

Charakterisierung eines Cysteinproteaseinhibitors
des Malariaerregers *Plasmodium berghei*
(Vincke und Lips, 1948)

DISSERTATION

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

vorgelegt von

Annika Rennenberg

aus Essen

Hamburg, 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn PD Dr. Volker Heussler
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Professor Dr. Iris Bruchhaus
Tag der Disputation: 04. September 2009

Hamburg, den 11. August 2009



Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Die Betreuung der vorliegenden Dissertation wurde von Herrn PD Dr. Volker Heussler übernommen. Die experimentellen Arbeiten wurden von Juli 2006 bis August 2009 am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in der Arbeitsgruppe Malaria I in Hamburg durchgeführt.

Diese Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium des Boehringer Ingelheim Fonds gefördert.

Erstgutachter: PD Dr. Volker Heussler

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Iris Bruchhaus

Zusammenfassung

Jeder Organismus muss die Aktivität seiner Proteasen streng überwachen. Parasiten müssen zusätzlich auch zahlreiche Proteasen des Wirtes hemmen, die wichtige Funktionen bei der Pathogenabwehr übernehmen. Sowohl extrazelluläre Parasiten (z.B. Nematoden und Zecken) als auch intrazelluläre Erreger (z.B. Viren und Protozoen) sezernieren Cysteinproteaseinhibitoren, die sowohl ihre eigenen Proteasen als auch die Proteasen des Wirtes kontrollieren. Die Inhibitoren schwächen beispielsweise die lokale Immunantwort, verhindern im Fall der intrazellulären Erreger den Wirtszelltod oder steuern die Prozessierung von Adhäsionsproteinen, mit deren Hilfe sich die Parasiten im Wirt orientieren.

Der Malariaerreger *Plasmodium berghei* exprimiert den Cysteinproteaseinhibitor PbICP (*Plasmodium berghei* inhibitor of cysteine proteases). PbICP ist ein ungewöhnliches Mitglied der Chagasinfamilieninhibitoren (ICPs, inhibitors of cysteine proteases, MEROPS-Familie 142). Im Rahmen dieser Arbeit wurde PbICP biochemisch, molekularbiologisch und strukturbiologisch näher charakterisiert.

Das *pbicp*-Gen wird sowohl in Mückenstadien als auch in der exoerythrozytären und erythrozytären Entwicklungsphase im Nagerwirt transkribiert. Sporoziten sezernieren den Cysteinproteaseinhibitor vor und nach Invasion von Hepatozyten. Wird PbICP vor der Invasion durch spezifische Antikörper abgefangen, reduziert sich die Anzahl der infizierten Leberzellen signifikant. Während der Entwicklung in den Leberzellen befindet sich PbICP vorwiegend in der parasitophoren Vakuole und im Parasitenzytosol. Am Ende der Leberphase wird PbICP ins Wirtszellzytosol freigesetzt. Hier könnte der Inhibitor die Aktivierung von Wirtszellproteasen verhindern und den eintretenden Wirtszelltod so abstimmen, dass er den komplizierten Freisetzungsprozess der Parasiten in den Blutstrom unterstützt. PbICP wird sowohl in der exoerythrozytären Phase als auch während der erythrozytären Phase proteolytisch prozessiert. Dabei wird der für die Plasmodien-ICPs spezifische N-terminale Teil des Proteins abgebaut, so dass nur die Chagasin-ähnliche Inhibitor-domäne übrig bleibt. Um die Prozessierung auch in der Leberphase im Western Blot nachzuweisen, wurden transgene *P. berghei* hergestellt, die den Inhibitor als GFP-Fusionsprotein überexprimierten.

Sowohl das Volllängenprotein als auch die prozessierte Form des Inhibitors (PbICP-C) wurden als rekombinante Proteine in *E. coli* hergestellt, gereinigt und in Kinetikstudien verwendet. Beide Proteine hemmten Papain, die Parasitenprotease Falcipain-2 und die Wirtsprotease Cathepsin L, nicht aber die Wirtsprotease Cathepsin B. PbICP-C wurde in großen Mengen gereinigt und in Zusammenarbeit mit Kristallographen der Universität Lübeck wurde die Kristallstruktur im Komplex mit Falcipain-2 gelöst.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über PbICP bilden die Basis für zahlreiche weitere Projekte, die unter anderem direkte medizinische Relevanz

haben. Beispielsweise soll zukünftig untersucht werden, ob sich der Cysteinproteaseinhibitor des Malariaerregers als Vakzinekandidat eignet, ob PbICP das Immunsystem des Wirtes manipuliert und ob die Kristallstruktur bei der Entwicklung von selektiven Proteaseinhibitoren helfen kann.

Schlagwörter: *Plasmodium berghei*, exoerythrozytäre Phase, Proteaseinhibitor, Chagasin, Cysteinproteasen, Sporozoiten, Invasion, Wirtszelltod, Prozessierung, Kristallstruktur

Abstract

Organisms strictly regulate their proteases to avoid undesired hydrolytic activity. Parasites have to control both their own proteases as well as the proteases of their host which are often involved in the defense against pathogens. Many intracellular and extracellular parasites secrete specific and tight-binding cysteine protease inhibitors that inhibit endogenous and host-derived proteases.

The rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* expresses PbICP (*Plasmodium berghei* inhibitor of cysteine proteases), an unusual member of the chagasin inhibitor family (ICPs, inhibitors of cysteine proteases, MEROPS family 142). In my PhD I characterized PbICP on the level of its biochemistry, cell and molecular biology as well as its structure.

Transcription of the *pbicp* gene takes place in the mosquito stage as well as in the exoerythrocytic and erythrocytic stage in the vertebrate host. Sporozoites secrete PbICP prior to and after invasion of hepatocytes. Antibody-mediated blockage of the inhibitor significantly reduced the number of infected hepatocytes in a dose-dependent manner. During liver stage development, PbICP predominantly localizes in the parasitophorous vacuole and in the parasite cytoplasm. At the end of the liver stage, the inhibitor is liberated into the host cell cytosol. Here the released PbICP probably fine-tunes the unusual death of the host cell by blocking host cell proteases. PbICP is proteolytically processed during the exoerythrocytic and erythrocytic parasite stages. The *Plasmodium*-specific N-terminal extension region is cleaved off and degraded in this process, yielding the chagasin-like C-terminal inhibitor domain of PbICP. Transgenic parasites overexpressing PbICP-GFP confirmed the processing of the inhibitor.

The full length PbICP as well as the processed form (PbICP-C) were expressed in *E. coli*, purified and used for kinetic studies. Both recombinant proteins inhibited papain, the parasite cysteine protease falcipain-2 as well as the host protease cathepsin L, but could not block the host protease cathepsin B. Recombinant PbICP-C was purified in large quantities, and in collaboration with crystallographers (University of Luebeck) the crystal structure of the PbICP-C in complex with falcipain-2 was solved.

The results of this study provide the basis for future projects that might have a direct medical impact. For instance, it will be investigated if PbICP is a suitable vaccine candidate and if the protease inhibitor manipulates the immune system of the host. Structural information on PbICP might aid the development of selective protease inhibitors directed against specific proteases.

Keywords: *Plasmodium berghei*, exoerythrocytic stage, protease inhibitor, chagasin, sporozoite, cysteine protease inhibitor, sporozoite, invasion, host cell death, protein processing, crystal structure

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Zusammenfassung | 4 |
| Abstract | 6 |
| Inhaltsverzeichnis | 8 |
| Abbildungsverzeichnis | 11 |
| Tabellenverzeichnis | 13 |
| Abkürzungsverzeichnis | 15 |
| 1 Einleitung | 18 |
| 1.1 Malaria | 18 |
| 1.1.1 Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i> | 20 |
| 1.1.2 Strategien zur Bekämpfung der Malaria..... | 23 |
| 1.2 Die Leberphase | 25 |
| 1.2.1 Das Nagetiermodell: Forschen mit <i>P. berghei</i> | 25 |
| 1.2.2 Detaillierte Beschreibung der exoerythrozytären Phase | 25 |
| 1.2.3 Die medizinische Relevanz der Leberphase..... | 35 |
| 1.3 Cysteinproteasen..... | 37 |
| 1.4 Cysteinproteaseinhibitoren | 39 |
| 1.5 Bedeutung von Cysteinproteasen und ihren Inhibitoren bei Infektionskrankheiten..... | 40 |
| 1.6 Inhibitortypen und ihre physiologische Relevanz | 42 |
| 1.7 Cysteinproteaseinhibitoren der Chagasinfamilie | 45 |
| 1.8 Zielsetzung der Arbeit..... | 47 |
| 2 Material und Methoden | 48 |
| 2.1 Kultivierung von <i>P. berghei</i> | 52 |
| 2.1.1 Färben von Blutaussstrichen mit Wright-Lösung | 52 |
| 2.1.2 Blutstabilate..... | 52 |
| 2.1.3 Mückenzucht und Mückeninfektion..... | 53 |
| 2.2 Kultivierung und Infektion von HepG2-Zellen..... | 53 |
| 2.3 Isolation der Gesamt-RNA von <i>P. berghei</i> | 55 |
| 2.3.1 RNA-Isolation während der Mückenphase..... | 55 |
| 2.3.2 RNA-Isolation während der Leberphase | 55 |
| 2.3.3 RNA-Isolation während der Blutphase | 55 |
| 2.4 Photometrische Bestimmung von RNA-Konzentrationen | 55 |
| 2.5 Transfektion von <i>P. berghei</i> | 56 |
| 2.6 Isolation der gDNA von erythrozytären <i>P. berghei</i> -Stadien | 59 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.7 | Saponinextrakt von erythrozytären <i>P. berghei</i> -Parasiten | 59 |
| 2.8 | Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen | 59 |
| 2.9 | Reverse Transkription..... | 60 |
| 2.10 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 60 |
| 2.10.1 | Duplex-PCR | 63 |
| 2.11 | Agarosegelelektrophorese | 63 |
| 2.12 | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> | 64 |
| 2.13 | Klonierungen | 65 |
| 2.13.1 | DpnI-Restriktion..... | 65 |
| 2.13.2 | Aufreinigung von DNA (PCR-Produkte, Plasmide) | 65 |
| 2.13.3 | DNA-Restriktion (PCR-Produkte, Plasmide)..... | 65 |
| 2.13.4 | DNA-Ligation | 66 |
| 2.13.5 | Übersicht über die verwendeten Vektoren und Primer..... | 67 |
| 2.14 | Transformation von <i>E. coli</i> | 69 |
| 2.15 | Plasmid-DNA-Gewinnung in großem Maßstab | 70 |
| 2.16 | Plasmid-DNA-Gewinnung in kleinem Maßstab | 70 |
| 2.16.1 | Plasmidpräparation mit Glasmilch (für Transformationen) | 70 |
| 2.16.2 | Plasmidpräparation mit Kit (für Sequenzierungen)..... | 71 |
| 2.17 | Sequenzierung von DNA | 71 |
| 2.18 | Proteinexpression in <i>E. coli</i> | 71 |
| 2.19 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 72 |
| 2.20 | Coomassie-Färbung von Proteingelen..... | 73 |
| 2.21 | Affinitätschromatographische Proteinaufreinigungen | 74 |
| 2.21.1 | His ₁₀ -Fusionsproteinaufreinigung unter nativen Bedingungen | 74 |
| 2.21.2 | GST-Fusionsproteinaufreinigung unter nativen Bedingungen..... | 75 |
| 2.21.3 | MBP-Fusionsproteinaufreinigung unter nativen Bedingungen | 75 |
| 2.22 | Dialyse der Proteinlösungen | 76 |
| 2.23 | Entfernung des MBP-Anhangs mit Faktor Xa..... | 76 |
| 2.24 | Proteinaufreinigungen mittels Ionenaustauschchromatographie | 76 |
| 2.25 | Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung | 77 |
| 2.26 | Inhibitorstudien | 78 |
| 2.27 | Herstellung von Antiseren..... | 80 |
| 2.27.1 | Übersicht über die Anti-PbICP-Antiseren..... | 83 |
| 2.28 | Proteinextrakte von <i>P. berghei</i> | 84 |
| 2.28.1 | Totallysat von infizierten HepG2-Zellen, Speicheldrüsen und Blutschizonten ... | 84 |
| 2.28.2 | Triton X-100-Lysate von <i>P. berghei</i> Saponinextrakten (HNET-Extrakte)..... | 84 |
| 2.29 | Western Blot-Analyse | 85 |
| 2.30 | Indirekte Immunfluoreszenzanalyse..... | 87 |
| 2.30.1 | Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von infizierten HepG2-Zellen und Sporoziten | 87 |
| 2.30.2 | Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von infizierten Blutzellen | 88 |

| | |
|---|------------|
| Inhaltsverzeichnis | 10 |
| <hr/> | |
| 2.31 Lebendfärbung von Sporozoiten | 90 |
| 2.32 Neutralisationsexperimente mit Sporozoiten | 91 |
| 2.33 Immunoelektronenmikroskopie | 92 |
| 2.33.1 Doppel-IEM-Färbungen | 95 |
| 2.33.2 Semi-Dünnschnitte | 95 |
| 2.34 Kultivierung und Transfektion von CHO-Zellen | 96 |
| 2.34.1 Magnetassoziierte Transfektion (MaTRA) | 96 |
| 2.34.2 CHO-Stabilate | 97 |
| 2.35 Zelltodstudien | 97 |
| 2.36 Lebendfärbungen von infizierten HepG2-Zellen | 97 |
| 2.37 Kristallisation von PbICP-C ^{GDEK} im Komplex mit der Parasitenprotease Falcipain-2 | 98 |
| 3 Ergebnisse | 100 |
| 3.1 Strukturelle Besonderheiten von PbICP | 100 |
| 3.2 Inhibitorstudien mit rekombinant hergestelltem PbICP | 102 |
| 3.3 Expression und Lokalisation von PbICP | 105 |
| 3.3.1 <i>P. berghei</i> Sporozoiten und junge Leberstadien sezernieren PbICP | 108 |
| 3.3.2 Ein Teil von PbICP wird in die PV transportiert | 116 |
| 3.3.3 PbICP-Freisetzung in das Hepatozytenzytoplasma am Ende der Leberphase | 118 |
| 3.4 PbICP wird posttranslational prozessiert | 120 |
| 3.5 Die N-terminale Region von PbICP ist nicht notwendig für die Inhibitorfunktion | 125 |
| 3.6 PbICP übernimmt eine wichtige Funktion bei der Infektion von HepG2-Zellen durch Sporozoiten | 129 |
| 3.7 Kristallstruktur von PbICP-C in Komplex mit Falcipain-2 | 130 |
| 3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse von weiteren PbICP-Teilprojekten | 135 |
| 3.8.1 Mutagenesestudien mit rekombinantem PbICP-C ^{GDEK} | 135 |
| 3.8.2 N-terminal verkürztes PbICP-C-GFP wird nicht von frühen Parasitenstadien sezerniert und ist ein PV-Marker für lebendmikroskopische Studien | 136 |
| 3.8.3 Rekombinantes PbICP-C fördert die Integrität der Wirtszellen | 139 |
| 4 Diskussion | 142 |
| 5 Anhang: Vollständige PbICP-Sequenz | 158 |
| 6 Literaturverzeichnis | 161 |
| Danksagungen | 173 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abbildung 1-1: Verbreitung der Malaria | 18 |
| Abbildung 1-3: Verbreitung der <i>Anopheles</i> -Mücke..... | 19 |
| Abbildung 1-5: Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i> | 21 |
| Abbildung 1-7: Schematische Darstellung eines Sporozoiten und eines Merozoiten von <i>Plasmodium</i> (© A. Rennenberg)..... | 27 |
| Abbildung 1-9: Die Leberphase von <i>Plasmodium</i> (© A. Rennenberg)..... | 34 |
| Abbildung 1-10: Bedeutung der Leberphase für die Bekämpfung von <i>Plasmodium</i> | 36 |
| Abbildung 1-11: Hydrolyse von Peptidbindungen durch Cysteinproteasen (©AR) | 37 |
| Abbildung 1-12: Funktionen und Regulationsmechanismen von Proteasen (©AR)..... | 44 |
| Abbildung 1-14: Kristallstruktur von Chagasin und dessen Interaktion mit Cathepsin L..... | 46 |
| Abbildung 2-1: Transfektionsablauf bei der Herstellung transgener <i>P. berghei</i> - Parasiten | 58 |
| Abbildung 2-3: Bakterielle Expressionsplasmide | 67 |
| Abbildung 2-4: Eukaryotische Expressionsplasmide..... | 67 |
| Abbildung 2-5: Übersicht über den Ablauf der Inhibitorstudien | 79 |
| Abbildung 2-6: Spezifitätsüberprüfung des Anti-PbICP-C-Antiserums (Kaninchen) in der Immunelektronenmikroskopie..... | 82 |
| Abbildung 2-8: Spezifitätsüberprüfung des Anti-PbICP-C-Antiserums (Maus) in der Immunfluoreszenzanalyse | 82 |
| Abbildung 2-10: Spezifitätsüberprüfung des Anti-PbICP-N-Peptidantiserums (Kaninchen) und des Anti-PbICP-C-Antiserums (Maus) in der Western Blot- Analyse..... | 83 |
| Abbildung 2-12: Übersicht über die rekombinanten Proteine im Vergleich zum endogenen PbICP, die für die Immunisierung verwendet wurden | 83 |
| Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des <i>pbicp</i> Gens..... | 100 |
| Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von PbICP im Vergleich zu Chagasin | 101 |
| Abbildung 3-5: Sequenzvergleich der Chagasinfamilienmitglieder..... | 102 |
| Abbildung 3-7: Rekombinantes PbICP ist ein effizienter Inhibitor von Papain..... | 104 |
| Abbildung 3-9: Das Gen <i>pbicp</i> wird während der Blut-, der Mücken- und der Leberphase transkribiert. | 105 |
| Abbildung 3-11: PbICP kann in erythrozytären Stadien von <i>P. berghei</i> nachgewiesen werden. | 106 |
| Abbildung 3-13: PbICP kann im Sporozoitenstadium und während der gesamten Leberphase von <i>P. berghei</i> nachgewiesen werden..... | 107 |
| Abbildung 3-15: PbICP wird von extrazellulären Sporozoiten sezerniert..... | 109 |
| Abbildung 3-17: PbICP ist an einem Pol unfixierter Sporozoiten lokalisiert..... | 110 |
| Abbildung 3-19: PbICP wird von intrazellulären Sporozoiten sezerniert..... | 111 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 3-21: PbICP wird von transformierenden Sporozoiten, Lebertrophozoiten und jungen Leberschizonten in der Nähe des Wirtszellkerns sezerniert. | 112 |
| Abbildung 3-23: Konfokale Aufnahmen bestätigen die Sekretion von PbICP in der Nähe des Wirtszellkerns. | 113 |
| Abbildung 3-25: PbICP befindet sich in Vesikeln von <i>P. berghei</i> Sporozoiten..... | 114 |
| Abbildung 3-27: IEM-Studien bestätigen, dass PbICP von freien und intrazellulären Sporozoiten sezerniert wird..... | 115 |
| Abbildung 3-29: PbICP kolokalisiert in Vesikeln mit TRAP und CSP (IEM)..... | 116 |
| Abbildung 3-31: PbICP kolokalisiert partiell mit dem PVM-Marker Expl..... | 117 |
| Abbildung 3-33: Ein großer Teil von PbICP ist außerhalb des Parasitenzytosols lokalisiert..... | 117 |
| Abbildung 3-18: PbICP kolokalisiert auch in erythrozytären Stadien partiell mit dem PVM-Marker Expl und kann in PV-assoziierten vesikulären Strukturen nachgewiesen werden. | 118 |
| Abbildung 3-36: PbICP kolokalisiert mit dem PV-Marker SERA2 im Schizontenstadium in der PV und am Ende der Leberphase im Wirtszellzytosol. | 119 |
| Abbildung 3-21: PbICP wird am Ende der Leberphase in die Wirtszelle freigesetzt... .. | 119 |
| Abbildung 3-23: PbICP wird während der Blutphase und im Sporozoitenstadium posttranslational prozessiert..... | 121 |
| Abbildung 3-25: PbICP wird im Leberschizonten posttranslational prozessiert. | 121 |
| Abbildung 3-27: Western Blot-Analysen von Blutstadien, Sporozoiten und Leberstadien der PbICP-GFP exprimierenden Parasiten bestätigten die Prozessierung von PbICP. | 122 |
| Abbildung 3-29: Lebendmikroskopische Aufnahmen von Leberstadien der PbICP-GFP exprimierenden <i>P. berghei</i> -Parasiten..... | 124 |
| Abbildung 3-31: Rekombinante PbICP-Konstrukte im Vergleich zum endogen prozessierten PbICP | 126 |
| Abbildung 3-33: Die N-terminale Domäne von PbICP ist nicht notwendig für die Inhibitorfunktion..... | 128 |
| Abbildung 3-35: Blockierung von PbICP durch spezifisches Antiserum reduziert die Infektiosität von <i>P. berghei</i> Sporozoiten <i>in vitro</i> | 130 |
| Abbildung 3-37: Kristallstruktur von PbICP-C in Komplex mit der <i>Plasmodium</i> -Cysteinprotease Falcipain-2..... | 131 |
| Abbildung 3-39: Die Kristallstruktur von PbICP-C ^{GDEK} im Detail | 132 |
| Abbildung 3-41: Vergleich der Kristallstrukturen von PbICP-C ^{GDEK} und Chagasin im Komplex mit Falcipain-2..... | 133 |
| Abbildung 3-43: Modell von PbICP-C ^{GDEK} im Komplex mit Cathepsin L und B..... | 134 |
| Abbildung 3-45: Übersicht über die Sequenzen der PbICP-C ^{GDEK} -Mutanten | 135 |
| Abbildung 3-33: N-terminal deletiertes PbICP-C-GFP wird im Gegensatz zum Vollängen-PbICP-GFP und zum endogenen PbICP nicht von jungen exoerythrozytären Parasitenstadien sezerniert. | 137 |
| Abbildung 3-48: PbICP-C-GFP ist ein stabiler PV-Marker (3D-Lebendmikroskopie).. | 138 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 3-36: Wirtszelllysosomen assoziieren mit der PV, ohne jedoch mit dieser zu fusionieren (konfokale Videomikroskopie)..... | 138 |
| Abbildung 3-38: Schematische Darstellung des Transfektionsplasmides pEGFPC2gfp-pbicip-c..... | 139 |
| Abbildung 3-40: Immunfluoreszenzanalyse von GFP bzw. GFP-PbICP-C ^{GDEK} exprimierenden CHO-Zellen nach TBHP-Behandlung..... | 140 |
| Abbildung 3-42: GFP-PbICP-C Expression in HepG2-Zellen schützt vor Zelltod. | 141 |
| Abbildung 4-1: PbICP kann eine Vielzahl von biologischen Funktionen übernehmen..... | 156 |
| Abbildung 4-3: Potentielle medizinische Nutzen von PbICP | 157 |
| Abbildung 5-1: Vollständige Sequenz von PbICP im Vergleich mit Chagasinfamilienmitgliedern..... | 160 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 2-1: Geräte | 48 |
| Tabelle 2-2: Fluoreszenzmikroskope und Elektronenmikroskop | 49 |
| Tabelle 2-3: Verbrauchsmaterialien..... | 50 |
| Tabelle 2-4: Datenbanken und Programme | 51 |
| Tabelle 2-5: Standardansatz für eine PCR mit der Mid Range Polymerase (PEQLAB) | 61 |
| Tabelle 2-6: Standard-PCR-Programm mit der Mid Range Polymerase | 61 |
| Tabelle 2-7: Standardansatz für eine PCR mit der Phusion Polymerase (Finnzymes/NEB)..... | 61 |
| Tabelle 2-8: Standard-PCR-Programm mit der Phusion Polymerase..... | 62 |
| Tabelle 2-9: Standard-PCR-Ansatz mit der Hot FirePol® Polymerase (Solis Biodyne)..... | 62 |
| Tabelle 2-10: Standard-PCR-Programm mit der Hot FirePol® Polymerase | 62 |
| Tabelle 2-11: Übersicht über Primer und Plasmid-Konstrukte..... | 68 |
| Tabelle 2-12: Pipettierschema für zwei Sammel- und zwei 12%ige Trenngele | 73 |
| Tabelle 2-13: Gradient bei der Reinigung von PbICP-Volllänge über die Mono Q-Säule | 76 |
| Tabelle 2-14: Gradient bei der Reinigung von PbICP-C über die Mono Q-Säule | 77 |
| Tabelle 2-15: p-Nitroanilinpeptidyl-Substrate (BACHEM Biochemica, Heidelberg) | 80 |
| Tabelle 2-16: Cysteinproteasen..... | 80 |
| Tabelle 2-17: Übersicht über die hergestellten Antiseren..... | 84 |
| Tabelle 2-19: Erstantikörper für Western Blot-Analysen | 86 |
| Tabelle 2-20: Zweitantikörper für Western Blot-Analysen | 86 |
| Tabelle 2-21: Erstantikörper für Immunfluoreszenzanalysen | 89 |
| Tabelle 2-22: Zweitantikörper und DNA-Farbstoffe für Immunfluoreszenzanalysen..... | 89 |

| | |
|--|-----|
| Tabelle 2-23: Antiseren, Zweitantikörper und DNA-Farbstoff für die Lebendfärbung ... | 90 |
| Tabelle 2-24: Antiseren für die Vorinkubation bei den Neutralisationsexperimenten.... | 91 |
| Tabelle 2-25: Erstantikörper für IEM | 94 |
| Tabelle 2-26: Zweitantikörper für IEM..... | 94 |
| Tabelle 2-27: Lebendfarbstoffe..... | 97 |
| Tabelle 3-1: Prozentuale Restaktivität der Proteasen in Anwesenheit von PblCP | 104 |
| Tabelle 3-3: Prozentuale Restaktivität der Proteasen in Anwesenheit von PblCP-N / -C..... | 128 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|--|
| ° C | Grad Celsius |
| 5'-UTR | 5'-terminale, untranslatierte Region |
| <i>A. stephensi</i> | <i>Anopheles stephensi</i> |
| Abb. | Abbildung |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| bp | Basenpaar(e) |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CDC | Centers for Disease Control and Prevention |
| CHO | Chinese hamster ovary (Zellkulturlinie) |
| CSP | circumsporozoite protein |
| C-terminal | am Carboxyende |
| Da | Dalton |
| DAPI | 4', 6-Diamidino-2-Phenylindol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>E. histolytica</i> | <i>Entamoeba histolytica</i> |
| E-64 | L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino)-butane |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EhICP1 | <i>Entamoeba histolytica</i> inhibitor of cysteine proteases 1 |
| EhICP2 | <i>Entamoeba histolytica</i> inhibitor of cysteine proteases 2 |
| et al. | et alteri (und andere) |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| ExpI | exported protein I |
| FCS | fötale Kälberserum |
| g | Gramm, Erdbeschleunigung |
| GPI-Anker | Glykosylphosphatidylinositol-Anker |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| h. p. i. | Stunden nach Infektion (hours post infection) |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| HepG2 | Humane Hepatomazelllinie |
| His ₁₀ - | zehn Histidinreste am N- oder C-Terminus eines Proteins |
| HRP | horseradish peroxidase |
| HSPGs | Heparansulfat-Proteoglykan |
| ICP | inhibitor of cysteine proteases |
| IMC | inner membrane complex |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid |
| k | Kilo (10 ³) |

| | |
|----------------------|---|
| <i>L. major</i> | <i>Leishmania major</i> |
| <i>L. mexicana</i> | <i>Leishmania mexicana</i> |
| LB | Luria-Bertani |
| LmICP | <i>Leishmania mexicana</i> inhibitor of cysteine proteases |
| M | molar, Mega- |
| m | milli (10^{-3}), Meter |
| MBP | Maltose-bindendes Protein |
| MEROPS | Peptidasen- und Inhibitor-Datenbank |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure |
| mRNA | messenger RNA |
| MWCO | molecular weight cut-off |
| n | nano (10^{-9}) |
| Ni | Nickel |
| NTA | Nitrilotriessigsäure |
| N-terminal | am Aminoende |
| OD | Optische Dichte |
| p | piko (10^{-12}), para- |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| <i>P. berghei</i> | <i>Plasmodium berghei</i> |
| <i>P. chabaudi</i> | <i>Plasmodium chabaudi</i> |
| <i>P. falciparum</i> | <i>Plasmodium falciparum</i> |
| <i>P. knowlesi</i> | <i>Plasmodium knowlesi</i> |
| <i>P. malariae</i> | <i>Plasmodium malariae</i> |
| <i>P. ovale</i> | <i>Plasmodium ovale</i> |
| <i>P. vivax</i> | <i>Plasmodium vivax</i> |
| <i>P. yoelii</i> | <i>Plasmodium yoelii</i> |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PbICP | <i>Plasmodium berghei</i> inhibitor of cysteine proteases |
| PbICP-C | C-terminale Inhibitor-domäne von PbICP |
| PbICP-N | N-terminale Verlängerungsregion von PbICP |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PfICP | <i>Plasmodium falciparum</i> inhibitor of cysteine proteases |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |
| pNA | p-Nitroanilin |
| PV | parasitophore Vakuole |
| PVM | parasitophore Vakuolenmembran |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAse | Ribonuklease |
| s | Sekunde |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SERA | Serine repeat antigen (Proteasenfamilie von <i>Plasmodium</i>) |
| SPECT | Sporozoite Microneme Protein Essential for Cell Transversal |
| <i>T. brucei</i> | <i>Trypanosoma brucei</i> |
| <i>T. cruzi</i> | <i>Trypanosoma cruzi</i> |
| <i>T. gondii</i> | <i>Toxoplasma gondii</i> |

| | |
|----------------------|---|
| <i>Tab.</i> | <i>Tabelle</i> |
| <i>TBE</i> | <i>Tris-Borat-EDTA</i> |
| <i>TBHP</i> | <i>tert-Butylhydroperoxid</i> |
| <i>TbICP</i> | <i>Trypanosoma brucei inhibitor of cysteine proteases</i> |
| <i>TBS</i> | <i>Tris-buffered saline</i> |
| <i>TBS-T</i> | <i>Tris-buffered saline und Tween 20</i> |
| <i>TEMED</i> | <i>N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin</i> |
| <i>TRAP</i> | <i>Thrombospondin-related adhesive protein</i> |
| <i>Tris</i> | <i>Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan</i> |
| <i>U</i> | <i>Unit</i> |
| <i>u</i> | <i>mikro (10⁻⁶)</i> |
| <i>UV</i> | <i>Ultraviolett</i> |
| <i>V</i> | <i>Volt</i> |
| <i>WHO</i> | <i>World Health Organization</i> |
| <i>v/v</i> | <i>Volumen pro Volumen</i> |
| <i>w/v</i> | <i>Gewicht pro Volumen</i> |
| <i>Z-Arg-Arg-pNA</i> | <i>Benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginin-p-nitroanilid</i> |
| <i>Z-Phe-Arg-pNA</i> | <i>Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-arginin-p-nitroanilid</i> |

1 Einleitung

1.1 Malaria

Malaria (*ital.* mala aria - schlechte Luft) ist eine Infektionskrankheit, die durch intrazelluläre Parasiten der Gattung *Plasmodium* hervorgerufen wird. Schätzungsweise 40 % der Weltbevölkerung leben in Gebieten, in denen Malaria endemisch vorkommt (WHO 2007). Die Verbreitung der Parasiten beschränkt sich heutzutage auf die Tropen und Subtropen. Endemiegebiete sind Teile Asiens, Afrika, Zentral- und Südamerika sowie Teile der Karibik (Abbildung 1-1). Jährlich erkranken mehr als 500 Millionen Menschen an schwerer Malaria, schätzungsweise bis zu 3 Millionen Infizierte sterben (WHO 2007)¹. Die meisten Todesfälle betreffen Kinder unter 5 Jahren und Schwangere in den südlich der Sahara gelegenen Regionen in Afrika. Statistisch gesehen stirbt alle 30 Sekunden ein afrikanisches Kind an Malaria. In vielen Endemiegebieten stellt die Malaria nicht nur ein Gesundheitsrisiko dar, sondern führt auch zu bedeutenden sozialen und wirtschaftlichen Problemen. Wirtschaftswissenschaftler schätzen, dass Malaria in einigen afrikanischen Ländern für eine Wachstums-Einbuße von bis zu 1,3 % pro Jahr verantwortlich ist (WHO 2007). In vielen Endemiegebieten bilden die Malaria und die Armut der Bevölkerung einen Teufelskreis, der in den betroffenen Regionen sowohl die Bekämpfung des Erregers als auch die Verbesserung der Infrastruktur und des Gesundheitswesens erschwert.

