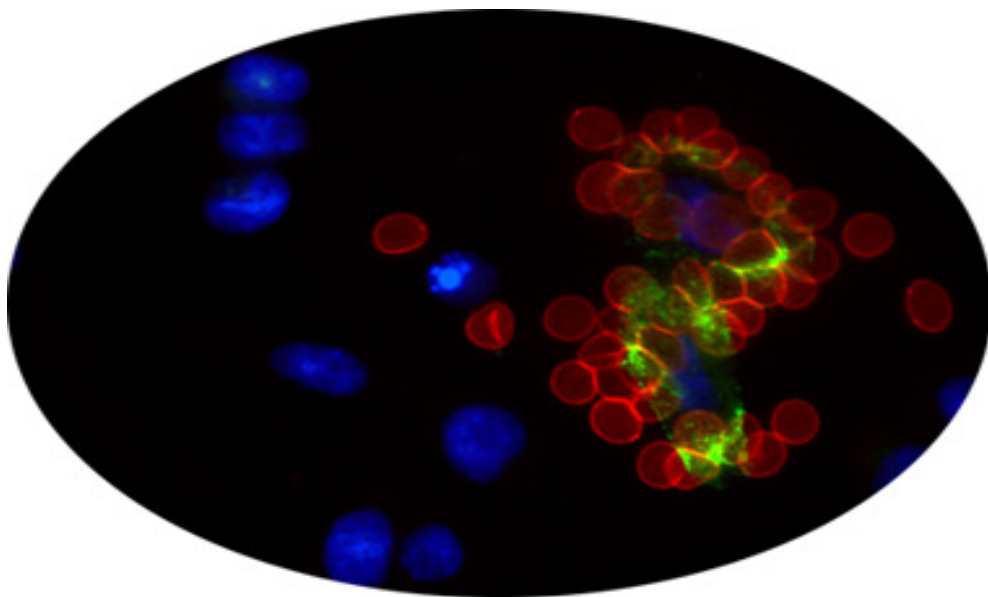


**Transport und Funktion adhäsiver Proteine des
Malariaerregers *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897)**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
am Department Biologie
der MIN Fakultät Hamburg



Vorgelegt von
Moritz Treeck
aus Hamburg

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. E. TANNICH
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Priv.-Doz. Dr. D. WARNECKE
Tag der Disputation: 30. Januar 2009

Hamburg, den 16. Januar 2009



Jörg Ganzhorn

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	7
2. Stand der Forschung	9
2.1 <i>Malaria</i>	9
2.1.1 Pathologie	10
2.1.2 Medikamente, Vektorbekämpfung und Vakzine	11
2.2 <i>Biologie des Parasiten</i>	13
2.2.1 Systematik	13
2.2.2 Morphologie und Entwicklung	14
2.2.3 Das Blutstadium	15
2.3 <i>Der Merozoit und seine Organellen</i>	17
2.3.1 Rhoptrien	18
2.3.2 Mikronemen	18
2.4 <i>Der Invasionsvorgang in Erythrozyten</i>	19
2.4.1 Mikronemenproteine und Invasion	20
2.4.2 Rhoptrienproteine und Invasion	23
2.5 <i>Proteintransport in Plasmodium falciparum</i>	24
3. Zielsetzung	25
4. Forschungsbericht	26
4.1 <i>Untersuchungen zum Proteintransport der EBL- Familie in Plasmodium falciparum</i>	26
4.1.1 Einleitung	26
4.1.2 Ergebnisse	27
4.1.3 Diskussion	34
4.2 <i>Funktionelle Untersuchung des Malaria Impfstoffkandidaten AMA-1 (Apical Membrane Antigen-1)</i>	37
4.2.1 Einleitung	37
4.2.2 Ergebnisse	39
4.2.3 Diskussion	52
5. Literatur	55
6. Anhang	62
6.1 <i>Publikationen</i>	62
6.2 <i>Anteile des Autors an den Publikationen</i>	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	14
Abbildung 2: Die erythrozytäre Lebensphase des Malariaparasiten <i>Plasmodium falciparum</i>	16
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Merozoiten	17
Abbildung 4: Der Invasionsvorgang in Erythrozyten	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Invasion auf molekularer Ebene	21
Abbildung 6: Posttranslationale Prozessierungen von AMA-1	22
Abbildung 7: Schematische Struktur von EBL-Proteinen	26
Abbildung 8: Deletion der 3'-Enden von <i>eba-140</i> , <i>eba-181</i> und <i>eba-175</i>	28
Abbildung 9: Kolokalisation der Deletionsmutanten EBA-140, EBA-181 und EBA-175 mit Mikronemenmarkern in Schizonten und Merozoiten	29
Abbildung 10: Domänenstruktur von EBA-175 und der EBA-175 Minigene	30
Abbildung 11: Lokalisation von EBA-175 GFP in unfixierten Parasiten	31
Abbildung 12: Kolokalisation der EBA-175 GFP Fusionsproteine	32
Abbildung 13: Einfluss der zeitlichen Expression auf die Lokalisation von Mikronemenproteinen	33
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Inhibition der Invasion mit Hilfe des 3D7 spezifischen Peptids R1 und Komplementation durch AMA-1 aus W2mef	38
Abbildung 15: Expression und Lokalisation von AMA-1 _{3D7} -GFP und AMA-1 _{W2mef} -GFP transgenen Parasiten	40
Abbildung 16: Mikroskopische Zeitreihe eines aufplatzenden Schizontens	41
Abbildung 17: Dynamische Veränderungen der AMA-1 Lokalisation nach Freisetzung der Merozoiten	42
Abbildung 18: FLIP Analyse von AMA-1 _{W2mef} -GFP nach der Merozoiten-Freisetzung: Apikales AMA-1 zeigt eingeschränkte Mobilität	43
Abbildung 19: FRAP Analyse von AMA-1 _{W2mef} -GFP nach der Merozoiten Freisetzung: Peripheres AMA-1 zeigt hohe Mobilität	44
Abbildung 20: Inhibition und Komplementation von AMA-1 während der Invasion	46
Abbildung 21: Expression von AMA-1 _{Δtail} -GFP und Kolokalisierung mit endogenem AMA-1	47
Abbildung 22: Funktionelle Analyse bestimmter Aminosäuren der zytoplasmatischen Domäne von AMA-1	49
Abbildung 23: Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von AMA-1	51

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha/ anti
AS, aa	Aminosäure/ aminoacid
Abb.	Abbildung
AMA-1	Apical Membrane Antigen 1
AP	Adapter Protein
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-
CDPK	Calcium Dependent Protein Kinase
CISM	Manhica Health Research Centre
CPD	Cytoplasmic Domain (zytoplasmatische Domäne)
crt	Cloroquine Resistance Transporter
CSP	Circumsporozoite Protein
DAPI	4'6-Diamino-2-phenylindol
DBL	Duffy Binding Like
Δ	delta
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBA	Erythrocyte Binding Antigen
EBL	Erythrocyte Binding Ligand
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FLIP	Fluorescence Loss In Photobleaching
GAP	Glidosome Associated Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRASP	Golgi Reassembly Stacking Protein
GSK	GlaxoSmithKline
h	Stunde
hDHFR	humane Dehydrofolatreduktase
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HT	Host Targeting Signal
IFA	Immunofluoreszenz Assay
IMC	Inner Membrane Complex
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K.O.	Knock Out
μ	Mikro
μm	Mikrometer
min	Minute
MSP	Merzoite Surface Protein
MTIP	MyoA Tail Interacting Protein
MTRAP	Merozoite TRAP

MVI	Malaria Vaccine Initiative
MyoA	Myosin A
n	nano
N-	Amino-
NIH	National Institute of Health
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PEXEL	<i>Plasmodium</i> Export Element
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PKA	Protein Kinase A
PTRAMP	<i>Plasmodium</i> Thrombospondin Related Apical Merozoite Protein
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
RAMA	Rhoptry Associated Membrane Antigen
RAP	Rhoptry Associated Protein
Rh	Reticulocyte Binding Protein Homologues
RNAi	RNA Interference
ROI	Region Of Interest
ROM	Rhomboid Protease
RON	Rhoptry Neck Protein
s.	siehe
s	Sekunde
spp.	Spezies
SP	Signalpeptid
SUB	Subtilisin-Like Protease
TGN	Trans-Golgi Network
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TM	Transmembrandomäne
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAP	Thrombospondin Related Adhesion Protein
TSP	Thrombospondin
TVN	Tubovesikuläres Netzwerk
u.a.	unter anderem
WHO	World Health Organization
WT	Wildtype
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

Malaria ist eine oft tödlich verlaufende Erkrankung, die durch einen Einzeller der Gattung *Plasmodium* hervorgerufen wird. Die Pathologie im Menschen wird hauptsächlich durch die intrazelluläre Lebensweise des Erregers in den roten Blutkörperchen, den Erythrozyten, hervorgerufen. Die invasive Form des Parasiten, der Merozoit, invadiert den Erythrozyten und bildet bis zu 32 Tochterzellen. Diese werden durch Ruptur der Wirtszelle entlassen und können neue Erythrozyten invadieren. Im apikalen Bereich der Merozoiten befinden sich sekretorische Organellen (Rhoptrien und Mikronemen), die während der Invasion Proteine auf die Merozoitenoberfläche oder in den interzellulären Spalt zwischen Erreger und Wirtszelle sekretieren. Wie diese, für die Invasion wichtigen Proteine, in die sekretorischen Organellen transportiert werden ist nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte erforscht werden, welchen Einfluss die zytoplasmatischen Domänen von ausgesuchten Typ I Transmembranproteinen der Mikronemen auf den zielgerichteten Transport in die Organellen und für die Invasion von Erythrozyten hat.

Durch Deletionen des kodierenden Bereiches der zytoplasmatischen Domänen einiger Mikronemenproteine konnte festgestellt werden, dass weder die Proteine der „Erythrocyte Binding Antigen“ Familie (EBA-175, EBA-140, EBA-181), noch das „Apical Membrane Antigen-1“ (AMA-1) von zytoplasmatischen Sequenzmotiven zielgerichtet in die Mikronemen dirigiert werden. Vielmehr konnte anhand von EBA-175 gezeigt werden, dass der Transport über eine konservierte, Cystein-reiche, luminaire Domäne vermittelt wird. Dies wurde durch die Verwendung von episomal exprimierten Minigenen ermittelt, die unterschiedliche Domänenkombinationen von EBA-175 als GFP-Fusionsprotein im Parasiten exprimieren. Zusätzlich konnte mit verschiedenen Promotoren gezeigt werden, dass eine zeitlich korrekte Expression der Mikronemenproteine innerhalb der asexuellen Blutphase eine Voraussetzung für den korrekten Transport darstellt.

Das für die Invasion essentielle AMA-1 wurde als GFP-Fusionsprotein in Parasiten exprimiert, um dessen Lokalisation, Dynamik und Funktion im Invasionsprozess zu analysieren. AMA-1 wird kurz vor der Invasion auf die Oberfläche von Merozoiten verteilt, wobei eine apikale Konzentration beobachtet werden kann. Wie diese beiden Populationen physisch und funktionell im Zusammenhang stehen ist nicht bekannt. Mit Hilfe von FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching) und FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) Analysen konnten zwei AMA-1 Populationen auf der Oberfläche der Merozoiten unterschieden werden: i) Eine periphere, mobile Fraktion, die an der

Reorientierung des Merozoiten beteiligt sein könnte und ii) eine apikale, weniger mobile Fraktion, die an der Bildung einer intimen Zell-Zellverbindung (moving junction) beteiligt sein könnte. Durch ein synthetisches Peptid, welches spezifisch an eine hydrophobe Tasche in der AMA-1 Ektodomäne bestimmter Parasiten-Isolate wie 3D7 (nicht aber an W2mef) bindet und die Reinvasion von 3D7-Parasiten in Erythrozyten spezifisch inhibiert, konnte durch Lebendvideomikroskopie die Inhibition der Invasion in Echtzeit dargestellt werden. Dabei zeigte sich, dass die Blockierung der hydrophoben Tasche von AMA-1 nicht die initiale Bindung oder Reorientierung an den Erythrozyten beeinflusst, aber das aktive Eindringen in die Wirtszelle verhindert, was auf eine Funktion bei der „moving junction“ Ausbildung kurz vor der Invasion hindeutet.

Auf dieser Basis wurde ein Komplementationsassay etabliert, bei dem in 3D7-Parasiten episomal W2mef-AMA-1 exprimiert wurde. Das ermöglichte erstmals die funktionelle Analyse von AMA-1 auf molekularer Basis, da episomal exprimiertes W2mef-AMA-1 die Funktion von endogenem 3D7-AMA-1 komplementieren kann. Dies konnte in Reinvasionsassays quantifiziert werden. Durch die Einführung von gezielten Mutationen in die zytoplasmatische Domäne des episomalen W2mef-AMA-1 konnten direkt die Auswirkungen der Mutationen an der Komplementationsfähigkeit gemessen werden. So führte die Deletion sowie die Substitution verschiedener konservierter Aminosäuren inklusive 6 putativer Phosphorylierungsstellen in der zytoplasmatischen Domäne zur kompletten, funktionellen Inaktivierung von AMA-1, obwohl der Transport in die Mikronemen nicht beeinträchtigt war. Die Phosphorylierung des essentiellen AMA-1 Proteins könnte sich als eine Achillesferse des Parasiten herausstellen. Die Identifikation und Charakterisierung der verantwortlichen Kinase(n) eröffnet damit die Möglichkeit einer neuen, innovativen Strategie zur Bekämpfung der Malaria.

2. Stand der Forschung

2.1 Malaria

Malaria ist, neben HIV und Tuberkulose, mit 1-3 Millionen Todesopfern und bis zu 500 Millionen Erkrankungen jährlich die verbreitetste Tropenkrankheit (Snow et al., 2005). In den 30-er Jahren entwickelte Medikamente (synthetische Quininderivate wie z.B. Chloroquine), der Einsatz von Insektiziden wie DDT (1,1-Bis[4-chlorphenyl]-2,2,2-trichlorethan) und andere Vektorkontrollmaßnahmen versprachen eine schnelle Ausrottung der Malaria. Die schnelle Resistenzentwicklung der Parasiten und der Zusammenbruch einer flächendeckenden Vektorkontrolle haben diese Hoffnungen zunichte gemacht.

Innerhalb der Gattung *Plasmodium*, die ca. 170 Spezies umfasst, deren Zwischenwirte von Säugern wie Mäusen und Affen, über Vögel bis hin zu Reptilien reichen, gibt es fünf humanpathogene Erreger (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*). Überträger sind Mücken der Gattung *Anopheles*. Das Endemiegebiet der Malaria umfasst weite Teile Afrikas, Südamerikas, Asiens und Ozeaniens, wobei die tödlichste Spezies, *Plasmodium falciparum*, hauptsächlich in Afrika, Haiti und Papua Neuguinea zu finden ist. Mit über 90% der Todesfälle ist Afrika am schwersten betroffen (Snow et al., 2005). Malaria hat durch seine hohe Todesrate, vor allem bei Kindern unter 5 Jahren, eine stark negative Auswirkung auf die sozio-ökonomische Entwicklung der betroffenen Länder, die ohnehin zu den ärmsten der Welt gehören (Sachs and Malaney, 2002; Teklehaimanot and Mejjia, 2008). Es gibt zahlreiche Medikamente gegen Malaria die auch prophylaktisch verwendet werden, jedoch erlauben die schnelle Resistenzentwicklung des Parasiten, die hohen Kosten und die Erfordernisse einer guten Infrastruktur keine weitreichende Medikation. Die Medikamente werden daher primär für Touristen oder Geschäftsreisende verwendet, die sich nicht dauerhaft in Risikogebieten aufhalten. Neben den Anstrengungen, neue und kostengünstige Medikamente herzustellen, konzentriert sich die Forschergemeinschaft heute zu einem großen Teil auf die Impfstoffentwicklung.

2.1.1 Pathologie

Die Symptome einer Malariainfektion sind hohe, periodische Fieberschübe mit Schüttelfrost und Krämpfen, Blutsepsis und eine Veränderung des Blutbildes. Die lebensgefährlichen Symptome der Malaria werden durch die erythrozytäre Lebensphase hervorgerufen. Durch das Aufplatzen von infizierten Erythrozyten kommt es zu einer ausgeprägten Immunantwort. Diese wird durch den starken Anstieg von freigesetzten Immunmodulatoren und Zytotoxinen (z. B. freies Glycosylphosphatidylinositol (GPIs)) ausgelöst. Die Zytotoxine und Zytokine sind u.a. für die Entwicklung von Fieber und einer Absenkung des Blutzuckerspiegels (Hypoglykämie) verantwortlich. Die Zytokinwirkung kann zusätzlich zur Hypoglykämie zu einer metabolischen Übersäuerung des Körpers (Laktatazidose) führen. Eine erhöhte Parasitämie kann schließlich eine starke Anämie bewirken. Diese wird durch die entwicklungsbedingte Lyse von Erythrozyten, vermehrten Abbau in der Milz und Hemmung der Erythropoese durch Zytokinfreisetzung hervorgerufen.

Die besonders letale *Malaria tropica* wird durch *P. falciparum* ausgelöst. Die Infektion von Erythrozyten durch diese Spezies bewirkt die Expression von adhäsiven Parasiten-Proteinen auf der Wirtszelloberfläche, die zu einer Adhäsion an das Endothel führen. Sequestrierung von infizierten Erythrozyten an den Kapillaren kann zu einem Blutstau führen, was besonders in Blutbahnen, die das Gehirn mit Sauerstoff versorgen zu schweren Symptomen führt (Koma). Diese sogenannte zerebrale Malaria ist eine der Haupttodesursachen der *Malaria tropica*. Es kann auch in anderen Organen zur Sequestrierung kommen, die eine lokal erhöhte Ausschüttung von Entzündungsfaktoren bewirkt. Die damit zusammenhängende Organunterversorgung kann insbesondere bei Kindern fatale Auswirkungen haben (Miller et al., 2002).

Die Schwere einer Malariaerkrankung wird sowohl von der genetischen Ausstattung des Parasiten und des Wirts als auch von Wirt-Parasit-Interaktionen beeinflusst. Die Virulenz des Erregers ist hierbei unter anderem abhängig von der Zytoadhärenz, der Vermehrungsrate, Medikamentenresistenz, dem Expressionsprofil und der Sequenz seiner polymorphen Antigene. Der Wirt beeinflusst den Krankheitsverlauf durch sein Alter, Schwangerschaft, genetische Eigenschaften (Sichelzellanämie, Thalassämie), Immunitätsstatus, sowie durch vorhandene Koinfektionen mit z.B. HIV (Abu-Raddad et al., 2006; Van Geertruyden and D'Alessandro, 2007).

2.1.2 Medikamente, Vektorbekämpfung und Vakzine

Bereits im 17. Jahrhundert wurde ein Pflanzenextrakt zur Behandlung von Malaria verwendet. Es wurde aus der Rinde des Chinarindenbaumes (*Chinchona officinalis*) gewonnen, der ursprünglich aus Peru stammt und durch Jesuiten im Zuge der Kolonialisierung von Südamerika nach Europa eingeführt wurde. Noch heute ist Chinin, der Wirkstoff in der „Chinarinde“, das wichtigste Therapeutikum bei einer schweren Malariaerkrankung. Das Alkaloid Chinin konnte im Jahr 1820 erstmals isoliert werden und gelangte 1943 als synthetisches Derivat (Chloroquin) auf den Markt. Chloroquin war gut verträglich und in der Herstellung kostengünstig. Der massenhafte und oftmals unkontrollierte Einsatz dieses Medikamentes im Koreakrieg führte zu einer schnellen Resistenzentwicklung des Parasiten. Schon 1957 wurden resistente Stämme in Südostasien entdeckt (Payne, 1987). Obwohl mittlerweile eine Anzahl von Malariamedikamenten aus unterschiedlichen Substanzklassen (z.B. Antifolate wie Pyremethamin, Antibiotika wie Sulfadoxin, Chinin-Derivate wie Mefloquin) zur Verfügung stehen und als Kombinationspräparate eingesetzt werden, sind gegen alle bisher verwendeten Medikamente resistente und multiresistente Parasiten beschrieben worden (Uhlemann and Krishna, 2005; Wongsrichanalai and Meshnick, 2008). Damit ist die Entwicklung neuer Wirkstoffe dringende Notwendigkeit (Butler, 2002). Neuerdings wird sehr erfolgreich Artemisinin, ein Pflanzenextrakt, in Kombinationspräparaten eingesetzt und wird von der WHO (World Health Organization) als erstes Mittel der Wahl gegen die Malaria angegeben (World Malaria Report 2008). Allerdings ist bisher die Verfügbarkeit begrenzt und es wird mit Nachdruck an industriellen Methoden zur Gewinnung des Wirkstoffes gearbeitet.

Eine weitere Möglichkeit der Malariabekämpfung liegt in der Kontrolle und Vernichtung der *Anopheles*-Mücke als Überträger. Das seit den 40-er Jahren verwendete Insektizid DDT stellte sich bei der Vektorbekämpfung als äußerst erfolgreich dar. In den USA, Europa, Indien, Sri Lanka, Südamerika und Asien wurde DDT in großen Mengen eingesetzt, mit unterschiedlichem Erfolg: Die USA gelten seit 1949 als malariafrei und auch in Europa konnte die Krankheit nahezu vollständig und dauerhaft zurückgedrängt werden (Mandavilli, 2006a; Mandavilli, 2006b). Im Gegensatz dazu waren die Erfolge in den am schwersten betroffenen Gebieten der Tropen und Subtropen nicht von dauerhafter Wirkung. Politische Instabilität, schlechte Infrastruktur und die vergleichsweise hohe Übertragungsrate im Vergleich mit den Industriestaaten, sowie das weltweite Verbot der DDT Anwendung wegen Umweltunverträglichkeit (1972) waren wichtige Faktoren bei diesen Misserfolgen. Des Weiteren kam es durch die inkonsequente Vektorbekämpfung zu Resistenzentwicklungen der

Mücken, was den Einsatz von DDT konterkarierte und zu neuen Malaria-Epidemien führte (Roberts and Andre, 1994; Sharma and Mehrotra, 1986). Heute wird DDT im sogenannten „Indoor residual spraying“ wieder vermehrt eingesetzt, wobei der Wirkstoff gezielt in Wohnquartieren versprüht wird (Mabaso et al., 2004; Mandavilli, 2006a; Mandavilli, 2006b). Eines der erfolgreichsten Mittel der Vektor- und Malariabekämpfung stellen imprägnierte Bettnetze dar. Sie sind in der Herstellung kostengünstig und wenn konsequent genutzt, sehr wirksam. Leider ist auch hier die Verteilung und richtige Nutzung problematisch. So sind in Hochrisikogebieten nur ca. 35% der Bevölkerung mit funktionsfähigen Moskitonetzen ausgestattet und nutzen diese (World Malaria Report 2008).

Trotz langwährender Bemühungen der Forschergemeinschaft gibt es bis heute keine Impfung gegen den Erreger. Ein entscheidendes Hindernis ist dabei die komplexe Biologie und die genetische Variabilität des Parasiten. Die schnelle Invasion und die geschickte Auswahl der Wirtszelle, die antigene Variabilität, die Unterdrückung der T-Zellantwort sowie die Adhäsion von infizierten Zellen an die Endothelien unterbinden eine effektive Immunantwort (Miller et al., 2002). In endemischen Gebieten kann es jedoch zu einer Teilimmunität kommen. Sie wird über einen langen Zeitraum erworben und setzt eine konstante Exposition mit dem Erreger voraus, was zur Bildung einer sogenannten Semi-Immunität führt. Es werden vornehmlich zwei Impfstrategien verfolgt. Zum einen die Impfung, die einen Schutz gegen die Primärinfektion in der Leber hervorruft und zum anderen ein Impfschutz gegen die Blutstadien, welcher somit auf die Hauptvermehrungsphase abzielt. 1967 wurde zum ersten Mal in Mäusen gezeigt, dass γ -bestrahlte Sporoziten Impfschutz gegen eine Infektion boten (Nussenzweig et al., 1967). Einige Jahre später konnte dieser Versuch auch in Menschen wiederholt werden (Rieckmann et al., 1979). Allerdings war die Immunität nur für 3 Monate gegeben, was für eine flächendeckende Immunisierungsstrategie nicht ausreicht. Neuerdings konnte mit genetisch attenuierten Sporoziten ein Impfschutz in Mäusen erreicht werden (Mueller et al., 2005).

