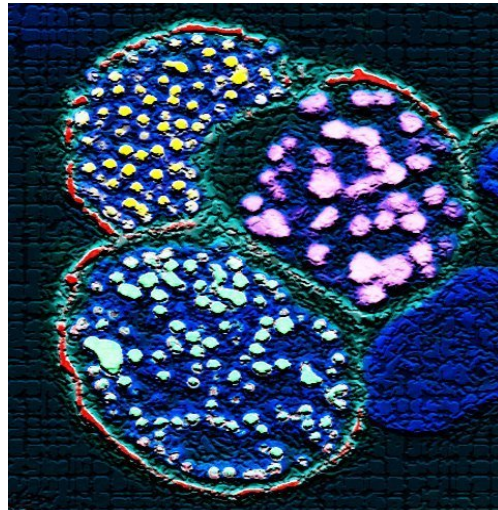


**Charakterisierung der putativen SERA-Cysteinproteasen-Familie  
während der Leberphase von *Plasmodium berghei*  
(Vincke und Lips, 1948).**



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

am Department Biologie der  
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

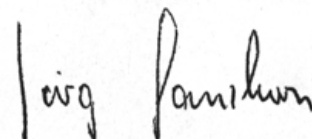
**Anja Schmidt-Christensen**

aus Weißwasser

Hamburg 2008

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. V. HEUSSLER  
Weiterer Gutachterin der Dissertation:  
Frau Professor Dr. I. BRUCHHAUS  
Tag der Disputation: 12. Dezember 2008

Hamburg, den 28. November 2008



Professor Dr. Jörg Ganzhorn  
Leiter des Departments Biologie

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>II</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 MALARIA .....	1
1.2 DER LEBENSZYKLUS VON <i>PLASMODIUM</i> .....	4
1.3 CYSTEINPROTEASEN.....	9
<i>Klassifikation</i> .....	9
<i>SERAs sind putative Cysteinproteasen der Papainfamilie</i> .....	13
<b>2. FORSCHUNGSBERICHT.....</b>	<b>17</b>
2.1 DIE FREISETZUNG INFEKTIÖSER MEROZOITEN IST EIN CYSTEINPROTEASEN-ABHÄNGIGER PROZESS .....	17
2.2 PbSERAs WERDEN STADIENSPEZIFISCH EXPRIMIERT UND ZUM ENDE DER LEBERPHASE STARK HOCHREGULIERT .....	18
2.3 PbSERAs WERDEN IN DER SPÄTEN LEBERPHASE PROZESSIERT .....	20
2.4 LOKALISATION DER PbSERAs IN DER EXO-ERYTHROZYTÄREN ENTWICKLUNGSPHASE.....	26
<i>Kolokalisationsstudien zur Prozessierung der PbSERAs</i> .....	26
<i>Lokalisation der zentralen SERA Proteasendomänen (Mittelteile)</i> .....	30
2.5 LOKALISATION VON PBDPAP3 UND PbSUB1 IN EXO-ERYTHROZYTÄREN ENTWICKLUNGSSTADIEN .....	33
2.6 ERGÄNZENDE DATEN .....	35
2.6.1 <i>Das endogene pbsera3 läßt sich nicht durch ein getaggetes pbsera3 ersetzen</i> .....	35
2.6.2 <i>konditionaler Knockout von pbsera3</i> .....	37
<b>3. DISKUSSION .....</b>	<b>40</b>
<b>4. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>50</b>
<b>5. ANTEILE DER AUTORIN AN DEN PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>56</b>
<b>6. WEITERE PUBLIKATIONEN MIT BETEILIGUNG DER AUTORIN.....</b>	<b>56</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>57</b>
<b>PUBLIKATIONEN</b>	

## ZUSAMMENFASSUNG

Malaria wird durch einen intrazellulären Parasiten der Klasse Apikomplexa verursacht. Der *Plasmodium* Lebenszyklus besteht aus einer abwechselnden Folge von invasiven und replikativen Entwicklungsstadien innerhalb des Wirbeltier-Wirts und dem Hauptüberträger, der weiblichen *Anopheles-Mücke*. Großes Interesse galt bisher der Aufklärung des *Plasmodium* Invasionsprozesses. Weniger detailliert untersucht ist jedoch, wie *Plasmodien* ihre Wirtszelle nach erfolgreich abgeschlossener Replikation verlassen.

Zum Ende der **exo-erythrozytären** Phase lösen sich *Plasmodium*-infizierte Hepatozyten von benachbarten Hepatozyten ab und merozoitengefüllte Vesikel - **Merosomen** genannt -, schnüren sich von infizierten Hepatozyten in das Lumen von Lebersinusoiden ab. Dabei werden die Merozoiten aus der PVM anhand eines **Cysteinproteasen**-abhängigen Prozesses freigesetzt und verteilen sich im Wirtszellzytoplasma. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die putativen „Serin Repeat Antigen“ (**SERA**) Cysteinproteasen in Hinblick auf die Beteiligung an der Merozoitenfreisetzung aus der Hepatoma-Wirtszelle untersucht. Anhand von RT-PCR und Promotoranalysen wurde ein **Transkriptionsprofil** der *P. berghei* SERAs (PbSERAs) während des gesamten Lebenszyklus` erstellt. Die Transkription der putativen Proteasen wird stadienspezifisch reguliert und PbSERA1-4 mRNA wird während der späten Leberphase des Parasiten stark hochreguliert. Zudem wurde die Synthese, **Prozessierung** und Lokalisierung der PbSERAs umfassend charakterisiert. Dafür wurden verschiedene Antiseren und monoklonale Antikörper gegen unterschiedliche Regionen von PbSERA1, PbSERA2, PbSERA3 und PbSERA4 hergestellt. Zusätzlich wurden transgene Parasiten generiert, die PbSERA3 mit einem C-terminalen TAP-Tag exprimieren. Western Blot Analysen zeigten, dass die PbSERA Pro-Peptide in der späten Leber- und Blutphase des Parasiten mehrfach prozessiert werden, resultierend in einer ca. 55 kDa Papain-ähnlichen Proteasendomäne. Einige *Plasmodium* SERA Proteine („Serin-Typ“ SERAs) besitzen ein katalytisches Serin im aktiven Zentrum der Proteasendomäne anstelle eines für „Cystein-Typ“ SERAs charakteristischen Cysteins. Interessanterweise unterscheidet sich die **Lokalisierung** der beiden Serin-Typ SERAs (PbSERA1 und PbSERA2) innerhalb der infizierten Hepatomazelle stark von den Cystein-Typ SERAs (PbSERA3 und PbSERA4). PbSERA1 findet sich in den multiplen Zellkernen des Parasiten, PbSERA2 in naher Assoziation zur parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) und PbSERA3 und PbSERA4 vorrangig im Parasiten-Zytoplasma, sowie zum Ende der exo-erythrozytären Entwicklung des Parasiten zunehmend in der



parasitophoren Vakuole. Mehrfache Versuche PbSERA3 genetisch auszuschalten, blieben ohne Erfolg und lassen daher eine essentielle Funktion von PbSERA3 vermuten. SERA Proteasen werden in *P. falciparum* Blutstadien bekanntlich von der Serinprotease **Subtilisin1** (PfSUB1) prozessiert, die innerhalb einer Prozessierungskaskade wiederum von der Cysteinprotease **Dipeptidyl Peptidase 3** (PfDPAP3) aktiviert wird. Für die Charakterisierung der *P.berghei* Homologen PbDPAP3 und PbSUB1 wurden Antiseren hergestellt und für Western Blot- und Immunfluoreszenzanalysen eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass beide Proteasen während der Leberphase exprimiert und auch aktiviert werden. Damit kann davon ausgegangen werden, dass es auch während der Leberphase zur Aktivierung der Proteasenkaskade PbDPAP3 - PbSUB1- PbSERA1-4 kommt.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha$	Alpha/anti
Abb.	Abbildung
AMA1	Apical Membrane Antigen 1
ANKA	ANtwerpen KAsapa
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary- oder Copy-DNA
CSP	Circumsporozoite Protein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPAP3	Dipeptidyl Peptidase 3
DTT	Dithiothreitol
E64	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-3-( <i>N</i> -{( <i>S</i> )-1-[ <i>N</i> -(4-guanidinobutyl)carbamoyl]3-methylbutyl}carbamoyl)oxirane-2-carboxylic acid
gDNA	genomische DNA
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSPG	Heparansulphat-Proteoglycan
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
$\mu\text{m}$	Mikro Meter
$\mu\text{M}$	Mikro Molar
MSP1	Merozoite Surface Protein1
P	<i>Plasmodium</i>
Pb	<i>P. berghei</i>
Pf	<i>P. falciparum</i>
pi	post Infection
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PV	parasitophore Vakuole
PVM	parasitophore Vakuolenmembran

RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger RNA
RT	Reverse Transkription
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SERA	Serin Repeat Antigen
sog.	sogenannt
SR-BI	Scavanger Receptor class B, type I
SUB1	Subtilisin 1
Tab.	Tabelle
TRAP	Thrombospondin-Related Adhesive Protein
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
z.Z.	zurzeit

IUPAC Kodierung für Nucleinsäuren

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymine
U	Uracil

IUPAC Kodierung für Aminosäuren

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

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Malaria

Der Erreger dieser Sumpf- oder auch Wechselfieber genannten Krankheit ist ein einzelliger Parasit der Gattung *Plasmodium*, welcher durch den Stich weiblicher *Anopheles-Mücken* übertragen wird. Die geographische Verteilung der Malaria ist bedingt durch die Verbreitung der *Anopheles-Mücke* und reicht von den tropischen und subtropischen Gebieten Afrikas, Südamerikas und Asiens bis in die gemäßigten Klimazonen hinein. Die Malaria ist in tropischen Gebieten unter 1500m eine der am meisten verbreiteten Infektionskrankheiten dieser Erde. Bisher konnte der Krankheit nur durch groß angelegte Ausrottungsversuche des Vektors – der *Anopheles-Mücke* – begegnet werden. Erst nach dem internationalen Verbot der Nutzung von DDT breitete sich die Krankheit wieder dramatisch aus. Die Zahl der jährlichen Neuinfektionen wird von der WHO weltweit auf über 500 Millionen, die Zahl der an Malaria Verstorbenen auf eine Million geschätzt, wobei ein Großteil afrikanische Kinder unter 5 Jahren und Schwangere betrifft (WHO, 2008). Mit zunehmender Globalisierung sind auch immer mehr Europäer betroffen. Allerdings werden z.Z. in Deutschland nicht mehr als 1000 Fälle pro Jahr durch Heimkehrer aus endemischen Gebieten gemeldet. Seit der wiedereingeführten Benutzung von Insektiziden in Innenräumen – dem sog. „Indoor Residual Spraying“ (IRS) – konnte erstmalig wieder ein signifikanter Rückgang von Malariafällen verzeichnet werden. Zehn von insgesamt vierzehn der heutzutage IRS nutzenden afrikanischen Länder greifen dabei wieder auf den Einsatz von DDT zurück.

Infektionen mit den humanpathogenen Malaria-Erregern *Plasmodium vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi* und *P. ovale* verlaufen selten tödlich. Die schwerste Form der Malaria – die Malaria tropica – wird durch *P. falciparum* verursacht. Obwohl sie nur etwa 15% aller Malariafälle

ausmacht, gehen fast alle Todesfälle und schweren Verläufe auf ihr Konto. Malaria ist therapierbar, aber bis heute ist noch keine flächendeckende Impfung gegen Malaria möglich. Die Inkubationszeit im Menschen liegt, in Abhängigkeit vom jeweiligen Erreger zwischen acht Tagen (*P. falciparum*) und maximal zwei Jahren (*P. vivax* und *P. ovale*). Betroffene klagen über grippeähnliche Frühsymptome. Die Todesursachen bei Malaria tropica sind vaskuläre Mikrozirkulationsstörungen im Gehirn und am Herzen. Eine schwere Komplikation ist die massive, hämolytische Anämie, die zur Hämoglobinurie führt und über ein akutes Nierenversagen zum Tode führen kann. Im Rahmen einer Malaria können auch neurologische Symptome wie Lähmungen und Krampfanfälle auftreten (zerebrale Malaria).

Im Malaria-Verbreitungsgebiet lebende Menschen sind vermehrt Infektionen mit *Plasmodium* Parasiten ausgesetzt. Dabei kommt es bei Erwachsenen und Jugendlichen langsam zur Ausbildung einer partiellen Immunität. Diese sog. „klinische“- oder Semi-Immunität führt zu sehr geringen Parasitämien ohne Krankheitserscheinungen und dem Eliminieren der Parasiten nach einigen Monaten. Da es aber regelmäßig zu Neuinfektionen mit *Plasmodien* kommt wird die Infektion aufrechterhalten. Der Antikörpertiter gegen die Gesamt-Blutstadien-Antigene von *Plasmodium* gilt als Ausdruck der Intensität und Dauer der Exposition, wohingegen ein altersabhängiger Anstieg dieses Titers bis zum Erreichen eines Plateaus im Alter von ca. 5 Jahren zu verzeichnen ist (Kamol-Ratanakul *et al.*, 1992).

Heutige Vakzinierungsstrategien zielen auf die Entwicklung von Lebendimpfstoffen, die eine sterile Immunantwort hervorrufen. *Plasmodium* Sporozoiten und Leberstadien sind ideale Ansatzpunkte für eine erfolgreiche Medikamenten- und Impfstoff-Entwicklung, da eine an diesem Punkt unterbrochene Infektionskette die Entwicklung des erythrozytären Zyklus und die damit assoziierte Pathologie verhindert werden könnte (Matuschewski und Mueller *et al.*, 2007; Oliveira-Ferreira *et al.*, 2001). Erste Erfolge erzielte die Immunisierung von Mäusen, Affen und Menschen mit *Plasmodium* Sporozoiten, die durch Bestrahlung attenuiert wurden. Die hervorgerufene sterile Immunität basiert dabei auf der Fähigkeit der abgeschwächten

Sporozoitien, Hepatozyten noch infizieren zu können, dann aber zu degradieren (Übersicht Rénia *et al.*, 2008; Hoffman *et al.*, 2002; Gwadz *et al.*, 1979; Clyde *et al.* 1973; Nussenzweig *et al.*, 1967). Bei der Herstellung von genetisch-attenuierten Parasiten (*engl.* „Genetically Attenuated Parasites“, GAP) macht man sich Methoden der reversen Genetik zu Nutze. Die gezielte Inaktivierung von Genen die für die Proteine UIS3, UIS4 oder P36p, P52 und P36 im Genom von *P. berghei* oder *P. yoelii* kodieren, wurden bereits für experimentelle Immunisierungen im Nagetier-Modell eingesetzt (Labaied *et al.*, 2007; Jobe *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2005a; Mueller *et al.*, 2005b; van Dijk *et al.*, 2005). Die genetisch-attenuierten Parasiten vermittelten einen kompletten sterilen Schutz vor nachfolgenden Infektionen mit virulenten *Plasmodium* Sporozoitien.

Erforscht werden auch Impfstoffe gegen die erythrozytäre Entwicklungsphase von *Plasmodium*, indem sie die Vermehrung von Merozoiten eindämmen und so den Verlauf einer Malaria mildern sollen (Übersicht Genton *et al.*, 2007). Transmissions-blockierende Vakzine induzieren eine neutralisierende Antikörper-Antwort im Menschen gegen *Plasmodium* Gametozyten- und Ookineten-Oberflächen Proteine (Kubler-Kielb *et al.*, 2007; Übersicht Saul, 2007). Die Antikörper werden mit dem Blut in die Mücke aufgenommen und verhindern dort die obligatorische Parasitenbefruchtung, Zygotenbildung und das Penetrieren des Mückenmitteldarms. Aufgrund der enormen Anpassungsfähigkeit der Parasiten kann bezweifelt werden, ob eine Impfung den Durchbruch im Kampf gegen die Malaria bringen kann. Daher müssen alternative Konzepte entwickelt werden werden.

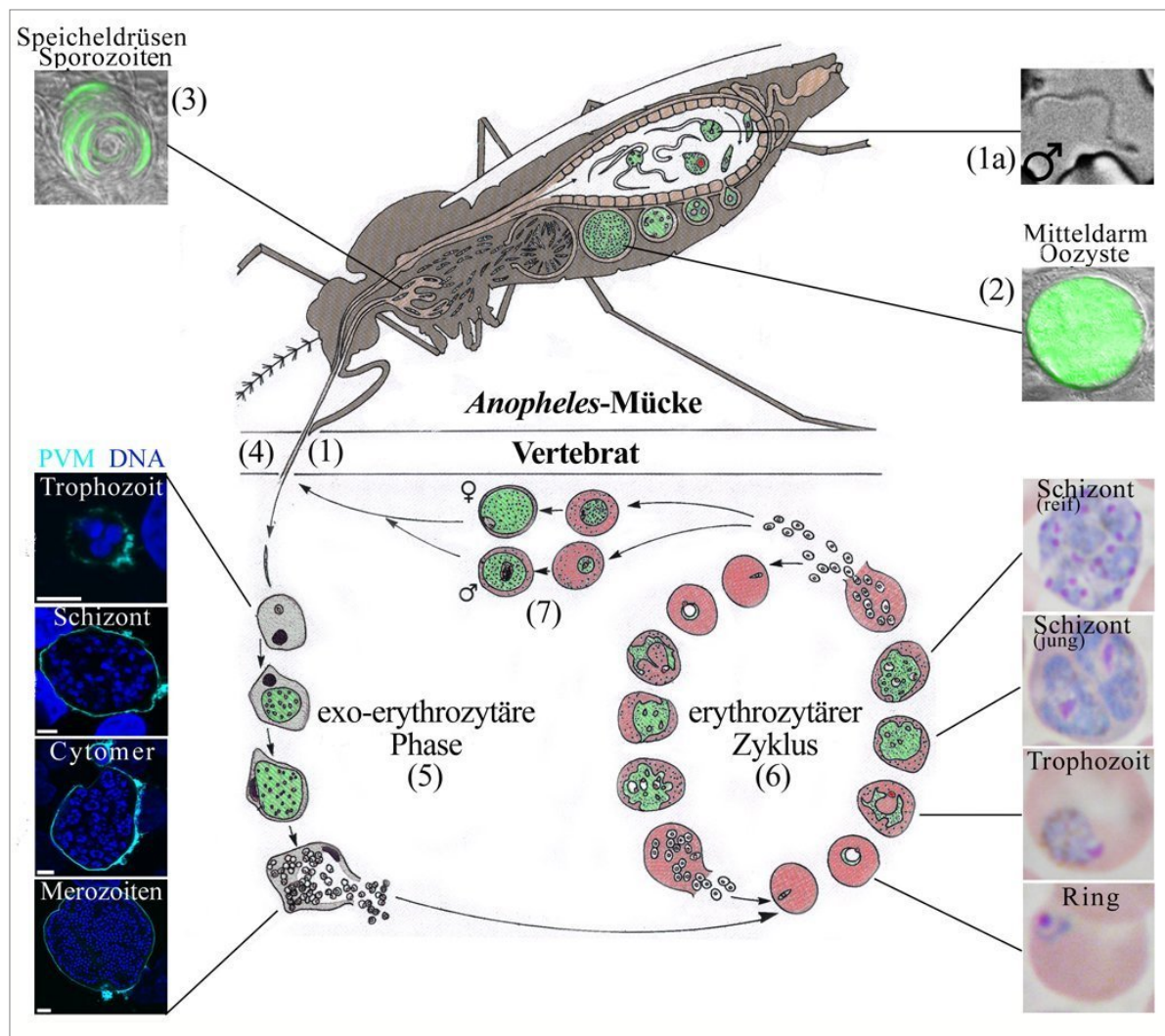
Derzeit verwendete chemoprophylaktische Medikamente gegen die Malaria beschränken sich auf Präparate, die die Vermehrung der *Plasmodien* während der erythrozytären Entwicklungsphase verhindern. Entsprechende Medikamente sind: Chloroquine (Resochin®) sowie die neueren Chemotherapeutika Pyrimethamin + Sulfadoxin (Fansidar®), Proguanil, Doxycyclin (verschiedene Handelsnamen), Mefloquin (Lariam®) und sog. ACT-Präparate (*engl.* „Artemisinin-based Combination Therapies“). Größtes Problem bei der

Malariabehandlung und Malariaprophylaxe sind die vermehrt auftretenden Chloroquin- und multi-resistenten Erreger. Hierdurch bedingt kommt es nun auch in Gebieten mit vormals geringem Risiko wieder vermehrt zu Infektionen. Das größte Potential haben Kombinations-Medikamente wie Atovaquon + Proguanil (Malarone®) und die Artemisinin Derivate Lumefantrin + Artemether (Riamet®), Amodiaquin + Artesunat und Pyrimethamin + Sulfadoxin (Fansidar®). Bisläng sind noch keine Resistenzen gegen den Wirkstoff Artemisinin aufgetreten. Medikamente wie Riamet®, Doxycyclin sowie sulfonamidhaltige Kombinationspräparate (z.B. Fansidar®) sind derzeit in Deutschland nicht zur Malariavorbeugung zugelassen.

## ***1.2 Der Lebenszyklus von Plasmodium***

*Plasmodium* gehört zur Klasse *Apicomplexa* und durchläuft einen zweigeteilten Lebenszyklus mit Wirtswechsel. Der Hauptwirt ist die weibliche *Anopheles*-Mücke, in der die sexuelle Differenzierung (Gamogonie) des Erregers stattfindet. Den Großteil der asexuellen Multiplikation (Schizogonie) verbringt der Einzeller intrazellulär im Leberendothel und roten Blutzellen von Wirbeltieren (Übersicht bei Peters *et al.*, 2002). Im Folgenden wird ein allgemeiner Überblick über den *Plasmodium* Lebenszyklus vermittelt (Abbildung 1). Der aktuelle Kenntnisstand zur exo-erythrozytäre Lebensphase des Parasiten wird am Ende des Kapitels detailliert vorgestellt.

Bei einer Blutmahlzeit an einem *Plasmodium*-infizierten Menschen oder Tier, nimmt die weibliche *Anopheles*-Mücke männliche und weibliche Gametozyten auf (1). Freigesetzte männliche Mikrogameten (Exocytose) befruchten die ebenfalls aufgenommenen Makrogameten und verschmelzen zur **Zygote**. Diese nistet sich als Ookinet zwischen Basal-



**Abbildung 1:** Lebenszyklus von *Plasmodium* Parasiten (Peters *et al.*, 2007; modifiziert), ergänzt mit eigenen mikroskopischen Aufnahmen von *P. berghei*. Bei der Blutmahlzeit an einem *Plasmodium*-infizierten Menschen oder Tier, nimmt die weibliche *Anopheles*-Mücke männliche und weibliche Gametozysten auf (1). Freigesetzte männliche Mikrogameten (Exocytose, 1a) befruchten die ebenfalls aufgenommenen Makrogameten und verschmelzen zu einer beweglichen Zygote oder Ookineten. Diese nistet sich im Mitteldarm der Mücke ein, und tritt nach einer Reduktionsteilung als Oozyste in die Sporogonie ein (2). Die entstandenen Sporozysten werden in das Hämocoel freigesetzt und wandern zur Speicheldrüse (3). Die Sporozysten werden dann bei der nächsten Blutmahlzeit auf den Menschen oder das Tier übertragen (4). Der Großteil der Parasiten tritt in den Blutstrom ein, wird zur Leber transportiert und invadiert aktiv Leberzellen. In der exo-erythrozytären Entwicklungsphase durchläuft der Parasit eine Schizogonie, ein Prozess ausgeprägten Wachstums und Replikation. Wiederholte Kernteilungen und eine anschließende Zellteilung bilden tausende infektiöse Merozoiten, welche die Blutgefäße erreichen und Erythrozyten infizieren. Die Abbildungen zeigen *P. berghei*-infizierte humane Hepatomazellen (HepG2), die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion fixiert und mit anti-Exp1 Antikörpern (färbt die parasitophore Vakuolenmembran, PVM) und DAPI (DNA) gefärbt wurden. Balken: 5µm. (5). Während der erythrozytären Vermehrung bilden sich durch Schizogonie ebenfalls Merozoiten, welche erneut Erythrozyten befallen. Die Abbildungen zeigen Blutausrichungen einer mit *P. berghei*-infizierten Maus, die mit Wright-Färbung fixiert und angefärbt wurde (DNA = rosa, Parasitenzytoplasma = blau, Hämozyin = braun) (6). Nach 2-3 Schizogonie-Zyklen entwickeln sich weibliche und männliche Gametozysten (7), die von einer weiblichen *Anopheles*-Mücke aufgenommen werden (1).



membran und Darmepithel der Mücke ein (2), um nach einer Reduktionsteilung als **Oozyste** in die Sporogonie einzutreten. In einer Oozyste entstehen etwa 4000 **Sporozoiten**, die ins Hämocoel freigesetzt werden und zur Speicheldrüse wandern (3). Die Sporozoiten werden bei der nächsten Blutmahlzeit der Mücke auf den Menschen übertragen (4). Beim Stich werden im Durchschnitt etwa 10-100 Sporozoiten in die Haut injiziert (Ponnudurai *et al.*, 1991; Rosenberg *et al.*, 1990). Davon dringen ca. 30% in Lymphgefäße ein und enden im Lymphknoten, in dem sich einige zu einkernigen exo-erythrozytären Stadien entwickeln können. In diesen Stadien werden sie von dendritischen Zellen des Immunsystems durch Phagozytose aufgenommen (Amino *et al.*, 2006). Der Großteil der Parasiten treten in den Blutstrom ein und werden innerhalb von 30 Minuten zur Leber transportiert (Fairly, 1947), wo sie in den Lebersinusoiden das Blutgefäß verlassen und aktiv in Hepatozyten eindringen (Kappe *et al.*, 2003). Bei *P. falciparum* und *P. malariae* wird der exo-erythrozytäre Zyklus (5) mit der Bildung von Merozoiten beendet. Bei *P. vivax* und *P. ovale* verbleiben auch während des erythrozytären Zyklus Parasiten in der Leber. Diese sind nicht aktiv und werden als Hypnozoiten bezeichnet (Cogswell, 1992).

Während der erythrozytären Vermehrung (6) verbrauchen die *Plasmodien* bis zu 80 Prozent des Hämoglobins der infizierten Zelle. Aus den meist ringförmigen **Trophozoiten** entwickeln sich **Schizonten**, die sich zu **Merozoiten** teilen (8-32 bei *P. falciparum*). Die Merozoiten befallen erneut Erythrozyten und starten so einen neuen erythrozytären Entwicklungszyklus (6). Nach 2-3 Schizogonie-Zyklen entwickeln sich weibliche und männliche Gametozyten (7), die von einer weiblichen *Anopheles-Mücke* aufgenommen werden können und damit den Entwicklungszyklus des Parasiten schließen.

#### *DIE EXO-ERYTHROZYTÄRE ENTWICKLUNGSPHASE IM DETAIL*

Die Vermehrung der *Plasmodium* Parasiten in der Leber verläuft asymptomatisch und eignet sich deshalb als Ziel für die Entwicklung von Impfstoffen und Prophylaxe-Strategien. Ein

weiterer Vorteil bei der Impfstoffentwicklung ist die Tatsache, dass Hepatozyten, im Gegensatz zu Erythrozyten, Parasitenantigene über MHC-Moleküle präsentieren können.

Sobald sich die **Sporozoiten** im Blutstrom befinden, erreichen sie schnell die Lebersinusoiden und infizieren innerhalb von Minuten Hepatozyten (Shin *et al.*, 1982). Die Selektivität des Prozesses involviert vermutlich spezifische Wechselwirkungen zwischen Sporozoiten Oberflächenproteinen und Wirtszellmolekülen. Dabei spielt die Erkennung der **Heparan-Sulphat-Proteoglycane** (HSPGs) von Hepatozyten eine wichtige Rolle. HSPGs der Hepatozyten oder der extrazellulären Matrix werden vermutlich durch kleinste Kanäle in Endothelzellen („*Fenestre*“ oder Fensterchen) in Lebersinusoiden exponiert. Die Interaktion mit der relativ konservierten Region II der Sporozoitenantigene „**Circumsporozoite Protein**“ (CSP) und „**Trombospondin Related Apical Protein**“ (TRAP), führt zur Sequestrierung der Sporozoiten (Rathore *et al.*, 2002; Frevort *et al.*, 1996; Sinnis *et al.*, 1996 und 1994; Cerami *et al.*, 1992). Nachdem die Sporozoiten Kupfferzellen des sinusoidalen Endothels überwunden haben (Baer *et al.*, 2007), durchqueren sie zunächst aktiv mehrere Hepatozyten, bevor sie sich in einem Hepatozyten etablieren (Mota *et al.*, 2001). Das gezielte Invadieren von Hepatozyten wird vermutlich über den erst kürzlich identifizierten „**Scavenger Receptor class B, type I**“ (SR-BI) Rezeptor des Parasiten vermittelt (Rodrigues *et al.*, 2008).

Der Parasit entwickelt sich innerhalb des Hepatozyten in einer parasitophoren Vakuole (PV). Die PV ist von der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) umgeben. Diese besteht zumindest teilweise aus der Plasmamembran der Hepatozyten, welche sich während der Invasion des Hepatozyten durch den Sporozoiten nach innen einstülpt (Meis *et al.*, 1983).

Innerhalb weniger Tage durchlaufen die Leberstadien eine **Schizogonie** – einen Prozess ausgeprägten Wachstums und verstärkter Replikation. Die PVM vergrößert sich mit dem Parasiten und erstreckt sich schon bald mit finger-ähnlicher Ausdehnung über das Wirtszellzytoplasma (Aikawa *et al.*, 1984), besonders ausgebildet nahe dem Nukleus und der Plasmamembran der Wirtszelle. Das dient wahrscheinlich der verbesserten

Nahrungsaufnahme aus dem Zytoplasma. Parasitenantigene werden in die PVM eingebaut und in das Hepatozytenzytoplasma exportiert und können über MHC Klasse I Moleküle auf der Hepatozytenoberfläche präsentiert werden (Renia *et al.*, 2008 und 1990). Wiederholte Kernteilungen und eine anschließende Zellteilung bilden letztendlich tausende von infektiösen **Merozoiten**, welche die Blutgefäße erreichen müssen, um rote Blutzellen zu infizieren. In diesem Prozess unterliegt die Wirtszelle einigen dramatisch morphologischen Veränderungen. Es konnte gezeigt werden, dass sich zum Ende der exo-erythrozytären Phase mit *Plasmodium*-infizierte Hepatozyten von benachbarten Hepatozyten ablösen. Dabei bilden sich merozoitengefüllte Vesikel – **Merosomen** genannt –, welche sich von infizierten Hepatozyten in das Lumen von Lebersinusoiden abschnüren (Sturm und Heussler, 2007; Baer *et al.* 2007; Sturm *et al.*, 2006). Die Merozoiten entgehen dadurch dem Angriff von Makrophagen und Kupffer-Sternzellen und gelangen sicher in die Blutbahn. In vitro lösen sich zum Ende der exo-erythrozytären Phase *P. berghei*-infizierte HepG2-Zellen aus dem Zellverband, gehen in den Zellkulturüberstand über und bilden ebenfalls Merosomen (Sturm *et al.*, 2006). Dabei werden die Merozoiten aus der PVM anhand eines Cysteinproteasen-abhängigen Prozesses freigesetzt und verteilen sich im Wirtszellzytoplasma (Sturm *et al.*, 2006; Meis *et al.*, 1985). Es wurde gezeigt, dass die Hemmung der Proteasen durch Zellmembran-permeable Inhibitoren die Zerstörung der PVM und die Entstehung von Merosomen vollständig blockierte. Da Proteasen offenbar eine entscheidene Rolle bei der Freisetzung von Merozoiten spielen, sind die Identifizierung der beteiligten Proteasen und deren Wirkungsmechanismen von größtem Interesse. Im Vordergrund der in Frage kommenden Proteasen steht die Familie der putativen „Serin Repeat Antigen“ (SERA) Proteasen, die auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist. Die Expression dieser vorhergesagten Proteasen wird während der späten Leberphase des Parasiten stark hochreguliert, um das geordnete Freisetzen der Merozoiten aus der Wirtszelle zu gewährleisten.

### 1.3 Cysteinproteasen

Proteasen haben nicht nur bei der Freisetzung der Parasiten, sondern während des gesamten Lebenszyklus des Parasiten eine herausragende Bedeutung. Bevor auf die biologischen Funktionen von SERA Proteasen eingegangen wird, soll deshalb kurz die Klassifikation und die biochemischen Grundlagen von Proteasen im Allgemeinen erklärt werden.

#### *KLASSIFIKATION*

Nach der Nomenklatur des Enzymkomitees (EC) der Internationalen Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie zählen die Proteasen (Peptidasen, EC 3.4.xx.xx) zur Enzymhauptklasse der Hydrolasen (EC 3). Die Proteasen lassen sich in zwei Klassen unterteilen. **Exopeptidasen** hydrolysieren Peptidbindungen vom amino- oder carboxyterminalem Ende. **Endopeptidasen**, auch Proteinase genannt, hydrolysieren Peptidbindungen im Inneren eines Polypeptidsubstrates. Die unspezifische, vollständige Proteolyse wird z.B. im lysosomalen Kompartiment durch die Endopeptidasen eingeleitet. Exopeptidasen bewirken den weiteren Abbau zu Dipeptiden und Aminosäuren (Bohley *et al.*, 1992).

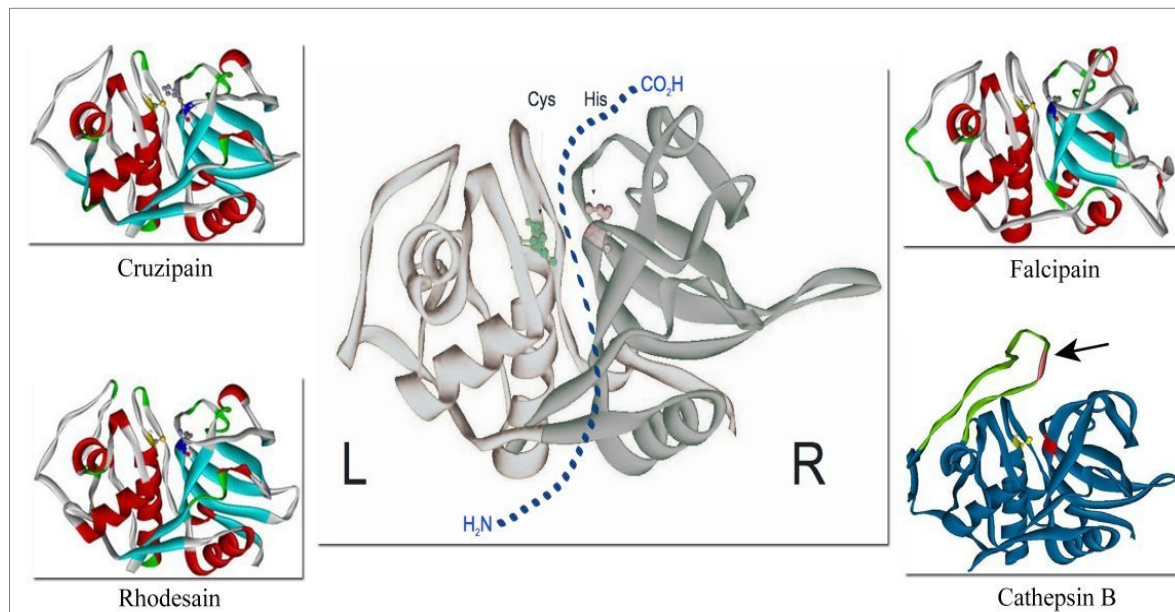
*Endopeptidasen.* Endopeptidasen werden aufgrund ihres katalytischen Mechanismus in fünf Klassen unterteilt. Nach den charakteristischen Aminosäureresten im katalytischen Zentrum unterscheidet man **Cystein-** (EC3.4.22.xx), **Serin-** (EC3.4.21.xx), **Threonin-** (EC3.4.25.xx), **Aspartyl-** (EC3.4.23.xx) und **Metallopeptidasen** (EC3.4.24.xx, Barrett *et al.*, 1998). Den ersten drei Klassen dienen SH- oder OH-Gruppen direkt unter Ausbildung eines Thio- bzw. Oxyat-Ions als Nukleophil (Storer und Menárd, 1994). Innerhalb einer Enzymklasse werden Enzyme, die in ihrem evolutionären Ursprung verwandt sind, in Superfamilien (Clans) und Familien eingeteilt. Cysteinproteasen, zu denen auch die SERA Proteasen gerechnet werden,

sind laut MEROPS-Datenbank weiter in 7 Superfamilien (Clans) eingeteilt: **Papain-Clan (Clan CA)**, Caspase-Clan (CD), Adenain-Clan (CE), Clan der Pyroglutamyl-Peptidase I (CF), Clan des Hedgehog Proteins (CH), Sortasen C (CL) und Clan C (C).

*Clan CA.* Die Vertreter der Papainsuperfamilie besitzen die katalytische Triade aus Cystein, Histidin und Asparagin. Ebenfalls essentiell für die katalytische Aktivität ist ein dem Cystein vorausgehendes Glutamin (Menárd und Storer, 1992). Viele Mitglieder der Papainsuperfamilie lassen sich durch E64 (Rich, 1986), Leupeptin (Katunuma und Kominami, 1995; Shaw, 1990) oder die natürlich vorkommende Gruppe der Cystatine (Abrahamson, 1994) inhibieren. Die Papainsuperfamilie wird entsprechend der MEROPS-Datenbank momentan in 21 Familien unterteilt, so z.B. die **Papainfamilie C1** (Clan CA, Familie C1) und die Calpainfamilie C2 (Clan CA, Familie C2).

*Die Papainfamilie C1.* Die Papainfamilie C1 umfasst ihrerseits zwei weitere Unterfamilien. Die kleinere Unterfamilie C1B (Bleomycin) beinhaltet zytosolische Peptidasen, während die **Unterfamilie C1A** (Papain) aus lysosomalen und sezernierten Peptidasen besteht. Letztere umfasst humane lysosomale Cathepsine wie Cathepsin B, C, H, L und S, im weiteren die Cathepsine F, K, O, V, W und X (Brix *et al.*, 2008), das pflanzliche Papain (EC3.4.22.2), die Parasitenproteasen Cruzipain und Rhodesain (bei Trypanosomen), sowie die *Plasmodium* Proteasen Falcipain 1-3 (Abb. 2) und die putativen **SERA** Proteasen. Aufgrund der Sequenzhomologien werden diese Enzyme in Cathepsin-L-ähnlich, Cathepsin-B-ähnlich und Cathepsin-F-ähnlich gruppiert. Bisher konnten die dreidimensionalen Proteinstrukturen von mehreren Cysteinproteasen, die zur Papainfamilie C1 gehören, mittels Röntgenkristallstrukturanalyse aufgeklärt werden. Die entsprechenden Strukturen sind über die Brookhaven Proteindatenbank (PDB) zugänglich.

Der Wirkungsbereich von Proteasen reicht vom relativ unspezifischen Proteinabbau bis zu hochspezifischen Prozessierungen in proteolytischen Kaskaden. Zu letzteren gehören z.B. der



**Abbildung 2:** Cathepsin-L-like (CL) und Cathepsin-B-like (CB) Cysteinproteasen. *Mitte:* Die L- und R-Domäne der Papain-like Cystein-Proteasen (am Beispiel von CL). Ein Substrat (blau dargestellt) wird entlang der "active site cleft" gebunden, mit dem C-Terminus nach oben. Hohe Homologie bei den CL Proteasen der Protozoen: *Trypanosoma cruzi* Cruzipain (*links oben*), *Trypanosoma brucei rhodesiense* Rhodesain (*links unten*) und *Plasmodium falciparum* Falcipain-2 (*rechts oben*). *Rechts unten:* Dreidimensionale Struktur des humanen Cathepsin B. Es gibt für CB-like Proteasen einen sog. „occluding loop“ (Pfeil) mit zwei His-Resten, die für die zusätzliche Exopeptidase-Aktivität dieser Proteasen verantwortlich sind.

programmierte Zelltod, die Komplementaktivierung und die Fibrinbildung. Die präzise Kontrolle der Aktivität dieser Enzyme ist also von enormer Bedeutung. Sie kann auf drei unterschiedlichen Ebenen erfolgen: durch die Kompartimentierung von Substraten und Enzymen; durch endogene Inhibitoren, die für alle Proteasenfamilien existieren, und durch die erst am Ort der Wirkung erfolgende Aktivierung einer inaktiven Vorstufe, die sog. **Prozessierung**. Letztere erfolgt durch limitierte autokatalytische Proteolyse oder durch eine andere Protease. Cathepsin C wird beispielsweise aktiviert, indem die Pro-Region durch die Cathepsine L oder S abgespalten wird (Dahl *et al.*, 2001). Demgegenüber sind die Cathepsine B und S sehr gut untersuchte Beispiele für die autokatalytische Aktivierung, die durch pH-Wert Erniedrigung ausgelöst wird (Quraishi *et al.*, 2001). Bei der Prozessierung zur Wirkform kann es zu erheblichen strukturellen Veränderungen des Vorläufermoleküls kommen, in dessen Verlauf sich das aktive Zentrum erst ausbildet, wie z.B. bei einigen Caspasen. Bei den Cysteinproteasen der Papainfamilie (Clan CA, Familie C1) ist das aktive Zentrum jedoch

schon im Vorläufermolekül vollständig ausgebildet. Es wird aber durch die N-terminale Pro-Sequenz blockiert (Cygler *et al.*, 1997).

Die humanen Cathepsine L und B kommen in beinahe jedem Gewebe des menschlichen Körpers vor, während die Cathepsine F, K, N, S, V, W Gewebe-selektiv exprimiert werden. (Lecaille *et al.*, 2002). Das pH-Optimum der meisten lysosomalen Cystein-Proteasen liegt im sauren Bereich. In neutralem bzw. schwach basischem Milieu werden sie rasch inaktiviert (Turk *et al.*, 1993; Kirschke *et al.*, 1989). Parasitenproteasen behalten dagegen ihre Aktivität auch bei neutralem oder schwach basischem pH (Sajid *et al.*, 2002; Caffrey *et al.*, 2001; Eakin *et al.*, 1992). Dieses hängt mit der Aufgabe der jeweiligen Proteasen zusammen. Während die humanen Cysteinproteasen eine gut kontrollierte Funktion innerhalb der Zelle ausüben müssen, sind die Parasitenproteasen auch für extrazelluläre Prozesse zuständig, u.a. für die Einnistung und Verbreitung der Parasiten in Gewebe und Zellen, Invasion und Freisetzung, Minderung der Immunantwort des Wirtes, Pathogenität und Ernährung der Parasiten. (Bruchhaus *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2003; Sajid *et al.*, 2002; Rosenthal, 1999; Tort *et al.*, 1999; Mottram *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 1992; North *et al.*, 1990; McKerrow, 1989). So spielen z. B. die Falcipaine für die Ernährung von *Plasmodien* durch proteolytischen Abbau von Hämoglobin eine entscheidende Rolle (Rosenthal *et al.*, 2002). Gewebe-invadierende Eigenschaften von Amöben sind vor allem auf die Sezernierung oder auch Oberflächenassoziation von „*Entamoeba histolytica* Cysteine Proteases“ (EhCPs) zurückzuführen (Jacobs *et al.*, 1998; Leippe *et al.*, 1995). Zudem konnte gezeigt werden, dass EhCP-A5, nicht jedoch EhCP-A1 und EhCP-A2, an Leberabzessbildung im Tiermodell beteiligt sind (Tillak *et al.*, 2005; Hellberg *et al.*, 2001) Die Charakterisierung von Parasiten- und Wirtszellproteinen, die in den Prozess der Invasion beteiligt sind, lieferte ein detailliertes Verständnis über involvierte Mechanismen (Sibley *et al.*, 2004). Diverse Strategien zur Invasion reichen von Phagozytose (z.B. *Leishmania*) und induzierter Aufnahme (z.B. *Trypanosoma cruzi*) bis hin zur aktiven Penetration von Wirtszellen (z.B. *Plasmodium* und

verwandte Apikomplexa). Invasionsprozesse und aktives „gliding“ (oder Fortbewegen) von *Plasmodium* und *Toxoplasma* basieren auf Aktin-Polymerisierung des Parasiten und regulierte Sezernierung von Zelloberflächen-Adhäsinen (u.a. TRAP bei *Plasmodium* und MIC2 bei *Toxoplasma*), welche zur Wirtszellerkennung beitragen, indem sie spezifisch mit Glucosamino-Glycanen (GAGs) der Wirtszelloberfläche interagieren.

Über die Freisetzung von *Plasmodium* Merozoiten ist hingegen noch wenig bekannt. Mit Ausnahme von Ookineten, müssen invasive Stadien (Sporozoiten, Merozoiten der exo-erythrozytären und erythrozytären Phase) die parasitophore Vakuole und kurz danach die Wirtszelle verlassen, um sich weiter zu vermehren und zu überleben. Inhibitorstudien deuten darauf hin, dass multiple proteolytische Prozesse während der Freisetzung von Schizonten-infizierten Erythrozyten (Arastu-Kapur *et al.*, 2007) sowie Schizonten-infizierten Hepatozyten (Sturm *et al.*, 2006) beteiligt sind. Die Behandlung von intrazellulären Schizonten mit dem Cysteinproteaseinhibitor E64 zeigte die Akkumulation von Membranschlüssen vitalen Merozoiten in der erythrozytären Phase (Wickham *et al.*, 2003; Salmon *et al.*, 2001) und der exo-erythrozytären Phase von *Plasmodium* (Sturm *et al.*, 2006). In diesem Zusammenhang konnten einige Cysteinproteasen identifiziert werden (Rosenthal *et al.*, 2004). Diese beinhalten die CL-ähnliche Cysteinprotease Falcipain-1 (Sijwali *et al.*, 2004; Eksi *et al.*, 2004), die in den Nahrungsvakuolen vorkommenden Hemoglobinasen Falcipain 2/2` und 3 (Sijwali *et al.*, 2001; Shenai *et al.*, 2000) und die Multigenfamilie der SERAs (Miller *et al.*, 2002; Bzik *et al.*, 1988; Delplace *et al.*, 1985).