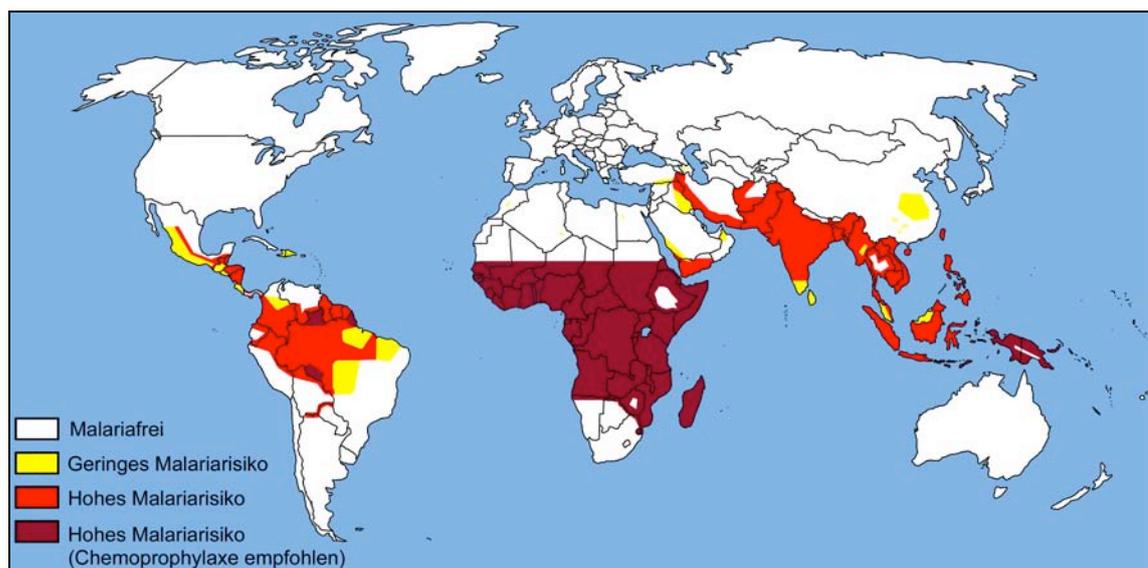


Abbildung 1-1: Verbreitung der Malaria

Stand 2005, (<http://rbm.who.int/wmr2005/html/map1.htm>)

Plasmodium ist ein einzelliger Parasit des Phylums *Apicomplexa*. Es gibt vier bekannte humanpathogene *Plasmodium*-Spezies, die verschiedene Formen der Malaria verursachen: *P. falciparum* (Malaria tropica), *P. vivax* (Malaria tertiana), *P. ovale* (Malaria tertiana) und *P. malariae* (Malaria quartana). Neuere Studien haben zudem gezeigt, dass der ursprünglich in Affen beschriebene Erreger *P. knowlesi* auch Menschen infizieren kann ². *P. falciparum* und *P. vivax* kommen am häufigsten vor. Die durch *P. falciparum* verursachte Malaria tropica (auch als Falciparum-Malaria bezeichnet) verursacht mit Abstand die meisten Todesfälle ³.

Wie die meisten durch Protozoen verursachten Infektionskrankheiten wird der Malariaerreger durch einen Insekten-Vektor verbreitet. Plasmodien werden durch den Stich einer infizierten *Anopheles*-Mücke übertragen. Schätzungsweise 30 bis 40 der ungefähr 430 *Anopheles*-Arten können humanpathogene Malariaerreger übertragen (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*, 2009). Einige dieser *Anopheles*-Arten kommen auch in den gemäßigten Klimazonen und damit auch in Deutschland vor (Abbildung 1-2). Da es aber wenig Mückenbrutplätze in der Nähe von Wohnstätten gibt und infizierte Menschen sofort behandelt werden, spielt in Deutschland nur noch die allochthone (eingeschleppte) Malaria durch heimkehrende Tropenreisende oder Immigranten eine Rolle ⁴.

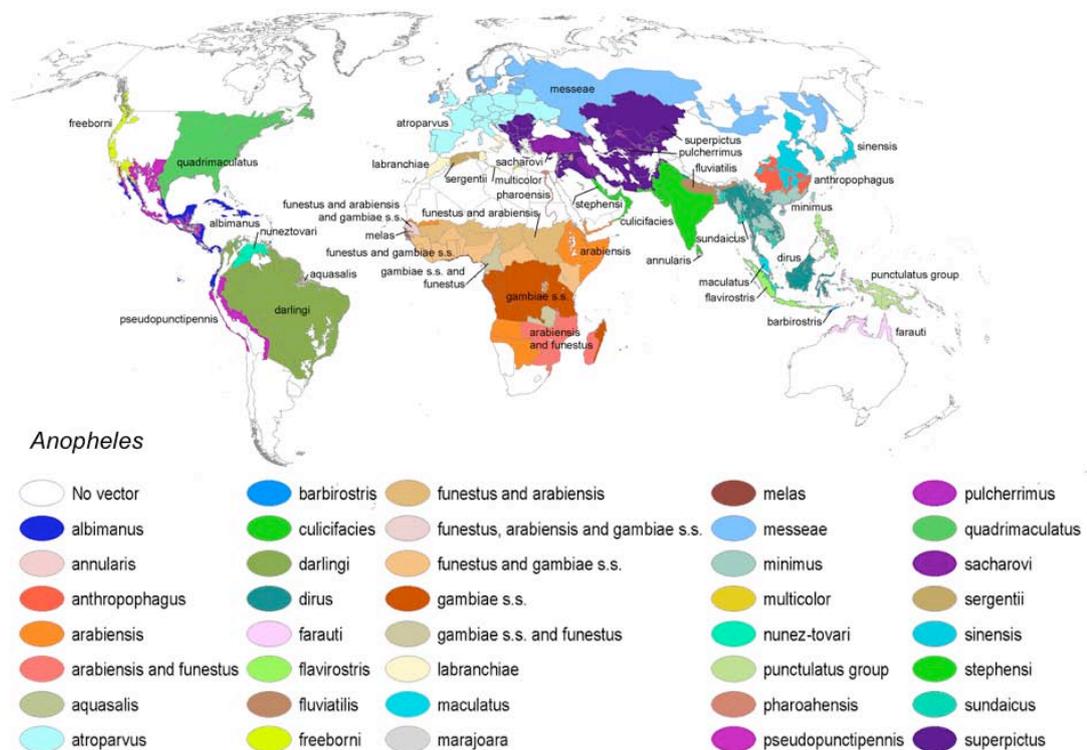


Abbildung 1-2: Verbreitung der *Anopheles*-Mücke

Stand 2008, Quelle: U.S. CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*)

Nach einer mehrtägigen Inkubationsphase in der Leber gelangen die Plasmodien ins Blut, befallen rote Blutzellen, vermehren sich in ihnen und werden unter Zellyse freigesetzt^{5,6}. In der Blutphase treten die Symptome der Erkrankung auf. Die Krankheit äußert sich zunächst in uncharakteristischen Symptomen wie Kopfschmerzen, Mattigkeit, Übelkeit und Fieber^{3,5}. Die schweren Fieberanfälle werden unter anderem durch eine überschießende Entzündungsantwort verursacht, die durch eine synchrone Freisetzung der Parasiten und dem damit einhergehenden Massenerfall roter Blutzellen ausgelöst wird^{5,6}. Durch den Verlust roter Blutzellen kommt es zum Auftreten typischer Anämie-Symptome wie Kurzatmigkeit und Tachykardie. Mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten weisen auf ihrer Zelloberfläche Parasitenproteine auf, die zur ihrer Anheftung an das Kapillarendothel und zu einer Rosettenbildung infizierter und nicht infizierter roter Blutzellen führen können^{3,6}. Die Kombination von Zytoadhärenz, Rosettenbildung und einer überschießenden Immunreaktion führt bei Malaria tropica häufig zu Komplikationen, die mit Gewebehypoxien und Organschädigungen einhergehen⁵. Treten unter anderem neurologische Ausfallerscheinungen auf, die bis hin zum Koma reichen können, spricht man von zerebraler Malaria (WHO 2007). Unbehandelt führt diese schwere Form der Malaria zum Tod des Erkrankten. Selbst bei rechtzeitiger Verabreichung von Antimalariamedikamenten sterben zwischen 15 und 20 % dieser Patienten, bei Überlebenden können zudem bleibende Hirnschäden entstehen (WHO 2006).

Es sind ungefähr 200 verschiedene Plasmodienarten bekannt, die alle in ihrem Lebenszyklus einen Mosquito-Vektor (Endwirt) und einen Vertebraten-Wirt (Zwischenwirt) befallen. Neben dem Menschen können in Abhängigkeit von der *Plasmodium*-Art Affen, Nagetiere, Vögel und Reptilien als Zwischenwirt dienen⁶. Im folgenden Abschnitt wird der Lebenszyklus des Malariaerregers näher erläutert.

1.1.1 Der Lebenszyklus von *Plasmodium*

Plasmodien durchlaufen während ihrer Entwicklung einen Generationswechsel sowie einen obligaten Wirtswechsel zwischen *Anopheles*-Mücke und Vertebratenwirt⁵. In Abbildung 1-3 ist der Lebenslauf schematisch dargestellt.

Die Entwicklung im Säugewirt wird in eine exoerythrozytäre Phase in der Leber und eine erythrozytäre Phase im Blut unterteilt. Beim Stich einer infizierten *Anopheles*-Mücke werden die Malariaerreger zusammen mit dem Speichelsekret in die Haut des Vertebratenwirtes inokuliert^{7,8}. In diesem Stadium werden die Parasiten Sporozoiten genannt. Sie sind äußerst mobil, invadieren Blutgefäße in der Haut und gelangen mit dem Blutstrom in die feinen Blutgefäße der Leber (Sinusoide)⁹. Über die im Endothel sitzenden Lebermakrophagen (Kupfferzellen) dringen die Sporozoiten in das Lebergewebe ein und transmigrieren zunächst Hepatozyten^{9,10}. Einige der Hepatozyten werden schließlich unter Ausbildung einer parasitophoren Vakuole (PV) infiziert. Innerhalb der PV entwickeln sich die Parasiten über das vielkernige Schizontenstadium zu mehreren tausend Merozoiten¹¹. Bei Infektionen mit *P. vivax*

und *P. ovale* entstehen zusätzlich einkernige Dauerstadien (Hypnozoiten), die über mehrere Jahre in der Leber fortbestehen können und für Malariarückfälle verantwortlich sind ⁵. Im Gegensatz zu der nachfolgenden erythrozytären Phase verläuft die Entwicklung in der Leber völlig symptomlos. Die Dauer des Leberschizogoniezyklus hängt von der Plasmodienspezies ab und kann von 2 (*P. berghei*) bis zu 15 Tagen (*P. malariae*) reichen ^{5, 12}.

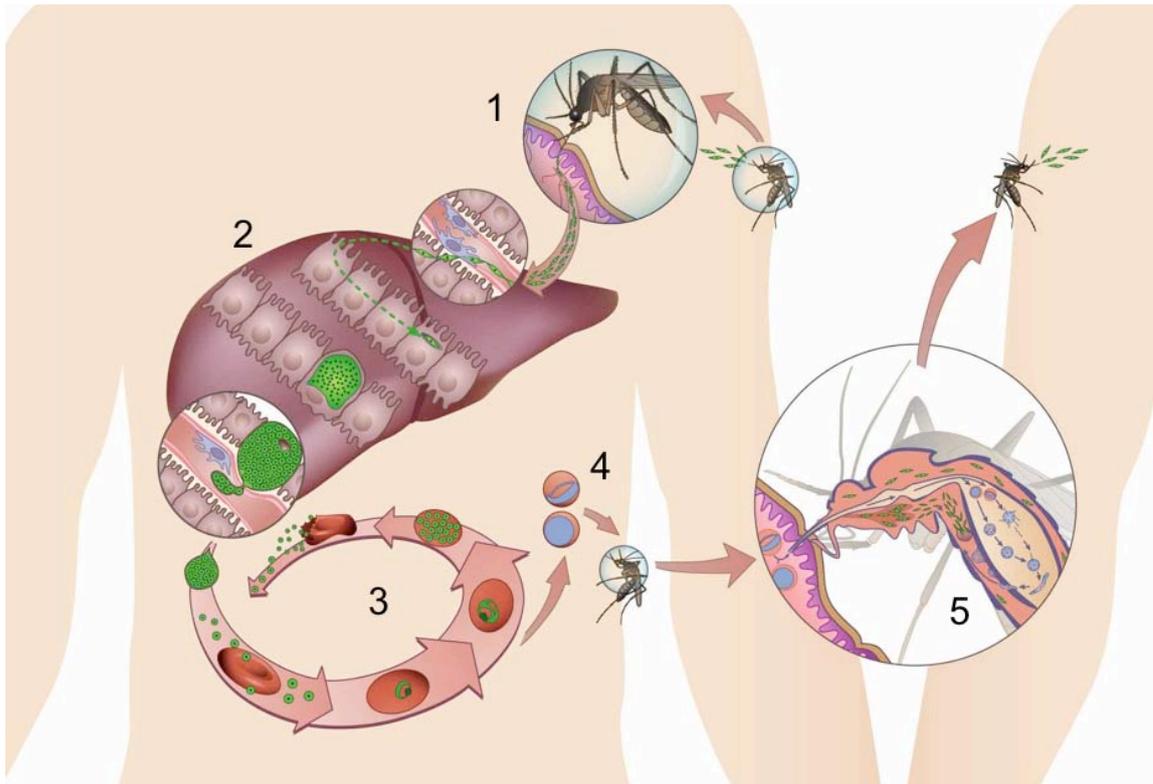


Abbildung 1-3: Der Lebenszyklus von *Plasmodium*

(1) Eine infizierte Anopheles-Mücke (Endwirt) überträgt beim Stich Sporozoiten in die Haut des Vertebraten (Zwischenwirt). (2) Sporozoiten invadieren Blutgefäße in der Haut und adhären in den Sinusoiden der Leber, wo sie Kupferzellen transmigrieren und so ins Lebergewebe gelangen. Hier transmigrieren sie einige Hepatozyten, bis sie schließlich unter Ausbildung einer parasitophoren Vakuole einen Hepatozyten infizieren. Innerhalb der parasitophoren Vakuole replizieren sich die Parasiten über ein vielkerniges Schizontenstadium, aus dem wiederum Tausende von einkernigen Merozoiten hervorgehen. Am Ende der Leberphase werden die Merozoiten in das Wirtszellzytoplasma freigesetzt und in sogenannten Merosomen gruppenweise in die Lebersinusoide abgeschnürt. (3) Außerhalb der Leber werden die Merozoiten ins Blut freigesetzt und befallen rote Blutzellen (Erythrozyten oder Retikulozyten). Die Parasiten replizieren sich, werden durch Zellyse wieder freigesetzt und infizieren erneut rote Blutzellen. (4) Einige Parasiten entwickeln sich zu männlichen und weiblichen Gametozyten. Werden die Geschlechtsformen bei der Blutmahlzeit einer Mücke aufgenommen, beginnt die geschlechtliche Vermehrung im Insektenvektor. (5) Im Mückendarm verschmelzen weiblicher und männlicher Gametozyt zu einer beweglichen Zygote (Ookinete), die sich im Mitteldarmepithel zur Oozyste entwickelt. Aus einer Oozyste entstehen tausende Sporozoiten, die in die Hämolymphe der Mücke freigesetzt werden und die Speicheldrüsen invadieren. Bei dem nächsten Mückenstich werden die Sporozoiten mit dem Speichelsekret auf einen neuen Vertebratenwirt übertragen. Quelle: Sturm und Heussler (2007)

Am Ende der Leberphase werden die Merozoiten aus der PV in das Wirtszellzytoplasma freigesetzt¹². Zeitgleich tritt ein ungewöhnlicher Wirtszelltod auf, bei dem nach außen hin ein vitaler Phänotyp erhalten bleibt und die sterbende Zelle somit nicht vom Immunsystem erkannt wird¹². Die absterbende Wirtszelle rundet sich ab und bildet Membranausstülpungen (Merosomen) in die benachbarten Lebersinusoiden aus. Die Merosomen werden mit Merozoiten beladen, schnüren sich ab und verlassen mit dem Blutstrom die Leber^{12, 13}. Im Blut werden die Merozoiten freigesetzt und befallen rote Blutzellen¹³. Während einige Plasmodienspezies ausschließlich reife Erythrozyten infizieren, bevorzugen andere die Vorläuferstadien (Retikoluzyten). Wie die exoerythrozytären Stadien in der Leber vermehren sich die Blutstadien der Parasiten in einer parasitophoren Vakuole über ein mehrkerniges Schizontenstadium^{5, 6}. In den roten Blutzellen bilden die Parasiten eine zentrale Nahrungsvakuole aus, in der unter anderem das als Malariapigment bekannte Hämozoin gelagert wird, ein braunschwarzes Abbauprodukt des Hämoglobins⁶. In Abhängigkeit von der Plasmodienspezies entstehen aus einem Schizonten bis zu 36 Merozoiten, die nach Lyse der Wirtszelle erneut rote Blutzellen befallen^{5, 6}. Ein erythrozytärer Schizogoniezyklus dauert je nach Plasmodienspezies 24 bis 72 Stunden⁵. Durch die wiederholten Schizogoniezyklen im Blut entstehen die Symptome und die gefährlichen Folgen der Malaria. In einigen Fällen wiesen Malariapatienten Parasitämiewerte bis zu 20 % auf. Einige Merozoiten differenzieren sich nach der Invasion in rote Blutzellen zu Geschlechtsformen, den männlichen Mikrogametozyten und den weiblichen Makrogametozyten^{5, 6}. Werden die Gametozyten während der Blutmahlzeit von einer *Anopheles*-Mücke aufgenommen, beginnt die sexuelle Entwicklung der Plasmodien im Mitteldarm der Mücke. Die Mikrogametozyten differenzieren sich zu meist acht einkernigen, begeißelten Mikrogameten und die Makrogametozyten zu Makrogameten⁵. Ein Mikrogamet verschmilzt mit einem Makrogameten zu einer beweglichen Zygote (Ookinete). Die Ookineten durchqueren Mitteldarmzellen und entwickeln sich zwischen der Epithelschicht und der Basalmembran der Mitteldarmwand zu Oozysten⁵. Aus den Oozysten gehen durch asexuelle Vermehrung Tausende von Sporozoiten hervor. Sie werden in die Hämolymphe freigesetzt und invadieren die Speicheldrüsen der Mücke⁶. Je nach Plasmodienart und Außentemperatur dauert die Entwicklung im Insektenwirt 8 bis 16 Tage. Bei der nächsten Blutmahlzeit der *Anopheles*-Mücke können die Sporozoiten mit dem Speichel auf einen neuen Vertebratenwirt übertragen werden.

1.1.2 Strategien zur Bekämpfung der Malaria

Um die Malaria zu bekämpfen, gibt es grundsätzlich folgende kurzfristige und langfristige Möglichkeiten:

- Wenn eine Infektion bereits vorliegt, müssen **Antimalariamedikamente** verabreicht werden. Die Diagnose und die Bestimmung der Plasmodienspezies können über einen Blutaussstrich, über einen immunologischen Nachweis von Parasitenantigenen oder mittels PCR erfolgen (WHO 2007). Sehr oft liegen Mischinfektionen vor. In vielen Fällen werden Kombinationstherapien eingesetzt, um ein möglichst breites Wirkungsspektrum zu haben und Resistenzen der Parasiten zu umgehen (WHO 2007). Definitionsgemäß müssen die im Kombinationspräparat zusammen verabreichten Komponenten unabhängig voneinander gegen die Blutstadien wirken und unterschiedliche molekulare Zielstrukturen haben. Sehr oft werden Artemisinin und seine Derivate, die eine SERCA-Typ Ca^{2+} -ATPase des Malariaerregers hemmen, zusammen mit den länger bekannten Wirkstoffen wie den 4-Aminoquinolinderivaten verabreicht, die die Häm-Detoxifikation unterbinden (Artemisinin-based combination therapy, ACT) (WHO 2007). Im Fall von *P. vivax* and *P. ovale* muss zudem Primaquin verabreicht werden, das gegen die Hypnozoiten in der Leber wirkt und somit wichtig ist, um Rückfälle (Rezidive) zu vermeiden (WHO 2007).
- Tropenreisenden wird in Abhängigkeit von der bereisten Region und der persönlichen Gesundheitssituation oft eine **Stand-by-Therapie** zur notfallmäßigen Eigenbehandlung oder eine **Chemoprophylaxe** empfohlen.
- Zur Zeit gibt es noch keinen kommerziell erhältlichen **Impfstoff** gegen Plasmodieninfektionen. Große Probleme bei der Impfstoffentwicklung bereiten die klonale Antigenvariation des Erregers, die Antigendiversität (multiple Allele) und die Komplexität der Immunreaktion. Um möglichst viele Abwehrmechanismen zu aktivieren, werden in Studien am Tiermodell zunehmend sowohl verschiedene Verabreichungsformen als auch verschiedene Parasitenantigene miteinander kombiniert (*heterologous prime-boost*). Zum Beispiel werden über Plasmid-DNA oder virale Vektoren verabreichte Plasmodium-Antigene zusammen mit *subunit*-Vakzinen wie RTS,S/AS02A verwendet. Ein weiterer Ansatz sind die altruistischen Impfstoffe, die die Transmission des Erregers unterbinden sollen, aber dem Geimpften selbst keinen unmittelbaren Nutzen bringen. Im Fall des Malariaerregers soll die Entwicklung oder die Vitalität der Gametozyten im Blut beeinträchtigt werden, die den Zyklus im Mücken-Vektor einleiten.
- Eine weitere Möglichkeit, die Verbreitung des Malariaerregers einzudämmen, ist die **Vektorkontrolle**. Die gezielte Bekämpfung der *Anopheles*-Mücke erfolgt durch Insektizidbehandlung der Innenwände von Wohnstätten (*Indoor Residual Spraying of long-acting insecticide*, IRS), durch die Verwendung von

insektizidimprägnierten Bettnetzen (*Long-Lasting Insecticidal Nets*, LLINs) sowie durch komplementäre Methoden wie beispielsweise die Vernichtung von Brutstätten in der Nähe von Dörfern (WHO 2007). Bisher gibt es noch keine alternativen Insektizide zu DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan) und Pyrethroiden, gegen die in einigen Regionen bereits Resistenzen aufgetreten sind (WHO 2007).

1.2 Die Leberphase

Da sich die vorliegende Arbeit vorwiegend mit der Leberphase von *Plasmodium* befasst, wird dieser Abschnitt des Lebenszyklus im Folgenden ausführlicher beschrieben.

1.2.1 Das Nagetiermodell: Forschen mit *P. berghei*

Weil Leberstadien im Gegensatz zu den Blutstadien von *Plasmodium* nicht in Dauerkultur gehalten werden können, muss auf Tiermodelle ausgewichen werden. Das praktikabelste System für die Erforschung der Säugetier-Malaria ist das hier verwendete Nagetiermodell. Die im Labor verwendeten Nagetierpathogene *P. berghei*, *P. yoelii* und *P. chabaudi* ähneln in ihrer Morphologie, ihrer Physiologie und in den entstehenden Krankheitssymptomen den Malaria-Erregern des Menschen¹⁴. Ein großer Vorteil des Tiermodells ist die Möglichkeit, den Wirt in die Studien mit einzubeziehen. Auf diese Weise können Fragestellungen wie die Interaktion zwischen Parasit und Wirt, die Entwicklung von Vakzinen und die Wirkungsweise von neuen Medikamenten untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde *P. berghei* als Modellorganismus verwendet, der 1948 von Vincke und Lips entdeckt wurde und dessen natürlicher Wirt die in Zentralafrika vorkommende Waldratte *Grammomys surdaster* ist (ausführliche Informationen über *P. berghei* befinden sich auf der Webseite des Leiden University Medical Centers, <http://www.lumc.nl>).

Für die Kultivierung im Labor werden weibliche Mücken der Gattung *Anopheles stephensi* regelmäßig über eine Blutmahlzeit infiziert. Für *in vitro* Studien können Sporozoiten aus den Speicheldrüsen der Mücken isoliert und murine sowie humane Leberzellen in Kultur infiziert werden. Um den *P. berghei*-Zyklus zu erhalten, werden Mäuse über infizierte Mücken oder über die intraperitoneale Verabreichung von Blutstabilaten infiziert.

1.2.2 Detaillierte Beschreibung der exoerythrozytären Phase

Sporozoiten: Der lange Weg von der Haut bis zur Leber

Die Infektion des Säugerwirtes beginnt mit dem Stich einer infizierten *Anopheles*-Mücke. In verschiedenen Studien mit den Nagetiermodellen konnten insbesondere mit Hilfe der Intravitalmikroskopie die Übertragung der Sporozoiten auf den Wirt in Echtzeit beobachtet, die Anzahl der inokulierten Parasiten bestimmt und ihr anschließendes Schicksal verfolgt werden^{7, 15-21}. Die Parasiten gelangen durch den Mückenstich in der Regel nicht direkt ins Blut, sondern werden zunächst in das avaskuläre Gewebe der Haut freigesetzt. In der Haut können sie in Abhängigkeit von der Plasmodienart bis zu drei Stunden ohne Vitalitätsverlust bleiben, obwohl sie mit den Immunzellen des Wirtes konfrontiert werden^{7, 8, 21}. In der Tat findet bereits an der Injektionsstelle eine

Immunantwort gegen die Malariaerregers statt ²². Da sie eine wichtige Rolle für den weiteren Infektionsverlauf und damit auch für die Vakzineentwicklung spielt, wurde die Definition einer "Hautphase" von *Plasmodium* vorgeschlagen ^{22, 23}. In der Haut können Sporozoiten drei verschiedene Wege einschlagen: (1) Sie invadieren Blutkapillare und erreichen über den Blutstrom die Leber, wo sie Hepatozyten infizieren, (2) sie verbleiben in der Haut und werden früher oder später vom Immunsystem eliminiert oder (3) sie invadieren Lymphgefäße und gelangen in nahegelegene Lymphknoten, wo sie größtenteils von Dendritischen Zellen phagozytiert und degradiert werden. Letzteres trifft auf etwa 20 % der inokulierten Sporozoiten zu ^{7, 21} und ist wahrscheinlich für die Entwicklung einer Sporozoiten-spezifischen zytotoxischen T-Zellantwort von Bedeutung ²². Nicht jede infizierte Mücke überträgt Parasiten und nicht jede Infektion mit Sporozoiten führt zu einer Leberinfektion ⁸. Im *P. berghei*-Modell waren durchschnittlich 235 Sporozoiten nötig, um eine Malariaerkrankung bei Mäusen hervorzurufen ⁸. Um extrazellulär in der Phagozyten-reichen Haut des Wirtes überleben zu können, müssen die Sporozoiten Mechanismen entwickelt haben, um dem Immunsystem des Wirtes zu entgehen. Ein bereits beschriebener Immunevasionsmechanismus basiert auf der Fähigkeit der Sporozoiten, durch Zellen zu transmigrieren (*cell traversal activity*) und somit den mobilen Phagozyten in der Haut zu entkommen ²⁴.

Invasive Stadien (Zoiten) von *Plasmodium*

Grundsätzlich benötigen die Sporozoiten zwei Eigenschaften, um den langen Weg zur Leber zu bewältigen: Zum einen sind sie zu einer aktiven Aktin-Myosin-basierten, gleitenden Fortbewegung (*gliding motility*) fähig, die auch für die aktive Invasion in Wirtszellen notwendig ist ^{6, 25}. Zum anderen können sie durch unterschiedliche Wirtszelltypen transmigrieren, wodurch sie sich vor den Immunzellen des Wirtes schützen und die natürlichen Barrieren auf dem Weg zur Leber überwinden ^{10, 24, 26}. Beide Fähigkeiten sind spezifisch für das Phylum *Apicomplexa* und spiegeln sich in dem spezialisierten Aufbau der invasiven Stadien von *Plasmodium* wider. Plasmodien besitzen drei verschiedene invasive Stadien (Ookineten, Merozoiten, Sporozoiten). In Abbildung 1-4 ist schematisch der Aufbau eines Sporozoiten und eines Merozoiten von *Plasmodium* gezeigt. Sie sind stark polarisierte Zellen, die vorwiegend am apikalen Pol einzigartige sekretorische Organellen aufweisen, die Mikronemen und die Rhoptrien. Diese Organellen enthalten Proteine, die für die gleitende Fortbewegung, die Transmigration, die rezeptorvermittelte Erkennung von Wirtsstrukturen und für die Wirtszellinfektion wichtig sind. Merozoiten besitzen neben den Mikronemen und Rhoptrien noch granuläre Vesikel (*dense granules*), die ebenfalls ihren Inhalt bei der Wirtszellinvasion sezernieren. Zusammen mit dem sogenannten Polring, der ein Mikrotubuli-Organisationszentrum (*microtubule-organizing center* MTOC) ausbildet, stellen die Mikronemen und Rhoptrien den Apikalkomplex am vorderen Pol der Zoiten dar, der namensgebend für das Phylum ist. Die Zellhülle (Pellicula) der invasiven Stadien besteht aus der Plasmamembran und zwei eng nebeneinander liegenden

inneren Membranen (*inner membrane complex*, IMC), die für die molekulare Motormaschinerie essentiell sind ²⁷.