Für Blutstadien gelten das „Apical Membrane Antigen-1“ (AMA-1) und das Merozoiten Oberflächen Protein 1 (MSP1) als aussichtsreiche Impfstoffkandidaten (Remarque et al., 2008; Withers et al., 2006). Klinische Studien der Stufe I zeigten bei beiden Antigenformulierungen eine gute Verträglichkeit (Remarque et al., 2008). Der ausgeprägte Sequenzpolymorphismus dieser Antigene und die relativ kurz anhaltende protektive Immunität stellen jedoch eine große Herausforderung dar. So konnte kürzlich für AMA-1 gezeigt werden, dass die weltweit vorherrschenden Polymorphismen wahrscheinlich in 6 große Gruppen eingeteilt werden können (Duan et al., 2008) und sich auf bestimmte Bereiche

des Proteins konzentrieren („immune escape regions“, Dutta et al., 2007). Kenntnisse dieser Art könnten helfen regionale Impfstoffkampagnen zu etablieren.

Inzwischen sind auf dem Gebiet der Impfstoffentwicklung einige Kollaborationen von Firmen und öffentlichen Forschungseinrichtungen entstanden. Eine Partnerschaft zwischen GlaxoSmithKline (GSK), der Universitätsklinik Barcelona, des Manhica Health Research Centre (CISM) und der PATH Malaria Vaccine Initiative (MVI) wurde im Jahr 2000 ins Leben gerufen, die derzeit eine der aufwendigsten Impfstudien durchführt (Alonso et al., 2004). Dort wurde die Impfstoffformulierung RTS,S/AS02A entwickelt, um eine Übertragung des Sporozoiten zu verhindern. Der Impfstoff ist ein rekombinantes Peptid eines Teilbereiches des CSP (circumsporozoite protein) und eines Hepatitis-B Oberflächenantigens. Dies wird zusammen mit Adjuvantien appliziert. Bisher konnte gezeigt werden, dass es sich durch eine hohe Verträglichkeit, vor allem auch bei Kindern unter fünf Jahren auszeichnet. Nach einer Immunisierung sinkt die Wahrscheinlichkeit einer Erstinfektion um 45%. Das Risiko klinische Symptome zu entwickeln vermindert sich um 30%. Leider ist auch bei diesen Impfstoffen bisher nur ein 18-monatiger Schutz erzielt worden. Trotz dieser Einschränkung ist RTS,S/AS02A der bisher erfolgreichste Malariaimpfstoff und wird in einer klinischen Studie der Phase III getestet.

2.2 Biologie des Parasiten

2.2.1 Systematik

Plasmodium spp. gehören zur Ordnung der Hämosporidia und bilden gemeinsam mit den *Coccidia*, *Gregarinida* und den *Piroplasmida* den Stamm der *Apicomplexa* (Storch and Welsch, 1994). Sie sind obligate Endoparasiten. Der Stamm zeichnet sich vor allem durch den Besitz einer elektronendichten Struktur im apikalen Bereich des Parasiten aus. Diese Region ist für die Invasion perfektioniert und beinhaltet spezialisierte Bereiche des Zytoskeletts sowie sekretorische Organellen („Dense granula“, Rhoptrien und Mikronemen), die Proteine, welche für die Wirtszellinvasion wichtig sind, beinhalten.

2.2.2 Morphologie und Entwicklung

Apicomplexa weisen einen haplohomophasischen Generationswechsel aus, der aus geschlechtlicher Fortpflanzung (Gamogonie) und ungeschlechtlichen Vielteilungen (Sporogonie und/oder Schizogonie) besteht. Der Generationswechsel geht mit einem

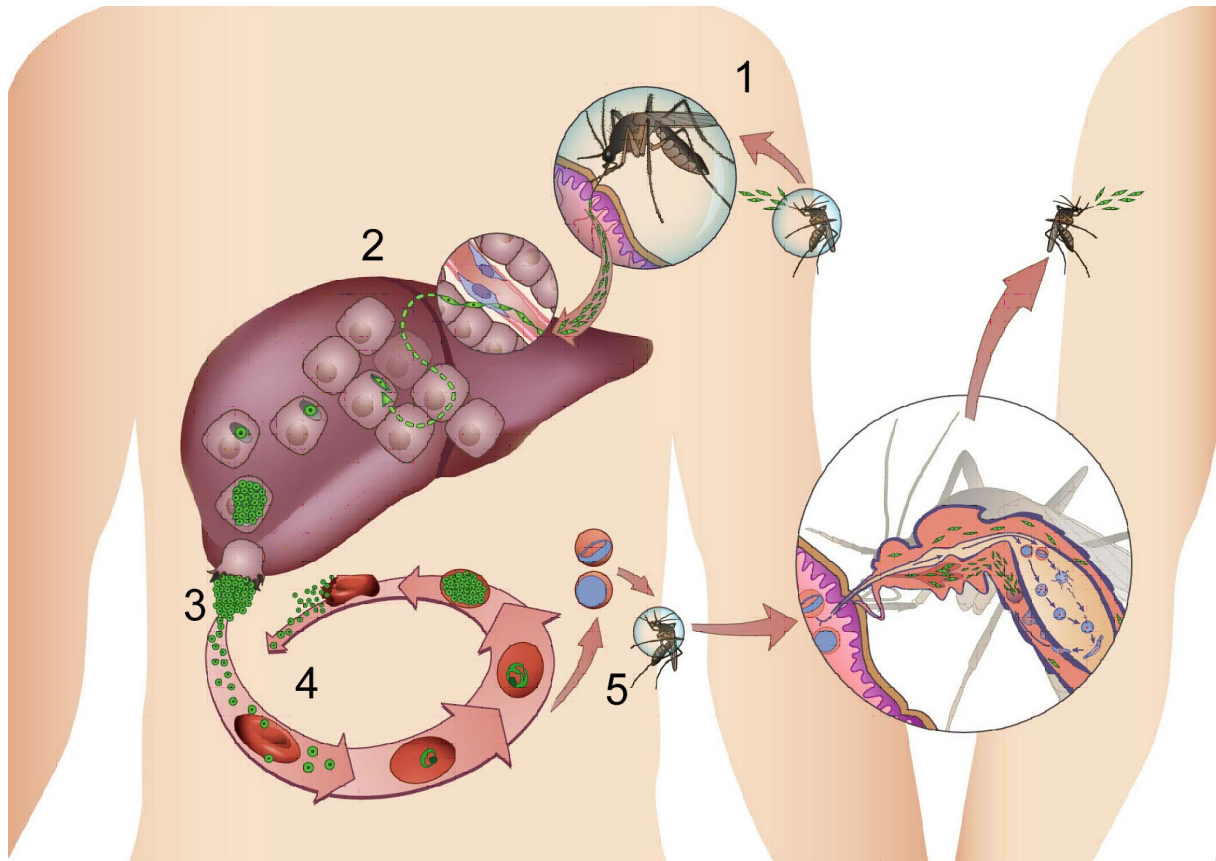


Abbildung 1: Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* (Sturm and Heussler, 2007)

Überträger ist eine Mücke der Gattung *Anopheles*. Durch den Stich der Mücke (1) gelangt der Sporozoit (grün) in die Leber (2). Dort findet eine erste Vermehrung statt und es werden bis zu 30.000 Merozoiten entlassen (3), welche die roten Blutkörperchen befallen. In diesen entwickelt sich der Parasit und entlässt nach einer Vielteilung bis zu 32 Tochterzellen, die neue Erythrozyten befallen (4). Unter bestimmten Bedingungen werden Gametozyten gebildet (5), die von einer Mücke bei einer Blutmahlzeit aufgenommen werden können und somit den Kreislauf schließen.

Wirtswechsel einher. Hauptwirt sind Stechmücken der Gattung *Anopheles*. Von den über 400 bekannten *Anopheles* Arten sind nur etwa 40 bei der Übertragung von den 5 humanpathogenen Plasmodium-Arten von Bedeutung (mit *Anopheles gambiae* an erster Stelle). Im Menschen beginnt die ungeschlechtliche Lebensphase in der Leber (siehe Abb.1). Durch den Stich einer infizierten Mücke gelangt der Sporozoit in die Blutbahn und wird passiv in die Leber transportiert. Dort wandert er in die Hepatozyten ein und bildet durch Sporogonie mehrere tausend Merozoiten, die in die Blutbahn entlassen werden. Hier beginnt die eigentliche Vermehrungsphase. Die Merozoiten invadieren rote Blutkörperchen und vermehren sich durch eine Schizogonie, wobei bis zu 32 Merozoiten gebildet werden, die

schließlich wieder in die Blutbahn entlassen werden und neue Erythrozyten befallen. Innerhalb der Wirtszelle lebt der Parasit in der parasitophoren Vakuole. Somit ist er räumlich vom Wirtszellzytosol durch zwei Membranen getrennt. Die Dauer dieses Vermehrungszyklus variiert je nach Spezies (für *P. falciparum* 48 Stunden). Unter bestimmten Bedingungen kommt es zur Ausbildung von Geschlechtsformen, den Mikro- und Makrogamonten, die bei einer Blutmahlzeit durch eine Mücke aufgenommen werden. Im Darm der Mücke differenzieren sich die Gamonten zu Gameten und es kommt zur Befruchtung. Die daraus resultierende Zygote wird zum Ookineten der in das Darmepithel migriert und sich dort enzystiert. Die daraus entstehende Oozyste entlässt nach einer Reduktionsteilung tausende Sporozoitien, die in die Speicheldrüse der Mücke wandern, um schließlich den Kreislauf zu schließen.

2.2.3 Das Blutstadium

Innerhalb der krankheitsbestimmenden Blutphase des Parasiten unterscheidet man im Giemsa gefärbten Blutausschlag vier Hauptformen (s. Abb. 2):

- Das Ringstadium ist durch eine charakteristische Ringform charakterisiert, welche in den ersten sechszehn Stunden nach der Invasion der Wirtszelle vorherrscht. Schon hier beginnt der Export von Parasitenproteinen in das Zytosol der Wirtszelle und damit deren Transformation
- Das Trophozystenstadium weist entsprechend seines Namens einen sehr aktiven Metabolismus auf. Hämoglobin als eine wichtige Nahrungsquelle wird metabolisiert und in Form von kristallinen Eisenderivaten (Hämözoin) in der Nahrungsvakuole abgelagert. Der Trophozoit bildet ein tubuläres Netzwerk aus, welches bis in die Wirtszelle hineinreichen kann. Der Abbau des Wirtshämoglobins dauert bis in die späte Schizogonie, bis schließlich die gesamte rote Blutzelle vom Parasiten ausgefüllt wird. In dieser Phase wird auch die Zellteilung vorbereitet.
- Im Schizontenstadium bildet der Parasit durch ungeschlechtliche Teilungen bis zu 32 Merozoiten, die am Ende dieses Stadiums gut zu erkennen sind und durch ein plötzliches Aufplatzen des infizierten Erythrozyten entlassen werden.
- Der Merozoit ist die invasive Form des Parasiten in der Blutbahn. Er ist 1-2µm lang und von birnenförmiger Gestalt. Während im basalen Pol der Zellkern zu finden ist, stellt der apikale Pol eine Besonderheit dar. In ihm befinden sich alle Komponenten, die für die aktive Wirtszellinvasion wichtig sind, darunter Mikronemen und Rhoptrien.

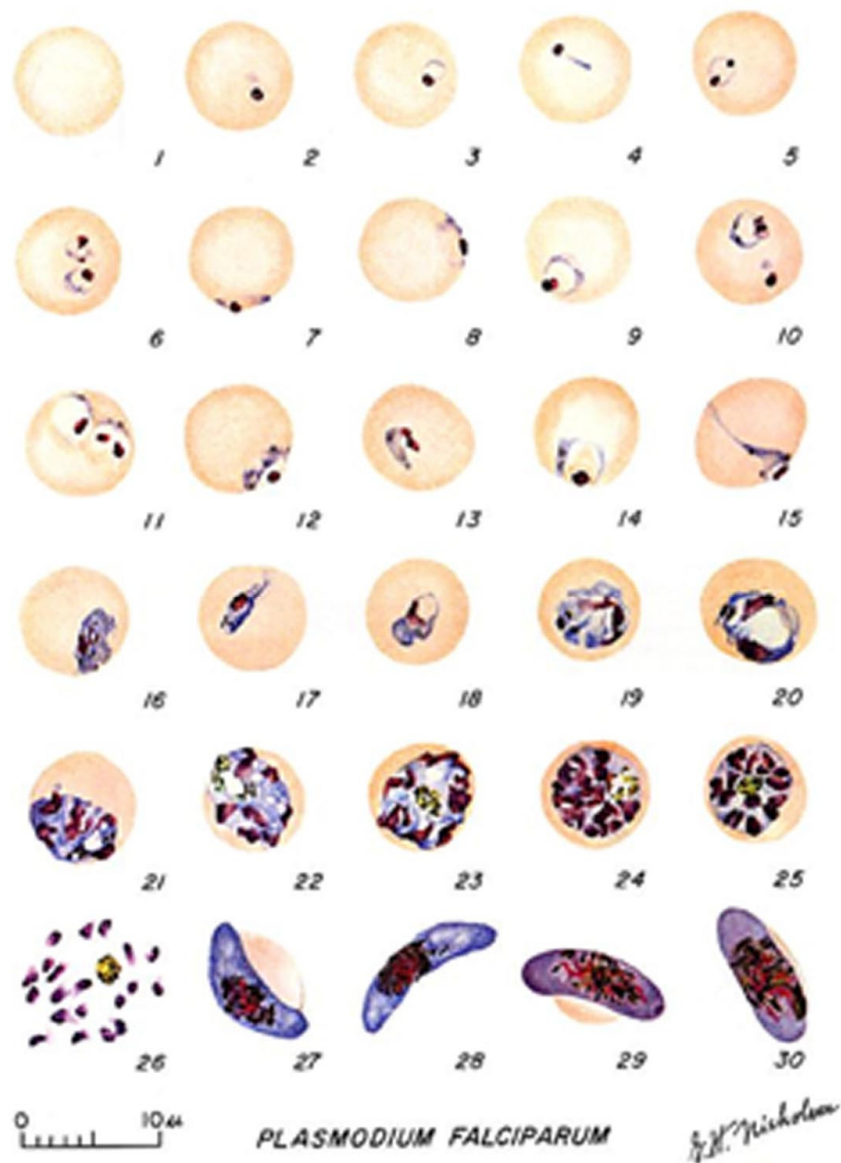


Abbildung 2: Die erythrozytäre Lebensphase (Blutphase) des Malariaparasiten *P. falciparum* (Coatney GR, 1971)

Nach der Invasion in den Erythrozyten entwickelt sich der Parasit über die Ringform (2-10) und den Trophozoiten (11-20) zum Schizonten, in dem durch eine Schizogonie die Tochterzellen gebildet werden (21-25). Schließlich werden durch Aufplatzen des Schizonten die freien Merozoiten entlassen (26). Unter gegebenen Umständen bilden sich Geschlechtsformen, die Gametozyten aus (27-30).

2.3 Der Merozoit und seine Organellen

Der Merozoit (Abb.3) ist die invasive Form der Blutphase. Wie bereits beschrieben (siehe 2.2.2 Morphologie), zeichnet sich der Stamm der Apicomplexa durch das Vorhandensein von apikalen Organellen aus: die Rhoptrien und Mikronemen, die Proteine beinhalten, welche für die Wirtszellinvasion essentiell sind, sowie den „Dense granula“, über die sehr wenig bekannt ist. Im Folgenden werden die Rhoptrien und Mikronemen näher beschrieben und ihre wichtige Funktion bei der Invasion hervorgehoben. Der Transportmechanismus, d.h. wie die sekretorischen Proteine zu ihrem jeweiligen subzellulären Bestimmungsort (Mikronemen oder Rhoptrien) gelangen, ist weitgehend unbekannt.

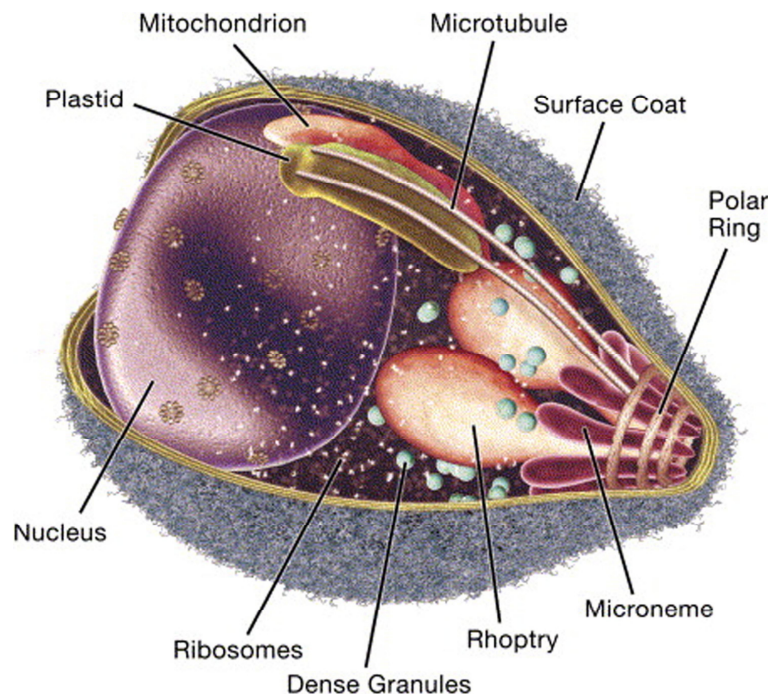


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Merozoiten (Cowman and Crabb, 2006)

Der Merozoit ist mit einer Länge von 1-2 μm erstaunlich hoch kompartimentiert. Neben Organellen wie dem Mitochondrium besitzt der Parasit spezielle Kompartimente wie den Apikoplast (ein DNA haltiges Chloroplasten-ähnliches Organell), sekretorische Organellen wie Rhoptrien, Mikronemen und den Dense Granula und eine für die Wirtszellinvasion spezialisierte Zytoskelettstruktur, die polaren Ringe.

2.3.1 Rhoptrien

Die Rhoptrien sind die größten sekretorischen Organellen. Sie sind paarig, birnenförmig und können ultrastrukturell in drei Teilbereiche unterschieden werden: Den Bulbus, der als elektronendichte Masse erscheint, die Rhoptrien „necks“ und den Ductus, durch den Proteine sekretiert werden (Bannister et al., 2000). Diese sekretorischen Organellen bilden sich durch vesikuläres „budding“ und Vesikelfusion gegen Ende der Schizogonie (36-40 Stunden nach der Invasion) aus (Bannister et al., 2000). In *P. falciparum* wurden bis heute 14 Proteine in den Rhoptrien lokalisiert, wobei die Gesamtanzahl vermutlich deutlich höher liegt (Haase et al., 2008).

2.3.2 Mikronemen

Die im Vergleich zu den Rhoptrien kleineren Mikronemen beinhalten hauptsächlich Proteine, die vor dem Invasionsvorgang auf die Oberfläche des Merozoiten gelangen (Cowman and Crabb, 2006). Über die Biogenese der Mikronemen gibt es keine Studien, es wird aber postuliert, dass die Mikronemen in der Zusammensetzung ihrer Proteine variieren und somit Subpopulationen existieren (Healer et al., 2002).

Prominente Vertreter sind das erythrozytenbindende Protein 175 (EBA-175) (Orlandi et al., 1992; Sim et al., 1990), welches eine hohe Affinität für Glycophorin A der Wirtszelle aufweist, und das Apikale Membran-Antigen-1 (AMA-1, Peterson et al., 1989).

2.4. Der Invasionsvorgang in Erythrozyten

Die Invasion von Erythrozyten ist ein schneller, fließender Prozess. Er kann in 5 Phasen unterschieden werden: i) initiale Bindung, ii) Reorientierung, iii) Ausbildung einer festen Bindung mit der Wirtszelle („tight junction“), iv) aktive Invasion und v) Verschmelzung der Membranen (Cowman and Crabb, 2006).

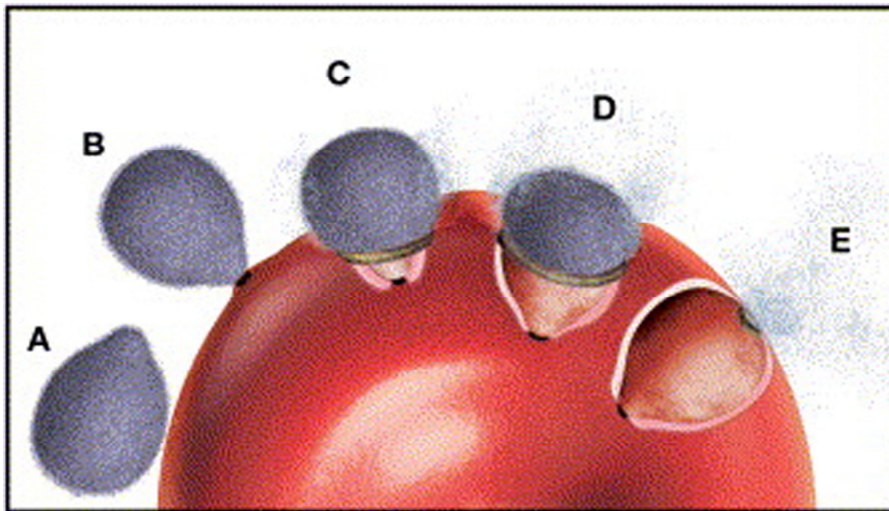


Abbildung 4: Der Invasionsvorgang in Erythrozyten (Cowman and Crabb, 2006)

(A) Der Merozoit reorientiert sich auf der Oberfläche der Wirtszelle und invadiert nach Ausbildung einer „tight junction“ (B) an seinem apikalen Pol (C). Während der Invasion kommt es zur Sekretion von Rhoprienproteinen und der Ausbildung der parasitophoren Vakuole (D). Parasiteneigene Proteasen spalten Oberflächenproteine während der Invasion und lösen somit stabile Wirt-Parasit Interaktionen (E) (weitere Erklärungen im Text).

Die einzelnen Phasen können wie folgt beschrieben werden (Abb. 4): **A)** initiale Bindung: Hier kommt es zu niedrigaffinen Protein-Protein Interaktionen zwischen Wirt und Parasit. **B)** Reorientierung: Nachdem der Parasit an die Wirtszelle gebunden hat, kommt es zur Reorientierung. Dabei positioniert er seinen invasionskompetenten Bereich in dem sich die Mikronemen und Rhoprien befinden so, dass eine direkte Verbindung mit der Wirtszelle hergestellt werden kann. **C)** Nun kommt es zur Ausbildung der „tight junction“, dem Kontaktpunkt der Parasiten und Wirtszellenmembran. Die „tight junction“ bleibt während des gesamten Invasionsvorgangs bestehen und bewegt sich als „moving junction“ vom apikalen zum distalen Pol. Dieser Prozess wird von der Actin-Myosin Maschinerie des Parasiten angetrieben (Baum et al., 2008). Welche Faktoren die Verschmelzung von Parasiten- und Wirtszellmembran beeinflussen ist gänzlich unbekannt. **D-E)** Obwohl die molekulare Zusammensetzung in der „Moving Junction“ noch nicht aufgeklärt ist, spielen Typ I Transmembranproteine des Parasiten, die mit Oberflächenstrukturen des Erythrozyten interagieren, eine wichtige Rolle. Diese molekularen Brücken müssen während des

Invasionsprozesses kontinuierlich aufgebrochen werden und auch eine Abspaltung von anderen Oberflächenproteinen des Parasiten ist notwendig. Diese Funktion üben u. a. Intramembranproteasen, sogenannte Rhomboid-Proteasen aus (Baker et al., 2006; O'Donnell et al., 2006).