#### *SERAS SIND PUTATIVE CYSTEINPROTEASEN DER PAPAINFAMILIE*

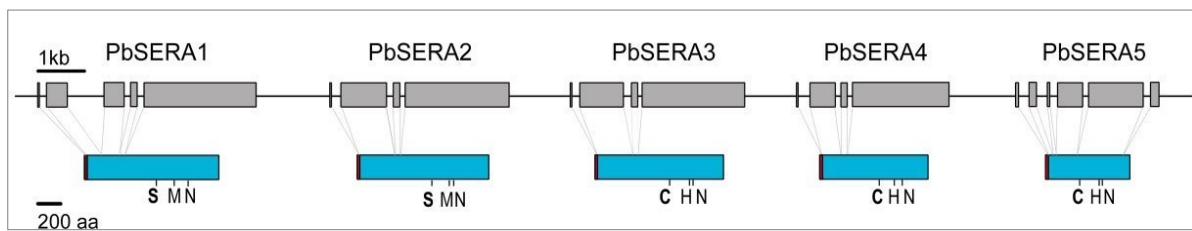
*Plasmodium* SERAs besitzen eine zentrale Domäne mit starker Homologie zur Familie der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen (Clan CA, Familie C1). Sie sind an der Freisetzung von Sporozoiten aus Oozysten (Aly *et al.*, 2005) und vermutlich auch an der Freisetzung von Merozoiten aus infizierten Erythrozyten und Hepatozyten beteiligt, (Blackman, 2008;



Schmidt-Christensen *et al.*, 2008; Arisue *et al.*, 2007; Aly *et al.*, 2005; Bourgon *et al.*, 2004; Hodder *et al.*, 2003).

*P. falciparum* SERA5 (PfSERA5) ist das zurzeit am besten charakterisierteste Protein der Familie und dessen N-terminale Domäne gilt zudem als Impfstoffkandidat. PfSERA5 wurde erstmals 1985 von P. Delplace und Kollegen als „P126“ bzw. 50 kDa prozessiertes Antigen in der PV von parasitierten Erythrozyten beschrieben. Es folgten die Identifizierung von PfSERA6 oder „SERP-H“ (Knapp *et al.*, 1991) und PfSERA4, im Originalpaper bezeichnet als „SERA3“ (Fox und Bzik, 1994).

Einige SERA Proteine („Serin-Typ“ SERAs) besitzen ein katalytisches Serin im aktiven Zentrum der Proteasedomäne anstelle eines für „Cystein-Typ“ SERAs charakteristischen Cysteins (Hodder *et al.*, 2003; Bourgeon *et al.*, 2004). SERAs konnten bisher in allen untersuchten *Plasmodium* Spezies identifiziert werden. Zusätzlich existiert jeweils ein *sera* Gen in *Theileria parva* und *T. annulata*, die auch zur Klasse Apicomplexa gehören (Arisue *et al.*, 2007). Die putativen Proteasen werden, mit einer Ausnahme, von einem zusammenhängenden Gen-Cluster kodiert, dessen Komplexität abhängig von der jeweiligen Spezies ist. Alle *Plasmodium* Spezies besitzen drei Cystein-Typ SERAs und eine variable Anzahl von Serin-Typ SERAs. Humanpathogene Spezies (*P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. ovale* und *P. vivax*) verfügen insgesamt über 7-14 *sera* Gene. Nagerpathogene Spezies (*P. berghei*, *P. yoelii* und *P. chabaudi*) besitzen fünf *sera* Gene (Abb. 3), wohingegen nur drei *sera* Gene in *P. gallinaceum* identifiziert wurden, da diese keine Serin-Typ SERAs aufweisen (Arisue *et al.*, 2007; Kooij *et al.*, 2005; Bourgon *et al.*, 2004; Aoki *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2002; Carlton *et al.*, 2002; Gor *et al.*, 1998; Kiefer *et al.*, 1996). In erythrozytären Entwicklungsstadien des Parasiten werden PfSERAs als 100-130 kDa Vorstufen synthetisiert. Für ihre Aktivierung unterliegen sie mehrfachen Prozessierungsschritten (Debrabant, 1992; Debrabant und Delplace, 1989; Delplace *et al.*, 1988, 1987 und 1985) durch Subtilisin1 (SUB1) Spaltung (Yeoh *et al.*, 2007).



**Abbildung 3:** Genetische Organisation des *pbsera* Clusters und vorhergesagte PbSERA Proteine (Maßstabsgetreu). (**Oben**) Die *pbsera* Gene liegen Tandem-ähnlich hintereinander in einem Gen-Cluster. Die Struktur der *pbsera* Gene ist dargestellt mit Exons als *graue Kästchen*, *Linien* zwischen den Kästchen repräsentieren Introns. (**Unten**): Die PbSERA Proteinstrukturen sind als *blaue Kästchen* gezeigt mit Signalpeptid (rot) und vorhergesagten katalytischen Aminosäuren des aktiven Zentrums. PbSERA1 und PbSERA2 verfügen über eine katalytische Triade von Serin (S), Methionin (M) und Asparagin (N); PbSERA3-5 besitzen eine katalytische Triade bestehend aus Cystein (C), Histidin (H) und Asparagin (N).

Synchron mit der Freisetzung der Merozoiten aus den Erythrozyten wird das PfSERA5 Peptid in ein N-terminales 47-kDa, ein zentrales 56-kDa und in ein C-terminales 18-kDa Fragment prozessiert. Die 47-kDa- und 18-kDa- Fragmente bleiben über Disulfidbrücken verbunden und scheinen mit der Merozoitenoberfläche assoziiert zu sein, während die zentralen 50- und 6-kDa Spezies beim Austreten der Schizonten verloren gehen (Li *et al.*, 2001; Debrabant, 1992; Delplace, 1987). Die Leupeptin-abhängige Inhibition der PfSERA5 Prozessierung vom 56-kDa Fragment zum murenen 50-kDa Fragment erlaubte die Freisetzung von Blutstadien-Merozoiten aus der PVM, inhibierte jedoch die Freisetzung aus der Wirtszelle. Interessanterweise konnte ein ähnlicher Phänotyp bei E64- und teilweise auch bei Antipain-behandelten infizierten Hepatozyten beobachtet werden, wohingegen Leupeptin den Austritt von reifen Merozoiten aus der PVM blockierte (Schmidt-Christensen *et al.*, 2008).

Knockout-Studien von *pfsera* Genen sollten Hinweise auf die Funktion der putativen Proteasen liefern, jedoch ergab die Deletion von *pfsera1-4* und *pfsera7-9* keinen nennenswerten Nachteil für die erythrozytäre Entwicklungsphase des Parasiten (Tab.1). Nur die Gene kodierend für die Proteine PfSERA5 und PfSERA6 konnten bisher nicht deletiert werden und gelten daher als essentiell für die Blutphase (McCoubrie *et al.*, 2007; Miller *et al.*,

2002). Im Jahre 2005 gelang der Arbeitsgruppe von K. Matuschewski der Knockout des ausschließlich während der sexuellen Vermehrung in der Mücke exprimierten *pfsera8* Homologs *pbsera5* in *P. berghei*. Die Analyse des resultierenden *pbsera5*-KO Phänotyps zeigte, dass das PbSERA5 Protein essentiell für die Freisetzung von Sporozoitien aus Oozysten ist (Aly *et al.*, 2005). Es wird daher vermutet, dass SERAs auch in anderen Entwicklungsstadien am Austritt des Parasiten aus der Wirtszelle beteiligt sein könnten, so auch in der exo-erythrozytären Phase. Daher steht als Ziel dieser Arbeit die Charakterisierung der PbSERAs in Hinblick auf eine mögliche Beteiligung dieser Proteasen bei der Freisetzung von Merozoiten aus infizierten Leberzellen.

PROTEASE IN <i>P.FALIPARUM</i> (PlasmoDB)	KO PHÄNOTYP (nur Blutphase)	REFERENZ	HOMOLOGE PROTEASE IN <i>P.BERGHEI</i> (GeneDB)	KO PHÄNOTYP	REFERENZ
<b>PfSERA1</b> PFB0360c	-	(2)			
<b>PfSERA2</b> PFB0355c	-	(1)			
<b>PfSERA3</b> PFB0350c	-	(1)			
<b>PfSERA4</b> PFB0345c	SERA5 mRNA hochreguliert	(2)	<b>PbSERA1</b> PB000108.00.0	-	(4)
<b>PfSERA5</b> PFB0340c	Lethal?	(1),(2)	<b>PbSERA2</b> PB107093.00.0	-	(4)
<b>PfSERA6</b> PFB0335c	Lethal?	(1)	<b>PbSERA3</b> PB000107.03.0	Lethal?	(4)
<b>PfSERA7</b> PFB0330c	-	(1)	<b>PbSERA4</b> PB000352.01.0	iv Injektion von <i>pbsera4</i> -KO Sporozoitien: Blutstadien um 2 Tage verzögert	(4)
<b>PfSERA8</b> PFB0325c	-	(1)	<b>PbSERA5</b> PB000649.01.0	Sporozoitien Austritt aus Oozysten blockiert	(3)
<b>PfSERA9</b> PFJ0135c	-	(2)			

**Tabelle 1:** SERA Nomenklatur und SERA Knockout-Studien. Die SERA-Verwandtschaftsverhältnisse in *P. falciparum* und *P. berghei* spiegeln sich **nicht** in der Nomenklatur (Arisue *et al.*, 2007) wieder. Direkte Homologien zwischen *P. falciparum*- und *P. berghei*- SERAs finden sich nur bei den Cystein-Typ SERAs (grau unterlegt). (KO) Knockout, (-) kein Phänotyp. Referenzen: (1) Miller *et al.*, 2002 ; (2) McCoubrie *et al.*, 2007; (3) Aly *et al.*, 2005; (4) Matuschewski und Putrianti, persönliche Mitteilung.

## 2. FORSCHUNGSBERICHT

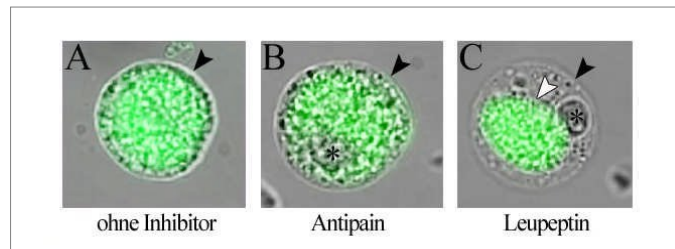
Hier werden die zentralen Punkte aus folgenden Veröffentlichungen dargestellt:

Schmidt-Christensen A, Sturm A, Horstmann S and Heussler VT (2008a): Expression and processing of *Plasmodium berghei* SERA3 during liver stage. *Cell Microbiol* **10** (8), 1723-1734.

Schmidt-Christensen A, Witt T, Lehmann C and Heussler VT (2008b): Characterization of putative SERA cysteineproteases during liver stage development of *P. berghei*. *Cell Microbiol*, submitted.

### ***2.1 Die Freisetzung infektiöser Merozoiten ist ein Cysteinproteasen-abhängiger Prozess***

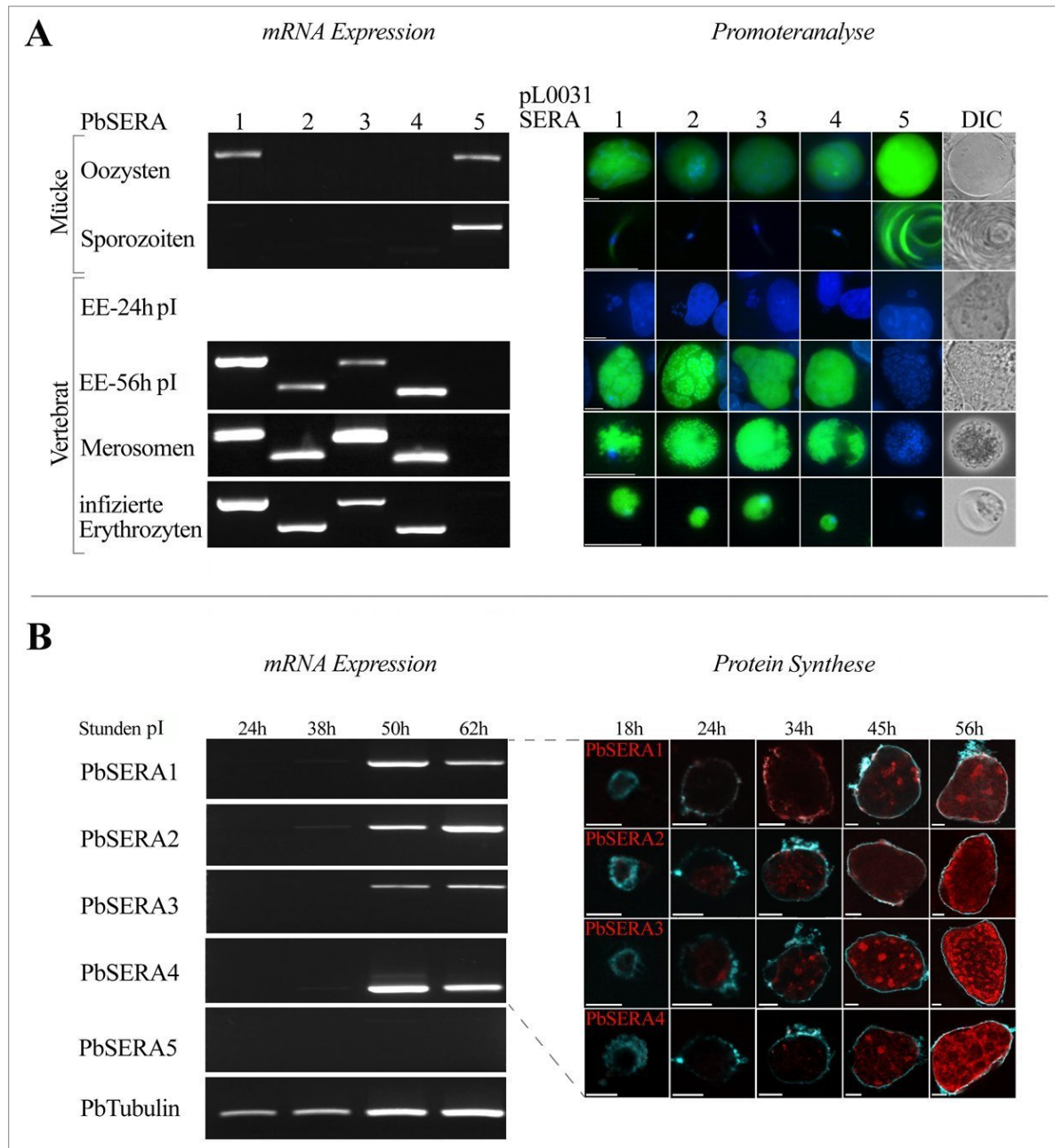
Es wurde gezeigt, dass Cysteinproteaseninhibitoren den Austritt von *Plasmodium*-Merozoiten aus infizierten Erythrozyten (Wickham *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2002; Salmon *et al.*, 2001) und Leberzellen (Sturm *et al.*, 2006) inhibieren. Die Behandlung von exo-erythrozytären *P. berghei*-Schizonten mit dem irreversiblen Cysteinproteaseninhibitor E64 *in vitro* blockierte das Ablösen von Merozoiten-gefüllten HepG2-Zellen komplett (Sturm *et al.*, 2006). Die Cystein- und Serinproteaseninhibitoren Antipain und Leupeptin inhibierten diesen Prozess ebenfalls, allerdings weniger effizient als E64. Infizierte Zellen, die sich trotz Inhibitor-Behandlung ablösten, zeigten einen unterschiedlichen Phänotyp abhängig von der benutzten Substanz (Abb. 4). Im Gegensatz zu Antipain-behandelten infizierten Zellen, die sich nicht wesentlich von unbehandelten infizierten Zellen unterschieden, waren in Leupeptin-behandelten Zellen die PVM noch deutlich erhalten (Abb. 4C), was darauf schließen lässt, dass die Inhibitoren auf unterschiedliche Proteasen wirken.



**Abbildung 4:** Der Cystein- und Serinproteaseninhibitor Leupeptin erhält die Struktur der PVM in *P. berghei*-infizierten abgelösten HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden mit *P. berghei* GFP-exprimierenden Sporozoiten infiziert und nach 48h Kultivierung mit 100 $\mu$ M Antipain oder Leupeptin für weitere 13h kultiviert. Abgelöste infizierte Zellen zeigen einen unterschiedlichen Phänotyp abhängig von der benutzten Substanz. (A) unbehandelte Kontrolle, (B) Antipain: Phänotyp vergleichbar mit (A). (C) Leupeptin: Zusätzlich zur Wirtszellmembran (schwarzer Pfeil) ist eine weitere Membran (PVM, weißer Pfeil) erkennbar, welche die Merozoiten (grün) einschließt, (\*) Wirtszellkern.

## 2.2 *PbSERAs* werden stadienspezifisch exprimiert und zum Ende der Leberphase stark hochreguliert

Da die verantwortlichen Proteasen vermutlich parasitären Ursprungs sind, wurden *Plasmodium* Datenbanken nach putativen Cysteinproteasen durchsucht. Dafür wurden folgende Kriterien verwendet: Erstens sollte die Protease eine Signalsequenz für die Einschleusung in den sekretorischen Pathway besitzen und zweitens sollte die Transkription der verantwortlichen Proteasegene zum Ende der Leberphase und somit kurz vor Zerstörung der PVM stark hochreguliert werden. RT-PCR Analysen von *P. berghei*-infizierten HepG2-Zellen zeigten eine starke Hochregulation von fünf Cysteinproteasen zum Ende der Leberphase. Diese beinhalten die Dipeptidylpeptidase 3 (DPAP3, annotiert als PB000888.02.0) und vier *PbSERA* Proteasen (Abb. 5B). Die mRNA Expression von *PbSERA*1-4 ist während den ersten 38 h post Infektion (pI) kaum detektierbar und wird 50h pI stark hochreguliert. Dagegen sind Transkripte der fünften *SERA* Protease von *P. berghei* (*PbSERA*5) ausschließlich während der Entwicklungsphase des Parasiten in der Mücke vorhanden (Abb. 5A). Die weitere Charakterisierung der *PbSERA* Promotorbereiche bestätigte weitestgehend die RT-PCR Ergebnisse. Dafür wurde der komplette 5' stromaufwärts gelegene Bereich des jeweiligen *SERA* Gens vor das „Grün Fluoreszierende Protein“ (GFP) in einen *P. berghei*-Transfektionsplasmid kloniert. Transfizierte Parasiten unterschiedlicher Entwicklungsstadien wurden anhand von Lebend-Mikroskopie nach GFP-Expression untersucht (Abb. 5A). GFP-*PbSERA*1-4 Parasiten synthetisieren kein GFP in frühen exo-erythrozytären (EE) Stadien 24h pI und zeigen eine starke GFP-Synthese in späten

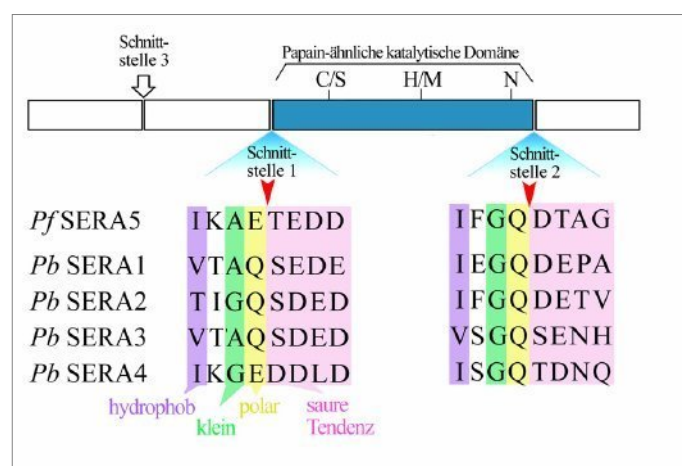


**Abbildung 5:** (A) PbSERA mRNA Expression ist stadienspezifisch reguliert. *Links:* mRNA Expression der fünf PbSERA wurde anhand von RT-PCR Analyse untersucht. Gesamt-RNA wurde von zwei Mückenstadien (Oozysten und Speicheldrüsen-Sporozoit), und parasitären Stadien des Vertebraten-Wirts (späte exoerythrozytäre (EE) Schizonten, abgelöste infizierte Zellen/Merosomen und infizierte Erythrozyten) isoliert und für die RT-PCR Analyse verwendet. *Rechts:* Die PbSERA Promoterregionen induzieren stadienspezifische GFP-Reporterexpression. Die komplette *stromaufwärts gelegenen Regionen* von PbSERA1-5 wurde jeweils vor GFP in den Plasmid pL0031 kloniert und in *P. berghei* Parasiten transfiziert. Transgene Parasiten wurden zur Mückeninfektion verwendet und Speicheldrüsen-Sporozoit für die Infektion von HepG2-Zellen verwendet. GFP-Synthese (grün) wurde während des gesamten Lebenszyklus anhand von Lebend-Mikroskopie untersucht. DNA wurde zusätzlich mit dem membranpermeablen Hoechst 33341 Farbstoff (blau) gefärbt. (B) Die PbSERA1-4 Expression ist in der späten Leberphase hochreguliert. *Links:* HepG2-Zellen wurden mit *P. berghei* Sporozoit infiziert und mRNA dieser infizierten Zellen wurde nach 24, 38, 50 und 62h pI isoliert. Messenger RNA Expression von allen fünf PbSERA Genen wurde mit RT-PCR Analyse untersucht. Als Kontrolle wurde zusätzlich PbTubulin mRNA amplifiziert. *Rechts:* HepG2-Zellen wurden mit *P. berghei*-Sporozoit infiziert und nach angegebenen Zeitpunkten fixiert und mit PbSERA1-4 spezifischen Antikörpern gefärbt (rot). Zusätzlich wurde der Parasit mit dem zytosolischen Marker anti-HSP90 (18h pI) oder dem PVM-Marker anti-Exp1 (24-56h pI) (cyan) gefärbt. Balken: 5µm.

EE-Entwicklungsstadien 56h pI, insbesondere während der Bildung von infektiösen Merozoiten. Die deutlich detektierbare SERA Promoteraktivität in Oozysten konnte durch Western Blot (WB) Analysen allerdings nicht bestätigt werden (Abbildung nicht gezeigt). Durch die Färbung von infizierten HepG2-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mit spezifischen Antikörpern in Immunfluoreszenzanalysen, konnte aber die massive Hochregulation von PbSERA1-4 Proteinen in der späten Leberphase bestätigt werden (Abb. 5A).

### 2.3 PbSERAs werden in der späten Leberphase prozessiert

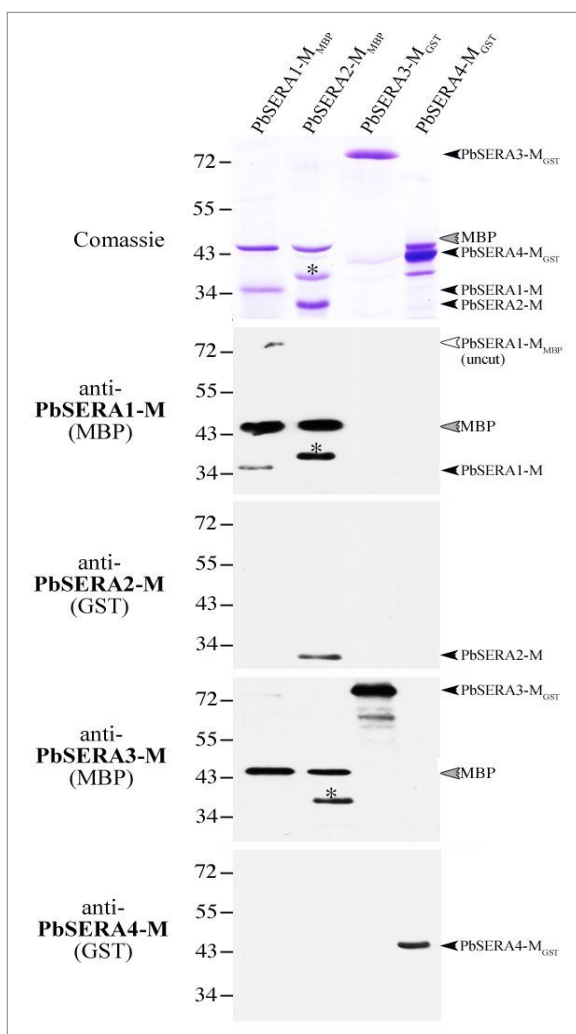
Es ist bekannt, dass *P. falciparum* SERA Proteasen mehrmals prozessiert werden (Übersicht Blackman, 2008). Dabei ist die Prozessierung von PfSERA5 während der Blutphase des Parasiten bisher am besten charakterisiert. Als verantwortliche Protease der PfSERA5 Prozessierung wurde erst kürzlich die Serinprotease SUB1 in *P. falciparum* identifiziert (Yeoh *et al.*, 2007). Mit der Ausnahme von PfSERA8, besitzen alle PfSERA Proteasen drei putative SUB1 Erkennungssequenzen (*engl.* „Site“, S): S1, S2 und S3 (Yeoh *et al.*, 2007). Die SUB1 Erkennungssequenzen S1 und S2 sind auch bei PbSERA1-4 gut konserviert (Abb. 6), wohingegen S3 aufgrund von geringer Homologien nicht eindeutig identifiziert werden



**Abbildung 6:** Putative PbSUB1 Prozessierungs-Schnittstellen für PbSERAs. Das obere Schema zeigt die SERA Proteinstruktur mit der Papain-ähnlichen zentralen Domäne (blau) und der putativen katalytischen Triade. *P. falciparum* SUB1 prozessiert PfSERA5 an den angegebenen Schnittstellen 1 und 2 (roter Pfeil, Yeoh *et al.*, 2007). Vorhergesagte Schnittstellen für SERA Proteine in *P. berghei* wurden direkt darunter *gelegt* und die Consensus Merkmale wurden farblich markiert. Aminosäuresequenzen von PbSERA5 wurden nicht abgebildet, da keine homologen Sequenzen identifiziert werden konnten. SUB1 hat eine eher lockere P1 (gelb) Spezifität (außer Leu, nachdem es nicht schneiden kann), eine Präferenz für Ile, Leu oder Val bei P4 (lila) und Beschränkung auf Gly oder Ala bei P2 (grün).



konnte. Für die umfassende Charakterisierung der PbSERA Prozessierung wurden verschiedene Antiseren und monoklonale Antikörper gegen unterschiedliche Regionen von PbSERA1, PbSERA2, PbSERA3 und PbSERA4 hergestellt. Dafür wurden Mäuse oder Ratten mit der variablen N-terminalen (N), der zentralen (M) oder der C-terminalen Domäne (C) (nur PbSERA1) rekombinant hergestellter PbSERA Proteine immunisiert (dargestellt als schwarze Balken in Abbildung 8). Antiseren, die gegen die Papain-ähnliche Proteasedomäne (M) der verschiedenen Proteasen gerichtet waren, wurden zunächst in einer Western Blot (WB) Analyse mit rekombinanten PbSERA Proteinen auf ihre Spezifität getestet (Abb. 7). Es konnte gezeigt werden, dass die jeweiligen Antiseren tatsächlich spezifisch nur das eigene rekombinante Protein erkennen. Danach konnte die Prozessierung der SERA Proteasen in der exo-erythrozytären (EE) und erythrozytären Entwicklungsphase des Parasiten in WB Analysen mit den spezifischen Antiseren untersucht werden (Abb. 8A-D). In Zellysaten von sowohl späten exo-erythrozytären (Spur1-3) als auch erythrozytären (Spur 4-6) *P. berghei* Entwicklungsstadien wurden zahlreiche prozessierte Proteinfragmente detektiert.



**Abbildung 7:** Western Blot Analyse von rekombinanten PbSERA Proteinen mit polyklonalen PbSERA Antiseren. Rekombinante PbSERA1-4 Proteine (1µg) wurden unter reduzierenden Bedingungen auf einem 10%-igen Polyacrylamid Gel aufgetrennt und mit Comassie gefärbt (*oben*). Von MBP-fusionierten rekombinanten Proteinen (Spuren 1 und 2) wurde das Tag durch Faktor Xa abgespalten (grauer Pfeil). Rekombinante PbSERA3 und PbSERA4 (Spur 3,4) Proteine verfügen über ein GST-Tag. Die jeweiligen rekombinanten PbSERA Proteine sind mit schwarzen Pfeilen auf der rechten Seite markiert. Vier identische Gele mit jeweils 50ng (Spur 1,2) oder 30ng (Spur 3,4) rekombinantes Protein wurden auf Nitrozellulose-Membranen transferiert und entweder mit anti-PbSERA1-M, anti-PbSERA2-M, anti-PbSERA3-M oder anti-PbSERA4-M Antiseren inkubiert. Antiseren gerichtet gegen PbSERA1-M (MBP) und PbSERA3-M (MBP) detektieren erwartungsgemäß zusätzlich zum eigenen (*schwarzer Pfeil*, rechts) das MBP-Protein (*grauer Pfeil*). Für die von beiden Antiseren zusätzlich detektierte Bande (*Stern*) kann eine Kreuzreaktion mit PbSERA2-M aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts ausgeschlossen werden. Vermutlich handelt es sich um ein MPB-Spaltprodukt, das auch im Comassie-Gel sichtbar ist. Antiseren, die gegen PbSERA2-M (GST) und PbSERA4-M (GST) gerichtet sind, detektieren ebenfalls jeweils nur die eigenen rekombinanten Proteine. Bei längerer Exposition werden allerdings auch die anderen GST-Fusionsproteine sichtbar, was aber wegen der im Serum enthaltenen anti-GST Antikörper auch zu erwarten war.

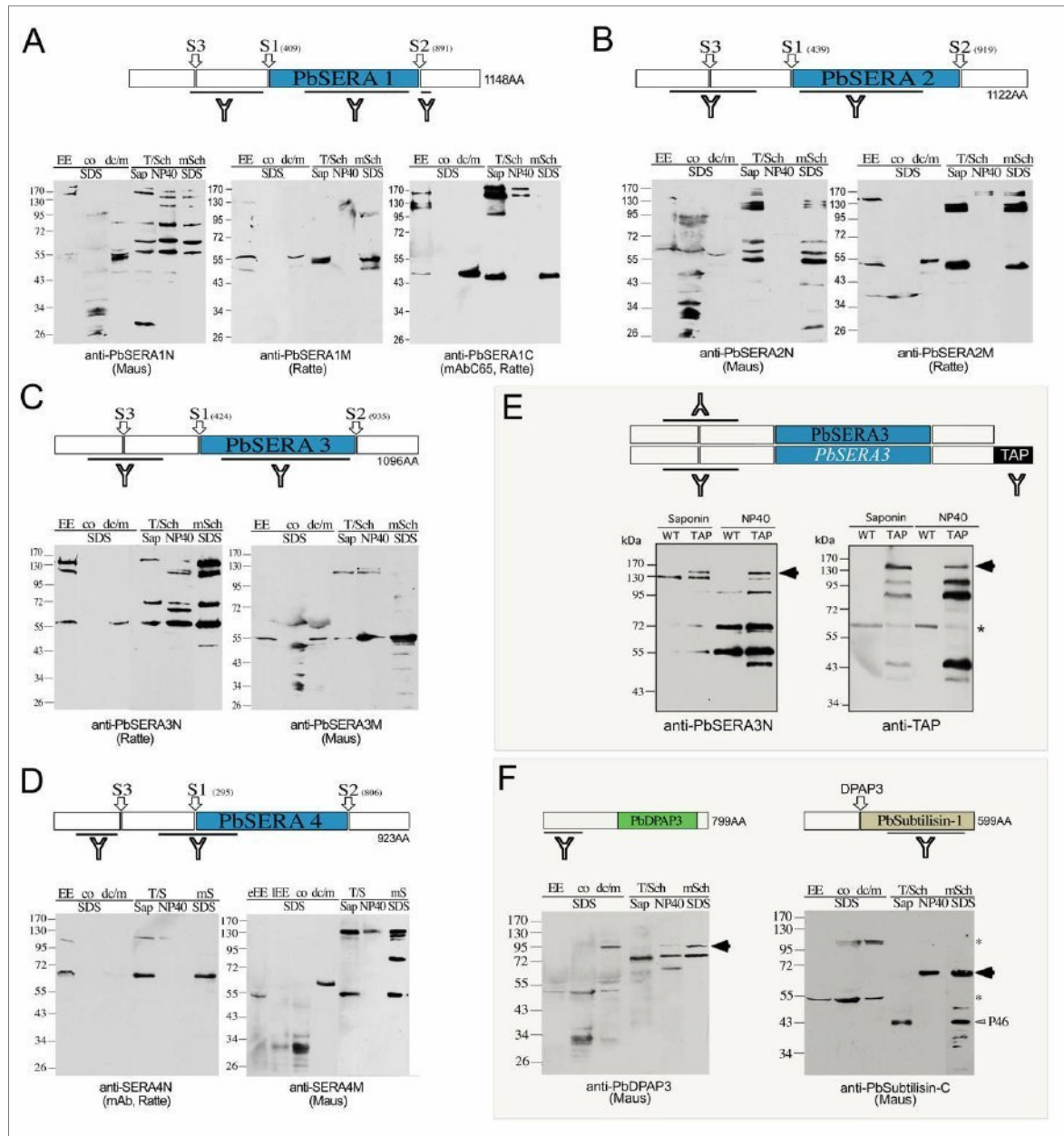


Dagegen waren in abgelösten *P. berghei*-infizierten HepG2-Zellen und Merosomen vorwiegend die vollständig prozessierten PbSERA Proteasen vorzufinden.

*PbSERA1*. Die Prozessierung des PbSERA1 Pro-Peptids erzeugt letztendlich drei Spaltprodukte: die zentrale Papain-ähnliche Proteasedomäne mit einem Molekulargewicht von 55 kDa, ein 47-kDa C-terminales sowie ein 55-kDa N-terminales Peptid (Abb. 8A). Das N-terminale Peptid wird womöglich ein weiteres Mal prozessiert, da ein 30-kDa N-terminales Spaltprodukt in der PV von erythrozytären *P. berghei* Entwicklungsstadien detektiert werden konnte. Außerdem erkennt das Antiserum PbSERA1-N noch weitere Peptide höheren Molekulargewichts, die jedoch weder die zentrale (M) noch die C-terminale Domäne des PbSERA Proteins zu beinhalten scheinen. Deswegen können unspezifische Kreuzreaktionen des Antiserums z.B. mit anderen PbSERA Proteasen bisher nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise handelt es sich aber auch um ein verändertes Laufverhalten von PbSERA1-N im Gel, verursacht durch verschiedene posttranslationelle Modifikationen, wie z.B. Glykosylierungen. Viral rekombinant synthetisiertes PfSERA5 wies sowohl einfache Glycosylierungen als auch komplexe N-terminale Mannose-Oligosaccharid-Verknüpfungen auf (Tine *et al.*, 1993), das eine große Ähnlichkeit zu dem hier beobachteten Bandenmuster ergab. Womöglich erklärt sich dadurch auch die hochmolekulare Duplet-Bande des Pro-Peptids, welche von anti-PbSERA1-N und anti-PbSERA1-C gleichermaßen erkannt wird.

*PbSERA2*. Die Prozessierung von PbSERA2 resultiert ebenfalls in hauptsächlich drei Spaltprodukte: die Papain-ähnliche Proteasedomäne (M) mit einem Molekulargewicht von 53 kDa, einem 55-kDa N-terminalen Peptid (Abb. 8B) und vermutlich einem C-terminalen Peptid, das aber nicht nachgewiesen werden konnte, da ein Antiserum gerichtet gegen den C-Terminus von PbSERA2 nicht verfügbar war. PbSERA2-N kann ein weiteres Mal prozessiert werden, da in SDS Lysaten von Blutschizonten ein 30-kDa Fragment detektiert werden konnte. Anti-PbSERA2-N und anti-PbSERA2-M detektieren jeweils eine hochmolekulare Triplet-Bande. Vermutlich handelt es sich dabei um verschiedene Spezies des Pro-Peptides.

*PbSERA4*. Die proteolytische Spaltung des PbSERA4 Pro-Peptids erzeugt eine zentrale Proteasedomäne mit einem Molekulargewicht von 54 kDa, sowie ein 65-kDa N-terminales Peptid (Abb. 8D). Ob es sich bei dem N-terminalen SERA Peptid um eine Zwischenspaltprodukt oder Endspaltprodukt handelt, ist derzeit nicht abschließend geklärt. Das 65-kDa N-terminale PbSERA4 Peptid korreliert mit dem in *P. falciparum* Blutstadien identifizierten P47, welches nochmals zu zwei P25 Spaltprodukten prozessiert wird (Li *et al.*, 2002). Das von anti-PbSERA4-M detektierte Zwischenspaltprodukt von 95 kDa in SDS-Totallysaten setzt sich vermutlich aus der zentralen Proteasedomäne und dem C-Terminus



**Abbildung 8:** Prozessierung der PbSERA Proteasen in exo-erythrozytären und erythrozytären Entwicklungsstadien von *P. berghei* Parasiten. Western Blot Analyse von *P. berghei* Zellextrakten mit verschiedenen Antikörpern gerichtet gegen N-terminale (N), zentrale (M) oder C-terminale (C) Epitope von PbSERA1 (A), PbSERA2 (B), PbSERA3 (C) und PbSERA4 (D), sowie gegen die in der Prozessierungskaskade höher stehenden Proteasen PbDPAP3 und PbSUB1 (F). Die schematischen Illustrationen der PbSERA1-4 (A-D) zeigen die putativen SUB1 Schnittstellen S1, S2 und S3 (Aminosäureposition in Klammern), oder die putative PbDPAP3 Schnittstelle in PbSUB1 (F) sowie als schwarze Balken die rekombinanten Proteine, die für die Generierung der Antikörper verwendet wurden. (A-F) Lysate von FACS-sortierten *P. berghei*-infizierten HepG2-Zellen 60h pI (exo-erythrocytic, EE), nicht infizierten HepG2 Zellen (control, co), abgelösten *P. berghei*-infizierten HepG2 Zellen/Merosomen (detached cells/merosomes, dc/m), aus Blut aufgereinigten *P. berghei* Trophozoiten/Schizonten (T/Sch), getrennt nach PV-Proteinen (Saponin, Sap) und Parasitenproteinen (NP40), sowie von synchronisierten Schizonten-Kulturen (mature schizonts, mSch) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose Membran übertragen und anschließend mit den verschiedenen Antisera wie angegeben inkubiert (zur Antikörperherstellung verwendete Tierart in Klammern). (F) schwarzer Pfeil deutet auf das Pro-Peptid, weißer Pfeil deutet auf die proteolytisch verarbeitete Proteasedomäne von PbSUB1 (P46). (\*) unspezifische Kreuzreaktion des Antikörpers. (E) Western Blot Analyse zum Vergleich von Wildtyp (WT) und transgenen *P. berghei* Parasiten (TAP), welche zusätzlich zu dem endogenen PbSERA3 ein PbSERA3 mit C-terminalen TAP-Tag exprimieren. Zellysate von aufgereinigten Trophozoiten/Schizonten, getrennt nach PV-Proteinen (Saponin,

Sap) und Parasitenproteinen (NP40) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und anschließend mit anti-PbSERA3-N oder humanem Gammaglobulin (anti-TAP) inkubiert. PbSERA3-N erkennt N-terminale Epitope des endogenen PbSERA3 und des transgenen PbSERA3-TAP (Pfeil) Pro-Peptides sowie dessen prozessierte N-terminalen Peptide, während anti-TAP das PbSERA3-TAP Pro-Peptid (Pfeil) und dessen prozessierte C-terminale Peptide detektiert, jedoch nicht das endogene PbSERA3. (\*) unspezifische Kreuzreaktion des Antikörpers.

zusammen. Dies konnte aber nicht abschließend geklärt werden, da kein Antiserum gegen den C-Terminus von PbSERA4 vorhanden war.

*PbSERA3*. Die Prozessierung von PbSERA3 verläuft nach einem ähnlichen Schema: Nach mehrmaliger Prozessierung des Pro-Peptides können eine zentrale Papain-ähnliche Proteasedomäne mit einem Molekulargewicht von 55 kDa, sowie ein 57-kDa N-terminales Spaltprodukt detektiert werden. Bemerkenswert ist, das PbSERA3 schon in Extrakten adhärenter infizierter HepG2-Zellen, und damit recht früh, vollständig prozessiert wird.

*TAP-tagging des PbSERA3 C-Terminus*. Für die spezifische Detektion von PbSERA3-C wurde ein transgener Parasitenstamm hergestellt. Diese Parasiten exprimieren zusätzlich zu dem endogenen PbSERA3 ein rekombinantes PbSERA3 mit C-terminalem TAP-Tag (*P. berghei* PbSERA3-TAP). Der TAP-Tag setzt sich aus zwei Protein A Domänen zusammen mit einem Molekulargewicht von 20 kDa und ist spezifisch von humanen Gammaglobulinen (anti-TAP) detektierbar. Die Herstellung der transgenen *P. berghei*-PbSERA3-TAP Parasiten erfolgte durch Transfektion mit dem *pL0032-PbSERA3* Transfektionsplasmid (Abb. 12A). Eine Southern Blot Analyse bestätigte die Integration der PbSERA3-TAP DNA Sequenz in den korrekten *pbsera* Gen Locus (Abb. 12B). Die zusätzliche Expression dieses Fusionsproteins hatte keinen nachteiligen Effekt auf die Entwicklung des Parasiten.

Folgend wurden Zellextrakte von *P. berghei* Wildtyp (WT) und transgenen Parasiten im Western Blot analysiert (Abb. 8E). Erwartungsgemäß sollte humanes Gammaglobulin (anti-TAP) das PbSERA3-TAP Pro-Peptid (Abb. 8E, Pfeil) sowie dessen prozessierte C-terminalen Peptide, nicht jedoch das endogene PbSERA3, erkennen. Dagegen sollte anti-PbSERA3-N zusätzlich zum rekombinanten Fusionsprotein auch das endogene Pro-Peptid detektieren, sowie die prozessierten N-terminalen Peptide von PbSERA3 und PbSERA3-TAP. PbSERA3 und PbSERA3-TAP Pro-Peptide wurden hauptsächlich in Zellextrakten der parasitophoren Vakuole (Saponin Extraktion) detektiert, wohingegen prozessierte N- und C-terminale PbSERA3 Peptide hauptsächlich in Parasitenextrakten vorhanden waren. Da diese Fragmente gleichermaßen in *P. berghei* WT und transgenen Parasiten vorkommen und nicht von anti-TAP erkannt werden, schlußfolgern wir daraus, dass ihnen der C-Terminus des Proteins fehlt.

Die vier markanten Protein Banden, welche in PV- und Parasitenextrakten von transgenen Parasiten mit anti-TAP detektiert werden können, repräsentieren vermutlich verschiedene PbSERA3-Peptide mit C-Terminus und TAP-Tag. Das gleichzeitige Detektieren von mehreren PbSERA3 Peptiden im Vergleich zu einer relativ begrenzten Anzahl in *P. falciparum* (Li *et al.*, 2002) ist womöglich durch das asynchrone Wachstum der Parasiten in Mäusen bedingt. Daher wurde die Western Blot Analyse mit Zellextrakten aus synchronisierten *P. berghei* WT und transgenen Schizonten-Kulturen wiederholt (siehe Suppl.Fig. 4 Schmidt-Christensen *et al.*, 2008a). Es konnte allerdings kein Unterschied zu dem Experiment mit gemischten erythrozytären Entwicklungsstadien festgestellt werden, was eher auf eine ständige Produktion und Prozessierung hindeutet.

#### WESTERN BLOT ANALYSE VON PBDPAP3 UND PBSUB1

Die Cysteinprotease DPAP3 und die Serinprotease SUB1 sind primär an der Freisetzung von *P. falciparum* Merozoiten aus Erythrozyten beteiligt. Inhibition der einen oder der anderen Protease verhindert die proteolytische Prozessierung von PfSERA5 und die Freisetzung der Merozoiten. In der Proteasenkaskade prozessiert DPAP3 zunächst SUB1, welches wiederum die Prozessierung der SERA-Proteasen reguliert, die dann wahrscheinlich für die Entlassung der Parasiten aus der Wirtszelle benötigt werden (Arastu-Kapur *et al.*, 2007). Für die Charakterisierung der *P. berghei* PbDPAP3 und PbSUB1 Homologen wurden zunächst Antiseren hergestellt. Dafür wurden Mäuse mit der N-terminalen PbDPAP3 Region oder der C-terminalen PbSUB1 Region rekombinant hergestellter Proteine immunisiert (dargestellt als schwarze Balken in Abbildung 8F). In den WB Analysen wurde PbDPAP3 in exo-erythrozytären (dc/m) und erythrozytären Entwicklungsstadien als 95-kDa Vorläuferprotein gefunden (Abb. 8F, linke Seite). In erythrozytären Trophozoiten/Schizonten-Lysaten wurde es allerdings hauptsächlich als prozessierte Form in der PV (Saponin Extraktion) gefunden. Anti-PbDPAP3-N detektiert nur N-terminale Peptide von PbDPAP3, nicht jedoch die prozessierte Papain-ähnliche Proteasedomäne. Daher kann keine detaillierte Aussage über die Endspaltprodukte der Prozessierung getroffen werden. In *P. falciparum* wurden drei PfDPAP3 Peptide mit den Molekulargewichten von 120-, 95- und 42 kDa (Arastu-Kapur *et al.*, 2007) nachgewiesen.

PbSUB1 wird als 68-kDa Pro-Peptid synthetisiert (Abb. 8F, rechte Seite) und ist mit anti-PbSUB1-C ausschließlich als prozessierte Proteasendomäne mit einem Molekulargewicht von 46 kDa (P46) in der PV von *P. berghei*-infizierten Erythrozyten nachweisbar. Dieses Peptid entspricht wahrscheinlich P47, der aktiven Proteasendomäne von SUB1 in *P. falciparum*

Blutstadien (Sajid *et al.*, 2000). In Lysaten von exo-erythrozytären *P. berghei* Entwicklungsstadien konnte mit anti-PbSUB1-C kein spezifisches Signal detektiert werden, obwohl anhand einer RT-PCR PbSUB1-mRNA nachgewiesen wurde (*siehe* Suppl.Fig. 5, Schmidt-Christensen *et al.*, 2008b). Möglicherweise liegt die SUB1 Proteinkonzentration in exo-erythrozytären Parasitenextrakten unter dem Detektionslevel des Western Blots.