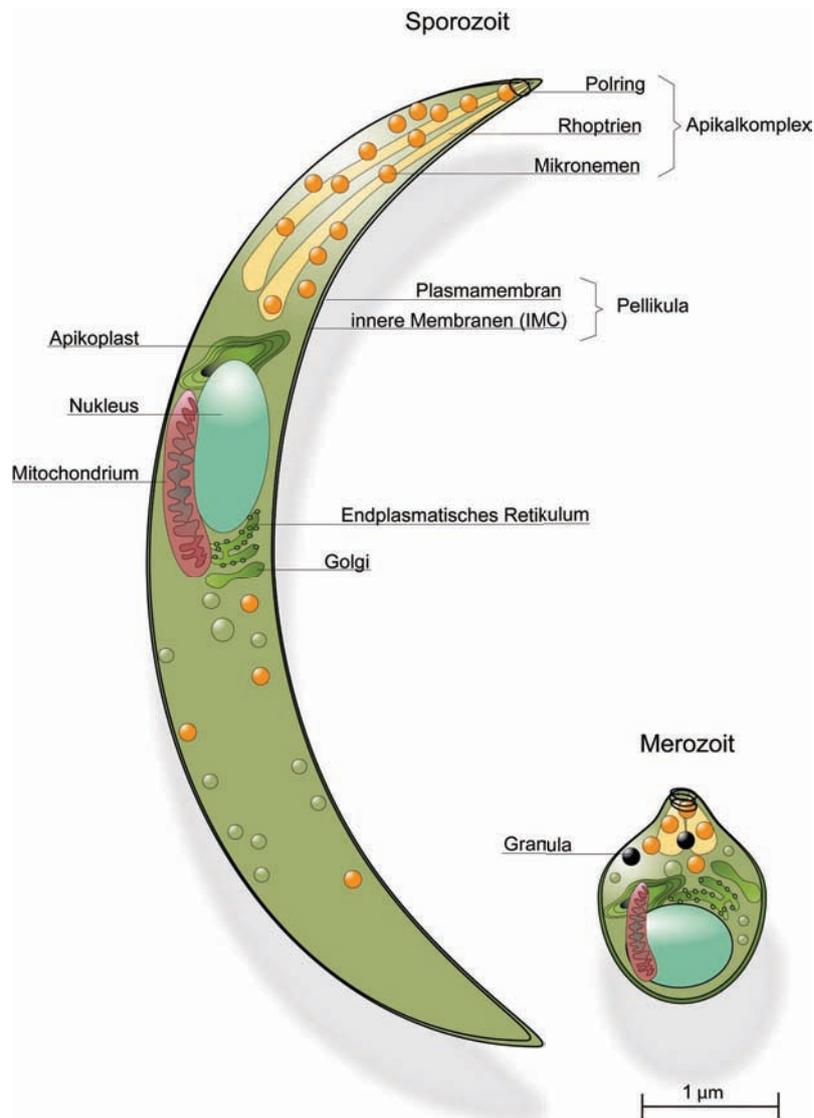


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung eines Sporozoiten und eines Merozoiten von *Plasmodium* (© A. Rennenberg)

Sporozoit und Merozoit sind zwei der drei invasiven Stadien von *Plasmodium*. Sie sind charakterisiert durch den Apikalkomplex (bestehend aus Mikronemen, zwei Rhoptrien, einer Polringstruktur, beim Merozoiten dazu als dichte granules bezeichnete sekretorische Granula) sowie durch zwei eng aneinander liegende innere Membranen (symbolisiert durch die doppelte Umrandungslinie, IMC = inner membrane complex), die zusammen mit der Plasmamembran die Pellikula (Zellhülle) bilden. Apikomplexa besitzen zudem einen Apikoplasten (Plastid, in dem unter anderem die Fettsäuresynthese stattfindet), ein Mitochondrium, einen typischen eukaryotischen Nukleus und einen rudimentären sekretorischen Apparat (ER und Golgi).

Die Motormaschinerie der Sporozoiten

Die Motormaschinerie der *Apicomplexa* basiert auf dem Zusammenspiel von Aktinfilamenten und Myosin ähnlich wie in einer Muskelzelle. Da die Aktin-Myosin-Strukturen in den Zoiten über verschiedene Adapterproteine sowohl mit den inneren Membranen (IMC) als auch über die Sporozoiten-Plasmamembran hinaus mit dem extrazellulären Substrat verbunden sind, kann die Kraft für eine kreiselnde, gleitende Vorwärtsbewegung des Parasiten genutzt werden²⁷. Für die vorliegende Arbeit ist es wichtig zu wissen, dass die gleitende Fortbewegung der Sporozoiten auf der kontinuierlichen Sezernierung von Adhäsionsmolekülen am apikalen Pol und ihrer Abspaltung am posterioren Pol beruht, wodurch die Sporozoiten charakteristische Proteinspuren auf ihrem Untergrund hinterlassen (*shedding* der Adhäsionsproteine)²⁵.²⁸ In der Regel befinden sich die Adhäsionsproteine in den Mikronemen, die regelmäßig mit der Plasmamembran am apikalen Pol der Sporozoiten fusionieren und ihren Inhalt sezernieren. Während die löslichen Mikronemeninhalte in den Extrazellulärraum abgegeben werden, gelangen die Adhäsionsproteine durch Transmembrandomänen oder Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in die Plasmamembran des Sporozoiten. Zwei gut charakterisierte Adhäsionsmoleküle der Sporozoiten sind TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*) und CSP (*circumsporozoite protein*). TRAP ist ein Mikronemenprotein, das über eine Transmembrandomäne in der Sporozoiten-Plasmamembran verankert wird. Das Protein spielt eine bedeutende Rolle für die Vorwärtsbewegung der Sporozoiten, da es das extrazelluläre Substrat mit der Motormaschinerie verbindet²⁵,²⁹. Über seine extrazelluläre Domäne bindet TRAP an Wirtsstrukturen und über seine intrazelluläre Domäne ist das Protein über ein Adapterprotein (Aldolase) mit den Aktinfilamenten verbunden²⁵. CSP (*circumsporozoite protein*) ist das Hauptoberflächenprotein der Sporozoiten und interagiert ebenfalls mit Wirtsstrukturen³⁰,³¹. Im Gegensatz zu TRAP ist CSP allerdings nicht mit dem Aktin-Myosin-System verbunden. CSP bindet die stark sulfatierten Heparansulfatproteoglykane auf den Hepatozyten und ihren Nachbarzellen, wodurch die Sporozoiten in der Leber adhären (*homing*)³²⁻³⁵. CSP wird wie TRAP kontinuierlich am apikalen Pol der Sporozoiten abgesondert, über einen GPI-Anker in die Plasmamembran inkorporiert, während der Sporozoitenbewegung zum posterioren Pol gezogen und proteolytisch freigesetzt²⁸. Die charakteristischen CSP- und TRAP-Spuren, die durch die kontinuierliche Abspaltung der Adhäsionsproteine entstehen, werden im Ergebnisteil dieser Arbeit wieder aufgegriffen.

Sporozoiten transmigrieren Wirtszellen

Im Gegensatz zur Aktin-Myosin-basierten, gleitenden Fortbewegung ist die Fähigkeit der Sporozoiten, durch verschiedene Wirtszelltypen zu transmigrieren, noch wenig verstanden. Transmigrierende Sporozoiten durchbrechen wahrscheinlich mit Hilfe von Perforinen, Proteasen und Lipasen die Plasmamembran der Wirtszellen, die daraufhin zytoplasmatisches Material freisetzen und teilweise apoptotisch oder nekrotisch

werden^{9, 10, 36}. Die bisher bekannten Proteine, die für die Transmigration wichtige Funktionen übernehmen, sind SPECT 1 (*sporozoite microneme protein essential for cell traversal*), SPECT 2 (auch *perforin-like protein 1* (PLP1) genannt), CelTOS (*cell traversal protein for ookinetes and sporozoites*) und eine Phospholipase auf der Oberfläche der Sporozoiten³⁷⁻⁴⁰. Funktionelle SPECT-, SPECT 2- und CelTOS-Nullmutanten waren nicht mehr in der Lage, *in vitro* Zellen zu transmigrieren und waren im Mausmodell nicht mehr infektiös. Allerdings waren diese Parasiten noch in der Lage, *in vitro* Hepatozyten zu infizieren. Zudem konnte bei intravenöser Verabreichung der Sporozoiten und gleichzeitiger Depletion der Kupffer-Zellen in der Leber auch *in vivo* wieder eine Infektion beobachtet werden^{24, 38, 39}. Kupffer-Zellen sind die im Endothel der Lebersinusoiden sitzenden Makrophagen und stellen für die Sporozoiten die Eintrittspforte in die Leber dar^{9, 41, 42}. Sporozoiten der funktionellen Phospholipase-Nullmutanten konnten dagegen bei intravenöser Verabreichung Hepatozyten infizieren, nicht jedoch bei intradermaler Verabreichung⁴⁰. Dies spricht dafür, dass Sporozoiten verschiedene Transmigrationsmechanismen verwenden, um Zellen in der Haut, Endothelzellen, Kupffer-Zellen oder Hepatozyten zu durchqueren. Im Fall der Kupffer-Zellen wurde die Ausbildung einer parasitophoren Vakuole beobachtet, die unabhängig von der Wirtszellphagozytose entsteht⁴¹. Interessanterweise wird eine inflammatorische Reaktion der transmigrierten Kupffer-Zellen durch die Sporozoiten unterdrückt^{43, 44}.

Adhäsion in der Leber und Hepatozyteninfektion

Sobald die Parasiten die Blutbahn erreicht haben, adhären sie relativ schnell in der Leber. Die Orientierung im Wirt und der Kontakt mit den spezifischen Zelltypen (Kupffer-Zellen, Hepatozyten) erfolgt im Wesentlichen durch die Interaktion von CSP mit unterschiedlich sulfatierten Heparansulfatproteoglykanen der Wirtszellen³²⁻³⁵. Auch innerhalb der Leber findet noch eine Transmigration der Sporozoiten durch Wirtszellen statt¹⁰. Warum die Sporozoiten zuerst einige Hepatozyten transmigrieren, bevor sie unter Ausbildung einer parasitophoren Vakuole einen Hepatozyten infizieren und sich in ihm replizieren, wird kontrovers diskutiert. Einige Studien liefern Hinweise darauf, dass Wirtszellfaktoren (z.B. intrazelluläre Kalium-Konzentrationen), mit denen die Parasiten während der Hepatozytentransmigration in Kontakt kommen, die Sporozoiten für eine produktive Infektion vorbereiten und zu der verstärkten apikalen Exozytose führen, die bei der Wirtszellinfektion beobachtet wird⁴⁵⁻⁴⁷. Zudem setzen die transmigrierten Hepatozyten das parakrin wirkende Signalmolekül HGF (hepatocyte growth factor) frei, das die benachbarten Hepatozyten vor Apoptose schützt und somit einen Abwehrmechanismus gegen den intrazellulären Parasiten unterdrückt^{36, 48}. Andererseits konnten die transmigrationsunfähigen SPECT- und SPECT 2-Knockout Parasiten wie Wildtyp-Parasiten Hepatozyten infizieren; die Transmigration in der Leber ist also nicht essentiell für die Sporozoiten^{24, 38, 39}. Zwei Studien zeigten sogar, dass die Transmigration durch Hepatozyten für die Sporozoiten eher von Nachteil ist und die Zahl der infizierten Leberzellen verringert^{24, 49}. Welche Faktoren die

Sporozoiten dazu veranlassen, die Transmigration einzustellen und unter Ausbildung der PV einen Hepatozyten zu infizieren, wird zur Zeit erforscht. Die Interaktion von CSP mit den stark sulfatierten Heparansulfatproteoglykanen der Leberzellen löst beispielsweise Signaltransduktionswege in den Sporozoiten aus, die für die Infektion wichtig sind⁵⁰. Dabei sind eine Calciumabhängige Proteinkinase und eine sekretierte Papain-ähnliche Cysteinprotease des Parasiten involviert⁵⁰. Letztere ist für die proteolytische Spaltung von CSP verantwortlich⁵⁰.

Besonders durch Transkriptom-Analysen wurden weitere Sporozoitenproteine identifiziert, die für die Hepatozyteninvasion und/oder für die Entwicklung der exoerythrozytären Stadien von Bedeutung sind. Zu ihnen gehören die exportierten Proteine UIS3, UIS4 (*up-regulated in infectious sporozoites*), P52, SAP1 (*Sporozoite Asparagine-rich Protein 1*), STARP (*sporozoite threonine asparagine-rich protein*), SPATR (*sporozoite protein with an altered thrombospondin domain*), SLARP (*sporozoite and liver stage asparagine-rich protein*), AMA1 (*apical membrane antigen 1*), EBA175 (*erythrocyte binding ligand 175*) und zwei weitere Proteine aus der 6-Cystein-Motiv-Proteinfamilie (Pbs36p und Pbs36)⁵¹⁻⁶⁴. Die Prozesse, die nach der initialen Erkennung der Wirtszelle folgen, sind insbesondere für das Merozoitenstadium gut charakterisiert. Zunächst entsteht eine feste Bindung zwischen den Adhäsionsproteinen auf der Oberfläche des Parasiten und der Wirtszelle. Die an der Invasion beteiligten Proteine werden verstärkt von den apikalen Organellen sekretiert⁶⁵. Der Übergang von einer schwachen zu einer festen Interaktion mit Wirtszellstrukturen wird oftmals durch eine proteolytische Prozessierung der entsprechenden Adhäsionsmoleküle erreicht⁶⁵. Anschließend erfolgt die Penetration, bei der die Position der festen Bindungsstelle zwischen Parasit und Wirtszelle zum posterioren Ende verschoben wird. Gleichzeitig wird die parasitophore Vakuole gebildet. Wie bei der extrazellulären Fortbewegung müssen die Adhäsionsproteine für eine kontinuierliche Vorwärtsbewegung während der Wirtszellinvasion proteolytisch gespalten werden⁶⁵. Neben den stark sulfatierten Heparanproteoglykanen wurden weitere Liganden für Sporozoitenproteine auf den Hepatozyten identifiziert, wie z.B. CD81, Fetuin-A und LRP (*low density lipoprotein receptor-related protein*)⁶⁶⁻⁶⁹.

Entwicklung im Hepatozyten

Im Fall von *P. berghei* beginnt nach ungefähr 20 Stunden die Zellkernteilung. Innerhalb von etwa 50 Stunden entwickeln sich die Parasiten zu riesigen Schizonten mit bis zu 30.000 Zellkernen. Die Leberschizonten und damit auch ihre Wirtszellen werden um ein Vielfaches größer als nicht infizierte Hepatozyten und weisen eine der schnellsten bekannten Replikationsraten von Eukaryonten auf⁷⁰. Wie die Leberparasiten ausreichend energieliefernde Nährstoffe, DNA-Bausteine und Lipidbestandteile für das Membranwachstum der Parasitenmembran, der parasitophoren Vakuolenmembran sowie der Wirtszellmembran heranziehen, ist noch weitgehend unverstanden. Als intrazelluläre Parasiten müssen die Plasmodien ihre Wirtszellen manipulieren, um ihr eigenes Überleben zu sichern. Die exoerythrozytären Stadien von *P. berghei*

unterbinden während der gesamten Entwicklung in der Leber die Apoptose der Wirtshepatozyten und stehen mit dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) der Wirtszelle in Kontakt^{71, 70}. Im Gegensatz zu den Blutstadien, von denen eine Vielzahl sezernierter Parasitenproteine bekannt ist, die in die Wirtszelle gelangen und diese strukturell und funktional verändern^{72, 73}, wurde für die Leberstadien bisher nur der Export von CSP in das Hepatozytenzytoplasma beschrieben^{74, 75}. CSP besitzt das PEXEL-Motiv (auch als VTS-Motiv bezeichnet, *vacuolar translocation signal*), das auch viele exportierte Blutstadienproteine aufweisen^{75, 76}. In den frühen Leberstadien befindet sich CSP in der Nähe des Wirtszellkerns. Durch ein NLS (*nuclear localisation signal*) gelangt CSP auch in den Hepatozytenzellkern und beeinflusst indirekt die Transkription verschiedener Wirtszellgene⁷⁵. Da CSP dem Immunsystem sowohl im Sporozoitstadium als auch während der Entwicklung in den Hepatozyten über MHC I-Komplexe (*major histocompatibility complex class I*) zugänglich ist, gilt es als sehr viel versprechender Vakzinekandidat (siehe Abschnitt 1.2.3).

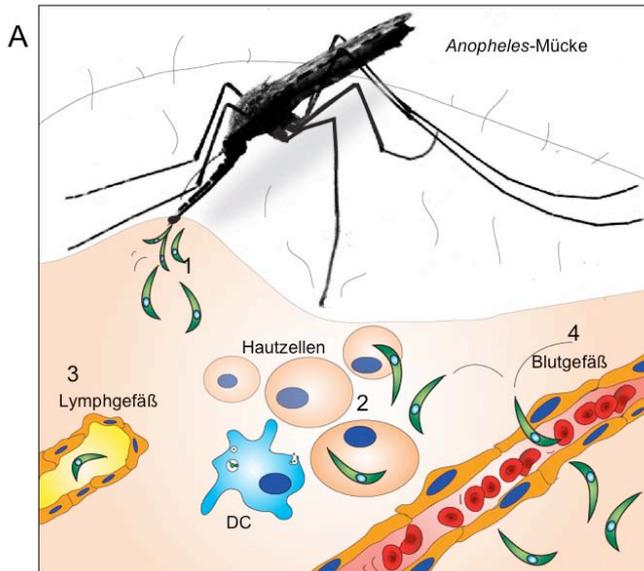
Am Ende der Schizogonie entstehen durch Invaginationen der Plasmamembran aus dem vielkernigen Schizonten zunächst größere Zusammenballungen von Parasiten-Zellkernen (Zytomerstadium). Durch wiederholte Einstülpungen der Plasmamembran des Parasiten werden die Zellkerngruppierungen im Zytomer immer kleiner, bis schließlich das einkernige Merozoitenstadium erreicht ist.

Merozoiten gelangen durch einen Trick in den Blutstrom

Am Ende der Leberphase degradieren Cysteinproteasen die Membran der parasitophoren Vakuole (PVM) und die Merozoiten mischen sich mit dem Hepatozytenzytosol¹². Überraschenderweise kommt es im gleichen Zeitraum zu einem ungewöhnlichen regulierten Wirtszelltod¹². Die infizierten Zellen runden sich ab und lösen sich aus dem Zellverband, ihre DNA ist kondensiert und Mitochondrien setzen Cytochrom c frei, das normalerweise ein wichtiges Signalmolekül für die Einleitung der Apoptose ist. Zuvor waren die infizierten Hepatozyten vor Apoptose geschützt, um das Überleben der Parasiten zu sichern⁷¹. Nun aber ermöglicht der Wirtszelltod den Parasiten, unerkannt von Immunzellen aus der Leber in den Blutstrom zu gelangen. Allerdings ist dies nur möglich, weil bestimmte Charakteristika einer klassischen Apoptose unterbunden werden und somit nach außen hin ein vitaler Phänotyp erhalten bleibt. Phosphatidylserin ist ein Bestandteil von Phospholipiden, das normalerweise auf der inneren, zum Zytosol gerichteten Seite der Plasmamembran lokalisiert ist. In apoptotischen Zellen befindet sich Phosphatidylserin auch auf der äußeren Seite der Plasmamembran und ist ein Signalmolekül für Makrophagen, die apoptotische Zelle zu eliminieren. Bei den infizierten Hepatozyten wird die Phosphatidylserin-Exposition auf der Außenseite durch die Plasmodien unterdrückt, so dass die toten Wirtszellen von Makrophagen nicht erkannt werden¹². Die abgelösten, mit Merozoiten gefüllten Hepatozyten bilden vesikuläre Ausstülpungen (Merosomen) in die benachbarten Blutgefäße aus¹². Über Plasmabrücken gelangen die Merozoiten aus der Mutterzelle in die Merosomen, die man sich wie Schiffe im Blutstrom vorstellen kann. Sind

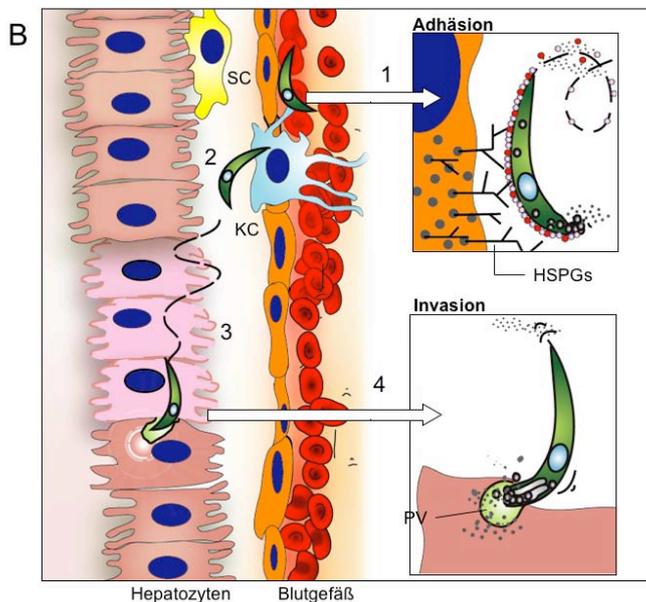
Merosomen ausreichend mit Parasiten beladen, knospen sie sich ab und werden mit dem Blutstrom aus der Leber transportiert¹². Die Merosomen akkumulieren in den pulmonalen Kapillaren des Herz-Lungen-Kreislaufsystems. Hier platzen sie auf und setzen die Merozoiten frei¹³. Die Merozoiten invadieren sofort die umgebenen roten Blutzellen und initiieren somit die nachfolgende Blutphase, die die Symptome der Malaria auslöst und essentiell für die Verbreitung der Plasmodien ist.

Sowohl die Degradation der PVM als auch der Wirtszelltod können mit E-64, einem synthetischen Peptid-Cysteinproteaseinhibitor, unterdrückt werden¹². Die Cysteinproteasen, die am Freisetzungsprozess beteiligt sind, wurden noch nicht eindeutig identifiziert. Vielversprechende Kandidaten sind die Mitglieder der SERA-Cysteinproteasenfamilie. Sie werden am Ende der Leberphase sehr stark exprimiert und gelangen zunächst in die PV. Ab dem späten Zytomerstadium befinden sie sich in ihrer aktiven, prozessierten Form zudem auch im Wirtszellzytosol⁷⁷. Von der Lokalisation her können sie daher sowohl die PVM degradieren als auch am ungewöhnlichen Wirtszelltod beteiligt sein. Welche weiteren molekularen Mechanismen für den Freisetzungsprozess eine Rolle spielen, ist Gegenstand unserer Forschung in der AG Malaria I am Bernhard-Nocht-Institut.



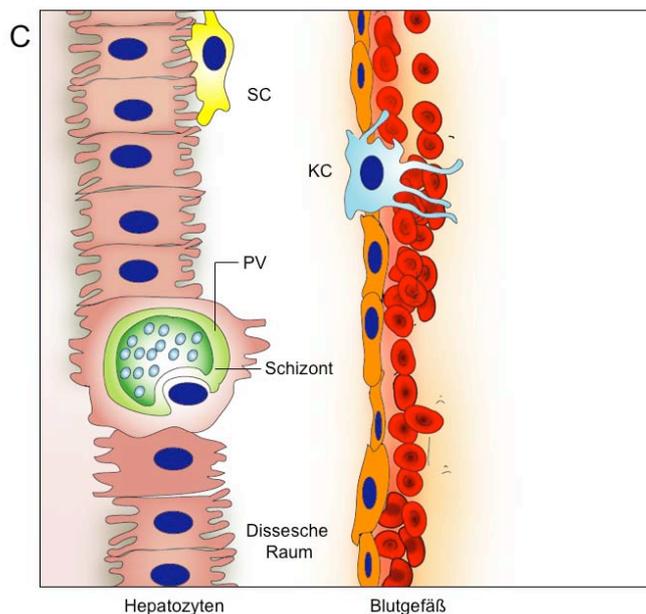
A: Sporozoiten in der Haut

Bei dem Stich einer infizierten *Anopheles*-Mücke werden Sporozoiten in die Haut des Zwischenwirtes inokuliert (1). Hier schützen sich die Sporozoiten durch aktives Migrationsverhalten vor phagozytierenden Immunzellen (z.B. DC, dendritische Zelle) (2) und gelangen durch Penetration von Gefäßendothelien entweder in das Lymphsystem (3), in dem sie früher oder später absterben, oder in den Blutstrom (4), über den sie die Lebersinusoiden erreichen. Ein Teil der Sporozoiten verbleibt in der Haut und wird durch Immunzellen eliminiert.



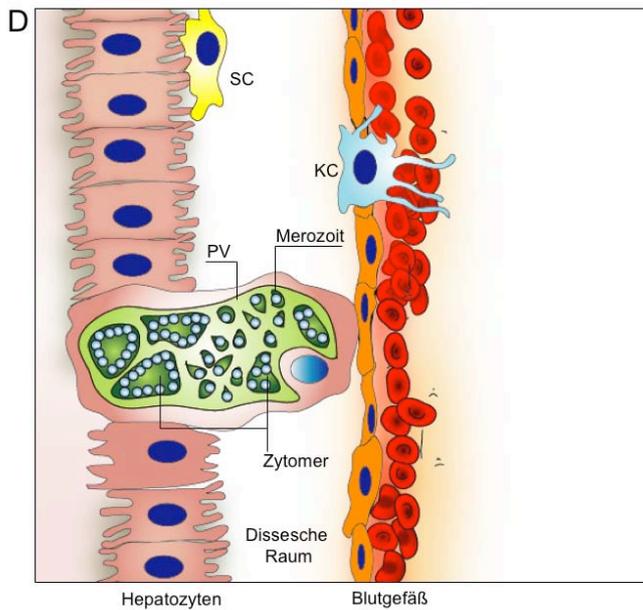
B: Sporozoiten erreichen die Leber

Über rezeptorvermittelte Interaktionen (z.B. CSP mit HSPGs, highly sulfated proteoglycans) adhären die Sporozoiten in den Lebersinusoiden (1), erkennen Kupfer-Zellen (KC, Kupffer cell, Lebermakrophagen) in den Sinusoidendothelien, transmigrieren sie (2) und gelangen so in das Lebergewebe. Hier transmigrieren sie einige Hepatozyten (3), bis sie unter Ausbildung einer parasitophoren Vakuole (PV) einen Hepatozyten infizieren (4). Um sich fortzubewegen (Migration, Invasion) und um über Rezeptoren Wirtsstrukturen zu erkennen, sezernieren die Sporozoiten verstärkt die Inhalte der apikalen Organellen (Mikronemen, Rhoptrien). SC = stellate cell, sternförmige Lipozyten



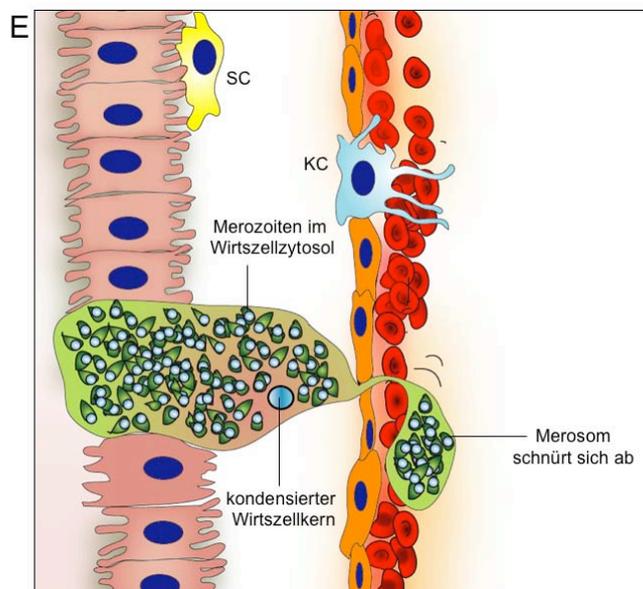
C: Schizontenstadium

Innerhalb der PV wächst der Parasit zunächst und beginnt dann mit der ungeschlechtlichen Vermehrung. Zunächst teilen sich nur die Zellkerne ohne anschließende Zellteilung, so dass ein Synzytium entsteht (Leberschizont). Wie der Schizont ausreichend Nährstoffe (Lipidbausteine, Aminosäuren, Nukleotide) für sein enormes Wachstum bezieht, ist noch weitgehend unverstanden.



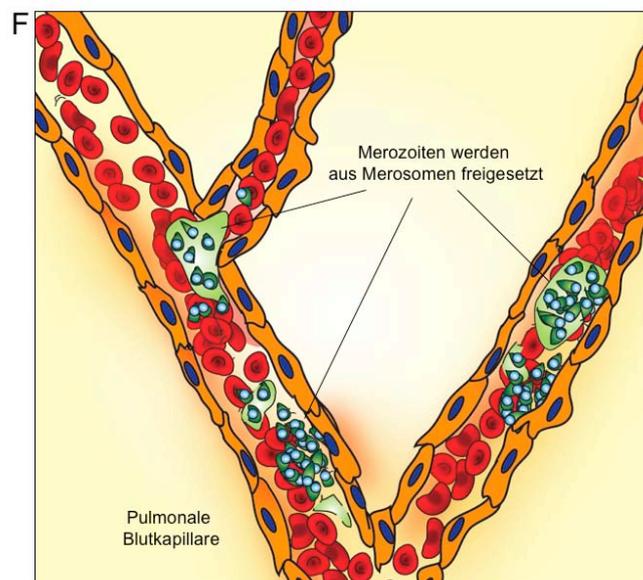
D: Merozoitenformation

Durch vermehrte Abschnürungen der Parasitenplasmamembran des Schizonten entstehen über sogenannte Zytoemerstadien einzelne Merozoiten mit identischer Organellenausstattung. Innerhalb weniger Tage (bei *P. berghei* ca. 48 Stunden *in vivo* und 65 Stunden *in vitro*) kann ein Leberparasit bis zu 30.000 Tochterparasiten (Merozoiten) bilden.



E: Merosomenausbildung

Am Ende der Leberphase kommt es zu einem ungewöhnlichen Wirtszelltod (symbolisiert durch einen kondensierten Wirtszellkern), bei der nach außen hin ein vitaler Phänotyp erhalten bleibt (keine Phosphatidylserin-Translokation auf die äußere Seite der Wirtszellmembran). Die Membran der PV wird aufgelöst und die Merozoiten gelangen in das Wirtszellzytosol. Die Wirtszelle rundet sich ab und bildet Ausstülpungen in benachbarte Blutgefäße aus, die mit Merozoiten gefüllt werden. Diese sogenannten Merosomen schnüren sich ab und verlassen die Leber über den Blutstrom.



F: Freisetzung der Merozoiten

Die Merosomen bleiben zunächst intakt. Mit dem Blutstrom gelangen sie bis in die pulmonalen Gefäße des Herz-Lungen-Kreislaufsystems. Hier akkumulieren sie und setzen die Merozoiten schließlich frei. Die Merozoiten befallen die umgebenden roten Blutzellen und initiieren die Blutphase, die die Symptome der Malaria auslöst.