2.4.1 Mikronemenproteine und Invasion

Die Mikronemenproteine sind maßgeblich an den ersten Schritten der Invasion beteiligt (Baum et al., 2008; Cowman and Crabb, 2006). Beim Erstkontakt mit der Wirtszelle kommt es zu einer rezeptorvermittelten Freisetzung von intrazellulärem Calcium, was eine Signalkaskade auslöst, die unter anderem die Sekretion der Mikronemen bewirkt (Carruthers et al., 1999). Alle bisher bekannten Mikronemenproteine sind Transmembranproteine (Cowman and Crabb, 2006). Antikörper gegen einige dieser Proteine, wie z.B. EBA-175 oder AMA-1 können die Invasion verhindern und somit stellen Mikronemenproteine *per se* gute Kandidaten für einen Impfstoff dar (Kocken et al., 2000; Sim et al., 1990). Sie unterliegen einem starken Selektionsdruck und zeichnen sich durch eine Vielzahl von „Single Nucleotide Polymorphismen“ (SNP's) ihrer Gene bei Feldisolaten aus (Cortes et al., 2003; Volkman et al., 2007). Weiterhin verfügt der Parasit über iso-funktionelle Proteine die mit unterschiedlichen Rezeptoren auf der Oberfläche der Erythrozyten interagieren und damit funktionell äquivalente Invasionswege bestimmen. Dies ist detailliert für die EBL-Proteinfamilie beschrieben worden (Gilberger et al., 2003b; Reed et al., 2000; Thompson et al., 2001), die vermutlich durch Gen-Duplikation entstanden ist. Diese Proteinfamilie kann als evolutive Antwort des Parasiten auf die Varianz der Wirtszellrezeptorstrukturen angesehen werden (z.B. Blutgruppen- Antigene, Oberflächenveränderungen bei Alterungsprozessen des Erythrozyten, Miller et al., 1994). Das Mikronemenprotein EBA-175 bindet mit Hilfe seiner F1/F2 Domäne des extrazellulären Bereiches mit hoher Affinität an die Sialinsäurereste von Glycophorin A (Orlandi et al., 1992; Sim et al., 1990). Die Bindung von EBA-175 an diese Oberflächenstruktur wird durch eine Dimerisierung ermöglicht (Tolia et al., 2005). Die Transmembrandomäne selbst besitzt eine Rhomboid-Protease Spaltstelle (O'Donnell et al., 2006). Dadurch wird die Ektodomäne während der Invasion abgespalten. Die zytoplasmatische Domäne konnte noch nicht genauer charakterisiert werden, ist aber für den Invasionsvorgang essentiell (Gilberger et al., 2003b). Eine mögliche Funktion der zytosolischen Domäne der EBL-Proteine ist die direkte oder indirekte Interaktion mit dem invasionstreibenden Aktin/Myosin Motor innerhalb des Parasiten wie es in Abb. 5 dargestellt ist.

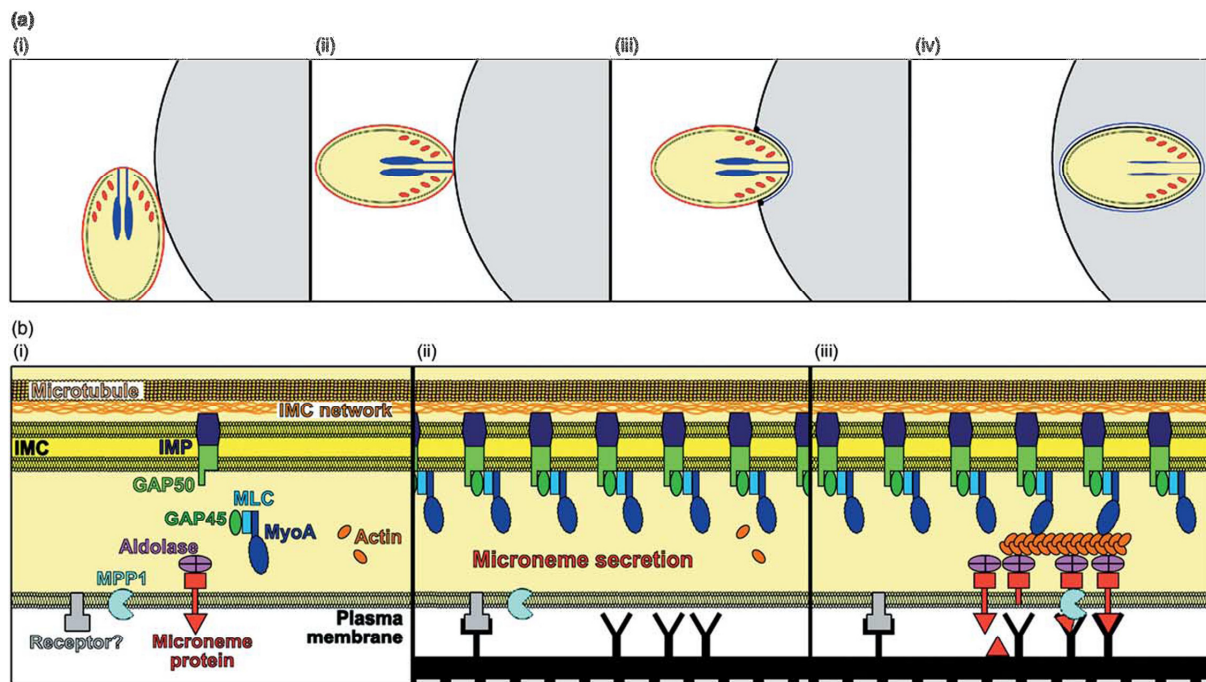


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Invasion auf molekularer Ebene (Soldati et al., 2004)

A: Invasion eines Merozoiten (gelb) in die Wirtszelle (hellblau). Die Organellen sind farbig gekennzeichnet (Rhoptrien, blau; Mikronemen, rot). **i)** Der Merozoit bindet an den Erythrozyten und reorientiert sich. **ii)** Es kommt zur Ausbildung der „tight junction“. **iii)** durch Sekretion der Rhoptrien- und Mikronemenproteine kommt es zur Interaktion mit Rezeptoren auf der Wirtszelle. **iv)** Der Parasit hat die Invasion erfolgreich abgeschlossen und befindet sich innerhalb der parasitophoren Vakuole. **B)** Molekulare Interaktionen während der Invasion. **i)** Auflistung aller bekannten Proteine, die an dem aktiven Invasionsprozess beteiligt sind. **ii)** Durch die Interaktion eines unbekannten Rezeptors mit der Wirtszelle kommt es zu einem Anstieg der Calciumkonzentration innerhalb des Parasiten, was die Sekretion der Mikronemen auslöst. **iii)** Mikronemen- und Rhoptrienproteine interagieren mit Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche (schwarz) einerseits und mit Proteinen des Fortbewegungsapparates des Parasiten (Aldolase, GAP45, MyoA, Actin, MLC) andererseits. Dadurch wird eine stabile Brücke mit dem „inner membrane complex“ (IMC) gebildet, die eine aktive Fortbewegung erlaubt. Während der Invasion müssen diese stabilen Wirt- Parasit Interaktionen gelöst werden. Dies geschieht durch Rhomboid Proteasen und andere Proteasen (sogenannte „Sheddasen“ wie z.B. MPP1), die adhäsive Proteine innerhalb der Transmembrandomäne oder in der Ektodomäne proteolytisch spalten.

Die Invasion selbst, also das aktive Eindringen in den Erythrozyten, wird u.a. durch Proteine der TRAP Familie geleistet. MTRAP (Merozoiten TRAP, Baum et al., 2006) wird in den Blutstadien exprimiert. Weitere TRAP Proteine werden in Sporozoiten (Sultan et al., 1997) und Ookineten exprimiert (Dessens et al., 1999). Sie besitzen neben einem Signalpeptid eine Thrombospondin-Domäne, eine Bindungsdomäne, die oft an interzellulären Adhäsionsvorgängen beteiligt ist. Die zytoplasmatische Domäne dieser Proteine interagiert mit Aldolase und weiteren Proteinen (u.A. GAP45), die am inneren Membrankomplex (IMC= inner membrane complex), einer stützenden membranösen Struktur unterhalb der Plasmamembran des Parasiten verankert ist und für die Ausbildung des molekularen Motors von Bedeutung sind. Über diese Brücke kann der Parasit direkt Kraft ausüben und aktiv invadieren (Baum et al., 2008).

Ein weiteres, gut charakterisiertes Protein der Mikronemen ist AMA-1 (apical membrane antigen-1, Narum and Thomas, 1994; Peterson et al., 1989). AMA-1 besitzt wie alle Mikronemenproteine ein Signalpeptid und unterliegt einer relativ aufwendigen posttranslationalen Prozessierung wie in Abb. 6 dargestellt (Healer et al., 2002; Howell et al., 2001). Neben der N-terminalen Prozessierung, die die Abspaltung des Signalpeptides und der Prodomäne beinhaltet (Abb. 6 A, B), kommt es auf der Oberfläche des Merozoiten zur Abtrennung von Domäne I, II und III (Howell et al., 2001). Verantwortlich für diese Prozessierung sind proteolytische Enzyme (zusammenfassend dargestellt in Blackman, 2004).

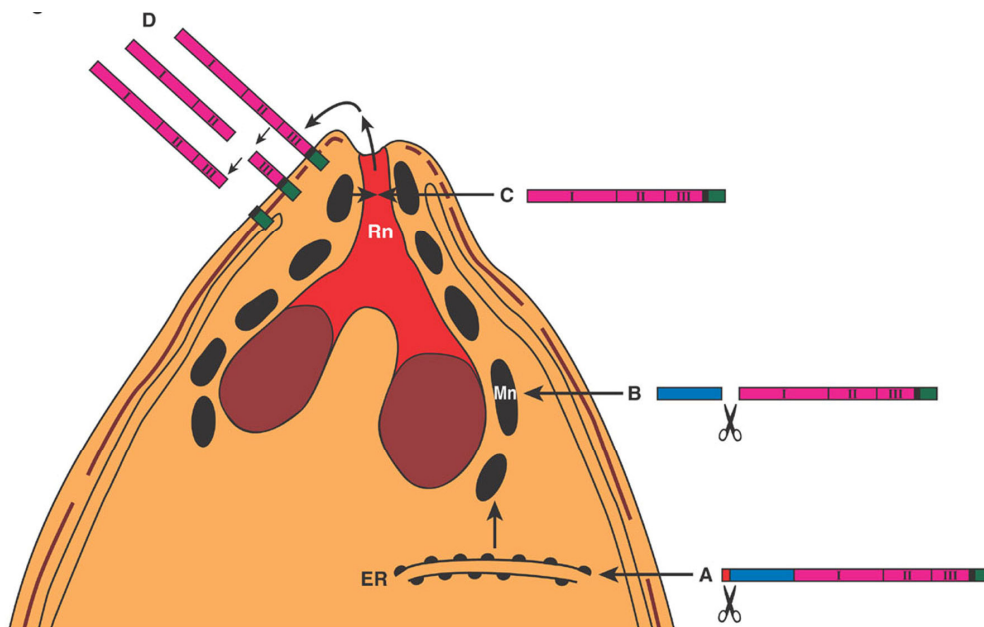


Abbildung 6: Posttranslationale Prozessierungen von AMA-1 vor und während der Invasion (Healer et al., 2002)

A) Das Signalpeptid wird während der Translokation in das endoplasmatische Retikulum (ER) abgetrennt. B) AMA-1 wird in die Mikronemen (Mn) transportiert und kurz vor der Invasion durch den Rhoptriehals (Rn) auf die Oberfläche des Merozoiten gebracht. (C) Während diesem Prozess kommt es zur Abspaltung der Prodomäne. (D) Während der Invasion wird die Ektodomäne proteolytisch abgespalten.

Der Hauptbestandteil von AMA-1 bleibt nach der Merozoitenfreisetzung im apikalen Bereich auf der Oberfläche. Nach einiger Zeit verteilt es sich allerdings gleichmäßig in der Peripherie auf der Oberfläche des Merozoiten.

Die Funktion von AMA-1 ist nicht bekannt. AMA-1 interagiert mit zwei bekannten Proteinen der Rhoptrien, RON4 und RON2 (Alexander et al., 2005). Dieser Komplex ist in der „moving junction“ lokalisiert worden. Aufgrund seiner Lokalisation ist eine Funktion bei der Reorientierung von Merozoiten und bei der Invasion in der "moving junction" diskutiert worden (Alexander et al., 2006; Alexander et al., 2005; Cowman and Crabb, 2006; Mitchell et al., 2004). Diese Hypothese wird durch Studien unterstützt, in denen Antikörper gegen AMA-

1, welche die Invasion verhindern, auch eine enge Interaktion zwischen Parasit und Wirtszelle stören (Mitchell et al., 2004). Weiterhin wurde Erythrozyten-bindende Aktivität für die Region III bei *Plasmodium yoelii* gezeigt (Fraser et al., 2001; Kato et al., 2005). Diese konnte allerdings nicht für AMA-1 von *P. falciparum* bestätigt werden.

Die funktionelle Analyse von AMA-1 im *P. falciparum* wird durch das Fehlen geeigneter konditioneller Vektorsysteme für Gen-knock-out-Mutanten verhindert.

2.4.2 Rhoprienproteine und Invasion

Die Rhoprienproteine sind im Gegensatz zu den Mikronemenproteinen heterogener. Sie umfassen Transmembranproteine, lösliche Proteine und GPI-verankerte Proteine (Cowman and Crabb, 2006; Gilson et al., 2006), die oft als Proteinkomplexe transportiert werden und ihre Funktion erfüllen. Sie sind in räumlich begrenzten Bereichen innerhalb des Rhoprienkörpers zu finden (zum Beispiel sind RAP-Proteine im Bulbus, Rh-Proteine im ausführenden Kanal lokalisiert). Wie diese differentielle Lokalisation innerhalb der Rhoprien gewährleistet wird ist unbekannt. Darüber hinaus ist die genaue Funktion der Rhoprienproteine während der Invasion in *P. falciparum* bisher kaum analysiert worden. Am besten untersucht sind die Rh-Proteine (reticulocyte binding protein homolog), die, vermutlich ähnlich wie die EBL-Proteine, für eine Rezeptor-Interaktion verantwortlich sind (Duraisingh et al., 2003). Mit Hilfe einer gezielten Gendeletion von *eba-175* konnte ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem EBL-Protein EBA-175 und dem Rh-Protein Rh4 gezeigt werden (Stubbs et al., 2005). Interessanterweise zeigen die Rh-Proteine aber im Gegensatz zu EBL-Proteinen keine vergleichbar hohe Affinität zu Oberflächenstrukturen des Erythrozyten (wie z.B. EBA-175 zu Glycophorin A).

Arbeiten in *T. gondii* weisen darauf hin, dass die Sekretion dieser Proteine nach dem ersten Kontakt mit der Wirtszelle initiiert wird und die Inhaltsstoffe der Rhoprien maßgeblich an der Ausbildung der parasitophoren Vakuole und der "tight junction" beteiligt sind (Dubremetz, 2007).

2.5 Proteintransport in *P. falciparum*

Wie alle eukaryotischen Zellen muss *P. falciparum* eine Vielzahl von Proteinen in bestimmte subzelluläre Bestimmungsorte transportieren. Dabei leiten z.B. N-terminale Signalsequenzen Proteine spezifisch in das Mitochondrium, in den Apikoplasten oder in den Zellkern (Alonso et al., 2004; Foth et al., 2003; Waller et al., 2000). Klassische Signalpeptide dagegen, die bei *P. falciparum* auch bis zu 80 Aminosäuren vom eigentlichen Start-Methionin in Richtung C-Terminus verschoben sein können (Lingelbach, 1993; Sargeant et al., 2006) gewährleisten, dass Proteine über das endoplasmatische Reticulum in den sekretorischen Transportweg eingegliedert werden. Der Mechanismus des gerichteten Transportes von Proteinen in die sekretorischen Organellen ist in *P. falciparum* bislang noch wenig untersucht. Es konnte für EBA-175 gezeigt werden, dass der Transport dieses Proteins unabhängig von der zytosolischen Domäne ist (Gilberger et al., 2003a).

Für ein Rhoprienprotein (Rhop2) wurde eine Sequenz gefunden, die aus einem Signalpeptid +5 Aminosäuren besteht und das Protein in die Rhoprien dirigieren kann (Ghoneim et al., 2007). Dies entspricht nicht dem Transport eines Rhoprienproteins (ROP2) von *T. gondii*, wo für den Transport ein klassisches, funktionelles, Tyrosin-basierendes Sortiermotiv in der zytosolischen Domäne gefunden wurde (Hoppe et al., 2000).

Im Vergleich zu vielen anderen Zellen weist der Proteintransport dieses intrazellulären Parasiten aber noch einige Besonderheiten auf. Über 500 Proteine werden in die Wirtszelle exportiert (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004; Sargeant et al., 2006; van Ooij et al., 2008). Dafür müssen die Membranen der parasitophoren Vakuole überbrückt werden. Aus Studien mit genetisch veränderten Parasiten konnte das sogenannte „Protein Export Element“ im N-Terminus von exportierten Proteinen identifiziert werden, das für den zielgerichteten Transport in das Wirtszellzytosol notwendig ist.

3. Zielsetzung

Innerhalb dieser Arbeit sollte die Funktion der zytoplasmatischen Domäne von Mikronemenproteinen untersucht werden. Dabei standen zwei Fragestellungen im Vordergrund:

- Ist die zytoplasmatische Domäne für den Transport dieser Proteine in die Mikronemen und auf die Oberfläche der Merozoiten notwendig?
- Ist die zytoplasmatische Domäne für die Funktion dieser Proteine bei der Invasion essentiell?

Die Untersuchungen sollten sich auf drei EBL-Proteine (EBA-140, EBA-175 und EBA-181) und vor allem AMA-1 beschränken. Zur Untersuchung von AMA-1 sollte zunächst die Dynamik von AMA-1 während der Invasion in lebenden Parasiten analysiert und dann ein Versuchsansatz entwickelt werden, der die funktionelle Charakterisierung der zytosolischen Domäne und damit die Beantwortung der oben genannten Fragen ermöglicht.

4. Forschungsbericht

4.1 Untersuchungen zum Proteintransport der EBL- Familie in *P. falciparum*

„A conserved region in the EBL proteins is implicated in microneme targeting of the malaria parasite Plasmodium falciparum.“

4.1.1 Einleitung

EBL-Proteine wie EBA-175, EBA-181 und EBA-140 haben eine konservierte Domänenstruktur (Abb. 7). Sie verfügen über ein Signalpeptid, zwei cysteinreiche, adhäsive Domänen (F1/F2), eine C-terminale cysteinreiche Domäne (Region VI), eine einfache Transmembrandomäne und eine zytosolische Domäne.

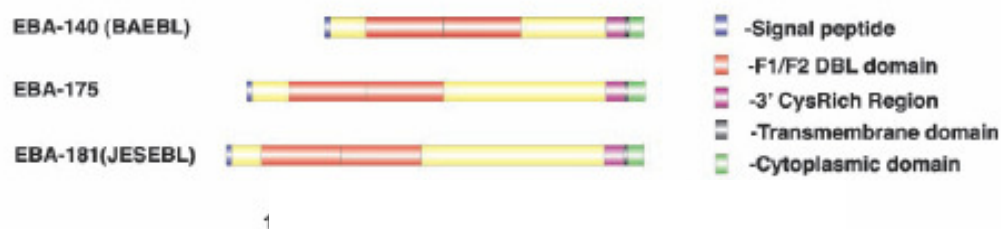


Abbildung 7: Schematische Struktur von EBL-Proteinen (Gilberger et al., 2003b)

Die drei Vertreter der EBL Familie weisen eine konservierte Domänenstruktur auf: Signalpeptid (blau), adhäsive Domänen (F1/F2 (rot), unstrukturierte Regionen (gelb), cysteinreiche Region VI (violett), Transmembrandomäne (schwarz), zytosolische Domäne (grün).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass EBA-175 unabhängig von seiner zytosolischen Domäne in die Mikronemen transportiert wird (Gilberger et al., 2003a). Es sollte zunächst untersucht werden, ob dieses Ergebnis auf die anderen Mitglieder der EBL- Familie übertragbar ist. Im Weiteren sollte die Domäne in den EBL- Proteinen identifiziert werden, die notwendig für den Transport ist.

4.1.2 Ergebnisse

1. Die Familie der Erythrozyten-bindenden Proteine (EBL) wird unabhängig von ihrer zytoplasmatischen Domäne in die Mikronemen transportiert

In dieser Studie wurden die anderen Mitglieder der EBA-Familie (EBA-140 und EBA-181) auf Sortiermotive innerhalb der zytoplasmatischen Domäne untersucht. Dafür wurden mit Hilfe eines entsprechenden Transfektionskonstruktes (s. Abb. 8) die Genabschnitte im endogenen Locus von *eba-140* und *eba-181*, welche für die zytoplasmatischen Domänen codieren, deletiert (Abb. 8A, C). Dies führt zur Expression von endogenen EBA-140 und EBA-181 ohne zytoplasmatische Domäne. Des Weiteren wurde eine EBA-175-Deletionsmutante hergestellt (Abb. 8E), die weder eine Transmembrandomäne noch eine zytoplasmatische Domäne besitzt. Die Integration der Plasmide und damit die Deletionen der gewünschten Gen-Abschnitte wurden durch Southern-Blot Analysen der genomischen DNA von transgenen Parasitenlinien gezeigt (Abb. 8B, D, F).



Abbildung 8: Deletion der 3'-Enden von *eba-140*, *eba-181* und *eba-175*

(A) Schematische Darstellung des "3'-replacement" des *eba-140* Gens durch "single crossover" Rekombination des pHH1 Vektors in den *eba-140* Locus. Die Selektionskassette (*hDHFR*) des pHH1 Vektors ist durch das schwarze Kästchen gekennzeichnet. Ein $\approx 1,1$ -kb Fragment des C- Terminus ohne die zytoplasmatische Domäne (grün) wurde in den pHH1 Vektor (Crabb et al., 2004) kloniert. Dieses Fragment ist durch die 3'-untranslatierte Region des *P. berghei* Dihydrofolat-Reduktase Gens (grau) flankiert. Die Kreuze symbolisieren die Abschnitte in denen eine Rekombination erwartet wurde. Die Intron/Exon Struktur des endogenen *eba-140* Gens: Blau, Signalpeptid; gelb, 3'-Cystein-reiche Region; rot, Transmembrandomäne; grün, zytoplasmatische Domäne. Die BglII-Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet und die Position der *eba-140* spezifischen Sonde als Balken gekennzeichnet. (B) Southern Blot Analyse der BglII verdauten genomischen DNA von Wildtyp und transgenen Parasiten zeigt, dass das Plasmid in den *eba-140* Locus integriert ist. Das endogene, *eba-140* spezifische Hybridisierungsfragment mit einer Größe von 8,5 kb ist nach der Integration des Plasmids nicht mehr zu sehen. Durch die Integration wird eine weitere Schnittstelle eingeführt und es kommt zur Detektion von zwei Banden der Größen 4,9 und 12 kb. (C) Schematische Darstellung der Integration des Deletionsplasmids durch ein "3'-Replacement" in den *eba-181* Locus durch homologe Rekombination. Die Restriktionsschnittstellen (BglII, XhoI und NcoI) sind gekennzeichnet. (D) Southern-Blot-Analyse restriktionsverdauter genomischer DNA von Wildtyp und transgenen Parasiten zeigt, dass das Deletionskonstrukt in den *eba-181* Locus integriert ist. Die Wildtyp-Bande bei 6,2 kb verschwindet unter Bildung von 3 Fragmenten der Größen 0,9, 3,3 und 3,8 kb. (E) Schematische Darstellung der Deletion in den endogenen *eba-175* Locus durch homologe Rekombination des pHH1 Vektors. Die Restriktionsschnittstellen sind markiert. (F) Das endogene Wildtyp Fragment von 10 kb verschwindet durch die Integration des Vektors. Durch das Einfügen neuer MfeI-Restriktionsschnittstellen kommt es hier zu Bildung von 3 Fragmenten der Größen 2,2, 8,1 und ca. 13kb.

Um die Auswirkungen der eingebrachten Mutationen auf die Lokalisation der verkürzten Proteine zu untersuchen, wurden sie mit spezifischen Antikörpern lokalisiert und ihre Verteilung mit anderen Mikronemenproteinen verglichen (Abb. 9). Fixierte Parasiten wurden dazu mit spezifischen Antikörpern (α -EBA-140, α -EBA-175, α -EBA-181) inkubiert und mit einem entsprechenden Mikronemenmarker kolokalisiert. Alle Deletionsmutanten kolokalisieren mit den entsprechenden Markerproteinen. Sie werden also unabhängig von ihrer zytoplasmatischen Domäne transportiert.