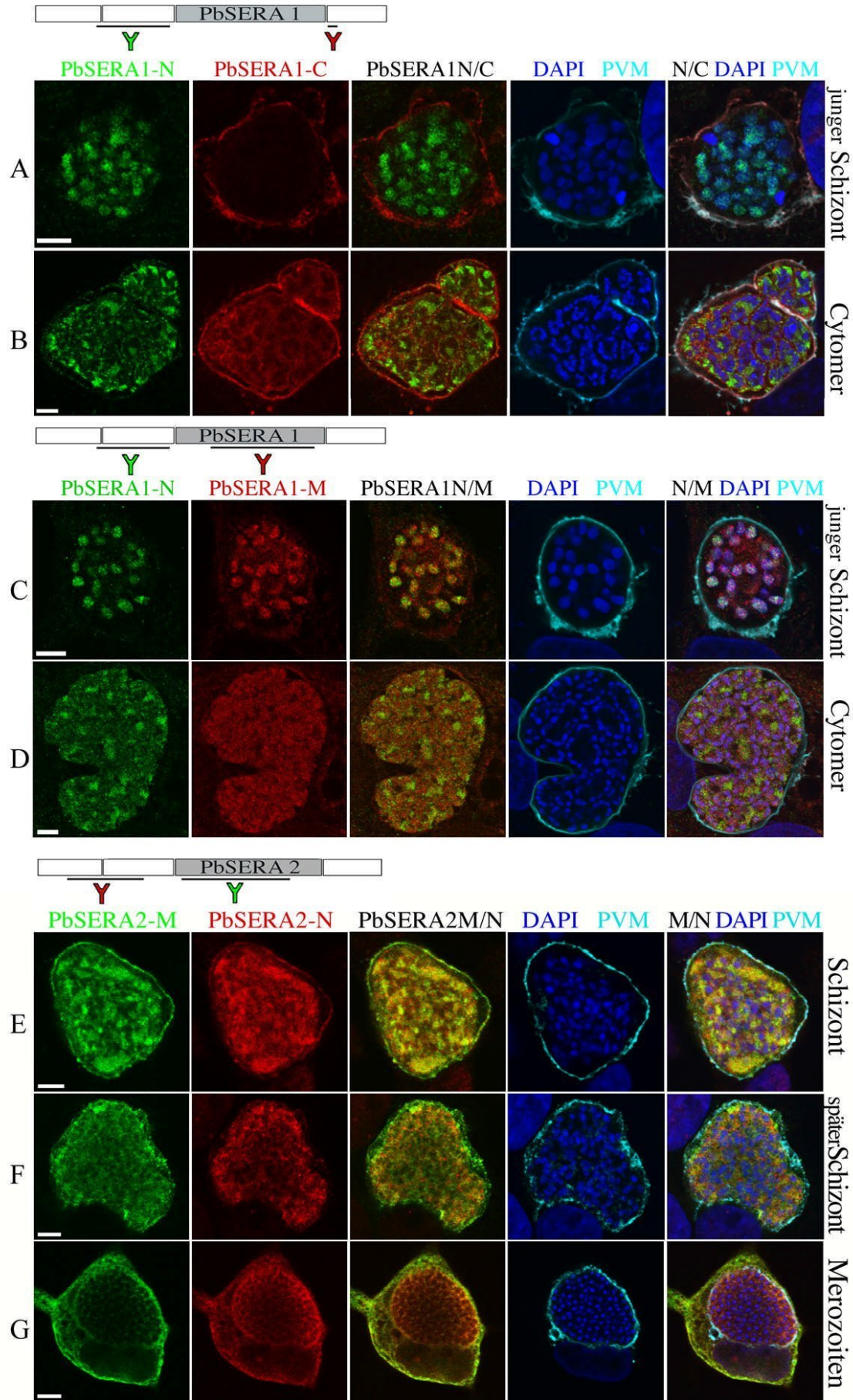
## ***2.4 Lokalisation der PbSERAs in der exoerythrozytären Entwicklungsphase***

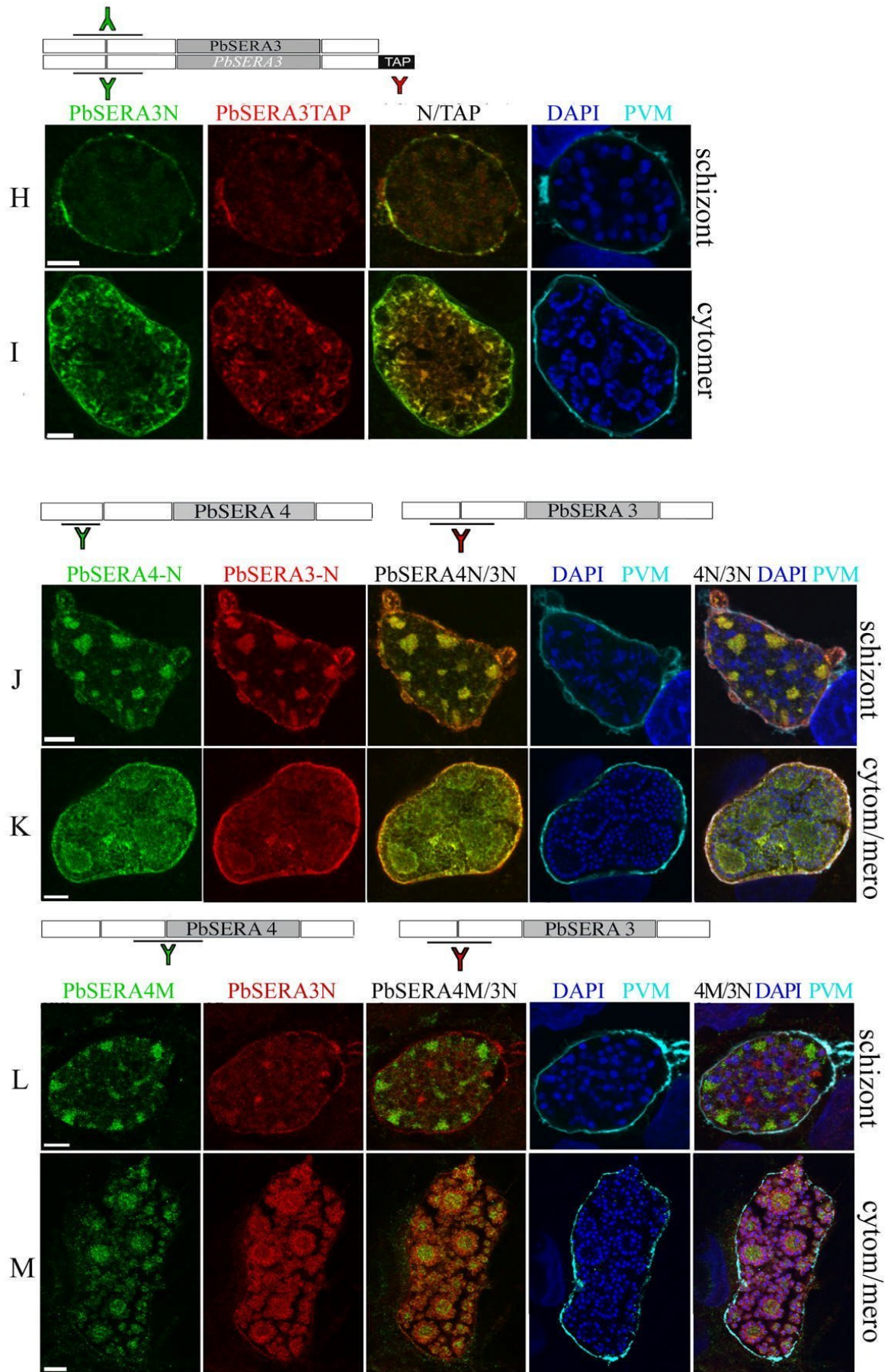
### *KOLOKALISATIONSSTUDIEN ZUR PROZESSIERUNG DER PbSERAS*

Western Blot Experimente zeigten, dass PbSERA Proteine während der späten exo-erythrozytären Entwicklungsphase des Parasiten prozessiert werden. Dieser Befund sollte zunächst durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie auf Einzelzellebene bestätigt werden. Die Verwendung spezifischer Antikörper gegen den N-terminus, die Papain-ähnliche Proteasendomäne oder den C-terminus von PbSERAs soll neben dem Prozessierungsstatus auch Aufschluß über die Lokalisierung der individuellen PbSERA Peptide in der infizierten Hepatomazelle geben. Dafür wurden HepG2-Zellen mit *P. berghei* WT oder transgenen Sporozoiten infiziert und nach 45h (Schizontenstadium), 56h (Cytomer) oder 59h (Merozoiten) fixiert. In einer anschließenden Immunfluoreszenzfärbung wurden Antikörper gegen N-terminale PbSERA Epitope (N) mit Antikörpern gegen zentrale (M) oder C-terminale PbSERA Epitope (C) kombiniert und mit Alexa 488 (grün)- und Alexa 594 (rot)-Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zweitantikörpern detektiert. Wenn sich zwei Rot und Grün fluoreszenzmarkierte Proteine am gleichen Ort befinden bzw. kolokalisieren, ist dies ein Hinweis auf potentielle Interaktion und wird durch eine Gelbfärbung signalisiert. Zusätzlich wurde die PVM (cyan) mit dem parasitenspezifischen Antikörper anti-Exp1 („Exported Protein 1“) markiert. Das Exp1 Protein wird während der Entwicklung des Parasiten in die PV exportiert und kurz darauf in die PVM integriert. Eine DNA-Färbung (blau) mit DAPI läßt anhand der ungefähren Anzahl und Anordnung der Parasiten-Zellkerne den Entwicklungszustand des Parasiten bestimmen (benannt auf der rechten Seite der Abbildung) und dient zusammen mit dem PVM-Marker der Lokalisation des intrazellulären Parasiten.

*PbSERA1*. Die Serin-Typ SERA PbSERA1 zeichnet sich durch eine sehr charakteristische Lokalisation aus. PbSERA1 liegt bereits in jungen Schizonten prozessiert vor (Abb. 9A), wobei PbSERA1-C (rot) eng mit der PVM (cyan) assoziiert und PbSERA1-N (grün) in den sich vermehrt teilenden Parasitenkernen (blau) detektiert wird (*siehe*









**Abbildung 9:** Kolokalisationsstudien zur Prozessierung von PbSERAs in infizierten HepG2-Zellen (konfokale Laserscanmikroskopie). HepG2-Zellen wurden mit *P. berghei* WT (**A-G, J-M**) oder transgenen PbSERA3-TAP (**H, I**) Sporozoiten infiziert, nach 45-59h fixiert und mit Antikörpern gerichtet gegen N-terminale, zentrale oder C-terminale Epitope der PbSERA gefärbt. Die Struktur des PbSERA Proteins mit der entsprechenden Papain-ähnlichen Proteasendomäne (grau) ist in den schematischen Illustrationen über jeder Block-Abbildung dargestellt. Die Bereiche der rekombinanten Proteine, die für die Herstellung der Antiseren/monoklonalen Antikörper verwendet wurden, sind als schwarze Balken markiert und die verwendeten Zweitantikörper gekoppelt mit dem Fluorophor Alexa 488 (grün) oder Alexa 594 (rot) sind farblich gekennzeichnet. Die PVM wurde mit dem anti-Exp1 (cyan) Antikörper und die DNA mit dem Dapi Farbstoff (blau) markiert. Die Entwicklungsstadien der Parasiten wurden jeweils auf der rechten Seite jeder Abbildung angegeben. Für eine einfachere Interpretation wurden gesondert rote und grüne Färbungen überlagert (Mitte). Gelb korreliert mit Kolokalisation. Für die eindeutige subzelluläre Orientierung wurden dann zusätzlich auch die DNA und PVM Färbung überlagert (DAPI/PVM). Folgende PbSERA Antikörper wurden verwendet: (**A-D**) Maus PbSERA1-N Antiserum, Ratte PbSERA1-C (C65) monoklonaler Antikörper, Ratte PbSERA1-M Antiserum; (**E-G**) Ratte PbSERA2-M Antiserum, Maus PbSERA2-N Antiserum; (**H-I**) Ratte PbSERA3-N Antiserum, humanes Gammaglobulin (anti-TAP); (**J-M**) Maus PbSERA4-N Antiserum, Maus PbSERA4-M Antiserum, Ratte PbSERA3-N Antiserum. Balken: 5µm.

Überlagerung). PbSERA1-M (rot) lokalisiert zu diesem Zeitpunkt ebenfalls zu großen Teilen im Kern des Parasiten, kolokalisiert aber nicht vollständig mit PbSERA1-N (Abb. 9C). Im Verlauf der Parasitenentwicklung, insbesondere im Cytomerstadium (Abb. 9B, D), ist die PbSERA1-N-spezifische Fluoreszenz vermehrt in konzentrierten Bereichen des Parasitenzytoplasmas lokalisiert und teilweise schwach mit der PVM assoziiert. Die PbSERA1-M-spezifische Fluoreszenz verteilt sich gleichmäßig im Zytoplasma und Zellkernen des Parasiten. PbSERA1-C (rot) liegt auch im Cytomerstadium assoziiert mit der PVM vor und wird zunehmend im Parasiten, insbesondere der Parasitenmembran detektiert (Abb. 9B).

*PbSERA2*. In Schizonten kolokalisieren PbSERA2-M (grün) und PbSERA2-N (rot) größtenteils im Parasiten, in der PV und teilweise der PVM (Abb. 9E, Überlagerung). Die PbSERA2-M-spezifische Fluoreszenz ist während der weiteren Parasitenentwicklung hauptsächlich mit der PVM assoziiert, dagegen ist PbSERA2-N (rot) vorrangig im Parasiten und der PV detektierbar (Abb. 9F). Bei abgeschlossener Reifung der Merozoiten wird die PVM zunehmend porös. PbSERA2-M (grün) und PbSERA2-N (rot) sind beide im Wirtszellzytosol detektierbar. Allerdings ist die PbSERA2-N-spezifische Fluoreszenz vorrangig innerhalb der PVM konzentriert, wohingegen PbSERA2-M vermehrt im Wirtszellzytoplasma vorzufinden ist (Abb. 9G).

*PbSERA3*. Für die Lokalisation der PbSERA3 wurden HepG2-Zellen mit transgenen *P. berghei*-PbSERA3-TAP Parasiten infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Diese Parasiten exprimieren zusätzlich zu dem endogenen PbSERA3 ein rekombinantes PbSERA3 mit C-terminalem TAP-Tag (Abb. 8H). Anhand einer WB Analyse konnte die normale Prozessierung des rekombinanten PbSERA3-TAP gezeigt werden (Abb. 8E). In Schizonten

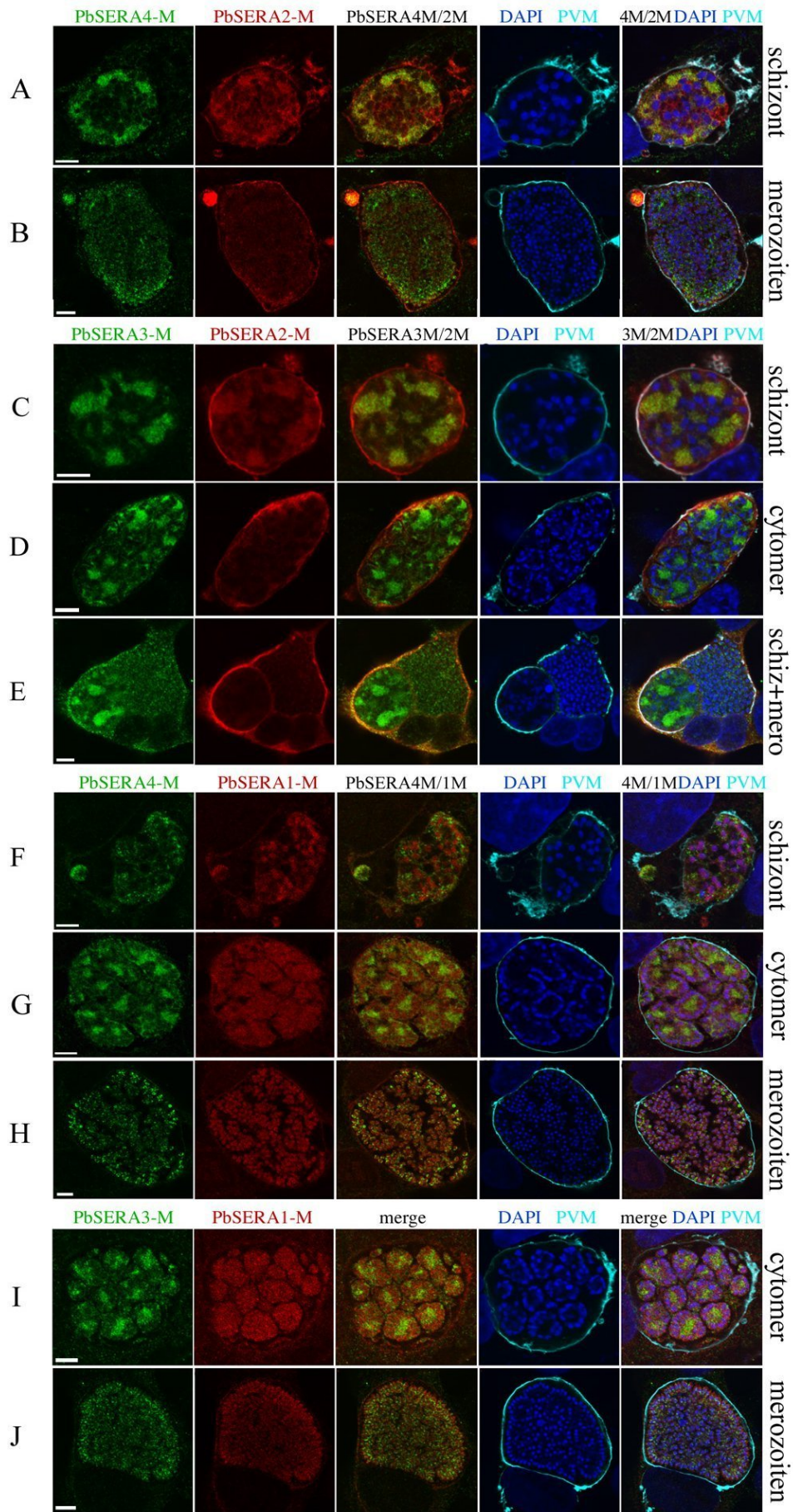


kolokalisieren PbSERA3-N (grün) und anti-TAP (rot) überwiegend nah assoziiert zur PVM (Abb. 9H, Überlagerung). Im Cytomerstadium überwiegt die PbSERA3-N-spezifische Fluoreszenz peripher im zellulären Kompartiment des Parasiten, insbesondere der PVM, was die Prozessierung der Protease zum späten Zeitpunkt der Parasitenentwicklung bestätigt.

*PbSERA4*. Für die spezifische Detektion der N-terminalen und zentralen Papain-ähnlichen Proteasendomäne von PbSERA4 stehen lediglich Maus-Antikörper zur Verfügung. Eine direkte Ko-Färbung ist daher nicht möglich. Die beiden Maus anti-PbSERA4-N und anti-PbSERA4-M Antikörper wurden daher jeweils zusammen mit dem Rattenantikörper anti-PbSERA3-N für indirekte Kolokalisationsstudien verwendet. PbSERA4-N kolokalisiert in jungen und späten exo-erythrozytären Entwicklungsstadien des Parasiten fast vollständig mit dem N-Terminus von PbSERA3 (Abb. 9J, K; Überlagerung). Für die PbSERA4-M-spezifische Fluoreszenz ist dies nicht der Fall (Abb. 9L, M). Vermutlich liegt daher PbSERA4 überwiegend als prozessiertes Protein vor. In Schizonten lokalisiert PbSERA4-N (grün) im Parasiten, der PV und PVM (Abb. 9J), in Cytomeren und sich entwickelnden Merozoiten zunehmend nahe der PVM und der Parasitenmembran (Abb. 9K). PbSERA4-M wird in Schizonten fast ausschließlich im Parasiten detektiert (Abb. 9L). Bei der Bildung einzelner Merozoiten stülpt sich die Parasitenmembran nach innen und verzweigt sich so oft bis jeder in der Schizogonie entstandene Tochterparasitenkern von einer eigenen Membran umgeben ist. Dabei können oft sog. „Meroblasten“ beobachtet werden (Abb. 9L); diese stellen die Zentren Merozoitenabschnürung dar (Sturm *et al.*, 2008). In diesem Entwicklungsstadium ist PbSERA4-M vorrangig im Zytoplasma der Meroblasten-Zentren lokalisiert und teilweise innerhalb der abgeschnürten Merozoiten.

#### *LOKALISATION DER ZENTRALEN SERA PROTEASEDOMÄNEN (MITTELTEILE)*

Die putativen Cysteinproteasen der SERA Familie unterscheiden sich im aktiven Zentrum ihrer Papain-ähnlichen Proteasendomäne durch den Austausch einer katalytischen Aminosäure. Die Serin-Typ SERAs (PbSERA1 und PbSERA2) besitzen im Gegensatz zu den Cystein-Typ SERAs (PbSERA3 und PbSERA4) ein Serin anstelle des katalytischen Cysteins mit noch bisher unbekanntem Auswirkungen auf deren proteolytische Aktivität. Es kann aber spekuliert werden, dass dieser Austausch die Proteasefunktion stark beeinträchtigt. Im Folgenden wird die Lokalisation der Cystein-Typ PbSERAs (grün) im Vergleich zu Serin-Typ PbSERAs (rot) in verschiedenen exo-erythrozytären Entwicklungsstadien des Parasiten dargestellt (Abb. 10). Obwohl sich die Lokalisation der Serin-Typ PbSERAs und Cystein-Typ PbSERAs grundlegend voneinander unterscheiden, findet man jedoch auch



**Abbildung 10:** Die Proteasendomänen der Cystein-Typ PbSERAs unterscheiden sich in ihrer Lokalisation zu Serin-Typ PbSERAs. *P. berghei*-infizierte HepG2-Zellen wurden 45-59h pI fixiert und mit Antisera gegen die zentrale Papain-ähnliche Proteasedomäne von Serin-Typ PbSERAs (rot) und Cystein-Typ PbSERAs (grün) markiert. Zusätzlich wurde mit anti-Exp1 (PVM, cyan) und Dapi (DNA, blau) gefärbt. Die Entwicklungsstadien der Parasiten sind jeweils an der Bildreihe rechts gekennzeichnet. Folgende Antisera wurden verwendet: Ratte anti-PbSERA1-M (F-J), Ratte anti-PbSERA2-M (A-E), Maus anti-PbSERA3-M (C-E, I, J) und Maus anti-PbSERA4-M (A, B, F-H). Für die einfachere Interpretation wurden die grünen und roten Aufnahmen (PbSERA) zunächst gesondert überlagert. Die zusätzliche Überlagerung mit Blau/cyan dient der eindeutigen subzellulären Orientierung im Parasiten. Balken: 5µm.

Gemeinsamkeiten. So akkumulieren z.B. PbSERA1-4-M in auffälligen Regionen im Parasitenzytoplasma von Schizonten-infizierten Hepatomazellen. Vermutlich handelt es sich um den Ort der PbSERA Proteinsynthese wobei das Signalpeptid die PbSERAs in den sekretorischen Transportweg zum endoplasmatischen Retikulum leitet, um anschließend in die PV transportiert zu werden. Jedes der PbSERA Proteine konnte in der PV und nah assoziiert zur PVM detektiert werden, wenn auch z.T. zu unterschiedliche Zeitpunkten (Abb. 9: PbSERA1-C, PbSERA2-M, PbSERA3-N, PbSERA4-N). Vermutlich werden die PbSERAs in der PV durch die Serinprotease SUB1 prozessiert, die ebenfalls dort lokalisiert wurde. Während die Papain-ähnliche Proteasendomäne von PbSERA2 (rot) weiterhin vorrangig in der PV und der PVM detektiert wird (Abb. 10A-D), unterscheiden sich die Proteasendomänen der verbleibenden PbSERAs deutlich in ihrer zellulären Lokalisation. PbSERA1-M (rot) detektiert über die zytoplasmatische Färbung hinaus punktuell konzentrierte Strukturen, welche mit den Parasitenkernen von Schizonten koloalisieren (Abb. 10F). Im weiteren Verlauf der Parasitenentwicklung verteilt sich PbSERA1-M gleichmäßig im Parasitenzytoplasma und Zellkernen von Cytomeren (Abb. 10G, I) und Merozoiten (Abb. 10H, J). PbSERA3-M und PbSERA4M lokalisieren dagegen in Schizonten hauptsächlich in konzentrierten Bereichen des Parasitenzytoplasmas. In Cytomeren verteilt sich die PbSERA3-M-spezifische Fluoreszenz auch auf zelluläre Kompartimente der PV (Abb. 10D, grün) mit teilweiser Koloalisation zu PbSERA2-M (Abb. 10D, Überlagerung). Am Ende der exoerythrozytären Entwicklung des Parasiten – kurz vor dem morphologisch sichtbarem Aufbrechen der PVM und Entlassung infektiöser Merozoiten – sind sowohl Cystein-Typ PbSERAs als auch Serin-Typ PbSERAs im Wirtszellzytoplasma detektierbar. Merozoiten werden ebenfalls von PbSERA-spezifischen Antikörpern markiert (Abb. 10B, E, H, J); vermutlich handelt es sich um neu synthetisiertes PbSERA Protein.

## 2.5 Lokalisation von PbDPAP3 und PbSUB1 in exo-erythrozytären Entwicklungsstadien

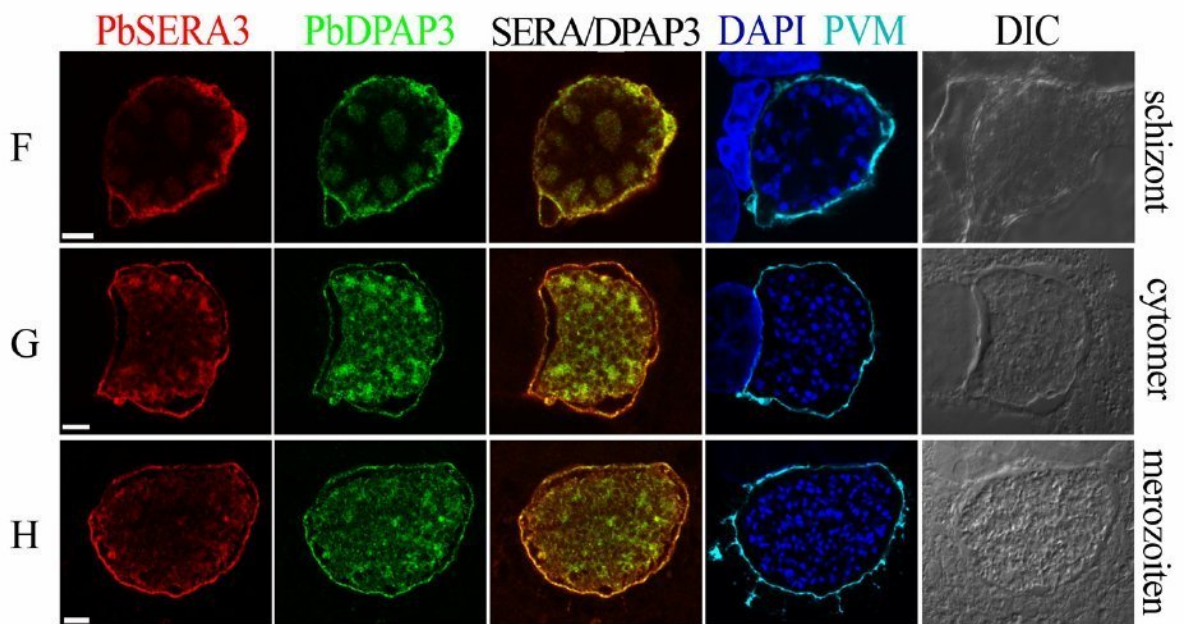
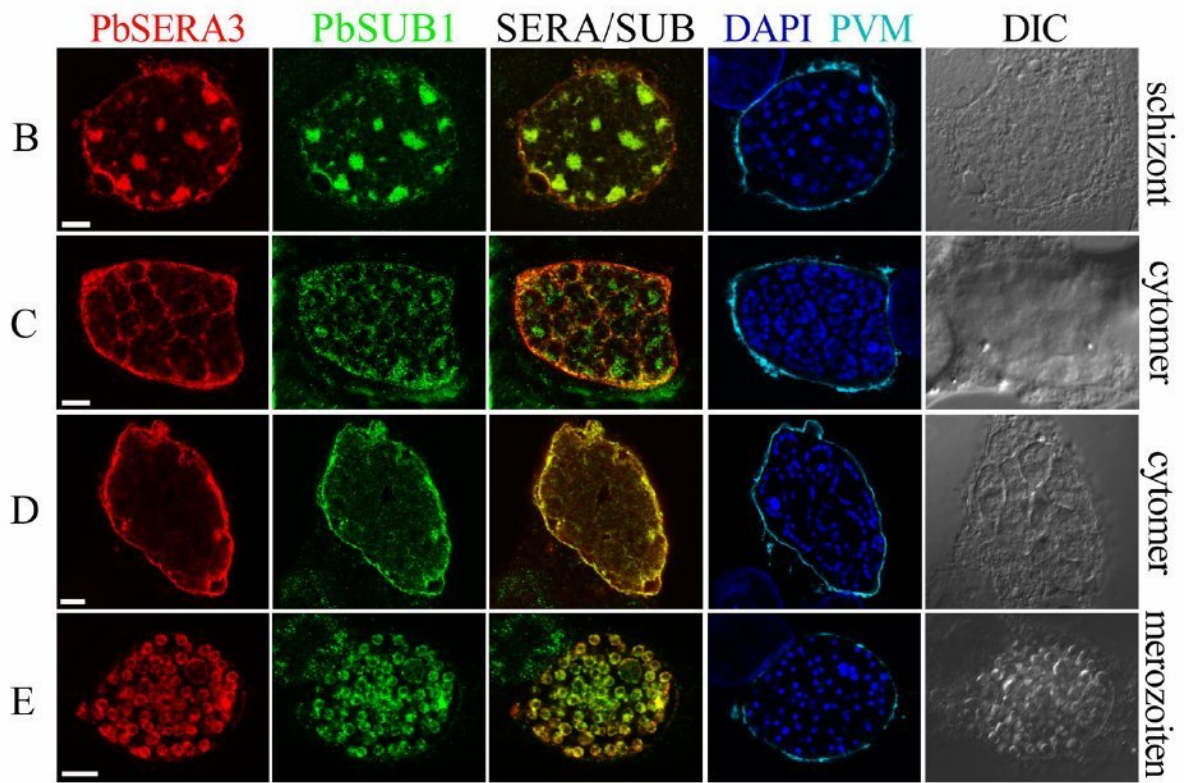
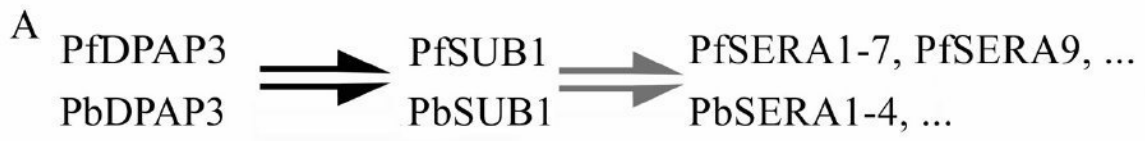
Die subzelluläre Lokalisation von PbDPAP3 und PbSUB1 wurde bisher weder in erythrozytären noch in exo-erythrozytären *Plasmodium* Entwicklungsstadien morphologisch untersucht. Dagegen wurde die *P. falciparum* SUB1 in sog. „Exonemen“ lokalisiert, eine erst kürzlich neu identifizierte Organellenform in erythrozytären Entwicklungsstadien (Yeoh *et al.*, 2007). Die Regulation der PfSERA Prozessierung basiert danach möglicherweise auf einer räumlichen Trennung der Serinprotease PfSUB1 und deren PfSERA Substrat, welches in der PV von infizierten Erythrozyten vorliegt (Yeoh *et al.*, 2007).

In nachfolgenden Experimenten wurde die Lokalisation von PbSUB1 und PbDPAP3 in exo-erythrozytären Entwicklungsstadien von *P. berghei* morphologisch untersucht. Die subzelluläre Lokalisation beider Proteasen im direkten Vergleich war leider nicht möglich, da jeweils nur Maus-Antiseren zur Verfügung standen. Für Kolokalisierungs-Experimente wurde stattdessen das PbSERA3-N-spezifische Rattenserum verwendet, da es nachweislich N-terminale Epitope der Cystein-Typ SERA PbSERA3 in PV und PVM detektiert. PbSUB1-C kolokalisiert mit PbSERA3-N in den zuvor für PbSERA beschriebenen charakteristischen Regionen im Zytoplasma von Schizonten (Abb. 11B). Die PbSUB1-C-spezifische Fluoreszenz verteilt sich in späteren Entwicklungsstadien in der PV und assoziiert stark mit der PVM (Abb. 11C, D). Sowohl PbSERA3-N als auch PbSUB1-C können in Merozoiten detektiert werden, allerdings nur mit eingeschränkter Kolokalisation (Abb. 10E).

PbDPAP3-N kolokalisiert ebenfalls mit PbSERA3-N in den spezifischen Regionen im Zytoplasma, in der PV und in der PVM (Abb. 11F-H). Aufgrund der Ergebnisse dieser Kolokalisationsstudien ist theoretisch eine räumliche Begegnung der Interaktionspartner innerhalb der Prozessierungskaskade (Abb. 11A) möglich. Eine klare räumliche Trennung von SUB1 und SERAs, wie sie durch sog. „Exonemen“-Strukturen für SUB1 in *Plasmodium* Blutschizonten realisiert werden (Yeoh *et al.*, 2007), ist in *Plasmodium* Leberstadien nicht erkennbar.

**Abbildung 11 (nächste Seite):** Lokalisation von PbDPAP3 und PbSUB1 in infizierten HepG2-Zellen. (A) Die Cysteinprotease PfDPAP3 prozessiert Serinprotease PfSUB1, welche wiederum PfSERA Proteasen in der PV von *P. falciparum* infizierten Erythrozyten aktiviert. Entsprechende homologe Proteasen in *P. berghei* sind PbDPAP3 und PbSUB1. (B-H) HepG2-Zellen wurden mit *P. berghei* Sporoziten infiziert und 45-59h pI fixiert. Entsprechende exo-erythrozytäre Entwicklungsstadien des Parasiten sind auf der rechten Seite benannt. Infizierte HepG2-Zellen wurden mit dem Rattenserum anti-PbSERA3-N (rot) und dem Mausantiserum anti-PbSUB1-C (B-E, grün) oder dem Mausantiserum anti-PbDPAP3-N (F-H, grün) markiert. Zur einfacheren Interpretation wurden nur die roten und grünen Aufnahmen überlagert (Mitte). Zusätzlich wurde mit anti-Exp1 (PVM, cyan) und Dapi (DNA, blau) gefärbt. DIC = Differential Interference Contrast, Balken: 5µm.



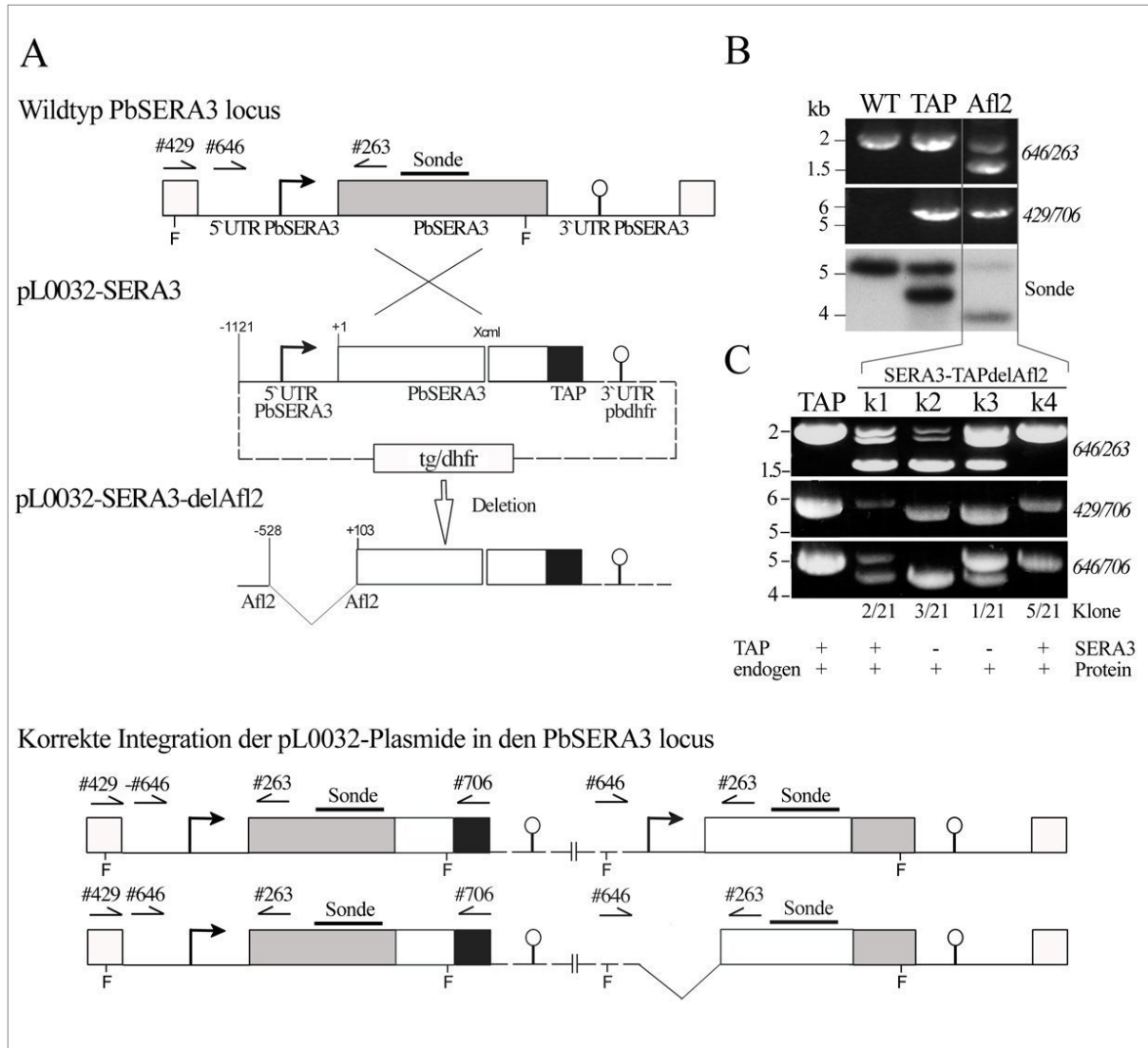


## 2.6 Ergänzende Daten

Ergänzend werden unveröffentlichte Daten vorgestellt, welche sich mit der genetischen Modifikation des *pbsera3* Gens beschäftigen.

### 2.6.1 DAS ENDOGENE *PBSERA3* LÄSST SICH NICHT DURCH EIN GETAGGTES *PBSERA3* ERSETZEN

Hier wurden bereits veröffentlichte Daten experimentell erneut aufgegriffen, in denen gezeigt wurde, dass *P. berghei* Parasiten zusätzlich zu dem endogenen PbSERA3 ein rekombinantes PbSERA3 mit C-terminalem TAP-Tag exprimieren können. Dafür wurden Parasiten mit dem linearisierten *pL0032-PbSERA3* Plasmid transfiziert. Das Konstrukt integriert durch homologe Rekombination in den *pbsera3* Gen Locus, welches eine Genverdopplung zur Folge hat (Abb. 12A). Nun sollte ein transgener Parasitenstamm generiert werden, der ausschließlich PbSERA3 mit C-terminalem TAP-Tag exprimiert. Hierfür wurde der ursprüngliche *pL0032-PbSERA3* Transfektionsplasmid, welcher die komplette kodierende Gensequenz für *pbsera3* enthält, mit dem Afl2-Restriktionsenzym geschnitten und anschließend religiert. Durch zweimaliges Schneiden des Enzyms werden 528 Basenpaare (bp) der 5' Region sowie 102 bp kodierende Sequenz des *pbsera3* Gens deletiert. Das modifizierte Konstrukt kodiert für eine 5' verkürzte *pbsera3* Gensequenz und erhält den Namen *pL0032-PbSERA3delAfl2* (Abb. 12A). In Abbildung 12A ist schematisch dargestellt wie die korrekte Integration des Plasmidkonstruktes in den Gen Locus geplant wurde. Der Erfolg der Transfektion wurde anhand von PCR und Southern Blot Analyse überprüft. Isolierte genomische DNA (gDNA) von *P. berghei* Wildtyp (WT), PbSERA3-TAP (TAP) und PbSERA3-TAPdelAfl2 (Afl2) Parasiten diente als Matrize für die Amplifikation von größenspezifischen PCR-Produkten mit dem Primerpaar #646/#263 (Abb. 12B, oben) und integrationspezifischen PCR-Produkten mit dem Primerpaar #429/#706 (Abb. 12B, Mitte). Erwartungsgemäß bindet das Primerpaar #646/#263 einmal an die Matrize von WT gDNA und jeweils zweimal an die Matrize von TAP und Afl2 gDNA (Abb. 12A) mit resultierenden Amplifikationsgrößen von 1.9kb für WT und TAP, im Gegensatz zu 1.9kb und 1.3kb für Afl2 gDNA (Abb.12B, oben). Ein mit dem Primerpaar #429/#706 amplifiziertes PCR-Produkt von 5,7 kb bestätigt die Integration der *pL0032*- Plasmide in den Gen Locus (Abb. 12B, mitte). Wie durch die ungleiche Bandenintensität im Southern Blot bereits vermutet wurde



**Abbildung 12:** TAP-Markierung von *pbsera3*. (A) Insertionsstrategie für die Herstellung der *PbSERA3*-TAP und *PbSERA3*-TAPdelAfl2 Parasiten. Das pL0032-*PbSERA3* Konstrukt enthält die 5' Region/5' Untranslated Region (UTR) und die komplette *pbsera3* kodierende Gensequenz fusioniert mit einem C-terminalen TAP-Tag (schwarze Box), sowie das 3'UTR von *pbdhfr* und das Gen für den *tg/dhfr* Selektionsmarker. Für die Herstellung des pL0032-*PbSERA3delAfl2* Konstrukts wurde das pL0032-SERA3 Plasmid mit dem Restriktionsenzym Afl2 geschnitten und religiert, wobei 528bp der 5' Region sowie 102bp der *pbsera3* kodierenden Region deletiert wurden. Die korrekte Integration der pL0032 Plasmide in den *pbsera3* Genlocus durch homologe Rekombination resultiert in einer Genduplikation - mit zwei funktionalen Genen bei der Transfektion mit pL0032-SERA3 (*PbSERA3*-TAP Parasiten) und einem funktionalen TAP-markierten sowie einem nicht funktionalem 5' verkürztem Gen bei der Transfektion mit pL0032-*PbSERA3delAfl2* (*PbSERA3*-TAPdelAfl2 Parasiten). Graue Box: ORF des endogenen *pbsera3*, weiße Box (groß): ORF des rekombinanten *pbsera3*, kleine weiße Box links: ORF *pbsera2*, kleine weiße Box rechts: ORF *pbsera4*, F: Fnu4HI Restriktionsschnittstelle (B) Analyse der transfizierten *P. berghei* Parasiten (Mischpopulation) mittels PCR (Oben, Mitte) oder Southern Blot (Unten). Analysiert wurde gDNA von *P. berghei* Wildtyp (WT), *PbSERA3*-TAP (TAP) oder *PbSERA3*-TAPdelAfl2 (Afl2) Parasiten. Das Primerpaar 646/263 für größenspezifische Amplifikate und das Primerpaar 429/706 für integrationsspezifische Amplifikate, sowie die verwendete radioaktiv markierte Sonde für den Southern Blot (schwarzer Balken) sind in (A) gekennzeichnet. (C) Genotypisierung klonaler *PbSERA3*-TAPdelAfl2 Parasiten mittels PCR Analyse. Aus der Subklonierung von der Parasitenpopulation aus (B) gingen Klone des Typs k1-k4 hervor.

(Abb. 12B, unten, Afl2), bestätigte eine nachfolgende WB Analyse, dass es sich bei den transgenen *PbSERA3*-TAPdelAfl2 Parasiten um eine Mischpopulation handelt. *PbSERA3*-N

Antiserum detektierte in Lysaten der transgenen *P. berghei*-PbSERA3-TAPdelAfl2 Parasiten das Pro-Peptid des endogenen und des rekombinanten PbSERA3. Humanes Gammaglobulin (Anti-TAP) detektierte erwartungsgemäß das PbSERA3-TAP Pro-Peptid, sowie C-terminale PbSERA3 Peptide mit TAP-Tag, vergleichbar zur Prozessierung bei *P. berghei* PbSERA3-TAP Parasiten. Für eine Subklonierung wurden mit der *P. berghei*-PbSERA3-TAPdelAfl2 Mischpopulation Mücken infiziert und mit den transgenen Sporozoiten HepG2-Zellen infiziert. Einige infizierte HepG2-Zellkulturen wurden 50h pI fixiert und mit anti-PbSERA3-N und anti-TAP markiert. Ein Großteil der infizierten HepG2-Zellen exprimiert TAP-getaggetes PbSERA3 (Abbildung nicht gezeigt). Daher wurden für die Subklonierung andere HepG2-Zellen mit transgenen Parasiten infiziert und 63h kultiviert. Abgelöste infizierte HepG2-Zellen, die tausende Parasite gleichen Genotypes enthalten wurden intravenös in die Schwanzvene von Mäusen injiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass jede Maus genau mit einer abgelösten Zelle infiziert wurde. Die klonalen Parasitenpopulationen wurden anhand einer PCR Analyse charakterisiert (Abb. 11C). Die Genotypisierung der verschiedenen klonalen Populationen ergab überraschend fünf Genotypen mit folgender Verteilung: zwei Klone von Typ1 (k1), 3 Klone von Typ2 (k2), ein Klon von Typ3 (k3), fünf Klone von Typ4 (Abb. 12C) und zehn Klone mit fehlender Integration des pL0032 Konstrukts (ohne Abbildung). Die zusätzliche Verwendung des Primerpaares #646/706 differenziert die Klone von Typ 1 und Typ2. Leider hat bei keinen der Klone das *pL0032-PbSERA3delAfl2* Konstrukt korrekt in den *pbsera3* Gen Locus integriert. Beispielfhaft wurden von je einem Vertreter der Klontypen k1-k4 Proteinlysate hergestellt und im WB analysiert (Daten nicht gezeigt). Die klonale Parasitenpopulation von Typ k1 und Typ k4 synthetisiert sowohl das TAP-markierte (TAP +) als auch das endogene PbSERA3 Protein (endogen +), dagegen exprimieren k2 und k3 nur das endogene PbSERA3 Protein (TAP -, endogen +). Keiner der Parasitenklone exprimiert nur das TAP-markierte PbSERA3.