Abbildung 1-5: Die Leberphase von *Plasmodium* (© A. Rennenberg)

1.2.3 Die medizinische Relevanz der Leberphase

Die Leberphase bietet eine sehr gute Basis, um die Malariaerreger zu bekämpfen:

- Die Leberphase ist der **erste Entwicklungsschritt** nach der Infektion mit Plasmodien. Im Gegensatz zur nachfolgenden Blutphase verläuft die Entwicklung des Malariaerregers in der Leber völlig **symptomlos**. Eine Behandlung auf Ebene der Leberphase würde erfolgen, bevor die Krankheitssymptome und lebensgefährlichen Komplikationen der Malaria entstehen.
- Werden die Plasmodien vor dem Erreichen der Blutphase abgetötet, wird zudem eine **Übertragung** der Erreger durch den Vektor unterbunden.
- Nur sehr wenige Parasiten durchlaufen die Leberphase. Eine **geringe Parasitenlast** führt zu erhöhten Erfolgschancen, alle Parasiten zu vollständig zu beseitigen.
- Sporozoiten und Leberstadien führen zu einer effizienten **humoralen und zellbasierten Immunantwort**, die eine gute Basis für eine **Vakzineentwicklung** darstellt. Allerdings gibt es trotz der wirksamen Immunreaktionen gegen *Plasmodium* selbst in Endemiegebieten keine sterile Immunität, die vor Reinfektionen schützt, sondern nur einen partiellen und relativ kurzlebigen immunologischen Schutz vor schweren Krankheitsverläufen ⁷⁸. Die Ursache dieses Widerspruchs liegt in der nachfolgenden Blutphase von *Plasmodium*. Die erythrozytären Formen lösen über einen noch relativ unverstandenen Mechanismus, bei dem Dendritische Zellen und T-Zell-inhibitorische Zytokine eine Rolle spielen, eine spezifische und unspezifische Immunsuppression aus. Diese wirkt sich offenbar rückwirkend auf die gegen die präerythrozytäre Phase gerichteten T-Zellen aus und verhindert eine Ausbildung von immunologischen Gedächtniszellen ⁷⁹⁻⁸¹. Sowohl im Mausmodell als auch in klinischen Studien mit Patienten konnte gezeigt werden, dass ein steriler immunologischer Schutz gegen die Malariaerreger erreicht wird, wenn die Blutphase durch Attenuierung der Parasiten oder durch Verabreichung von Medikamenten unterdrückt wurde ⁵³.

^{78, 82-86}

Es wird bereits intensiv an der Entwicklung von Vakzinen geforscht, die gegen die exoerythrozytären Stadien der Malariaerreger wirken. Einer der aussichtsreichsten Kandidaten ist RTS,S/AS02A, das sich aus dem bereits als Hepatitis-B-Impfstoff erprobten Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus (HbSAg) und der Carboxyterminalen Hälfte des *P. falciparum* CSP zusammensetzt. In Feldstudien konnten erste Erfolge mit RTS,S/AS02A verzeichnet werden ^{78, 87, 88}. Allerdings ist sowohl die Effizienz als auch die Dauer des erreichten Schutzes aller bisher getesteten Vakzinekandidaten im Vergleich zu den gängigen Vakzinen (z.B. gegen Tetanus) bei weitem nicht zufriedenstellend. Zudem kommt es aufgrund der stetig zunehmenden

Resistenzentwicklung gegen die gängigen, preiswerten Antimalariamittel immer öfter zu Problemen bei der Behandlung von Malariapatienten. Es ist daher unbedingt notwendig, die Aufklärung der Leberphase aus biologischer und medizinischer Sicht voranzutreiben, weitere Antigene des Parasiten zu identifizieren und sie auf ihren potentiellen medizinischen Nutzen hin zu überprüfen.

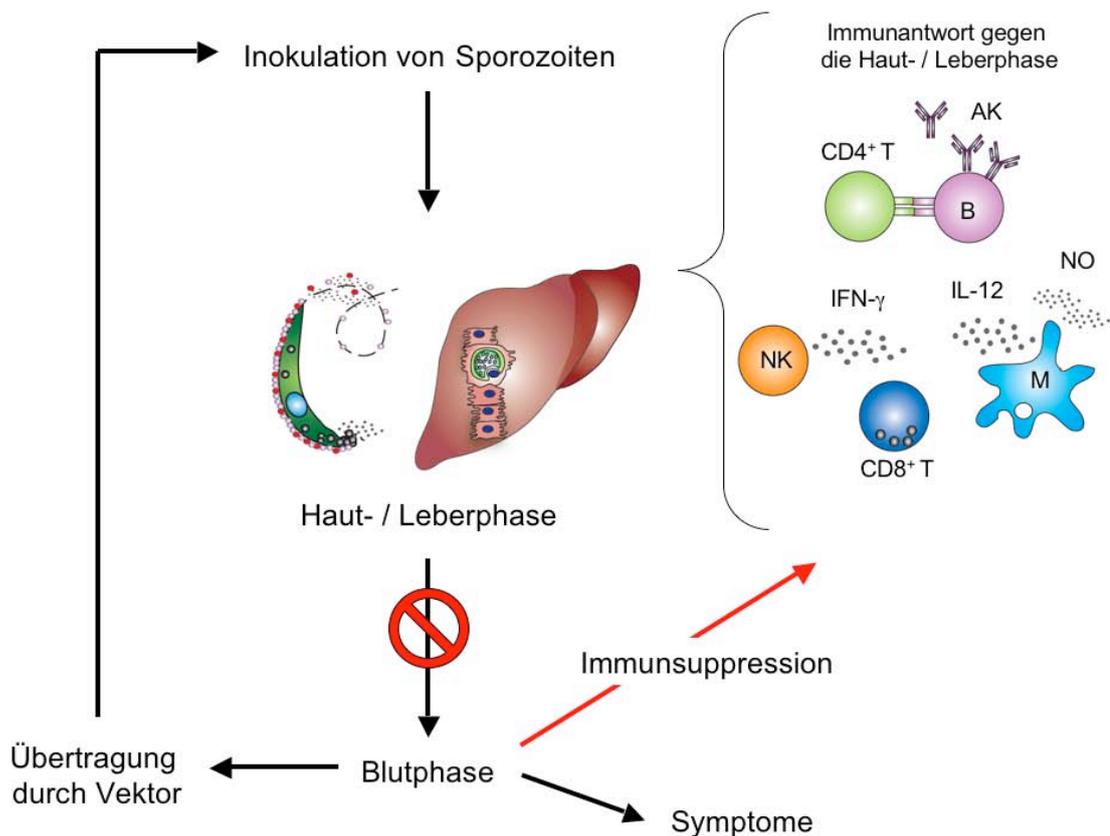


Abbildung 1-6: Bedeutung der Leberphase für die Bekämpfung von *Plasmodium*

Gegen die Hautphase und gegen die Leberphase der Plasmodien gibt es nachweislich eine starke humorale und zellbasierte Immunantwort, die für die Bekämpfung der Malariaerreger von hoher Relevanz ist. Dabei spielen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, Antikörper-produzierende B-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK), NO-produzierende Makrophagen (M) sowie die Zytokine IL-12 und IFN- γ eine wichtige Rolle. Trotzdem gibt es keine natürliche Immunität gegen Plasmodieninfektionen, weil die nachfolgende Blutphase rückwirkend die Immunantwort gegen die Haut- und Leberphase unterdrückt. Findet man einen Weg, den Zyklus von Plasmodium nach der Leberphase zu unterbrechen, kann man die effiziente Immunantwort erhalten, die Symptome der Malaria unterbinden und die Übertragung des Erregers durch den Insektenvektor verhindern.

Zu den bekannten wichtigen Zielstrukturen gehören die Cysteinproteasen, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird. Zudem spielen Cysteinproteasen und ihre Inhibitoren bei der Interaktion zwischen Parasit und Wirt eine wichtige Rolle.

1.3 Cysteinproteasen

Enzyme, die Peptidbindungen hydrolysieren, werden als Peptidasen oder Proteasen bezeichnet. Nach dem MEROPS-System werden Proteasen anhand ihres evolutionären Verwandtschaftsgrades in Clans und Familien eingeteilt⁸⁹. Die Charakteristika der einzelnen Proteaseklassen sind über die MEROPS-Datenbank abrufbar (<http://merops.sanger.ac.uk>). Wichtige Clans sind die Aspartat-, Cystein-, Metallo- und Serinproteasen. Clan C umfasst die Cysteinproteasefamilien. Er besteht aus sechs verschiedenen Unterstämmen (CA bis CL), die wiederum in 76 Familien unterteilt werden (C1 bis C76).

Katalytischer Mechanismus

Das aktive Zentrum der Cysteinproteasen besteht aus einer katalytischen Dyade, die aus dem namensgebenden Cysteinrest und einem Histidinrest besteht. Das Cystein wird basenkatalytisch durch das Histidin aktiviert. Die basenkatalytisch aktivierte Thiolgruppe des Cysteins greift als Nukleophil das Carbonyl-C-Atom des Peptidsubstrates an, so dass ein tetraedrisches Intermediat entsteht. Das Intermediat wird oftmals durch ein konserviertes Glutamin über Wasserstoffbrücken stabilisiert. Histidin überträgt ein Proton auf die Peptidbindung des Substrats, woraufhin der N-terminale Teil des Substrats mit einer endständigen Aminogruppe abgespalten wird. Unter Rückbildung der Carbonylgruppe bildet sich ein Thioacyl-Intermediat aus, in dem das Peptidsubstrat über den Carbonylkohlenstoff an das Enzym gebunden ist. Durch einen nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls am partiell positiv geladenen Carbonylkohlenstoff wird wiederum der Rest des Substrates freigesetzt und das Enzym regeneriert.

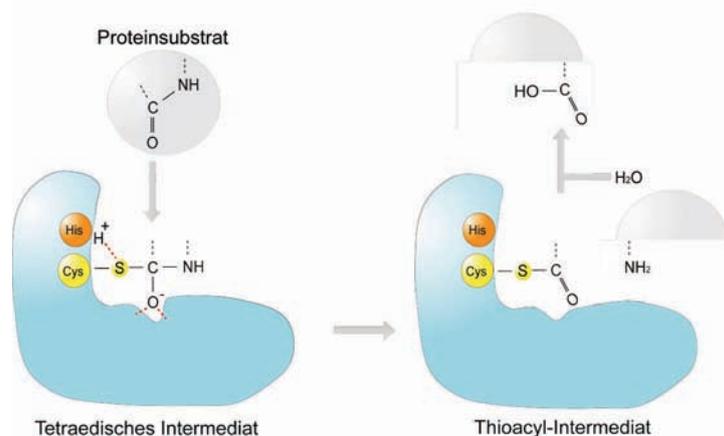


Abbildung 1-7: Hydrolyse von Peptidbindungen durch Cysteinproteasen (©AR)

Cysteinproteasen (blau) hydrolysieren Peptidbindungen von Proteinsubstraten über eine kovalente Katalyse. Ein Cysteinrest (gelb) dient als Nukleophil und greift das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrats an. Ein basischer Histidinrest polarisiert die Thiolgruppe des Cysteins und überträgt nach der Bildung des Thioacyl-Intermediats das Proton auf die Amidgruppe des Peptidsubstrats, dessen N-terminaler Teil daraufhin abgespalten wird.

Cysteinproteasestrukturen

In der MEROPS-Datenbank werden Cysteinproteasen nach ihrer Struktur in verschiedene Unterstämme unterteilt^{89, 90}.

Das aktive Zentrum der CA-Cysteinproteasen wird beispielsweise von zwei Domänen (R, L) gebildet, die durch eine V-förmige Furche getrennt sind⁹¹. In dieser Furche bindet das Substrat, so dass eine der Peptidbindungen in die Nähe der katalytischen Dyade gelangt. Der Cysteinrest ist in der R-Domäne lokalisiert, der Histidinrest dagegen in der L-Domäne. Zu dem Unterstamm CA gehören die für die vorliegende Arbeit relevanten Cysteinproteasen der C1-Familie. Die C1-Familie wird synonym auch als Papain-Superfamilie bezeichnet und beinhaltet Endopeptidasen und Exopeptidasen. Klassische Vertreter der C1-Familie sind neben Papain die lysosomalen Säuger-Proteasen Cathepsin L und Cathepsin B. Abgesehen von den Übereinstimmungen bezüglich ihrer Gesamtstruktur, die zur Einordnung der beiden Proteasen in die C1-Familie führen, unterscheiden sie sich voneinander sowohl durch Sequenzeinschübe, in ihrer Substratspezifität als auch in ihren katalytischen Eigenschaften⁹². Cathepsin B besitzt eine etwa 20 Aminosäuren lange, zusätzliche Sequenz (*occluding loop*), die den Zugang zum aktiven Zentrum der Protease einschränkt. Zwei Histidinreste in dieser Schleifenstruktur ermöglichen zusätzlich zu der Endopeptidasefunktion eine Aktivität als Dipeptidylcarboxypeptidase.

Funktionen von Cysteinproteasen

Proteasen galten lange Zeit als Degradationsenzyme, die ausschließlich für die Nährstoffverwertung und den intrazellulären Proteinumsatz zuständig sind⁹³. Diese Sichtweise hat sich vollkommen geändert. Heute werden Proteasen auch als extrem wichtige Signalmoleküle angesehen, die an zahlreichen vitalen Prozessen beteiligt sind⁹³. Beispielsweise übernehmen sie wichtige Funktionen im Zellzyklus (Zellproliferation, programmierter Wirtszelltod, DNA-Replikation), für die Gewebemöostase und Wundheilung, für die Blutgerinnung, für das Kreislaufsystem und für die Immunantwort⁹³. Bis auf wenige Ausnahmen sind proteasegesteuerte Signalprozesse irreversibel und können einen direkten Effekt auf die biologische Funktion des Proteinsubstrats haben⁹³. Beispielsweise werden einige Chemokine und Proteasen durch Prozessierung aktiviert (*switch of function* oder *gain of function*), während zum Beispiel ICAD, der Inhibitor einer DNase, durch Prozessierung seine Inhibitorfunktion verliert und die DNase freigibt (*loss of function*)⁹³. Während Proteasesubstrate bei Signaltransduktionsvorgängen oftmals nur an einer spezifischen Stelle gespalten werden (Konzept der limitierten Proteolyse), werden sie dagegen von den "Haushalts"-Proteasen in den Lysosomen und durch das Proteasom in kleine Peptide oder in die einzelnen Aminosäuren zerlegt.

Regulation von Cysteinproteasen

Um die Zelle vor ungewollter hydrolytischer Aktivität zu schützen, müssen die Proteasen streng reguliert werden⁹¹. Neben einer kontrollierten Proteinbiosynthese und -degradierung (langfristige Regulation) gibt es weitere Regulationsmechanismen auf posttranslationaler Ebene, die mittelfristig oder kurzfristig wirksam sind. Mittelfristige Kontrollmöglichkeiten sind die oftmals mehrstufige Prozessierung der Proteasen und kovalente Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen. Cysteinproteasen werden wie die meisten anderen Proteasen zunächst als inaktive Vorläuferformen (Zymogene) synthetisiert. Typischerweise besitzt ein Zymogen bereits die Struktur des aktiven Enzyms, wird aber durch ein hochselektives, N-terminales Propeptid im aktiven Zentrum reversibel blockiert⁹⁴. Viele Cysteinproteasen sind sekretorische Proteine, die in spezielle Zellkompartimente oder in den Extrazellulärraum transportiert werden. Oftmals steuern äußere Umgebungsfaktoren wie z.B. Ca^{2+} -Ionen, Lipide oder andere Proteine die Aktivität der Proteasen. Bei Cathepsinen ist die kompetitive Hemmung durch die N-terminalen Propeptide pH-abhängig^{95, 96}. Eine saure Umgebung senkt die Affinität des Propeptids zu der entsprechenden Protease. Auf diese Weise werden die Cathepsine erst im sauren Milieu der Lysosomen aktiviert. Für einige Cysteinproteasen der Papainfamilie existieren zudem autonom exprimierbare Peptidinhibitoren, die ähnlich hohe Selektivitäten wie die Protease-assoziierten Propeptide besitzen. Im Gegensatz zu den N-terminalen Propeptiden hemmen sie die Enzyme in der Regel weitgehend unabhängig vom pH-Wert ihrer Umgebung^{97, 98}.

Die Interaktion mit natürlichen Inhibitoren ist einer der wichtigsten kurzfristig wirksamen Regulationsmechanismen von bereits aktivierten Proteasen im Organismus. Sie werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

1.4 Cysteinproteaseinhibitoren

Es wurden bisher zahlreiche Klassen von Cysteinproteaseinhibitoren beschrieben und noch immer kommen neue hinzu^{89, 90, 98}. Cysteinproteaseinhibitoren wurden in allen Organismenreichen nachgewiesen. Eukaryotische Inhibitorclassen wie die Klasse der Cystatine können über 200 Mitglieder umfassen. Natürliche Cysteinproteaseinhibitoren können anhand ihres Wirkungsmechanismus, ihrer Spezifität, ihrer Struktur oder ihres Ursprungs klassifiziert werden. Allerdings ist eine einheitliche Klassifizierung oft schwierig, da ein Inhibitormolekül mehrere Inhibitor-domänen und damit auch mehrere Spezifitäten und Reaktivitäten aufweisen kann⁹⁰. Außerdem lässt die Struktur eines Inhibitors nicht immer Rückschlüsse auf den Mechanismus der Hemmung zu. Auch die Strukturen der Zielproteasen liefern keine eindeutigen Hinweise auf die Art der Hemmung. Proteasen mit unterschiedlichen Strukturen können über den gleichen Mechanismus gehemmt werden und umgekehrt⁹⁰.

In der von Neil D. Rawlings, Dominic P. Tolle und Alan J. Barrett eingeführten Terminologie werden Proteaseinhibitoren nach ihrer Proteinfaltung in Stämme (Clan IA bis JF) und nach den Sequenzhomologien ihrer Inhibitor-domänen in Familien (I1 bis I168) unterteilt^{89, 90}. Wie bei den Proteasen bietet hier die MEROPS-Datenbank eine aktuelle Übersicht über die Proteaseinhibitoren und ihre Eigenschaften⁸⁹.

In der Regel regulieren Organismen ihre eigenen Proteasen über reversible, kompetitive Inhibitoren, bei denen der Inhibitor mit dem Substrat um die Enzymbindung konkurriert. Eine Ausnahme stellen die irreversibel hemmenden Serpine dar. Sie hemmen vorwiegend Serinproteasen, aber einige ihrer Mitglieder können auch Cysteinproteasen der Papain-Superfamilie hemmen⁹⁸. Sie binden wie das jeweilige Substrat im aktiven Zentrum der Protease und werden von der Thiolgruppe des katalytischen Cysteins nukleophil angegriffen. Nach der Ausbildung des tetraedischen Enzym-Peptid-Intermediates erfolgt eine sehr schnelle, ausgeprägte Konformationsänderung des Enzyms, so dass die Folgereaktion nicht mehr stattfinden kann⁹⁸. Man spricht hier von einem *Trapping*-Mechanismus, da der Inhibitor das Substrat nachahmt und so dem Enzym im übertragenen Sinne eine Falle stellt. Serpine machen beim Menschen etwa zehn Prozent des Plasmaproteins aus. Wichtige Serpine sind das Akut-Phase-Protein Antitrypsin und das vor Thrombosen schützende Antithrombin.

Die meisten endogenen Inhibitoren hemmen nur eine der Proteaseklassen. Eine der Ausnahmen stellt das Plasmaprotein Alpha-2-Makroglobulin dar, ein riesiges Glykoprotein, das im Blut alle Endoproteaseklassen (Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteinasen) komplexieren kann und eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen spielt⁹⁹.

Typische C1-Cysteinproteaseinhibitoren hemmen ihre Zielenzyme in der Regel mit einer niedrigen Dissoziationskonstante und wirken über einen reversiblen, kompetitiven Mechanismus⁹¹. Cystatine und Thyropine blockieren beispielsweise sterisch wie ein Keil die Vertiefung der Proteasen, in der das aktive Zentrum lokalisiert ist⁹¹. Der katalytische Cysteinrest muss dabei nicht direkt beteiligt sein. Die biologischen Funktionen der Cysteinproteaseinhibitoren sind so vielfältig wie die der Proteasen. Dysregulation und Genmutationen von Proteaseinhibitoren können zu schweren Krankheiten führen, angefangen von neurodegenerativen Erkrankungen bis hin zu Krebs^{91, 100}.

1.5 Bedeutung von Cysteinproteasen und ihren Inhibitoren bei Infektionskrankheiten

Inhibitoren regulieren nicht nur endogene Cysteinproteasen, sondern dienen auch dem Schutz vor Proteasen parasitärer Erreger⁹¹. Parasitenproteasen gehören oftmals zu den wichtigsten Virulenzfaktoren von Parasiten und damit zu wichtigen Zielstrukturen für Medikamente^{92, 101}. Die sezernierten Cysteinproteasen der parasitär lebenden Amöbe *E. histolytica* führen beispielsweise zu starken Gewebsschädigungen und

schwächen die lokale Immunantwort des Wirtes ab, indem sie Antikörper und Anaphylatoxine des Komplementsystems degradieren¹⁰². *E. histolytica* besitzt 86 hypothetische Proteasegene, von denen 50 für verschiedene Cysteinproteasen kodieren und deren Funktionen größtenteils noch unbekannt sind¹⁰³. Zahlreiche Studien mit synthetischen Cysteinproteaseinhibitoren haben gezeigt, dass Cysteinproteasen auch im Fall des Malariaerregers wichtige Ansatzpunkte für die Medikamentenentwicklung sind. Während des gesamten Lebenszyklus übernehmen die Proteasen verschiedene Aufgaben, die für den Parasiten überlebensnotwendig sind. Die regulierte Aktivität verschiedenener Cysteinproteasen ist essentiell für die Freisetzung der *Plasmodium*-Sporozoitien aus den Oozysten im Mitteldarm der Mücke, für die Hepatozyteninfektion, für die Entwicklung und Freisetzung der Leberstadien, für die Invasion roter Blutzellen, für die Hämoglobinverwertung und für den Zellaustritt der Blutstadien^{12, 35, 104-107}.

Umgekehrt verwenden Pathogene Proteaseinhibitoren, um Proteasen des Wirtes zu hemmen^{98, 108}. Dabei hängt es stark von der jeweiligen Lebensweise der Parasiten ab, mit welchen Wirtsproteasen sie in Kontakt kommen.

Proteasen sind beispielsweise am programmierten Zelltod, an der Antigenpräsentation über MHC-Komplexe, an der Parasitenabwehr durch Lysosomenfusion, an der Freisetzung und Aktivierung von Immunmodulatoren und an der Homöostase verschiedener Gewebebarrieren beteiligt^{93, 98, 108, 109, 110}. Je nach Funktion befinden sich die Proteasen entweder im Zytoplasma, in spezialisierten Kompartimenten oder im Extrazellulärraum. Durch Signalstoffe kann sich die Lokalisation auch ändern. So sind lysosomale Proteasen auch für extrazelluläre Parasiten von Bedeutung und nicht nur für intrazelluläre Parasiten, die in einer Vakuole leben. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Lysosomen nach Verletzung von Zellen mit der Zellmembran fusionieren können und so ihren Inhalt in den Extrazellulärraum abgeben. Zudem können einige Immunzellen (z.B. Mastzellen, zytotoxische T-Zellen) den Inhalt von sogenannten sekretorischen Lysosomen als Antwort auf externe Stimuli freisetzen^{111, 112}.

Intrazelluläre Parasiten müssen die Antigenpräsentation verhindern, sich vor dem Kontakt mit den proteasereichen Lysosomen der Wirtszelle schützen und den in der Regel über Cysteinproteasen vermittelten programmierten Zelltod der Wirtszelle unterbinden. Beispielsweise besitzt das Baculovirus *Autographa californica* einen Cysteinproteaseinhibitor (p35), der die Caspasen der Wirtszelle hemmt und damit die Apoptose verhindert¹¹³. Vermutlich interagiert auch LmIcP, der Cysteinproteaseinhibitor des Protozoons *Leishmania mexicana*, mit Proteasen des Wirtes¹¹⁴.

Parasitär lebende Nematoden befinden sich dagegen während ihrer gesamten Lebensdauer im Extrazellulärraum des Wirtes und müssen somit effiziente Mechanismen entwickelt haben, um dem Immunsystem des Wirtes zu trotzen. Interessanterweise haben verschiedene Studien gezeigt, dass die parasitären Nematoden Cysteinproteaseinhibitoren der Cystatinfamilie sezernieren, die eine lokale antiinflammatorische Wirkung haben und Wirtsproteasen hemmen, die an der

Antigenpräsentation über MHC II-Komplexe beteiligt sind^{108, 110, 115-119}. Dieser Effekt ist spezifisch für die Cystatine der parasitären Nematoden, obwohl die Sequenzunterschiede zu den homologen Inhibitoren des freilebenden Nematoden *C. elegans* sehr gering sind¹⁰⁸. Auch Zecken sekretieren Cysteinproteaseinhibitoren, um sich während der mehrtägigen Blutmahlzeit vor dem Immunsystem des Wirtes zu schützen¹²⁰. Die Zecke *Ixodes scapularis* sezerniert mit dem Speichel das Cystatin Sialostatin L, das ebenfalls antiinflammatorisch wirkt und die Proliferation von zytotoxischen T-Zellen verhindert.

1.6 Inhibitortypen und ihre physiologische Relevanz

Grundsätzlich kann man Proteaseinhibitoren nach ihrer physiologischen Funktion in zwei Kategorien einteilen: In Notfall-Inhibitoren (*emergency type inhibitors*) und regulatorische Inhibitoren (*regulatory type inhibitors*)^{91, 93}. In der Regel befinden sich Notfallinhibitoren in ihrer Mikroumgebung im molaren Überschuss zu den Zielproteasen, die sich im Normalzustand in einem anderen Kompartiment befinden und somit für die Notfall-Inhibitoren nicht zugänglich sind. Oftmals schützen Notfallinhibitoren ihre Mikroumgebung vor Parasitenproteasen oder endogenen Proteasen, die in ein falsches Zellkompartiment gelangt sind. Typische Notfall-Inhibitoren sind beispielsweise endogene Cystatine, die das Wirtszellzytosol und den Extrazellulärraum vor fehlgeleiteten, lysosomalen Proteasen oder auch vor den Proteasen von Pathogenen schützen⁹¹. Parasitierende Nematoden und Zecken nutzen dagegen ihre Cystatine, um Wirtspoteasen zu hemmen, die an der Pathogenabwehr beteiligt sind^{108-110, 115, 116, 118, 120-122}.

Im Gegensatz zu den Notfall-Inhibitoren kolokalisieren die regulatorischen Inhibitoren oftmals mit ihren Zielproteasen⁹¹. Sie werden in drei Subtypen unterteilt: Entsorgungstyp (*threshold inhibitor*), Puffertyp (*buffer type inhibitor*) und Verzögerungstyp (*delay type inhibitor*). Die Inhibitoren des Entsorgungstyps können wie ein Notfall-Inhibitor schnell und mit niedriger Dissoziationskonstante ihre Zielproteasen binden, befinden sich jedoch in der Zelle in deutlich geringeren Konzentrationen als die Zymogene ihrer Zielenzyme. Bei einer massiven Zymogenaktivierung sind die Inhibitoren daher nicht mehr in der Lage, die Proteolyseaktivität zu unterdrücken. Ein typisches Beispiel für einen Entsorgungstyp sind die IAPs (*inhibitors of apoptosis protein*), die in nahezu allen Organismen vorkommen und endogene Caspasen inhibieren⁹¹. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass die Zelle erst bei einer exzessiven Aktivierung der Caspasezymogene in Apoptose eintritt. Intrazelluläre Pathogene wie das bereits im vorherigen Abschnitt erwähnte Baculovirus *A. californica* können diese Aktivierungsschwelle durch die Expression von eigenen Cysteinproteaseinhibitoren erhöhen und damit das Überleben ihrer Wirtszellen sicherstellen^{113, 123-126}. Regulatorische Inhibitoren des Puffertyps binden ihre Zielproteasen zwar schnell, dissoziieren aber auch wieder leicht von ihnen.

Die Substrate der Proteasen können also leicht mit ihnen um die Bindungsstelle konkurrieren. In Abwesenheit des Substrates schützt der Puffertyp-Inhibitor die Zelle auf diese Weise vor unerwünschter Hydrolyseaktivität, während er das Enzym in Anwesenheit des jeweiligen Substrates freigibt. Oftmals geschieht letzteres auch indirekt durch Faktoren, die mit der Anwesenheit des Substrates korrelieren. *In vitro* Experimenten zufolge können hochaffine Notfall-Inhibitoren der Cystatinklasse durch Änderung der äußeren Bedingungen in Puffertyp-Inhibitoren konvertieren⁹¹. Dieser Mechanismus ermöglicht eine schnelle Reaktion auf die Veränderungen der Umwelt, da die Proteasen bereits in ihrer aktiven Form in der Zelle vorliegen können, aber von dem Inhibitor unter normalen Umständen blockiert werden. Unter den Bedingungen, die die Notfall-Inhibitorfunktion begünstigen, kann also ein Reservoir aus potentiell aktiven Proteasen in der Zelle angelegt werden, das durch Änderung äußerer Faktoren der Zelle sofort zur Verfügung gestellt wird. Regulatorische Inhibitoren des Verzögerungstyps hemmen ihre Zielenzyme wie Notfall-Inhibitoren über einen pseudoirreversiblen Mechanismus, allerdings mit einer sehr kleinen Assoziationskonstante. Dies erlaubt der Protease, für einen bestimmten Zeitraum ihre Funktion auszuführen. Durch die Verzögerungstyp-Inhibitoren werden die Hydrolyseaktivitäten der jeweiligen Proteasen also zeitlich limitiert. Sie spielen unter anderem für die limitierte Proteolyse bei Signaltransduktionsprozessen eine wichtige Rolle⁹¹.

Zusammengefasst hängt die physiologische Bedeutung eines Proteaseinhibitors davon ab, ob er mit der entsprechenden Protease zumindest zu einem bestimmten Zeitpunkt kolokalisiert, welche äußeren Bedingungen in der Mikroumgebung vorliegen (z.B. pH-Wert, Konzentration des um die Bindungsstelle konkurrierenden Substrats, Vitalität der Zelle), wie groß die Affinität zwischen Protease und Inhibitor ist und wie ihre relativen Konzentrationen in der jeweiligen Mikroumgebung sind. In Abbildung 1-8 werden die wichtigsten Funktionen der Proteasen und die Regulationsmechanismen durch verschiedene Inhibitorarten noch einmal zusammengefasst.