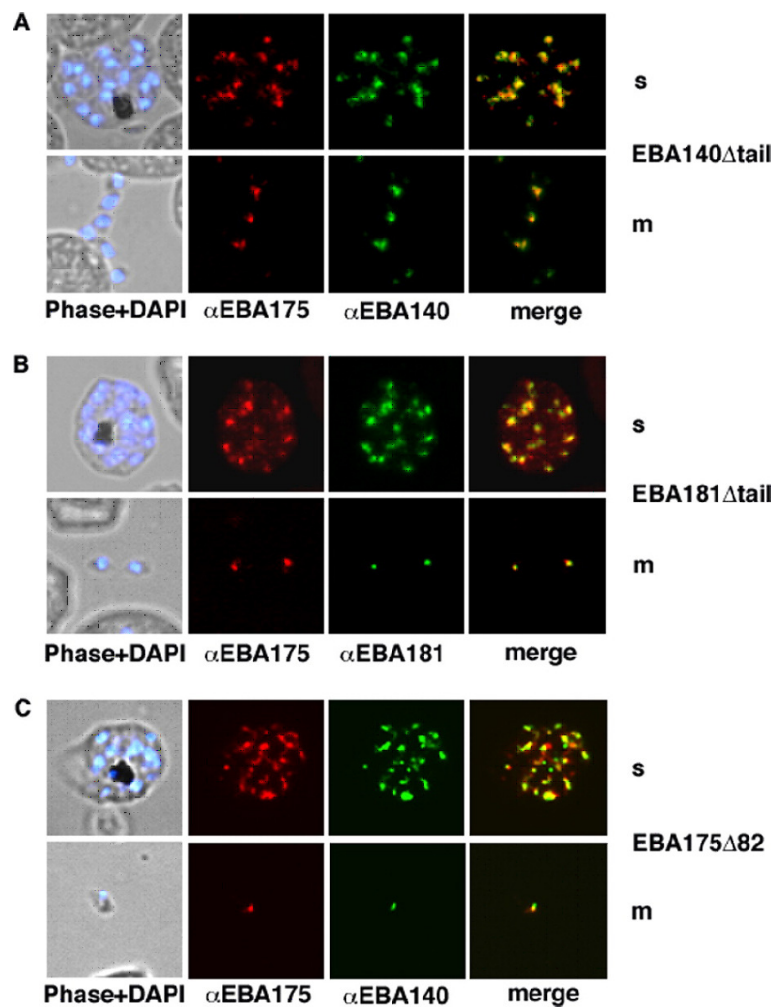


Abbildung 9: Kolokalisation der Deletionsmutanten EBA-140, EBA-181 und EBA-175 mit Mikronemenmarkern in Schizonten (s) und Merozoiten (m)

(A) EBA-140 Δ tail (EBA-140 mit deletierter zytoplasmatischer Domäne) (grün) kolokalisiert (merge) in den Mikronemen mit EBA-175 (rot). Der Zellkern ist mit DAPI angefärbt (blau). (B) EBA-181 Δ tail (EBA-181 mit deletierter zytoplasmatischer Domäne) (grün) kolokalisiert in den Mikronemen mit EBA-175 (rot) (C) EBA-175 Δ 82 (EBA-175 ohne Transmembran- und zytoplasmatischer Domäne) (rot) kolokalisiert mit dem Mikronemenmarker EBA-140.

2. Domänen von EBA-175 können als GFP-Fusionsproteine exprimiert werden

Mit Hilfe von sogenannten Minigenen, die jeweils Teilbereiche des EBA-175 Proteins kodieren, konnten die essentiellen Bereiche für den Mikronementtransport genauer bestimmt werden. Dazu wurde ein Vektor hergestellt, der eine C-terminale Fusion mit GFP ermöglicht und mit dem *ama-1* Promotor eine späte Expression in den Blutstadien sicherstellt (Abb. 10A). Alle Minigene (E1-E4) kodieren für ein Signalpeptid, um den Eintritt in den sekretorischen Transportweg zu vermitteln. Während E1 die 3'cysteinreiche Region VI, die Transmembrandomäne (TM) und die zytoplasmatische Domäne (CPD) besitzt, hat E2 neben dem Signalpeptid nur die 3'cysteinreiche Region VI. E3 und E4 fehlt die 3'cysteinreiche Region, sie sind aber beide in der Membran verankert. Die Expression dieser Minigene wurde mit Hilfe von Western-Blots untersucht und die Fusionsproteine zeigen die erwartete Größe (Abb. 10B)

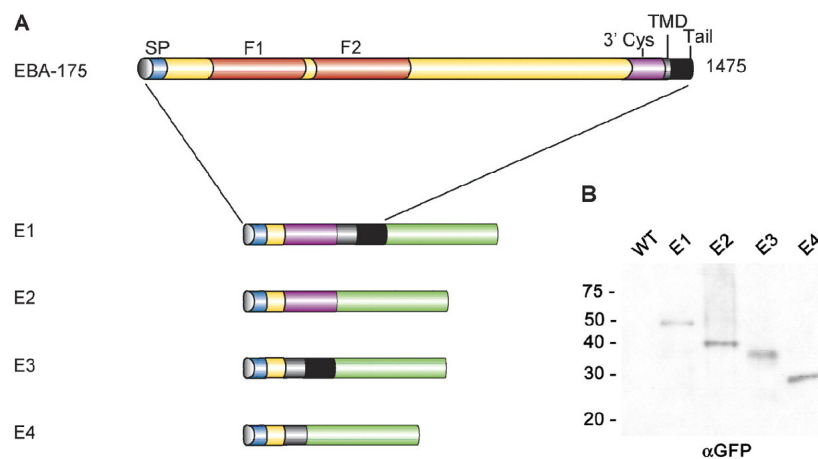


Abbildung 10: Domänenstruktur von EBA-175 und der EBA-175 Minigene

(A) Die Domänenstruktur von EBA-175 im Vergleich mit den codierenden Bereichen der Minigene. Signalpeptid (blau), F1/F2 Domäne (rot), 3'cysteinreiche Region VI (violett), Transmembrandomäne (grau), zytoplasmatische Domäne (schwarz), GFP (grün). (B) Western- Blot mit GFP spezifischen Antikörpern von Wildtyp (WT) und den Zelllinien E1-E4 Proteinextrakten. Der Antikörper erkennt ausschließlich die Fusionsproteine in den transgenen Zelllinien. Die angezeigten Banden besitzen die erwartete Größe.

3. Die konservierte Region VI ist für die Zielsteuerung von EBA-175 verantwortlich.

Die Lokalisation der EBA-175-GFP-Fusionsproteine (E1-E4) wurde mikroskopisch untersucht (Abb.11). Während die Fusionsproteine, die beide die cysteinreiche Region VI besitzen (E1 und E2), in den apikalen Bereichen von Schizonten und freien Merozoiten sichtbar sind (Abb. 11A, B), gelangen die Proteine ohne diese Domäne (E3 und E4) nur bis zum endoplasmatischem Retikulum (ER) und akkumulieren in einer perinukleären Region (Abb. 11C, D).

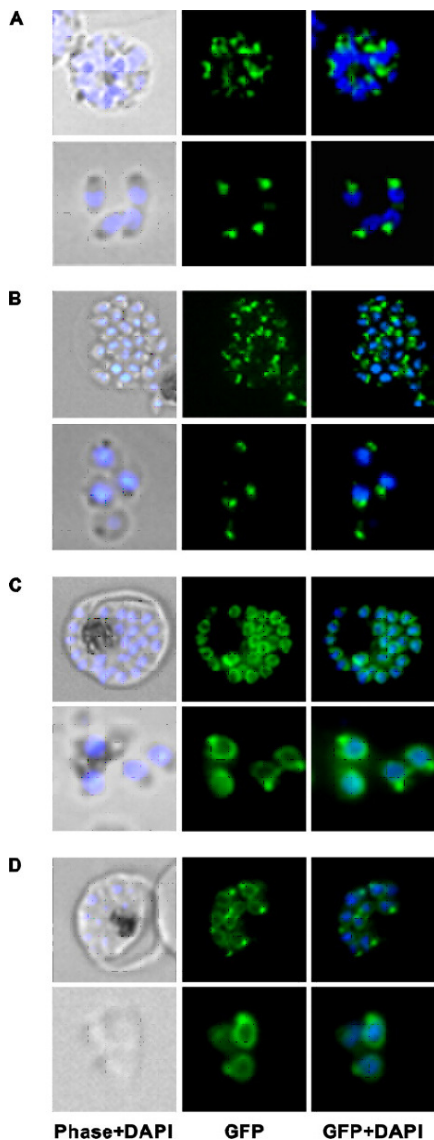


Abbildung 11: Lokalisation von EBA-175 GFP in unfixierten Parasiten

(A) und (B) die Fluoreszenz des Fusionsproteins befindet sich bei den Parasiten die E1 und E2 exprimieren in den apikalen Regionen der Merozoiten und Schizonten. (C) und (D), die Verteilung der GFP-Fusionsproteine E3 und E4 (grün) ist auf einen perinukleären Bereich beschränkt (beide Fusionsprodukte besitzen keine Region VI). Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt.

Diese Ergebnisse wurden im IFA (Immunfluoreszenz Assay) bestätigt. Dazu wurde eine Formaldehyd/Glutaraldehyd-Fixierung verwendet, welche die Fluoreszenz des GFP nicht beeinträchtigt.

Die beiden Zelllinien E1 und E2, die beide die 3'cysteinreiche Region VI besitzen, kolokalisieren mit EBA-175 im apikalen Bereich von Schizonten und Merozoiten (Abb. 12A), wobei der gegen EBA-175 gerichtete Antikörper nicht die GFP-Fusionproteine

erkennt. E3 und E4 können weder mit einem Mikronemenprotein, noch mit einem

Oberflächenprotein kolokalisiert werden (Abb. 12B, C). Sie können partiell mit dem Golgi-Marker GRASP kolokalisiert werden, wie es für ER-lokalisierte

Proteine beschrieben ist (Struck et al., 2005). Zusätzlich wurde die unterschiedliche Lokalisation der EBA-175-GFP-Fusionsproteine in folgende vier Phänotypen charakterisiert und quantifiziert (Abb. 12E): I) Parasitophore Vakuole (pv), II) intermediärer Typ, bei dem sowohl apikales als auch ER-ständiges Fusionsprotein gesehen wird III) apikale und IV) perinukleäre Lokalisation.

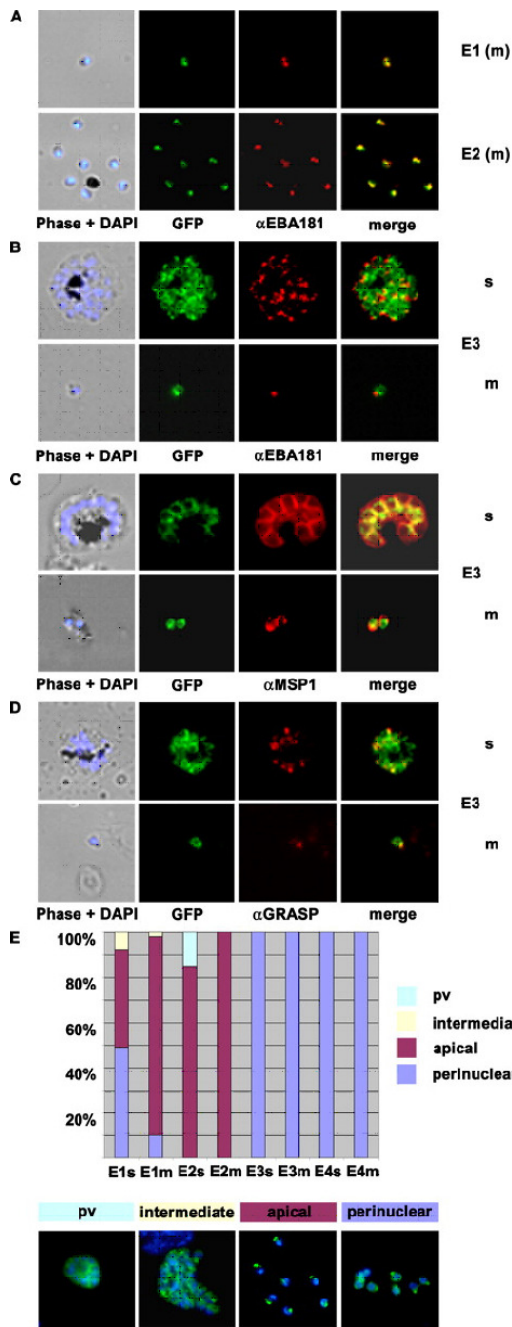


Abbildung 12: Kolokalisation der EBA-175-GFP-Fusionsproteine

(A) in E1 und E2-GFP-Parasiten kann die Fluoreszenz (grün) mit EBA-181-spezifischen Antikörpern (rot) kolokalisiert werden (merge). (B) E3 (und E4, Daten nicht gezeigt) wird nicht in die Mikronemen transportiert (grün). Es kolokalisiert nicht mit dem Mikronemenmarker EBA-181 (rot) sondern akkumuliert in einem perinukleären Kompartiment. (C) MSP-1-spezifische Antikörper (rot) zeigen eine unterschiedliche Lokalisation zur Oberfläche an. (D) Das Fusionsprodukt überlappt partiell mit dem Golgi-Marker GRASP (rot). (E) Quantitative Analyse der Zelllinien (E1-E4). Es wurden jeweils 100 Parasiten ausgezählt und die Verteilung der GFP-markierten Proteine in folgende Kategorien eingeteilt: I) parasitophore Vakuole (pv, hellblau), II) intermediärer Phänotyp (gelb), III) apical (rot) und IV) perinukleäre Lokalisation (violett).

4. Zeitlich korrekte Expression ist für den Transport von EBA-175 in die Mikronemen essentiell

In früheren Publikationen wurde eine zeitlich korrekte Expression, welche dem endogenen Protein ähnlich ist, als Voraussetzung für einen erfolgreichen Transport in die Mikronemen postuliert (Kocken et al., 1998). Um dieses für den Transport von EBA-175 in *P. falciparum* zu überprüfen, wurde das Konstrukt E2 unter der Kontrolle des *crt*-Promotors (chloroquin-resistance transporter) exprimiert und die Auswirkungen auf den Transport des Fusionsproteins analysiert. Der *crt*-Promotor (im Gegensatz zum *ama-*

I-Promotor) bewirkt eine konstitutive Expression der Fusionsproteine in den Blutstadien (s. Abb. 13 A1 und C1). Während E2 unter Kontrolle des *ama-1*-Promotors in den Mikronemen akkumuliert (s. Abb. 11A, 12A), führt die Expression unter dem *crt*-Promotor zu einer fehlerhaften Lokalisation in der parasitophoren Vakuole (Abb. 13B).

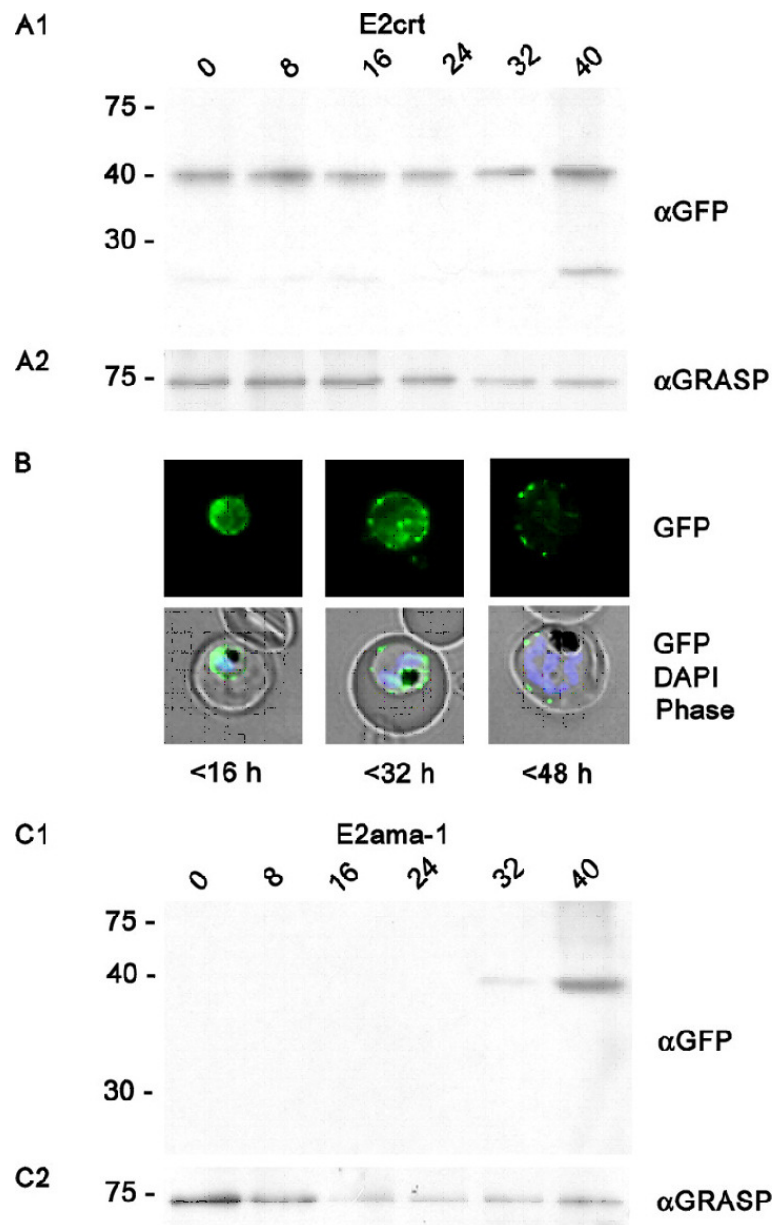


Abbildung 13: Einfluss der zeitlichen Expression auf die Lokalisation von Mikronemenproteinen

(A) Stadienspezifischer Western-Blot von E2_{cr}-Parasiten. **A1:** α -GFP Antikörper weisen die Expression von E2 unter der Kontrolle des CRT- Promotors in allen Stadien nach. **A2:** α -GRASP wurde als Ladekontrolle in diesem stadienspezifischen Western-Blot verwendet. (B) Die Fluoreszenz von E2_{cr}- GFP kann in allen erythrozytären Stadien beobachtet werden. Das Fusionskonstrukt scheint in der parasitophoren Vakuolenmembran lokalisiert zu sein. (C) Stadienspezifischer Western-Blot von E2_{ama-1} **C1:** Die Expression von E2 unter dem *ama-1* Promotor ist auf späte Stadien beschränkt (≥ 40 h post-Infektion). **C2:** α -GRASP Antikörper wurden als Ladekontrolle verwendet. Alle Proben wurden in 8h Intervallen von synchroner Kultur mit ca. 10% Parasitämie entnommen.

4.1.3 Diskussion

Die Proteine der Rhoptrien und Mikronemen sind für eine rationale Impfstoffentwicklung von großem Interesse, da experimentell gezeigt werden konnte, dass gegen sie gerichtete Antikörper die Invasion in Erythrozyten zu 100 % blockieren können. Die Identifizierung eines spezifischen Sequenzmotives, welches für den Transport der Proteine in die jeweiligen sekretorischen Organellen verantwortlich ist, wäre von großer Bedeutung, da es eine genomweite Analyse und Identifizierung von neuen, bisher unbekanntem sekretorischen Proteinen ermöglichen würde.

Die Sequenzierung des Genoms von *P. falciparum* im Jahre 2002 (Gardner et al., 2002) ermöglicht die bioinformatische Suche nach Genen oder Proteinen mit bestimmten Eigenschaften. Neben der Suche nach Domänen mit bekannter Struktur ermöglicht die Kenntnis bestimmter Signalsequenzen wie etwa Signalpeptide, Apikoplasten-Targeting-Sequenzen oder PEXEL-Motive, auch die Vorhersage der Lokalisation bisher uncharakterisierter Proteine (Foth et al., 2003; Hiller et al., 2004; Hiller et al., 2005; Marti et al., 2005; Marti et al., 2004; Sargeant et al., 2006; van Ooij et al., 2008). In *P. falciparum* sind Proteine, die direkt an der Invasion beteiligt sind, in den sekretorischen Organellen, den Mikronemen und den Rhoptrien gelagert. Neben einem N-terminalen Signalpeptid sind Sequenzmotive, die den Transport dieser Proteine in ihre Zielorganellen steuern, bisher unbekannt. In *Toxoplasma* wurde im Jahr 2000 eine tyrosinabhängige Zielsteuerungssequenz für Rhoptrienproteine postuliert, die den zytoplasmatischen Sortiermotiven anderer Organismen homolog ist (Bonifacino and Traub, 2003; Hoppe et al., 2000). Sie sind Bindungsstellen für Adapterproteine (AP-1- AP-4), welche aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sind. Dabei bestimmen die μ -Ketten die Spezifität für eine bestimmte Zielsteuerungssequenz. Die Adapterproteine assoziieren mit Komponenten der Vesikelhülle, was schließlich zur Vesikelbildung und Abknospung am Golgi führt. 2003 konnte jedoch für ein gut untersuchtes *Plasmodium* Typ-I-Transmembranprotein (EBA-175) gezeigt werden, dass der Transport dieses Proteins unabhängig von der zytoplasmatischen Domäne ist, obwohl (degenerierte) Tyrosin-Sortiersignale vorhanden sind (Gilberger et al., 2003a). In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Ergebnis auf die beiden verwandten Mitglieder der EBL-Familie (EBA-181, und EBA-140) ausgeweitet werden. Um den für den Transport verantwortlichen Bereich weiter einzugrenzen, wurde eine Deletion der CTD und der Transmembrandomäne von EBA-175 vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass auch die Transmembrandomäne für den gerichteten Transport in die Mikronemen keine Rolle spielt.

Mit Hilfe von episomal exprimierten „Minigenen“, die Domänen von EBA-175 in verschiedener Kombination kodieren, konnte schließlich gezeigt werden, dass die Region VI von EBA-175 im luminalen Bereich für den Transport in die Mikronemen ausreicht.

Über die Mechanismen des zielgerichteten und differentiellen Transports von Proteinen entweder in die Mikronemen oder Rhoptrien werden zwei grundlegende Hypothesen diskutiert. Zum einen könnte es aufgrund von Protein-Protein Interaktionen in spezialisierten Bereichen des Golgis zu einer Ansammlung von Rhoptrien- oder Mikronemenproteinen kommen (Meissner et al., 2002). Diese Proteinkomplexe könnten dann als Vesikel für die Rhoptrien oder als fertige Mikronemen abknospen und an ihren Bestimmungsort gelangen. Hinweise darauf liefert eine elektronenmikroskopische Arbeit, in der gezeigt wurde, dass Mikronemen als scheinbar fertiges Organell entlang einer „Mikrotubuli-Schiene“ in den apikalen Bereich transportiert werden (Bannister et al., 2003). Andererseits könnten Rezeptorproteine, die entweder mit Mikronemen- oder Rhoptrienproteinen interagieren, den zielgerichteten Transport in endosomale Vesikel gewährleisten. Die Rezeptorproteine würden dann ihrerseits die nötige Sequenzinformation in ihrer zytosolischen Domäne enthalten (Gilberger et al., 2003a). Möglicherweise werden in *P. falciparum* beide Mechanismen verwendet.

Proteine der sekretorischen Organellen werden nicht konstitutiv in die Mikronemen oder Rhoptrien transportiert, sondern es findet eine transkriptionelle Regulation statt. Eine korrekte zeitliche Expression von EBA-175 und AMA-1 (Kocken et al., 1998) spielt eine Rolle beim Transport, was die Abhängigkeit der Assoziation mit anderen Proteinen unterstreicht. Eine frühe Expression des Proteins führt zu einer Fehllokalisierung in der parasitophoren Vakuole. In dieses Kompartiment werden Proteine dirigiert, welchen spezielle Sortiermotive fehlen (Waller et al., 2000). Dies kann damit erklärt werden, dass die Biogenese der sekretorischen Organellen erst in späteren Stadien beginnt. Fehlen Komponenten der Organell-Biogenese (wie im Falle einer frühen Expression der Minigene unter dem CRT Promotor), werden die Proteine durch den "default" Weg in die parasitophore Vakuole, bzw. die parasitophore Vakuolenmembran geschleust.

Damit gleichen sie den reguliert sekretierten Proteinen in sekretorischen Zellen, wie z.B. Leberzellen oder Nervenzellen, die Neurotransmitter oder Hormone auf einen Reiz hin schnell sekretieren. Hier findet das Sorting im Trans-Golgi-Netzwerk statt (Arvan, 2004; Arvan and Castle, 1992; Chant and Huttner, 1991; Dikeakos and Reudelhuber, 2007). Dazu gibt es zwei Hypothesen: i) Die „sorting for entry“ Hypothese, bei denen regulierte sekretorische Proteine im Golgi aufgrund eines verminderten pH-Wertes und erhöhter

Calcium-Konzentrationen mit einem Sorting-Rezeptor interagieren. Dies führt zur Bildung von Proteinkomplexen, die dann in sich bildende Vesikel aufgenommen werden können. Die ii) „sorting by retention“ Hypothese beschreibt eine Abschnürung ganzer Teilbereiche des Golgis als unreife sekretorische Vesikel. Durch eine selektive Rückführung von Proteinen aus diesen Vesikeln zum Golgi kommt es zur Konzentration von sekretorischen Proteinen in den Vesikeln. Welche der beiden Hypothesen bei *P. falciparum*, oder allgemeiner für die Apicomplexa gilt, ist noch unklar.