### 2.6.2 KONDITIONALER KNOCKOUT VON PBSERA3

Die Herstellung konditionaler KO Parasiten basiert auf der Integration eines KO-Plasmids mittels homologer Rekombination durch *Double crossover* in einen Flp-exprimierenden *P. berghei* NK65 Klon (Klon Flp-uis4). Dieser wird „Recipient clone“ oder „Empfänger Klon“ genannt. Der Empfänger Klon exprimiert die Wildtyp Flp-Rekombinase stadienspezifisch unter der Kontrolle des *uis4* Promoters und verfügt zusätzlich über eine GFP-Fluoreszenz (integriert mit dem *dhfrts* Selektionsmarker). Die demnach in Sporozoiten synthetisierte Flp-

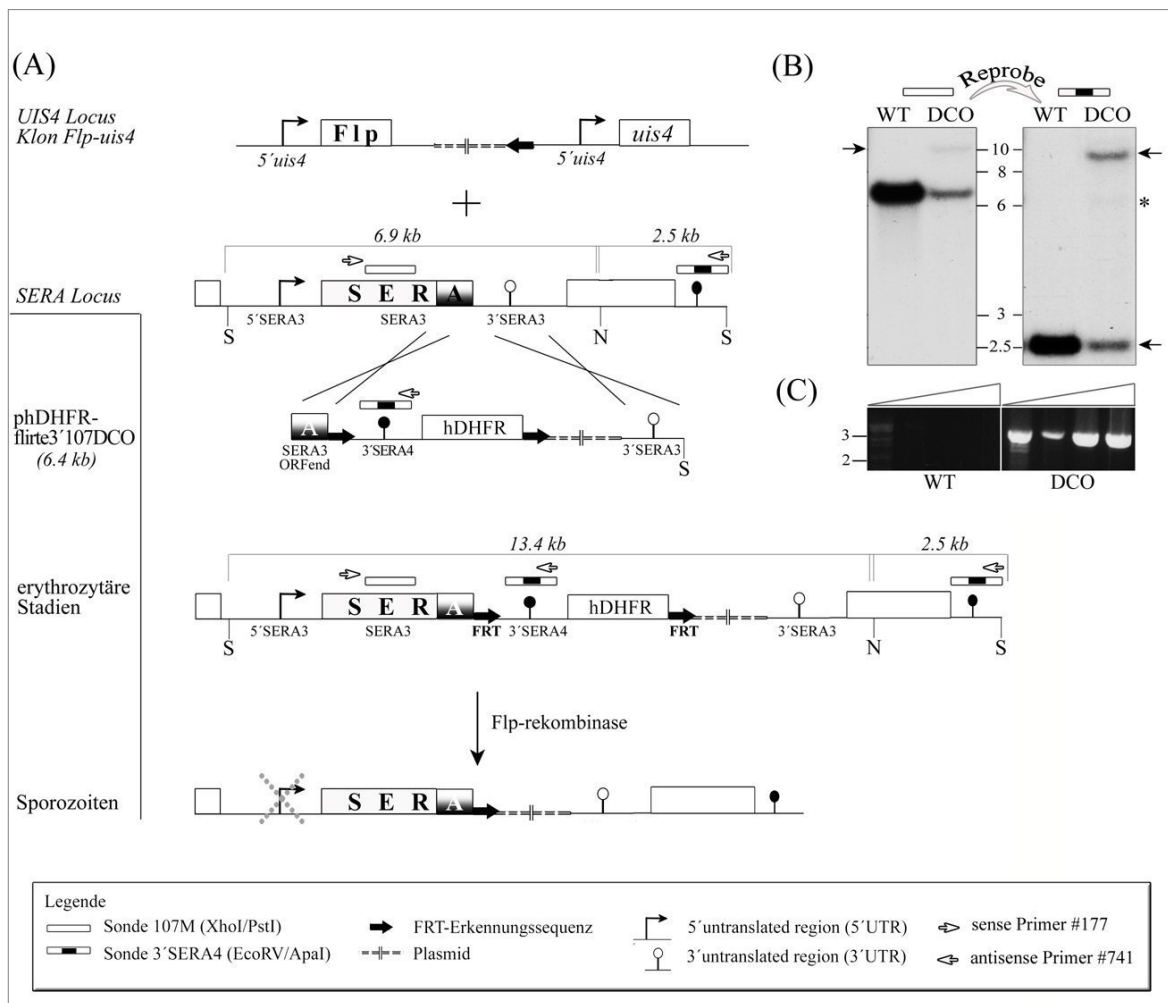


Rekombinase ermöglicht die Rekombination mit Hilfe von sog. „*frt*-Erkennungssequenzen“, welche die zu deletierende Region flankieren (Abb. 13A). Dieses System wurde von Menárd und Kollegen erstmals im Jahre 2004 für *P. berghei* etabliert (Carvalho *et al.*, 2004) und bereits erfolgreich für den konditionalen Knockout von *msp1*, *ron4* und *amal* angewendet (Menárd, persönliche Mitteilung).

Das Prinzip für den konditionalen Knockout von *pbsera3* basiert auf der stadienspezifischen Deletion dessen 3'UTRs. Erythrozytäre *P. berghei* Flp-uis4 Merozoiten wurden mit dem KO-Plasmid „phDHFR-flirte3'107DCO“ transfiziert und mit WR99210 auf Integration in den korrekten Gen Locus selektioniert. Das KO-Plasmid (Abb. 13A) enthält zwei zu *pbsera3* homologe Gensequenzen, ca. 800 bp des 3'ORFs mit anschließenden 15 bp des 3'UTR (SERA3ORFend) und ca. 730 bp des 3'UTRs ohne die besagten anfänglichen 15bp (3'SERA3). Für eine gesicherte Expression von PbSERA3 in der erythrozytären Entwicklungsphase des transgenen Parasiten wurde das 3'UTR des Gens *pbsera4* (3'SERA4), das ein vergleichbares Transkriptionsprofil aufweist (siehe Abb. 5) kloniert. Die *pbsera4* 3'UTR sowie der *hdhfr*-Selektionsmarker sind durch zwei 5'-3'-gerichtete *frt*-Erkennungssequenzen flankiert.

Die transfizierte Parasitenpopulation (DCO) wurde mittels Southern Blot (Abb. 13B) und PCR Analyse (Abb. 13C) auf Erfolg der Integration des KO-Plasmids in den korrekten Gen Locus untersucht. Der Southern Blot offenbart eine schwache Integrationseffizienz von ca. 10%. Die radioaktiv markierte Sonde „107M“ bindet spezifisch an den zentralen ORF von *pbsera3* und detektiert in der transgenen Mischpopulation zusätzlich zur 6,9 kb Wildtyp Bande eine Integrationsbande von ca. 10 kb (Abb. 13B, links), entgegen der erwarteten Bande bei 13,4 kb. Zur Validierung des Ergebnisses wurde der Blot gereinigt und mit einer weiteren Sonde inkubiert (Abb. 13B, rechts). Die Sonde „3'SERA4“ bindet außer an den endogenen 3' Bereich von *pbsera4* und dem integrierten rekombinanten 3'UTR von *pbsera4* demzufolge auch an Bereiche episomaler DNA (Abb. 13A). Bei gDNA von Wildtyp *P. berghei* Parasiten (WT) detektiert die Sonde erwartungsgemäß eine einzelne Bande von ca. 2.5kb. In transgenen Parasiten (DCO) detektiert die Sonde Integrationsbanden von ebenfalls 2.5kb und 10 kb (Pfeil), sowie eine episomale Bande von ca. 6.4 kb (Stern). Die Integrationseffizienz liegt aufgrund dieses Southern Blots bei etwa 50%, jedoch weicht auch hier die Größe der Integrationsbande von dem erwarteten Wert ab. Die unterschiedliche Intensität der integrationspezifischen Banden mit den unterschiedlichen Sonden kann nicht erklärt werden. Zusätzlich wurde die Integration mittels PCR Analyse bestätigt (Abb. 13C). Das resultierende Amplifikat wurde zudem kloniert und sequenziert.

Die Integration des KO-Plasmids ist daher möglich, jedoch blieben alle Versuche einen Klon zu erhalten bisher ohne Erfolg. Es wurden vier separate Subklonierungen mit je 12 bis 28 Mäusen durchgeführt, teilweise von der Parentalpopulation, sowie von bereits subklonierten Populationen.



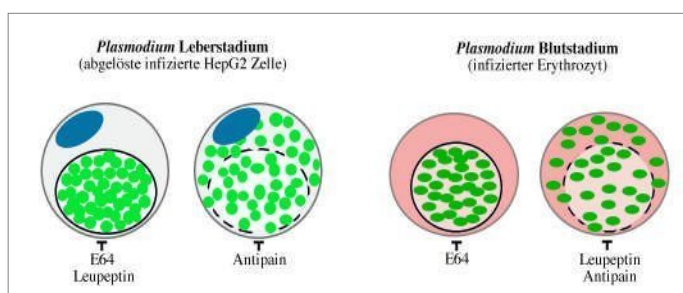
**Abbildung 13:** konditionaler Knockout von *pbsera3*. (A) Insertionsstrategie für die Herstellung der *pbsera3* Knockout Parasiten. Der GFP-fluoreszierende *Recipient* Klon *Flp-uis4*, welcher die *Flp*-Rekombinase unter Kontrolle des *uis4* Promotors exprimiert, wird mit dem KO-Plasmid *phDHFR-flirte3'107DCO* transfiziert. Dieser integriert über homologe Rekombination mittels *double crossover* in den *pbsera3* Gen Locus. Dafür enthält der KO-Plasmid zwei homologe Gensequenzen zu *pbsera3*, einen Teil des 3'ORF (SERA3ORFend) und den 3'UTR (3'SERA3), sowie zwei *Flp*-Rekombinationssequenzen (*frt*-sites), welche den 3'UTR von *pbsera4* und den Selektionsmarker flankieren. Nach Integration in erythrozytären Stadien des Parasiten ersetzt der *pbsera4* 3'UTR die Funktion des *pbsera3* 3'UTR. In transgenen *P. berghei* Sporoziten wird die Expression der *Flp*-Rekombinase durch den *uis4* Promoter angeschaltet und das *Flp* Protein rekombiniert bzw. deletiert den 3'UTR Bereich von *pbsera3* und somit dessen Transkription. (B) Southern Blot Analyse

### 3. DISKUSSION

#### DER AUSTRITT VON PLASMODIUM PARASITEN AUS DER WIRTSZELLE BENÖTIGT PROTEASE AKTIVITÄT

In dieser Arbeit wurden die Expression, Lokalisierung und Prozessierung der putativen SERA Cysteinproteasen im *P. berghei* Leberstadium näher charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Analysen lassen auf eine wichtige Funktion dieser Proteasen beim Austritt des Parasiten aus der Wirtszelle schließen. Der Lebenszyklus parasitärer *Plasmodien* besteht aus invasiven und replikativen Stadien im Vertebraten und Invertebraten Wirt. Am Invasionsprozess beteiligte Proteine des Parasiten und der Wirtszelle sind bereits gut untersucht, dagegen ist immer noch wenig darüber bekannt, wie der Malaria Parasit seine Wirtszelle nach abgeschlossener Reproduktion verläßt.

Invasive Stadien, z.B. Sporozoiten und Merozoiten des Leber- und Blutstadiums, werden durch multiple Teilung gebildet und müssen daraufhin ihr intrazelluläres Kompartiment (parasitophore Vakuole) und kurz darauf ihre Wirtszelle verlassen. Generelle Voraussetzung für die Freisetzung des Parasiten ist die Destabilisierung von zwei Membranen – PVM und Wirtszellmembran – und des Zytoskeletts. Inhibitorstudien lieferten erste Hinweise auf die Beteiligung von Proteasen an diesem Prozess. Die Behandlung von intrazellulären Schizonten mit einem Inhibitor-Cocktail aus Leupeptin, Chymostatin, Antipain (Serin- und Cysteinproteaseninhibitoren) und Pepstatin (Aspartatproteaseninhibitor) resultierte in der Akkumulation von vitalen Merozoiten, wobei die normale Freisetzung der Parasiten blockiert war (Lyon und Haynes, 1986). Kurz darauf demonstrierten Delplace und Kollegen (1988), dass allein Leupeptin die Freilassung von Merozoiten aus infizierten Erythrozyten inhibiert und dabei mit der Prozessierung von P126 (PfSERA5) interferiert. Heute weiß man, dass Leupeptin unter anderem die Serinprotease SUB1 inhibiert, welche in einer Prozessierungskaskade dann SERA Proteasen prozessiert (Yeoh *et al.*, 2007).



**Abbildung14:** Die Freisetzung von Merozoiten aus infizierten Hepatomazellen und Erythrozyten ist Protease-abhängig (Schematische Darstellung). Behandelt wurde mit dem Cysteinprotease-Inhibitor E64 und den Serin- und Cysteinprotease-Inhibitoren Leupeptin und Antipain. Lila: PVM, Grau/Rot: Wirtszellmembran, Blau: Wirtszellkern, Grün: *Plasmodium* Merozoiten

Außerdem wurde gezeigt (Salmon *et al.*, 2001), dass die Behandlung intrazellulärer Schizonten mit dem Cysteinproteaseninhibitor E64 die Bildung von PVM-umschlossenen Merozoiten Strukturen („PVM-enclosed merozoite structures“, *PEMS*) hervorruft. Bei E64 handelt es sich strukturell um ein Epoxysuccinat-Inhibitor, der insbesondere Cysteinproteasen des Clans CA, wie Papain, Cruzain und die Cathepsine B, H und L hemmt (Gomes *et al.*, 2005; Barrett *et al.*, 1982). Die Destabilisierung der PVM, nicht jedoch der Erythrozytenmembran, involviert offensichtlich eine oder mehrere E64-sensitive Cysteinproteasen. Hingegen erlaubt ein Inhibitor-Cocktail aus Leupeptin und Antipain die Degradierung der PVM, aber bewahrt die Erythrozytenmembran (Wickham *et al.*, 2003).

Interessanterweise sind Beobachtungen bezüglich der Inhibitorstudien von *Plasmodium* erythrozytären Entwicklungsstadien teilweise auf exo-erythrozytäre Entwicklungsstadien übertragbar (Abb. 14). Die späte Behandlung von *P. berghei*-infizierten HepG2-Zellen mit dem Cysteinproteaseninhibitor E64 verhindert das Ablösen der infizierten Zellen, sowie die Merosomenbildung in vitro. Erfolgt die Behandlung mit E64 erst kurz vor abgeschlossener Merozoitenentwicklung, bleibt bei abgelösten infizierten Zellen die PVM zusätzlich zur Wirtszellmembran erhalten und die Entlassung freier infektiöser Merozoiten ist blockiert (Sturm und Heussler, 2007). Des weiteren erlaubt Antipain die Degradierung der PVM, wohingegen Leupeptin die PVM-Zerstörung verhindert (Schmidt-Christensen *et al.*, 2008). Die Studien scheinen sich hinsichtlich der unterschiedlichen Wirkung von Leupeptin zu widersprechen. Dies könnte in der Tat in experimentellen Variablen, wie z.B. verschiedene Kulturbedingungen von *Plasmodium* Blut- und Leberstadien oder in Entwicklungsstadienspezifischen Abläufen der Parasiten begründet liegen. Dennoch gibt es wesentliche Gemeinsamkeiten. Die Destabilisierung bzw. Degradierung der PVM und der Wirtszellmembran wird jeweils unterschiedlich reguliert und ist eindeutig Protease-abhängig, wobei die Zerstörung der PVM einen E64-sensitiven Prozess voraussetzt. Welche Cysteinproteasen kommen dafür in Frage und wie werden sie reguliert? Bisher konnten einige für putative Cysteinproteasen kodierende Gene in *Plasmodium* identifiziert und charakterisiert werden (Rosenthal *et al.*, 2004). Dazu gehören Falcipain-1, eine nicht-essentielle Cathepsin L-ähnliche Cysteineprotease (Sijwali *et al.*, 2004), die in der Nahrungsvakuole residierenden Hämoglobinasen Falcipain-2, -2' und -3, sowie die Genfamilie der SERA Cysteinproteasen. Ähnlich der Asparatprotease Plasmepsin II besitzt Falcipain-2 zusätzlich zur Hämoglobinase Aktivität die Eigenschaft Wirtszellproteine des erythrozyten Zytoskeletts – Spektrin, Protein 4.1 und Aktin – bei neutralem pH zu verdauen. Bei fortgeschrittener Merozoitenentwicklung konnte es zudem im Zytoplasma von infizierten Erythrozyten detektiert werden (Le Bonniec

*et al.*, 1999). In Betracht nachfolgender Gen-Knockout Studien kann jedoch angenommen werden, dass weder Falcipain-2 noch Plasmeypsin II essentiell für das späte Blutstadium sind (Sijwali *et al.*, 2006; Omara-Opyene *et al.*, 2004). Dagegen lokalisieren die putativen SERA Cysteinproteasen zum richtigen Zeitpunkt in der PV und sind daher potentielle Kandidaten für Effektorproteasen, die an der Freisetzung des Parasiten direkt oder indirekt beteiligt sind.

#### *SERA PROTEASEN WERDEN STADIENSPEZIFISCH EXPRIMIERT UND ZUM ENDE DER LEBERPHASE STARK HOCHREGULIERT*

Promoteranalysen sowie der Proteinnachweis durch Western Blot Analyse und IFA zeigten, dass *P. berghei* SERA1-4 zum Ende der exo-erythrozytären Entwicklungsphase stark exprimiert werden. Vermutlich sind daher die putativen Cysteinproteasen an der Merozoitenreifung sowie am Ablösen infizierter Hepatomazellen beteiligt. Zudem konnte eine starke Promotoraktivität für PbSERA1-4 in allen *P. berghei* Blutstadien detektiert werden. PfSERA Transkripte wurden hingegen nicht in Ringstadien, aber in *P. falciparum* Schizonten nachgewiesen (Miller *et al.*, 2002). Laut unseren Promoteranalysen beschränkt sich die Expression des PfSERA8 Homologs PbSERA5, auch bekannt als ECP1, auf Oozysten und Sporozoiten Entwicklungsstadien und bestätigt damit zuvor veröffentlichte Daten (Schmidt-Christensen *et al.*, 2008; Arisue *et al.*, 2007; Aly *et al.*, 2005). Die für diese Arbeit durchgeführten Promoteranalysen lassen auf eine zusätzliche Transkription von PbSERA1, PbSERA2 und PbSERA3 in Oozysten schließen. RT-PCR Analysen zeigen dagegen eine mRNA Expression von nur PbSERA1 und PbSERA5 in Oozysten und letztlich wurde keine PbSERA1-4 Proteine im WB detektiert. Dies läßt vermuten, dass die SERA Translation teilweise post-transkriptional reguliert wird. Ähnlich wurde dies auch für *P. falciparum* Blutstadien berichtet. Ungeachtet der Hochregulation von PfSERA1-9 mRNA konnten nur Proteine zentral im Gencluster liegender *pfsera* Gene (*pfsera*4-6) in Parasiten nachgewiesen werden (Miller *et al.*, 2002). Die unerwartete GFP-Synthese von PbSERA1-4-GFP-transfizierten Parasiten in Oozysten könnte möglicherweise auch durch die Verwendung eines alternativen 3'UTRs verursacht worden sein. Anstatt des entsprechenden *pbsera* 3'UTRs enthalten alle Konstrukte das 3'UTR des konstitutiv exprimierten *pbdhfr/ts* Gens. Hinführend wurde die Heterogenität von 5'- und 3'-UTRs bereits als allgemeines und verbreitetes Merkmal von *Plasmodium* Transkripten diskutiert (Fox *et al.*, 1994), unter anderem auch für die Transkriptionskontrolle von *sera* Genen. Allerdings zeigte das PbSERA5-GFP Konstrukt, das auch das 3'UTR des konstitutiv exprimierten *pbdhfr/ts* Gens

enthält keine unerwartete Expression in Blut- und Leberstadium, was gegen einen großen Einfluss des 3'UTR spricht.

#### *PROZESSIERUNG DER SERA PROTEASEN HÄNGT VON DER PARASITENENTWICKLUNG AB*

Die proteolytische Spaltung des PfSERA5 Proteins wurde bereits umfassend charakterisiert und konnte sowohl durch Inhibition von PfDPAP3 als auch PfSUB1 verhindert werden. Die Inhibition der Cysteinprotease PfDPAP3 reduzierte die Mengen an aktivem PfSUB1 und reguliert somit die Aktivität von PfSUB1. Die Serinprotease PfSUB1 reguliert wiederum die Prozessierung von PfSERA-Proteasen, die dann wahrscheinlich für die effiziente Freigabe der Parasiten aus der Erythrozyten-Wirtszelle verantwortlich sind (Yeoh *et al.*, 2007; Arastu-Kapur *et al.*, 2007).

Die Prozessierung von SERA Proteasen in *P. berghei* Leberstadien wurde anhand von Antikörpern untersucht, die gegen verschiedene Regionen von PbSERA1-4 generiert wurden. SERA Proteasen wurden im Leberstadium bisher nicht charakterisiert, da niedrige Infektionsraten biochemische Analysen limitierten. Das *FACS-Sortieren* von GFP-exprimierenden *P. berghei* Parasiten ermöglicht die Anreicherung der Zellkultur mit infizierten Zellen (Prudêncio *et al.*, 2008; Schmidt-Christensen *et al.*, 2008). Umfangreiche Studien zur Prozessierung von PbSERAs, wie sie für erythrozytäre *P. falciparum* Parasiten gezeigt wurden (Debrabant und Delplace *et al.*, 1989; Delplace *et al.*, 1987) sind allerdings nach wie vor bei *P. berghei* exo-erythrozytären Entwicklungsstadien nicht durchführbar. Die wichtigste Erkenntnis aus den durchgeführten WB Analysen war, dass alle PbSERA1-4 Proteine synthetisiert und in späten Leberstadien prozessiert werden. Kleinere Mengen unprozessierter PbSERA Proteine werden in Lysaten später Leberschizonten höchstwahrscheinlich durch spät- oder unterentwickelte Parasiten hervorgerufen, welche bei jeder *in vitro* Infektion zu beobachten sind, da die Synchronisierung der Parasiten-Entwicklung in infizierten Hepatomazellen derzeit noch nicht möglich ist. Die für *P. falciparum* eindeutig identifizierte Reihenfolge der SERA Prozessierung (S1, S2, S3) ist für die SERAs in *P. berghei* nur schwierig nachzuweisen. Tendenziell unterliegt jedoch die Serin-Typ SERA PbSERA1 zunächst einer C-terminalen und Cystein-Typ SERA PbSERA4 einer N-terminalen Prozessierung. Obwohl die Synchronisierung der Parasiten während der Leberphasenentwicklung nicht möglich ist, können abgelöste infizierte Zellen von einer gemischt infizierten Zellkultur abgesammelt werden. Diese enthalten alle ausgereifte Merozoiten, die vergleichbar mit synchronisierten *P. berghei*-Schizonten Kulturen sind. Antikörper, die gegen die zentrale Papain-ähnliche Proteasedomäne (M) der SERAs 1-4

gerichtet sind, erkennen ein 53-55-kDa Peptid, das sehr wahrscheinlich dem aktiven Enzym entspricht. Es ist zudem erwähnenswert, dass N- und C-terminale Domänen nicht sofort degradiert werden und daher eine noch unbekannt Funktion ausüben könnten.

*SERIN-SERAS UND CYSTEIN-SERAS UNTERSCHIEDEN SICH IN IHRER SUBZELLULÄREN LOKALISATION UND VERMUTLICH IN IHRER FUNKTION*

Die wohl interessanteste Beobachtung aus den Immunfluoreszenzanalysen zeigt, dass sich die Verteilung beider Serin-Typ SERAs PbSERA1 und PbSERA2 im Vergleich zu den Cystein-Typ SERAs PbSERA3 und PbSERA4 in infizierten HepG2-Zellen stark unterscheidet. Vermutlich üben die einzelnen PbSERAs unterschiedliche Funktionen während der Leberphasenentwicklung des Parasiten aus.

Überraschenderweise gelang es kürzlich Elyzana D. Putrianti aus der Arbeitsgruppe von Kai Matuschewski die Gene *pbsera1*, 2 und 4 zu deletieren, wohingegen die Deletion des *pbsera3* Gens nicht möglich war (persönliche Mitteilung). Der Knockout (KO) von den Serin-Typ SERA Genen *pbsera1* und *pbsera2* bewirkte keinen Nachteil für die Entwicklung des Parasiten, d.h. diese Gene sind vermutlich nicht essentiell. *pbsera4*-KO Parasiten zeigten ebenfalls keine sichtliche Beeinträchtigung in ihrer Entwicklung in vitro, jedoch waren erste Parasiten nach intravenöser (iv) Injektion von Sporozoiten erst um zwei Tage verzögert (Tag7) in Blut von Ratten detektierbar. Vermutlich hat die genetische Deletion des *pbsera4* Gens doch einen negativen Effekt für den Parasiten, der in vitro nicht ausgeprägt ist. Eigene Bemühungen den Knockout von *pbsera3* zu generieren, waren ebenfalls nicht erfolgreich, was bestätigt, dass PbSERA3 eine essentielle Funktion während der erythrozytären Entwicklung des Parasiten ausübt. Der experimentelle Ansatz für den konditionalen Knockout beabsichtigte die Flankierung des 3'UTR mit spezifischen *frt*-Erkennungssequenzen (*engl. Flp Recognition Target*), die von einer stadienspezifisch synthetisierten Flp-Rekombinase (in Sporozoiten) rekombiniert werden, welche somit die Transkription des *pbsera3* Gens in Sporozoiten und Leberstadien unterbindet. Obwohl nachweislich eine Integration des KO-Plasmids stattfand, konnte trotz mehrmaliger Subklonierungsversuche keine klonale Population in der Blutphase isoliert werden. Die spezifischen *frt*-Erkennungssequenzen (5'-GAAGTTCCTATTC->TCTAGAAA<-GTATAGGAACTTC-3') bestehen aus einer asymmetrisch gerichteten Kernregion (8bp) und zwei flankierenden palindromen Wiederholungen (13bp) (Hartley und Donelson, 1980). Es wäre theoretisch möglich, dass *frt*-Elemente am 3'UTR die

Bildung von zusätzlichen RNA-Sekundärstrukturen begünstigen, die zum Abbruch der Transkription führen. Dies käme dann einem vorzeitigen Knockout in der Blutphase gleich. Weiterhin unverstanden bleibt die Ursache für die Genduplikation von *sera* Genen in verschiedenen *Plasmodium* Spezies. Möglicherweise bedeutet dies eine wichtige Funktion für SERAs, wie die vermutete Rolle beim Austritt des Parasiten aus der Wirtszelle. Ein weiterer Grund für die Genduplikation wäre eine vermehrte antigene Variation, aber dies ist recht unwahrscheinlich angesichts der Lokalisation der SERA Proteine im Parasiten und der PV bzw. PVM. Der Knockout von PbSERA5 demonstrierte die essentielle Rolle des Proteins während der Freisetzung von Sporozoiten aus Oozysten (Aly *et al.*, 2005). Es ist wichtig zu erwähnen, dass PbSERA5 nicht in erythrozytären Entwicklungsstadien des Parasiten exprimiert wird und somit relativ einfach ausgeschaltet werden kann, weil der Parasiten dadurch nicht beeinträchtigt wird. Die Deletion kommt dann erst während der Insektenphase des Parasiten zum Tragen, wenn die Selektion schon abgeschlossen ist. Dagegen werden alle anderen PbSERAs während der Blutphase synthetisiert, was Knockout Experimente problematisch macht. Falls ein KO keinen Phänotyp hat, kann keine Aussage über die Funktion des jeweiligen Proteins getroffen werden. Es kann nur geschlussfolgert werden, dass es zur Kompensierung des Verlustes der Proteinexpression kommen kann und man letztendlich auf die wenigen Parasiten selektioniert, welche für den Verlust der bestimmten Protease kompensieren können. Wertvoll sind diese Experimente dennoch, da sie die Proteasen als Zielgruppe für die Entwicklung neuer Antimalaria-Mittel aufgrund ihrer Redundanz ausschließen können.

*Das TAP-Markieren von PbSERA3.* Das C-terminale Markieren des *pbsera3* Gens mit dem TAP-Tag lieferte zunächst Informationen über die Prozessierung und Lokalisierung des PbSERA3 Proteins und dessen C-terminaler Fragmente in infizierten Hepatomazellen. *P. berghei*-PbSERA3-TAP Parasiten exprimieren das PbSERA3-TAP Protein zusätzlich zum endogenen PbSERA3 und sind in ihrer Entwicklung nicht benachteiligt im Vergleich zu Wildtyp Parasiten. Obwohl die transgenen Parasiten eine normale Prozessierung und Lokalisierung des PbSERA3-TAP Proteins zeigen, blieb die nachträgliche Deletion des endogenen *pbsera3* Gens ohne Erfolg. Desgleichen gelang Elyzana D. Putrianti das C-terminale Markieren (ohne Genduplikation) von *pbsera3* nicht, während *pbsera1*, 2 und 4 mit einem fluoreszierenden mCherry-Tag versehen werden konnten (persönliche Mitteilung). Interessanterweise zeigen die PbSERA4mCherry Parasiten einen vergleichbaren Phänotyp zu PbSERA4-KO Parasiten. Es ist daher anzunehmen, dass ein C-terminal fusionierter mCherry-



Tag die Funktion der Protease behindert. Vermutlich trifft dies auch für den C-terminalen TAP-Tag von PbSERA3 zu, weshalb die genetische Modifikation des endogenen PbSERA3 Gens bisher erfolglos blieb.

Eine weitere Spekulation über die Funktion der PbSERAs basiert auf deren individuellen Lokalisierung in infizierten Hepatomazellen. PbSERA1 lokalisiert überwiegend in Zellkernen von früh und spät entwickelten Parasiten der Leberphase und ist womöglich an der Modulation der Transkriptionskontrolle beteiligt, vielleicht durch Prozessierung von Transkriptionsfaktoren. Die Kernlokalisierung von PbSERA1 stützt sich auf keine bisher bekannte Kernlokalisierungssequenz („Nuclear Localization Signal“, abgekürzt NLS), wie sie z.B. für die Proteinkinase *P. berghei* MAPK1 (Bolte, Dissertation) oder das Aspartat-reiche Protein „Sporozite and Liver stage Asparagin-Rich Protein“ (SLARP) (Silvie *et al.*, 2008) identifiziert wurden. SLARP wird stadienspezifisch exprimiert und SLARPMCherry lokalisiert ausschließlich in Zellkernen von Sporozoiten sowie Trophozoiten und Schizonten der exo-erythrozytären Entwicklungsphase des Parasiten. Basierend auf Knockout-Studien vermuten Silvie *et al.* (2008), dass SLARP als Transkriptionsfaktor die Genexpression in Sporozoiten und frühen Leberparasiten reguliert. Transkriptionsfaktoren spielen wahrscheinlich beim Wechsel von einem Parasitenstadium zum nächsten eine entscheidene Rolle und deshalb muss die Expression sehr genau reguliert werden (de Silva *et al.*, 2008). Es ist deshalb möglich, dass Proteasen in den Kern transportiert werden müssen, um Transkriptionsfaktoren zu spalten und sie damit zerstören bevor sie über den Proteosom-Weg komplett abgebaut werden können.

Der prozessierte C-terminus von PbSERA1 lokalisiert hingegen in direkter Nähe der PVM. Bekannte Membran-Assoziations-Motife konnten jedoch in Zusammenhang mit der Membranassoziation nicht identifiziert werden. PfSERA5 bindet angeblich spezifisch an Phospholipide der Erythrozytenmembran-Innenseite (Perkins und Ziefer, 1994) und wahrscheinlich findet eine ähnliche Assoziation für *P. berghei* SERAs statt. Serin-Typ SERA PbSERA2 ist in frühen Schizonten ebenfalls an der PVM detektierbar. Da auch PbSUB1 zur PVM transportiert wird, könnte PbSERA2 dort prozessiert werden und seiner möglichen Funktion als Protease bei der PVM Degradation nachkommen. Eine proteolytische Aktivität konnte für die putativen SERA-Proteasen bisher nicht nachgewiesen werden. Die Chymotrypsin-ähnliche Proteasenaktivität der Serin-Typ SERA PfSERA5 (Hodder *et al.*, 2003) wurde inzwischen von der Arbeitsgruppe revidiert, doch die Kristallstruktur von PfSERA5 verrät eine erstaunliche Ähnlichkeit zu bekannten Cysteinproteasen (Crabb,

persönliche Mitteilungen). Der Austausch des katalytischen Cysteins zu einem Serin im aktiven Zentrum – zusammengesetzt aus Histidin, Asparaginsäure und das katalytische Serin – beschreibt die Serin-Typ SERAs eigentlich als Serinproteasen mit einer Cysteinprotease Konformation (Eakin *et al.*, 1989). Diese Struktur zeigt gewisse Ähnlichkeiten zu einer Klasse von Trypsin-ähnlichen Cysteinproteasen in Viren (Bazan *et al.*, 1988).

Einen weiteren interessanten und gleichzeitig überraschenden Hinweis hinsichtlich der Funktion der Serin-Typ SERAs fanden Crabb und Kollegen. Die Mutation einer konservierten Aminosäure im aktiven Zentrum einer Serin-Typ PfSERA führte zur vorzeitigen Freisetzung von frühreifen Parasiten aus infizierten Erythrozyten (Crabb, persönliche Mitteilungen). Eine mögliche Interpretation wäre demnach, dass Serin-Typ SERAs die Cystein-Typ SERAs hinsichtlich der Verfügbarkeit eines bisher unbekanntes Substrates regulieren. Aufgrund der Lokalisation von Serin-Typ SERA PbSERA2 an der PVM ist ähnliches auch für *P. berghei* SERAs denkbar. Spekulativ sollte die Überexpression von PbSERA2 demzufolge den gegenteiligen Effekt, d.h. die verspätete Freigabe von Merozoiten, zeigen.

Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass PbSERA3 in jungen Leberschizonten als Pro-Peptid zur PVM lokalisiert und später prozessiert wird. Unter Freigabe der prozessierten zentralen Papain-ähnlichen Proteasedomäne verbleibt der N-terminus assoziiert mit der PVM. Zudem konnte unprozessiertes PbSERA3 Pro-Peptid apikal in Merozoiten detektiert werden, vergleichbar zu der Lokalisierung von PfSERA5 (Perkins und Ziefer, 1994). Daher könnte PbSERA3 sowohl beim Austritt des Parasiten aus der Wirtszelle als auch bei Invasionsprozessen beteiligt sein. PbSERA4 lokalisiert während der Leberphasenentwicklung überwiegend mit einem ähnlichen Verteilungsmuster zu dem von PbSERA3, daher wäre eine ähnliche Funktion vorstellbar.

#### *DIE MÖGLICHE BETEILIGUNG DER SERAS AM WIRTSZELLTOD*

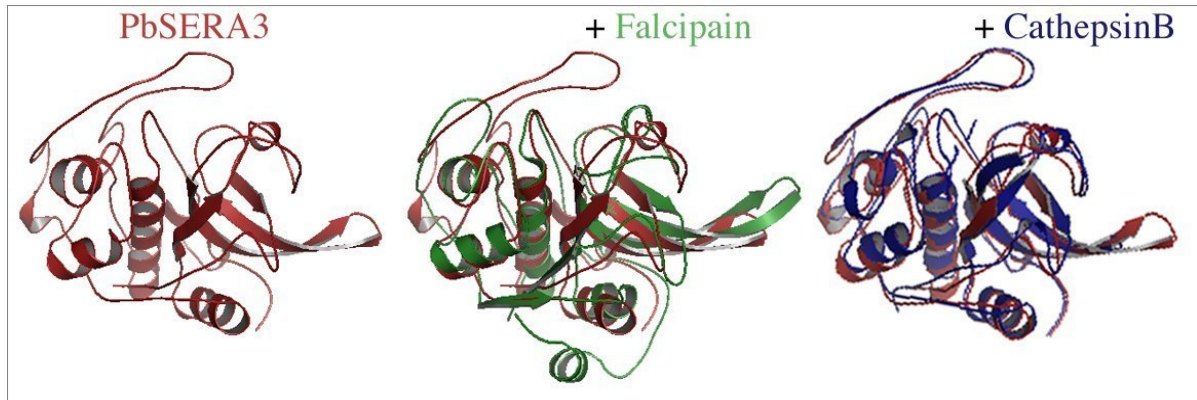
Während der exo-erythrozytären Entwicklung von *P. berghei* Schizonten in Hepatozyten, zeigt die Wirtszelle keinerlei Anzeichen von Zelltod (Leiriáro *et al.*, 2005 und 2004; van de Sand *et al.*, 2005). In der Tat blockiert der Parasit sogar aktiv die apoptotische Wirtszell-Maschinerie, um sein Überleben innerhalb des Wirts zu sichern. Erst sehr spät in der Leberphasenentwicklung, wenn der Schizont zu tausenden Merozoiten differenziert ist, sind erste Merkmale von Wirtszelltod detektierbar. Dieser scheinbar plötzliche Wechsel begründet sich vermutlich weniger in dem nachlassenden Schutz vor Apoptose sondern stattdessen in der Induktion eines Parasiten-induzierten Zelltodes. Unterstützt wird diese Hypothese von

fehlender Caspase-Aktivität und DNA-Fragmentierung, sowie degradierten Mitochondrien in abgelösten *P. berghei*-infizierten Hepatomazellen (Sturm *et al.*, 2006, Sturm und Heussler, 2007). Eine denkbare Möglichkeit ist, dass das enorme Wachstum des intrazellulären Parasiten und der daraus folgende Nährstoffmangel für die Wirtszelle einen Autophagy-ähnlichen Zelltod induziert, einhergehend mit der Aktivierung von Wirtszell-Cathepsinen. Sehr viel wahrscheinlicher ist aber, dass die E64-sensitiven Cysteinproteasen vom Parasiten stammen.

Bei den dafür in Frage kommenden Proteasen handelt es sich voraussichtlich um SERA Cysteinproteasen des Parasiten, welche nachweislich kurz vor der sichtbaren Degradierung der PVM im Wirtszellzytosol detektiert wurden. Es ist deshalb denkbar, dass die Parasitenproteasen einen geordneten Zelltod einleiten, der schließlich zur Bildung von Merosomen führt und damit den Übergang der Leberphase des Parasiten in die Blutphase ermöglicht.

Der von *P. berghei* eingeleitete Wirtszelltod unterliegt offensichtlich einer strengen zeitlichen Kontrolle, wobei vermutlich die Proteaseaktivität reguliert werden muss. Deshalb stellt sich die Frage nach der Regulation von Parasitenproteasen. Außerdem bleibt abzuklären, wie sich der Parasit vor den eigenen Proteasen und eventuell vor Wirtszellproteasen schützt? In der Tat konnte ein Cysteinproteaseninhibitor in *P. berghei* identifiziert werden, welcher potentiell sowohl parasitäre als auch Wirtszell-Cysteinproteasen (Caspasen) hemmen kann (Pandey *et al.*, 2006). Da er zum Ende der Leberphaseninfektion im Wirtszellzytoplasma lokalisiert (Annika Rennenberg, unveröffentlicht) ist auch eine Regulation der am Wirtszelltod beteiligten Proteasen durchaus denkbar. Der „*P. berghei* Inhibitor of Cysteine Proteases“ (PbICP) gehört zur Familie der Chagasin-ähnlichen Inhibitoren, welche endogene Cysteinproteasen (*Trypanosoma cruzi*) oder Wirtszell-Cysteinproteasen (*Leishmania mexicana*) regulieren können (Santos *et al.*, 2005 und 2006; Besteiro *et al.*, 2004). Rekombinant exprimiertes PbICP inhibiert reversibel und kompetitiv mehrere Cathepsin L-ähnliche Cysteinproteasen, unter anderem die *Plasmodium* Protease Falcipain-2, Papain und Cysteinproteasen von *Entamoeba histolytica*, nicht jedoch Cathepsin B (Annika Rennenberg, unveröffentlicht). Ob PbICP die putative SERA Protease Aktivität regulieren kann, ist unklar. Die Proteinstruktur von PbSERA3 konnte aufgrund der Sequenzhomologie zu verwandten Cysteinproteasen mit bekannten Röntgenkristallstrukturen modelliert werden (Krishna Nagarajan, persönliche Mitteilungen). Dabei deutet sich für PbSERA3 eine für Cysteinproteasen des C1A Klans charakteristische ellipsoidale Form an, einhergehend mit einem für Cathepsin B typischen sog. „occluding Loop“ (Abb. 15). Da PbICP CathepsinL-

ähnliche Cysteinproteasen (wie Falcipain-2) hemmt, nicht jedoch Cathepsin B, sind die SERA Proteasen vermutlich kein potentielles Ziel für PbICP. Vielmehr scheint die Funktion von PbICP zu sein, Caspasen und Cathepsine der Wirtszelle zu inhibieren, um einen geordneten Zelltod der Wirtszelle, eingeleitet durch SERA Proteasen, zu ermöglichen.



**Abbildung 15:** Modellierter Tertiärstruktur von PbSERA3 (von K. Nagarajan, Lübeck) im Vergleich zu bekannten Röntgenkristallstrukturen von Cathepsin L-ähnlicher Cystein Protease *Plasmodium falciparum* Falcipain-2 (FP-2, grün) und humanem Cathepsin B (blau). (Links): zeigt die Kernstruktur (Ala<sup>595</sup>-Ser<sup>900</sup>) von PbSERA3 mit einer angedeuteten ellipsoidalen Form, welche charakteristisch für Cysteinproteasen des C1A Klans ist. Der Polypeptidstrang der reifen Protease faltet sich in zwei distinkte Domänen, getrennt durch eine lange zentrale putative Substratbindetasche, welche das aktive Zentrum enthält. Die linke Domäne (L-Domäne) ist vorzugsweise alpha-helikel mit langen Segmenten ohne reguläre Sekundärstruktur. Die rechte Domäne (R-Domäne) enthält große antiparallele beta-Faltblattstrukturen. (Mitte) Vergleich PbSERA3 und FP-2, (Rechts) Vergleich PbSERA3 und Cathepsin B. Auffällig verdeckt die verlängerte Schleife (engl. „Occluding Loop“) von PbSERA3 mit sehr kurzen  $\beta$ -Faltblattstrukturen die potentielle Bindetasche des aktiven Zentrums.

## 4. LITERATURVERZEICHNIS

- Abrahamson M** (1994): Cystatins. *Methods Enzymol* **244**: 685-700.
- Aikawa M, Schwartz A, Uni S, Nussenzweig R, Hollingdale M** (1984): Ultrastructure of in vitro cultured exoerythrocytic stage of *Plasmodium berghei* in a hepatoma cell line. *Am J Trop Med Hyg* **33**(5):792-9.
- Aly AS, Matuschewski K** (2005): A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium* sporozoite egress from oocysts. *J Exp Med* **202**: 225–230.
- Amino R, Thiberge S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R** (2006): Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *C R Biol* **329**(11):858-62.
- Aoki S, Li J, Itagaki S, Okech BA, Egwang TG, Matsuoka H, Palacpac NM, Mitamura T, Horii T** (2002): Serine repeat antigen (SERA5) is predominantly expressed among the SERA multigene family of *Plasmodium falciparum*, and the acquired antibody titers correlate with serum inhibition of the parasite growth. *J Biol Chem* **277**, 47533-40.
- Arastu-Kapur S, Ponder EL, Fonovi UP, Yeoh S, Yuan F, Fonovi M, Grainger M, Phillips CI, Powers JC, Bogyo M** (2007): Identification of proteases that regulate erythrocyte rupture by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Chem Biol* **4**(3):203-13.
- Arisue N, Hirai M, Arai M, Matsuoka H, Horii T** (2007): Phylogeny and evolution of the SERA multigene family in the genus *Plasmodium*. *J Mol Evol* **65**: 82–91.
- Baer K, Roosevelt M, Clarkson AB Jr, van Rooijen N, Schnieder T, Frevert U** (2007): Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver. *Cell Microbiol* **9**:397–412.
- Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF** (1998): Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press, London.
- Blackman MJ** (2008): Malarial proteases and host cell egress: an ‘emerging’ cascade. *Cell Microbiol* **10**(10): 1925-1934.
- Blackman MJ** (2004): Proteases in host cell invasion by the malaria parasite. *Cell Microbiol* **6** (10): 893-903.
- Blackman MJ** (2000): Proteases involved in erythrocyte invasion by the malaria parasite: function and potential as chemotherapeutic targets. *Curr Drug Targets* **1**(1):59-83.
- Bohley B, Seglen PO** (1992): Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* **48**:151-157
- Bolte S** (2006): Parasiten-induzierte Phosphorylierungsereignisse in *Plasmodium berghei* [Vincke&Lips, 1948]-infizierten Hepatozyten. Dissertation Universität Hamburg.
- Bourgon R, Delorenzi M, Sargeant T, Hodder AN, Crabb BS, Speed TP** (2004): The serine repeat antigen (SERA) gene family phylogeny in *Plasmodium*: the impact of GC content and reconciliation of gene and species trees. *Mol Biol Evol* **21**: 2161–2171.
- Brix K, Dunkhorst A, Mayer K, Jordans S** (2008): Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie* **90**(2): 194-207.
- Bruchhaus I, Loftus BJ, Hall N, Tannich E** (2003): The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot. Cell* **2**, 501–509
- Bzik DJ, Li Wb, Horii T, Inselburg J** (1988): Amino acid sequence of the serine-repeat antigen (SERA) of *Plasmodium falciparum* determined from cloned cDNA. *Mol. Biochem. Parasitol* **30**:279–288.
- Caffrey CR, Hansell E, Lucas KD, Brinen LS, Alvarez Hernandez A, Cheng J, Gwaltney SL, Roush WR, Stierhof YD, Bogyo M, Steverding D, McKerrow JH** (2001): Active site mapping, biochemical properties and subcellular localization of rhodesain, the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Mol Biochem Parasitol* **118**(1):61-73.
- Carlton JM, Angiuoli SV, Suh BB, Kooij TW, Perteza M, Silva JC, Ermolaeva MD, Allen JE, Selengut JD, Koo HL** (2002): Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature*. **419**:512–519.