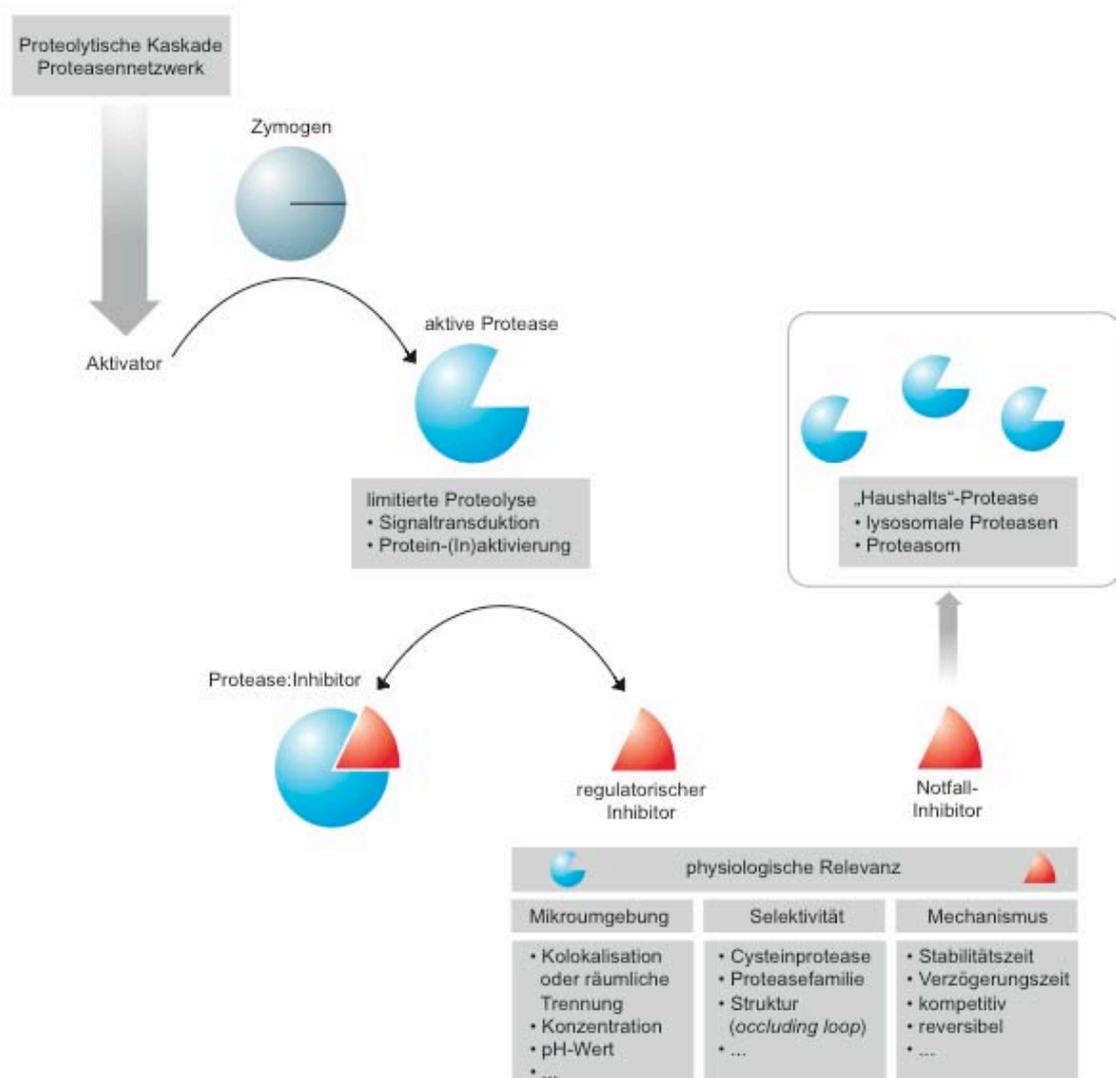


Abbildung 1-8: Funktionen und Regulationsmechanismen von Proteasen (©AR)

Proteasegesteuerte Signaltransduktionen laufen oft in proteolytischen Kaskaden ab, bei denen eine übergeordnete aktive Protease die inaktive Zymogenform einer anderen Protease durch Prozessierung aktiviert. Da eine Protease jeweils mehrere Substrate umsetzt, werden mit jeder Stufe mehr Proteasen aktiviert, so dass der Effekt immer stärker wird (Signalverstärkung). Wenn die Hierarchie der Proteasereaktionen nicht eindeutig ist, spricht man von Proteasennetzwerken. Bei Signalkaskaden werden Proteasesubstrate oftmals nur an einer spezifischen Stelle gespalten (Konzept der limitierten Proteolyse). Um diese Proteaseaktivität genau zu regulieren, werden Proteasen, die an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind, oft durch regulatorische Inhibitoren kontrolliert. In den Lysosomen und im Proteasom werden die Proteinsubstrate dagegen in kleine Peptide oder in einzelne Aminosäuren zerlegt, was für die MHC:Antigenpräsentation, die Nährstoffverwertung und für den täglichen Proteinumsatz von Bedeutung ist. Diese "Haushalts"-Proteasen befinden sich in der Regel in abgeschlossenen Kompartimenten. Nachbarkompartimente werden häufig durch entsprechende Notfall-Inhibitoren vor den konstitutiv aktiven "Haushalts"-Proteasen geschützt. Ob Inhibitoren im Organismus physiologisch relevant sind, hängt von ihrer Lokalisation, ihrer Selektivität und ihrem Inhibitionsmechanismus ab.

1.7 Cysteinproteaseinhibitoren der Chagasinfamilie

Die Bedeutung der Cysteinproteasen von Protozoen für die Pathogenität und für die Medikamentenentwicklung ist schon lange bekannt. Überraschenderweise besitzen Protozoen keine homologen Cysteinproteaseinhibitoren der bisher bekannten Inhibitorfamilien (z.B. Cystatine). Es war unklar, wie die einzelligen Parasiten ihre eigenen zahlreichen Proteasen kurzfristig regulieren und wie sie sich vor den Proteasen des Wirtes schützen, bis mit Chagasin aus *Trypanosoma cruzi* eine neue Cysteinproteaseinhibitorfamilie entdeckt wurde (MEROPS Clan IX; Familie 142)¹²⁷. Chagasin-ähnliche Inhibitoren wurden bisher nur in Protozoen (*T. cruzi*, *T. brucei*, *L. mexicana*, *L. major*, *E. histolytica*, *P. falciparum*) und dem Bakterium *P. aeruginosa* identifiziert und werden auch als ICPs (*inhibitor of cysteine proteases*) bezeichnet^{128, 129}. Die Inhibitoren können sowohl endogene Cysteinproteasen des Parasiten (*T. brucei*, *T. cruzi*, *P. falciparum*, *E. histolytica*) als auch Wirtszellproteasen (*L. major*, *P. falciparum*) inhibieren^{114, 130-135}.

ICPs weisen untereinander nur eine sehr geringe Sequenzhomologie von weit unter 30 % auf, besitzen aber konservierte Struktur motive und eine charakteristische Proteinfaltung. Die Kristallstrukturen von Chagasin und LmICP wurden bereits aufgeklärt^{136, 137}. Chagasin konnte zudem in Komplex mit Cathepsin L, Papain, der *P. falciparum* C1-Cysteinprotease Falcipain-2 und Cathepsin B kristallisiert werden, so dass hier auch die genauen Interaktionen zwischen Inhibitor und Protease bekannt sind¹³⁸⁻¹⁴¹.

Chagasin besteht aus acht β -Faltblattsträngen und einer kurzen 3_{10} -Helix. Die β -Faltblattstränge sind in Analogie zu Immunglobulindomänen in einer β -Sandwich-Struktur angeordnet. Die Chagasinfamilieninhibitoren sind damit die ersten Proteine mit einer Immunglobulinstruktur, die in Nicht-Metazoen beschrieben wurden¹³⁷. Die einzelnen Faltblattstränge sind über sechs Schleifenstrukturen (*Loops*) miteinander verbunden. Die *Loop*-Strukturen 2, 4 und 6 interagieren mit der Protease, indem sie wie ein Keil in das aktive Zentrum des Enzyms ragen.

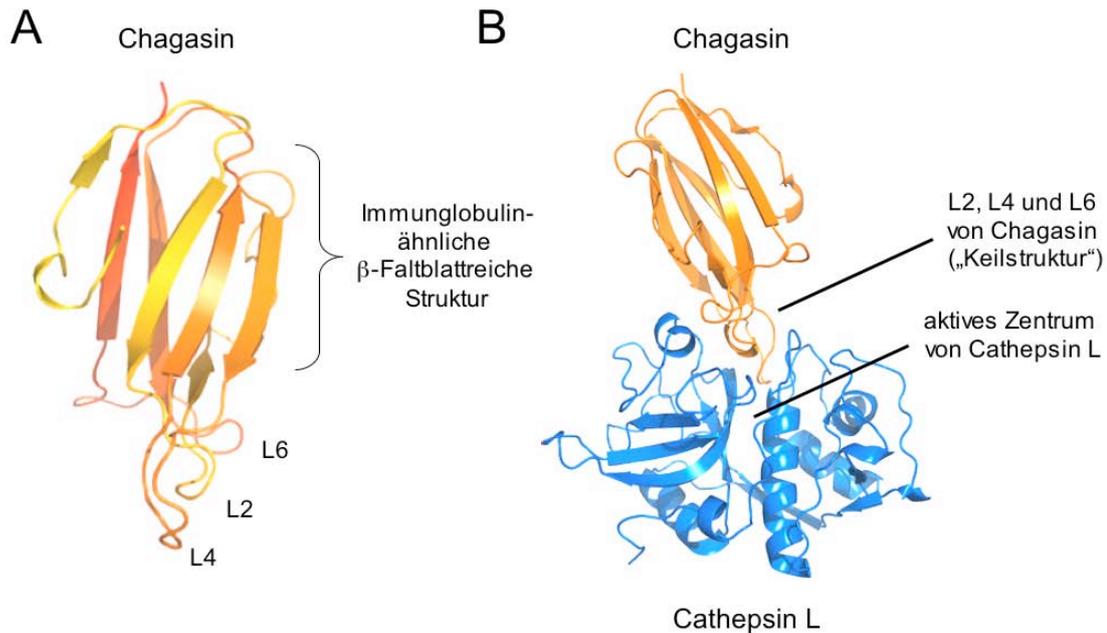


Abbildung 1-9: Kristallstruktur von Chagasin und dessen Interaktion mit Cathepsin L

Kristallstruktur von Chagasin (A) ¹³⁸. Kristallstruktur von Chagasin im Komplex mit Cathepsin L (B) ¹³⁹.

Chagasin von *T. cruzi*, dem Erreger der Chagas-Krankheit, reguliert die Parasitenprotease Cruzipain. In Epimastigoten von *T. cruzi* kolokalisiert der Inhibitor mit der Protease und *in vivo* bildet Chagasin mit Cruzipain stabile Komplexe ¹³⁰. Eine Überexpression von Chagasin führte zu Mutanten, die in ihrer Differenzierungsfähigkeit beeinträchtigt waren und *in vitro* eine verminderte Infektiosität aufwiesen. TbICP von *T. brucei*, dem Erreger der Schlafkrankheit, reguliert ebenfalls endogene Proteasen des Parasiten ¹³¹. Die Blutstadien von funktionellen TbICP-Nullmutanten wiesen bei ihrer Differenzierung zur prozyklischen Form einen verstärkten Austausch der stadienspezifischen Oberflächenproteine auf, degradierten schneller Antikörper, die an Oberflächenproteine gebunden waren und erreichten im Mausmodell höhere Parasitämien ¹³¹.

Falstatin (PflICP) von *P. falciparum* ist für die Infektiosität der erythrozytären Merozoiten von Bedeutung. Wenn Falstatin durch Antikörper abgefangen wurde, konnten die Merozoiten *in vitro* signifikant schlechter rote Blutzellen infizieren ¹³⁵.

Der Inhibitor LmICP von *L. mexicana* hemmt dagegen wahrscheinlich Wirtszellproteasen. Funktionelle LmICP-Nullmutanten wiesen eine unveränderte Aktivität der Parasitenproteasen auf und konnten *in vitro* mit der gleichen Effizienz wie die Wildtyp-Parasiten Zellen infizieren ¹¹⁴. *In vivo* waren die Nullmutanten jedoch weniger virulent als die Wildtyp-Parasiten. LmICP schützt also wahrscheinlich die eindringenden Parasiten vor Wirtszellproteasen, die für die Pathogenabwehr zuständig sind.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit wurde ein Cysteinproteaseinhibitor des Malariaerregers *P. berghei* identifiziert¹⁴². PbICP (*Plasmodium berghei inhibitor of cysteine proteases*) ist ein ungewöhnliches Mitglied der Chagasinfamilie und bisher der einzige bekannte Cysteinproteaseinhibitor, den der Malariaerreger in der Leberphase exprimiert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte PbICP während der exoerythrozytären Phase des Malariaerregers durch Immunfluoreszenzstudien und Elektronenmikroskopie lokalisiert werden. Die vorangegangene Diplomarbeit lieferte Hinweise darauf, dass PbICP während der erythrozytären Phase prozessiert wird. In dieser Arbeit sollte die Prozessierung von PbICP auch in der exoerythrozytären Phase analysiert werden. Da die Infektionsrate im Leberstadium sehr gering ist und die Western Blot-Analyse von Wildtyp-Leberparasiten oftmals unmöglich macht, sollten transgene Parasiten generiert werden, die PbICP als GFP-Fusionsprotein überexprimieren. Alternativ sollten domänenspezifische Antiseren hergestellt werden, um die Prozessierung auch in Immunfluoreszenzanalysen zu analysieren. Das Volllängenprotein und die prozessierte Form von PbICP sollten rekombinant hergestellt und in Kinetikstudien mit verschiedenen Proteasen miteinander verglichen werden. Anhand der Ergebnisse der Lokalisations- und Kinetikstudien sollten anschließend Hypothesen über die biologischen Funktionen des Inhibitors aufgestellt werden und diese durch geeignete Experimente überprüft werden. Um nähere Informationen über die besondere Struktur der Plasmodien-ICPs zu erhalten, sollte die prozessierte Form von PbICP mit der Parasitenprotease Falcipain-2 in Zusammenarbeit mit Kristallographen kokristallisiert werden.

2 Material und Methoden

Tabelle 2-1: Geräte

| Gerät | | Hersteller- / Vertriebsfirma |
|--------------------|--|--|
| Acrylamidgelkammer | Hoefer Mighty Small II | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Analysenwaage | KERN 410 | Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern |
| Agarosegelkammer | Horizon ® 58 | Gibco, Karlsruhe |
| Binokular | KL1500LCD | Zeiss, Hamburg |
| Blotting Tank | Modell EB10 | Labtec Int., Burkhardsdorf |
| Brutschrank | B5060EK-C02 | Heraeus, Hannover |
| Brutschrank | B6200 | Heraeus, Hannover |
| Digitalkamera | C4742-95 | Hamamatsu, Herrsching |
| Durchflussspumpe | Pharmacia LKB-Pump P1 | Pharmacia, Karlsruhe |
| ELISA-Reader | MRX Microplate Reader | Dynatech Laboratories, Guernsey, England |
| | Automated Microplate Reader LAMBDA E | MWG-Biotech, Ebersberg |
| Entwickler | Curix 60 | AGFA, Leverkusen |
| Entwicklerkassette | IEC 60406 | Rego X-Ray GmbH, Augsburg |
| Inverses Mikroskop | Axiovert 25 | Zeiss, Hamburg |
| Magnetrührer | RET basic | IKA Labortechnik, Hamburg |
| Multipette | Multipette® plus | Eppendorf, Hamburg |
| pH-Meter | pH Level 1 | InoLab, Weilheim |
| Photometer | Bio-Photometer | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettierhilfe | Pipetus®-akku | Hirschmann, Eberstadt |
| Power-Supply | EPS 3500 | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Power-Supply | Power PAC 300 | Bio-Rad, München |
| Schüttler | Innova TM Inkubator Shaker 4400 | New Brunswick Scientific, Nürtingen |

- Fortsetzung nächste Seite -

- Fortsetzung -

| Gerät | | Hersteller- / Vertriebsfirma |
|---------------------|--------------------------|--|
| Sonifikator | Sonifer 250 | Branson, Dietzenbach |
| Sterilbank | BSB 6A | Gelaire Flow Laboratories, Opera, Italien |
| Thermoblock | Thermomixer 5436 | Eppendorf, Hamburg |
| Thermocycler | Gene Amp PCR System 2400 | Perkin Elmer, Rodgau- Jüdesheim |
| Ultraschallbad | Sonorex Super | Bandelin SCHALLTEC GmbH, Mörfelden-Walldorf |
| UV-Transilluminator | UV-Flächenstrahler | Konrad Bender, Wiesloch |
| Vortexer | VF2 | IKA Labortechnik, Hamburg |
| Zentrifugen | 5415C | Eppendorf, Hamburg |
| | 4K10 | Sigma, Steinheim |
| | 1-15K | Sigma, Steinheim |
| | Minifuge T | Eppendorf, Hamburg |
| | Cytospin 3 | SHANDON, Life Sciences International GmbH, Frankfurt am Main |

Tabelle 2-2: Fluoreszenzmikroskope und Elektronenmikroskop

| Mikroskop | Beschreibung |
|---------------------|----------------------------------|
| FEI Tecnai™ TEM | Transmissionselektronenmikroskop |
| LSM 5 LIVE, Zeiss | Lebendstudien (Laser) |
| Axiovert 200, Zeiss | Inverses Fluoreszenzmikroskop |
| Leitz DM RB | Aufrechtes Fluoreszenzmikroskop |
| Olympus FV1000 | Konfokales Fluoreszenzmikroskop |

Tabelle 2-3: Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Hersteller- / Vertriebsfirma |
|---|-------------------------------------|
| Chirurgische Schere, 13 cm | Hauptner, Zürich, Schweiz |
| Deckgläschen, rund, Ø 13 mm | Engelbrecht, Furth |
| Dialysemembran (Spectra/Por, MWCO 6-8 kDa) | Roth, Karlsruhe |
| Dumont Präzisionspinzette, 5/45° | Roth, Karlsruhe |
| Einwegkanülen | Braun, Melsungen |
| Einwegspritzen | Braun, Melsungen |
| Eppendorf Reaktionsgefäße | Eppendorf, Hamburg |
| Falcon Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 mL) | Sarstedt, Nürnbrecht-Rommelsdorf |
| Fotofilm AGFA APX 100 | AGFA Leverkusen |
| Glasbodenschalen | WillCoWells, Amsterdam |
| Glasküvetten | Roth, Karlsruhe |
| Glasobjektträger (Polysine™ und Super Frost™) | Roth, Karlsruhe |
| Insulinspritzen (BD-Micro-Fine 0,5 ml) | BD Medical, Heidelberg |
| Kunststoffpipetten | Greiner, Solingen-Wald |
| Mikrotiterplatten 96 Well (Polystyrol), Flachboden und Rundboden, unbeschichtet | Sarstedt, Nürnbrecht-Rommelsdorf |
| Mikrotiterplatte Nunc 96 Well™, Polylysine, Flachboden | Nunc (Apogent), Roskilde, Dänemark |
| Nitrozellulose Transfer Membran Protran® | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Parafilm | Pechiney, Mühlital |
| Pasteurpipetten | Brand, Wertheim |
| Petrischalen | Nunc, Roskilde, Dänemark |
| Pipettenspitzen | Sarstedt, Nürnbrecht-Rommelsdorf |
| Pipettenspitzen, gestopft | Greiner, Solingen-Wald |
| Silikonstift PapPen | G. Kisker, Steinfurt |
| Sterilfilter (0,22 µm) | Sarstedt, Nürnbrecht-Rommelsdorf |
| Thermanox Deckgläschen, rund, Ø 13 mm | Nunc, Roskilde, Dänemark |
| Whatman-Filterpapier | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Zellkulturflaschen (25 cm ² / 75 cm ²) | Sarstedt, Nürnbrecht-Rommelsdorf |
| Zellkulturschalen (24 Well) | Greiner, Solingen-Wald |

Tabelle 2-4: Datenbanken und Programme

| Datenbank bzw. Internetprogramm | Internetadresse | Beschreibung |
|--|--|--|
| PlasmoDB | www.plasmodb.org | <i>Plasmodium</i> -Datenbank |
| GeneDB | www.genedb.org | <i>Plasmodium</i> -Datenbank |
| SangerDB | www.sanger.ac.uk/Projects/Protozoa/ | <i>Plasmodium</i> -Datenbank |
| PredictProtein | www.predictprotein.org | Vorhersage von Proteinmodifikationen und Struktureigenschaften sowie für PSI-BLAST-Suche |
| ClustalW-Service | www.ebi.ac.uk/clustalw/ | Anordnungen von Sequenzen nach dem ClustalW-Algorithmus |
| Jalview | www.jalview.org | Bearbeitung von ClustalW-Dateien |
| JNet Secondary Structure Prediction | Integrierter Web-Service von Jalview | Vorhersage von Proteinsekundärstrukturen |
| SignalP | www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ | Vorhersage N-terminaler Signalpeptide und ihrer Prozessierungsstellen |
| MEROPS | http://merops.sanger.ac.uk/ | Proteasen- und Inhibitoren-Datenbank |
| MacVector™ | Sequenzanalysen, Primereigenschaften | |
| Excel, GraphPad Prism | Auswertung der Kinetikstudien | |
| Openlab | Bearbeitung von Immunfluoreszenz-bildern | |

2.1 Kultivierung von *P. berghei*

Da Leberstadien im Gegensatz zu den Blutstadien von *Plasmodium* nicht in Dauerkultur gehalten werden können, wurde hier das Nagermodell mit *P. berghei* verwendet. Weibliche Mücken der Gattung *A. stephensi* wurden regelmäßig über das Blut einer infizierten NMRI-Maus (Charles-River-Laboratory, Sulzfeld) mit dem Nagerpathogen *P. berghei* ANKA (Vincke and Lips, 1948) infiziert. Die Gametozytenentwicklung im Blut der Maus wurde zuvor im Blutausstrich kontrolliert. Zum einen wurde mikroskopisch die Exflagellation der männlichen Gametozyten beobachtet, die durch die Temperaturänderung von 37 °C auf Raumtemperatur eingeleitet wurde, und zum anderen wurden die Blutzellen mit Wright-Lösung angefärbt, so dass man die Parasitenstadien unterscheiden konnte. Zudem wurde anhand der gefärbten Blutausstriche die Parasitämie bestimmt. Für *in vitro* Studien können ab etwa 18 Tagen nach der Blutmahlzeit Sporozoiten aus den Speicheldrüsen isoliert und HepG2-Zellen in Kultur infiziert werden. Um den *P. berghei*-Zyklus zu erhalten, wurden Mäuse über Mücken oder durch intraperitoneale Verabreichung von Blutkonserven infiziert. Um einen schnelleren Parasitenanstieg zu erreichen, kann den Mäusen zwei bis drei Tage vor der Infektion 200 µl Phenylhydrazin (6 mg/ml) intraperitoneal verabreicht werden. Phenylhydrazin führt zum Absterben roter Blutzellen und damit indirekt zur Retikulozytenproduktion, die bevorzugt von *P. berghei* infiziert werden.

Es wurde mit dem Wildtypstamm und den transgenen Stämmen PbGFPCON¹⁴³ sowie PbmCherry¹⁴⁴ von *P. berghei* ANKA gearbeitet.

2.1.1 Färben von Blutausstrichen mit Wright-Lösung

Mäusen wurde ein Tropfen Blut aus der Schwanzvene entnommen und auf einem Objektträger ausgestrichen und kurz getrocknet. Auf den Blutausstrich wurden 10 Tropfen Wright-Färbelösung (1 mg/ml Wright Stain in Methanol) gegeben, nach ungefähr 2 Minuten 10 Tropfen ddH₂O hinzugefügt und nach weiteren 2 Minuten mit Leitungswasser abgespült. Nachdem der Blutausstrich getrocknet war, konnte am Lichtmikroskop die Parasitämie (infizierte Blutzellen/nicht-infizierte Blutzellen*100) ausgezählt und die Morphologie der Parasiten bestimmt werden.

2.1.2 Blutstabilate

Bei einer Parasitämie von 5 - 15 % wurden 100 µl Blut mit 200 µl Freezing-Lösung (Alsever's Solution, Sigma mit 10 % Glycerol, Biomol) gemischt und sofort bei -70 °C eingefroren.

2.1.3 Mücken-zucht und Mückeninfektion

Die *A. stephensi* Mücken wurden bei 27 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 80 % sowie einem 12-Stunden-Tag-und-Nacht-Zyklus gezüchtet. Die Mücken ernährten sich von 10%iger Glukoselösung, die über einen getränkten Watteball zur Verfügung gestellt wurde. Für die Eiablage bekamen die weiblichen Mücken zudem ein bis zwei Mal pro Woche eine Blutmahlzeit. Dazu wurde humanes Spenderblut im Verhältnis von 1:1 mit FCS gemischt und in einen Metallzylinder gegeben, der zu einer Seite offen war. Über die geöffnete Seite wurde Parafilm gespannt und der Zylinder so auf den Mückenkäfig gestellt, dass die Tiere den Parafilm durchstechen und das Blutgemisch trinken konnten (*membrane feeding*). Der Metallzylinder wurde während der Blutmahlzeit auf 37°C erwärmt. Zwei Tage nach der Blutmahlzeit legten die Weibchen ihre Eier auf bereitgestellte feuchte Filter ab. Die Eier wurden mit Hilfe der Filterscheibe in eine mit Wasser gefüllte Schale überführt. Die Larven wurden mit Fischfutter ernährt. Nach etwa 10 Tagen wurden die Puppenstadien von den Larven getrennt, in einer kleineren Wasserschale gesammelt und in einen Zuchtkäfig gestellt, wo die adulten Tiere schlüpfen.

Um die Mücken mit *P. berghei* zu infizieren, wurden etwa 150 der 3 bis 6 Tage alten Weibchen in Infektionskäfige überführt und für mehrere Stunden gehungert. Für die Mückeninfektion sollte die Parasitämie der infizierten Maus bei 10-15 % liegen und es sollten viele reife Gametozyten vorhanden sein. Die Maus wurde betäubt (z.B. mit Ketamin/Domitor) und für etwa 40 Minuten auf den Mückenkäfig gelegt. Nach der Blutmahlzeit wurde die Maus durch eine Überdosis des Betäubungsmittels oder durch CO₂ getötet.

Bei 21 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 80 % konnten nach etwa 16 bis 18 Tagen Sporozoiten aus den Speicheldrüsen der Mücken isoliert werden.

2.2 Kultivierung und Infektion von HepG2-Zellen

Zellen der humanen, adhären wachsenden Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 (European Collection Of Cell Culture) wurden in 10 ml Kulturmedium in 250ml-Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter sterilen Bedingungen kultiviert. Zum Verdünnen der Kultur oder zum Überführen der Zellen in Kulturschalen wurde der Zellrasen mit sterilem PBS gewaschen und die HepG2-Zellen mittels limitierter Trypsin/EDTA- oder Accutasebehandlung (PAA Laboratories GmbH, Österreich) abgelöst. Mit 5 ml des Kulturmediums wurde die Trypsin- oder Accutaseaktivität gestoppt und die Zellen anschließend bei 460 x g für 3 Minuten sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in den gewünschten Verdünnungen in eine 250ml-Zellkulturflasche oder in die Vertiefungen einer Kulturschale gegeben. Bei Bedarf wurde die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Kulturmedium von HepG2-Zellen

| | |
|---|---------------------------------|
| Minimal Essential Medium (MEM) with Earl's salts* | 500 ml |
| fetal calf serum (FCS)* | 10 % (v/v) |
| L-Glutamin (100x)* | 2 mM |
| Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x)* | 100 U/ml Pen., 100 µg/ml Strep. |
| *PAA Laboratories GmbH, Österreich | |

PBS (10x)

| | |
|--|--------|
| Na ₂ HPO ₄ (Roth, Karlsruhe) | 57 mM |
| K ₂ HPO ₄ (Roth, Karlsruhe) | 18 mM |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 750 mM |
| → pH-Wert 7,4 | |

Für Infektionsexperimente wurden die Zellen auf Glasdeckgläschen in 24-well-Kulturschalen überführt. Je nach Experiment wurden ca. 0,5 bis $2 \cdot 10^5$ Zellen auf Glasdeckgläschen ausgesät. *P. berghei*-Sporoziten wurden ab dem 18. Tag nach der Mückeninfektion aus den Speicheldrüsen von infizierten *A. stephensi*-Mücken präpariert und in einem möglichst kleinen Flüssigkeitsvolumen (ca. 200 µl/24-well) für mindestens 2 Stunden auf HepG2-Zellen gegeben.

Für die Sporozitenpräparation wurden die Mücken entweder mit Chloroform oder durch Eiskühlung betäubt. Nachdem die Mücken zuerst in Ethanol desinfiziert und dann in PBS gewaschen worden waren, wurden sie zum Schutz vor Austrocknung über einen möglichst kurzen Zeitraum auf feuchten Tüchern gelagert. Die Präparation der zwei Speicheldrüsen aus dem Thorax erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle bei einer 20- bis 50fachen Vergrößerung im Infektionsmedium. Die sechs Lappen des Speicheldrüsenpaares wurden anschließend mit Pinzetten zerrissen und unter einem inversen Mikroskop bei einer 400fachen Vergrößerung auf die Anwesenheit von Sporoziten überprüft. Je nach geschätzter Sporozitenanzahl wurden die Inhalte von ein bis vier Speicheldrüsen auf ausgesäte HepG2-Zellen gegeben. Nach einer ungefähr 2 bis 3 stündigen Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂-Gehalt) wurde das Medium durch frisches Kulturmedium aufgetauscht. Bei den transgenen PbGFPCON- und PbmCherry-Parasiten konnte die Anwesenheit der Sporoziten in den Speicheldrüsen der Mücken und die Effizienz der HepG2-Infektionen am inversen Fluoreszenzmikroskop überprüft werden.

Infektionsmedium

| | |
|---|---------------------------------|
| Minimal Essential Medium (MEM) with Earl's salts* | 500 ml |
| Bovines Serumalbumin (BSA)* | 3 % (w/v) |
| L-Glutamin (100x)* | 2 mM |
| Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x)* | 100 U/ml Pen., 100 µg/ml Strep. |
| → sterilfiltrieren | |

*PAA Laboratories GmbH, Österreich

2.3 Isolation der Gesamt-RNA von *P. berghei*

RNA wurde mit dem Kit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben isoliert und bei -70 °C gelagert. Alternativ konnte die Zellprobe im Lysepuffer des Kits aufgenommen werden und für einige Zeit bei -20 °C gelagert werden.

2.3.1 RNA-Isolation während der Mückenphase

Etwa 20 infizierte Mitteldärme (ca. 10 bis 14 Tage nach Infektion) oder 20 infizierte Speicheldrüsen (ca. 18 bis 25 Tage nach Infektion) wurden aus den Mücken entnommen, direkt in 350 µl Lysepuffer des NucleoSpin® RNA II Kits aufgenommen und nach Herstellerangaben isoliert.

2.3.2 RNA-Isolation während der Leberphase

Zu einem gewünschten Zeitpunkt nach Infektion wurden infizierte HepG2-Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 350 µl Lysepuffer des NucleoSpin® RNA II Kits aufgenommen und nach Herstellerangaben isoliert.