In *P. falciparum* ist als Beispiel für eine Aggregation und daraus resultierendem Transport, das GPI-verankerte Rhoptrienprotein RAMA bekannt. RAMA interagiert im sekretorischem Pathway mit den Rhoptrienproteinen RAP1 (Rhoptry associated protein), RAP2 und RhopH3 (high-molecular mass rhoptry protein), wie in FRET-Studien (Fluorescence resonance energy transfer) gezeigt wurde (Topolska et al., 2004). Die RAP Familie besteht aus drei Proteinen (RAP1, RAP2 und RAP3), die in späten Stadien der Schizontenentwicklung exprimiert und in den Rhoptrien lokalisiert sind. Sie formen einen Proteinkomplex, dessen Funktion nicht bekannt ist. Die C-terminale Deletion von ca. 1400 Basenpaaren des *rap1*-Gens führt zu einer Zerstörung des Komplexes und resultiert in der Retention der einzelnen Familienmitglieder im endoplasmatischen Retikulum (Baldi et al., 2000). Im Gegensatz dazu führt ein Gen-Knock-out des *rap3*-Gens nicht zu einer Retention von RAP1 und 2 im sekretorischen Transportweg, was für eine zentrale Rolle des RAP1 Proteins beim Transport spricht (Baldi et al., 2002). Weitere Beispiele für eine Komplexbildung beim Proteintransport findet man bei *T. gondii*. Dort ist die Assoziation von z.B. MIC2 (microneme protein 2) und MIC2AP (microneme protein 2 associated protein) gezeigt worden. Dabei besitzt MIC2AP ein Propeptid, welches in einem endosomalen Kompartiment prozessiert wird, was schließlich die Translokation in die Mikronemen ermöglicht (Harper et al., 2004; Harper et al., 2006; Huynh et al., 2006; Huynh et al., 2003). MIC2 besitzt in der zytoplasmatischen Domäne zwei Targeting-Signale, welche den Komplex in Micronemen leiten und damit eine Eskorterfunktion übernehmen.

Weiterführende Arbeiten zielen auf die Identifizierung von putativen EBL- Bindungspartnern mit Eskorterfunktion ab.

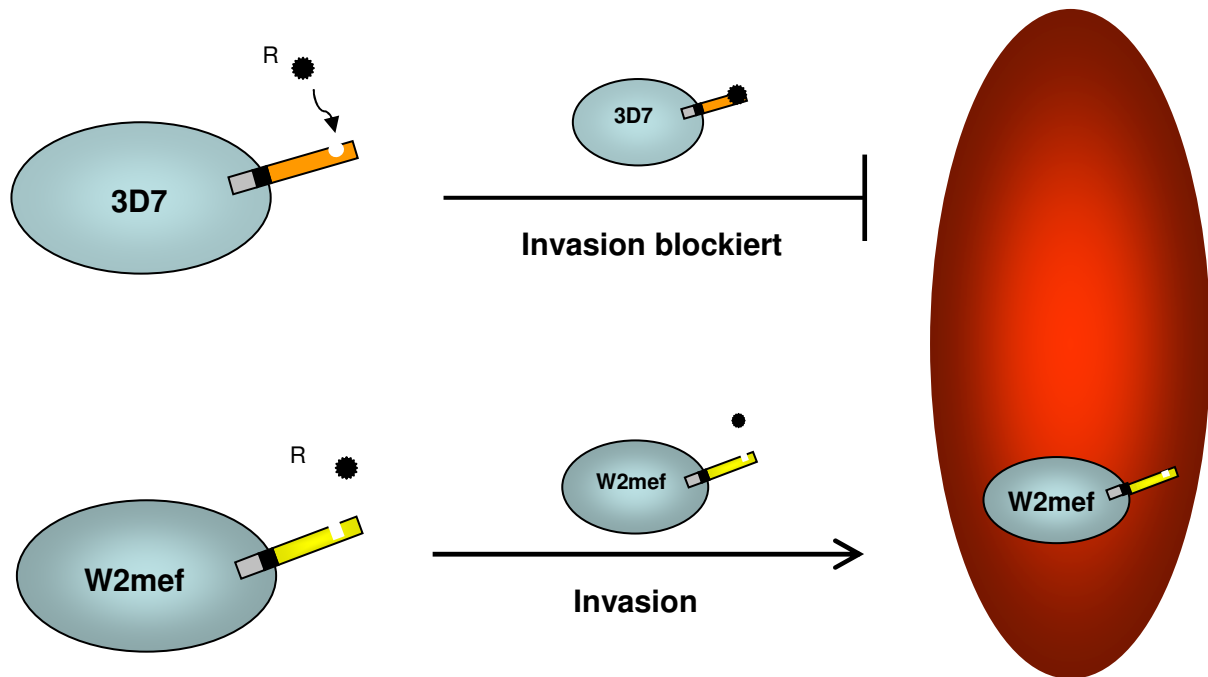
4.2 Funktionelle Untersuchung des Malaria Impfstoffkandidaten AMA-1 (Apical Membrane Antigen)

„Functional analysis of the leading vaccine candidate AMA-1 reveals an essential role for the cytoplasmic domain in the invasion process.“

4.2.1 Einleitung

AMA-1 ist ein Typ I Transmembranprotein und ist im Gegensatz zu den EBL-Proteinen essentiell für die Invasion von Erythrozyten. AMA-1 wird von hyperimmunem Serum erkannt (Peterson et al., 1995; Thompson et al., 2001). Antikörper gegen AMA-1 können die Invasion von Merozoiten in Erythrozyten *in vitro* verhindern (Hodder et al., 2001) und eine Vakzinierung mit rekombinantem AMA-1 kann Immunität erzeugen (Burns et al., 2003; Crewther et al., 1996; Genton and Reed, 2007; Narum et al., 2000; Polhemus et al., 2007; Thera et al., 2008). 2004 konnten Healer und ihre Mitarbeiter mit Hilfe von transgenen Parasiten zeigen, dass Primärsequenzunterschiede im AMA-1 Protein von zwei unterschiedlichen *P. falciparum* Stämmen (3D7 versus W2mef) verantwortlich dafür sind, dass verschiedene Antikörper unterschiedlich stark die Reinvansion von Parasiten in Erythrozyten verhindern (Healer et al., 2004). Harris und seine Mitarbeiter (Harris et al., 2005) konnten dann durch die „Phage Display Technologie“ ein Peptid identifizieren (R1-Peptid), das ähnlich wie bestimmte monoklonale Antikörper eine Reinvansion von Erythrozyten parasitenstammspezifisch verhindern kann, indem es an einen bestimmten Bereich von AMA-1 bindet (siehe Abb. 14). Obwohl AMA-1 als führender Vakzinekandidat gilt, ist ebenso wenig über die Dynamik von AMA-1 vor und während des Invasionsprozess wie über die Funktion oder die funktionellen Bereiche dieses Proteins bekannt.

A:



B:

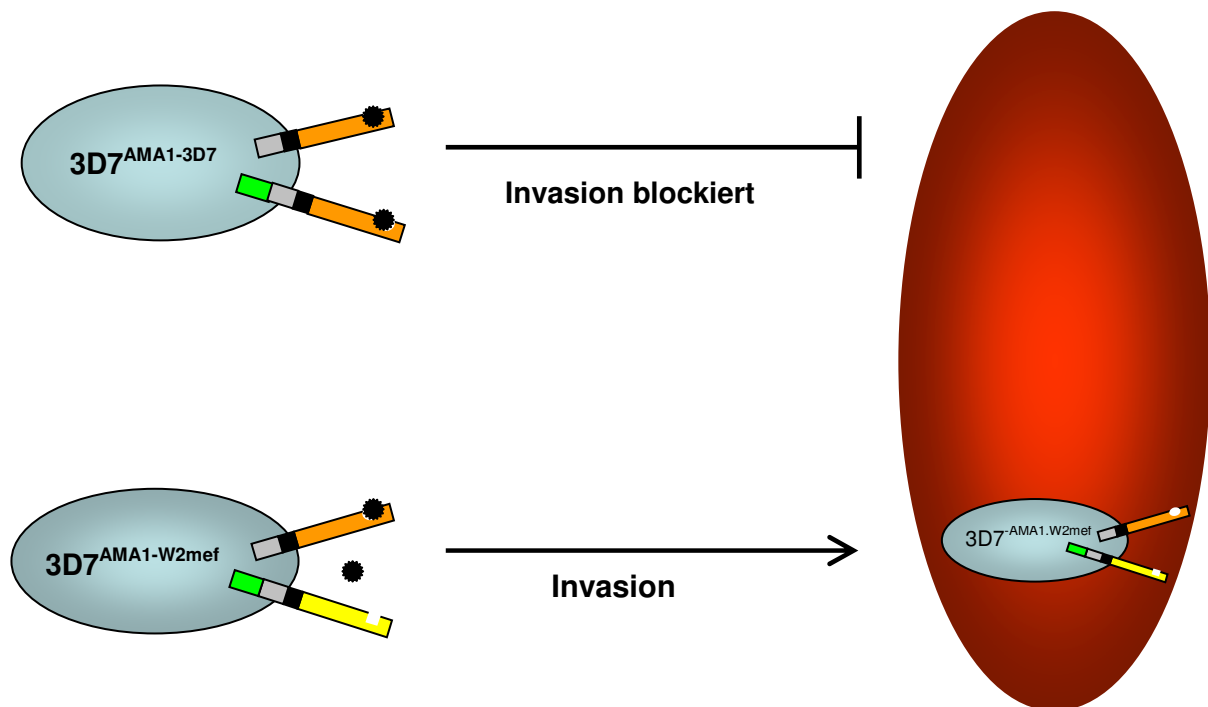


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Inhibition der Invasion mit Hilfe des 3D7 spezifischen Peptids R1 (A) und Komplementation durch AMA-1 aus W2mef (B)

(A) Das R1 Peptid (schwarzer Stern) bindet an die extrazelluläre Domäne von AMA-1 in 3D7 (orange), jedoch nicht an die AMA-1 Variante aus W2mef Parasiten (gelb) und inhibiert so die Invasion durch 3D7 Parasiten. (B) Die Expression von 3D7 AMA-1 in 3D7-Parasiten ($3D7^{AMA1-3D7}$) kann die Inhibition durch das R1-Peptid nicht komplementieren. Expression von W2mef AMA-1 in 3D7 Parasiten ($3D7^{AMA1-W2mef}$) führt zu einer Komplementation und die Parasiten können in den Erythrozyten invadieren.

4.2.2 Ergebnisse

1. AMA-1 kann episomal als GFP-Fusion exprimiert werden

AMA-1 wurde von genomischer DNA von 3D7- oder W2mef-Parasiten (Abb. 15A) amplifiziert und in den pARL-AMA-1-GFP Vektor kloniert, bei dem die Expression des Transgens vom AMA-1-Promotor kontrolliert wird (Treeck et al., 2006). Die Konstrukte wurden in den *P. falciparum* 3D7-Stamm transfiziert. Western-Blot-Analysen zeigen, dass beide Proteine (AMA-1_{3D7}-GFP und AMA-1_{W2mef}-GFP) korrekt exprimiert und prozessiert werden (Abb. 15B). GFP-spezifische monoklonale Antikörper erkennen die Fusionsproteine mit einer Größe von 110- bzw. 92 kDa (Propeptid abgespalten). Beide Fusionsproteine werden in gleichen Mengen wie endogenes AMA-1 exprimiert, wie mit einem polyklonalen AMA-1-Antikörper gezeigt wird (Abb. 15C). Dieser Antikörper erkennt sowohl die endogenen AMA-1 Fragmente (83 und 66 kDa) als auch die GFP-Fusionsproteine (110 und 92 kDa). Ein monoklonaler Antikörper (1F9) gegen AMA-1_{3D7} erlaubt die spezifische Detektion des endogenen AMA-1 (3D7 ist die Ursprungszelllinie für die transgenen Parasiten), aber nicht AMA-1_{W2mef} (Abb. 15D). In lebenden Parasiten kann AMA-1_{W2mef}-GFP (und AMA-1_{3D7}-GFP, Daten nicht gezeigt) in Schizonten im apikalen Bereich und in freien Merozoiten auf der Oberfläche lokalisiert werden (Abb. 15E). Das GFP-Fusionsprotein kolokalisiert hierbei mit dem endogenen AMA-1, wie durch die Verwendung des monoklonalen α -AMA-1_{3D7} Antikörpers in IFAs gezeigt werden kann (Abb. 15F).

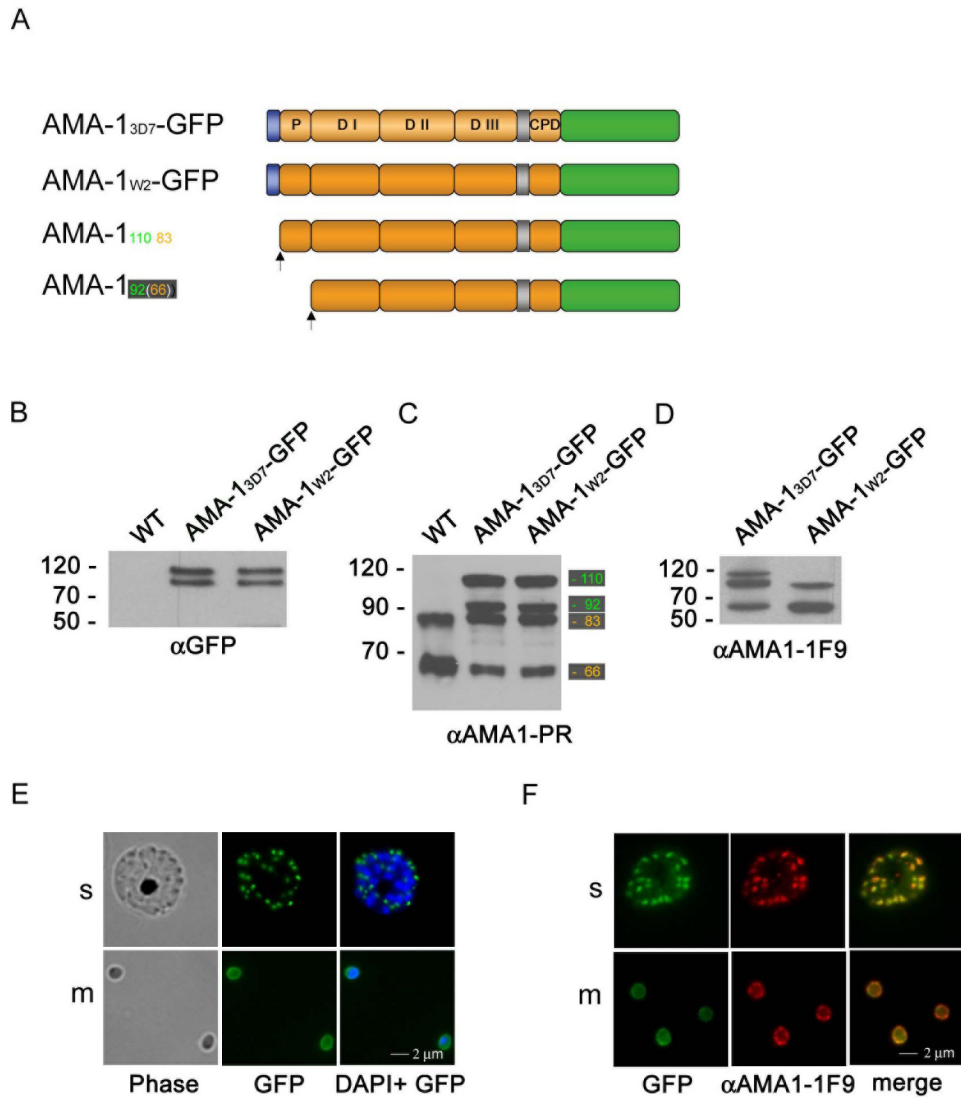


Abbildung 15: Expression und Lokalisation von AMA-1_{3D7}-GFP und AMA-1_{W2mer}-GFP in transgenen Parasiten

(A) Schematische Darstellung von AMA-1-GFP Fusionsproteinen: Signalpeptid (blau), Transmembrandomäne (grau), Prodomäne (P), Domänen I-III und zytoplasmatische Domäne (orange), GFP (grün). AMA-1_{3D7}-GFP ist hellbraun hinterlegt. Die Protease-Schnittstellen des Signalpeptids und der Prodomäne sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Größe der Banden sind entweder in grün (GFP-Fusion) oder braun (Wildtyp AMA-1) gezeigt. (B) Western-Blot-Analyse mit GFP-spezifischen Antikörpern weisen jeweils zwei Fragmente (110 kDa und 92 kDa) von AMA-1_{3D7}-GFP und AMA-1_{W2mer}-GFP in den transgenen Parasiten, aber nicht in Wildtyp - Parasiten nach. (C) Western Blot Analyse der transgenen AMA-1_{3D7}-GFP und AMA-1_{W2mer}-GFP Expression mit einem AMA-1-spezifischen polyklonalen Antikörper. In Wildtyp Parasiten werden die endogenen AMA-1 Fragmente (83 kDa und eine 66 kDa) erkannt. In den transgenen Zelllinien werden zwei weitere Fragmente der GFP-Fusionsproteine erkannt. (D) Der 3D7 spezifische AMA-1-Antikörper (1F9) erkennt nur das endogene AMA-1, aber nicht AMA-1_{W2mer}-GFP. (E-F) Lokalisierung von AMA-1_{W2mer}-GFP. (E) In unfixierten Parasiten ist AMA-1_{W2mer}-GFP (grün) in Schizonten (s) in den apikalen Bereich der Merozoiten konzentriert und wird nach der Merozoitenfreisetzung über die Oberfläche der Merozoiten (m) verteilt. (F) Die Verteilung von AMA-1_{W2mer}-GFP ist mit der vom endogenen AMA-1-Protein (dargestellt durch den 1F9 Antikörper, rot) identisch (merge). Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt.

2. Dynamik von AMA-1 während der Merozoitenfreisetzung: Live-Videofluoreszenzmikroskopie

Die Dynamik und Oberflächentranslokation von AMA-1 in lebenden Parasiten wurde mit Hilfe der Fluoreszenzvideomikroskopie dargestellt (Abb. 16). In der abgebildeten Zeitreihe ist ein AMA-1_{w2mef}-GFP exprimierender Schizont zu sehen, der nach ca. 20 Sekunden Merozoiten freisetzt. Freie Merozoiten zeigen eine apikale Lokalisation von AMA-1-GFP. Über die Dauer des Experiments (120s) kommt es zu einer leichten Verlagerung aus dem apikalen Bereich auf die Gesamtoberfläche des Merozoiten, wobei die meiste Fluoreszenz im apikalen Bereich konzentriert bleibt. Erst nach einigen Minuten erscheint AMA-1 gleichmäßig über die Oberflächen des Merozoiten verteilt zu sein (Abb.17).

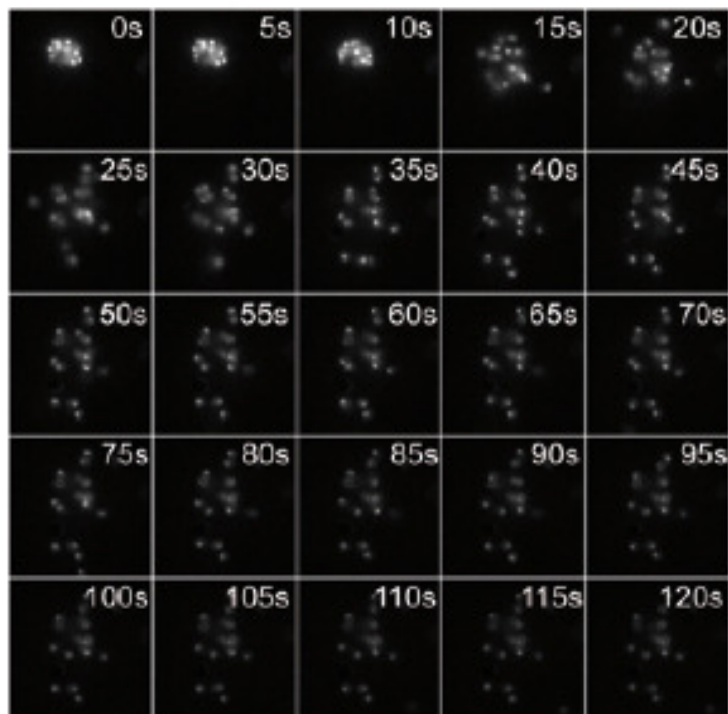


Abbildung 16: Mikroskopische Zeitreihe eines aufplatzenden Schizonten

Das fluoreszierende AMA-1-GFP wurde in Epifluoreszenzaufnahmen über einen Zeitraum von 120 Sekunden mit einer Bildrate von 1 Bild/ Sekunde gefilmt. Ein Schizont mit hauptsächlich apikaler AMA-1-GFP Lokalisation platzt auf und die entlassenen Merozoiten zeigen eine vorwiegend apikale Lokalisation des Fusionsproteins mit etwas Lokalisation auf der Oberfläche (=Peripherie).

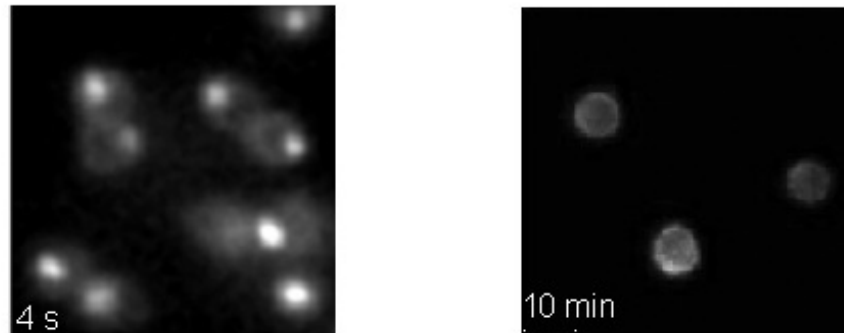


Abbildung 17: Dynamische Veränderungen der AMA-1 Lokalisation nach Freisetzung der Merozoiten

Direkt nach der Ruptur (4s) eines Schizonten wird AMA-1-GFP auf der Oberfläche, als auch mit einer starken Konzentration im apikalen Bereich vorgefunden. Mit zunehmender Zeit findet man eine erhöhte Menge von AMA-1-GFP auf der Oberfläche und weniger im apikalen Bereich.

3. FLIP und FRAP Analysen zeigen, dass das apikal konzentrierte AMA-1 aufgrund seiner unterschiedlichen Diffusionsfähigkeit vom peripheren AMA-1 unterschieden werden kann.

„Fluorescence Loss In Photobleaching“ (FLIP) und „Fluorescence Recovery After Photobleaching“ (FRAP) -Experimente können Auskunft über die Mobilität von Molekülen in einer Membran geben. FLIP-Analysen von AMA-1_{w2mef}-GFP-exprimierenden Parasiten, bei denen ein großer Teil des basalen Bereiches der Merozoiten durch einen Laserimpuls ausgebleicht wurde, zeigen, dass der Verlust der Fluoreszenz im apikalen Bereich verzögert auftritt. Die Kinetiken des Fluoreszenzverlustes für die einzelnen Bereiche (und Referenzmerozoiten) sind in Abb. 18D dargestellt. In der Region, die geblichen wurde, ist ein schneller starker Abfall der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen (grün), während die Kontrollmerozoiten keine Veränderung in der Fluoreszenzintensität zeigen (orange, gelb, hellrot). Die Fluoreszenz im apikalen Bereich (braun) nimmt über den Zeitraum von einer Sekunde stetig ab, bevor es zu einem Equilibrium kommt.