- Carvalho TG, Thiberge S, Sakamoto H, Menard R** (2004): Conditional mutagenesis using site-specific recombination in *Plasmodium berghei*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 14931–14936.
- Cerami C, Kwakye-Berko F, Nussenzweig V** (1992): Binding of malarial circumsporozoite protein to sulfatides [Gal(3-SO<sub>4</sub>)beta 1-Cer] and cholesterol-3-sulfate and its dependence on disulfide bond formation between cysteines in region II. *Mol Biochem Parasitol* **54**(1):1-12.
- Clyde DF, Most H, McCarthy VC, Vanderberg JP** (1973): Immunization of man against sporozoite-induced *falciparum* malaria. *Am J Med Sci* **266**(3):169-77.
- Cogswell FB** (1992): The hypnozoite and relapse in primate malaria. *Clin Microbiol Rev* **5**(1):26-35.
- Cyglar M und Mort JS** (1997): Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie* **79**: 645 – 652.
- Dahl SW, Halkier T, Lauritzen C, Dolenc I, Pedersen J, Turk V, Turk B** (2001): Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry* **40**(6):1671-8.
- Debrabant A, Maes P, Delplace P, Dubremetz JF, Tartar A, Camus D** (1992): Intramolecular Mapping of *Plasmodium falciparum* P126 proteolytic fragments by N-terminal amino acid sequencing. *Mol Biochem Parasitol* **53**: 89–95.
- Debrabant A, Delplace P** (1989): Leupeptin alters the proteolytic processing of P126, the major parasitophorous vacuole antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **33**: 151–158.
- Delplace P, Dubremetz JF, Fortier B, Vernes A** (1985): A 50 kilodalton exoantigen specific to the merozoite release-reinvasion stage of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **17**:239–251.
- Delplace P, Fortier B, Tronchin G, Dubremetz JF, Vernes A** (1987): Localization, biosynthesis, processing and isolation of a major 126 kDa antigen of the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **23**: 193–201.
- Delplace P, Bhatia A, Cagnard M, Camus D, Colombet G, Debrabant A** (1988): Protein p126: a parasitophorous vacuole antigen associated with the release of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Biol Cell* **64**: 215–221.
- De Silva EK, Gehrke AR, Olszewski K, León I, Chahal JS, Bulyk ML, Llinás M** (2008): Specific DNA-binding by apicomplexan AP2 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(24):8393-8.
- Eakin AE, Mills AA, Harth G, McKerrow JH, Craik CS** (1992): The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* **267**(11):7411-20.
- Eksi S, Czesny B, Greenbaum DC, Bogyo M, Williamson KC** (2004): Targeted disruption of *Plasmodium falciparum* cysteine protease, falcipain 1, reduces oocyst production, not erythrocytic stage growth. *Mol Microbiol* **53**(1):243-50.
- Fairley NH** (1947): Sidelights on malaria in man obtained by subinoculation experiments. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **40**: 621–676.
- Fox BA, Bzik DJ** (1994): Analysis of stage-specific transcripts of the *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen (SERA) gene and transcription from the SERA locus. *Mol Biochem Parasitol* **68**:133–144.
- Frevert U, Sinnis P, Esko JD, Nussenzweig V** (1996): Cell surface glycosaminoglycans are not obligatory for *Plasmodium berghei* sporozoite invasion in vitro. *Mol Biochem Parasitol* **76**(1-2): 257-66.
- Genton B, Reed ZH** (2007): Asexual blood-stage malaria vaccine development: facing the challenges. *Curr Opin Infect Dis* **20**(5): 467-75.
- Gomes DEB, Carvalho ML, Vieira FMC, Bisch PM, Pascutti PG** (2005): Thermodynamical and structural analysis of cruzain/cruzipain2 complexed with E-64 by molecular modeling and dynamics simulations. *FEBS Journal* **272**
- Gor DO, Li AC, Rosenthal PJ** (1998) Protective immune responses against protease-like antigens of the murine malaria parasite *Plasmodium vinckei*. *Vaccine* **16**:1193–1202.
- Gwadz RW, Cochrane AH, Nussenzweig V, Nussenzweig RS** (1979): Preliminary studies on vaccination of rhesus monkeys with irradiated sporozoites of *Plasmodium knowlesi* and characterization of surface antigens of these parasites. *Bull World Health Organ.* **57** Suppl

- 1:165-73.
- Hellberg A, Nickel R, Lotter H, Tannich E, Bruchhaus I** (2001): Overexpression of cysteine roteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cell Microbiol* **3**, 13–20.
- Hodder AN, Drew DR, Epa VC, Delorenzi M, Bourgon R, Miller SK** (2003): Enzymic, phylogenetic, and structural characterization of the unusual papain-like protease domain of *Plasmodium falciparum* SERA5. *J BiolChem* **278**: 48169–48177.
- Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, Sacci J, de la Vega P, Dowler M, Paul C, Gordon DM, Stoute JA, Church LW, Sedegah M, Heppner DG, Ballou WR, Richie TL** (2002): Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis* **15**:185(8):1155-64.
- Jacobs T, Bruchhaus I, Dandekar T, Tannich E, Leippe M** (1998): Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* **27**: 269–276.
- Jobe O, Lumsden J, Mueller AK, Williams J, Silva-Rivera H, Kappe SH, Schwenk RJ, Matuschewski K, 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* **15**:196(4): 599-607.
- Kamol-Ratanakul P, Chirakalwasarn N, Lertmaharit S, Dhanamun B, Seublinwong T, Udomsangpetch R, Perlmann H, Perlmann P, Thaithong S** (1992): Seroepidemiologic studies of humoral immune response to the *Plasmodium falciparum* antigens in Thailand. *Am J TropMed Hyg* **47**(5): 554-61.
- Kappe SH, Kaiser K, Matuschewski K** (2003): The *Plasmodium* sporozoite journey: a rite of passage. *Trends Parasitol* **19**(3):135-43.
- Katunuma N und Kominami E** (1995): Structure, properties, mechanism, and assays of cysteine protease inhibitors: Cystatins and E-64 derivatives. *Methods Enzymol* **251**: 382-397.
- Kiefer MC, Crawford KA, Boley LJ, Landsberg KE, Gibson HL, Kaslow DC, Barr PJ** (1996): Identification and cloning of a locus of serine repeat antigen (sera)-related genes from *Plasmodium vivax*. *Mol Biochem Parasitol* **78**: 55–65.
- Kirschke H, Wiederanders B, Brömme D, Rinne A** (1989): Cathepsin S from bovine spleen: Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem J* **264**(2):467-73.
- Knapp B, Hundt E, Nau U, Kupper HA** (1989): Molecular cloning, genomic structure and localization in a blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by a serine stretch. *Mol Biochem Parasitol* **32**: 73–83.
- Koning-Ward TF, Crabb BS** (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.
- Kooij TW, Carlton JM, Bidwell SL, Hall N, Ramesar J, Janse CJ, Waters AP** (2005): A *Plasmodium* whole-genome synteny map: indels and synteny breakpoints as foci for species-specific genes. *PLoS Pathog* **1**:e44.
- Kubler-Kielb J, Majadly F, Wu Y, Narum DL, Guo C, Miller LH, Shiloach J, Robbins JB, Schneerson R** (2007): Long-lasting and transmission-blocking activity of antibodies to *Plasmodium falciparum* elicited in mice by protein conjugates of Pfs25. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(1):293-8.
- Labaied M, Harupa A, Dumpit RF, Coppens I, Mikolajczak SA, Kappe SH** (2007): *Plasmodium yoelii* sporozoites with simultaneous deletion of P52 and P36 are completely attenuated and confer sterile immunity against infection. *Infect Immun* **75**(8):3758-68.
- Le Bonniec S, Deregnaucourt C, Redeker V, Banerjee R, Grellier P, Goldberg DE, Schrevel J** (1999): Plasmepsin II, an acidic hemoglobinase from the *Plasmodium falciparum* food vacuole, is active at neutral pH on the host erythrocyte membrane skeleton. *J Biol Chem* **274**: 14218-14223.
- Lecaille F, Kaleta J, Brömme D** (2002): Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev* **102**(12):4459-88.

- Leippe M, Sievertsen H J, Tannich E, Horstmann R D** (1995): Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. *Parasitology* **111**, 569–574
- Leirião P, Rodrigues CD, Albuquerque SS, Mota MM** (2004): Survival of protozoan intracellular parasites in host cells. *EMBO* **5**(12): 1142-7.
- Leirião P, Albuquerque SS, Corso S, van Gemert GJ, Sauerwein RW, Rodriguez A, Giordano S, Mota MM** (2005): HGF/MET signalling protects *Plasmodium*-infected host cells from apoptosis. *Cell Microbiol* **7**(4):603-9.
- Matuschewski K, Mueller AK** (2007): Vaccines against malaria—an update. *FEBS J* **274**(18):4680-7.
- McCoubrie JE, Miller SK, Sargeant T, Good RT, Hodder AN, Speed TP** (2007): Evidence for a common role for the serine-type *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen proteases: implications for vaccine and drug design. *Infect Immun* **75**: 5565–5574.
- McKerrow JH** (1989): Parasite proteases. *Exp parasitol* **68**(1): 111-5.
- Meis JF, Verhave JP, Jap PH, Sinden RE, Meuwissen JH** (1983): Malaria parasites: discovery of the early liver form. *Nature* **302**(5907): 424-6.
- Meis JF, Verhave JP, Jap PH, Meuwissen JH** (1985): Fine structure of exoerythrocytic merozoite formation of *Plasmodium berghei* in rat liver. *J Protozool* **32**(4): 694-9.
- Ménard R und Storer A** (1992): Oxyanion hole interactions in serine and cysteine proteases. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **373**: 393-400.
- MEROPS-Datenbank**: <http://www.merops.co.uk/>
- Miller SK, Good RT, Drew DR, Delorenzi M, Sanders PR, Hodder AN, Speed TP, Cowman AF, Mueller AK, Labaied M, Kappe SH, Matuschewski K** (2005a): Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature* **433**(7022):164-7.
- Mueller AK, Camargo N, Kaiser K, Andorfer C, Frevert U, Matuschewski K, Kappe SH** (2005b): *Plasmodium* liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite-host interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(8): 3022-7.
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodriguez A** (2001): Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* **291**:141–144.
- Mottram JC, Frame MJ, Brooks DR, Tetley L, Hutchison JE, Souza AE, Coombs GH** (1997): The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *J Biol Chem* **272**(22): 14285-93.
- Nagarajan K, Hilgenfeld R** (Lübeck): Modellierete Struktur von PbSERA3.
- North MJ, Mottram JC, Coombs GH** (1990): Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol Today* **6**(8):270-5.
- Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C** (1967): Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. *Nature* **216**(5111):160-2.
- Oliveira-Ferreira J, Daniel-Ribeiro C** (2001): Protective CD8+ T cell responses against the pre-erythrocytic stages of malaria parasites: an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **96**(2):221-7.
- Omara-Opyene AL, Moura PA, Sulsona CR, Bonilla JA, Yowell CA, Fujioka H** (2004): Genetic disruption of the *Plasmodium falciparum* digestive vacuole plasmepsins demonstrate their functional redundancy. *J Biol Chem* **279**: 54088-54096.
- Pandey KC, Singh N, Arastu-Kapur S, Bogyo M, Rosenthal PJ** (2006): Falstatin, a cysteine protease inhibitor of *Plasmodium falciparum*, facilitates erythrocyte invasion. *PLoS Pathog* **2**(11):e117.
- Peters W, Pasvol G** (2002): Tropical medicine and parasitology. **5th** edition, London, Edinburgh.
- Ponnudurai T, Lensen AH, van Gemert GJ, Bolmer MG, Meuwissen JH** (1991): Feeding behaviour and sporozoite ejection by infected *Anopheles stephensi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **85**(2):175-80.
- Prudêncio M, Rodrigues CD, Ataíde R, Mota MM** (2008): Dissecting in vitro host cell infection by *Plasmodium* sporozoites using flow cytometry. *Cell Microbiol*.**10**(1): 218-24.
- Quraishi O und Storer AC** (2001): Identification of internal autoproteolytic cleavage sites within the prosegments of recombinant procathepsin B and procathepsin S. Contribution of a plausible unimolecular autoproteolytic event for the processing of zymogens belonging to the papain family. *J Biol Chem*.**276**(11): 8118-24.



- Rathore D, Sacci JB, de la Vega P, McCutchan TF** (2002): Binding and invasion of liver cells by *Plasmodium falciparum* sporozoites. Essential involvement of the amino terminus of circumsporozoite protein. *J Biol Chem.* **277**(9):7092-8.
- Rénia L, Mattei D, Goma J, Pied S, Dubois P, Miltgen F, Nüssler A, Matile H, Menégaux F, Gentilini M** (1990): A malaria heat-shock-like determinant expressed on the infected hepatocyte surface is the target of antibody-dependent cell-mediated cytotoxic mechanisms by nonparenchymal liver cells. *Eur J Immunol* **20**(7):1445-9.
- Rénia L** (2008): Protective immunity against malaria liver stage after vaccination with live parasites. *Parasite* **15**(3):379-83.
- Rennenberg A** (2006): Charakterisierung eines Cysteinproteaseninhibitors in *Plasmodium berghei* (Vincke und Lips, 1948). Diplomarbeit Universität Hamburg.
- Rich DH** (1986): In "Proteinase Inhibitors", eds. Barrett, A.J., and Salvesen, G., Elsevier, Amsterdam.
- Rodrigues CD, Hannus M, Prudêncio M, Martin C, Gonçalves LA, Portugal S, Epiphanyo S, Akinc A, Hadwiger P, Jahn-Hofmann K, Röhl I, van Gemert GJ, Franetich JF, Luty AJ, Sauerwein R, Mazier D, Koteliansky V, Vornlocher HP, Echeverri CJ, Mota MM** (2008): Host scavenger receptor SR-BI plays a dual role in the establishment of malaria parasite liver infection. *Cell Host Microbe* **4**(3):271-82.
- Rosenberg R, Wirtz RA, Schneider I, Burge R** (1990): An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **84**(2): 209-12.
- Rosenthal PJ** (1999): Proteases of protozoan parasites. *Adv Parasitol* **43**: 105-59.
- Rosenthal PJ** (2002): Hydrolysis of erythrocyte proteins by proteases of malaria parasites. *Curr Opin Hematol* **9**: 140–145.
- Rosenthal PJ** (2004): Cysteine proteases of malaria parasites. *Int J Parasitol.* **34**(13-14): 1489-99.
- Sajid M, McKerrow JH** (2002): Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* **120**(1):1-21.
- Salmon BL, Oksman A, Goldberg DE** (2001): Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 271–276.
- Saul A** (2007): Mosquito stage, transmission blocking vaccines for malaria *Curr Opin Infect Dis* **20**(5):476-81.
- Schmidt-Christensen A, Sturm A, Horstmann S and Heussler VT** (2008a): Expression and processing of *Plasmodium berghei* SERA3 during liver stage. *Cell Microbiol* **10** (8), 1723-1734.
- Schmidt-Christensen A, Witt T, Lehmann C and Heussler VT** (2008b): Serine- and cysteine-type *P. berghei* SERAs are processed in liver stage parasites and display distinct subcellular localization patterns indicating distinct roles. *Cell Microbiol*, submitted.
- Shaw E** (1990): Cysteiny proteinases and their selective inactivation. *Adv Enzymol* **63**: 271-347.
- Shenai BR, Sijwali PS, Singh A, Rosenthal PJ** (2000): Characterization of native and recombinant falcipain-2, a principal trophozoite cysteine protease and essential hemoglobinase of *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **275**: 29000–29010.
- Shin SC, Vanderberg JP, Terzakis JA** (1982): Direct infection of hepatocytes by sporozoites of *Plasmodium berghei*. *J Protozool.* **29**(3): 448-54.
- Sibley LD** (1994): Intracellular parasite invasion strategies. *Science* **304**(5668): 248-53.
- Sijwali PS, Shenai BR, Gut J, Singh A, Rosenthal PJ** (2001): Expression and characterization of the *Plasmodium falciparum* hemoglobinase falcipain-3. *Biochem J* **360**: 481–489.
- Sijwali PS, Kato K, Seydel KB, Gut J, Lehman J, Klemba M, Goldberg DE, Miller LH, Rosenthal PJ** (2004): *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-1 is not essential in erythrocytic stage malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(23): 8721-6.
- Sinnis P, Clavijo P, Fenyö D, Chait BT, Cerami C, Nussenzweig V** (1994): Structural and functional properties of region II-plus of the malaria circumsporozoite protein. *J Exp Med* **180**(1): 297-306.
- Sinnis P** (1996): The malaria sporozoite's journey into the liver. *Infect Agents Dis* **5**(3):182-9.
- Souza AE, Waugh S, Coombs GH, Mottram JC** (1992): Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *FEBS Lett* **311**(2): 124-7.
- Stanley SL Jr, Zhang T, Rubin D, Li E** (1995): Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect*

*Immun* **63**,1587–1590

- Storer AC und Ménard R** (1994): Catalytic mechanism in the papain family of cysteine peptidases. In: Proteolytic Enzymes (ed. Barrett, A.J.). *Methods in Enzymol.*, Academic Press. **244**: 486-500.
- Sturm A, Retzlaff S, Franke-Fayard B, Graewe S, Bolte S, Roppenser B, Aepfelbacher M, Janse C, Heussler T** (2008): Alteration of the parasite membrane and the parasitophorous vacuole membrane during development of exo-erythrocytic *Plasmodium berghei* merozoites. *Protist*. In Print
- Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, RetzlaV S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT** (2006): Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* **313**: 1287–1290.
- Sturm A, Heussler VT** (2007): Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic *Plasmodium* parasites. *Med Microbiol Immunol*. **196**(3):127-33.
- Tillak M, Nowak N, Lotter H, Bracha R, Mirelman D, Tannich E, Bruchhaus I** (2006): Increased expression of the major cysteine proteases by stable episomal transfection underlines the important role of EhCP5 for the pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **149**(1): 58-64.
- Tine JA, Conseil V, Delplace P, De Taisne C, Camus D, Paoletti E** (1993): Immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen (p126) expressed by vaccinia virus. *Infect Immun* **61**(9): 3933–3941.
- Tort J, Brindley PJ, Knox D, Wolfe KH, Dalton JP** (1999): Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Adv Parasitol*. **43**:161-266.
- Turk B, Dolenc I, Turk V, Bieth JG** (1993): Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry* **32**: 375-380.
- van Dijk MR, Douradinha B, Franke-Fayard B, Heussler V, van Dooren MW, van Schaijk B, van Gemert GJ, Sauerwein RW, Mota MM, Waters AP, Janse CJ** (2005): Genetically attenuated, P36p-deficient malarial sporozoites induce protective immunity and apoptosis of infected liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**(34):12194-9.
- Vincke IH and Lips M** (1948). *Ann Soc Belg Med Trop* **28**: 97-104.
- Wickham ME, Culvenor, JG, Cowman AF** (2003): Selective inhibition of a two-step egress of malaria parasites from the host erythrocyte. *J Biol Chem* **278**: 37658–37663.
- Yeoh S, O'Donell R, Koussis K, Dluzewski A, Ansell K, Osborne S** (2007): Subcellular discharge of serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes. *Cell* **131**: 1072–1083.

## 5. ANTEILE DER AUTORIN AN DEN PUBLIKATIONEN

### 5.1 Anteile der Autorin an vorgelegter Veröffentlichung:

Schmidt-Christensen A, Sturm A, Horstmann S and Heussler VT (2008a): Expression and processing of *Plasmodium berghei* SERA3 during liver stage. *Cell Microbiol* **10** (8), 1723-1734.

Die dargestellten Fragestellungen, Methoden und Ergebnisse wurden von Frau Schmidt-Christensen eigenständig unter der Leitung von PD Dr. Heussler ausgearbeitet, durchgeführt und ausgewertet. Dies beinhaltet die mRNA-Expressionsanalysen mittels RT-PCR der PbSERA Proteasen, sowie die Herstellung sämtlicher Antiseren und die Generierung monoklonaler Antikörper. Die Western Blots und Immunfluoreszenzen wurden ebenfalls von ASC durchgeführt. Ferner wurden die transgenen *P. berghei*-PbSERA3-TAP Parasiten hergestellt und charakterisiert. Die Inhibitorversuche wurden von den Koautoren der Arbeitsgruppe Malaria I (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin) geleistet. Der Artikel wurde von den Autoren gemeinsam verfasst.

### 5.1 Anteile der Autorin an vorgelegter Veröffentlichung:

Schmidt-Christensen A, Witt T, Lehmann C and Heussler VT (2008b): Characterization of putative SERA cysteineproteases during liver stage development of *P. berghei*. *Cell Microbiol*, Manuskript eingereicht.

Alle dargestellten Fragestellungen, Methoden und Ergebnisse wurden von Frau Schmidt-Christensen eigenständig unter der Leitung von PD Dr. Heussler ausgearbeitet, durchgeführt und ausgewertet. Technische Assistenz wurde von den Koautoren der Arbeitsgruppe Malaria I (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin) geleistet. Der Artikel wurde eigenständig mit Unterstützung von PD Dr. Heussler verfasst.

## 6. WEITERE PUBLIKATIONEN MIT BETEILIGUNG DER AUTORIN

van de Sand C, Horstmann S, **Schmidt A**, Sturm A, Bolte S, Krueger A, Lütgehetmann M, Pollok JM, Libert C, Heussler VT (2005): The liver stage of *Plasmodium berghei* inhibits host cell apoptosis. *Mol Microbiol* **58**, 731–742.

Der Anteil von Frau Schmidt-Christensen an dieser Publikation betrug ca. 15 Prozent. Es wurden mehrere Färbungen für die indirekten Immunfluoreszenz-Analysen hergestellt sowie eine mikroskopische Analyse und Bildaquisition durchgeführt.

## **DANKSAGUNG**

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater und Mentor PD DR. VOLKER T. HEUSSLER für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sowie die Inspiration, Unterstützung, Geduld und wertvollen Ratschläge für das Gelingen der Arbeit.

Frau DR. IRIS BRUCHHAUS danke ich herzlichst für die Übernahme des Koreferats.

Besonderer Dank gilt meiner ins Herz geschlossenen Arbeitsgruppe „LOS HEPATITOS“, deren einzelne Namen aufzuzählen hier derzeit den Rahmen sprengen würde, jedoch dessen Wichtigkeit dadurch nicht gemindert werden soll!

Unser Teamwork, Eure Unterstützung, aufheiternden Worte, Zusammenhalt, Einfühlungsvermögen, Begeisterung und Hilfsbereitschaft: Ihr seid Spitze!

Unmessbarer Dank gilt meiner Familie. Ihr seid immer für mich da. Ihr habt mich stets bestärkt and standet mir mit RAT und TAT zur Seite.

## **PUBLIKATIONEN**

Schmidt-Christensen A, Sturm A, Horstmann S and Heussler VT (2008a): Expression and processing of *Plasmodium berghei* SERA3 during liver stage. *Cell Microbiol* **10** (8), 1723-1734.

**Titel Cover:** *P.berghei*-infizierte HepG2-Zelle (Cytoomerstadium) gefärbt mit monoklonalem Mausantikörper anti-PbSERA4-N (rot), anti-Exp1 (grün) und Dapi (blau).



# Expression and processing of *Plasmodium berghei* SERA3 during liver stages

**OnlineOpen:** This article is available free online at [www.blackwell-synergy.com](http://www.blackwell-synergy.com)

Anja Schmidt-Christensen, Angelika Sturm,  
Sebastian Horstmann and Volker T. Heussler\*  
Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine,  
Bernhard-Nocht-Str 74, 20359 Hamburg, Germany.

## Summary

**Cysteine proteases mediate liberation of *Plasmodium berghei* merozoites from infected hepatocytes. In an attempt to identify the responsible parasite proteases, we screened the genome of *P. berghei* for cysteine protease-encoding genes. RT-PCR analyses revealed that transcription of four out of five *P. berghei* serine repeat antigen (PbSERA) genes was strongly upregulated in late liver stages briefly before the parasitophorous vacuole membrane ruptured to release merozoites into the host cell cytoplasm, suggesting a role of PbSERA proteases in these processes. In order to characterize PbSERA3 processing, we raised an antiserum against a non-conserved region of the protein and generated a transgenic *P. berghei* strain expressing a TAP-tagged PbSERA3 under the control of the endogenous promoter. Immunofluorescence assays revealed that PbSERA3 leaks into the host cell cytoplasm during merozoite development, where it might contribute to host cell death or activate host cell proteases that execute cell death. Importantly, processed PbSERA3 has been detected by Western blot analysis in cell extracts of schizont-infected cells and merozoite-infected detached hepatic cells.**

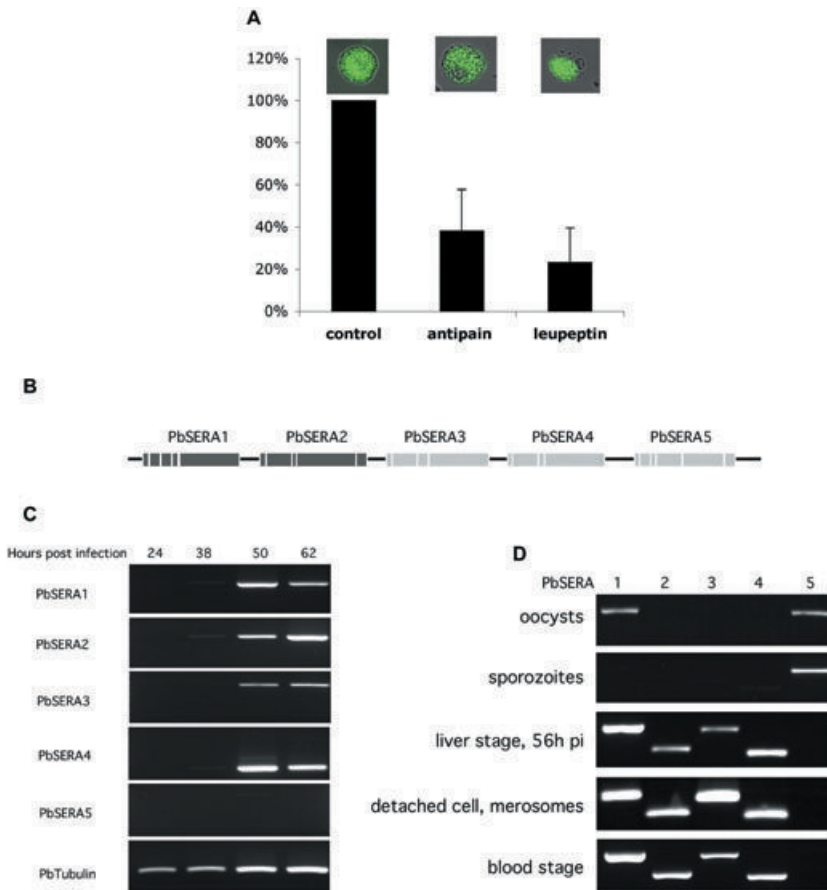
## Introduction

Despite 100 years of malaria research, malaria remains one of the world most deadly diseases, causing more than one million deaths per year. The causative agent of malaria, the *Plasmodium* parasite, is transmitted by the bite of an infected *Anopheles* mosquito. Research on the rodent malaria parasite *P. berghei* revealed that transmit-

ted sporozoites are deposited under the skin from where they enter blood vessels to eventually reach the liver with the blood stream (Amino *et al.*, 2005). By traversing Kupffer cells (Baer *et al.*, 2007a), sporozoites gain access to the liver tissue where they transmigrate through a number of hepatocytes (Mota *et al.*, 2001), before finally invading one by formation of a parasitophorous vacuole (PV). Inside this vacuole, the parasite develops into a large, multinucleated body called the liver schizont. The liver schizont differentiates into several thousand merozoites that must enter blood vessels to infect red blood cells (RBCs). During this process, the host cell undergoes a number of dramatic morphological changes, observed as detachment from the neighbouring cells and eventually formation of merozoites (Sturm *et al.*, 2006; Sturm and Heussler, 2007). Merozoites are merozoite-filled, host cell-derived vesicles that migrate into the adjacent blood vessel of the liver tissue and therefore seem to function as a safe transport system that delivers parasites, undetected by the immune system, into the blood stream. *In vitro*, *P. berghei*-infected HepG2 cells detach at the end of the exoerythrocytic stage and float into the culture media, where they also form merozoites (Sturm *et al.*, 2006). This entire process can be inhibited by treating infected cells with the general cysteine protease inhibitor E64. Previously, it has also been shown that E64 blocks merozoite release from infected RBCs (Salmon *et al.*, 2001; Wickham *et al.*, 2003), suggesting a crucial role of cysteine protease during parasite liberation. *P. falciparum* SERA proteins are a family of nine conserved putative cysteine proteases thought to play a key role in liberation of blood stage parasites from RBCs and sporozoites from oocysts (Hodder *et al.*, 2003; Bourgon *et al.*, 2004; Arisue *et al.*, 2007). Each examined *Plasmodium* species possesses SERAs of two major groups, specified as 'cysteine-type SERAs' and 'serine-type SERAs'. Serine-type SERAs contain an active site serine residue instead of the canonical cysteine residue (Hodder *et al.*, 2003; Bourgon *et al.*, 2004). *P. falciparum* SERA5 (PfSERA5), also known as SERP and p126 (Delplace *et al.*, 1987; Bzik *et al.*, 1988; Knapp *et al.*, 1989), is the best-characterized SERA protease. In a series of elegant studies it has been shown that p126 or SERA5 becomes proteolytically processed in several steps to final peptide of 50 kDa (Delplace *et al.*, 1985; 1987; 1988; Debrabant and Delplace, 1989; Debrabant *et al.*, 1992). Leupeptin-dependent inhibition of

Received 12 December, 2007; revised 11 March, 2008; accepted 3 April, 2008. \*For correspondence. E-mail [heussler@bni-hamburg.de](mailto:heussler@bni-hamburg.de); Tel. (+49) 40 42818485; Fax (+49) 40 42818512.

Re-use of this article is permitted in accordance with the Creative Commons Deed, Attribution 2.5, which does not permit commercial exploitation.



**Fig. 1.** A. Cysteine and serine protease inhibitors block detachment of *P. berghei*-infected HepG2 cells. HepG2 cells were infected with *P. berghei* sporozoites. Upon cultivation for 48 h, cells were treated with 100  $\mu$ M of either antipain or leupeptin for an additional 13 h. Detached cells in treated and untreated control wells were counted and expressed as a percentage of control (untreated) cells. Error bars have been calculated from data of three independent experiments.

B. The SERA gene family of *P. berghei* consists of five members, aligned in a tandem cluster. Dark grey boxes represent exons of the 'cysteine-type' SERA members, light grey boxes symbolize the exons of 'serine-type' SERAs.

C. PbSERA1–4 expression is upregulated in late liver stages. HepG2 cells were infected with *P. berghei* sporozoites and mRNA of these infected cells was prepared at 24, 38, 50 and 62 h post infection. Messenger RNA expression of all five PbSERAs was verified by RT-PCR. As a control, tubulin mRNA was additionally amplified.

D. PbSERA mRNA expression is stage specifically regulated. mRNA expression of all five PbSERAs was verified by RT-PCR. Total mRNA was isolated from two mosquito stages (oocysts and salivary gland sporozoites), and from three parasite stages of the vertebrate host (late liver schizont stage, detached cells/merosomes and the blood stages) and subjected to RT-PCR analysis.

SERA5 processing from a 56 kDa fragment to the mature 50 kDa peptide still allowed the release of blood stage merozoites from the PVM but blocked the liberation of merozoites from the infected cell (Debrabant and Delplace, 1989), which is a striking similarity to the inhibition of merozoite release in E64-treated infected hepatocytes (Sturm *et al.*, 2006).

As the genomes of different *Plasmodium* species contain different numbers of SERA genes (Arisue *et al.*, 2007; McCoubrie *et al.*, 2007), there is some confusion about the nomenclature of the SERA family. We decided to adopt the names recently suggested (Arisue *et al.*, 2007), although they do not match the results of homology and synteny searches (McCoubrie *et al.*, 2007). For example, *P. falciparum* SERA3 is a serine-type SERA, whereas *P. berghei* SERA3 is a cysteine-type SERA.

It has been shown that immune responses against the N-terminal part of PfSERA5 correlate with immunity against malaria (Okech *et al.*, 2001; Okech *et al.*, 2006) and thus SERA proteases might be interesting candidates for vaccine design. Here, we describe the expression and localization of *P. berghei* cysteine-type SERA3 during late liver stages of the parasite and provide evidence for its processing.

## Results

### *Cysteine proteases are involved in merozoite release from the PV in P. berghei-infected HepG2 cells*

It has been shown for both, *Plasmodium* blood stages (Salmon *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Wickham *et al.*, 2003) and *Plasmodium* liver stages (Sturm *et al.*, 2006) that cysteine protease inhibitors can block the process of merozoite release. The liberation of exoerythrocytic *P. berghei* merozoites from the PV was effectively blocked by the irreversible cysteine protease inhibitor E64. To further characterize protease function during this process, we treated *P. berghei*-infected HepG2 cells 48 h post infection with 100  $\mu$ M ml<sup>-1</sup> leupeptin and antipain, two serine and cysteine protease inhibitors (Fig. 1A) and counted the detached cells 67 h after infection. Both inhibitors blocked cell detachment considerably but not completely compared with untreated cells. Infected cells that still detached despite inhibitor treatment exhibited a different phenotype depending on the drug used (inserted images in Fig. 1A). In leupeptin-treated cultures, merozoites in detached cells were still surrounded by a PVM within the host cell. On the other hand, detached cells in antipain-treated cultures looked similar to detached cells



of untreated control cultures, with merozoites mixing freely with the host cell cytoplasm. These results suggest that the inhibitors either act on different proteases or inhibit the same protease by different mechanisms. It has indeed been shown that leupeptin and antipain have different inhibitory effects on defined proteases (Otto and Schirmeister, 1997). The fact that leupeptin treatment preserved the PVM structure in infected detached cells whereas in antipain-treated detached cells merozoites were liberated from the PV supports the hypothesis that more than one protease is involved in parasite liberation and induction of host cell death. One likely scenario is that a kind of 'initiator' protease induces the processing of 'effector' proteases and their activation results in the observed phenotype. Depending on which stage the individual inhibitors act, destruction of the PVM, cell detachment or host cell death might be affected.

#### *Transcription of four SERA genes is strongly upregulated in late liver stages*

We reasoned that proteases that are responsible for PVM destruction and merozoite liberation into the host cell cytoplasm are most likely of parasite origin and thus, we performed database searches for *Plasmodium* cysteine proteases containing a signal sequence. To focus on candidate proteases relevant for merozoite liberation, a second selection criterion was the proof of an upregulated transcription towards the end of the liver stage, briefly before PVM damage. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis revealed a strongly enhanced expression of five cysteine protease mRNAs in late liver stages, including a putative cysteine protease annotated as PB000888.02.0 (data not shown) and four PbSERA proteases (Fig. 1C). Unlike *P. falciparum*, which possesses nine SERA protease genes (Miller *et al.*, 2002), the *P. berghei* genome contains only five (Fig. 1B and Fig. S1) (Bourgon *et al.*, 2004; Arisue *et al.*, 2007), with PbSERA1–4 but not PbSERA5 expressed in late liver stages. Importantly, mRNA expression of PbSERA1–4 could hardly be detected during the first 38 h post infection, whereas expression was strongly upregulated 50 h post infection (Fig. 1C). Further characterization of the SERA3 promoter largely confirmed the RT-PCR results. We cloned the complete 5' UTR of SERA3 in front of GFP within a *P. berghei* transfection plasmid. Transfected *P. berghei* parasites do not express GFP in early liver stages but show a strong GFP expression towards the end of the exoerythrocytic stage, in particular during merozoite formation (Fig. S2).

Similarly to other SERA protease genes that have been identified (Arisue *et al.*, 2007; McCoubrie *et al.*, 2007), PbSERA genes are arranged in a tandem cluster (Fig. 1B) that contains two serine-type SERAs (PbSERA1, -2) and

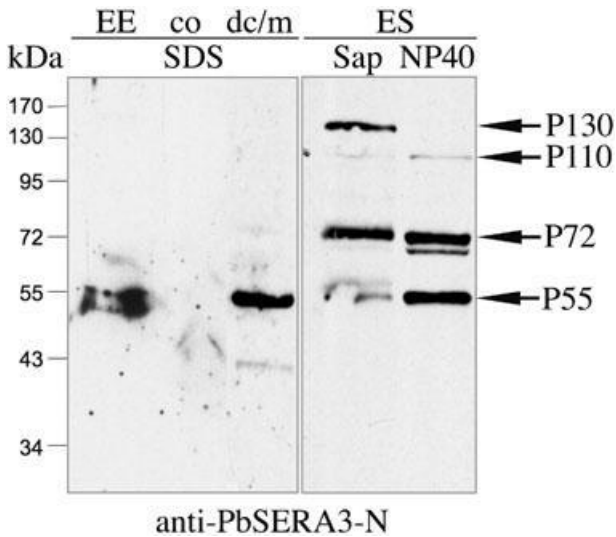
three cysteine-type SERAs (PbSERA3, -4 and -5). Alignment of the amino acid sequences of the five PbSERAs and PfSERA5 of *P. falciparum* revealed highly conserved areas including the protease-like domain in the central region and areas of low homology at the N- and C-termini of the proteins (Fig. S1). RT-PCR analysis was used to determine stage-specific mRNA expression of SERA genes throughout the life cycle of the parasite. Messenger RNA was isolated from two mosquito stages (oocysts and salivary gland sporozoites) and three mammalian stages (late liver schizonts, detached cells/merosomes, infected erythrocytes) and subjected to RT-PCR using primers specific for each PbSERA cDNA (Fig. 1D). Whereas PbSERA1 mRNA expression was detected in oocysts, late liver stage parasites, detached cells/merosomes and infected RBCs, PbSERA2–4 gene transcription was restricted to mammalian stages. On the other hand, PbSERA5 mRNA could only be detected in mosquito stages, confirming previous results (Aly and Matuschewski, 2005).

#### *PbSERA3 is processed in late liver stages*

To produce an antiserum that specifically recognizes PbSERA3, rats were immunized with the variable N-terminal region of the protein. It is well established that SERA proteases of *P. falciparum* undergo several steps of processing but nothing was known about processing of the *P. berghei* homologues. To investigate processing of PbSERA3 during blood and liver stages, we performed Western blot analysis using the anti-PbSERA3-N antiserum (Fig. 2). Several PbSERA3 protein fragments were detected in cell extracts of blood stage parasites, infected HepG2 cells and also in detached cells and merosomes. Whereas in extracts of blood stage parasites, full-length PbSERA3 (130 kDa) and processed forms of 72 and 55 kDa were recognized by the antiserum, a processed 55 kDa PbSERA3 was the main fragment in late infected HepG2 cells and in detached cells/merosomes detected by the antiserum used for this experiment. The 55 kDa species most likely corresponds to the N-terminal fragment P47, which is the result of SERA5 processing in *P. falciparum* blood stage parasites (Li *et al.*, 2002) and does not correspond to the mature PbSERA3 protease. Saponin treatment, which releases the content of the PV, suggested that in blood stage parasites, PbSERA3 is first secreted into the PV and subsequently processed, most likely by other proteases in the PV (Fig. 2).

#### *TAP-tagging of PbSERA3*

To further characterize processing of PbSERA3 in adherent infected HepG2 cells, we used single cell analysis using IFA techniques. The aim was to use antibodies against both ends of the protein for staining of different

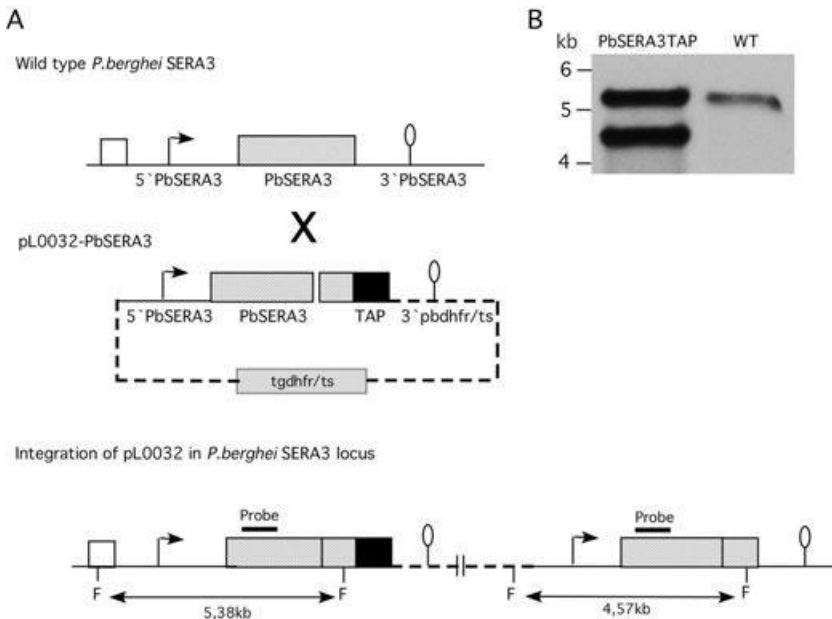


**Fig. 2.** Processing of PbSERA3 in liver and blood stages. Saponin and NP40 extracts of erythrocytic stage (ES) were made and compared with whole-cell SDS lysates of detached cells/merosomes (dc/m), FACS-sorted HepG2 cells containing 50 h exoerythrocytic schizonts (EE) cells and non-infected HepG2 cell lysates (co) by Western blot analysis using an anti-PbSERA3-N antiserum.

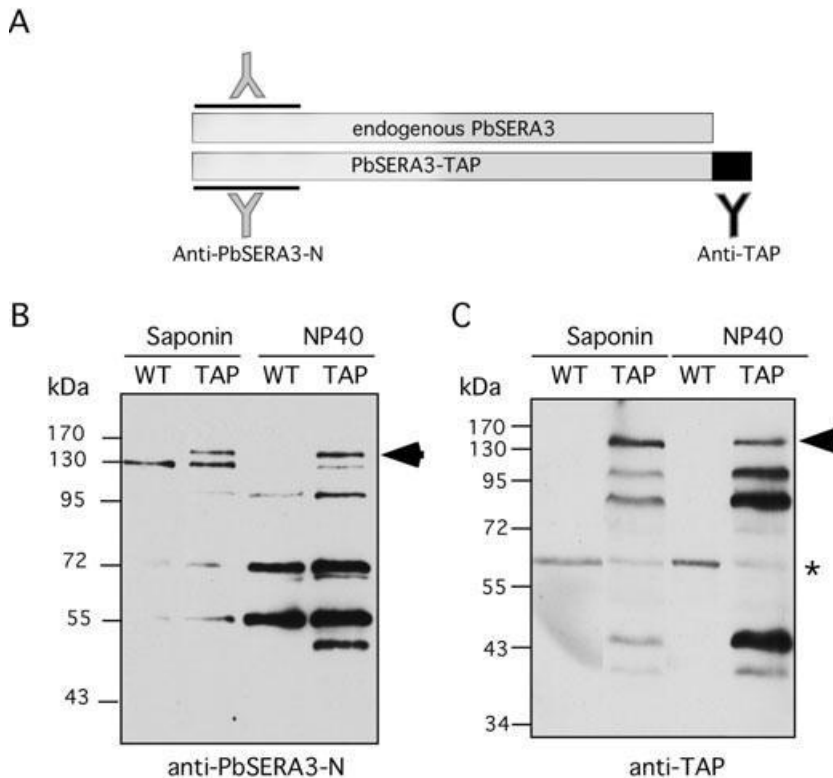
parasite liver stages, assuming that colocalization of the two antibodies would represent detection of the full-length protein whereas different staining patterns would indicate processing. To detect the N-terminus we used the antiserum described above and for detection of the C-terminus, we generated a transgenic parasite strain, expressing full-length PbSERA3 fused to a TAP-tag at the C-terminus (Fig. 3A). Southern blot analysis was used to confirm the integration of the tagged PbSERA3 DNA sequence into

the correct gene locus (Fig. 3B). Expression of this additional tagged SERA protease had no effect on parasite development throughout the life cycle (Fig. S3).

Protein extracts of purified wild-type (WT) *P. berghei* blood stage parasites and transgenic parasites expressing additionally to the endogenous PbSERA3, TAP-tagged PbSERA3, were first analysed by Western blotting to demonstrate a normal processing of the tagged protein. Purified WT or transgenic parasites were treated with saponin to initially extract proteins present in PV (Fig. 4B). A subsequent lysis with NP40 was used to extract soluble proteins from the parasite. As shown in a schematic illustration in Fig. 4A, human IgG is expected to detect TAP-tagged full-length and processed C-terminal fragments of PbSERA3-TAP, but no reactivity is expected for the endogenous PbSERA3. On the other hand, the anti-PbSERA3-N antiserum should recognize both full-length proteins and the N-termini of the processed forms of PbSERA3 as well as TAP-tagged PbSERA3. For both WT and transgenic parasite preparations, full-length proteins were primarily found in the PV (saponin extraction) whereas processed forms were mainly detected in parasite extracts (Fig. 4B) confirming the results presented in Fig. 2. As these fragments are present in WT and transgenic parasite and because they are also not detected by the anti-TAP human IgG, it can be concluded that they lack the C-terminus of the protein. Importantly, during the blood stage of the parasite TAP-tagged PbSERA3 appeared to be processed similarly to WT PbSERA3 with the exception of a processed form of about 50 kDa, which was not present in extracts of WT parasites. The four main protein fragments detected in saponin- and NP40-extracts of transgenic parasites by human IgG correspond to four



**Fig. 3.** Integration of a TAP-tagged copy of PbSERA3 into the SERA locus. Shown are schematic representations detailing the outcome of the expected integration event. A. Wild-type PbSERA3 locus showing part of the PbSERA2 gene (white box) and the PbSERA3 gene (grey box) with 5' UTR and 3' UTR (upper part). The pL0032-PbSERA3 targeting construct including the 5' UTR and full-length PbSERA3 gene (without STOP codon) fused to a TAP-tag (black box), the 3' pbdhfr/ts sequence and a selectable *tgdhfr/ts* marker cassette (middle part) was integrated into the PbSERA3 locus (lower part). F = *FnuI* restriction sites. The expected fragments are indicated. B. Southern blot analysis showing the correct integration event. Wild-type parasites and transfected parasites were isolated from infected mice and genomic DNA was prepared. Upon *FnuI* digestion, Southern blot analysis was performed using a PbSERA3-specific DNA probe. The location of the probe is indicated in (A).