2.3.3 RNA-Isolation während der Blutphase

Mindestens 100 µl Blut einer mit *P. berghei* infizierten NMRI-Maus mit einer möglichst hohen Parasitämie wurde für wenige Sekunden zentrifugiert und das Pellet in 350 µl Lysepuffer des NucleoSpin® RNA II Kits aufgenommen und nach Herstellerangaben isoliert. Alternativ konnte zuvor ein Parasitenextrakt hergestellt werden (siehe 2.7).

2.4 Photometrische Bestimmung von RNA-Konzentrationen

Die RNA-Lösungen wurden hundertfach in destilliertem Wasser verdünnt und ihre optische Dichte (OD) in Quarzküvetten bei 260 nm im Photometer gemessen. Ein OD₂₆₀-Wert von 1 entspricht ungefähr 33 µg/ml RNA. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und bei 280 nm (OD_{260/280}) zeigt die Verunreinigung mit Proteinen an. Eine reine RNA-Lösung besitzt einen OD_{260/280}-Wert von 2,0.

In Abhängigkeit von der Parasitämie reichten 100 µl bis 200 µl des infizierten Mäuseblutes aus, um ausreichend Gesamt-RNA von *P. berghei* zu gewinnen (ca. 50 bis 100 ng/µl bei einer Parasitämie von 15 %). Wurde RNA aus infizierten HepG2-Zellen isoliert, stammte die RNA aufgrund der geringen Infektionseffizienz hauptsächlich aus den HepG2-Zellen. Über die Ausbeute der *P. berghei*-RNA ließ sich in diesem Fall also keine Aussage machen.

2.5 Transfektion von *P. berghei*

Die Transfektion der Blutschizonten von *P. berghei* erfolgte im Wesentlichen nach Janse et al., 2006¹⁴⁵. Eine Übersicht über den Ablauf wird in Abbildung 2-1 gezeigt.

Vorbereitung der Plasmide

Das gewünschte Gen wurde in *P. berghei* Expressionsplasmide kloniert (hier: pL0017 von MR4, konstitutiver *P. berghei*-Promotor *pbeef1aa*), die zusätzlich zu den Eigenschaften eines bakteriellen Expressionsplasmids ein Pyrimethaminresistenz vermittelndes Gen (hier: *Toxoplasma gondii* DHFR/TS; Dihydrofolat-Reduktase-Thymidylat-Synthetase) und eine Integrationssequenz (hier: *c-/d-ssu-rrna*-Lokus) enthielten (Klonierungen siehe Abschnitt 2.13). Etwa 40 µg DNA wurden mit SacII und ApaI (NEB, Frankfurt a.M.) verdaut, um das Plasmid in der Integrationssequenz zu linearisieren und anschließend aufgereinigt (siehe 2.13.2). Für die Transfektion wurden 2,5 bis 10 µg DNA in einem Volumen von maximal 15 µl benötigt.

Übernachtskultur zur Schizontenanreicherung

Für eine Transfektion von etwa 10 Konstrukten wurden 2 infizierte NMRI-Mäuse benötigt. Diese wurden bei einer Parasitämie von 1 bis 3 % zu einem Zeitpunkt getötet, an dem sich möglichst viele Parasiten im Ringstadium befanden und durch Herzpunktion ausgeblutet. Das infizierte Blut wurde zusammen mit 300 µl Heparin in 5 ml des 37 °C warmen Transfektionsmediums aufgenommen. Die Suspension wurde 8 Minuten bei 450 x g in einer Schwingrotorzentrifuge zentrifugiert und der Überstand (Medium und Mausserum) verworfen. Die sedimentierten roten Blutzellen wurden in 50 ml des Transfektionsmediums resuspendiert, in eine 500 ml-Zellkulturflasche überführt und steril mit einem Gasmischung (90 % Stickstoff, 5 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid) begast. Die Zellkulturflasche wurde mit einem geschlossenen Deckel (kein Filterdeckel) verschlossen und auf einem Horizontalschüttler bei 37 °C leicht geschüttelt, so dass sich keine Blutzellen am Flaschenboden absetzen konnten. Die Blutzellen wurden etwa 18 Stunden inkubiert, damit sich die Ringstadien zu reifen Schizonten entwickeln. Im Fall von *P. berghei* platzen die Schizonten in Kultur nicht auf, so dass der Lebenszyklus hier stoppt und sich die Schizonten im Verlauf der Inkubation anreichern. Im Blutausschlag (siehe 2.1.1) wurde überprüft, ob die Kultur ausreichend reife Schizonten enthielt.

Transfektionsmedium

| | |
|--|--------|
| RPMI 1640 (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) | 100 ml |
| FCS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) | 25 ml |
| Gentamicin-Ratiopharm® 80SF (Ratiopharm GmbH, Ulm) | 150 µl |

Dichtegradientenzentrifugation zur Schizontenisolierung

Die Schizonten wurden über Dichtegradientenzentrifugation mit einem Nycodenzgradienten von nicht infizierten Blutzellen und jungen Stadien getrennt. Aus der Nycodenz-Stammlösung wurden 27,5 ml entnommen und in einem Falcon-Gefäß mit 22,5 ml PBS aufgefüllt. Mit je 10 ml dieser Lösung wurden ungefähr 35 ml der Blutkultur vorsichtig unterschichtet. Die Suspension wurde in einer Schwingrotorzentrifuge für 20 Minuten bei 450 x g zentrifugiert. Die Schizonten bildeten einen braunen Ring an der Grenzschicht zwischen Nycodenz-Lösung und der Mediumschicht und wurden mit einer Glaspipette vorsichtig in ein weiteres Falcon-Gefäß überführt. Um Nycodenz-Reste aus der Schizontensuspension zu entfernen, wurde das Gefäß mit warmem Transfektionsmedium aufgefüllt und für 8 Minuten bei 450 x g zentrifugiert. Das Schizontenpellet wurde in Transfektionsmedium resuspendiert und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße in die Anzahl der benötigten Ansätze aufgeteilt (1 ml pro Ansatz). Die Schizontensuspensionen wurden für wenige Sekunden zentrifugiert (ca. 5 Sekunden bei 10.000 x g) und die Pellets im Überstand bis zur Verwendung stehen gelassen.

Nycodenzstammlösung

| | |
|--|-------|
| Nycodenz (Axis-Shield, Oslo, Norwegen) | 138 g |
| gepuffertes Medium | 500ml |

Gepuffertes Medium für den Nycodenz-Gradienten

| | |
|--|---------------|
| KCl (Roth, Karlsruhe) | 3 mM |
| CaNa ₂ EDTA (Roth, Karlsruhe) | 0,3 mM |
| Tris-HCl (Biomol, Hamburg) | 5 mM |
| | → pH-Wert 7,5 |

Nucleofektion und Infektion der Mäuse

Etwa 2,5 bis 10 µg DNA wurden in 100 µl der Nucleofektor-Lösung (Transfektions-Kit für humane T-Zellen, A88A6, Amaxa) überführt. Das Schizontenpellet wurde in der DNA-Transfektionslösung resuspendiert, mit einer mitgelieferten Pipette in die Elektroporationsküvette überführt und die Elektroporation mit dem Programm U-033 im Nucleofektor® (Amaxa) durchgeführt. Direkt im Anschluss an die Elektroporation wurden 100 µl Transfektionsmedium hinzugefügt, die Suspension mit der mitgelieferten Pipette in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und luftblasenfrei in eine Insulinspritze (BD) aufgezogen. Die transfizierten Schizonten wurden in die Schwanzvene in 4 bis 6 Wochen alte NMRI-Mäuse injiziert, die zur leichteren Injektion zuvor unter Rotlicht gesetzt worden waren.

Selektion

Für die Herstellung transgener *P. berghei* wurden Vektoren verwendet, die eine Resistenz gegenüber Pyrimethamin vermitteln. Am Folgetag der Transfektion bekamen die Mäuse 70 mg/L Pyrimethamin ins Trinkwasser (autoklaviertes Leitungswasser). Am ersten Tag nach der Transfektion kann man Parasiten im Blutausstrich nachweisen, am zweiten oder dritten Tag sollten durch den Selektionsdruck keine Parasiten mehr im Blutausstrich zu sehen sein. Erst nach 7 bis 14 Tagen sollten wieder Parasiten nachweisbar sein, da sich dann die transgenen Parasiten ausreichend vermehrt haben. Je nach Experiment wurden Blutstabilate (siehe 2.1.2.) angefertigt, DNA isoliert oder Transfermäuse infiziert.

Selektionszusatz für das Trinkwasser (100x)

Pyrimethamin (Sigma, Steinheim) 7 mg/ml in DMSO, Lagerung bei 4 °C

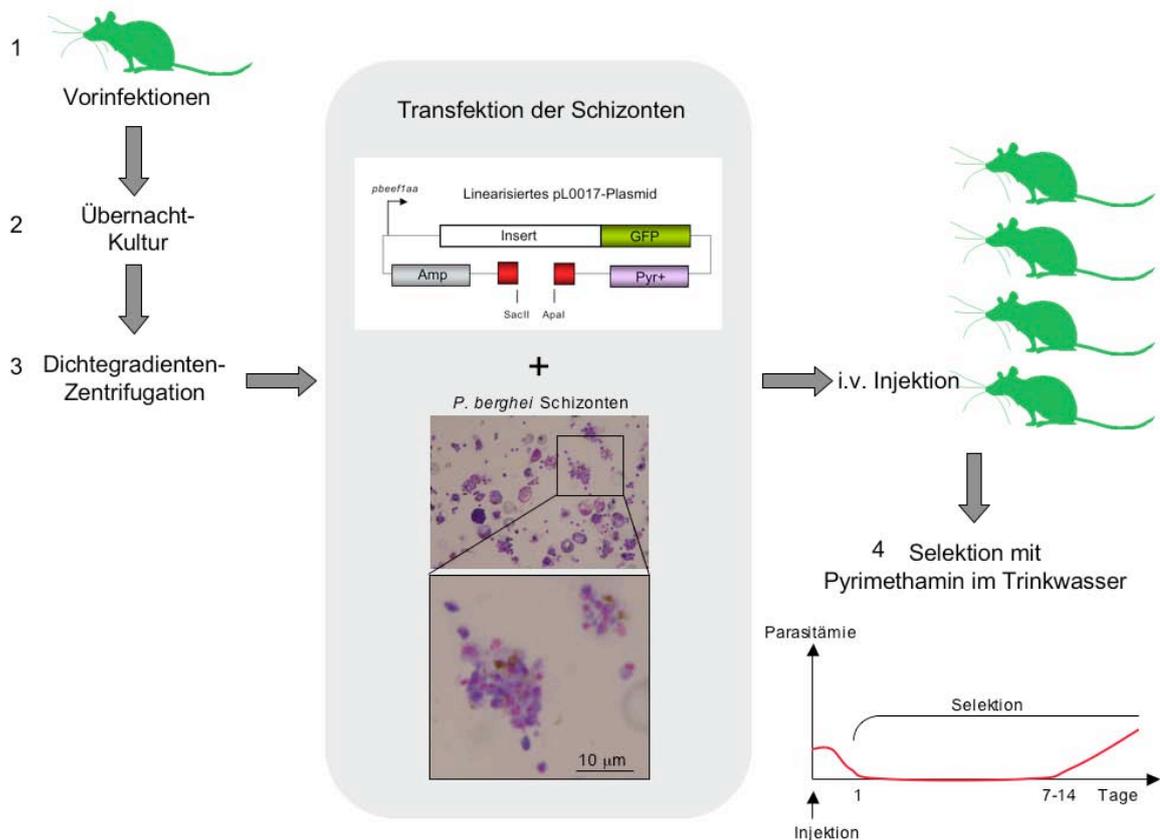


Abbildung 2-1: Transfektionsablauf bei der Herstellung transgener *P. berghei*-Parasiten

2.6 Isolation der gDNA von erythrozytären *P. berghei*-Stadien

Mindestens 100 µl Blut einer mit *P. berghei* infizierten NMRI-Maus mit einer möglichst hohen Parasitämie wurde kurz an zentrifugiert, das Pellet in Lysepuffer des QIamp - DNA-Blood Mini-Kit® Kits (Qiagen) aufgenommen und nach Herstellerangaben isoliert. Alternativ konnte zuvor ein Parasitenextrakt hergestellt werden (siehe 2.7). Bis zu ihrer Verwendung wurde die genomische DNA bei -20 °C gelagert.

2.7 Saponinextrakt von erythrozytären *P. berghei*-Parasiten

Durch Herzpunktion wurde das Blut einer infizierten NMRI-Maus mit einer möglichst hohen Parasitämie entnommen (ca. 1,5 bis 2 ml Blut, 15 % Parasitämie). Die Blutzellen wurden bei 2000 x g für 2 Minuten zentrifugiert und ungefähr fünfmal mit einem möglichst großen Volumen PBS (siehe 2.2) gewaschen, um das Serum vollständig zu entfernen. Das Zellsediment wurde im ungefähr 2,5fachen Volumen einer 0,15%igen oder 0,05%igen Saponinlösung vorsichtig resuspendiert und 8 Minuten auf Eis inkubiert. Saponin zerstört die Erythrozytenmembran und die Membran der parasitophoren Vakuole. Dagegen bleibt bei dieser kurzen Inkubationszeit die Parasitenmembran intakt. Die Suspension wurde anschließend bei 2800 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde so oft mit PBS gewaschen, bis der Überstand keine rötliche Färbung mehr aufwies. Bei den Waschvorgängen wurde jeweils bei 2800 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Größere, dunkelbraun bis rote Aggregate aus fragmentierten Erythrozytenmembranen wurden mit einer Pipettenspitze entfernt. Das Parasitensediment ist dunkelbraun gefärbt. Aus 1,5 ml Blut einer hoch infizierten Maus kann etwa ein Parasitensediment mit einem Volumen von 200 µl isoliert werden. Die Proben wurden in 25 µl-Fractionen aufgeteilt und bei -70 °C gelagert.

Saponinlösung

Saponin (Sigma, Steinheim)

0,15 % oder 0,05 % in PBS (siehe 2.2)

2.8 Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die DNA-Lösungen wurden hundertfach in destilliertem Wasser verdünnt und ihre optische Dichte (OD) in Quarzküvetten bei 260 nm im Photometer gemessen. Ein OD₂₆₀-Wert von 1 entspricht ungefähr 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Eine DNA-Lösung ohne Proteinverunreinigungen besitzt einen OD_{260/280}-Wert von 1,8.

2.9 Reverse Transkription

Nach der Isolierung der Gesamt-RNA (siehe 2.3) wurde die darin enthaltene mRNA mit Hilfe von Oligo(dT)-Nukleotiden und Reverser Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in cDNA umgeschrieben.

Um Kontaminationen mit genomischer *P. berghei*-DNA feststellen zu können, wurde einem Ansatz keine Reverse Transkriptase zugegeben.

Pro Ansatz (20 μ l) wurden 9 μ l der jeweiligen Gesamt-RNA-Probe (ca. 1 - 2 μ g Gesamt-RNA), 50 ng der Oligo(dT)-Nukleotide (1 μ l der 50 ng/ μ l Stocklösung; Invitrogen, Paisley, GB), 4 μ l 5x *First Strand* Puffer (Invitrogen, Paisley, GB), 1 mM von jedem Triphosphatnukleotid (2 μ l der Stocklösung mit 10 mM pro Nukleotid; DNTP-100, Sigma, Steinheim), 2 mM DTT (2 μ l der 20 mM Stocklösung; Invitrogen, Paisley, GB) und 100 U Reverse Transkriptase (1 μ l der Originallösung; SuperscriptTM II RNase H⁻, Invitrogen, Paisley, GB) zusammengegeben und mit RNase- und DNase-freiem dH₂O (aqua ad iniectionabilia Delta Select; Delta Select GmbH, Pfullingen) auf 20 μ l aufgefüllt. Nach Zugabe der Oligo(dT)-Nukleotide zur RNA-Lösung wurden zunächst die Sekundärstrukturen der RNA durch zweiminütiges Erhitzen in 70 °C heißem Wasser zerstört und die RNA anschließend sofort auf Eis gestellt. Bei der Negativkontrolle wurde anstelle der Reversen Transkriptase 1 μ l des RNase- und DNasefreien Wassers zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte im Thermocycler für 90 Minuten bei 42 °C. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch siebenminütiges Erwärmen auf 72 °C inaktiviert. Stammt die eingesetzte RNA aus infiziertem Blut, wurde die hergestellte cDNA mindestens 2,5fach verdünnt (ad 50 μ l). Die Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Operon (Köln) bezogen. Eine Liste der verwendeten Primer befindet sich in Abschnitt 2.13. Für Klonierungen wurden die DNA-Polymerasen Mid Range Polymerase (PEQLAB Biotechnologie GmbH; Erlangen, D) und PhusionTM High Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes / NEB; Frankfurt/Main) verwendet, für analytische Zwecke die DNA-Polymerase Hot FirePol® (Solis Biodyne, Tartu, Estonia).

Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden so ausgewählt, dass ihre Schmelztemperaturen bei etwa 55 °C bis 65 °C lagen. Die Schmelztemperaturen wurden mit dem Programm MacVectorTM 7.2.3 bestimmt. Die Konzentrationen der Oligonukleotid-Stocklösungen wurde mit DNase-freiem, destilliertem Wasser (aqua ad iniectionabilia Delta Select; Delta Select GmbH, Pfullingen) auf 100 pmol/ μ l eingestellt und ein Teil der Stocklösung 10fach verdünnt (10 pmol/ μ l). Beide Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

Wenn ein Plasmid als Template verwendet wurde, erfolgte anschließend ein DpnI-Verdau (siehe Abschnitt 2.13.1).

Tabelle 2-5: Standardansatz für eine PCR mit der Mid Range Polymerase (PEQLAB)

| Reagenz | Volumen |
|---|--------------|
| 10 x Mid Range Reaction Buffer | 5 µl |
| dNTP (10 mM von jedem der vier dNTPs) | 2 µl |
| Sense-Primer (10 pmol/µl) | 1 µl |
| Antisense-Primer (10 pmol/µl) | 1 µl |
| Template (ca.1 bis 200 ng/µl) | 1 µl |
| dH ₂ O (aqua ad iniectabilia Delta Select) | 39 µl |
| Mid Range Polymerase, 5 U/µl (PEQLAB Biotechnologie GmbH; Erlangen) | 1 µl |
| | 50 µl |

Alternativ kann je nach Anwendung ca. 1,5 µl MgCl₂ (25 mM, PEQLAB) zugegeben werden. Dies fördert die Ausbeute an PCR-Produkt, erhöht aber auch die Fehlerrate der DNA-Polymerase.

Tabelle 2-6: Standard-PCR-Programm mit der Mid Range Polymerase

| Reagenz | Temperatur | Zeit | Zyklen |
|---------------------------------------|------------|---------|-------------|
| 1. Denaturierung der DNA | 94 °C | 3 min | (Hot Start) |
| 2. Denaturierung der DNA | 94 °C | 1 min | 30 x |
| 3. Hybridisierung der Oligonukleotide | 55 °C | 1 min | |
| 4. Synthese des Komplementärstranges | 68 °C | 2,5 min | |
| 5. nach letztem Zyklus | 68 °C | 10 min | |
| 6. Beendigung des Programmes | 4°C | ~ | |

Tabelle 2-7: Standardansatz für eine PCR mit der Phusion Polymerase (Finnzymes/NEB)

| Reagenz | Volumen |
|---|--------------|
| 5 x Phusion HF Reaction Buffer | 10 µl |
| dNTP (10 mM von jedem der vier dNTPs) | 2 µl |
| Sense-Primer (10 pmol/µl) | 1 µl |
| Antisense-Primer (10 pmol/µl) | 1 µl |
| Template (ca.1 bis 200 ng/µl) | 1 µl |
| dH ₂ O (aqua ad iniectabilia Delta Select) | 34 µl |
| Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes / NEB; Frankfurt/Main) | 1 µl |
| | 50 µl |

Tabelle 2-8: Standard-PCR-Programm mit der Phusion Polymerase

| Reagenz | Temperatur | Zeit | Zyklen |
|---------------------------------------|------------|---------|-------------|
| 1. Denaturierung der DNA | 98 °C | 2 min | (Hot Start) |
| 2. Denaturierung der DNA | 98 °C | 0,5 min | 30 x |
| 3. Hybridisierung der Oligonukleotide | 55 °C | 1 min | |
| 4. Synthese des Komplementärstranges | 72 °C | 2 min | |
| 5. nach letztem Zyklus | 72 °C | 10 min | |
| 6. Beendigung des Programmes | 4 °C | ~ | |

Tabelle 2-9: Standard-PCR-Ansatz mit der Hot FirePol® Polymerase (Solis Biodyne)

| Reagenz | Volumen |
|---|--------------|
| 10 x Solis Buffer B | 5 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 5 µl |
| dNTP (10 mM von jedem der vier dNTPs) | 2 µl |
| Sense-Primer (10 pmol/µl) | 2 µl |
| Antisense-Primer (10 pmol/µl) | 2 µl |
| Template (ca.1 bis 200 ng/µl) | 2 µl |
| dH ₂ O (aqua ad iniectabilia Delta Select) | 28,5 µl |
| Hot FirePol® Polymerase, 5 U/µl (Solis Biodyne, Tartu, Estonia) | 0,5 µl |
| | 50 µl |

Alternativ wurden auch 25 µl-PCR-Ansätze verwendet, bei denen das Volumen aller Reagenzien halbiert wurde.

Tabelle 2-10: Standard-PCR-Programm mit der Hot FirePol® Polymerase

| Reagenz | Temperatur | Zeit | Zyklen |
|---------------------------------------|------------|-------|--------|
| 1. Denaturierung der DNA | 94 °C | 3 min | |
| 2. Denaturierung der DNA | 94 °C | 1 min | 30 x |
| 3. Hybridisierung der Oligonukleotide | 55 °C | 1 min | |
| 4. Synthese des Komplementärstranges | 74 °C | 1 min | |
| 5. nach letztem Zyklus | 74 °C | 7 min | |
| 6. Beendigung des Programmes | 4 °C | ~ | |

2.10.1 Duplex-PCR

Die Duplex-PCR wurde mit den zwei Primerpaaren 145/146 (*pbicp*) und 66/67 (*pbtubulin*) durchgeführt. Der 50 μ l-Ansatz enthielt 5 pmol von jedem der vier Oligonukleotide (4 μ l Oligonukleotidlösung) und dementsprechend jeweils 1 μ l (5 pmol) weniger Oligonukleotidlösung als der standardmäßige PCR-Ansatz. Ansonsten erfolgte die PCR mit der DNA-Polymerase Hot FirePol[®] (Solis Biodyne, Tartu, Estonia) unter den beschriebenen Bedingungen.

2.11 Agarosegelelektrophorese

Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Je nach erwarteten Fragmentgrößen wurde ein 1%iges bis 2%iges Agarosegel hergestellt und 5 μ l eines entsprechenden Größenstandard mit auf das Gel aufgetragen. Die Agarose (Gibco BRL, Eggenstein) wurde in TBE-Puffer oder TAE-Puffer aufgekocht und mit 0,1 μ g/ml Ethidiumbromid (Biomol, Hamburg) versetzt. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer bzw. TAE-Puffer verwendet. Als Größenmarker wurden HyperLadder I (200 bis 10.000 bp) oder HyperLadder IV (100 bis 1000 bp; Bionline, Luckenwalde) verwendet. Je nach Gelgröße wurde für 20 bis 45 Minuten eine Spannung von 80 bis 110 V angelegt. Die DNA-Banden wurden durch das interkalierte Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

DNA-Ladepuffer (6x)

| | |
|---|--------------|
| Bromphenolblau-Natriumsalz (Merck, Darmstadt) | 0,25 % (w/v) |
| Xylene Cyanol FF (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) | 0,25 % (w/v) |
| Glycerol (Biomol, Hamburg) | 60 % (v/v) |

Im 1%igen Agarosegel, läuft Bromphenolblau wie ein 300 bp-Fragment, während Xylene Cyanol FF sich wie ein 4000 bp-Fragment verhält.

TBE-Puffer (10x)

| | |
|------------------------------------|-------------|
| Tris (Biomol, Hamburg) | 0,89 M |
| Borsäure (Roth, Karlsruhe) | 0,89 M |
| EDTA-Natriumsalz (Biomol, Hamburg) | 25 mM |
| | → pH-Wert 8 |

TAE-Puffer (10x)

| | |
|------------------------------------|-------------|
| Tris (Biomol, Hamburg) | 0,4 M |
| Natriumacetat (Biomol, Hamburg) | 0,2 M |
| EDTA-Natriumsalz (Biomol, Hamburg) | 0,01M |
| | → pH-Wert 8 |

2.12 Herstellung kompetenter *E. coli*

Es wurde eine 5 ml-Übernacht-Kultur der *E. coli*-Bakterien angesetzt (5 ml LB-Medium: für BL21 (DE3) pAPIacI^Q mit 50 µg/ml Kanamycin; für BL21 Rig mit 34 µg/ml Chloramphenicol; für XL10-GOLD ohne Antibiotikum). Am nächsten Morgen wurde eine 100ml-Kultur mit 1 ml Übernacht-Kultur angeimpft. Wenn eine Zelldichte mit einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 erreicht war, wurden die Bakterien durch fünfminütige Zentrifugation bei 800 x g und 4 °C sedimentiert. Das Sediment wurde in 30 ml eiskaltem Tfb1-Puffer resuspendiert, für 1,5 Stunden auf Eis inkubiert und gelegentlich vorsichtig gemischt. Anschließend wurden die Bakterien erneut bei 4 °C zentrifugiert, in 5 ml eiskaltem Tfb2-Puffer aufgenommen und im Kühlraum in 50 bis 100 µl Fraktionen aufgeteilt. Danach wurden die kompetenten Bakterien sofort in Trockeneis/Ethanol schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -70 °C gelagert.

LB-Medium (Luria-Bertani Medium)

LB-Broth (Roth, Karlsruhe) 20 g/L in dH₂O → Autoklavieren

Kanamycin-Stocklösung (1000x)

Kanamycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 50 mg/ml in dH₂O

Chloramphenicol-Stocklösung (1000x)

Chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 34 mg/ml in dH₂O

Tfb1-Puffer

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Essigsäure (Roth, Karlsruhe) | 30 mM |
| MnCl ₂ (Roth, Karlsruhe) | 50 mM |
| KCl (Roth, Karlsruhe) | 100 mM |
| CaCl ₂ (Roth, Karlsruhe) | 10 mM |
| Glycerin (Biomol, Hamburg) | 15 % |

Tfb2-Puffer

| | |
|-------------------------------------|----------|
| MOPS/NaOH (Sigma, Steinheim) | 10 mM |
| CaCl ₂ (Roth, Karlsruhe) | 75 mM |
| KCl (Roth, Karlsruhe) | 10 mM |
| Glycerin (Biomol, Hamburg) | 15 % |
| | → pH 7.0 |

2.13 Klonierungen

Für die Klonierungen wurden folgende Einzelschritte durchgeführt:

- RNA-Isolation und Reverse Transkription (siehe 2.3 und 2.9) oder Präparation des Plasmid-Templates (siehe 2.16)
- PCR (siehe 2.10) und Präparation der Vektoren (siehe 2.15)
- Aufreinigung der PCR-Produkte (bei Plasmid-Templates anschließend DpnI-Verdau, siehe 2.13.1)
- Restriktion und Aufreinigung von PCR-Produkten und Vektoren (siehe 2.13.2 und 2.13.3)
- Ligation (siehe 2.13.4)
- Transformation in *E. coli* (siehe 2.14)
- Plasmidpräparation (siehe 2.16)
- analytische Restriktion (Restriktion von etwa 1 µg Plasmid mit geeigneten Restriktionsenzymen und Analyse im Agarosegel) und Sequenzierung (siehe 2.17)

Eine Übersicht über die verwendeten Primer und Vektoren befindet sich in Abschnitt 2.13.5).

2.13.1 DpnI-Restriktion

Plasmid-Templates wurden nach der PCR in dem Reaktionsansatz durch Restriktion mit DpnI (1 µl DpnI pro 50 µl Reaktionsansatz, 37 °C, 1 h) zerstört.

2.13.2 Aufreinigung von DNA (PCR-Produkte, Plasmide)

DNA-Fragmente wurden mit dem Kit NucleoSpin® Extract (Macherey-Nagel, Düren) nach der Vorschrift des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurde die DNA-Ausbeute mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.13.3 DNA-Restriktion (PCR-Produkte, Plasmide)

Gereinigte Plasmide und PCR-Produkte wurden jeweils in 20 µl-Reaktionsansätzen mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Die Durchführung erfolgte im Puffer des Herstellers und je nach Restriktionsenzym in An- oder Abwesenheit von 1 mg/ml BSA (NEB) für ungefähr eine Stunde im Wasserbad bei 37 °C.

Wenn der Vektor nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurde, dephosphorylierte man den Vektor durch Inkubation mit einer Phosphatase (CIP, NEB) nach Herstellerangaben für eine Stunde bei 37 °C.

Nach der Restriktion wurden die Plasmide und PCR-Produkte mit dem Kit NucleoSpin® Extract aufgereinigt.

2.13.4 DNA-Ligation

Die geschnittenen Vektoren und PCR-Produkte wurden im molaren Verhältnis von 1:3 im 10 µl-Ansatz zusammengegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 400 U einer T4-DNA-Ligase (1 µl der 400000 U/mL-Lösung; New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) im zugehörigen Ligationspuffer inkubiert. Es wurden zwischen 100 und 300 ng Vektor-DNA für die Ligation eingesetzt und die zugehörige Insertmenge mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{100 \text{ bis } 300 \text{ ng Vektor} * \dots \text{ kb Insert} * 3}{\dots \text{ kb Vektor}} = \text{benötigte Insertmenge [ng]}$$

Im direkten Anschluss an die Ligation erfolgte die Transformation kompetenter XLGold *E.coli*-Bakterien (siehe 2.14). Bei Bedarf wurde der Ligationserfolg überprüft, indem 5 µl des Ligationsansatzes mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.11) analysiert wurden.