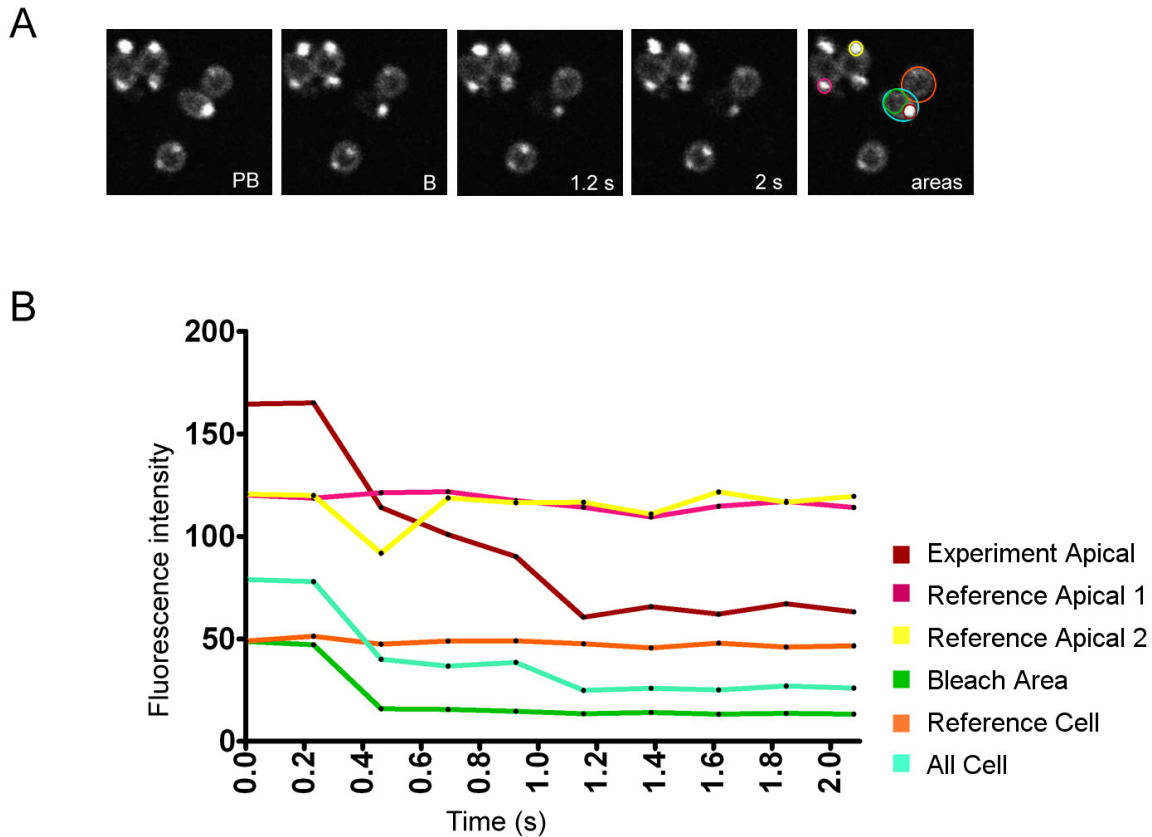


Abbildung 18: FLIP-Analyse von AMA-1_{w2mer}-GFP nach der Merozoiten-Freisetzung: Apikales AMA-1 zeigt eingeschränkte Mobilität

(A) FLIP-Analyse von freien Merozoiten direkt nach ihrer Freisetzung. Zeitreihe: Prä-Bleichung (PB), Bleichimpuls (B) und 1,2 bzw. 2,0 Sekunden nach dem Bleichpuls (1,2 und 2s). Die Regionen, in denen die Fluoreszenz über Zeit gemessen wurde, sind farblich gekennzeichnet. (B) Kinetik der Veränderung der Fluoreszenz für jede dieser Regionen. Der Bleichpuls ist bei 0,2 Sekunden. Die Kurve zeigt einen nahezu kompletten Verlust der Fluoreszenz in der gebleichten Region (grün) in weniger als 0,2 s, wohingegen die im apikalen Bereich konzentrierte Fluoreszenz langsam abnimmt (braun). Nach 0,4 Sekunden ist die apikale Fluoreszenz um 50% reduziert und erst nach 1 s stellt sich ein Equilibrium ein. Die Intensität von drei Referenzmerozoiten wurde gemessen (orange, gelb, hellrot) um einen Bleicheffekt durch unfokussiertes Photobleichen auszuschließen.

Um die Mobilität der apikalen AMA-1-GFP Population mit der peripheren zu vergleichen, wurde eine FRAP-Analyse an freien Merzoiten durchgeführt, die bereits eine gleichmäßige, periphere Verteilung des AMA-1-GFP aufweisen (Abb. 19A). Hier wurde ein kleiner Bereich im basalen Teil gebleicht (weiße Fläche) und der Rückfluss von fluoreszierenden Molekülen in den gebleichten Bereich untersucht. Wie in der Kinetik in Abb. 19B zu sehen ist, nimmt die Fluoreszenz in dem gebleichten Bereich (grün) schnell ab, während die Fluoreszenz im apikalen Bereich des Merozoiten leicht verzögert abnimmt (violett). Die qualitative Analyse der Daten (Abb. 19C) ergibt, dass der Rückfluss von ungebleichem AMA-1-GFP in den gebleichten Bereich sehr schnell ist. Die halbmaximale Fluoreszenz (HalfMax) ist innerhalb von 0,148 Sekunden erreicht. Die mobile Fraktion lässt sich mit 89% errechnen, was darauf hindeutet, dass ein Großteil von AMA-1-GFP mobil und innerhalb der Membranebene frei diffundierbar ist.

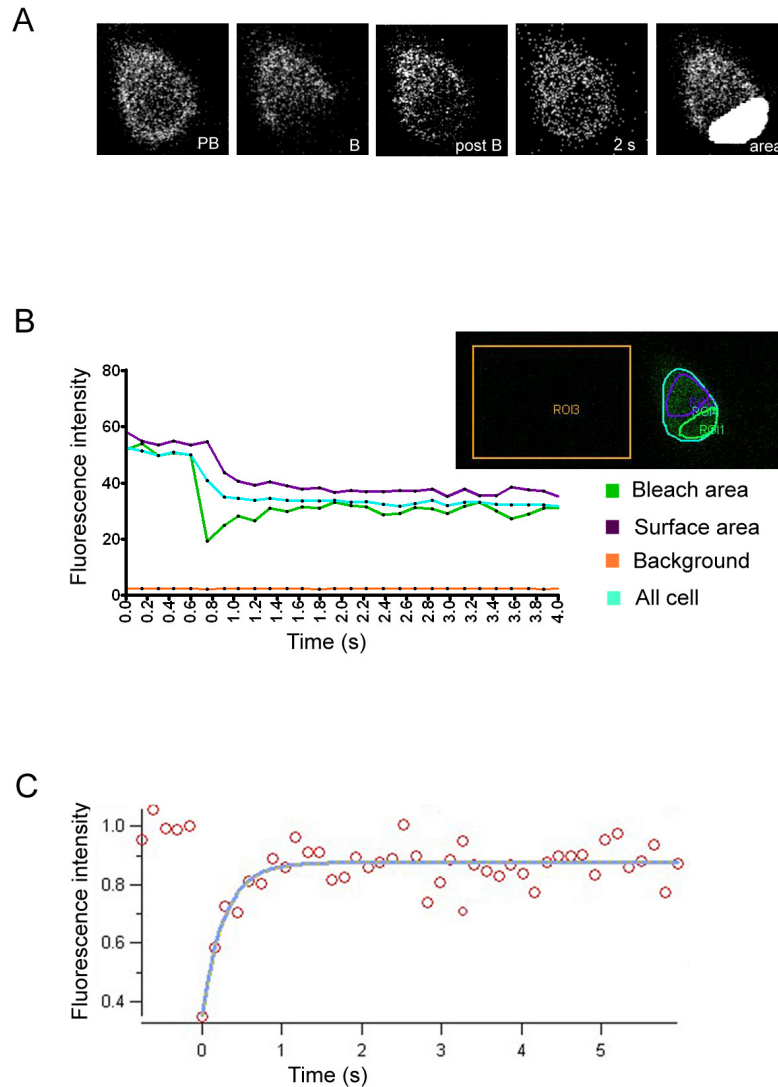


Abbildung 19: FRAP-Analyse von AMA-1_{W2mer}-GFP nach der Merozoiten Freisetzung: Peripheres AMA-1 zeigt hohe Mobilität

(A) Mikroskopische Zeitreihe der FRAP Analyse: PB (Prä-Bleichen), B (Bleichen), post B (nach dem Bleichen) 2 s (2 Sekunden nach dem Bleichpuls). Die gebleichte Fläche ist weiß dargestellt (B) Kinetik der Fluoreszenzveränderung für definierte Regionen. Die definierten Regionen sind in der eingebetteten Abbildung farbig angezeigt. Der Bleichpuls ist nach 0,6 s gesetzt. Alle definierten Regionen sind durch die Bleichung beeinträchtigt. In dem gebleichten Gebiet kann eine schnelle Regeneration der Fluoreszenz beobachtet werden (grün). Die apikale Fluoreszenz (violett) nimmt mit einer Verzögerung von 0,2 s ab. 50% der Oberflächenfluoreszenz (violett) sind innerhalb von 1,57 Sekunden gebleicht. (C) Qualitative Analyse der FRAP- Daten. Die FRAP-Kurve wurde gegen die Prä-Bleich-Intensität normalisiert. Der Zeitpunkt 0 bezieht den Punkt an dem der Bleichpuls gesetzt ist und die Regeneration startet. Die ermittelte Fluoreszenz-Regenerations Halbzzeit liegt bei 0,148 s und die mobile Fraktion der AMA-1-GFP Fusionsprotein liegt bei 89%.

4. Inhibition der Invasion durch AMA-1 spezifisches R1 Peptid und Komplementation durch Expression von AMA-1_{W2mef}-GFP

Die Invasion von 3D7- (aber nicht von W2mef-) Parasiten kann durch die spezifische Interaktion von AMA-1 mit dem R1-Peptid inhibiert werden (Harris et al., 2005 und Abb. 14A, 20D). Der Wirkmechanismus des R1 Peptides wird mit Hilfe der Videomikroskopie veranschaulicht (Abb. 20A, B). Hierzu wird die Invasion von 3D7-Merozoiten in Erythrozyten in Gegenwart (Abb. 20A) und in Abwesenheit (Abb. 20B) des Peptids gefilmt. Die Inhibition der Invasion von 3D7-Merozoiten durch das R1-Peptid führt zu einer Immobilisierung der Merozoiten auf der Oberfläche der Erythrozyten. In dieser Phase findet man AMA-1 an der Kontaktstelle zum Erythrozyten, allerdings kolokalisiert es nicht mit dem Rhoprienmarker Rh2b (Abb. 20C). Interessanterweise laufen in Gegenwart des Peptids (Abb. 20B) die initiale Bindung an den Erythrozyten und die Reorientierung des Merozoiten unverändert ab. Der Unterschied wird erst nach der Reorientierung sichtbar, wenn der Parasit versucht sich in die Wirtszelle zu schieben. Es kommt zu einer starken Deformation des Erythrozyten unter einer gleichzeitigen Vorwärtsbewegung des Merozoiten, die jedoch nicht zu einer Invasion der Wirtszelle führt. Dies deutet darauf hin, dass der im Invasionsprozess beteiligte Fortbewegungsapparat aktiviert wird, ohne jedoch das Eindringen des Parasiten zu erlauben.

Die stammspezifische Inhibition der Invasion bildet die Basis für einen Komplementationsassay (siehe Abb. 14B und 20D). Die episomale Expression von AMA-1_{W2mef}-GFP, aber nicht von AMA-1_{3D7}-GFP, führt zu einer Komplementation des durch das R1-Peptid inhibierten, endogenen AMA-1 (Abb. 20D). Die Invasionsfähigkeit ist allerdings von 80 % (Wildtyp-W2mef-Parasiten) auf 30 % reduziert. Durch den Komplementationsversuch kann gezeigt werden, dass AMA-1 als funktionelles Transgen in Parasiten exprimiert werden kann.

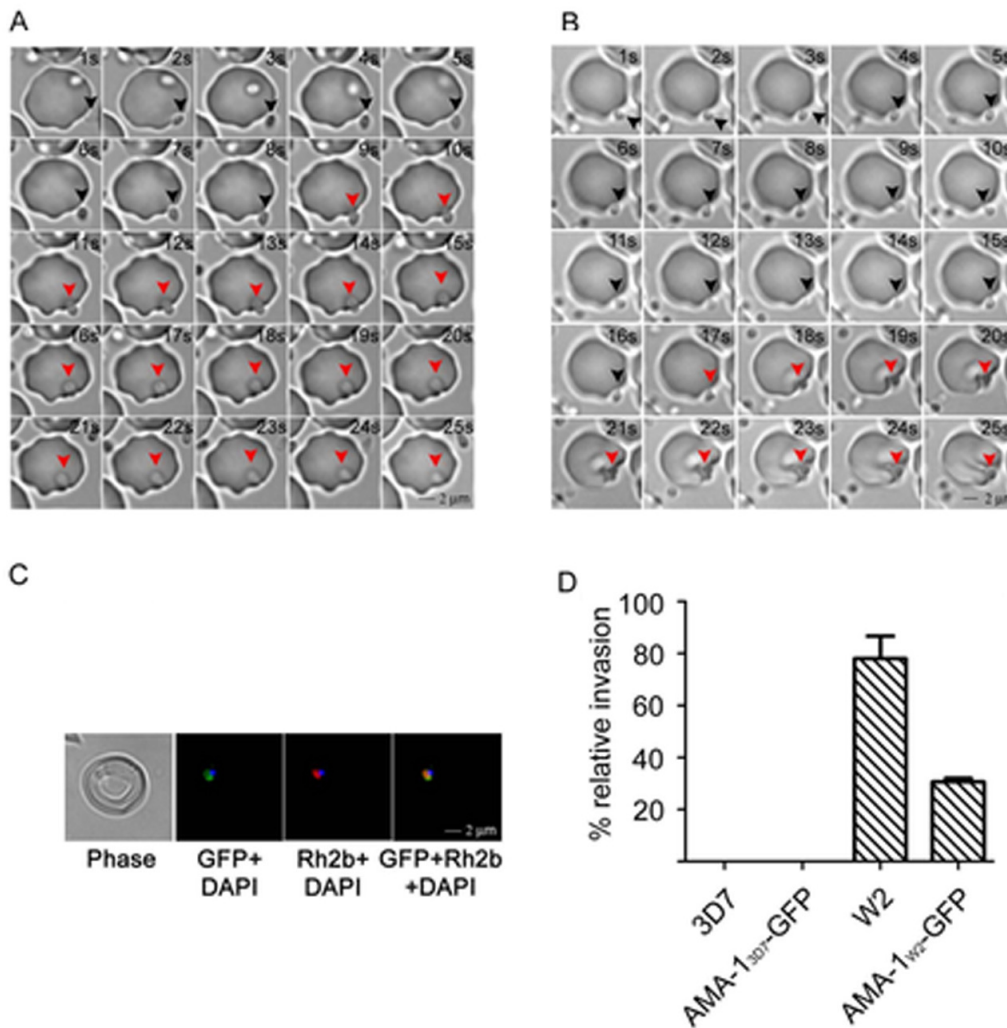


Abbildung 20: Inhibition und Komplementation von AMA-1 während der Invasion

(A-B) Video-Mikroskopie der Erythrozyteninvasion durch 3D7-Merozoiten in Abwesenheit oder Gegenwart des R1-Peptids. (A) Zeitreihe eines Merozoiten, der eine humane rote Blutzelle invadiert. Bildrate: 1 Bild/ s. Ein Merozoit bindet an den Erythrozyten (schwarzer Pfeil) reorientiert sich indem er den apikalen Pol in Kontakt mit der Wirtszelle bringt und invadiert schließlich. Die Reorientierung ist nach ca. 8 Sekunden beendet und der gesamte Invasionsprozess ist nach 12-16 Sekunden vollzogen (rote Pfeile). (B) Zeitserie der Erythrozyteninvasion in Gegenwart von 100µg/ml R1-Peptid. Bildrate: 1 Bild/ s. Obwohl AMA-1 funktionell durch das Peptid inaktiviert wird, kommt es zur Reorientierung des Merozoiten (schwarzer Pfeil), die von einer schnellen Vorwärtsbewegung gefolgt ist (rote Pfeile). Es kommt aber nicht zur Invasion. (C) Immunfluoreszenzaufnahmen von AMA-1_{3D7}-GFP in Anwesenheit des R1-Peptides: AMA-1_{3D7}-GFP (grün) konzentriert sich hauptsächlich auf die Kontaktstelle zwischen Merozoit und Wirtszelle und kolokalisiert nicht mit dem Rhoprien-Marker RH2b (rot). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt. (D) Statistische Auswertung von Erythrozyten-Reinvasionsassays in der Gegenwart von 100µg/ml R1 Peptid. Die Abbildung zeigt die relative Erythrozyteninvasion in Gegenwart oder Abwesenheit des blockierenden Peptids. Im Gegensatz zu W2mef Wildtyp Parasiten kann der 3D7 Stamm in Gegenwart des R1 Peptids nicht invadieren. Während die Expression von AMA-1_{3D7}-GFP die Invasionsfähigkeit nicht verändert, ermöglicht die episodale Expression von AMA-1_{W2mef}-GFP eine Invasion.

5. Die zytoplasmatische Domäne von AMA-1 hat keine Funktion beim Transport oder der Oberflächentranslokation des Proteins

Die Inhibierung der endogenen AMA-1-Funktion und deren Komplementation durch episomale Expression von AMA-1_{w2mef} stellen die Grundlage für eine detaillierte Untersuchung der zytoplasmatischen Domäne während des Invasionsprozesses dar. Zunächst wurde eine Deletionsmutante von AMA-1_{w2mef}-GFP hergestellt, in der die zytoplasmatische Domäne deletiert ist (Abb. 21A). Die Expression des Fusionsproteins wurde in Western-Blot-Analysen mit Hilfe von α -GFP-Antikörpern gezeigt (Abb.21B). Der Einfluss der Deletion auf die Lokalisation wurde in lebenden und fixierten Parasiten untersucht (Abb. 21C, D) und es kann gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Domäne von AMA-1 keine essentiellen Sequenzinformationen für die Zielsteuerung des Proteins zu den Mikronemen oder anschließend auf die Oberfläche besitzt: AMA-1 Δ tail (grün) kolokalisiert in Schizonten (s) und Merozoiten mit endogenen AMA-1 1F9 (rot) (Abb. 21D).

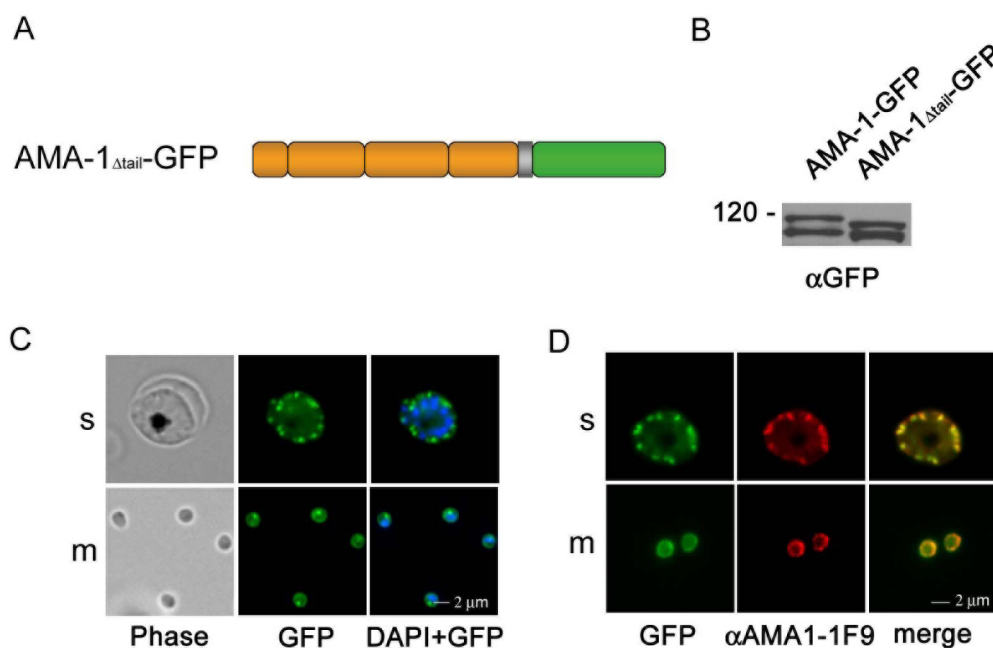


Abbildung 21: Expression von AMA-1 Δ tail-GFP und Kolokalisierung mit endogenem AMA-1

(A) Schematische Darstellung des episomal exprimierten AMA-1-GFP mit einer deletierten zytoplasmatischen Domäne (AMA-1 Δ tail-GFP). (B) Die Expression des Transgens wurde mit GFP-spezifischen Antikörpern verifiziert. (C, D) Die Deletion der zytoplasmatischen Domäne hat keinen Effekt auf den Transport von AMA-1 Δ tail-GFP in Schizonten (s) oder Merozoiten (m). Dies wird in lebenden (C) wie in fixierten (D) Parasiten gezeigt in denen das Transgen (grün) mit dem endogenen AMA-1 (rot) kolokalisiert.

6. Die zytoplasmatische Domäne von AMA-1 ist für die Invasion essentiell

Die Auswirkung von Deletionen oder Mutationen in der zytoplasmatischen Domäne von AMA-1 kann mit Hilfe des entwickelten Komplementationsassays überprüft werden. Dabei zeigt sich, dass AMA-1_{W2mef}-GFP ohne seine zytoplasmatische Domäne funktionell inaktiv ist. Der AMA-1_{Δtail}-GFP exprimierende Parasit kann ohne zytoplasmatische Domäne in Gegenwart des R1-Peptids nicht mehr invadieren (Abb. 22D). Dieses weist auf eine essentielle Rolle dieser Domäne während der Invasion hin.

Um Hinweise auf die funktionelle Spezifität der zytoplasmatischen Domäne zu erhalten, wurden zunächst Substitutionen mit den vergleichbar kurzen zytoplasmatischen Domänen von EBA-175 und RH2b, zwei gut charakterisierten Mikronemen- (EBA-175) oder Rhoprienproteinen (Rh2b) vorgenommen (Abb. 22A). Obwohl diese Chimären (AMA-1_{EBA175}-GFP und AMA-1_{Rh2b}-GFP) exprimiert werden (Abb. 22C) und mit dem endogenen Protein kolokalisieren (Daten nicht gezeigt), können sie die zytoplasmatische Domäne von AMA-1 nicht funktionell komplementieren (Abb. 22D).

Um die funktionalen Bereiche der zytoplasmatischen Domäne genauer zu beschreiben, wurden C-terminale Deletionen (AMA-1-Δ571-588, Δ589-611, Δ12, Δ5-GFP) sowie Substitutionen von einigen hoch-konservierten Aminosäuren (AMA-1_{YD576-AA}-GFP, AMA-1_{DE593-AA}-GFP, AMA-1_{DPE597AA}-GFP, AMA-1_{FW602AA}-GFP) und Mutationen der putativen Phosphorylierungsstellen (AMA-1_{PM}-GFP) eingeführt (Abb. 22A, B). Die Expression dieser AMA-1 Mutanten in 3D7-Parasiten wurden mit Hilfe des Western-Blots nachgewiesen (Fig. 22C) und deren korrekte Lokalisierung durch IFAs mit dem 1F9-Antikörper gezeigt (Daten nicht gezeigt). Komplementationsversuche zeigen, dass alle eingeführten Mutationen bis auf den Austausch von YD574 (AMA-1_{YD576-AA}-GFP) zu einer funktionellen Inaktivierung von AMA-1 führen (Abb. 22D).