**Fig. 4.** Western blot analysis of wild-type PbSERA and PbSERA3-TAP-expressing *P. berghei* blood stage protein extracts. A. Schematic representation of endogenous PbSERA3 protein and TAP-tagged PbSERA3. The epitopes against which the different antibodies are directed (anti-PbSERA3-N and anti-TAP) are indicated.

B and C. Wild-type (WT) or transgenic parasites (TAP) were initially lysed with saponin to extract proteins present in the PV and subsequently treated with NP40 to extract soluble parasite proteins. Western blot analysis was performed using antibodies directed against the PbSERA3 N-terminus (B) or the TAP-Tag (C). Molecular weight markers (in kDa) are shown on the left side of each blot. The arrows indicate the full-length TAP-tagged PbSERA3 and the asterisk in C labels an unspecific band.

protein species that include the C-terminus and the TAP-tag as illustrated in Fig. 4A. The simultaneous occurrence of many PbSERA3 peptides in Western blot experiments in comparison to relatively limited number of fragments in Western blot analysis of *P. falciparum* cell extracts (Li *et al.*, 2002) reflects most likely the non-synchronous growth of *P. berghei* in mice. To confirm this assumption, we synchronized *P. berghei* blood stage parasites (WT parasites and PbSERA3-TAP expressing parasites) *in vitro* and repeated the Western blot analysis with lysates of highly enriched schizonts (Fig. S4). As expected, processing was more pronounced when compared with lysates of mixed cultures. The prominent 72 kDa protein detected in mixed cultures by the antiserum directed against the N-terminus is not present in lysates of synchronized cultures (Fig. S4A). However, when the blot was probed with anti-TAP antiserum (Fig. S4B), no difference was seen to the experiment with mixed culture lysates, suggesting that N-terminal but not C-terminal processing occurs in blood stage schizonts.

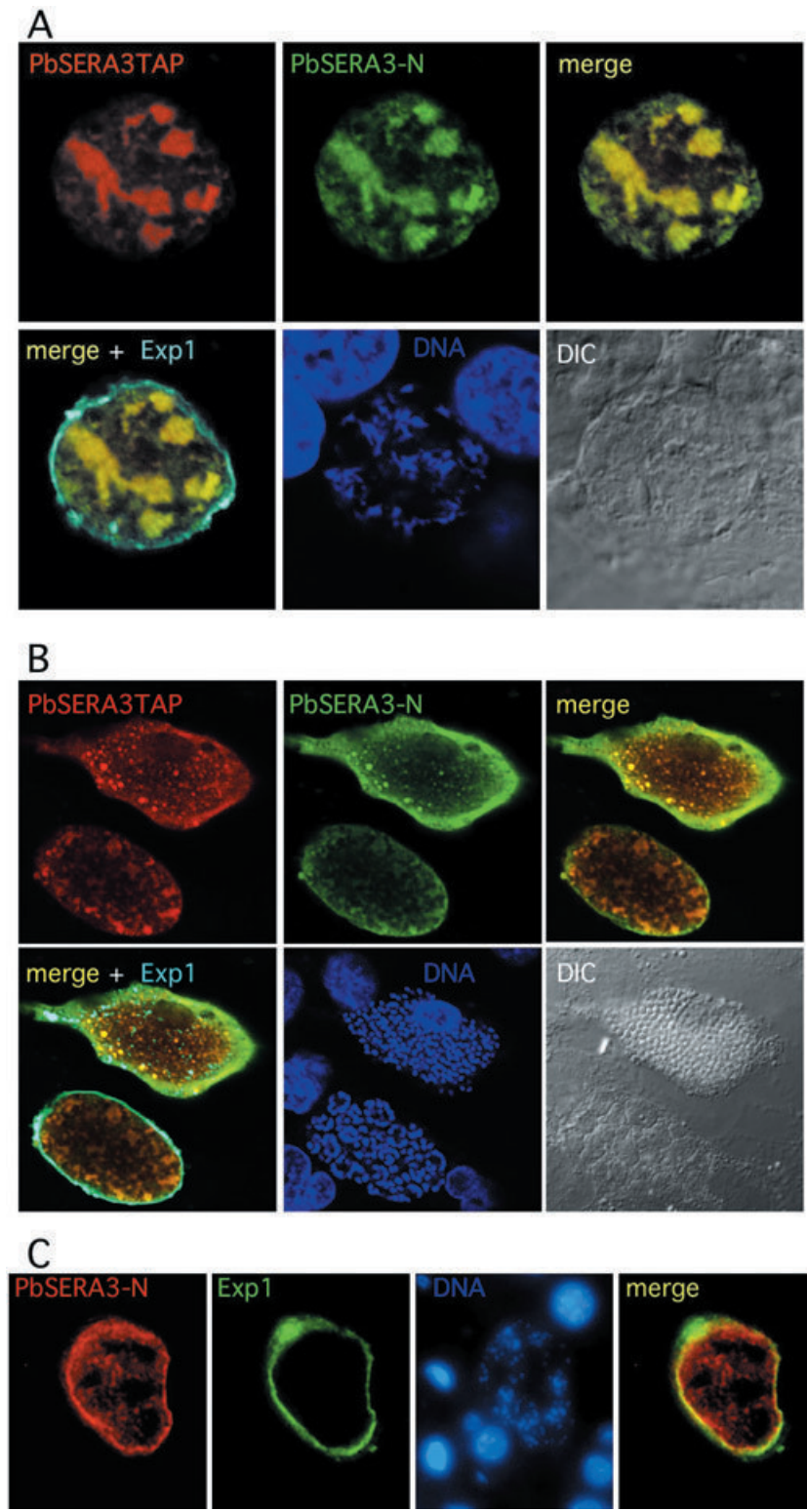
#### Subcellular localization of PbSERA3

Western blot analysis of blood stage parasite extracts suggested that processed PbSERA3 forms exists in the PV and in the parasite. To determine the subcellular localization of PbSERA3 in late liver stage parasites, indirect immunofluorescence analysis was performed. To prove

whether the TAP-tagged and the endogenous versions of PbSERA3 colocalize, we stained schizont-infected HepG2 cells with both human IgG to detect TAP-tagged PbSERA3 and with the antiserum directed against the N-terminus of PbSERA3 (Fig. 5A). The vast majority of the detected proteins indeed colocalized in defined regions of the parasite, indicating that the TAP-tag does not alter the localization of the tagged protein. Using the PbSERA3-N antiserum a similar staining pattern was also seen in HepG2 cells infected with WT parasites (Fig. S5), confirming that additional expression of TAP-tagged PbSERA3 has no effect on the localization of the protein. From this experiment, it can be concluded that human IgG is indeed suitable for detection of the TAP-tagged C-terminus of PbSERA3 at the correct location. Importantly, in fixed liver sections of *P. berghei*-infected mice, the staining pattern obtained by anti-PbSERA3-N antiserum detection resembled the *in vitro* acquired results with PbSERA3-N localizing mainly in the parasite cytoplasm and close to the PVM (Fig. 5B and C).

In order to inhibit SERA processing, we treated infected HepG2 cultures 48 hpi with E64 and stained the cells with anti-TAP and anti-PbSERA3-N 56 hpi. Additionally, the PVM was visualized using an anti-Exp1 antiserum. At this time point, in a substantial number of infected non-treated control cells, PbSERA3 was found in the host cell cytoplasm whereas in E64-treated cells, PbSERA3 was restricted to the parasite. In Fig. 6, representative images

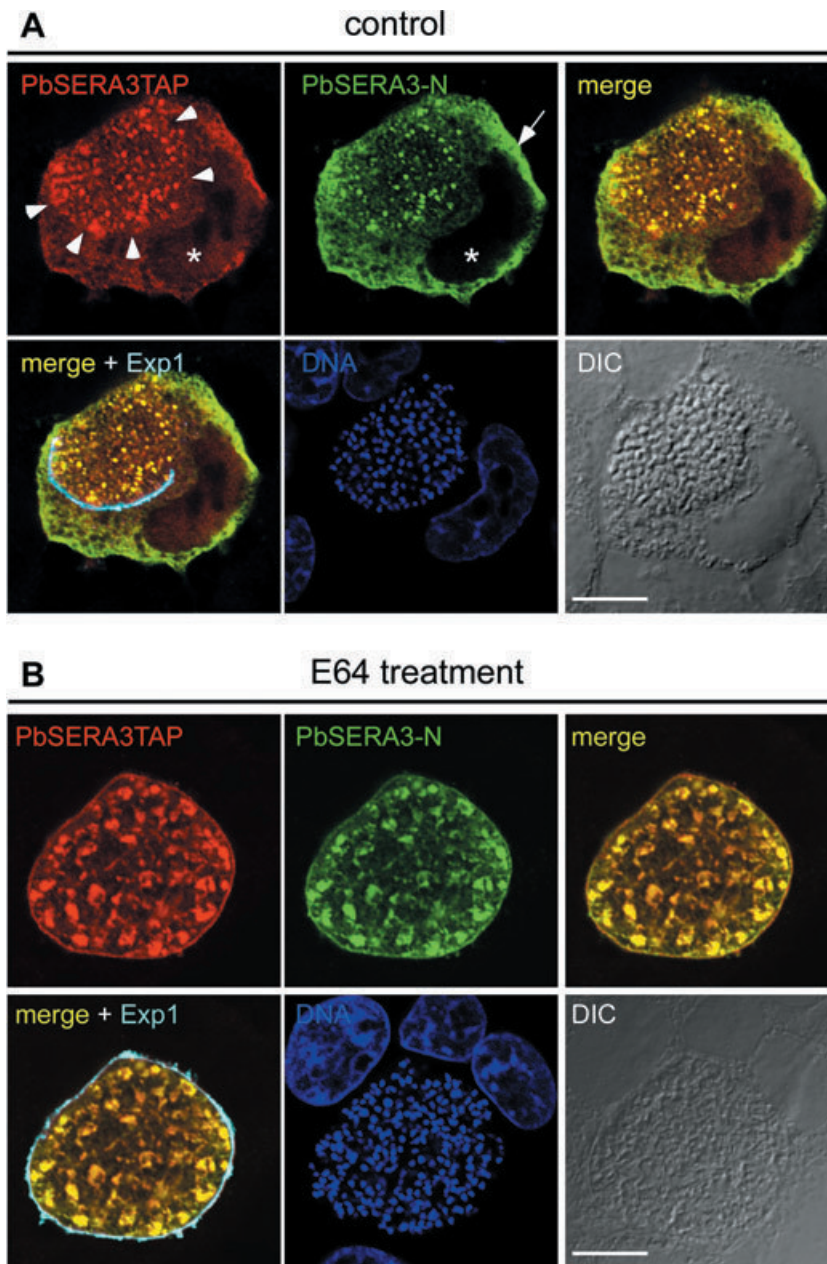




**Fig. 5.** PbSERA3 localization in *P. berghei*-infected HepG2 cells and in hepatocytes. Infected HepG2 cells were fixed 48–60 h post infection and stained with anti-TAP (red), anti-PbSERA3-N (green), anti-Exp1 (cyan) to visualize the PVM and the DNA dye DAPI (blue). (A) Schizont stage; (B) cytomere and merozoite stage; (C) section of a *P. berghei*-infected liver stained with anti-PbSERA3-N (red), anti-Exp1 (green) and DAPI (blue). Bar = 10  $\mu$ M.

are depicted. When merozoites have been formed, the PVM ruptures, releasing PbSERA3-N and C into the host cell cytoplasm (Fig. 6A). However, a closer examination of the staining patterns revealed some interesting differences

in the distribution of PbSER3-N and C fragments. PbSERA3-N was found equally distributed over the remaining parasite structure and the host cell but was absent from the host cell nucleus. In contrast, the



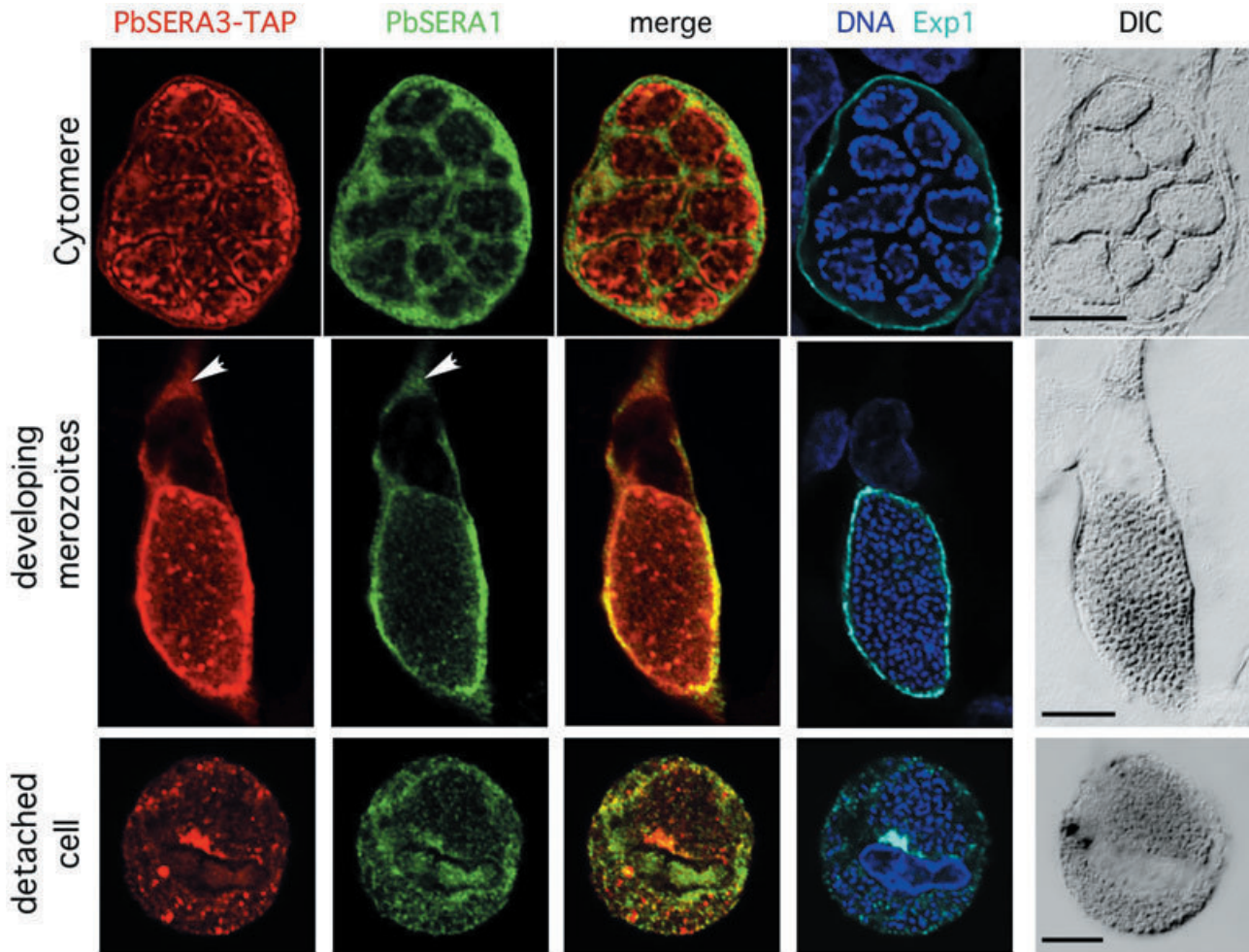
**Fig. 6.** Inhibition of cysteine protease activity by E64 inhibits PbSERA3 release in the host cell cytoplasm. A total of 48 hpi infected HepG2 cells were treated with E64 (B) or were left untreated as a control (A) and cultured for additional 15 h. Cells were fixed and stained as described above. The asterisk in (A) labels the host cell nucleus, which contains already the TAP-tagged C-terminus of PbSERA3 but not its N-terminus. Arrowheads mark the parasite dimensions in the infected cell. The arrow indicates an area of high PbSERA3-N concentration. Note that the concentration of TAP-tagged C-terminus is clearly lower (red staining). Bar = 10  $\mu$ M.

TAP-tagged C-terminus of PbSERA3 was clearly more concentrated to the parasite. Staining of the host cell cytoplasm with anti-TAP was less pronounced than was seen for anti-PbSERA3-N staining. Despite the reduced occurrence of PbSERA3-C in the host cell, it was found in the nucleus of the host cell. Together, the differences in the staining pattern clearly confirm PbSERA3 processing at this stage in non-treated control cells. On the other hand, the PVM in E64-treated cells appeared to be intact and in the vast majority of infected cells, no PbSERA3 translocation to the host cell cytoplasm was observed (Fig. 6B). Importantly, PbSERA3-N and PbSERA3-TAP colocalized

almost completely, indicating that PbSERA3 is indeed inhibited by E64 treatment.

With the transgenic parasite line expressing a TAP-tagged PbSERA3 we now have a valuable tool to perform colocalization experiments with other PbSERAs. Together with a panel of specific antibodies, this should help us to analyse PbSERA expression, localization and processing during the liver stage of the parasite in detail. Figure 7 provides the first hint that PbSERA localization might vary considerably during the exoerythrocytic parasite stage. Quadruple labelling experiments using human IgG, mouse anti-PbSERA1, chicken anti-Exp1 and DAPI were





**Fig. 7.** PbSERA3-C and PbSERA1-M localization in infected HepG2 cells. *P. berghei*-infected HepG2 cells were fixed at different time points post infection and stained with anti-TAP (red), anti-PbSERA1-M mAb (green), anti-Exp1 (cyan) and DAPI (blue). Arrows indicate SERA localization in the host cell cytoplasm. For easier interpretation, only images obtained with anti-TAP and anti-PbSERA1 were merged. Yellow colour indicates colocalization. Bar = 10  $\mu$ M.

used to determine SERA localization at different parasite stages. In cytomere-stage parasites, PbSERA3 localized mainly in the parasite cytoplasm and the PVM, with little protein located in the PV (Fig. 7, upper panel). Interestingly, at this stage, PbSERA1 was predominantly detected in the PV, suggesting a different localization of both PbSERA proteins. When merozoites have been formed, both antibodies label the already damaged PVM and the host cell cytoplasm (Fig. 7, middle panel). Finally, in detached cells, the PVM is completely disintegrated and PbSERA-1 and -3 are found in the host cell in distinct foci, which do not completely overlap (Fig. 7, lower panel). It should be noted that in cell extracts of detached cells/merosomes, only processed PbSERA3 protein was detected by Western blotting (Fig. 2), suggesting that TAP detection at this stage visualizes the processed C-terminus of the protein.

## Discussion

Here, we present for the first time evidence that four putative proteases of the PbSERA family are expressed in late liver stages and that PbSERA3 becomes processed during merozoite development. In the activated state, PbSERA3 might contribute to the observed PVM destruction and merozoite liberation as has been postulated for SERA5 during the blood stage of *P. falciparum* (Hodder *et al.*, 2003). Although there is no doubt that cysteine proteases mediate PVM destruction and facilitate merozoite release from hepatocytes, additional factors might be required to guarantee release of merozoites from merosomes. It has recently been shown that merosomes migrate out of the liver and reach the lung (Baer *et al.*, 2007b). It might well be that in the microvasculature, a pressure-driven merozoite release occurs similarly to

what has been described for *P. falciparum* merozoite release from erythrocytes (Glushakova *et al.*, 2005). Our own *in vitro* live imaging of *P. berghei*-infected hepatocytes supports this view. We observed that merozoites are not all released at once from merosomes but are liberated in several convulsive eruptions over a period of about 1 h. After the release of 10–20 merozoites the merosome membrane is closed again until the next eruption (V.T. Heussler, unpubl. obs.). This form of merozoite release might well be triggered by increased osmotic pressure, which decreases upon merozoite release and again increases once the membrane is re-sealed. However, the fact that the entire process of PVM degradation and merozoite liberation can be blocked by different protease inhibitors demonstrates clearly that proteases appear to act as initiators of merozoite release.

We found that mRNA expression of four PbSERA proteases was strongly upregulated briefly before merozoite development. Furthermore, we could show by IFA that, at this stage, PbSERA1 translocated predominantly into the PV. Upon disruption of the PVM, PbSERA1 and PbSERA3-C were localized in the host cell cytoplasm, suggesting a role in the subsequent host cell death. SERA proteases have also been proposed to mediate parasite liberation from *P. falciparum*-infected erythrocytes with PfSERA5 being processed briefly before merozoite liberation (Hodder *et al.*, 2003) and it appears likely that the molecular mechanisms of *Plasmodium* merozoite liberation from infected erythrocytes and hepatocytes are similar. It has already been shown that *P. falciparum* SERA5 has a weak proteolytic activity (Hodder *et al.*, 2003), but the physiological roles of the different SERAs and their substrates in infected cells are still not known (McCoubrie *et al.*, 2007). Approaches to knockout the different *P. falciparum* SERAs expressed during the blood stage either did not generate an apparent phenotype or were lethal (Miller *et al.*, 2002; McCoubrie *et al.*, 2007). Obviously, knockout of some PfSERAs can be compensated by upregulating the expression of others (McCoubrie *et al.*, 2007) and thus alternative approaches like inducible expression or stage-specific expression (Carvalho *et al.*, 2004) have to be considered in the future to determine the function of the individual SERAs in blood and liver stages. As we show here that PbSERA proteases localize to different compartments in infected hepatocytes, it is also possible that not only expression levels but also the change in protein localization might compensate for the lack of certain SERAs in knockout parasites. Staining of large liver stage parasites is much easier to perform and to interpret than staining of infected RBCs and thus *P. berghei*-infected hepatocytes might turn out to be a valuable tool to analyse the localization and the function of SERA proteases in general. The most important evidence that SERA proteases are involved in

parasite liberation comes indeed from knockout studies performed in *P. berghei* (Aly and Matuschewski, 2005). These authors had demonstrated that PbSERA5 expression is restricted to the insect stage and thus selection of knockout parasite strains during the blood stage was possible. Parasites lacking functional PbSERA5 did not show defects in mosquito infection or in the development of sporozoites within oocysts. However, PbSERA5-knockout sporozoites were not able to leave mature oocysts and no salivary gland infection was observed. Another intriguing question is why *Plasmodium* parasites express several rather similar proteases at the same time. Our observation that the localization of these proteases differs considerably within infected cells provides an explanation for this simultaneous expression. Alternatively, the different SERA proteases might be arranged in cascades with one SERA processing another member of the family similarly to what is known for caspases in metazoans. As we expect that mature PbSERA proteases, once translocated to the cytoplasm of the infected hepatocyte, are responsible for executing host cell death, this would indeed be a striking analogy with initiator caspases and executor caspases triggering apoptosis in other organisms. Interestingly, the genome of *Theileria annulata*, which is a closely related parasite to *Plasmodium*, contains also a SERA gene (McCoubrie *et al.*, 2007). As *Theileria* parasites actively inhibit host cell apoptosis during the schizont stage but kill their host cell during merozoite release (Heussler *et al.*, 2002), it will be highly interesting to determine the expression and the function of the putative protease during parasite liberation from infected leukocytes. For *Plasmodium*-SERAs, the next challenge is to decipher their function in detail, in particular to define their role in the execution of host cell death. The work presented here provides a good basis for further analysis of SERA function, and some exciting findings can be expected in the near future.

## Experimental procedures

### *Experimental animals*

Animals were from Charles River Laboratories. All animal work was conducted in accordance with European regulations and approved by local state authorities.

### *PbSERA gene prediction and amino acid sequence alignment*

Homology searches for *P. berghei* sequences similar to PySERA1–5 and the annotated PfSERA1–9 genes were performed with the basic local alignment search tool (BLAST) program of the GeneDB website or of PlasmoDB website. cDNA sequences were translated and then aligned using the CLUSTAL W programme of MacVector.



### Transcript detection

For RT-PCR analysis, total RNA was isolated from  $6 \times 10^5$  WT salivary gland sporozoites,  $10^6$  WT oocyst sporozoites, infected HepG2 cells at different time points post infection, detached cells/merosomes or from 0.15% saponin-treated (Sigma) blood stage parasites (RBC stage) using the RNA Extract Kit II (Machery and Nagel). First strand cDNA was synthesized with the Superscript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) using 200 ng of each total RNA. Target cDNAs were amplified using the following primer sets: PbSERA1/for (5'-TTAGATGCAGCCGACACAAG-3') and PbSERA1/rev (5'-TACTCCATTTGCGAGCACA-3'); PbSERA2/for (5'-TTCCCTTTCAC CACAACCTC-3') and PbSERA2/rev (5'-TCACATTTGTTCGT TTCTGGA-3'); PbSERA3/for (5'-ATGGCAGCTCTCTCATCAAT-3') and PbSERA3/rev (5'-TGTGGTGAAAATTGAACTCTGAA-3'); PbSERA4/for (5'-CACGAAATTAATACGCAAACCT-3') and PbSERA4/rev (5'-TCATTAGTGTGTGTTTCCCATT); PbSERA5/for (5'-TCTGGAACAAGCAATTTACAAAA-3') and PbSERA5/rev (5'-TCAGCGAATCCAAGTCCTTT-3'). As an internal control, a primer set (Pbtubulin/for (5'-TGGAGCAGGAAATAACTGGG-3') and Pbtubulin/rev (5'-ACCTGACATAGCGGCTGAAA-3') that annealed to *P. berghei* tubulin was used. All RNA preparations were free of genomic DNA (gDNA) contamination as no PCR product was obtained when reverse transcriptase has been omitted from the RT-PCR (negative control).

### In vitro infection of HepG2 cells

Human hepatoma cells (HepG2) were obtained from the European cell culture collection. Cells were cultivated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in EMEM (Gibco), containing 10% fetal calf serum, 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin and 1% MEM non-essential amino acids (all PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). The cells were passaged by trypsinization every 4–6 days and for infection,  $10^5$  cells were seeded per coverslip in a 24-well plate. *P. berghei* WT (ANKA) or transgenic sporozoites were prepared from dissected salivary glands of infected *Anopheles stephensi* mosquitoes and incubated with HepG2 cells for 2 h. After washing, the infected cultures were incubated at 37°C until the indicated times.

### SDS-PAGE and Western blotting

Parasite proteins obtained from 55% Nycodenz-enriched blood stage schizont preparation or collected floating cells/merosomes were separated on 12% SDS-PAGE reducing gels and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were probed with rat antisera directed against the N-terminus of PbSERA3 (PbSERA3-N) or human gamma-globulins (anti-TAP, Sigma). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rat or anti-human IgG (Pierce) were used for detection, and bands were visualized using enhanced chemiluminescence Pico Detection Kit (Pierce).

### Immunofluorescence microscopy

For analysis of SERA localization in late liver stages, infected HepG2 cells were fixed with 4% formaldehyde, permeabilized with ice-cold methanol and incubated with primary antibodies (1:400 in 10% FCS diluted in PBS) or human gamma-globulin

(10 µg ml<sup>-1</sup> in 10% FCS diluted in PBS). Bound antibodies were detected using anti-human Alexa Fluor 594-, anti-rat Alexa Fluor 488- or anti-chicken Cy5-conjugated secondary antibody (Molecular Probes, Leiden, the Netherlands). To identify the PVM of intracellular parasites, cells were stained with a parasite-specific chicken anti-PbExp1 antibody. Nuclei of the cells were visualized with a 10 µg ml<sup>-1</sup> aqueous solution of DAPI (Sigma-Aldrich, Germany). Immunofluorescence-labelled cells were examined by confocal microscopy using the Olympus FV1000 (SIM-scanner and spectral detection).

### Immunohistological staining

For analysis of PbSERA3 localization *in vivo*, female C57BL/6 mice were infected intravenously with  $2.5 \times 10^5$  *P. berghei* WT (ANKA) sporozoites. Forty-eight hours post infection, mouse liver samples were fixed in HOPE Solution I (Hepes Glutamic Acid buffer mediated organic Solvent Protection effect; DCS, Hamburg) and were embedded in paraffin. Sections of 2 µm were treated with 0.5% Triton X-100 diluted in PBS and stained with rat anti-PbSERA3-N and chicken anti-Exp1 antibodies, diluted to 1:100, followed by detection with anti-rat-Alexa 594 and antichick-Cy2. DAPI was used to stain the nuclei of the host cell and the parasite.

### Antibodies

**Expression and purification of recombinant GST fusion proteins.** RT-PCR was used to clone PbSERA1, and PbSERA3 cDNA. BamHI/EcoRI sites and XhoI sites were introduced at the end of forward and reverse primers respectively (restriction enzyme sites are underlined): SERA3/for (5'-GTGGATCCATGGCACGT CTCTCATCAAT-3') and SERA3/rev (5'-GTCTCGAGATGTGGT GAAAATTGAACTCTGAA-3'); SERA1/for (5'-GTGTGAATCTTA GATGCAGCCGACACAAG-3') and SERA1/rev (5'-GACTCGAG TTATCCTTCTCCAGTTGGTTGATG-3'). The resulting PCR products were ligated into the appropriate pGEX vectors and expressed in *Escherichia coli* BL21 cells (Stratagene) as glutathione S-transferase (GST) fusion proteins. GST fusion proteins of PbSERA1 (Leu<sup>877</sup>-Gly<sup>910</sup>) or PbSERA3 (Met<sup>1</sup>-Phe<sup>235</sup>) were harvested by suspending bacteria expressing SERA proteins in 10 ml buffer A (10 mM EDTA in PBS) in the presence of Complete™ Protease Inhibitor mixture tablets (Roche Molecular Biochemicals) for 30 min followed by sonification. The recombinant SERA fusion proteins were purified from the supernatant using glutathione-sepharose as described by the manufacturer (Amersham Biosciences). Twenty micrograms of each purified fusion protein was mixed with Freund's complete adjuvant and used to immunize rats (Lewis, female 3 months old), followed by multiple boosting.

**Hybridoma production.** Following immunization, blood samples were collected to test serum reactivity against the SERA1-C protein. From a positive mouse lymph node, cells were isolated and fused to the mouse myeloma cell line X63Ag8.653. Supernatants were screened by direct ELISA and single-cell clones were isolated by limited dilution.

**Purification of antibodies.** To collect polyclonal rat serum, immunized animals were killed and heparinized blood was collected by

cardiac puncture. Serum was obtained after centrifugation. Monoclonal antibodies were isolated by applying the cell culture supernatant to a Protein G-Sepharose column (Amersham Biosciences). Total IgG was eluted from the column and dialysed against PBS.

#### pL0032-SERA3 plasmid design and transfection

DNA was amplified by PCR from *P. berghei* blood stage parasite gDNA template using the Phusion Taq DNA polymerase High Fidelity enzyme (Finnzyme). Preparation of gDNA was performed using the Blood DNA Extract Kit (Qiagen). The *P. berghei* TAP transfection plasmid pL0032, for homologous recombination into the genome, was obtained from MR4. The 5' UTR and the complete PbSERA3 ORF targeting sequence were obtained by amplification of *P. berghei* gDNA using the primer set: SERA3-TAP/for (5'-GCTCTAGATTTAACAATAAAGTTTGC AAAATAGTG AAT-3') and SERA3-TAP/rev (5'-CATGCCATGGACATAACA GAAGAGACATTTGTTTTTCC-3'). The resulting fragment was cloned into the NcoI/XbaI cloning sites of pL0032 in frame with the TAP-tag coding sequence. The plasmid was linearized for transfection using the unique restriction site XcmI. Schizont-stage parasites were transfected with 5 µg of purified plasmid DNA (Machery and Nagel Kit PC100), as previously described (Janse *et al.*, 2006).

#### Southern blot

For isolation of parasite gDNA, infected mice were exsanguinated at 3–5% parasitemia and gDNA was isolated from whole blood as described above. Manipulation of recombinant DNA and analysis of nucleic acids by Southern blot hybridization were carried out using a non-radioactive labelling kit according to manufacturers protocol (Amersham Biosciences).

#### Comparison of wild-type versus transgenic SERA3-TAP parasite development

For counting oocysts, midguts of WT or SERA3-TAP transgenic *P. berghei*-infected *A. stephensi* mosquitoes were stained in 0.5% mercurochrome in 0.9% NaCl 10 days after a blood meal.

Monitoring parasitemia in mice: sporozoites were prepared from salivary glands of *A. stephensi* mosquitoes 21 days after an infectious blood meal. A total of 30 000 WT or SERA3-TAP transgenic *P. berghei* sporozoites were injected intravenously into three mice for each parasite strain. Parasitemia was monitored by blood smears.

#### FACS sorting of exoerythrocytic GFP-expressing *P. berghei* parasites

HepG2 cells were seeded 24 h prior infection in 24-well plates. GFP-expressing *P. berghei* sporozoites from five to 10 well-infected mosquitoes were used to infect each of three wells. Fifty hours post infection, cells were detached by Accutase treatment, pooled in 10 ml media and subsequently FACS sorted. Sorted infected cells were immediately lysed and used for Western blot analysis as described above.

#### Acknowledgements

We thank Mike Blackman for providing us with the subtilisin 1 cleavage sites in PfSERA5 prior to publication. We are also grateful to Rebecca Stanway for critically reading the manuscript and to Ulrike Froehlike for excellent technical assistance. MR4 and Chris Janse are thanked for providing *P. berghei* transfection plasmids and the PbGFPcon parasite strain. This work was supported by a DFG grant to V.H. (HE 4497/1–2).

#### References

- 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., Menard, R., and Frischknecht, F. (2005) *In vivo* imaging of malaria parasites – recent advances and future directions. *Curr Opin Microbiol* **8**: 407–414.
- Arisue, N., Hirai, M., Arai, M., Matsuoka, H., and Horii, T. (2007) Phylogeny and evolution of the SERA multigene family in the genus *Plasmodium*. *J Mol Evol* **65**: 82–91.
- Baer, K., Roosevelt, M., Clarkson, A.B., Jr, van Rooijen, N., Schnieder, T., and Frevert, U. (2007a) Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver. *Cell Microbiol* **9**: 397–412.
- Baer, K., Klotz, C., Kappe, S.H., Schnieder, T., and Frevert, U. (2007b) Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog* **3**: e171.
- Bourgon, R., Delorenzi, M., Sargeant, T., Hodder, A.N., Crabb, B.S., and Speed, T.P. (2004) The serine repeat antigen (SERA) gene family phylogeny in *Plasmodium*: the impact of GC content and reconciliation of gene and species trees. *Mol Biol Evol* **21**: 2161–2171.
- Bzik, D.J., Li, W.B., Horii, T., and Inselburg, J. (1988) Amino acid sequence of the serine-repeat antigen (SERA) of *Plasmodium falciparum* determined from cloned cDNA. *Mol Biochem Parasitol* **30**: 279–288.
- Carvalho, T.G., Thiberge, S., Sakamoto, H., and Menard, R. (2004) Conditional mutagenesis using site-specific recombination in *Plasmodium berghei*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 14931–14936.
- Debrabant, A., and Delplace, P. (1989) Leupeptin alters the proteolytic processing of P126, the major parasitophorous vacuole antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **33**: 151–158.
- Debrabant, A., Maes, P., Delplace, P., Dubremetz, J.F., Tartar, A., and Camus, D. (1992) Intramolecular mapping of *Plasmodium falciparum* P126 proteolytic fragments by N-terminal amino acid sequencing. *Mol Biochem Parasitol* **53**: 89–95.
- Delplace, P., Dubremetz, J.F., Fortier, B., and Vernes, A. (1985) A 50 kilodalton exoantigen specific to the merozoite release-reinvasion stage of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **17**: 239–251.
- Delplace, P., Fortier, B., Tronchin, G., Dubremetz, J.F., and Vernes, A. (1987) Localization, biosynthesis, processing and isolation of a major 126 kDa antigen of the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **23**: 193–201.
- Delplace, P., Bhatia, A., Cagnard, M., Camus, D., Colombet,

- G., Debrabant, A., *et al.* (1988) Protein p126: a parasitophorous vacuole antigen associated with the release of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Biol Cell* **64**: 215–221.
- Glushakova, S., Yin, D., Li, T., and Zimmerberg, J. (2005) Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. *Curr Biol* **15**: 1645–1650.
- Heussler, V.T., Rottenberg, S., Schwab, R., Kuenzi, P., Fernandez, P.C., McKellar, S., *et al.* (2002) Hijacking of host cell IKK signalosomes by the transforming parasite *Theileria*. *Science* **298**: 1033–1036.
- Hodder, A.N., Drew, D.R., Epa, V.C., Delorenzi, M., Bourgon, R., Miller, S.K., *et al.* (2003) Enzymic, phylogenetic, and structural characterization of the unusual papain-like protease domain of *Plasmodium falciparum* SERA5. *J Biol Chem* **278**: 48169–48177.
- Janse, C.J., Ramesar, J., and Waters, A.P. (2006) High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc* **1**: 346–356.
- Knapp, B., Hundt, E., Nau, U., and Kupper, H.A. (1989) Molecular cloning, genomic structure and localization in a blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by a serine stretch. *Mol Biochem Parasitol* **32**: 73–83.
- Li, J., Matsuoka, H., Mitamura, T., and Horii, T. (2002) Characterization of proteases involved in the processing of *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen (SERA). *Mol Biochem Parasitol* **120**: 177–186.
- McCoubrie, J.E., Miller, S.K., Sargeant, T., Good, R.T., Hodder, A.N., Speed, T.P., *et al.* (2007) Evidence for a common role for the serine-type *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen proteases: implications for vaccine and drug design. *Infect Immun* **75**: 5565–5574.
- Miller, S.K., Good, R.T., Drew, D.R., Delorenzi, M., Sanders, P.R., Hodder, A.N., *et al.* (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.
- Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., *et al.* (2001) Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* **291**: 141–144.
- Okech, B., Mujuzi, G., Ogwal, A., Shirai, H., Horii, T., and Egwang, T.G. (2006) High titers of IgG antibodies against *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen 5 (SERA5) are associated with protection against severe malaria in Ugandan children. *Am J Trop Med Hyg* **74**: 191–197.
- Okech, B.A., Nalunkuma, A., Okello, D., Pang, X.L., Suzue, K., Li, J., *et al.* (2001) Natural human immunoglobulin G subclass responses to *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen in Uganda. *Am J Trop Med Hyg* **65**: 912–917.
- Otto, H.H., and Schirmeister, T. (1997) Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem Rev* **97**: 133–172.
- Salmon, B.L., Oksman, A., and Goldberg, D.E. (2001) Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 271–276.
- Sturm, A., and Heussler, V. (2007) Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic *Plasmodium* parasites. *Med Microbiol Immunol* **196**: 127–133.
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., *et al.* (2006) Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* **313**: 1287–1290.
- Wickham, M.E., Culvenor, J.G., and Cowman, A.F. (2003) Selective inhibition of a two-step egress of malaria parasites from the host erythrocyte. *J Biol Chem* **278**: 37658–37663.
- Yeoh, S., O'Donnell, R., Koussis, K., Dluzewski, A., Ansell, K., Osborne, S., *et al.* (2007) Subcellular discharge of serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes. *Cell* **131**: 1072–1083.

## Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

**Fig. S1.** Comparison of PbSERA1–5 and *P. falciparum* SERA5. Multiple alignment of amino acid sequence of *P. berghei* SERAs with PfSERA5. Gaps are introduced to maximize homology. Light grey shading indicates similarities. Dark grey shadings indicate identities. The PfSERA5 processing sites by PfSUB1 (Yeoh *et al.*, 2007) are indicated by black shading and white letters. Asterisks label the putative catalytic triade of SERA proteases.

**Fig. S2.** The SERA3 5' non-transcribed region induces late GFP expression in transgenic liver stage parasites. The entire 5' UTR of PbSERA3 gene was cloned in front of GFP into the plasmid pL0031. *P. berghei* parasites were transfected with resulting plasmid construct. Transgenic parasites were passaged through mosquitoes and corresponding sporozoites were used to infect HepG2 cells. Live imaging was performed at indicated time points. As a control, transgenic parasites expressing GFP under the constitutive pbeef1aa promoter were used to infect HepG2 cells. Bar = 10 µm.

**Fig. S3.** Normal development of transgenic *P. berghei* expressing TAP-tagged SERA3.

A. Insect stage. Mosquitoes were infected with wild-type (WT) or transgenic *P. berghei* parasites expressing TAP-tagged SERA3. 10 days post infection, midguts of 6 (for WT) and 8 (for transgenic parasites) mosquitoes were dissected and the midguts were stained with mercurochrome before oocysts were counted. The numbers of oocysts of all individual mosquitoes are depicted on the graph. B. Mammalian stage. Sporozoites were prepared from salivary glands of infected mosquitoes and intravenously injected into mice. Blood stage parasitemia was followed for 10 days. The course of parasitemia for all individual mice is shown.

**Fig. S4.** WB analysis of synchronized *P. berghei* blood stages. A mixed *P. berghei* culture was synchronized as described previously (Janse *et al.*, 2006). Saponin and NP40 lysates were prepared and subjected to SDS-PAGE. Upon transfer to nitrocellulose membranes, Western blot analysis using anti-PbSERA3-N (A) and anti-TAP (B) antiserum was performed.

**Fig. S5.** SERA3 localization in *P. berghei*-infected HepG2 cells. Infected cells were fixed 48 hpi and stained with an anti-SERA3-N antiserum (red) and with an anti-Exp1 antiserum (green). DNA was stained with Dapi.

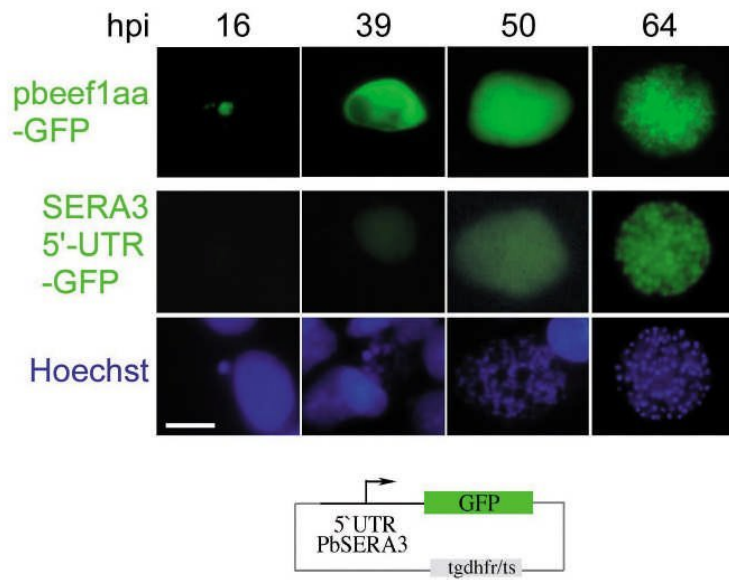
This material is available as part of the online article from: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1462-5822.2008.01162.x>

Please note: Blackwell Publishing is not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.



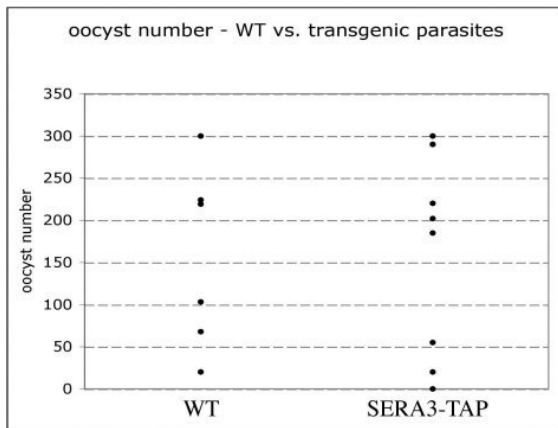


Supplementary figure 2, Schmidt-Christensen et al.

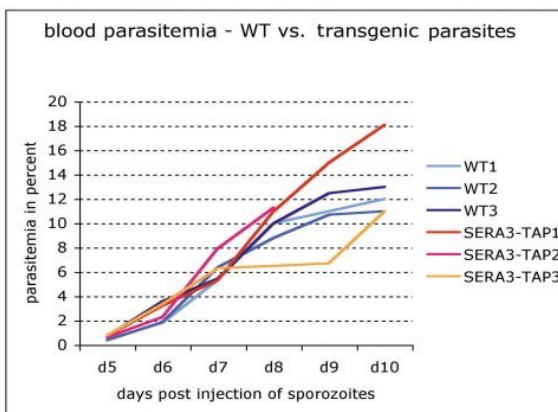


Supplementary figure 3, Schmidt-Christensen et al.

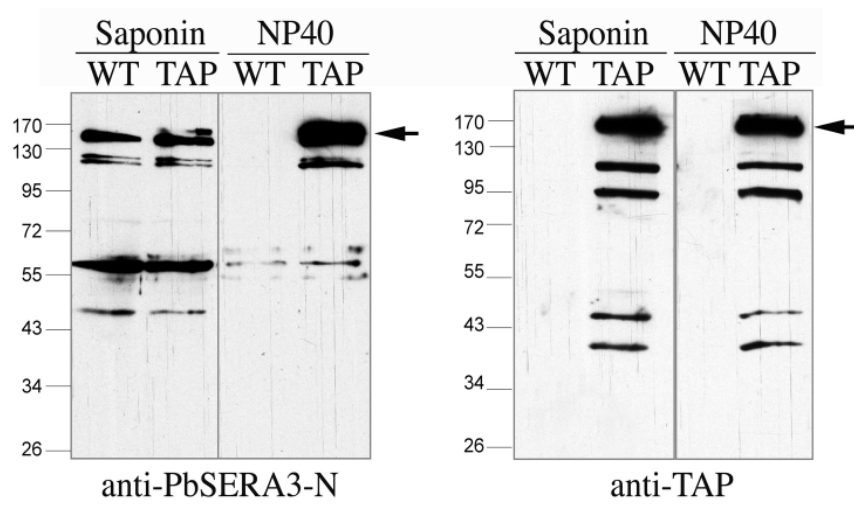
A



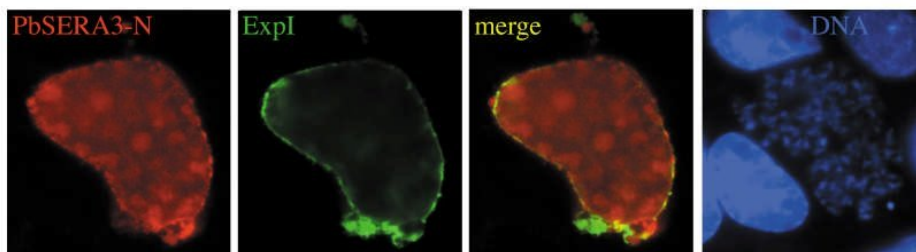
B



Supplementary Figure 4, Schmidt-Christensen et al.