2.13.5 Übersicht über die verwendeten Vektoren und Primer

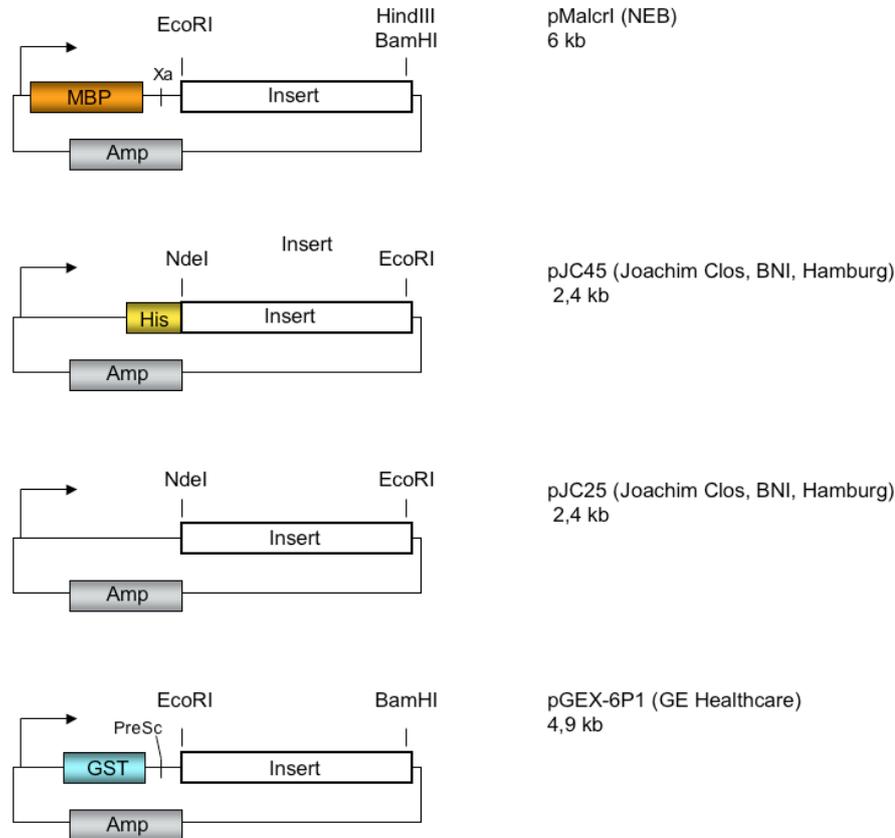


Abbildung 2-2: Bakterielle Expressionsplasmide

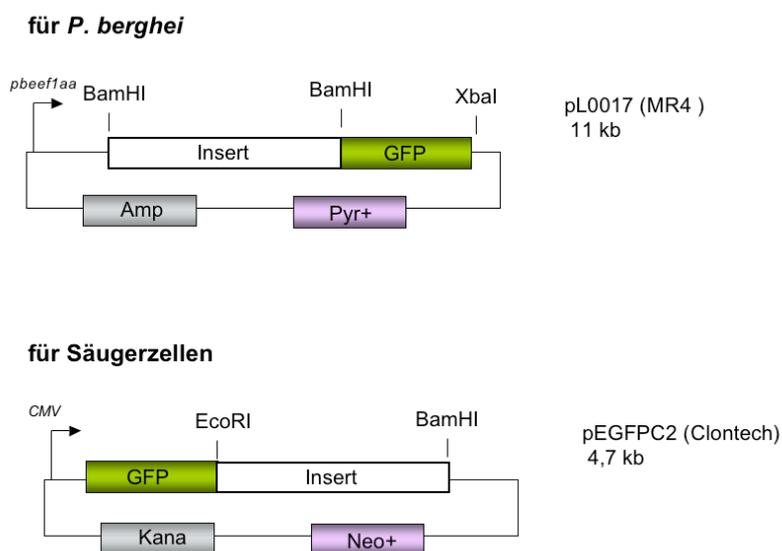


Abbildung 2-3: Eukaryotische Expressionsplasmide

Tabelle 2-11: Übersicht über Primer und Plasmid-Konstrukte

| Konstrukt | Primer | Primerbeschreibung | Primersequenz |
|--|---------|--|---|
| pMalcrl-PbiCP (Volllänge) | 492 | EcoRI | GG GAAATTC GAAGATAACGACATATACTCTTTTGATATC |
| | 588 | HindIII mit Stopcodon | CCC AAGCTT TTA TTGGACAGTCACGTATATAAT |
| pMalcrl-PbiCP-C ^{Ks} | 1168 | EcoRI | CGTCGT GAAATTC AAAAGCAATTTAGAAGAAAAAC |
| | 588 | HindIII mit Stopcodon | CCC AAGCTT TTA TTGGACAGTCACGTATATAAT |
| pMalcrl-PbiCP-C ^{GDEK} | 597 | EcoRI | TT GAAATTC GGAGATGAAAAATGTGGTAAATCA |
| | 598 | BamHI mit Stopcodon | TT GGATCC TTA TTGGACAGTCACGTATATAAT |
| pMalcrl-PbiCP -N „lang“ | 492 | EcoRI | GG GAAATTC GAAGATAACGACATATACTCTTTTGATATC |
| | 494 | BamHI | TT GGATCC AGTCAATTCATATTTACTATCAACCTTTACCA |
| pMalcrl-PbiCP -N „kurz“ | 492 | EcoRI | GG GAAATTC GAAGATAACGACATATACTCTTTTGATATC |
| | 493 | BamHI | TT GGATCC TGGTTAAATGAGTTGTATGAAGTAGTTGGG |
| pJC45-PbiCP-C ^{GDEK} | 344 | NdeI | TT CATATG GGAGATGAAAAATGTGGTAAATCA |
| | 345 | EcoRI mit Stopcodon | TT GAAATTC TTA TTGGACAGTCACGTATATAAT |
| pJC25-PbiCP-C ^{GDEK} | 344/345 | siehe oben | siehe oben |
| pJC25-PbiCP-C ^{Ks} | 1088 | NdeI | CGTCGT CATATG AAAAGCAATTTAGAAGAAAAAC |
| | 345 | EcoRI mit Stopcodon | TT GAAATTC TTA TTGGACAGTCACGTATATAAT |
| pGEX-6P1-PbiCP-C ^{GDEK} | 346 | BamHI | CTG GGATCC GGAGATGAAAAATGTGGTAAATCA |
| | 345 | EcoRI mit Stopcodon | TT GAAATTC TTA TTGGACAGTCACGTATATAAT |
| pGEX-6P1-PbiCP-C ^{GDEK} (del) | 631 | Glycinlinker | GGGGGGGGG AGTGATTTAAACCCCAAGAAAAACCCCAATG |
| | 649 | 5'-Phosphorylierung | Phosp.-CTGAGTAAACAGAAATTTCTTCGAAAAAAATGA |
| pGEX-6P1-PbiCP-C ^{GDEK} L2mut (QuickChange™-Mutagenese) | 629 | Punktmutagenese | TTATGTATTGACCTCGAAGGAAAT CCTACT ACTGGATATTTATG GGTATTATTAGGA |
| | 630 | Punktmutagenese | TCCTAATAATACCCATAAATATCCAGT AGTAGG ATTCCTCGAGGTCATACATAA |
| pL0017-PbiCP (Volllänge mit Signalpeptid) | 595 | BamHI mit Startcodon | CTG GGATCC ATGAAAAGTATAACTTTTTTCGTGTTTAAAT |
| | 596 | BamHI | CTG GGATCC TTGGACAGTCACGTATATAATTTAGTGTT |
| pL0017-PbiCP-C ^{Ks} (Deletionsmutagenese) | 1033 | Deletionsmutagenese | TTCACAAATGTGATAAAAAGGGCTAGGATGG |
| | 1035 | Deletionsmutagenese, 5'-Phosphorylierung | Phosp.- AAAAGCAATTTAGAAGAAAAACACACAATG |
| pEGFP2-PbiCP-C ^{GDEK} | 597 | EcoRI | TT GAAATTC GGAGATGAAAAATGTGGTAAATCA |
| | 598 | BamHI mit Stopcodon | TT GGATCC TTA TTGGACAGTCACGTATATAAT |
| pEGFP2-PbiCP-C ^{Ks} | 1112 | EcoRI | AT GAAATTC AAAAGCAATTTAGAAGAAAAACACACAATG |
| | 598 | BamHI mit Stopcodon | TT GGATCC TTA TTGGACAGTCACGTATATAAT |
| PbiCP-Nachweis (Duplex-PCR) | 146 | PbiCP-Nachweis | ATGCTCCATCCCTAGCCCTTT |
| | 145 | | CCACTTTCATTCAATTTGTTGTT |

2.14 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli*-Bakterien wurden mittels Hitzeschock transformiert. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, etwa 100 ng Plasmid-DNA oder 5 µl eines Ligationsansatzes (siehe 2.13.4) in die Bakteriensuspension gegeben und die Ansätze 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 60 Sekunden (XL Gold) oder 45 Sekunden (BL21) bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt, kurz auf Eis abgekühlt und mit 800 µl vorgewärmten SOC-Medium versetzt. Danach wurden die Bakterien eine Stunde bei 37 °C im Thermomixer geschüttelt, auf LB-Selektionsplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Um Plasmide zu vervielfältigen und nach Ligationen wurden XL-Gold *E. coli* transformiert, die keine eigene Antibiotikaresistenz besaßen und somit nur die Resistenz der Plasmide berücksichtigt wurde. Für Proteinexpressionen wurden BL21 (DE3) pAPlacI^Q (pJC-Plasmide) oder BL21 Rig (pMalcrl-Plasmide, pGEX-6P1-Plasmide) mit einer Kanamycinresistenz (BL21 (DE3) pAPlacI^Q) oder einer Chloramphenicolresistenz (BL21 Rig) verwendet. Hier wurden sowohl die Resistenzgene der Plasmide als auch die Resistenz der Bakterien ausgenutzt und daher zwei Antibiotika verwendet.

SOC-Medium

| | | |
|-------------------------------------|--------|----------------------|
| Trypton (Biomol, Hamburg) | 2 % | } → Autoklavieren |
| Hefeextrakt (Biomol, Hamburg) | 0,5 % | |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 10 mM | |
| KCl (Roth, Karlsruhe) | 2,5 mM | |
| MgCl ₂ (Roth, Karlsruhe) | 5 mM | } → Sterilfiltrieren |
| MgSO ₄ (Roth, Karlsruhe) | 5 mM | |
| Glucose (Roth, Karlsruhe) | 0,4 % | |

Ampicillin-Stocklösung (1000x)

Ampicillin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 100 mg/ml in dH₂O
(einen Tropfen NaOH hinzufügen zum Lösen)
Langzeitlagerung bei -20 °C

Kanamycin-Stocklösung (1000x)

Kanamycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 50 mg/mL in dH₂O
Langzeitlagerung bei -20 °C

Chloramphenicol-Stocklösung (1000x)

Chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 34 mg/mL in Ethanol
Langzeitlagerung bei -20 °C

LB-Selektionsplatten für transformierte Bakterien

LB-Agar (Roth, Karlsruhe) 35 g/L in dH₂O → Autoklavieren
Antibiotika (1x) in den handwarmen, noch flüssigen Agar geben,
Platten gießen

2.15 Plasmid-DNA-Gewinnung in großem Maßstab

Allgemeine Vektoren und Transfektionsplasmide wurden in großem Maßstab mit dem Nucleobond[®] Plasmid PC100 (Macherey-Nagel, Düren) isoliert. XL-Gold *E. coli* wurden transformiert, über Nacht auf Selektionsagarplatten angezogen, am Folgetag ein Klon in 50 bis 100 ml LB-Selektionsmedium überführt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am Folgetag wurden die Bakterien sedimentiert und nach Herstellerangaben die Plasmide isoliert.

2.16 Plasmid-DNA-Gewinnung in kleinem Maßstab

2.16.1 Plasmidpräparation mit Glasmilch (für Transformationen)

XL-Gold *E. coli* wurden transformiert, über Nacht auf Selektionsagarplatten inkubiert, am Folgetag Klone in jeweils 5 ml LB-Selektionsmedium überführt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am Folgetag wurden 4 ml der Übernachtskultur für 30 Sekunden bei 11.000 x g zentrifugiert und das Bakteriensediment in 250 µl STET-Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden 10 Minuten mit 10 µl Lysozym-Stocklösung auf Eis inkubiert und anschließend für 1,5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Das erhaltene Bakterienlysat wurde 3 Minuten auf Eis gekühlt und für 15 Minuten bei 12.000 x g (Raumtemperatur) zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 500 µl einer 6 M NaI-Lösung und 10 µl Glasmilchsuspension gegeben und die Lösung für 5 Minuten bei 37 °C leicht geschüttelt (DNA-Bindung an die Glasmilch). Die Suspension wurde für 1 Minute bei 12.000 x g (Raumtemperatur) zentrifugiert und das Glasmilchsediment mit 1 ml *New Wash*-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Glasmilchsediment für 5 Minuten bei 56 °C erwärmt, um Ethanolrückstände zu beseitigen. Die Sediemnt wurde in 50 µl DNase-freiem dH₂O (aqua ad iniectionabilia Delta Select; Delta Select GmbH, Pfullingen) resuspendiert und erneut für 5 Minuten bei 56 °C inkubiert, um die Plasmid-DNA von den Glasmilchpartikeln zu lösen. Die Glasmilchpartikel wurde sedimentiert und die DNA-Konzentration im Überstand photometrisch bestimmt (siehe 2.8). Die DNA-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

Lysozym-Stocklösung

Lysozym (Muraminidase from hen egg white; Roche Diagnostics, Mannheim) 10 mg/ml in dH₂O

Glasmilch-Suspension

30 g Siliciumoxid (Sigma, Steinheim) in 250 ml dH₂O aufschwemmen, mehrere Stunden rühren, über Nacht bei Raumtemperatur sedimentieren lassen, anschließend 220 ml des Überstandes absaugen, Zugabe von 300 µl 37%iger Salzsäure, aliquotieren und anschließend autoklavieren
Langzeitlagerung bei 4 °C

NaI-Lösung (6 M)

NaI (Roth, Karlsruhe)

89,6 g in 100 ml dH₂O

Lagerung bei 4 °C unter Lichtausschluss

STET-Puffer*

| | |
|--|-------------|
| Saccharose (Sigma, Steinheim) | 8 % |
| Tris-HCl (Biomol, Hamburg) | 50 mM |
| EDTA-Natriumsalz (Ethylendiamintetraessigsäure; Biomol, Hamburg) | 1 mM |
| Triton X-100 (Sigma, Steinheim) | 5 % |
| | → pH-Wert 8 |

New Wash-Puffer*

| | |
|--|---------------|
| Ethanol (Roth, Karlsruhe) | 50 % |
| EDTA-Natriumsalz (Ethylendiamintetraessigsäure; Biomol, Hamburg) | 5 mM |
| Tris-HCl (Biomol, Hamburg) | 5 mM |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 50 mM |
| | → pH-Wert 7,5 |

* Langzeitlagerung bei -20 °C, für mehrere Monate bei 4 °C haltbar

2.16.2 Plasmidpräparation mit Kit (für Sequenzierungen)

Für Sequenzierungen wurden die Plasmide mit dem Kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Düren) isoliert. Es wurden vergleichbare DNA-Ausbeuten wie bei der Präparation mit Glasmilch erhalten; allerdings besaßen die DNA-Lösungen kaum Proteinverunreinigungen (OD₂₆₀/OD₂₈₀-Werte bei ca. 1,8).

2.17 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden bei AGOWA GmbH (Berlin) in Auftrag gegeben.

2.18 Proteinexpression in *E. coli*

Die Plasmide, die für das gewünschte rekombinante Protein kodierten, wurden in BL21 *E. coli* Bakterien transformiert (siehe 2.14). Am Folgetag nach der Transformation wurden von den auf der Selektionsplatte gewachsenen Bakterien Flüssigkulturen (LB-Medium, Roth; autoklaviert) mit den entsprechenden Antibiotika angesetzt und bei 37 °C geschüttelt. Für analytische Zwecke wurde ein Klon pro Ansatz in 10 ml vorgewärmtes LB-Selektionsmedium überführt. Für Präparationszwecke wurde je nach Bedarf mit einem Flüssigkeitsvolumen von 250 ml bis 6 L gearbeitet und viele Klone vereinigt. In der Wachstumsphase (OD₆₀₀ zwischen 0,3 und 0,8) wurden die Bakterien für 2 Stunden mit 1 mM des Induktors IPTG inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend bei 3000 x g, 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert und die Sedimente bis zur Proteinaufreinigung (siehe 2.21 oder 2.24) bei -20 °C gelagert. Vor und nach der Induktion wurden zwischen 2 und 10 ml der Bakteriensuspension für eine SDS-PAGE-Analyse (siehe 2.19) abgenommen. Die Bakterien wurden bei 11.000 x g und 30 Sekunden sedimentiert und je nach Sedimentgröße in 50 bis 300 µl Laemmli-Puffer (siehe 2.19) resuspendiert. Um zu

überprüfen, ob sich die rekombinanten Proteine in der löslichen oder unlöslichen Fraktion der Bakterienlysate befanden, wurden die nach der Induktion abgenommenen Proben nach der Sedimentation in 100 bis 300 μ l PBS aufgenommen und die Bakterien durch dreimaliges, 10 Sekunden langes Sonifizieren bei Stärke 2 (Sonifer 250, Branson, Dietzenbach) aufgeschlossen. Anschließend wurden die Lysate bei 13.000 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde im Verhältnis von 1:1 in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen; das Sediment mit den Zelltrümmern wurde je nach Größe in 0,5 bis 1 ml Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und die enthaltene DNA durch erneutes Sonifizieren zerkleinert. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE (siehe 2.19) analysiert.

IPTG-Stocklösung (1000x)

Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (Biomol, Hamburg) 1 M in autoklaviertem dH₂O

2.19 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden im diskontinuierlichen System unter denaturierenden Bedingungen als SDS-Protein-Komplexe in Abhängigkeit von ihrer molekularen Masse elektrophoretisch aufgetrennt. Für die rekombinanten Proteine wurden in der Regel 12%ige Acrylamid-Trenngelle verwendet. Die Proben wurden im Volumenverhältnis von 1:1 mit Laemmli-Probenpuffer (2x) versetzt und vor dem Beladen des Gels 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte im Laufpuffer bei 25 mA pro Gel. Als Größenmarker wurde der PageRuler™ Protein Ladder (10 bis 200 kDa, MBI-Fermentas, St.-Leon-Rot) verwendet.

Laemmli-Probenpuffer (2x)

| | |
|---|---------------|
| Tris-HCl (Biomol, Hamburg) | 125 mM |
| SDS (Biomol, Hamburg) | 2 % (w/v) |
| Glycerol (Biomol, Hamburg) | 20 % (v/v) |
| DTT (Dithiothreitol; Biomol, Hamburg) | 20 mM |
| Bromphenolblau-Natriumsalz (Merck, Darmstadt) | 0,001 % (w/v) |
| | → pH-Wert 6,8 |

Laufpuffer (10x)

| | |
|---|-----------|
| Tris (Biomol, Hamburg) | 0,25 M |
| Glycin (Biomol, Hamburg) | 0,5 M |
| SDS (Natriumdodecylsulfat; Biomol, Hamburg) | 1 % (w/v) |

Trenngelpuffer (4x)

| | |
|---|---------------|
| Tris-HCl (Biomol, Hamburg) | 1,5 M |
| SDS (Natriumdodecylsulfat; Biomol, Hamburg) | 0,4 % (w/v) |
| | → pH-Wert 8,8 |

Sammelgelpuffer (4x)

| | |
|--|---------------|
| Tris-HCl (Biomol, Hamburg) | 0,5 M |
| SDS (Natriumdodecylsulfat Biomol, Hamburg) | 0,4 % (w/v) |
| | → pH-Wert 6,8 |

APS-Stocklösung

APS (Ammoniumpersulfat; Biomol, Hamburg) 25 % (w/v)
 Langzeitlagerung bei -20 °C, für einige Tage bei 4 °C haltbar

Tabelle 2-12: Pipettierschema für zwei Sammel- und zwei 12%ige Trenngele

| Reagenz | Sammelgel | Trenngel (12 %) |
|----------------------------------|-----------|-----------------|
| Gelpuffer (4x) s.o. | 1,25 ml | 2,5 ml |
| 30 % Acrylamid (Biomol, Hamburg) | 650 µl | 4,0 ml |
| dH ₂ O | 3,05 ml | 3,4 ml |
| 25 % APS-Stocklösung | 25 µl | 50 µl |
| TMED* (Biomol, Hamburg) | 5 µl | 5 µl |

*N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

**Acrylamidgelkammer Hoefer Mighty Small II, Amersham Biosciences, Freiburg

2.20 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Proteingele wurden mindestens eine Stunde oder über Nacht unter leichtem Schütteln in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Anschließend wurden sie ebenfalls unter leichtem Schütteln in Entfärberlösung inkubiert, bis nur noch die Proteinbanden blau angefärbt waren. Die Gele wurden mit destilliertem Wasser gewaschen und in Cellophanfolie getrocknet.

Coomassie-Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma, Steinheim) 0,1 % (w/v)
 Methanol (Roth, Karlsruhe) 40 % (v/v)
 Essigsäure (Roth, Karlsruhe) 10 % (v/v)

Entfärberlösung

Methanol (Roth, Karlsruhe) 20 % (v/v)
 Essigsäure (Roth, Karlsruhe) 10 % (v/v)

2.21 Affinitätschromatographische Proteinaufreinigungen

Die rekombinanten His-Fusionsproteine wurden in BL21 (DE3) pAPIacl^Q exprimiert, die MBP- und GST-Fusionsproteine in BL21 Rig (siehe 2.18). Das Volumen der Kultur betrug 10 ml bis 6 L, je nach Anwendungszweck. Die Bakterien wurden sedimentiert (15 Minuten, 300 g, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet im entsprechenden Lysepuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Bakterien durch mehrmaliges, 20 Sekunden langes Sonifizieren bei Stärke 3 (Sonifer 250, Branson, Dietzenbach) aufgeschlossen und für 30 Minuten bei 10.000 x g (4 °C) zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen. Die Fusionsproteine in der löslichen Fraktion des Lysats wurden bei 4 °C für ungefähr 1 Stunde auf einem Laborroller mit den entsprechenden Affinitätsmatrix-Partikeln inkubiert (Ni-NTA-Partikel für His, Glutathion-Sepharose-Partikel für GST, Amylose-Partikel für MBP). Die Suspension wurde in eine Säule (Propylene Columns, Qiagen, Hilden) überführt, in der die Partikel durch einen Filter zurückgehalten wurden. Die Partikel wurden fünfmal mit 20 ml von jedem Waschpuffer gewaschen. Gegebenenfalls wurde der Durchlauf und die erste Waschfraktion für spätere Analysen aufgefangen. Anschließend wurden die Proteine in Fraktionen (0,5 ml bis 1 ml) mit den Elutionspuffern eluiert. Die erhaltenen Proteinlösungen wurden bei -20 °C gelagert. Nur die für die Kristallisation hergestellten Fraktionen von His-PbICP-C^{GDEK} wurden bei 4 °C gelagert, da das Protein bei hohen Konzentrationen (> 1,5 mg/ml) ausfiel.

2.21.1 His₁₀-Fusionsproteinaufreinigung unter nativen Bedingungen

Für 1 L Bakterienkultur wurden etwa 600 µl der Ni-NTA-Partikelsuspension (Ni-NTA-Superflow; Qiagen, Hilden) verwendet. Vor der Inkubation mit der löslichen Fraktion des Bakterienlysates wurden die Ni-NTA-Partikel dreimal mit 10 ml Lysepuffer gewaschen. Die imidazolhaltigen Puffer wurden im Dunkeln gelagert.

Lysepuffer

| | |
|--|---------------|
| NaH ₂ PO ₄ (Roth, Karlsruhe) | 50 mM |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 300 mM |
| Imidazol (Sigma, Steinheim) | 10 mM |
| | → pH-Wert 8,0 |

Waschpuffer 1

| | |
|--|---------------|
| NaH ₂ PO ₄ (Roth, Karlsruhe) | 50 mM |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 300 mM |
| Imidazol (Sigma, Steinheim) | 20 mM |
| | → pH-Wert 8,0 |

Waschpuffer 2 (stringent)

| | |
|--|---------------|
| NaH ₂ PO ₄ (Roth, Karlsruhe) | 50 mM |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 2 M |
| Imidazol (Sigma, Steinheim) | 50 mM |
| | → pH-Wert 8,0 |

Elutionspuffer

| | |
|--|---------------|
| NaH ₂ PO ₄ (Roth, Karlsruhe) | 50 mM |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 300 mM |
| Imidazol (Sigma, Steinheim) | 250 mM |
| | → pH-Wert 8,0 |

2.21.2 GST-Fusionsproteinaufreinigung unter nativen Bedingungen

Für 1 L Bakterienkultur wurden etwa 600 µl der Glutathion-Agarose-Partikelsuspension (Glutathione-Agarose, Sigma, Steinheim) verwendet. Vor der Inkubation mit der löslichen Fraktion des Bakterienlysates wurden die Glutathion-Agarose-Partikel dreimal mit 10 ml Lysepuffer gewaschen.

Lyse- und Waschpuffer

| | |
|---------------------------------|--------------------|
| Triton X-100 (Sigma, Steinheim) | 1 % |
| Tween-20 (Sigma, Steinheim) | 1 % |
| | in PBS (siehe 2.2) |

Elutionspuffer

| | |
|---|--|
| Glutathion, reduziert (Roth, Karlsruhe) | 10 mM (frisch zugeben, event. mit DTT versetzen) |
| Tris-HCl (Biomol, Hamburg) | 50 mM |
| | → pH-Wert 9,5 |

2.21.3 MBP-Fusionsproteinaufreinigung unter nativen Bedingungen

Für 1 L Bakterienkultur wurden etwa 600 µl der Amylose-Partikelsuspension (Amylose-Resin, NEB, Frankfurt a.M.) verwendet. Vor der Inkubation mit der löslichen Fraktion des Bakterienlysates wurden die Amylose-Partikel dreimal mit 10 ml Lysepuffer gewaschen.

Lysepuffer und Waschpuffer 1

| | |
|----------------------------|---------------|
| Tris-HCl (Biomol, Hamburg) | 20 mM |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 200 mM |
| EDTA (Sigma, Steinheim) | 1 mM |
| | → pH-Wert 7,4 |

Waschpuffer 2

| | |
|----------------------------|---------------|
| Tris-HCl (Biomol, Hamburg) | 20 mM |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 2 M |
| EDTA (Sigma, Steinheim) | 1 mM |
| | → pH-Wert 7,4 |

Elutionspuffer

| | |
|----------------------------|---------------|
| Tris-HCl (Biomol, Hamburg) | 20 mM |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 200 mM |
| EDTA (Sigma, Steinheim) | 1 mM |
| Maltose (Roth, Karlsruhe) | 10 mM |
| | → pH-Wert 7,4 |

2.22 Dialyse der Proteinlösungen

Die Eluate der rekombinanten Proteine wurden in Dialyseschläuchen (Roth) mit einem MWCO-Wert (*molecular weight cut-off*) von 6 bis 8 kDa gegen ein mindestens 100faches Puffervolumen des gewünschten Puffers über Nacht bei 4 °C dialysiert. Nach den ersten 2 Stunden erfolgte ein Pufferwechsel.

2.23 Entfernung des MBP-Anhangs mit Faktor Xa

Der Fusionsanhang der MBP-Proteine (Vektor: pMalcri) wurde mit der Serinprotease Faktor Xa (NEB, Frankfurt a.M.) entfernt. Dafür wurden umgerechnet 50 µg Protein mit 1 µl Faktor Xa (1 mg/ml) in einem 100 µl Reaktionsansatz über Nacht bei Raumtemperatur verdaut. Die Proteine wurden anschließend gegen MonoQ Puffer A für eine chromatographische Aufreinigung dialysiert (siehe 2.22 und 2.24).

Faktor-Xa-Puffer

| | |
|-------------------------------------|---------------|
| Tris-Base (Biomol, Hamburg) | 20 mM |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 100 mM |
| CaCl ₂ (Roth, Karlsruhe) | 2mM |
| | → pH-Wert 8,0 |

2.24 Proteinaufreinigungen mittels Ionenaustauschchromatographie

Rekombinante Proteine ohne Anhang wurden über Nacht bei 4 °C in MonoQ-Puffer A dialysiert (siehe 2.22). Dabei handelte es sich entweder um PbICP-C^{GDEK} oder PbICP-C^{KS} (Vektor: pJC25, Ausgangsmaterial: Totallysate von Bakterien) oder um PbICP-Volllänge nach Abspaltung des MBP-Anhangs mit Faktor Xa (Vektor: pMalcri, Ausgangsmaterial siehe 2.23). Die dialysierten Proteinlösungen wurden auf eine Konzentration von 6 mg/ml eingestellt und 1 ml der Probe in eine MonoQ-Anionenaustauschersäule (Mono Q, HR 5/5 column, 0,5 x 50 mm, Pharmacia Biotech AB) injiziert, die zuvor mit MonoQ-Puffer A äquilibriert worden war. Als Laufpuffer diente MonoQ-Puffer A.

PbICP-Volllänge wurde in 0,5 ml-Fractionen bei einer MonoQ-Puffer B-Konzentration von 40 bis 45 % und einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert.

Tabelle 2-13: Gradient bei der Reinigung von PbICP-Volllänge über die Mono Q-Säule

| ml | 10 | 10 | 2 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 |
|--------------------|----|--------|---------|----|---------|----|----------|-----|
| MonoQ-Puffer B (%) | 0 | 0 - 40 | 40 - 45 | 45 | 45 - 50 | 50 | 50 - 100 | 100 |

PbICP-C^{GDEK} und PbICP-C^{KS} wurden in 0,5 ml-Fractionen bereits im Durchlauf (i.d.R. Fractionen 2 bis 7) aufgefangen, da auf diese Weise sehr saubere Fractionen erhalten wurden. Die restlichen Proteine im Bakterientotallysate wurden dagegen auf der Säule zurückgehalten und erst durch steigende MonoQ-Puffer B-Konzentrationen eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min.

Tabelle 2-14: Gradient bei der Reinigung von PbICP-C über die Mono Q-Säule

| ml | 12 | 15 |
|--------------------|----|---------|
| MonoQ-Puffer B (%) | 0 | 0 - 100 |

MonoQ-Puffer A

| | |
|------------------------------------|---|
| Tris-Base (Biomol, Hamburg) | 25 mM |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 25 mM |
| EDTA-Natriumsalz (Biomol, Hamburg) | 1 mM |
| | → pH-Wert 6,2 für PbICP-C ^{GDEK} , PbICP-C ^{KS} |
| | → pH-Wert 7,6 für PbICP-Volllänge/MBP |

MonoQ-Puffer B

| | |
|------------------------------------|---|
| Tris-Base (Biomol, Hamburg) | 25 mM |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 800 mM |
| EDTA-Natriumsalz (Biomol, Hamburg) | 1 mM |
| | → pH-Wert 6,2 für PbICP-C ^{GDEK} , PbICP-C ^{KS} |
| | → pH-Wert 7,6 für PbICP-Volllänge/MBP |

2.25 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem BCA-Protein-Assay Kit von Pierce (Rockford, USA) bestimmt. Dazu wurden in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Flachboden, unbeschichtet) Dreifachbestimmungen von zwei verschiedenen Verdünnungen der Proteinproben durchgeführt. 10 µl der Proteinproben wurden möglichst zeitgleich zu jeweils 200 µl des BCA-Assay-Reagenziengemisches gegeben. Als Standard dienten drei BSA-Eichreihen (2 mg/ml bis 0,03 mg/ml). Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C wurden die Farbreaktionen im ELISA-Reader bei 570 nm quantifiziert. Dabei mussten die Proteine in Lösungen vorliegen, die keine reduzierenden Substanzen (z.B. Glutathion, DTT) enthielten.