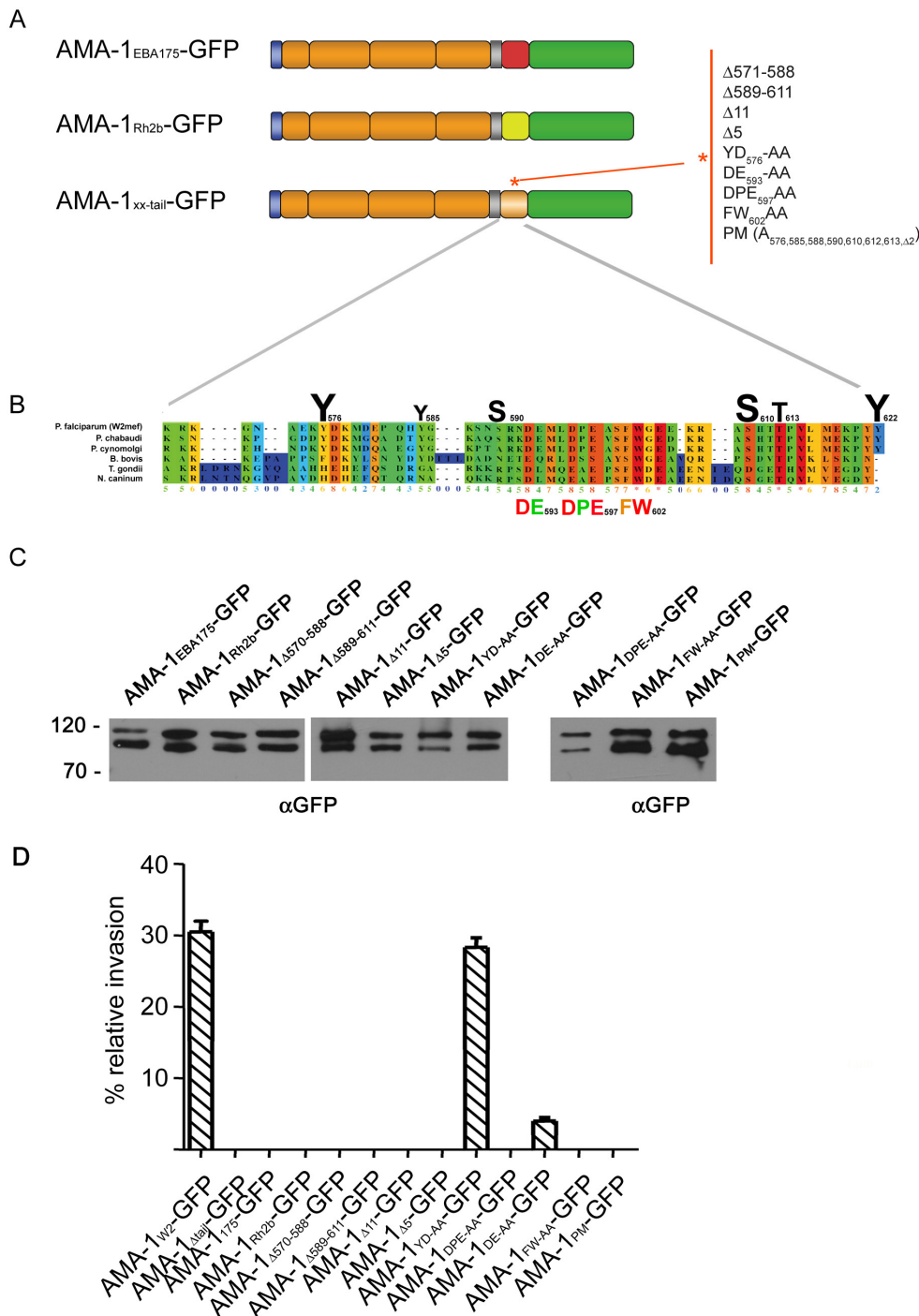


Abbildung 22: Funktionelle Analyse bestimmter Aminosäuren der zytoplasmatischen Domäne von AMA-1

(A) Schematische Darstellung der eingeführten Mutationen. (B) Sequenzvergleich mit homologen AMA-1 anderer Apicomplexa. Der Grad der Konservierung ist beziffert und durch das PRALINE Alignmentprogramm farbkodiert (<http://zeus.cs.vu.nl/programs/pralinewww>). Der Grad der Konservierung wird mit aufsteigenden Nummern von 0-,,*“ dargestellt, wobei 0 für keine Konservierung steht und „*“ für identische Aminosäuren steht. Aminosäuren, die gemäß Vorhersage (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos) phosphoryliert werden können, sind hervorgehoben. Die Schriftgröße der Aminosäure entspricht ihrer Phosphorylierungswahrscheinlichkeit. (C) Die Expression der Fusionsproteine wurde durch GFP-spezifische Antikörper verifiziert. (D) Komplementationsversuche der transgenen Zelllinien in der Gegenwart des R1 Peptids: Die Zelllinie AMA-1_{W2mef}-GFP wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

7. Die zytoplasmatische Domäne von AMA-1 wird phosphoryliert

Mit Hilfe eines Phosphatase-Assays kann gezeigt werden, dass die zytosolische Domäne von AMA-1 phosphoryliert wird. Wie in Abb. 22D dargestellt, führt die Mutagenese der Phosphorylierungsstellen (AMA-1_{PM}-GFP) zu einer funktionellen Inaktivierung des Proteins. Die Prozessierung von AMA-1 auf der Oberfläche des Merozoiten resultiert in einem C-terminalen Fragment, das aus der Transmembran- und der zytosolischen Domäne besteht (Abb. 6, 23A). Dieses ist als GFP-Fusionsprotein in jungen Ringstadien in der Peripherie des Parasiten als zwei punktförmige Foci sichtbar (Abb. 23B). In Western-Blot-Analysen können zwei C-terminale Prozessierungsbanden dargestellt werden, die als GFP-Fusionsproteine eine Größe von 43 und 48 kDa haben (s. Abb. 23C). Die entsprechenden C-terminalen Fragmente von AMA-1_{PM}-GFP zeigen ein deutlich verändertes Laufverhalten in der SDS-Page. Die um ca. 3 kDa verringerte molekulare Masse entspricht nicht der errechneten Massenänderung von 0.6 kDa. Um zu zeigen, dass das veränderte Laufverhalten durch eine Phosphorylierung der zytosolischen Domäne bedingt ist, wurden Parasitenextrakte von AMA-1-GFP und AMA-1_{PM}-GFP mit Lambda-Phosphatase behandelt (Abb. 23D) und ihr Laufverhalten in der SDS-Page verglichen. Dazu wurde AMA-1-GFP solubilisiert (SN) und gegen im Pellet (P) verbleibendes AMA-1 im Western-Blot aufgetragen. Beide Fraktionen zeigen die erwartete Bandengröße. Phosphatase-Behandlung von AMA-1-GFP, nicht aber von AMA-1_{PM}-GFP Parasiten, bewirkt eine deutliche Veränderung des Laufverhaltens (Abb. 23E), was zeigt, dass das Wildtyp-Protein phosphoryliert wird.

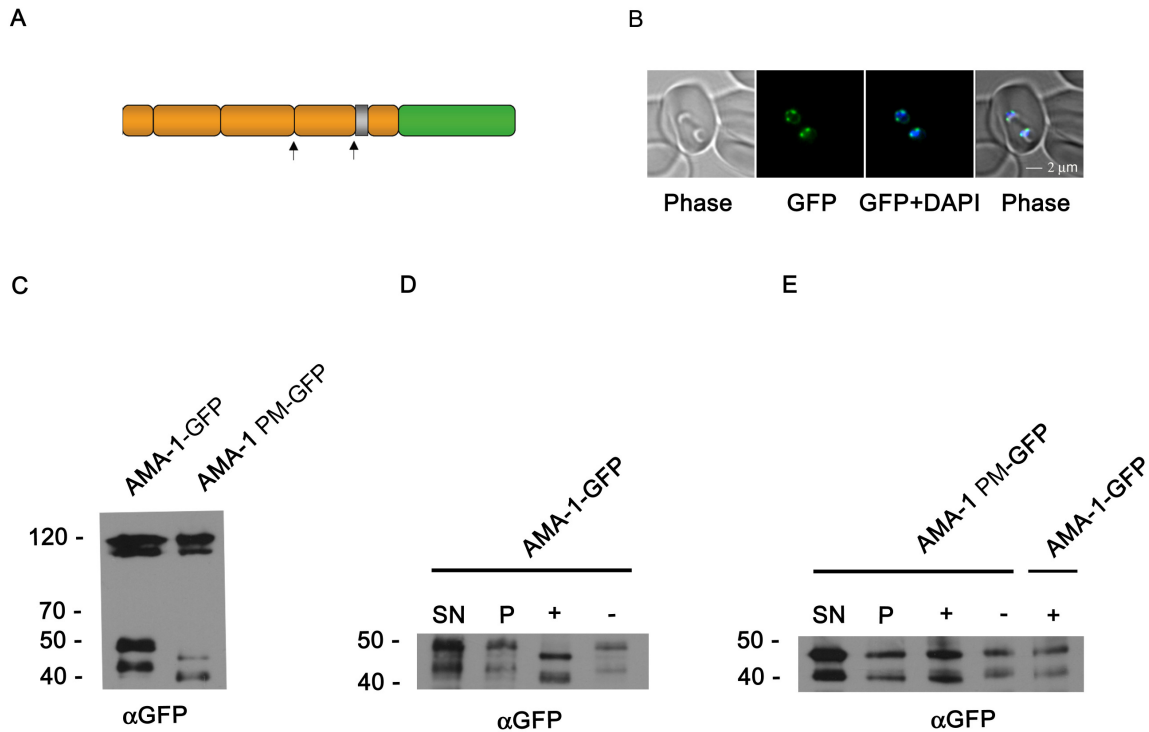


Abbildung 23: Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von AMA-1

(A) Während der Invasion kommt es zu sekundären Prozessierungen in der Domäne III des N-Terminus die zu spezifischen Spaltungsprodukten von AMA-1-GFP von 44 und 49 kDa führen. (B) Lebendfluoreszenzaufnahmen zeigen AMA-1-GFP (grün) nach der Invasion in jungen Ringstadien. Der Zellkern ist mit DAPI (blau) gefärbt. (C) Western-Blot-Analyse von Wildtyp und AMA-1_{PM}-GFP. (D) Western-Blot-Analyse von Lambda-Phosphatase verdauten AMA-1-GFP. AMA-1-GFP wurde extrahiert und entweder mit (+) oder ohne (-) Lambda-Phosphatase inkubiert und anschließend im Western-Blot detektiert. Die Pelletfraktion (P) und das Lysat (SN), die nicht behandelt wurden, dienen als Kontrolle. Die Behandlung mit Phosphatase führt zu einer Gewichtsreduktion von ca. 3 kDa von AMA-1-GFP, jedoch nicht in der Kontrolle (-). (E) Die Behandlung der Phosphorylierungsmutante (PM) mit Phosphatase hat keinen Einfluss auf das Laufverhalten des Proteins wie im Western Blot gezeigt werden kann. Lysat und Pellet sind als Kontrolle aufgetragen. Die Größe der PM-Banden ist identisch zu denen der Phosphatase-behandelten AMA-1-GFP Probe.

4.2.3 Diskussion

AMA-1 ist ein Mikronemenprotein, das für die Invasion in Erythrozyten essentiell ist (Triglia et al., 2000). Obwohl es sich zu einem führenden Vakzinekandidaten für einen Blutphasenimpfstoff entwickelt, ist über die Funktion des Proteins bisher wenig bekannt. In *P. falciparum* (wie in *T. gondii*) gibt es zwei AMA-1 Populationen: Eine Apikale und eine Periphere, die über die Gesamtoberfläche verteilt ist. Mit Hilfe von FRAP- und FLIP-Analysen konnte gezeigt werden, dass das periphere Protein im Gegensatz zum apikalen AMA-1 frei in der Membran diffundierbar ist. Können die beiden AMA-1 Populationen möglicherweise zwei unterschiedliche Funktionen haben? Könnte peripheres AMA-1 eine Rolle bei der Re-Orientierung des Merozoiten spielen und apikales AMA-1 an der Ausbildung der „tight and moving junction“ beteiligt sein? Oder stellt das periphere AMA-1 eine funktionell irrelevante Population dar, wie es für peripheres AMA-1 in *T. gondii* postuliert wurde (Alexander et al., 2005)?

Eine Interaktion mit Oberflächenstrukturen auf murinen Erythrozyten konnte mit AMA-1 von *P. yoelii* experimentell durch die Überexpression von AMA-1 auf COS-7 Zellen nachgewiesen werden (Fraser et al., 2001). Elektronenmikroskopische Untersuchungen in *P. knowlesi* zeigen, dass in der Anwesenheit eines monoklonalen Antikörpers gegen AMA-1 der initiale Kontakt zwischen dem Parasiten und der Erythrozytenmembran nicht gestört wird, allerdings erfolgte keine Reorientierung des Parasiten zum apikalen Ende hin (Mitchell et al., 2004). Eine Reorientierung ist die Voraussetzung für die Ausbildung einer „tight junction“ und der späteren Invasion. Die Inhibierung dieser Reorientierung durch AMA-1-spezifische Antikörper legt eine Funktion von AMA-1 bei diesem Prozess nahe und könnte durch das periphere AMA-1 geleistet werden. Die notwendige Interaktion mit der Erythrozytenmembran müsste reversibel, aber gerichtet sein. Strukturanalysen von AMA-1 haben eine, innerhalb der Apicomplexa hochkonservierte, hydrophobe Tasche identifiziert (Bai et al., 2005) die möglicherweise eine Funktion bei der postulierten Rezeptorbindung übernehmen könnte (Coley et al., 2006) und die prominenteste strukturelle Eigenschaft in der Ektodomäne darstellt.

Ob und in welcher Art *P. falciparum* AMA-1 während des Invasionsprozesses Wechselwirkungen mit Rezeptoren auf der Erythrozytenmembran eingeht, ist derzeit jedoch noch unklar. Für humane Erythrozyten steht eine Validierung der Ergebnisse noch aus. Das

R1-Peptid bindet wie ein monoklonaler, inhibitorischer Antikörper (α AMA-1-1F9) in der hydrophoben Tasche, die als putativer Bindungsbereich von Oberflächenstrukturen des Erythrozyten diskutiert wird (Fraser et al., 2001; Harris et al., 2005). In der vorliegenden Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass trotz der Anwesenheit des R1-Peptids der Parasit zur Reorientierung fähig ist und die Invasion zumindest initiiert wird, wie die Vorwärtsbewegung des Merozoiten zeigt. Dies steht im Gegensatz zu der von Mitchell et al. (2004) beschriebenen Inhibition der Reorientierung durch polyklonale Antikörper. Dies könnte einerseits durch eine, von der eigentlichen Funktion von AMA-1 unabhängigen, sterischen Hinderung durch die verwendeten polyklonalen Antikörper erklärt werden. Andererseits können andere extrazelluläre Bereiche von AMA-1, an die die verwendeten polyklonalen Antikörper binden, eine Rolle bei der Reorientierung spielen. Was ist die Funktion des apikalen AMA-1? In *T. gondii* konnte gezeigt werden, dass AMA-1 als Komplex mit den Rhoprienproteinen RON4 und RON2 in der „tight junction“ vorliegt (Alexander et al., 2005). Eine Interaktion von RON4 mit AMA-1 ist auch für *P. falciparum* beschrieben (Alexander et al., 2006). Die eigentliche Funktion der Interaktion von RON-Proteinen mit AMA-1 in der „tight junction“ ist momentan noch nicht geklärt. Es ist jedoch möglich, dass dieser Komplex i) mit dem Actin-Myosin Motor in Wechselwirkung treten kann ii) ein Signal weitergeleitet wird (z.B. erfolgreiche Reorientierung), oder iii) eine Stabilisierung der Parasit-Wirt-Interaktion gewährleistet wird.

Im Komplementationsassay kann gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Domäne von AMA-1 für die Invasion essentiell ist. Sie wird vor oder während der Invasion phosphoryliert und die Mutation der putativen Phosphorylierungsstellen verhindert eine Komplementation. Die dafür verantwortlichen Kinasen sind hierbei von besonderem Interesse. Micoarrays zeigen, dass 8 Kinasen gleichzeitig mit AMA-1 transkriptionell hochreguliert sind (Bozdech et al., 2003). Davon zeigen 4 eine Calcium-Abhängigkeit und gehören damit zur Klasse der "calcium dependent protein kinasen" (CDPK). Calcium (Ca^{2+}) ist eines der bedeutendsten Signalmoleküle in allen eukaryotischen Zellen einschließlich Protozoen (Moreno and Docampo, 2003). In *T. gondii* konnte bereits gezeigt werden, dass die Invasion des Parasiten Ca^{2+} -abhängig und notwendig für die Sekretion der Mikronemen-Proteine ist (Kieschnick et al., 2001; Lovett and Sibley, 2003). Diese Annahme gilt auch für *Plasmodium* (Cowman and Crabb, 2006). Die Phosphorylierung könnte auch durch die Aktivierung einer Serin/Threonin-Proteinkinase, Proteinkinase C (PKC), katalysiert werden. Einen durch Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) angeregten Anstieg von zytosolischem Ca^{2+} aktiviert die PKC, was zur

Phosphorylierung der jeweiligen Zielproteine führt. Lovett *et al.* konnten zeigen, dass IP₃ auch in *T. gondii* einen Ca²⁺-Anstieg stimuliert (Lovett et al., 2002). Des Weiteren könnte die Phosphorylierung auch durch die Proteinkinase A (PKA) des Typs I katalysiert werden. Diese Serin/Threonin-Kinase ist cAMP abhängig. In Untersuchungen zur Invasion von Sporozoiten wurde gezeigt, dass die Sekretion der apikalen Organellen durch den Anstieg der cAMP Konzentration induziert wird (Ono et al., 2008). Dies könnte ebenso bei der Invasion von Merozoiten der Fall sein, wobei ein Zusammenspiel von Ca²⁺ und cAMP regulierten Prozessen wahrscheinlich ist (Beraldo et al., 2005).

Die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von AMA-1 könnte mehrere Funktionen haben: i) sie könnte zu einer Konformationsänderung im extrazellulären Bereich von AMA-1 führen und damit die Interaktion und Komplexierung mit anderen Parasitenproteinen (z.B. RON4) oder Oberflächenstrukturen auf der Wirtszelle beeinflussen, oder ii) eine Phosphorylierung könnte die Bindung oder die Dissoziation von Proteinen an die zytoplasmatische Domäne bedingen und damit spezifische Prozesse der Invasion auslösen.

Die gezielte Inaktivierung der AMA-1 phosphorylierenden Kinase(n) stellt eine attraktive therapeutische Interventionsmöglichkeit dar. Beispiele für den Einsatz von Kinase-Inhibitoren als Medikamente sind bisher vor allem aus der Krebstherapie bekannt. Derzeit sind ca. 5 Medikamente für Krebserkrankungen zugelassen, welche spezifisch Kinasen hemmen. Der Wirkmechanismus liegt dabei oft in einer irreversiblen Bindung eines Moleküls an die ATP-Bindungstasche der Kinase (z.B. Gleevec/Imatinib). Weitere 12 Medikamente werden derzeit in klinischen Studien getestet (Sebolt-Leopold und English, 2006). Während in der Krebstherapie und Virenbekämpfung hauptsächlich humane Kinasen in ihrer Aktivität gehemmt werden, z.B. um die Ausbildung von Blutgefäßen zu inhibieren oder den Zellzyklus zu arretieren und diese somit zum Teil starke Nebenwirkungen zeigen, würden spezifische Inhibitoren von parasitären Kinasen eine gezielte Therapie ermöglichen, ohne in die Physiologie des Wirtes einzugreifen.

5. Literatur

- Abu-Raddad, L.J., P. Patnaik, and J.G. Kublin. 2006. Dual infection with HIV and malaria fuels the spread of both diseases in sub-Saharan Africa. *Science*. 314:1603-6.
- Alexander, D.L., S. Arastu-Kapur, J.F. Dubremetz, and J.C. Boothroyd. 2006. *Plasmodium falciparum* AMA1 binds a rhoptry neck protein homologous to TgRON4, a component of the moving junction in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell*. 5:1169-73.
- Alexander, D.L., J. Mital, G.E. Ward, P. Bradley, and J.C. Boothroyd. 2005. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog*. 1:e17.
- Alonso, P.L., J. Sacarlal, J.J. Aponte, A. Leach, E. Macete, J. Milman, I. Mandomando, B. Spiessens, C. Guinovart, M. Espasa, Q. Bassat, P. Aide, O. Ofori-Anyinam, M.M. Navia, S. Corachan, M. Ceuppens, M.C. Dubois, M.A. Demoitie, F. Dubovsky, C. Menendez, N. Tornieporth, W.R. Ballou, R. Thompson, and J. Cohen. 2004. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*. 364:1411-20.
- Arvan, P. 2004. Secretory protein trafficking: genetic and biochemical analysis. *Cell Biochem Biophys*. 40:169-78.
- Arvan, P., and D. Castle. 1992. Protein sorting and secretion granule formation in regulated secretory cells. *Trends Cell Biol*. 2:327-31.
- Bai, T., M. Becker, A. Gupta, P. Strike, V.J. Murphy, R.F. Anders, and A.H. Batchelor. 2005. Structure of AMA1 from *Plasmodium falciparum* reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:12736-41.
- Baker, R.P., R. Wijetilaka, and S. Urban. 2006. Two *Plasmodium* rhomboid proteases preferentially cleave different adhesins implicated in all invasive stages of malaria. *PLoS Pathog*. 2:e113.
- Baldi, D.L., K.T. Andrews, R.F. Waller, D.S. Roos, R.F. Howard, B.S. Crabb, and A.F. Cowman. 2000. RAP1 controls rhoptry targeting of RAP2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Embo J*. 19:2435-43.
- Baldi, D.L., R. Good, M.T. Duraisingh, B.S. Crabb, and A.F. Cowman. 2002. Identification and disruption of the gene encoding the third member of the low-molecular-mass rhoptry complex in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 70:5236-45.
- Bannister, L.H., J.M. Hopkins, A.R. Dluzewski, G. Margos, I.T. Williams, M.J. Blackman, C.H. Kocken, A.W. Thomas, and G.H. Mitchell. 2003. *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *Journal of Cell Science*. 116:3825-34.
- Bannister, L.H., J.M. Hopkins, R.E. Fowler, S. Krishna, and G.H. Mitchell. 2000. Ultrastructure of rhoptry development in *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts. *Parasitology*. 121 (Pt 3):273-87.
- Baum, J., T.W. Gilberger, F. Frischknecht, and M. Meissner. 2008. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Trends Parasitol*.
- Baum, J., D. Richard, J. Healer, M. Rug, Z. Krnajski, T.W. Gilberger, J.L. Green, A.A. Holder, and A.F. Cowman. 2006. A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. *J Biol Chem*. 281:5197-208.
- Beraldo, F.H., F.M. Almeida, A.M. da Silva, and C.R. Garcia. 2005. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J Cell Biol*. 170:551-7.

- Blackman, M.J. 2004. Proteases in host cell invasion by the malaria parasite. *Cell Microbiol.* 6:893-903.
- Bonifacino, J.S., and L.M. Traub. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annual Review of Biochemistry.* 72:395-447.
- Bozdech, Z., J. Zhu, M.P. Joachimiak, F.E. Cohen, B. Pulliam, and J.L. DeRisi. 2003. Expression profiling of the schizont and trophozoite stages of *Plasmodium falciparum* with a long-oligonucleotide microarray. *Genome Biology.* 4:R9.
- Burns, J.M., Jr., P.R. Flaherty, M.M. Romero, and W.P. Weidanz. 2003. Immunization against *Plasmodium chabaudi* malaria using combined formulations of apical membrane antigen-1 and merozoite surface protein-1. *Vaccine.* 21:1843-52.
- Butler, D. 2002. Malaria initiative cries out for action in Africa. *Nature.* 420:351.
- Carruthers, V.B., O.K. Giddings, and L.D. Sibley. 1999. Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell Microbiol.* 1:225-35.
- Chanat, E., and W.B. Huttner. 1991. Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *J Cell Biol.* 115:1505-19.
- Coatney GR, C.W., Warren M, Contacos PG. 1971. The Primate Malaria. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda.
- Coley, A.M., K. Parisi, R. Masciantonio, J. Hoeck, J.L. Casey, V.J. Murphy, K.S. Harris, A.H. Batchelor, R.F. Anders, and M. Foley. 2006. The most polymorphic residue on *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 determines binding of an invasion-inhibitory antibody. *Infect Immun.* 74:2628-36.
- Cortes, A., M. Mellombo, I. Mueller, A. Benet, J.C. Reeder, and R.F. Anders. 2003. Geographical structure of diversity and differences between symptomatic and asymptomatic infections for *Plasmodium falciparum* vaccine candidate AMA1. *Infect Immun.* 71:1416-26.
- Cowman, A.F., and B.S. Crabb. 2006. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell.* 124:755-66.
- Crabb, B.S., M. Rug, T.W. Gilberger, J.K. Thompson, T. Triglia, A.G. Maier, and A.F. Cowman. 2004. Transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods in Molecular Biology.* 270:263-76.
- Crewther, P.E., M.L. Matthew, R.H. Flegg, and R.F. Anders. 1996. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. *Infect Immun.* 64:3310-7.
- Dessens, J.T., A.L. Beetsma, G. Dimopoulos, K. Wengelnik, A. Crisanti, F.C. Kafatos, and R.E. Sinden. 1999. CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *Embo J.* 18:6221-7.
- Dikeakos, J.D., and T.L. Reudelhuber. 2007. Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot to sort out. *J Cell Biol.* 177:191-6.
- Duan, J., J. Mu, M.A. Thera, D. Joy, S.L. Kosakovsky Pond, D. Diemert, C. Long, H. Zhou, K. Miura, A. Ouattara, A. Dolo, O. Doumbo, X.Z. Su, and L. Miller. 2008. Population structure of the genes encoding the polymorphic *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1: implications for vaccine design. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:7857-62.
- Dubremetz, J.F. 2007. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell Microbiol.* 9:841-8.
- Duraisingh, M.T., T. Triglia, S.A. Ralph, J.C. Rayner, J.W. Barnwell, G.I. McFadden, and A.F. Cowman. 2003. Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *Embo J.* 22:1047-57.
- Dutta, S., S.Y. Lee, A.H. Batchelor, and D.E. Lanar. 2007. Structural basis of antigenic escape of a malaria vaccine candidate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:12488-93.