Supplementary figure 5, Schmidt-Christensen et al.



# Serine- and cysteine-type *P. berghei* SERAs are processed in liver stage parasites and display distinct subcellular localization patterns indicating distinct roles

Anja Schmidt-Christensen, Tina Witt, Christine Lehmann and Volker T. Heussler  
Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine,  
Bernhard-Nocht-Str 74, 20359 Hamburg, Germany.

## Summary

Egress of *Plasmodium* liver-stage merozoites, blood-stage merozoites and mosquito midgut sporozoites appears to be mediated by a class of papain-like cysteine proteases, called serine repeat antigens (SERA). We analysed the promotor activity of all *Plasmodium berghei* SERA proteases throughout the life cycle and raised antisera against the PbSERA1-4 to determine their localisation and processing state. Western Blot analysis revealed that PbSERA1-4 are processed in late liver stages. Localization studies show that PbSERA1 and PbSERA2, which have a serine residue instead of the canonical cysteine residue in the catalytic centre (serine-type SERAs), have distinct subcellular localization patterns compared to cysteine-type SERAs, PbSERA3 and PbSERA4. Further colocalization experiments revealed that other members of the protease cascade, which is responsible for processing of SERAs, the *P. berghei* subtilisin I and PbDPAP are expressed during the liver stage suggesting that they are involved in the activation of PbSERAs.

## Introduction

Malaria is responsible for 500 million new infections and the death of 1 million people each year, mainly children and pregnant women (WHO 2008). The infection of the mammalian host is initiated by transmission of *Plasmodium* sporozoites during blood feeding by the *Anopheles* vector. *Plasmodium* parasites initially infect hepatocytes and later erythrocytes, but the pathology they induce is caused by either the adherence or the lysis of infected red blood cells. During the asymptomatic exoerythrocytic cycle, the invaded sporozoite develops within a parasitophorous vacuole into a metabolically highly active trophozoite stage, divides asexually and becomes a multinucleated liver host schizont.

The liver schizont differentiates into several thousand merozoites and drastically changes the morphology of its host cell until it finally detaches from neighbouring cells (Sturm *et al.*, 2006; Sturm and Heussler, 2007). Subsequently, merozoite-filled host cell-derived vesicles, called merosomes, bud off the infected cell and are transported to the blood stream to release thousands of daughter parasites that invade erythrocytes. In vitro, *P. berghei*-infected HepG2 cells detach at the end of the exoerythrocytic development, float into the culture media and eventually form merosomes (Sturm *et al.*, 2006). Parasite release is inhibited both from *P. berghei*-infected hepatoma cells (Sturm *et al.*, 2006) and from *P. falciparum*-infected erythrocytes (Salmon *et al.*, 2001; Wickham *et al.*, 2003) by treatment with the cysteine protease inhibitor E64, proving that cysteine proteases play a key role in this process. SERAs are putative cysteine proteases and thought to be involved in the liberation of blood stage parasites from RBCs and sporozoites from oocysts (Hodder *et al.*, 2003; Bourgon *et al.*, 2004; Aly *et al.*, 2005; Arisue *et al.*, 2007).

*P. falciparum* SERA5 is well characterized and one of the most promising blood stage vaccine candidates, first described as parasitophorous vacuole (PV) resident antigen „P126“ (Delplace *et al.*, 1985) or SERP (Bzik *et al.*, 1988) in blood stage parasites. Some SERA proteins (“serine-type”) including PfSERA5 contain an active site serine residue instead of the canonical cysteine residue seen in „cysteine-type“ SERAs (Hodder *et al.*, 2003; Bourgon *et al.*, 2004). SERAs are found in all *Plasmodium* species investigated and a single gene copy is found in *Theileria* parasites (Arisue *et al.*, 2007). The putative proteases are encoded by a tandem gene array whose complexity is species-dependent. All *Plasmodium* species have 3 cysteine-type SERAs and a variable number of serine-type SERAs. Human *Plasmodium* species (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. ovale*) have a total number between 7-14 SERA genes and rodent *Plasmodium* parasites (*P. berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi*) obtain 5, whereas 3 genes are found in avian *Plasmodium* parasites species (*P. gallineceum*) as they lack the serine-type SERAs (Kiefer *et al.*, 1996; Gor *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2002; Aoki *et al.*, 2002; Carlton *et al.*, 2002; Bourgon *et al.* 2004; Kooij *et al.* 2005; Arisue *et al.* 2007). In blood stages, the precursor PfSERA5 undergoes multiple steps of processing (Delplace *et*

*al.*, 1985, 1987, 1988; Debrabant and Delplace 1989; Debrabant 1992) by subtilisin 1 (SUB1) cleavage (Yeoh *et al.*, 2007), which occur shortly before schizont rupture (Li *et al.*, 2002). Leupeptin-dependent inhibition of PfSERA5 processing from a 56kDa fragment to the mature 50kDa peptide still allowed the release of blood stage merozoites from the PV, but blocked the liberation of merozoites from the infected cell (Debrabant and Delplace, 1989). Interestingly, a similar phenotype could be observed for E-64- and to some extent in antipain-treated infected hepatocytes whereas leupeptin treatment blocked escape of mature merozoites from the PV (Schmidt-Christensen *et al.*, 2008).

We previously characterized the cysteine-type PbSERA3 in late liver stages (Schmidt-Christensen *et al.*, 2008). Here we have examined the remaining PbSERAs, analyzing expression, processing and their distinct localization patterns in *P. berghei* liver stage.

## Results

### 1. Stage-specific promoter activity of SERA genes

To monitor SERA gene expression during the entire life cycle of *P. berghei* by live microscopy, we have generated five transgenic parasite strains that express GFP under the control of the SERA1-5 promoter regions. We cloned the 5' flanking region and 5' untranslated region (5' UTR) upstream of each SERA open reading frame (ORF) in front of GFP into the *P. berghei* transfection plasmid pL0031 (Fig. 1A, right panel). GFP expression was monitored in all life cycle stages of the parasite (Fig. 1A). Additionally, DNA was visualized with cell membrane permeable dye Hoechst 33342. We observed that the promoter regions of SERA1-4 do not induce GFP expression in early liver stage trophozoites (24hpi) but induce a strong expression in late liver schizont (63hpi), as well as in blood asexual (rings, trophozoites, schizonts) and sexual stages (not shown). In contrast, parasites that express the GFP reporter gene under the control of the 5' flanking region of SERA5 are not fluorescent during liver or blood stages, but show strong GFP expression in oocysts and salivary gland sporozoites, confirming previous RT-PCR results (Schmidt-Christensen *et al.*, 2008). In contrast to previous RT-PCR results, a weak GFP expression was also detected in oocysts of parasites transfected with SERA2 and PbSERA3 promoter-GFP constructs. It is not clear whether this reflects the basal transcription level of the corresponding promoter region, but, using Western Blot analysis, no protein encoded by SERA1-4 was detected in oocyst lysates (Suppl.Fig. 1). Additionally, we examined SERA protein expression during liver stage development by immunofluorescence analysis. *P. berghei*-infected HepG2 cells were fixed at different time points post infection, stained with antibodies directed against each SERA1-4

and co-stained with antibodies against either a cytosolic *P. berghei* marker anti-HSP90 (18hpi) or the PVM-marker anti-ExpI (24h-56hpi) (Fig. 1B). Clearly, immunofluorescence analysis (IFA) confirmed a strong upregulation of SERA protein expression in late liver stages. Interestingly, SERA1-4 protein expression could already be detected at 24hpi, whereas the GFP-reporter experiments suggested that no SERA proteins are expressed at this time point. IFA of *P. berghei*-infected HepG2 cells at 18hpi revealed no SERA1-4 expression in early liver stages.

### 2. SERAs are processed in late liver stages

It is well established that SERA proteases of *P. falciparum* are processed by SUB1 serine protease (Yeoh *et al.*, 2008). We could recently confirm expression and processing of cysteine-type *P. berghei* SERA3 in blood and late liver stages (Schmidt-Christensen *et al.*, 2008).

For a comprehensive characterization of SERA processing in liver stages, we generated a panel of specific polyclonal and monoclonal antibodies in mice and rats that recognize different regions of PbSERA1, 2, 3 and 4. To exclude cross-reactivity of the different antisera raised against the highly homologous central region, they were first tested by Western blot analysis against all 4 recombinant SERA central domains (PbSERA1-4-M, Fig 2E). This experiment confirmed that the tested antisera detected exclusively their corresponding SERA central region. To specifically detect the C-terminus of PbSERA1, a monoclonal antibody, termed C65 was generated and the corresponding epitope of PbSERA1 was identified by western blotting (WB) of recombinant epitopes of PbSERA1-C. The smallest region that was recognized by mAb C65 was a 10 amino acid epitope (D<sup>892</sup>-EPASISTQ-E<sup>901</sup>) at the C-terminus of PbSERA1 (Suppl.Fig. 2, blue). To investigate SERA processing during blood and liver stages, the antisera/mAb were applied to western blot analysis of various parasite protein extracts. Purified mixed blood stage parasites were treated with Saponin to extract proteins present in the PV (Sap). A subsequent lysis with NP40 was used to extract soluble proteins from the parasite (NP40). Total lysates were prepared from mature schizont cultures, from detached cells/merosomes and from late liver schizonts. Blotted parasite extracts were probed either with anti-PbSERA1-N, anti-PbSERA1-M and anti-PbSERA1-C mAb (Fig. 2A), or anti-PbSERA2-N and anti-PbSERA2-M (Fig. 2B), or anti-PbSERA3-N and anti-PbSERA3-M (Fig. 2C) or anti-PbSERA4-N mAb and anti-PbSERA4-M (Fig. 2D). Schematic illustrations of each SERA protein show predicted SUB1 processing sites and polypeptides used for immunization.

All tested PbSERA proteins appear to be multiple processed in erythrocytic and late exoerythrocytic



schizonts as well as in detached cells/merosomes, finally releasing the processed central papain-like protease domains with the molecular weight of 55kDa for PbSERA1 (Fig.2A), 54 kDa for PbSERA2 (Fig.2B), 55 kDa for PbSERA3 (Fig.2C) and 56 kDa for the central protease domain of PbSERA4 (Fig.2D). Those processed 54-56 kDa central protease domains of PbSERAs correspond most likely to P56, the released central fragment of PfSERA5 after cleavage by PfSUB1. Comparing extracts of liver to blood stage parasites revealed slight differences. The central protease domains of PbSERA1, PbSERA2 and PbSERA4 were approximately 5kDa bigger in extracts of infected liver cells. It must now be determined whether this is due to a stage-specific modification or an artefact of in vitro cell culture conditions. Saponin treatment, which releases the content of the PV, revealed that in late trophozoite and schizont blood stage parasites, SERA proteases are secreted into the PV and are subsequently processed most likely by other proteases in the PV like SUB1. Interestingly, we observed many different SERA N-terminal fragments (for SERA1-3), which could be due to the non-synchronous growth of *P. berghei* in mice. Therefore we generated in vitro highly enriched synchronized schizont cultures and used them to prepare total cell lysates. These lysates were used for WB analysis (Fig. 2, mSch). As expected, processing was more pronounced for cysteine-type SERA3 and SERA4 when compared with lysates of mixed parasites. In contrast, processing of serine-type SERA1 and SERA2 was less pronounced, which clearly distinguishes serine-type SERAs from cysteine-type SERAs. However, in merozoite-filled detached hepatoma cells, one final processed fragment could be detected for each SERA. Full-length unprocessed SERA in extracts of liver schizonts (EE) are likely due to the mixed parasite population since in vitro exo-erythrocytic parasite growth is not synchronous. It is important to notice that in WB analysis each mAb/antiserum generates a specific staining pattern and thus confirms their specificity making them useful tools to study processing and localization of PbSERA proteases in liver stages.

### 3. Serine-type PbSERA1 localization depends on the developmental stage of the parasite

Western blot analysis of late blood stage and liver stage extracts suggested that processed PbSERA1 forms exist in the PV and in the parasite. To determine subcellular localization of full-length and processed PbSERA1 fragments in liver stage parasites, indirect immunofluorescence analysis (IFA) was performed. *P. berghei*-infected HepG2 cells were fixed at different timepoints post infection and stained using mAb/antisera directed

against epitopes of the N-terminal and the C-terminal domains (Fig. 3A-D) or the central (M) papain like protease domain of PbSERA1 (Fig. 3E-H). We reasoned that colocalization of PbSERA1-N with PbSERA1-C indicates an unprocessed SERA protein, whereas separated localization of PbSERA1-N and PbSERA1-C indicates processing. The PVM was visualized using an anti-Exp1 antiserum. In early liver schizonts, PbSERA1-C predominantly co-localized with the PVM (Fig. 3A), whereas PbSERA1-N (green, Fig. 3A) and PbSERA1-M (red, Fig. 3E) were found in the nuclei of the parasite. In late liver schizonts and cytomere stages, increasing amounts of PbSERA1-N (Fig. 3B,C,G,H) and PbSERA1-M (Fig.3G,H) were also found in the parasite cytoplasm, where they colocalize to some extent, most likely representing partially processed protein. PbSERA1-C, however, still localizes in the PV and PVM. Furthermore, in late schizont and cytomere stages anti-PbSERA1-N partly stained the PVM, but less pronounced than anti-PbSERA1-C. Together, localization of PbSERA1-M fragments to the nucleus (Fig. 3E-H) and localization of PbSERA1-C fragments to the PVM (Fig. 3A-D) could be observed in all liver developmental stages of the parasite, but in some liver developmental stages general parasite stain could also be seen. As mentioned before, processing of PbSERA1 seems to happen primarily at the C-terminus. Whereas the processed C-terminal fragment remains attached to the PVM, the PbSERA1-M/N domain is released into the parasite and partly localizes to the parasite nuclei (Fig. 3D, red).

### 4. Cysteine-type PbSERA3 is processed during schizont stage

In previous studies, we could show that processing of PbSERA3 can be blocked by treatment of *P. berghei* schizont-infected HepG2 cells 48hpi with the broad cysteine protease inhibitor E-64 (Schmidt-Christensen et al., 2008). To further characterize the timing of PbSERA3 processing and subcellular localization of full-length and processed fragments of PbSERA3 in liver stage parasites, indirect immunofluorescence analysis (IFA) was performed. *P. berghei* expressing SERA3 with a C-terminal TAP-tag were used to infect HepG2 cells. These cells were stained with both human IgG to detect the TAP-tagged C-terminus and with the antiserum directed against the N-terminus of PbSERA3 (Fig. 4). At 45hpi, PbSERA3-N and PbSERA3-TAP colocalized almost completely in the parasite and in close proximity to the PVM (Fig. 4A) suggesting that in schizont-stage-parasites SERA3 is localized as full-length precursor protein to the PVM. However, at the cytomere stage, when the parasite prepares for daughter cell formation, a clear

difference in distribution of PbSERA3-N and the TAP-tagged C-terminus was observed (Fig. 4B). Although some colocalization was still found in the parasite, the N-terminal fragment, but not the C-terminal fragment, was clearly more concentrated close to the PVM and in the PV, suggesting that processing had occurred. At later timepoints, SERA3 N- and C-terminal fragments are released into the host cell cytoplasm (Fig. 4C), while some SERA3 fragments remain associated to the PVM. SERA3 was found strongly expressed by liver-derived merozoites (Fig. 4C,D). Colocalization of PbSERA3-N and PbSERA3-TAP at defined areas suggests that the PbSERA3 precursor is newly synthesized prior to merozoite release and thus might be involved in the invasion process of blood cells (Fig. 4D, inset).

#### 5. *PbSERA2* and *PbSERA4* are also processed

Additional data were obtained concerning the processing state of SERA2 and SERA4 (Suppl.Fig. 3,4). Co-staining of infected HepG2 cells with anti-PbSERA2-N (red) and anti-PbSERA2-M (green) indicates that anti-PbSERA2-M primarily recognizes the processed protease domain of PbSERA2 in late schizonts (Suppl.Fig. 3). Prior merozoite release, PbSERA2-N and M are found in the host cell cytoplasm with remaining parts of PbSERA2-M associated to the PVM (Suppl.Fig. 3C). To examine processing of PbSERA4, infected HepG2 cells were stained either with the mouse mAb PbSERA4-N (Suppl.Fig.4A-C, green) or the mouse antiserum PbSERA4-M (Suppl.Fig. 4D-F, green) and co-stained with the rat antiserum PbSERA3-N (red) for comparison. The vast majority of PbSERA4-N colocalized at all stages with PbSERA3-N in the parasite cytoplasm, PV and PVM (Suppl.Fig. 4A-C), whereas PbSERA4-M was mostly distributed within the parasite cytoplasm (Suppl.Fig. 4D) and slightly colocalizing with PbSERA3-N in close association with the PVM at the cytomere and merozoite stage (Suppl.Fig. 4E,F).

#### 6. Serine-type and cysteine-type SERA protease domains differ in subcellular localization

Having confirmed processing of PbSERA proteases during the liver stage, the next goal was to compare the localization of the central papain-like protease domains of the different PbSERAs. We again employed IFA, using mouse or rat antisera directed against the central papain-like domain of each protease (Fig. 5). Importantly, both serine-type SERAs showed a localization pattern distinct from that of the cysteine-type SERAs. PbSERA3-M (Fig. 5C-E, I, green) is primarily found in the parasite cytoplasm and in the PV (Fig. 5D, green) and weakly associated to the PVM. Anti-PbSERA3-M also labeled individual merozoites in the final liver

stage (Fig. 5E,J, green). In contrast, SERA1-M localizes with a well-defined pattern to parasite nuclei in early stages (Fig. 5F, red) and is then evenly distributed between parasite nuclei and cytoplasm in later stages (Fig. 5G-J, red). SERA2-M was clearly associated with the PVM throughout liver stage development (Fig. 5A-E, red). Since both antisera against PbSERA3-M and PbSERA4-M were raised in mouse, direct colocalization studies were not possible. However, staining patterns could be compared indirectly by co-staining with a mouse antiserum against PbSERA3-M and PbSERA4-M (green) and with rat antisera PbSERA1-M and PbSERA2-M (red). Especially in schizont stages, distinct areas of colocalization (yellow) were found in the parasite cytoplasm (Fig. 5A,C), suggesting synchronized expression and localization.

#### 7. *PbSUB1* is expressed in liver stages and localizes to the PV

For *P. falciparum* blood stages it has been shown that, in a protease cascade, PfSERA proteases are processed by PfSUB1, which in turn, acts downstream of PfDPAP3 (Fig. 6A). The PfSUB1 precursor becomes activated and cleaved by PfDPAP to produce a 47 kDa protease domain (Sajid *et al.*, 2000). In late *P. berghei* liver stages, transcripts of both PbSUB1 and PfDPAP3 homolog PbDPAP3 (annotated as PB000888.02.0) and are found to be strongly upregulated (Suppl.Fig 5A). To characterize protein expression and localization in liver stages, antisera against PbDPAP3 and PbSUB1 were generated. WB analysis (Suppl.Fig. 5B,C) confirmed that PbSUB1 is processed in late blood stages. The 67 kDa full-length PbSUB1 is targeted to the PV and consequently processed to a 46 kDa C-terminal domain (P46) (Suppl.Fig. 5B). PbSUB1 protein could not be detected by western blotting in late liver schizonts or infected detached cells, probably because of the limited detection level of this method. However, immunofluorescence analysis of infected HepG2 cells revealed, that PbSUB1-C (Fig. 6B, green) localizes to the PV at the cytomere stage and is found in close association with the PVM. In the early cytomere stage, it partly colocalized with PbSERA3-N, whereas in later cytomere stages an almost complete colocalization was found. PbSUB1 is also expressed in merozoites. The precursor of PbDPAP3 migrated close to predicted molecular weight of 95 kDa (Suppl.Fig. 5C) and is found in similar localization patterns as observed for PbSUB1 (Fig. 6C).

## Discussion

In this report, we describe processing and differential subcellular localization of four putative PbSERA cysteine proteases during the liver stage of

the *P. berghei* parasite. Promotor analysis and detection of the endogenous proteins, revealed that PbSERA1-4 were strongly upregulated in late liver stages, suggesting that they might be involved in merozoite liberation and detachment of infected cells. Additionally, strong fluorescence was found in all *P. berghei* blood stages when GFP expression was under control of PbSERA1-4 promoters. In contrast PfSERA transcripts have not been detected in ring stages, but were seen to be strongly upregulated in *P. falciparum* blood schizonts (Miller *et al.*, 2002). Our promotor analysis indicated that expression of the PfSERA8 homolog PbSERA5, also known as ECP1, was restricted to oocysts and sporozoites, confirming earlier work (Aly *et al.*, 2005; Arisue *et al.*, 2007; Schmidt-Christensen *et al.*, 2008). Live imaging experiments suggested additional transcription of SERA1, SERA2 and SERA3 during oocyst stages. We previously reported mRNA expression of only SERA1 and SERA5 in oocysts by RT-PCR analysis (Schmidt-Christensen *et al.*, 2008). SERA1-4 protein could not be detected by WB. This suggests that SERA expression is partly regulated on a post-transcriptional level. This was also found for the blood stage of *P. falciparum*, where despite upregulation of PfSERA1-9 mRNA (most prominently SERA5), only protein of centrally located SERA genes (SERA4-6) was detected in parasites (Miller *et al.*, 2002). Another possibility why GFP expression was detected in oocysts of parasites transfected with PbSERA1-4 GFP promotor constructs, is that these constructs do not contain the 3' untranslated regions of the corresponding SERA gene but all contain the 3' end of the *Pbdhfr/ts* gene, which is known to be constitutively expressed. It has been suggested that heterogeneity of 5' and 3' ends may be a common feature of *Plasmodium* transcripts and involved in transcriptional control of SERAs (Fox *et al.*, 1994). We furthermore addressed processing of SERA proteases. Proteolytic processing of the PfSERA5 protein has been well characterized and it was shown that it could be blocked by inhibition of either DPAP3 or PfSUB1. DPAP3 inhibition reduced the levels of mature PfSUB1 and therefore acts upstream of PfSUB1. PfSUB1, in turn, regulates processing of downstream substrates, required for efficient release of parasites from host red blood cells (Yeoh *et al.*, 2008; Arastu-Kapur *et al.*, 2007). To characterize processing of SERA proteases in *P. berghei* liver stages, we have used antibodies raised against different domains of PbSERA1-4. Characterization of liver stage proteases has been limited by the low infection rates of HepG2 cells by *Plasmodium* sporozoites. However, FACS sorting of cells infected with GFP expressing-*P. berghei* parasites, allowed enrichment of cultures for infected cells (Schmidt-Christensen *et al.*, 2008). The most important finding from the WB analysis using

whole cell lysates of enriched parasite cultures was that all SERA1-4 proteins are expressed and become processed in late liver stages. Small amounts of unprocessed SERA observed in the mature liver schizont lysates were likely derived from parasites with a delayed or impaired development, which is a common feature of in vitro liver stage infections. Extensive processing studies of SERAs as shown for *P. falciparum* blood stages (Delplace *et al.*, 1987; Debrabant and Delplace *et al.*, 1989), cannot be performed for *P. berghei* liver stage parasites, since synchronization of parasite development in infected hepatoma cells is not yet possible. Despite difficulties in identifying the order of PbSERA processing, there is a tendency for initial C-terminal processing of the serine-type PbSERA1, whereas the cysteine-type PbSERA4 appears to be first N-terminally processed. Although synchronization during liver stage development is not possible, at the end of liver stage development infected cells detach and can be collected from a mixed culture and all contain mature merozoites. We found that PbSERAs were almost completely processed in detached cells, similar to in synchronized blood stage *P. berghei* schizont cultures. Antibodies directed against the central papain-like protease domains of SERAs recognize a final fragment of approx. 55 kDa. Notably, N- and C-terminal domains are not immediately degraded and therefore might have a yet unknown function. The most interesting finding from our localization studies is that the two serine-type SERAs PbSERA1 and PbSERA2, have distinct subcellular localization patterns compared to cysteine-type PbSERA3 and PbSERA4, indicating that SERAs might have different roles in liver stage parasites. However, recently it was shown that PbSERA1,2 and 4 genes can be knocked out without affecting the parasite (Kai Matuschewski and Elyzana Dewi Putrianti, personal communication) suggesting a certain redundancy of PbSERAs. Our own attempts to knock out PbSERA3 were not successful and thus we believe that it has an essential function during blood stage development.

The reason for gene duplication of SERA genes in the different *Plasmodium* species remains unclear but it can be speculated that it reflects an highly important function such as the suggested role in parasite egress. Another reason for gene duplication is an increased antigen variation but this is not very likely considering the localization of the SERAs. Knockout of the PbSERA5 gene demonstrated that the corresponding protein plays a crucial role in sporozoite liberation from oocysts. It is important to note that PbSERA5 is not expressed in the blood stage and thus gene depletion and selection during the blood stage was possible. In contrast, all other PbSERAs are expressed during the blood stage and knockout approaches are therefore problematic. If gene depletion does not cause an obvious phenotype

nothing can be concluded on the function of the corresponding protein. Still these experiments are valuable since they show clearly that these proteins are not suitable as targets for anti-malarial drugs due to their redundancy.

Another speculation about the function of PbSERAs is based on their individual subcellular localization. PbSERA1, which localizes predominantly in the nuclei of early and late liver stage parasites, might be involved in modulation of transcriptional control perhaps by processing transcription factors. The processed C-terminal domain of SERA1 is found closely associated with the PVM but the membrane association does not rely on any so far known membrane association protein motifs. It has already been reported that PfSERA5 binds specifically to phospholipids located in the inner leaflet of the RBC membrane (Perkins and Ziefer, 1994) and its likely that a similar association can be found in *P. berghei* SERAs.

PbSERA2 remains in close association with the PVM in early schizonts as does PbSUB1, indicating that PbSERA2 might be processed there and contribute to the PVM rupture and merozoite release. Our IFAs indicate that full-length PbSERA3 is localized to the PVM in early schizonts and processed later, with the N-terminus remaining associated with the PVM but releasing the processed central papain-like protease domain. However, some full-length PbSERA3 localized to merozoites similar to what has been shown for PfSERA5 (Perkins and Ziefer, 1994). Therefore it could be involved in both parasite egress and invasion processes. PbSERA4 appeared to predominantly have a localization similar to that of PbSERA3 during liver stage development, suggesting also a similar function.

Together, we provide first evidence that the protease cascade PbDPAD - PbSUB1 - PbSERA is functional in infected hepatocytes. PbSERA1-4 are fully processed in detached cells and probably contribute to merozoite liberation from the PVM and the formation of merosomes.

## Experimental procedures

### Experimental animals

Animals were from Charles River Laboratories. All animal work was conducted in accordance with European regulations and approved by local state authorities.

### SERA promotor analysis and pL0031-SERA 5'UTR plasmid design

DNA was amplified via Polymerase chain reaction (PCR) from mixed *P. berghei* blood stage parasite genomic DNA (gDNA) template using the Phusion Taq DNA polymerase High Fidelity enzyme (Finnzyme). Preparation of genomic DNA was

performed using the Blood DNA extract Kit (Machery Nagel). The *P. berghei* GFP transfection plasmid pL0031 for episomal transfection was obtained from MR4 (Andy Waters). The 5' flanking region and 5' untranslated region (5'UTR) of SERA1, SERA2, SERA3, SERA4 and SERA5 were obtained by amplification of *P. berghei* gDNA using the primer set: **SERA1**-5'UTR/for (5'-TATAGCGGCCGCGCATTATACTAATTCTACAGAGG-3') and SERA1-5'UTR/rev (5'-CATGCCATGGTTTTACAAGTATAATATTTAACTGG-3'), **SERA2**-5'UTR/for (5'-GCTCTAGATGATTTAAGAAATGCTTATGAAATTTATGATA-3') and SERA2-5'UTR/rev (5'-CATGCCATGGTGTGTTATATAAAATAAAAAATAAATATAGTTATTTATATATTTTCC-3'), **SERA3**-5'UTR/for (5'-GCTCTAGATTTAACAATAAACTTTGCAAAATAGTGAAT-3') and SERA3-5'UTR/rev (5'-CATGCCATGGTTTTTCTTTATATTTTCATTAAC-3'), **SERA4**-5'UTR/for (5'-TCCCGCGGTGGGAACGCTGTAAAAATCA-3') and SERA4-5'UTR/rev (5'-CATGCCATGGTTTGTACAATAATTTTAATCTTGAACATTTTACTTCA-3'), **SERA5**-5'UTR/for (5'-CGTCTAGACGGCTTGTTTAGTAATTTATAACT-3') and SERA5-5'UTR/rev (5'-TATCCATGGCTTCCGTTATTTTTAAAAGTTTGTC-3'). XbaI/NotI/SacII and NcoI sites were introduced at the end of forward and reverse primers, respectively (restriction enzyme sites are underlined). The resulting fragments were cloned into the XbaI/NotI/SacII and NcoI cloning sites of pL0031. *P. berghei* blood stage parasites were transfected with 5 µg of purified circular plasmid DNA (Machery and Nagel Kit PC100) as previously described (Janse *et al.*, 2006). For live imaging of parasites, mosquito midguts infected with mutant *P. berghei*, salivary glands, infected HepG2 cells seeded in glass bottom dishes or a drop of transgene *P. berghei* infected blood were stained with cell permeable Hoechst 33342 (1:2000) and examined by inverse fluorescence microscopy.

### In vitro infection of HepG2 cells

Human hepatoma cells (HepG2) were obtained from the European cell culture collection. Cells were cultivated at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> in EMEM (Gibco) containing 10 % fetal calf serum, 1 % L-Glutamine, 1 % Penicillin/Streptomycin and 1 % MEM Non-essential amino acids (all PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). The cells were passaged by trypsinisation every 4-6 days and for infection 5x10<sup>4</sup>-5x10<sup>5</sup> cells were seeded per coverslip. *P. berghei* WT (ANKA) or transgenic sporozoites were prepared from dissected salivary glands of infected *Anopheles stephensi* mosquitoes and incubated with HepG2 cells for 2 hours. After washing, the infected cultures were incubated at 37 °C for indicated times.

### SDS-PAGE and Western Blot Analysis

Parasite proteins obtained from FACS-sorted enriched adherent liver stages, floating cells/merosomes or Nycodenz enriched blood stage schizont preparation or *P. berghei* GFP-con (Franke-Fayard *et al.*, 2004) infected mosquito midguts (day11 post bloodmeal) were separated on 10% SDS-PAGE reducing gels and transferred to 0.2µm nitrocellulose membranes. Membranes were probed with rat or mouse antisera (1: 4000) or monoclonal antibodies (Hybridoma supernatant) or human gamma-globulins (1µg/ml, anti-TAP, Sigma). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rat, anti-mouse or anti-human IgG (1: 20.000, Pierce) were used for detection, and bands were visualized by enhanced chemiluminescence Pico or Femto Detection Kit (Pierce).

### Antibodies

*Expression and purification of recombinant GST or MBP fusion proteins.* RT-PCR was used to prepare cDNA encoding N-terminal, central (M)- or C-terminal regions of PbSERA1, PbSERA2, PbSERA3, PbSERA4, Pb000888.02.0 or Pbsubtilisin-1 (Table 1). BamHI/EcoRI sites and XhoI/BamHI/PstI/NotI sites were introduced at the end of forward and reverse primers, respectively (restriction enzyme sites are underlined). The resulting PCR products were ligated into the appropriate pGEX6P-1 (Amersham, Buckinghamshire, England) or pMal- crI (NEB, Frankfurt, Germany) vectors and expressed in *Escherichia coli* BL21 cells (Stratagene) as glutathione *S*-transferase (GST) or maltose binding protein (MBP) fusion proteins, where the GST/MBP tag always fused to the N-terminus of the expressed protein. GST/MBP fusion proteins were harvested by suspending bacteria in 5 ml buffer A (10 mM EDTA in PBS) for GST purification or buffer B (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) for MBP purification in the presence of Complete™ protease inhibitor mixture tablets (Roche Molecular Biochemicals) for 30 min followed by sonification. GST fusion proteins were purified from the supernatant using glutathione-agarose as described by the manufacturer (Amersham Biosciences). Amylose-agarose was used for isolation of MBP fusion proteins (NEB). The purified protein was used to immunize mice (Balb/c or NMRI, female, 6 weeks old) or rats (Lewis, female, 3 months old) along with complete Freund adjuvant, followed by multiple boosting immunizations.

*Hybridoma production.* A rat was repeatedly immunized i.m. with 20 µg of purified PbSERA1-C-GST fusion protein plus complete/incomplete Freund adjuvant. For mouse immunization, 20 µg of purified PbSERA4-N-GST fusion protein plus complete/incomplete Freund adjuvant was

repeatedly injected intraperitoneally. Prior to fusion, blood samples were taken to test serum reactivity against the SERA1-C and SERA4-N protein. 3 days prior fusion, the final boost was given with recombinant protein diluted in PBS. B cells were isolated from lymph nodes (rat) or the spleen (mouse) and fused to the mouse myeloma cell line P3X63.Ag8.653. The positive pools of hybridoma cells reacting with SERA1-C/SERA4-N were screened by indirect ELISA. Single-cell clones were isolated by limited dilution. Clone C65 (SERA1C) was characterized further and found to bind an epitope (D<sup>892</sup>-EPASISTQ-E<sup>901</sup>) at the C-terminus close to the SUB1 recognition site.

### Specificity testing of antisera directed against the central domain of SERA by WB analysis

For MBP-SERA2-M (i) and GST-SERA3-M (ii) additional PCR products were amplified from cDNA using the primer sets: (i) PbSERA2M<sub>for</sub> (#164), PbSERA2M-MBP<sub>rev</sub> (#913, 5'-AACTGCAGTATGGATAATTGGATTGAGTTG-3') and (ii) PbSERA3M-GST<sub>for</sub> (#386, 5'-TTGGATCCTGGTTATTTGCATCTAAGTTACATTT-3'), PbSERA3M-GST<sub>rev</sub> (#358, 5'-CCGCTCGAGAATTGAATCACTATCTGGCTCCAT-3') and cloned into the appropriate vector. MBP- and GST fusionproteins were expressed and purified as described above. The MBP-tag was cleaved of the MBP-fusion protein by digestion with Factor Xa.

### Factor Xa digestion:

30µg recombinant MBP-fusion protein was dialyzed overnight in buffer A (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, pH8.0) at 4°C and treated with 0.8µg Factor Xa enzyme (NEB) overnight at room temperature.

### FACS sorting of exoerythrocytic GFP-expressing *P. berghei* parasites

5x10<sup>5</sup> HepG2 cells were seeded 24 h prior to infection in 24-well plates. GFP-expressing *P. berghei* sporozoites from 2-3 infected mosquitoes were used to infect each of ten wells. 15 hours post infection, cells were detached by Accutase (PAA) diluted 1:1 in PBS for 10 minutes, pooled in 2 ml media and subsequently FACS sorted. Sorted infected cells were seeded in 24-well plates, incubated at 37 °C for another 46 hours and used for Western blot analysis as described above.

### Immunofluorescence microscopy

For analysis of PbSERA localization in late liver stages, infected HepG2 cells were fixed with 4% formaldehyd, permeabilized with ice-cold methanol and incubated with primary antibodies (1:400 in

Primer sets	protein	Tag	species
#179 SERA1-N <sub>for</sub> : (5'-GTGTGAATTCAAATCGGCCATGTTAAGGAA-3') #180 SERA1-N <sub>rev</sub> : (5'-TGTGGCGGCCGCTTCCGTGTAAGAAACAATCG-3')	Lys <sup>200</sup> - Gly <sup>366</sup>	GST	mouse
#388 SERA1-M <sub>for</sub> : (5'-TTCGGATCCTATTGCAATGATGAATATTGTGACAG-3') #373 SERA1-M <sub>rev</sub> : (5'-AACTGCAGTCAGTAAAAATCAGGAGATATTTTTGAA-3')	Tyr <sup>586</sup> - Tyr <sup>869</sup>	MBP	rat
#241 SERA1-C <sub>for</sub> : 5'-GTGTGAATTCCTTAGATGCAGCCGACACAAG-3' #242 SERA1-C <sub>rev</sub> : 5'-CTGGGATCCTACTCCATTTTCGAGCACAA-3'	Leu <sup>877</sup> - Ser <sup>1122</sup>	GST	rat mAb (C65)
#171 SERA2-N <sub>for</sub> : 5'-TGAATTCGGTTCCCTTTCACCACAACCTC-3' #175 SERA2-N <sub>rev</sub> : 5'-TGTGGCGGCCGCTCACATTTGTTCTGTTCTGGA-3'	Ser <sup>146</sup> - Cys <sup>327</sup>	GST	mouse
#164 SERA2-M <sub>for</sub> : 5'-TGAATTCAAACATGTAGAACAATGGGTTGC-3' #166 SERA2-M <sub>rev</sub> : 5'-TGTGGCGGCCGCTATGGATAATTGGATTCAGTTGG-3'	Lys <sup>546</sup> - Pro <sup>714</sup>	GST	rat
#262 SERA3-N <sub>for</sub> : 5'-GTGGATCCATGGCACGTCTCTCATCAAT-3' #263 SERA3-N <sub>rev</sub> : 5'-GTCTCGAGATGTGGTGAAAATTGAACTCTGAA-3'	Met <sup>1</sup> - Pro <sup>235</sup>	GST	rat
#342 SERA3-M <sub>for</sub> : 5'-CGGGATCCAAAGTAACTGCTCAAAGTGATGAAGA-3' #358 SERA3-M <sub>rev</sub> : 5'-AACTGCAGAAATTGAATCACTATCTGGCTCCAT-3'	Trp <sup>620</sup> - Ser <sup>875</sup>	MBP	mouse
#243 SERA4-N <sub>for</sub> : 5'-TTGAATTCACGAAATTAATACGCAAACCT-3' #244 SERA4-N <sub>rev</sub> : 5'-GAATCGCGCCGCTCATTAGTGTGTGTTCCATT-3'	His <sup>20</sup> - Asn <sup>188</sup>	GST	mouse mAb (38C8)
#129 SERA4-M <sub>for</sub> : 5'-TGTGGATCCTTACAGCAAATGCAAAGAA-3' #130 SERA4-M <sub>rev</sub> : 5'-TGTCTCGAGCATGAGCATCTAATGTGCCACT-3'	Phe <sup>216</sup> - His <sup>365</sup>	GST	mouse
#941 Subt-C <sub>for</sub> : 5'-CGGGATCCCAGGAGATCCATGGGATGAT-3' #908 Subt-C <sub>rev</sub> : 5'-CGCTCGAGACCACCCCATGCAATTTTATT-3'	Gly <sup>334</sup> - Gly <sup>565</sup>	GST	mouse
#172 DPAP3-N <sub>for</sub> (888N <sub>1</sub> ): 5'-TGAATTCATTGCTTGAGTAGGCATGTGG-3' #176 DPAP3-N <sub>rev</sub> (888N <sub>1</sub> ): 5'-TGTGGCGGCCGCTCATCAACCATGCTATTA CGTG-3'	Cys <sup>23</sup> - Asp <sup>208</sup>	GST	mouse

Table 1: Primer sets for the amplifications of the different PbSERA regions expressed as fusion proteins in bacteria and used for immunization of mice and rats (species) are presented. The amino acid position of the respective PbSERA proteases and the fusion partner for subsequent purification (MBP or GST) are indicated.

10% FCS diluted in PBS) or human gamma-globulin (10µg/ml) or a chicken anti-ExpI antibody. Bound antibodies were detected using anti-human Alexa Fluor 594-, anti-mouse- Alexa-488, anti-rat Alexa Fluor 594/488- or anti-chicken Cy5-conjugated secondary antibody (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Nuclei of the cells were visualised with a 10µg/ml aqueous solution of DAPI (Sigma-Aldrich, Germany). Immunofluorescence-labeled cells were examined by confocal microscopy using the Olympus FV1000 (SIM-scanner and spectral detection).

## References

- Aly AS, Matuschewski K (2005): A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium* sporozoite egress from oocysts. *J Exp Med* **202**:225–230.
- Aoki S, Li J, Itagaki S, Okech BA, Egwang TG, Matsuoka H, Palacpac NM, Mitamura T, Horii T (2002): Serine repeat antigen (SERA5) is predominantly expressed among the SERA multigene family of *Plasmodium falciparum*, and the acquired antibody titers correlate with serum inhibition of the parasite growth. *J Biol Chem* **277**:47533–47540.
- Arastu-Kapur S, Ponder EL, Fonovic UP, Yeoh S, Yuan F, Fonovic M, Grainger M, Phillips C, Powers J and Bogyo M (2007): A chemical genetic screen identifies proteases that regulate erythrocyte rupture by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Chem Biol* **4**(3):203-13.
- Arisue, N, Hirai M, Arai M, Matsuoka H, and Horii T (2007): Phylogeny and evolution of the SERA multigene family in the genus *Plasmodium*. *J Mol Evol* **65**: 82–91.
- Bourgon R, Delorenzi M, Sargeant T, Hodder AN, Crabb BS, Speed TP (2004): The serine repeat antigen (SERA) gene family phylogeny in *Plasmodium*: the impact of GC content and reconciliation of gene and species trees. *Mol Biol Evol* **21**:2161–2171.
- Bzik DJ, Li WB, Horii T, Inselburg J (1988): Amino acid sequence of the serine-repeat antigen (SERA) of *Plasmodium falciparum* determined from cloned cDNA. *Mol Biochem Parasitol* **30**:279–288.
- Carlton JM, Angiuoli SV, Suh BB (2002): Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*

*yoelii*. *Nature* **419**:512–519.

**Delplace P, Fortier B, Tronchin G, Dubremetz JF, Vernes A** (1987): Localization, biosynthesis, processing and isolation of a major 126 kDa antigen of the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **23**:193–201.

**Debrabant A, and Delplace P** (1989): Leupeptin alters the proteolytic processing of P126, the major parasitophorous vacuole antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **33**: 151–158.

**Debrabant A, Maes P, Delplace P, Dubremetz JF, Tartar A, and Camus D** (1992): Intramolecular mapping of *Plasmodium falciparum* P126 proteolytic fragments by N-terminal amino acid sequencing. *Mol Biochem Parasitol* **53**: 89–95.

**Delplace P, Dubremetz JF, Fortier B, and Vernes A** (1985): A 50 kilodalton exoantigen specific to the merozoite release-reinvasion stage of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **17**: 239–251.

**Delplace P, Fortier B, Tronchin G, Dubremetz JF, and Vernes A** (1987): Localization, biosynthesis, processing and isolation of a major 126 kDa antigen of the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **23**: 193–201.

**Delplace P, Bhatia A, Cagnard M, Camus D, Colombet G, Debrabant A** (1988): Protein p126: a parasitophorous vacuole antigen associated with the release of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Biol Cell* **64**: 215–221.

**Fox BA, Bzik DJ** (1994): Analysis of stage-specific transcripts of the *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen (SERA) gene and transcription from the SERA locus. *Mol Biochem Parasitol* **68**:133–144.

**Fox BA, Pang XL, Suzue K, Horii T, Bzik DJ** (1997): *Plasmodium falciparum*: an epitope within a highly conserved region of the 47-kDa amino-terminal domain of the serine repeat antigen is a target of parasite-inhibitory antibodies. *Exp Parasitol* **85**:121–134.

**Franke-Fayard B, Trueman H, Ramesar J, Mendoza J, van der Keur M, van der Linden R, Sinden RE, Waters AP and Janse CJ** (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.

**Gor DO, Li AC, Rosenthal PJ** (1998): Protective immune responses against protease-like antigens of the murine malaria parasite *Plasmodium vinckei*. *Vaccine* **16**(11–12): 1193–202.

**Hodder AN, Drew DR, Epa VC, Delorenzi M, Bourgon R, Miller SK, Moritz RL, Frecklington DF, Simpson RJ, Speed TP, Pike RN, Crabb BS** (2003): Enzymic, phylogenetic, and structural characterization of the unusual papain-like protease

domain of *Plasmodium falciparum* SERA5. *J Biol Chem* **278**:48169–48177.

**Kiefer MC, Crawford KA, Boley LJ, Landsberg KE, Gibson HL, Kaslow DC, Barr PJ** (1996): Identification and cloning of a locus of serine repeat antigen (sera)-related genes from *Plasmodium vivax*. *Mol Biochem Parasitol* **78**:55–65.

**Kooij TW, Carlton JM, Bidwell SL, Hall N, Ramesar J, Janse CJ, Waters AP** (2005): A *Plasmodium* whole-genome synteny map: indels and synteny breakpoints as foci for species-specific genes. *PLoS Pathog* **1**:e44.

**Li J, Matsuoka H, Mitamura T, Horii T** (2002): Characterization of proteases involved in the processing of *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen (SERA). *Mol Biochem Parasitol* **120**:177–186.

**Miller SK, Good RT, Drew DR, Delorenzi M, Sanders PR, Hodder AN, Speed TP, Cowman AF, de Koning-Ward TF, Crabb BS** (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.

**Perkins ME and Ziefer A** (1994): Preferential binding of *Plasmodium falciparum* SERA and rhoptry proteins to erythrocyte membrane inner leaflet phospholipids. *Inf Immunity* **62** (4): 1207–1212

**Schmidt-Christensen A, Sturm A, Horstmann S, Heussler VT** (2008): Expression and processing of *Plasmodium berghei* SERA3 during liver stages. *Cell Microbiol* **10**(8): 1723–1734.

**Sajid M, Withers-Martinez C and Blackman MJ** (2000): Maturation and specificity of *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease-1, a malaria merozoite subtilisin-like serine protease. *J Biol Chem* **275**(1): 631–41.