- Foth, B.J., S.A. Ralph, C.J. Tonkin, N.S. Struck, M. Fraunholz, D.S. Roos, A.F. Cowman, and G.I. McFadden. 2003. Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. 299:705-8.
- Fraser, T.S., S.H. Kappe, D.L. Narum, K.M. VanBuskirk, and J.H. Adams. 2001. Erythrocyte-binding activity of *Plasmodium yoelii* apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells. *Mol Biochem Parasitol*. 117:49-59.
- Gardner, M.J., S.J. Shallom, J.M. Carlton, S.L. Salzberg, V. Nene, A. Shoaibi, A. Ciecko, J. Lynn, M. Rizzo, B. Weaver, B. Jarrahi, M. Brenner, B. Parvizi, L. Tallon, A. Moazzez, D. Granger, C. Fujii, C. Hansen, J. Pederson, T. Feldblyum, J. Peterson, B. Suh, S. Angiuoli, M. Pertea, J. Allen, J. Selengut, O. White, L.M. Cummings, H.O. Smith, M.D. Adams, J.C. Venter, D.J. Carucci, S.L. Hoffman, and C.M. Fraser. 2002. Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14. *Nature*. 419:531-4.
- Genton, B., and Z.H. Reed. 2007. Asexual blood-stage malaria vaccine development: facing the challenges. *Curr Opin Infect Dis*. 20:467-75.
- Ghoneim, A., O. Kaneko, T. Tsuboi, and M. Torii. 2007. The *Plasmodium falciparum* RhopH2 promoter and first 24 amino acids are sufficient to target proteins to the rhoptries. *Parasitol Int*. 56:31-43.
- Gilberger, T.W., J.K. Thompson, M.B. Reed, R.T. Good, and A.F. Cowman. 2003a. The cytoplasmic domain of the *Plasmodium falciparum* ligand EBA-175 is essential for invasion but not protein trafficking. *J Cell Biol*. 162:317-27.
- Gilberger, T.W., J.K. Thompson, T. Triglia, R.T. Good, M.T. Duraisingh, and A.F. Cowman. 2003b. A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from *Plasmodium falciparum* defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. *J Biol Chem*. 278:14480-6.
- Gilson, P.R., T. Nebl, D. Vukcevic, R.L. Moritz, T. Sargeant, T.P. Speed, L. Schofield, and B.S. Crabb. 2006. Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Proteomics*. 5:1286-99.
- Haase, S., A. Cabrera, C. Langer, M. Treeck, N. Struck, S. Herrmann, P.W. Jansen, I. Bruchhaus, A. Bachmann, S. Dias, A.F. Cowman, H.G. Stunnenberg, T. Spielmann, and T.W. Gilberger. 2008. Characterization of a conserved rhoptry-associated leucine zipper-like protein in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 76:879-87.
- Harper, J.M., E.F. Hoff, and V.B. Carruthers. 2004. Multimerization of the *Toxoplasma gondii* MIC2 integrin-like A-domain is required for binding to heparin and human cells. *Mol Biochem Parasitol*. 134:201-12.
- Harper, J.M., M.H. Huynh, I. Coppens, F. Parussini, S. Moreno, and V.B. Carruthers. 2006. A cleavable propeptide influences *Toxoplasma* infection by facilitating the trafficking and secretion of the TgMIC2-M2AP invasion complex. *Mol Biol Cell*. 17:4551-63.
- Harris, K.S., J.L. Casey, A.M. Coley, R. Masciantonio, J.K. Sabo, D.W. Keizer, E.F. Lee, A. McMahan, R.S. Norton, R.F. Anders, and M. Foley. 2005. Binding hot spot for invasion inhibitory molecules on *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect Immun*. 73:6981-9.
- Healer, J., S. Crawford, S. Ralph, G. McFadden, and A.F. Cowman. 2002. Independent translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infect Immun*. 70:5751-8.

- Healer, J., V. Murphy, A.N. Hodder, R. Masciantonio, A.W. Gemmill, R.F. Anders, A.F. Cowman, and A. Batchelor. 2004. Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* 52:159-68.
- Hiller, N.L., S. Bhattacharjee, C. van Ooij, K. Liolios, T. Harrison, C. Lopez-Estrano, and K. Haldar. 2004. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection.. *Science.* 306:1934-7.
- Hiller, N.L., C. van Ooij, and S. Bhattacharjee. 2005. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Trends in Parasitology.* 21:402-3.
- Hodder, A.N., P.E. Crewther, and R.F. Anders. 2001. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infect Immun.* 69:3286-94.
- Hoppe, H.C., H.M. Ngo, M. Yang, and K.A. Joiner. 2000. Targeting to rhoptry organelles of *Toxoplasma gondii* involves evolutionarily conserved mechanisms. *Nature Cell Biology.* 2:449-56.
- Howell, S.A., C. Withers-Martinez, C.H. Kocken, A.W. Thomas, and M.J. Blackman. 2001. Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. *J Biol Chem.* 276:31311-20.
- Huynh, M.H., J.M. Harper, and V.B. Carruthers. 2006. Preparing for an invasion: charting the pathway of adhesion proteins to *Toxoplasma* micronemes. *Parasitol Res.* 98:389-95.
- Huynh, M.H., K.E. Rabenau, J.M. Harper, W.L. Beatty, L.D. Sibley, and V.B. Carruthers. 2003. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *Embo J.* 22:2082-90.
- Kato, K., D.C. Mayer, S. Singh, M. Reid, and L.H. Miller. 2005. Domain III of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:5552-7.
- Kieschnick, H., T. Wakefield, C.A. Narducci, and C. Beckers. 2001. *Toxoplasma gondii* attachment to host cells is regulated by a calmodulin-like domain protein kinase. *J Biol Chem.* 276:12369-77.
- Kocken, C.H., D.L. Narum, A. Massougbojji, B. Ayivi, M.A. Dubbeld, A. van der Wel, D.J. Conway, A. Sanni, and A.W. Thomas. 2000. Molecular characterisation of *Plasmodium reichenowi* apical membrane antigen-1 (AMA-1), comparison with *P. falciparum* AMA-1, and antibody-mediated inhibition of red cell invasion. *Mol Biochem Parasitol.* 109:147-56.
- Kocken, C.H., A.M. van der Wel, M.A. Dubbeld, D.L. Narum, F.M. van de Rijke, G.J. van Gemert, X. van der Linde, L.H. Bannister, C. Janse, A.P. Waters, and A.W. Thomas. 1998. Precise timing of expression of a *Plasmodium falciparum*-derived transgene in *Plasmodium berghei* is a critical determinant of subsequent subcellular localization. *J Biol Chem.* 273:15119-24.
- Lingelbach, K.R. 1993. *Plasmodium falciparum*: a molecular view of protein transport from the parasite into the host erythrocyte. *Exp Parasitol.* 76:318-27.
- Lovett, J.L., N. Marchesini, S.N. Moreno, and L.D. Sibley. 2002. *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca(2+) release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. *J Biol Chem.* 277:25870-6.
- Lovett, J.L., and L.D. Sibley. 2003. Intracellular calcium stores in *Toxoplasma gondii* govern invasion of host cells. *J Cell Sci.* 116:3009-16.
- Mabaso, M.L., B. Sharp, and C. Lengeler. 2004. Historical review of malarial control in southern African with emphasis on the use of indoor residual house-spraying. *Trop Med Int Health.* 9:846-56.
- Mandavilli, A. 2006a. DDT returns. *Nat Med.* 12:870-1.
- Mandavilli, A. 2006b. Health agency backs use of DDT against malaria. *Nature.* 443:250-1.

- Marti, M., J. Baum, M. Rug, L. Tilley, and A.F. Cowman. 2005. Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte. *J Cell Biol.* 171:587-92.
- Marti, M., R.T. Good, M. Rug, E. Knuepfer, and A.F. Cowman. 2004. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science.* 306:1930-3.
- Meissner, M., M. Reiss, N. Viebig, V.B. Carruthers, C. Toursel, S. Tomavo, J.W. Ajioka, and D. Soldati. 2002. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. *J Cell Sci.* 115:563-74.
- Miller, L.H., D.I. Baruch, K. Marsh, and O.K. Doumbo. 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 415:673-9.
- Miller, L.H., M.F. Good, and G. Milon. 1994. Malaria pathogenesis. *Science.* 264:1878-83.
- Mitchell, G.H., A.W. Thomas, G. Margos, A.R. Dluzewski, and L.H. Bannister. 2004. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect Immun.* 72:154-8.
- Moreno, S.N., and R. Docampo. 2003. Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol.* 6:359-64.
- Mueller, A.K., M. Labaied, S.H. Kappe, and K. Matuschewski. 2005. Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature.* 433:164-7.
- Narum, D.L., J.D. Haynes, S. Fuhrmann, K. Moch, H. Liang, S.L. Hoffman, and B.K. Sim. 2000. Antibodies against the *Plasmodium falciparum* receptor binding domain of EBA-175 block invasion pathways that do not involve sialic acids. *Infection & Immunity.* 68:1964-6.
- Narum, D.L., and A.W. Thomas. 1994. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol.* 67:59-68.
- Nussenzweig, R.S., J. Vanderberg, H. Most, and C. Orton. 1967. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature.* 216:160-2.
- O'Donnell, R.A., F. Hackett, S.A. Howell, M. Treeck, N. Struck, Z. Krnjanski, C. Withers-Martinez, T.W. Gilberger, and M.J. Blackman. 2006. Intramembrane proteolysis mediates shedding of a key adhesin during erythrocyte invasion by the malaria parasite. *J Cell Biol.* 174:1023-33.
- Ono, T., L. Cabrita-Santos, R. Leitao, E. Bettiol, L.A. Purcell, O. Diaz-Pulido, L.B. Andrews, T. Tadakuma, P. Bhanot, M.M. Mota, and A. Rodriguez. 2008. Adenylyl cyclase alpha and cAMP signaling mediate *Plasmodium* sporozoite apical regulated exocytosis and hepatocyte infection. *PLoS Pathog.* 4:e1000008.
- Orlandi, P.A., F.W. Klotz, and J.D. Haynes. 1992. A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac(alpha 2-3)Gal- sequences of glycophorin A. *Journal of Cell Biology.* 116:901-9.
- Payne, D. 1987. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today.* 3:241-6.
- Peterson, D.S., L.H. Miller, and T.E. Wellems. 1995. Isolation of multiple sequences from the *Plasmodium falciparum* genome that encode conserved domains homologous to those in erythrocyte-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:7100-4.
- Peterson, M.G., V.M. Marshall, J.A. Smythe, P.E. Crewther, A. Lew, A. Silva, R.F. Anders, and D.J. Kemp. 1989. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol.* 9:3151-4.

- Polhemus, M.E., A.J. Magill, J.F. Cummings, K.E. Kester, C.F. Ockenhouse, D.E. Lanar, S. Dutta, A. Barbosa, L. Soisson, C.L. Diggs, S.A. Robinson, J.D. Haynes, V.A. Stewart, L.A. Ware, C. Brando, U. Krzych, R.A. Bowden, J.D. Cohen, M.C. Dubois, O. Ofori-Anyinam, E. De-Kock, W.R. Ballou, and D.G. Heppner, Jr. 2007. Phase I dose escalation safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* apical membrane protein (AMA-1) FMP2.1, adjuvanted with AS02A, in malaria-naive adults at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine*. 25:4203-12.
- Reed, M.B., S.R. Caruana, A.H. Batchelor, J.K. Thompson, B.S. Crabb, and A.F. Cowman. 2000. Targeted disruption of an erythrocyte binding antigen in *Plasmodium falciparum* is associated with a switch toward a sialic acid-independent pathway of invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:7509-14.
- Remarque, E.J., B.W. Faber, C.H. Kocken, and A.W. Thomas. 2008. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitol*. 24:74-84.
- Rieckmann, K.H., R.L. Beaudoin, J.S. Cassells, and K.W. Sell. 1979. Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. *Bull World Health Organ*. 57 Suppl 1:261-5.
- Roberts, D.R., and R.G. Andre. 1994. Insecticide resistance issues in vector-borne disease control. *Am J Trop Med Hyg*. 50:21-34.
- Sachs, J., and P. Malaney. 2002. The economic and social burden of malaria. *Nature*. 415:680-5.
- Sargeant, T.J., M. Marti, E. Caler, J.M. Carlton, K. Simpson, T.P. Speed, and A.F. Cowman. 2006. Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. *Genome Biol*. 7:R12.
- Sebolt-Leopold, J.S., and J.M. English. 2006. Mechanisms of drug inhibition of signalling molecules. *Nature*. 441:457-62.
- Sharma, V.P., and K.N. Mehrotra. 1986. Malaria resurgence in India: a critical study. *Soc Sci Med*. 22:835-45.
- Sim, B.K., P.A. Orlandi, J.D. Haynes, F.W. Klotz, J.M. Carter, D. Camus, M.E. Zegans, and J.D. Chulay. 1990. Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion. *Journal of Cell Biology*. 111:1877-84.
- Snow, R.W., C.A. Guerra, A.M. Noor, H.Y. Myint, and S.I. Hay. 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 434:214-7.
- Soldati, D., B.J. Foth, and A.F. Cowman. 2004. Molecular and functional aspects of parasite invasion. *Trends Parasitol*. 20:567-74.
- Storch, V., and U. Welsch. 1994. Kurzes Lehrbuch der Zoologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Struck, N.S., S. de Souza Dias, C. Langer, M. Marti, J.A. Pearce, A.F. Cowman, and T.W. Gilberger. 2005. Re-defining the Golgi complex in *Plasmodium falciparum* using the novel Golgi marker PfGRASP. *J Cell Sci*. 118:5603-13.
- Stubbs, J., K.M. Simpson, T. Triglia, D. Plouffe, C.J. Tonkin, M.T. Duraisingh, A.G. Maier, E.A. Winzeler, and A.F. Cowman. 2005. Molecular mechanism for switching of *P. falciparum* invasion pathways into human erythrocytes. *Science*. 309:1384-7.
- Sturm, A., and V. Heussler. 2007. Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic *Plasmodium* parasites. *Med Microbiol Immunol*. 196:127-33.
- Sultan, A.A., V. Thathy, U. Frevert, K.J. Robson, A. Crisanti, V. Nussenzweig, R.S. Nussenzweig, and R. Menard. 1997. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Cell*. 90:511-22.

- Teklehaimanot, A., and P. Meja. 2008. Malaria and poverty. *Ann N Y Acad Sci.* 1136:32-7.
- Thera, M.A., O.K. Doumbo, D. Coulibaly, D.A. Diallo, A.K. Kone, A.B. Guindo, K. Traore, A. Dicko, I. Sagara, M.S. Sissoko, M. Baby, M. Sissoko, I. Diarra, A. Niangaly, A. Dolo, M. Daou, S.I. Diawara, D.G. Heppner, V.A. Stewart, E. Angov, E.S. Bergmann-Leitner, D.E. Lanar, S. Dutta, L. Soisson, C.L. Diggs, A. Leach, A. Owusu, M.C. Dubois, J. Cohen, J.N. Nixon, A. Gregson, S.L. Takala, K.E. Lyke, and C.V. Plowe. 2008. Safety and immunogenicity of an AMA-1 malaria vaccine in Malian adults: results of a phase 1 randomized controlled trial. *PLoS ONE.* 3:e1465.
- Thompson, J.K., T. Triglia, M.B. Reed, and A.F. Cowman. 2001. A novel ligand from *Plasmodium falciparum* that binds to a sialic acid-containing receptor on the surface of human erythrocytes. *Molecular Microbiology.* 41:47-58.
- Tolia, N.H., E.J. Enemark, B.K. Sim, and L. Joshua-Tor. 2005. Structural basis for the EBA-175 erythrocyte invasion pathway of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell.* 122:183-93.
- Topolska, A.E., A. Lidgett, D. Truman, H. Fujioka, and R.L. Coppel. 2004. Characterization of a membrane-associated rhoptry protein of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 279:4648-56.
- Trecek, M., N.S. Struck, S. Haase, C. Langer, S. Herrmann, J. Healer, A.F. Cowman, and T.W. Gilberger. 2006. A conserved region in the EBL proteins is implicated in microneme targeting of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 281:31995-2003.
- Triglia, T., J. Healer, S.R. Caruana, A.N. Hodder, R.F. Anders, B.S. Crabb, and A.F. Cowman. 2000. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Mol Microbiol.* 38:706-18.
- Uhlemann, A.C., and S. Krishna. 2005. Antimalarial multi-drug resistance in Asia: mechanisms and assessment. *Curr Top Microbiol Immunol.* 295:39-53.
- Van geertruyden, J.P., and U. D'Alessandro. 2007. Malaria and HIV: a silent alliance. *Trends Parasitol.* 23:465-7.
- van Ooij, C., P. Tamez, S. Bhattacharjee, N.L. Hiller, T. Harrison, K. Liolios, T. Kooij, J. Ramesar, B. Balu, J. Adams, A. Waters, C. Janse, and K. Haldar. 2008. The malaria secretome: from algorithms to essential function in blood stage infection. *PLoS Pathog.* 4:e1000084.
- Volkman, S.K., E. Lozovsky, A.E. Barry, T. Bedford, L. Bethke, A. Myrick, K.P. Day, D.L. Hartl, D.F. Wirth, and S.A. Sawyer. 2007. Genomic heterogeneity in the density of noncoding single-nucleotide and microsatellite polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. *Gene.* 387:1-6.
- Waller, R.F., M.B. Reed, A.F. Cowman, and G.I. McFadden. 2000. Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. *EMBO Journal.* 19:1794-802.
- Withers, M.R., D. McKinney, B.R. Ogutu, J.N. Waitumbi, J.B. Milman, O.J. Apollo, O.G. Allen, K. Tucker, L.A. Soisson, C. Diggs, A. Leach, J. Wittes, F. Dubovsky, V.A. Stewart, S.A. Remich, J. Cohen, W.R. Ballou, C.A. Holland, J.A. Lyon, E. Angov, J.A. Stoute, S.K. Martin, and D.G. Heppner, Jr. 2006. Safety and reactogenicity of an MSP-1 malaria vaccine candidate: a randomized phase Ib dose-escalation trial in Kenyan children. *PLoS Clin Trials.* 1:e32.
- Wongsrichanalai, C., and S.R. Meshnick. 2008. Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis.* 14:716-9.
- World Malaria Report 2008. www.who.int/malaria/wmr2008

6. Anhang

6.1 Publikationen

1. „A conserved region in the EBL proteins is implicated in microneme targeting of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.” (Treeck et al., 2006, Journal of Biological Chemistry)
2. „Functional Analysis of the leading vaccine candidate AMA-1 reveals an essential role for the cytoplasmic domain in the invasion process.” (Treeck et al., 2008, Plos Pathogens)

Des Weiteren:

3. „Intramembrane proteolysis mediates shedding of a key adhesin during erythrocyte invasion by the malaria parasite.” (O'Donnell et al., 2006, Journal of Cell Biology)
4. „Characterization of a conserved rhoptry-associated leucine zipper-like protein in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.” (Haase et al., 2008, Infection and Immunity)
5. „Spatial dissection of the cis- and trans-Golgi compartments in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.” (Struck et al., 2008, Molecular Microbiology)
6. „*Plasmodium falciparum* possesses two GRASP proteins that are differentially targeted to the Golgi complex via a higher- and lower-eukaryote-like mechanism.” (Struck et al., 2008, Journal of Cell Science)

6.2 Anteile des Autors an den Publikationen

- 6.1.1 Anteile des Autors an der vorgelegten Veröffentlichung „A conserved region in the EBL proteins is implicated in microneme targeting of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.“ (Treeck et al., 2006)

Die dargestellten Fragestellungen, Methoden und Ergebnisse wurden von Herrn Treeck unter der Anleitung von Dr. Gilberger ausgearbeitet, durchgeführt und ausgewertet. Technische Assistenz wurde von den Koautoren geleistet. Der Artikel wurde von den Autoren gemeinsam verfasst.

- 6.1.2 Anteile des Autors an der vorgelegten Veröffentlichung „Functional Analysis of the leading vaccine candidate AMA-1 reveals an essential role for the cytoplasmic domain in the invasion process.“ (Treeck et al., 2008)

Die dargestellten Fragestellungen, Methoden und Ergebnisse wurden von Herrn Treeck unter der Anleitung von Dr. Gilberger ausgearbeitet, durchgeführt und ausgewertet. Technische Assistenz wurde von den Koautoren geleistet. Der Artikel wurde von den Autoren gemeinsam verfasst.

- 6.1.3 Anteile des Autors an der vorgelegten Veröffentlichung „Intramembrane proteolysis mediates shedding of a key adhesin during erythrocyte invasion by the malaria parasite.“ (O'Donnell et al., 2006)

Der Autor war an der Analyse und Auswertung der Daten beteiligt. Der Artikel wurde von den Autoren gemeinsam verfasst.

- 6.1.4 Anteile des Autors an der vorgelegten Veröffentlichung „Characterization of a conserved rhoptry-associated leucine zipper-like protein in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.“ (Haase et al., 2008)

Der Autor war an der Klonierung und Transfektion einiger Konstrukte und an der Analyse der *in vivo* Daten beteiligt. Der Artikel wurde von den Autoren gemeinsam verfasst.

- 6.1.5 Anteile des Autors an der vorgelegten Veröffentlichung „Spatial dissection of the cis- and trans-Golgi compartments in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.“ (Struck et al., 2008)

Der Autor war an der Klonierung und Transfektion einiger Konstrukte und an der Analyse der *in vivo* Daten beteiligt. Der Artikel wurde von den Autoren gemeinsam verfasst.

- 6.1.6 Anteile des Autors an der vorgelegten Veröffentlichung „*Plasmodium falciparum* possesses two GRASP proteins that are differentially targeted to the Golgi complex via a higher- and lower-eukaryote-like mechanism.“ (Struck et al., 2008)

Der Autor war an der Klonierung und Transfektion einiger Konstrukte und an der Analyse der *in vivo* Daten beteiligt. Der Artikel wurde von den Autoren gemeinsam verfasst.

Danksagung:

Zuerst einen Dank an Dr. Tim Gilberger für die Betreuung dieser Arbeit. Ich danke vor allem für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die daraus resultierende Freiheit an dem „herumzuexperimentieren“, was mich interessiert! Ein weiterer Dank gilt Dr. Tobias Spielmann, der immer ein offenes Ohr hat und bei Problemen gerne und versiert hilft! Der Arbeitsgruppe Gilberger (und inzwischen auch Spielmann) danke ich für die ausgesprochen gute Arbeitsatmosphäre: für die Zukunft sind die Hürden hoch! Ein besonderer Dank an die Personen, die, für allgemeine Aufgaben viel tun- was teilweise wenig gewürdigt wird- Maya, Ana, Susi!

Ich danke den beiden Dissertationsgutachtern Herren Prof. Tannich und Dr. Warnecke für das Lesen dieser Seiten und im Voraus den Disputationsgutachtern für das Stellen von einfachen Fragen!

Meinen Eltern, die sich durch diesen wissenschaftlichen Text auf der Suche nach Rechtschreibfehlern gekämpft haben. Vielen Dank an Herrn Dr. Andreas Krüger aka. Krüschi für die hervorragende Adleraugenkorrektur der Arbeit und das letzte überflüssige Komma, das er entdeckt hat!

Ich danke Claudia Sander-Jülch für die technische Hilfe am FACS, die mir viele, viele Stunden des Zählens erspart hat!

Ein besonderer Dank an Frau Karow und Frau Jessen für das leibliche Wohl, das nicht wenig zu meiner allgemeinen Zufriedenheit beigetragen hat. Ich danke den Supportern aus der Nachbarschaft, der „Scharfen Ecke“, der „Kogge“, der „Roten Laterne“ und dem „Griechen“ für die schönen Stunden die ich dort verbringen konnte.

Zu guter Letzt danke ich natürlich Linda- für ihr Verständnis und ihre altruistische Ader- die mir immer wieder beweist, dass es eben doch Engel gibt!