**Salmon BL, Oksman A, and Goldberg DE** (2001): Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 271–276.

**Sturm A and Heussler V** (2007): Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic *Plasmodium* parasites. *Med Microbiol Immunol* **196**: 127–133.  
**Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A** (2006): Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* **313**: 1287–1290.

**Wickham ME, Culvenor JG and Cowman AF** (2003): Selective inhibition of a two-step egress of malaria parasites from the host erythrocyte. *J Biol Chem* **278**: 37658–37663.

**Yeoh S, O'Donnell R, Koussis K, Dluzewski A, Ansell K, Osborne S** (2007): Subcellular discharge of serine protease mediates release of invasive

malaria parasites from host erythrocytes. *Cell* **131**: 1072–1083.

### Figure Legends

#### Figure 1:

Stage-specific SERA expression and upregulation of SERA1–4 expression in late liver stage parasites. (A) transgenic *P. berghei* parasites, expressing either one of the SERA1, SERA2, SERA3, SERA4 or SERA5 promoter-GFP-reporter constructs, were monitored by live microscopy throughout the lifecycle of the parasite. Midgut-oocysts (oo), salivary gland sporozoites (sp), HepG2 cells infected with transgenic parasites at indicated timepoints (EE) and erythrocytic stage (ES) parasites were additionally stained with Hoechst 33342. (B) SERA protein expression in early and late liver stage parasites. HepG2 cells were infected with either *P. berghei* WT (for PbSERA1,2 and 4 staining) or *P. berghei* PbSERA3-TAP expressing parasites, which express an additional TAP-tagged PbSERA3 protein under control of the endogenous promoter. Parasites were stained with either anti-PbSERA1-C mAb, anti-PbSERA2-M antisera, anti-TAP (human gammaglobulins) or anti-PbSERA4-N mAb and cytoplasmic marker anti-HSP90 (18hpi) or PVM marker anti-ExpI (24–56hpi).

**Figure 2:** Western blot analysis of PbSERA recombinant proteins using PbSERA polyclonal antisera. Recombinant PbSERA proteins (1µg) spanning the central papain-like protease domain (M) were separated on a 10% polyacrylamide gel under reducing conditions and stained with Coomassie (top panel). Tags of the MBP-fusion proteins (lane1,2) were cleaved off. The MBP-tag (grey arrow) and resulting proteins (black arrow) are indicated. GST fusion proteins were insoluble and thus were purified by Prep-Cell purification (lane 3, 4) GST-tags could therefore not be cleaved off. Recombinant protein (30ng protein) were subjected to SDS-PAGE and subsequently transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were probed individually with rat or mouse anti-PbSERA1–4-M polyclonal antisera. The antibody used to probe each membrane is indicated at the left. As expected, antisera directed against PbSERA1-M(MBP) and PbSERA3-M(MBP) recognize additional to their own recombinant protein (black, white arrow) the MBP protein (grey arrow). Both antisera show a cross-reaction with a protein (star) that is readily stained with coomassie and most likely contains a MBP cleavage product. Antisera directed against PbSERA2-M(GST) and PbSERA4-M(GST) detect specifically their own proteins. With longer exposing times signals can also be detected from other GST-fusion proteins, most likely due to detection of the GST-tag and

not other SERA proteins, since equal amounts of recombinant protein were used.

#### Figure 3:

Processing of PbSERA proteases in liver and blood stages. Western Blot analysis of *P. berghei* extracts using antisera or mAb against different parts of PbSERA1 (A), PbSERA2 (B), PbSERA3 (C) or PbSERA4 (D). Schematic illustration of each SERA protease shows generated antisera and mAb directed against N-terminal (N), central (M) or C-terminal (C) regions indicated as black bars (antibody species in brackets) and predicted processing sites (S1, S2, S3) for PbSERA1–4 by the *P. berghei* SUB1 protease. FACS-sorted HepG2 cells containing 61h exoerythrocytic schizonts (EE), non-infected HepG2 cells (co) or detached cells/merosomes (dc/m) were used to gain whole-cell SDS lysates of liver stage parasites. Saponin and NP40 extracts of enriched late trophozoite and schizont (T/Sch) blood stage parasites were compared to whole-cell SDS lysates of purified mature blood schizonts (mSch).

#### Figure 4:

Localization of PbSERA1 in early and late liver stages. *P. berghei* infected HepG2 cells were fixed at different timepoints (45–58h) post infection and analyzed on single cell level using IFA. Developmental stages are indicated (right). Localization of the N-terminal, central and C-terminal domain was visualized by co-staining of mouse anti-PbSERA1-N (green) antiserum and rat anti-PbSERA1-C mAb (red) (A–D) or mouse anti-PbSERA1-N and rat anti-PbSERA1-M antiserum (red) (E–H). The PVM is stained with chicken anti-ExpI (cyan) and DNA is labeled with DAPI (blue). Images obtained with anti-PbSERA1-N and anti-PbSERA1-C or PbSERA1-M were merged. Yellow colour indicates colocalization. Additional merging with images obtained with DAPI/PVM staining clarifies co-localization with parasitic compartments. Scale bar: 5µm.

#### Figure 5:

Localization and processing of TAP-tagged SERA3 in liver stages. HepG2 cells infected with *P. berghei* PbSERA3-TAP were fixed at different timepoints (45–58h) post infection and stained with anti-PbSERA3-N antisera (green), anti-TAP (human gamma-globulins, red), anti-ExpI (PVM, cyan) and DAPI (blue). Parasites were analyzed by confocal fluorescence microscopy. For easier interpretation, only images obtained with anti-PbSERA3-N and anti-TAP were merged. Yellow colour indicates colocalization. Scale bar (white): 5µm, scale bar (grey): 1µm.



**Figure 6:**

Cysteine-type and serine-type SERA protease domains are localized in different subcellular compartments of the parasite. HepG2 cells were infected with *P. berghei* parasites and fixed at different timepoints (45-58hpi) post infection. Developmental stages are indicated (right). Rat antibodies directed against central (M) domain of serine-type SERA2 (A,B) or SERA1 (C,D, red) were co-stained with mouse antibodies recognizing the central domain of cysteine-type SERA4 (A,C) or SERA3 (B, D, green). PVM is visualized anti-ExpI (cyan), DNA is labeled with DAPI (blue). Green and red images were merged to visualize colocalization (yellow) of SERAs and merged with images obtained from DAPI/PVM staining to clarify subcellular localization within the parasite. Scale bar: 5µm.

**Figure 7:**

Localization of PbSUB1 and PbDPAP3 in late liver stages. (A) Protease cascade of DPAP3 processing SUB1, which in turn processes SERA. Mouse antibodies directed against PbSUB1 (green) (A) or PbDPAP3 (Pb000888.02.0) (B) were co-stained with rat antibodies recognizing the N-terminal domain of cysteine-type PbSERA3. Developmental stages are indicated (right). PVM is visualized anti-ExpI (cyan), DNA is labeled with DAPI (blue). Green and red images were merged to visualize colocalization (yellow) of PbSUB1 or PbDPAP3 with SERA3 and merged with images obtained from DAPI/PVM staining to clarify subcellular localization within the parasite. Scale bar: 5µm.

**Supplementary Figure 1:**

PbSERA1-4 protein analysis in oocysts. Western Blot analysis of midgut-oocysts (oo), uninfected midguts as negative control (co) and blood schizont lysates as positive control (ES) using specific anti-PbSERA1-C mAb, anti-PbSERA2-M, anti-PbSERA3-N and anti-PbSERA4-M antisera. Antisera directed against the oocyst-specific TRAP antigen, was used as loading control.

**Supplementary Figure 2:**

Characterization of mAb C65. The monoclonal antibody C65 binds within a region (C1) of the S2 SUB1 recognition site. For further characterization C1, C1/1, C1/2 and C1M GST fusion proteins were applied used for western blot analysis using the monoclonal antibody C65. Epitope regions are indicated as black bars. The blot was stripped and reprobed with anti-GST to ensure that comparable amounts of protein were loaded.

**Supplementary Figure 3:**

PbSERA2 localization in *P. berghei* infected HepG2 cells. Infected HepG2 cells were fixed 48-58hpi and stained with rat anti-PbSERA2-M (green), mouse anti-PbSERA3-N (red), anti-ExpI (cyan) to stain the PVM and the DNA dye DAPI (blue). Developmental parasitic stages are indicated: schizont (upper panel), late schizont (middle panel) and developing merozoites (lower panel). For easier interpretation, images obtained with anti-PbSERA2-N and PbSERA2-M were merged individually. Yellow colour indicates co-localization. Additional merges with images gained with DAPI and anti-ExpI are shown for orientation within the parasite. Scale bar: 5µm.

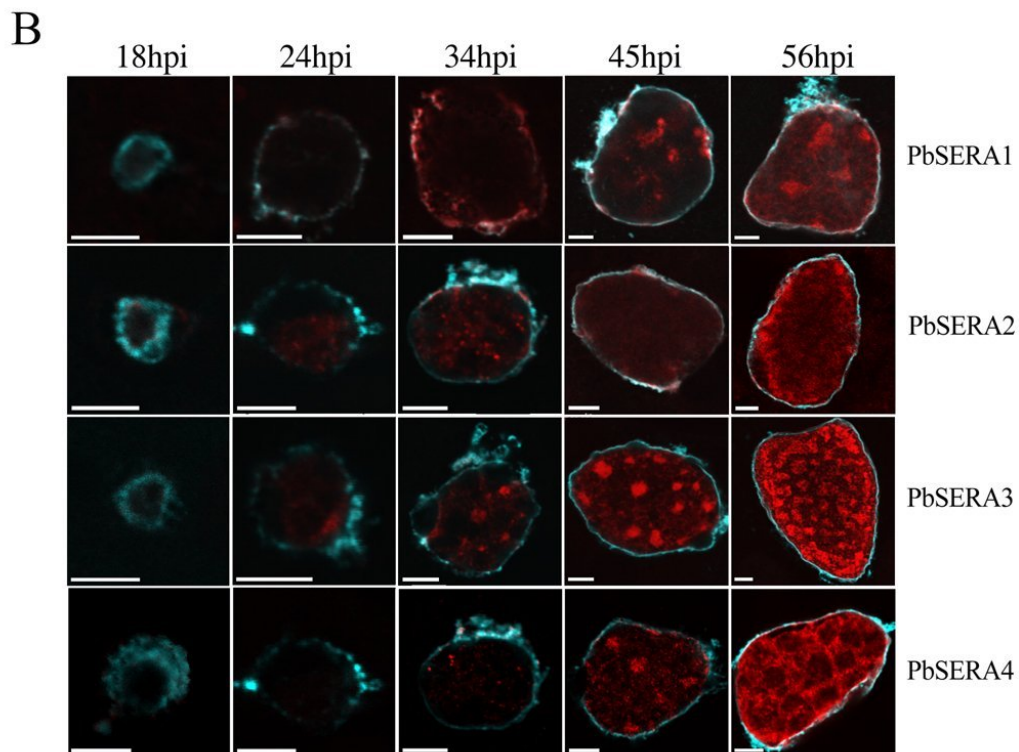
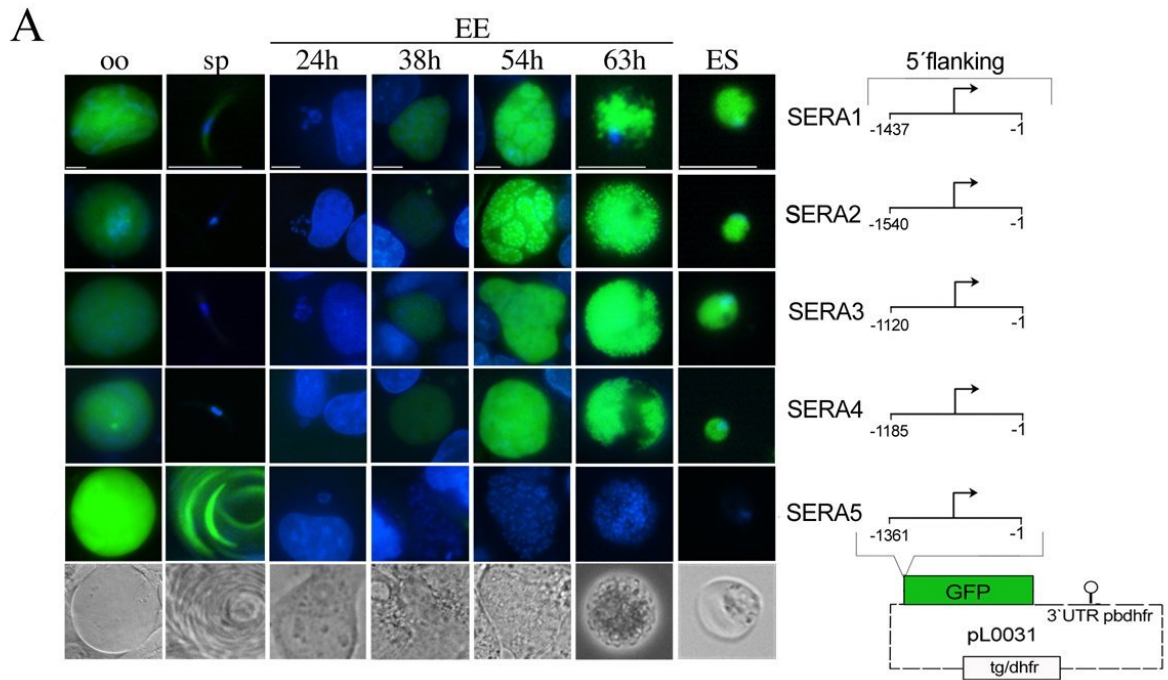
**Supplementary Figure 4:**

PbSERA4 localization in *P. berghei* infected HepG2 cells. Infected HepG2 cells were fixed 48-58hpi and stained with rat anti-PbSERA3-N (red) in comparison to (A) mouse anti-PbSERA4-N (green) or (B) mouse anti-PbSERA4-M (green), anti-ExpI (cyan) to stain the PVM and the DNA dye DAPI (blue). Note, since both PbSERA4 antisera are made in mice direct co-staining is excluded. Developmental parasitic stages are indicated comparable in (A) and (B): schizont (upper panel), cytomere (middle panel) and partly cytomere/developing merozoites (lower panel). For easier interpretation, images obtained with anti-PbSERA3-N and PbSERA4-N/PbSERA4-M were merged individually. Yellow colour indicates co-localization. Additional merges with images gained with DAPI and anti-ExpI are shown for orientation within the parasite. Scale bar: 5µm.

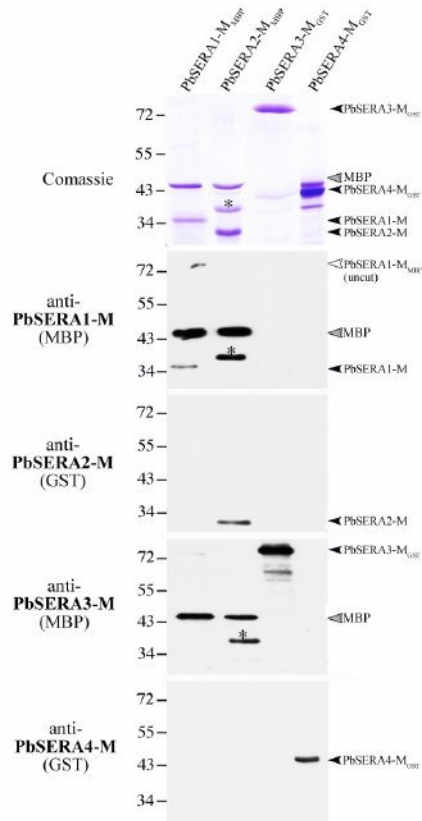
**Supplementary Figure 5:**

Expression and Processing of PbSUB1 and PbDPAP3 proteases. (A) mRNA expression of PbSUB1 (Pb001288.02.0) and PbDPAP3 (Pb000888.02.0) is upregulated in *P. berghei* late liver stages. Total RNA was isolated from two mosquito stages (oocysts and salivary gland sporozoites) and from parasite stages of the vertebrate host (late liver schizont stages and blood stages) and subjected to RT-PCR analysis. For preparation of late liver schizonts, HepG2 cells were infected with *P. berghei* sporozoites and mRNA of these infected cells was prepared at 38, 48, 50 and 63 hours post infection. As a control, tubulin mRNA was additionally amplified. Western Blot analysis of *P. berghei* extracts using antisera against the C-terminal domain of PbSUB1 (B) or the N-terminal domain of PbDPAP3 (C). Schematic illustration of each protease shows generated antisera indicated as black bars and (A) the predicted processing site for the *P. berghei* DPAP3 protease. For description of individual lanes see Figure legend 2.

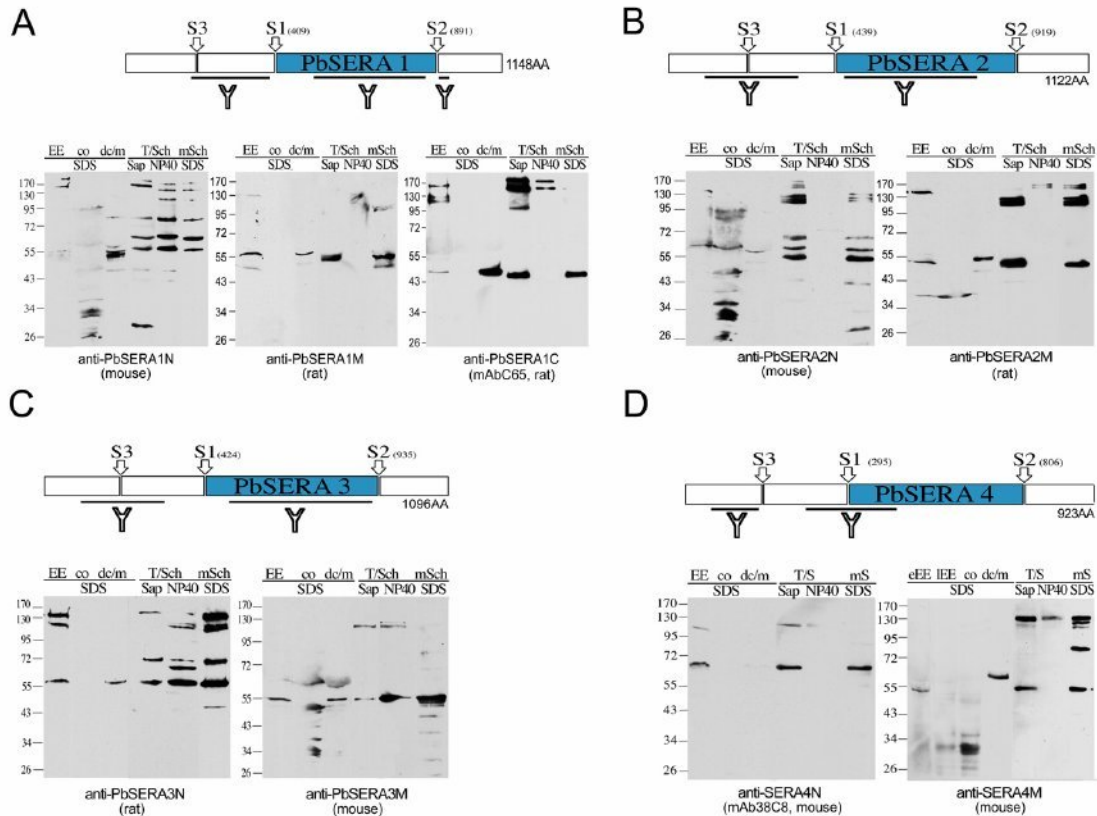
Schmidt-Christensen et al., Figure 1



Schmidt-Christensen et al., Figure 2

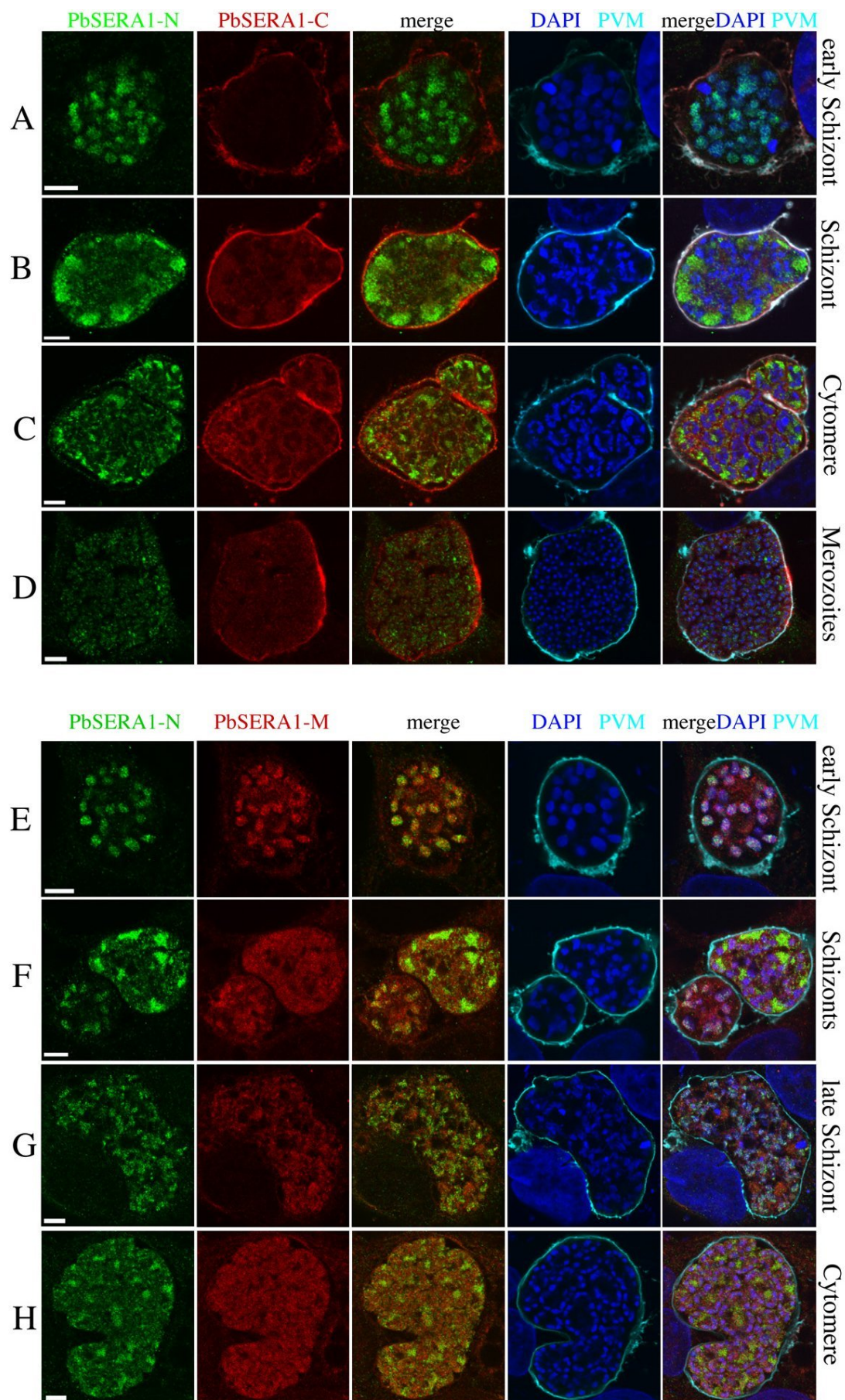


Schmidt-Christensen et al, Figure 3

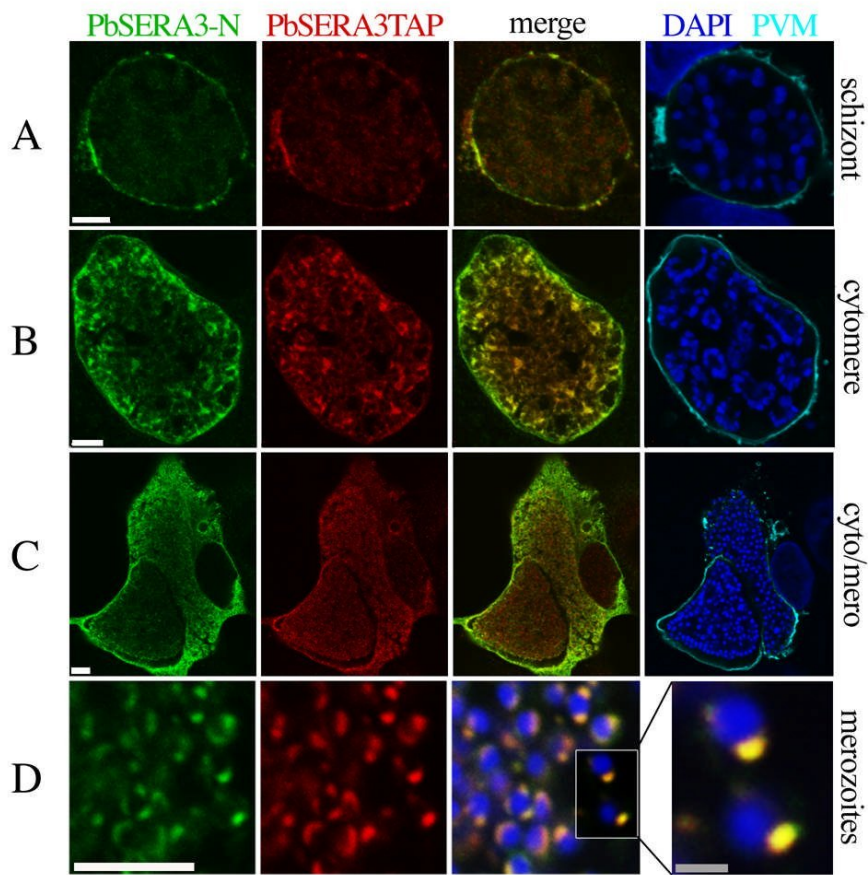




Schmidt-Christensen et al., Figure 4

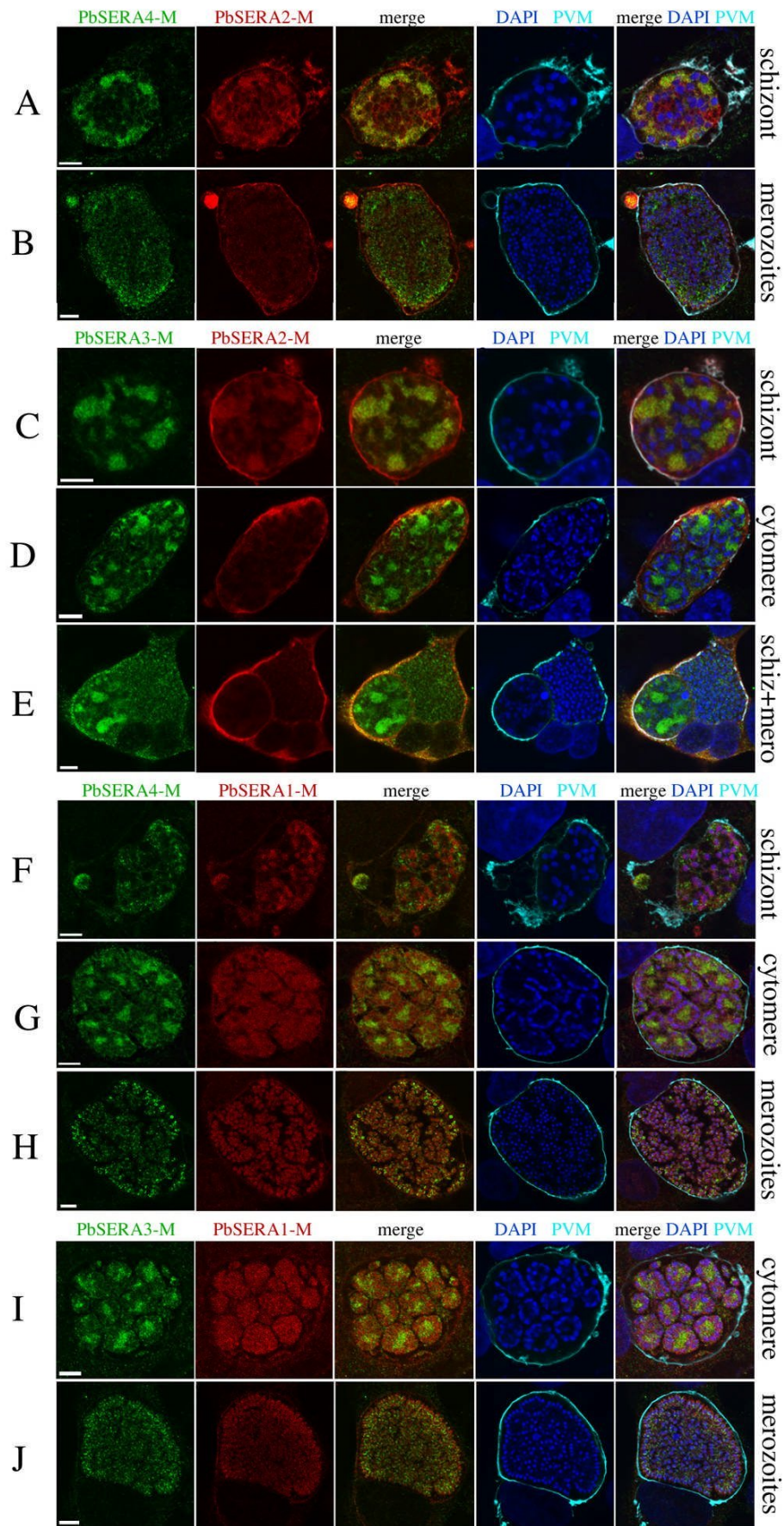


Schmidt-Christensen et al., Figure 5

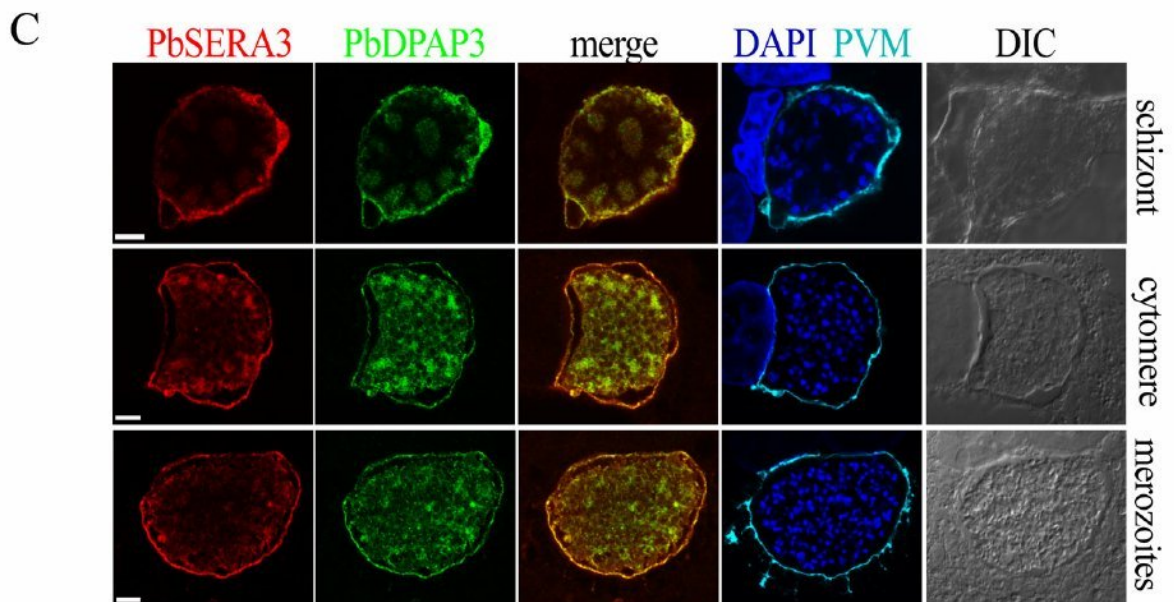
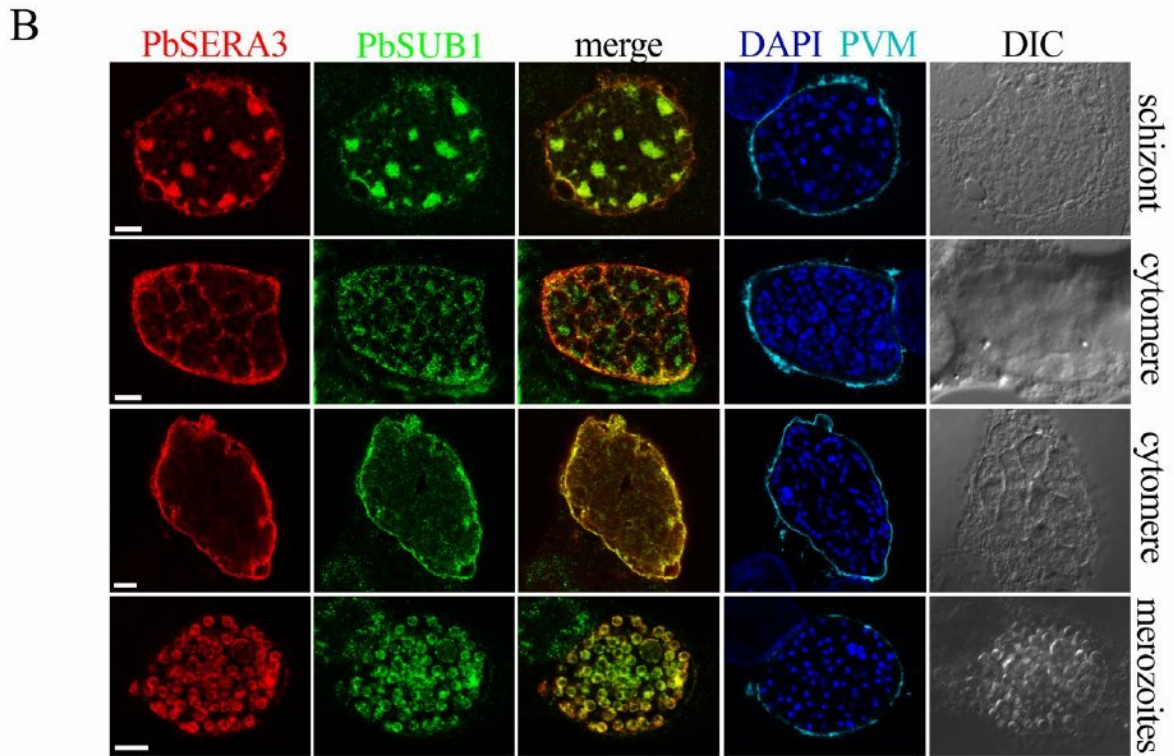
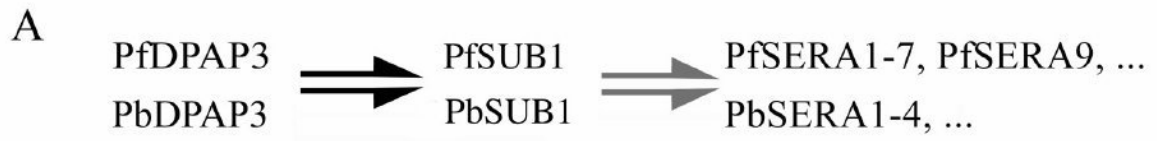




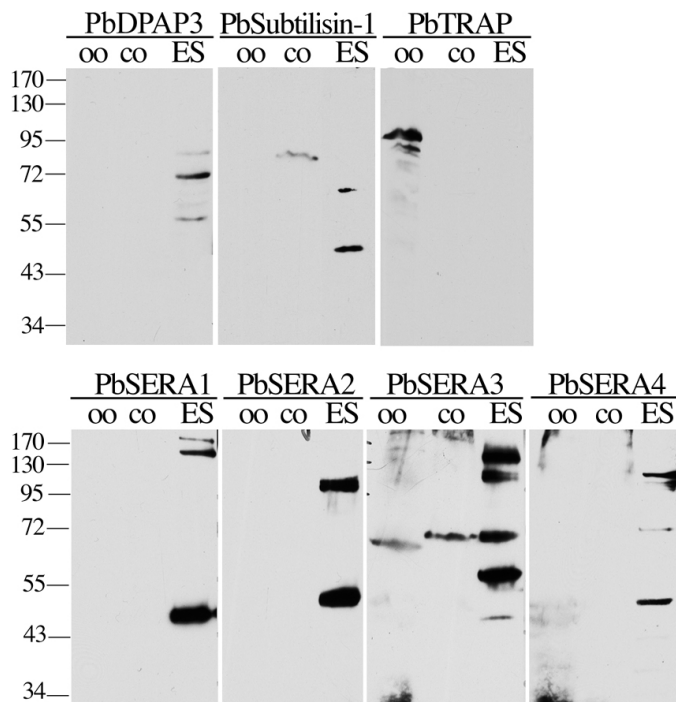
Schmidt-Christensen et al., Figure 6



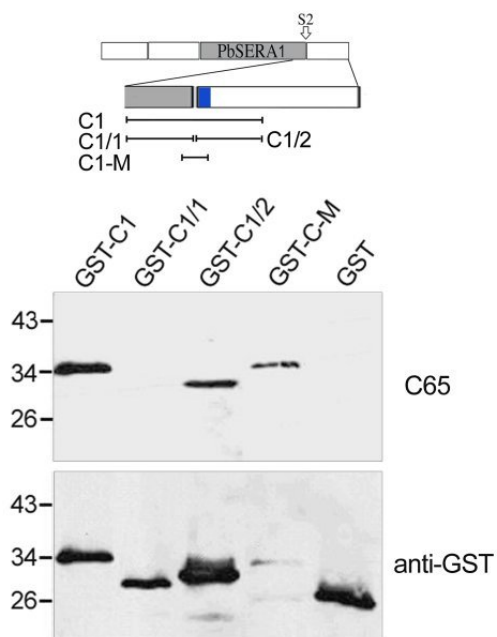
Schmidt-Christensen et al., Figure 7



Schmidt-Christensen et al., Supplementary Figure 1

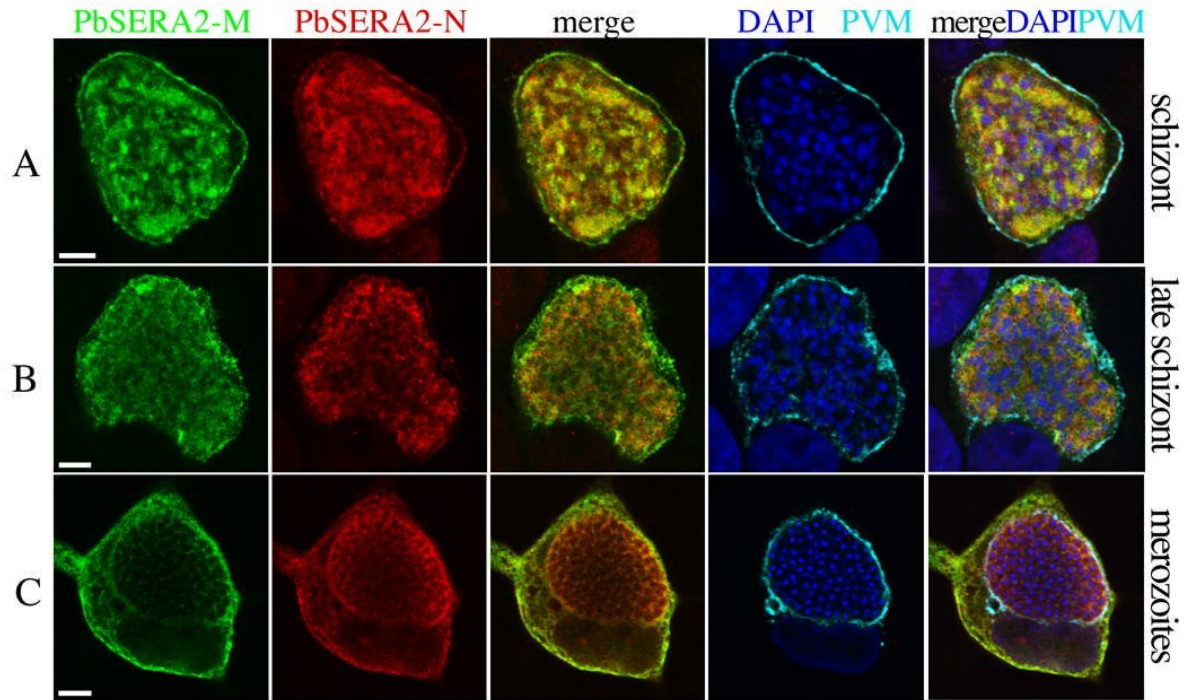


Schmidt-Christensen et al., Supplementary Figure 2

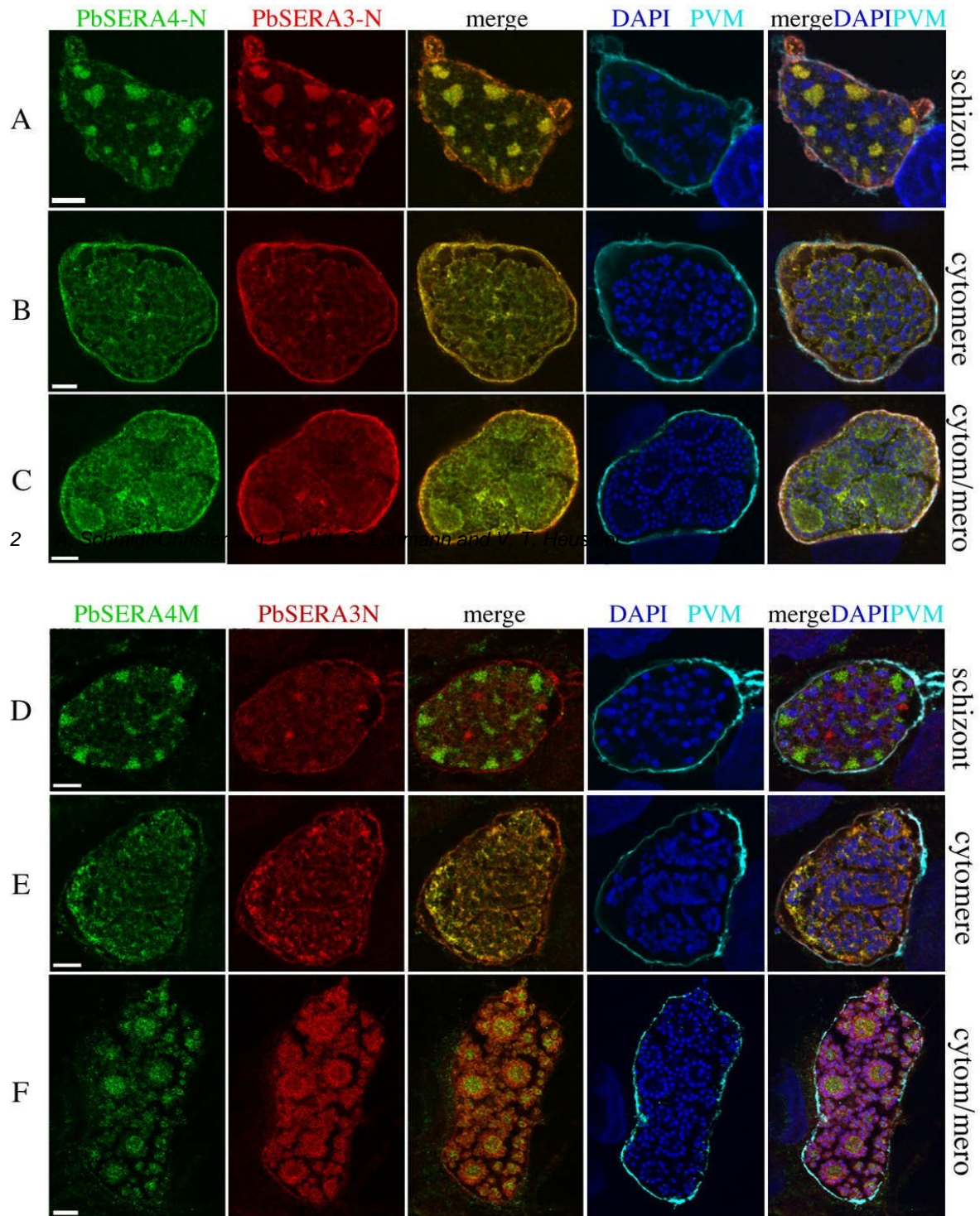




Schmidt-Christensen et al., Supplementary Figure 3

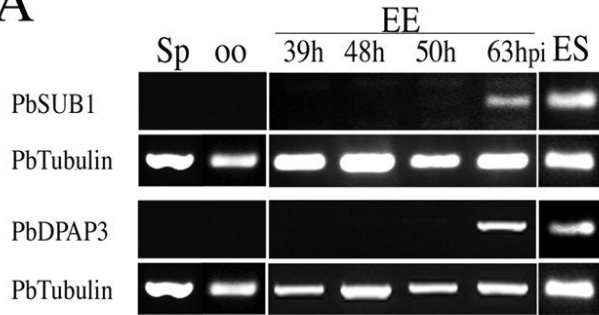


Schmidt-Christensen et al., Supplementary Figure 4

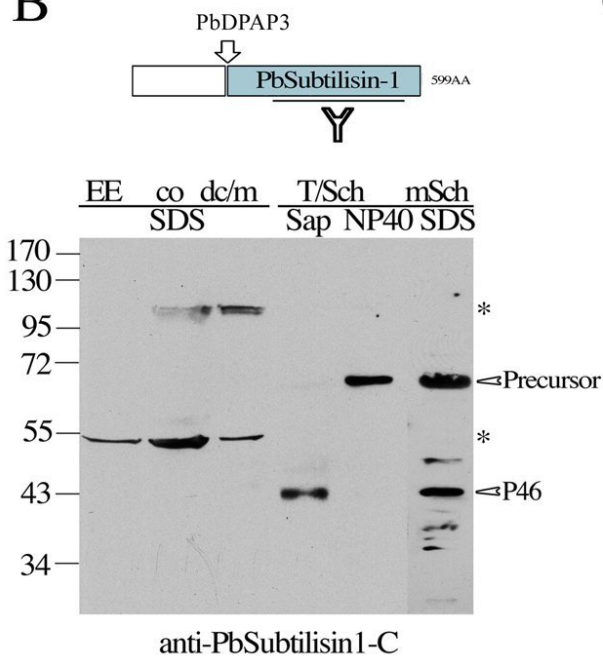


Schmidt-Christensen et al., Supplementary Figure 5

A



B



C