2.26 Inhibitorstudien

Die Enzymkinetiken wurden in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Flachboden, unbeschichtet) und in einem Endvolumen von 200 µl als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die verschiedenen Proteasen, ihre Substrate und die verwendeten Kinetikpuffer sind unten tabellarisch aufgelistet. Die Proteasen wurden jeweils in Anwesenheit des Inhibitors oder in Anwesenheit des Kontrollproteins (ohne Vorinkubation von Protease und Inhibitor/Kontrollprotein) mit dem entsprechenden p-Nitroanilin-Peptidylsubstrat bei Raumtemperatur inkubiert. Das freigesetzte p-Nitroanilin verursachte eine Gelbfärbung, die im Verlauf von einer Stunde nach Reaktionsstart bei 405 nm im ELISA-Reader alle 10 Sekunden quantifiziert wurde. Im Excel-Diagramm wurden die OD-Werte gegen die Zeit aufgetragen und die Steigungen ($\Delta E/\Delta t$) im linearen Bereich der Sättigungskurven bestimmt. Die Volumenaktivität der Proteasen wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\Delta E * V_{\text{Messlösung}}}{\Delta t * e * d * V_{\text{Protease}}} = \text{Volumenaktivität der Protease}$$

ΔE : Differenz von Messwert 2 – Messwert 1

$V_{\text{Messlösung}}$: Gesamtmenge pro *Well* = 0,2 ml

Δt : Zeitdifferenz zwischen Messwert 2 – Messwert 1 = 15 Sekunden

e : Extinktionskoeffizient von pNA; $8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

d : Küvettendicke / Höhe der Flüssigkeitssäule im *Well*; 0,6 cm

V_{Protease} : eingesetzte Enzymmenge (0,2 bis 0,05 µl für Papain, 3 µl für Cathepsin L, 1 µl bis 8 µl für Falcipain-2, 5 µl für Cathepsin B)

Die prozentualen Restaktivitäten der Proteasen wurden anschließend mit der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{Aktivität mit Inhibitor}}{\text{Aktivität mit Kontrollprotein}} \times 100 = \text{Restaktivität der Protease [\%]}$$

Die prozentualen Restaktivitäten der Proteasen wurden in Excel als Säulendiagramm dargestellt.

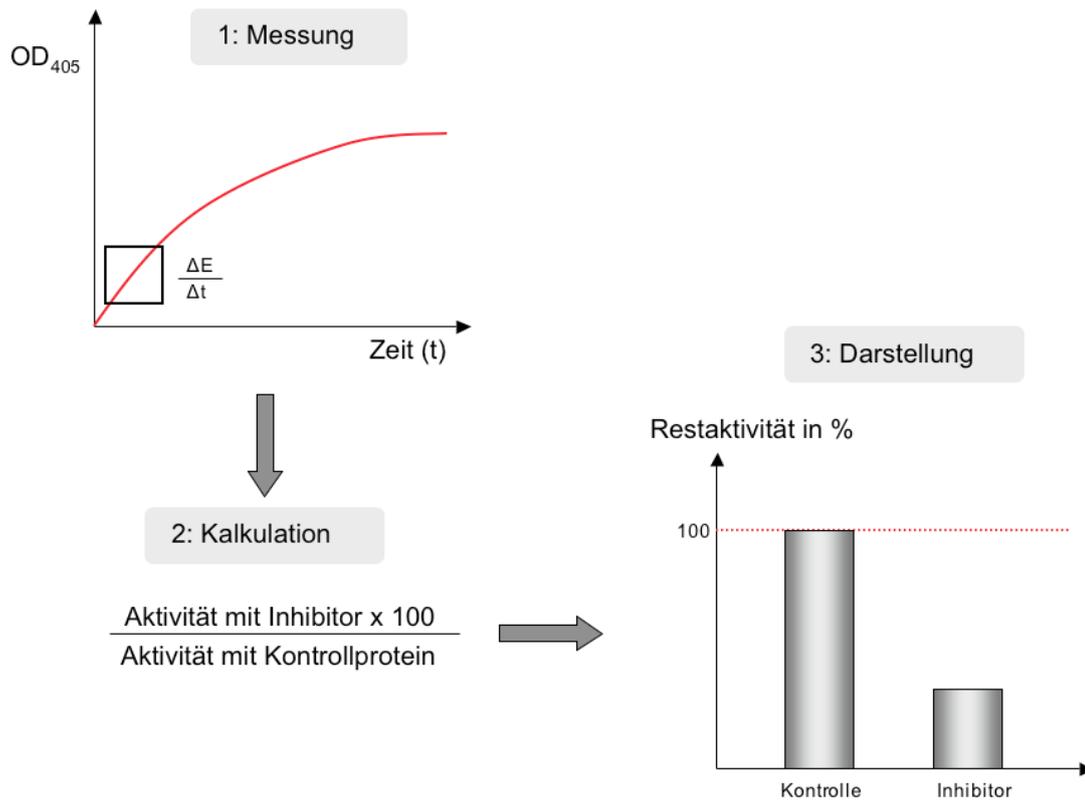


Abbildung 2-4: Übersicht über den Ablauf der Inhibitorstudien

Kinetikpuffer-1 (Cathepsin B)

KH₂PO₄ (Roth, Karlsruhe) 100 mM
 EDTA-Natriumsalz (Biomol, Hamburg) 2 mM
 DTT (Biomol, Hamburg) 10 mM immer frisch zugeben
 → pH-Wert 6,0

Kinetikpuffer-2 (Papain, Falcipain-2)

Natriumacetat (Roth, Karlsruhe) 100 mM
 DTT (Biomol, Hamburg) 10 mM immer frisch zugeben
 → pH-Wert 5,5

Kinetikpuffer-3 (Cathepsin L)

Natriumacetat (Roth, Karlsruhe) 100 mM
 DTT (Biomol, Hamburg) 1 mM immer frisch zugeben
 → pH-Wert 5,0

Tabelle 2-15: p-Nitroanilinpeptidyl-Substrate (BACHEM Biochemica, Heidelberg)

| Substrat | Stocklösung* | Konzentration im Ansatz | Protease |
|---------------|----------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| Z-Arg-Arg-pNA | 76 mM in Methanol | 600 μ M ** | Cathepsin B |
| Z-Phe-Arg-pNA | 82 mM in Methanol | 600 μ M ** | Cathepsin L Papain Falcipain-2 |

* Lagerung bei -20 °C

** Verdünnungen (1:10) der Stocklösungen für eine bessere Substratlöslichkeit in DMSO (Biomol, Hamburg) angesetzt

Tabelle 2-16: Cysteinproteasen

| Substrat | Stocklösung* | Stocklsg. im Ansatz | Puffer | Substrat |
|--|------------------------------|----------------------|--------|---------------|
| Papain (Sigma, Steinheim) | 50 U/ml in dH ₂ O | 0,05 bis 0,2 μ l | 2 | Z-Phe-Arg-pNA |
| Cathepsin B (Sigma, Steinheim) | 10 U/ml in Acetatpuffer** | 5 μ l | 1 | Z-Arg-Arg-pNA |
| Cathepsin L (V. Turk, Jozef Stefan Institute, Ljubljana) | 0,2 mg/ml | 3 μ l | 3 | Z-Phe-Arg-pNA |
| Falcipain-2 (K. Nagarajan, Universität Lübeck) | 0,5 bis 1 mg/ml | 1 bis 8 μ l | 2 | Z-Phe-Arg-pNA |

Lagerung bei -20 °C

**Acetatpuffer für die Cathepsin B-Stocklösung

| | |
|--|-------------|
| MgCl ₂ (Roth, Karlsruhe) | 0,5 mM |
| EDTA-Natriumsalz (Ethylendiamintetraessigsäure; Biomol, Hamburg) | 2 mM |
| Natrumacetat (Roth, Karlsruhe) | 50 mM |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 0,2 M |
| | → pH-Wert 5 |

2.27 Herstellung von Antiseren

Die Immunisierung der Mäuse wurde selbstständig durchgeführt, die Immunisierung der Kaninchen wurde bei Eurogentec S.A. (Seraing, Belgien) in Auftrag gegeben.

Für die Immunisierung der Mäuse wurde Freund's Adjuvant verwendet. Vor der intraperitonealen Verabreichung wurden die Proteinlösung (25 bis 50 μ g Protein in PBS, siehe 2.2) und das Adjuvant im Volumenverhältnis von 1:1 gemischt und so lange in einer Spritze durch wiederholtes Aufziehen homogenisiert, bis eine zähflüssige homogene Emulsion entstand. Es wurden Balb/c- und NMRI-Mäuse (Charles-River-Laboratory, Sulzfeld) verwendet. Für das Präimmenserum und für Antiserumproben wurden 10 bis 30 μ l Blut aus der Schwanzvene entnommen, die Blutzellen durch

Zentrifugation (3 Sekunden bei 11.000 x g oder 2 Minuten bei 2000 x g) sedimentiert und das Serum zur weiteren Verwendung abgenommen.

Der Ablauf war folgendermaßen:

- Präimmunserum abnehmen
- 1. Immunisierung: 25 bis 50 µg Protein in PBS 1:1 mit 50 bis 100 µl Freund's Adjuvant *complete* (Sigma, Steinheim)
- 2. Immunisierung nach 2 Wochen: 25 bis 50 µg Protein in PBS 1:1 mit 50 bis 100 µl Freund's Adjuvant *incomplete* (Sigma, Steinheim)
- nach einigen Tagen ca. 20 µl Blut aus der Schwanzvene abnehmen, Serum abnehmen und im ELISA/IFA/WB testen
- 3. Immunisierung nach 2 Wochen: 25 bis 50 µg Protein in PBS 1:1 mit 50 bis 100 µl Freund's Adjuvant *incomplete* (Sigma, Steinheim)
- nach einigen Tagen ca. 20 µl Blut aus der Schwanzvene abnehmen, Serum abnehmen und im ELISA/IFA/WB testen
- bei zufriedenstellenden Analyseergebnissen Gesamtblut durch Herzpunktion entnehmen, Serum isolieren, aliquotieren, 1 Aliquot bei 4 °C zur kurzfristigen Verwendung aufbewahren und restliche Aliquots in 50 % Glycerol (Biomol, Hamburg) bei -20 °C einfrieren

Die Spezifität der verwendeten Antiseren wurde überprüft, indem das entsprechende Präimmunserum in der jeweiligen Methode als Kontrolle verwendet wurde (siehe Abbildung 2-5 und Abbildung 2-6A). Zudem wurden teilweise in Immunfluoreszenzanalysen und Western Blot-Analysen Konkurrenzexperimente durchgeführt, bei denen das Antiserum in einem Kontrollansatz mit dem entsprechenden rekombinanten Antigen vorbehandelt wurde (siehe Abbildung 2-6C). Dafür wurden 1 µM Antigen in den entsprechenden Lösungen für die Antikörperverdünnungen (z.B. 2,5 % Milch/TBS-T bei Western Blot, 5 % FCS/PBS bei der Immunfluoreszenzanalyse) mit dem Antiserum für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Laborroller inkubiert. Gegebenenfalls wurden anschließend die Lösungen aufgefüllt, um auf das benötigte Volumen und die gewünschte Antiserumverdünnung zu kommen. Anschließend wurde das normale Western-Blot- oder Immunfluoreszenzanalyse-Protokoll befolgt. Die verwendeten Verdünnungen werden in Tabelle 2-17 aufgelistet. Zudem wurde die Spezifität der Domänen-spezifischen Antiseren im Western-Blot mit Hilfe der verschiedenen rekombinanten Proteine bestätigt (siehe Abbildung 2-7). Die Antiserum-basierten Lokalisationsstudien wurden durch die Lebendmikroskopie der PbICP-GFP exprimierenden Parasiten überprüft.

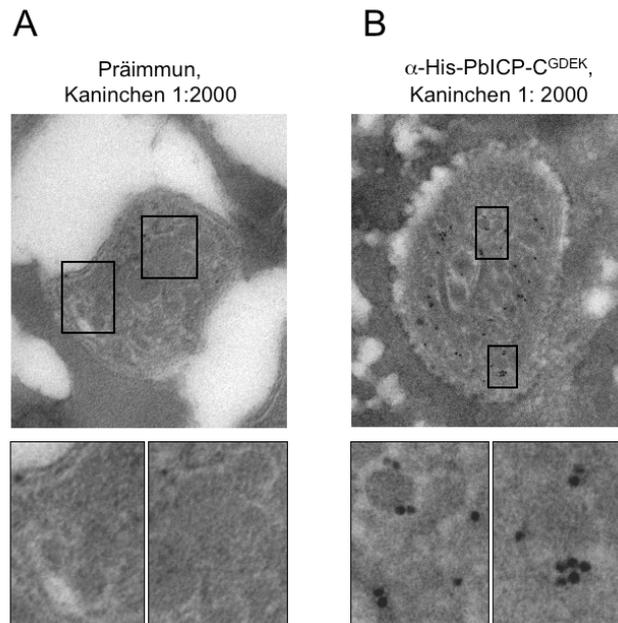


Abbildung 2-5: Spezifitätsüberprüfung des Anti-PbICP-C-Antiserums (Kaninchen) in der Immunelektronenmikroskopie

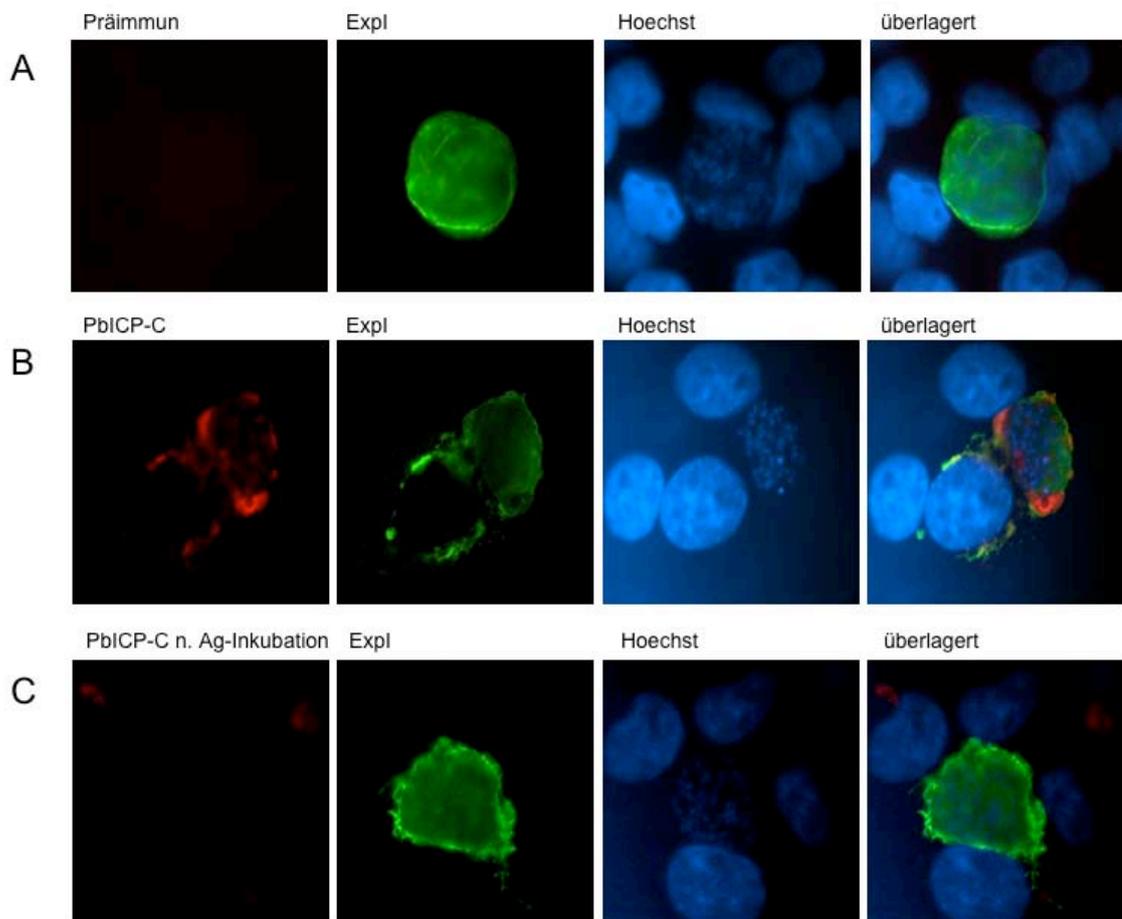


Abbildung 2-6: Spezifitätsüberprüfung des Anti-PbICP-C-Antiserums (Maus) in der Immunfluoreszenzanalyse

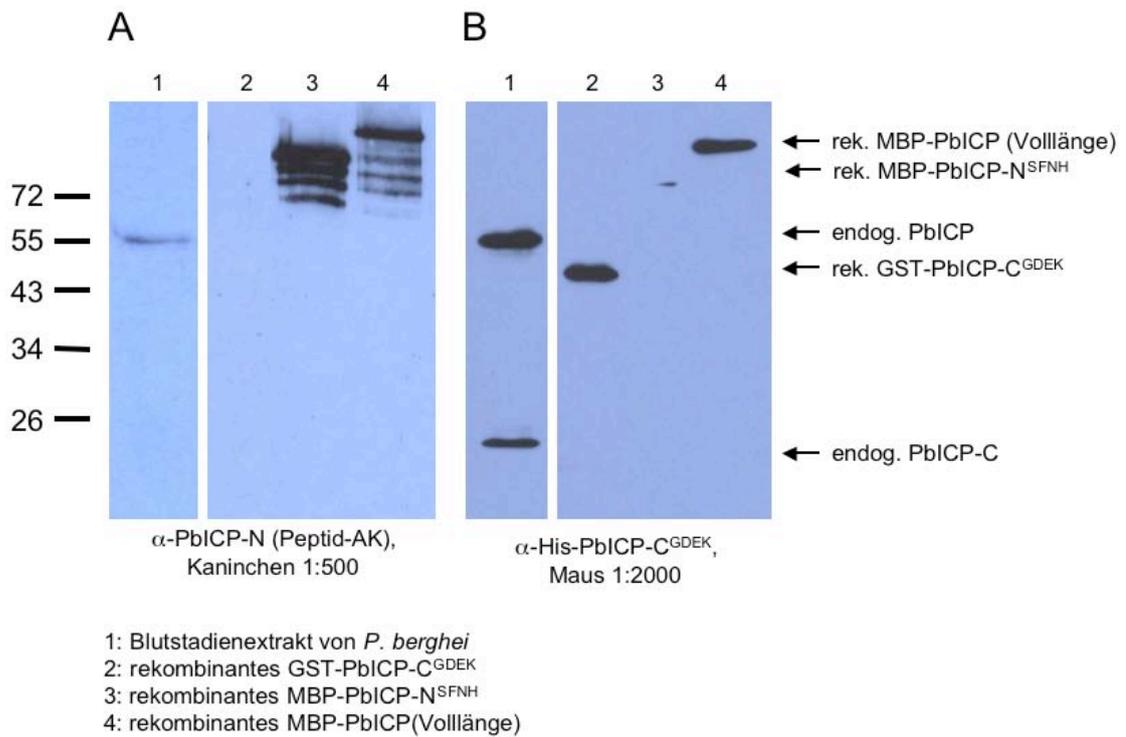


Abbildung 2-7: Spezifitätsüberprüfung des Anti-PbICP-N-Peptidantisersums (Kaninchen) und des Anti-PbICP-C-Antiserums (Maus) in der Western Blot-Analyse

2.27.1 Übersicht über die Anti-PbICP-Antiseren

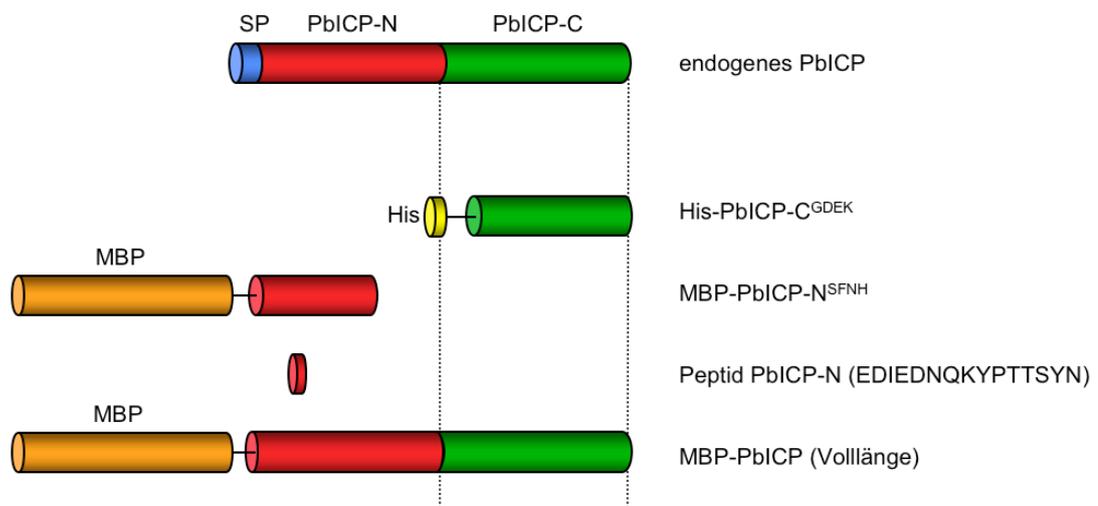


Abbildung 2-8: Übersicht über die rekombinanten Proteine im Vergleich zum endogenen PbICP, die für die Immunisierung verwendet wurden

Tabelle 2-17: Übersicht über die hergestellten Antisera

| | Maus | | Kaninchen | |
|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | IFA | WB | IFA | WB |
| His-PbICP-C ^{GDEK} | +++ 1:500 bis 1:2000 | +++ 1:500 bis 1:2000 | +++ 1:500 bis 1:2000 | +++ 1:500 bis 1:2000 |
| MBP-PbICP-N ^{SFNH} | ++ 1:500 bis 1:1000 | ++ 1:500 bis 1:1000 | - | - |
| Peptid PbICP-N (EDIEDNQKYPTTSYN) | - | - | + (1:1000) | ++ 1:500 bis 1:1000 |
| MBP-PbICP (Volllänge) | ++ 1:500 bis 1:2000 | ++ 1:500 bis 1:2000 | - | - |

2.28 Proteinextrakte von *P. berghei*

2.28.1 Totallysate von infizierten HepG2-Zellen, Speicheldrüsen und Blutschizonten

Das Probenmaterial wurde in PBS (siehe 2.2) gewaschen und im zweifachen Volumen Laemmli-Probenpuffer (2x) aufgenommen. Die DNA im Lysat wurde zerkleinert, indem die Probe entweder 15 Minuten mit 5 U Benzonase (Novagen/Merck KGaA, Darmstadt) bei Raumtemperatur inkubiert oder fünfmal für 30 Sekunden im Ultraschallbad beschallt wurde.

Um Schizonten zu isolieren, wurde eine Übernacht-Kultur und eine Nycodenz-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, die in Abschnitt 2.5 beschrieben werden.

2.28.2 Triton X-100-Lysate von *P. berghei* Saponinextrakten (HNET-Extrakte)

Die Herstellung von Saponinextrakten wird in Abschnitt 2.7 beschrieben. Das nach der Saponinlyse erhaltene Parasitensediment wurde im Volumenverhältnis von 1:1 mit HNET-Puffer versetzt, für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 13.000 x g, 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Fraktion des Triton X-100-Lysates) und das Zelltrümmer-Sediment (unlösliche Fraktion des Triton X-100-Lysates) wurden in Laemmli-Probenpuffer (2x) aufgenommen. Das Laemmli-Probenpuffervolumen entsprach dabei dem Volumenverhältnis des Überstandes.

HNET-Puffer

| | |
|--|---------------|
| HEPES-NaOH * (Biomol, Hamburg) | 25 mM |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 150 mM |
| EDTA-Natriumsalz (Ethylendiamintetraessigsäure; Biomol, Hamburg) | 1 mM |
| Triton X-100 (Sigma, Steinheim) | 0,5 % |
| | → pH-Wert 7,4 |

* 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure]

2.29 Western Blot-Analyse

Proteinproben wurden im 12%igen Gel mittels SDS-PAGE (siehe 2.19) aufgetrennt, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Für die SDS-PAGE wurde als Größenstandard PageRuler™ Prestained ProteinLadder (10 bis 170 kDa, MBI-Fermentas, St.-Leon-Rot) verwendet, dessen Proteinbanden sowohl im Gel als auch später auf der Nitrozellulosemembran als farbige Banden sichtbar waren. Anschließend wurden die Proteine im *Wet-Blotting*-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Whatman-Filterpapiere und die Membran wurden zuvor in Transferpuffer äquilibriert. Das Gel befand sich bezüglich der Membran auf der Kathodenseite innerhalb des *Blotting-Tank*-Einsatzes. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 400 mA in Transferpuffer. Freie Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran wurden blockiert, indem die Membran für mindestens eine Stunde in TBS-T mit 5 % Milchpulver (Roth, Karlsruhe) geschwenkt wurde. Die anschließende Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Der Erstantikörper wurde in 3 ml 2,5 % Milchpulver/TBS-T verdünnt und in einem 50 ml-Falkongefäß auf einem Laborroller mit der Nitrozellulosemembran inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem Zweitantikörper versetzt, der mit Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) markiert war und ebenfalls in 3 ml 2,5 % Milchpulver/TBS-T verdünnt wurde. Die Membran wurde eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper auf einem Laborroller inkubiert, dreimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, einmal mit TBS gewaschen und anschließend die Antikörperkomplexe mit Hilfe von ECL-Reagenzien, Röntgenfilm und Entwicklergerät sichtbar gemacht. Es wurden entweder die kommerziell erhältlichen ECL-Reagenzien von Pierce und Bio-Rad (SuperSignal West pico bzw. femto von Pierce, Rockford, USA und ImmunStar™ Western C™ von Bio-Rad) oder beim Nachweis rekombinanter Proteine selbst hergestelltes ECL verwendet. Bei dem selbst hergestellten ECL wurden pro Membran 3 ml von ECL-Lösung A mit 0,9 µl 30%igen H₂O₂ (Roth, Karlsruhe) und 300 µl ECL-Lösung B gemischt und für 2 Minuten mit der Membranoberfläche inkubiert. Der Flüssigkeitsfilm wurde vorsichtig mit einem Filterpapier entfernt und anschließend in Dunkelheit ein Röntgenfilm mit den bei der Enzymreaktion freigesetzten Photonen belichtet. Nach unterschiedlichen Expositionszeiten (zwischen 30 Sekunden und eine Stunde) wurden die Röntgenfilme in den Entwickler eingeführt und die von den Antikörpern gebundenen Proteine auf der Nitrozellulosemembran sichtbar gemacht.

Tabelle 2-18: Erstantikörper für Western Blot-Analysen

| Antikörperbezeichnung | Verdünnung | Quelle |
|--|------------|---------------------------------------|
| Anti-His-PbICP-C ^{GDEK} (Maus) | 1:2000 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Anti-His-PbICP-C ^{GDEK} (Kaninchen) | 1:2000 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Anti-Peptid-PbICP-N (Kaninchen) | 1:500 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Anti-GFP (Kaninchen) | 1:1000 | Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| Anti-GFP (Maus) | 1:1000 | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| Anti-human-Tubulin (Maus) | 1:5000 | Sigma, Steinheim |

Tabelle 2-19: Zweitantikörper für Western Blot-Analysen

| Antikörperbezeichnung | Verdünnung | Quelle |
|-----------------------------------|------------|------------------------------|
| Anti-Maus IgG, HRP*-Konjugat | 1:5000 | Pierce, Rockford, USA |
| Anti-Maus Fc IgG, HRP*-Konjugat | 1:5000 | Rockland, Hamburg |
| Anti-Kaninchen IgG, HRP*-Konjugat | 1:10.000 | Cell Signalling, Boston, USA |

*horseradish peroxidase

Transferpuffer

| | |
|---|---------------|
| Glycin (Biomol, Hamburg) | 192 mM |
| Tris (Sigma, Steinheim) | 25 mM |
| SDS (Natriumdodecylsulfat; Biomol, Hamburg) | 1,3 mM |
| Methanol (Roth, Karlsruhe) | 20 % (v/v) |
| | → pH-Wert 8,3 |

TBS (10x)

| | |
|----------------------------|---------------|
| Tris-HCl (Biomol, Hamburg) | 100 mM |
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 1,5 M |
| | → pH-Wert 7,4 |

TBS-T

TBS mit 0,05 % Tween-20 (Sigma, Steinheim)

ECL-Lösung A

| | |
|---|--------|
| Tris-HCl (Sigma, Steinheim) 0,1 M; pH-Wert 8,6 | 200 ml |
| Luminol Natriumsalz (Sigma, Steinheim) bei 4 °C lagern | 50 g |

ECL-Lösung B

| | |
|--|-------|
| DMSO (Biomol, Hamburg) | 10 ml |
| Para-Hydroxycoumarinsäure (p-Coumaric acid, Sigma, Steinheim) unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur lagern | 11 mg |

2.30 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

2.30.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von infizierten HepG2-Zellen und Sporozoiten

Infizierte HepG2-Zellen oder Sporozoiten auf Glas-Deckgläsern in den Kulturschalenvertiefungen wurden vorsichtig mit PBS (siehe 2.2) gewaschen und anschließend mit 1 ml 4%iger Formaldehyd-Lösung (in PBS) bei Raumtemperatur fixiert. Nach 30 Minuten wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und zur Permeabilisierung der Membranen für 10 Minuten mit eiskaltem Methanol versetzt. Sporozoiten wurden teilweise auch direkt mit eiskaltem Methanol fixiert und permeabilisiert. Die fixierten Zellen konnten in Methanol bei -20 °C bis zu mehreren Monaten aufbewahrt werden. Methanolrückstände wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Präparate für 30 Minuten bis 1 Stunde mit 10 % FCS oder 5 % FCS (in PBS) inkubiert (Blockieren freier Bindungsstellen). Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C über Nacht mit den entsprechenden Erstantikörper-Verdünnungen in 10, 5 oder 2,5 % FCS/PBS in feuchter Atmosphäre inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen und unter Lichtausschluss für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit den entsprechenden Verdünnungen der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zweitantikörpern und einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Der größte Teil des Flüssigkeitsfilmes wurde vorsichtig mit einem Filterpapier entfernt und die Deckgläser mit DAKO Fluorescent Eindeckmedium (DAKO, Carpinteria, USA) auf Objektträger (Super Frost™) geklebt, so dass die mit Zellen bewachsene Seite nach unten zeigte. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4 °C unter Lichtausschluss aufbewahrt, damit das Eindeckmedium aushärten konnte. Innerhalb der nächsten Tage wurden die Präparate am Fluoreszenzmikroskop (Leitz DM RB, Leica oder Olympus FV1000) analysiert.

Für Immunfluoreszenz-Analysen von abgelösten, mit Merozoiten gefüllten Wirtszellen und Merosomen am Ende der Leberphase wurde der Kulturüberstand abgenommen, die Zellen durch 8minütige Zentrifugation bei 100 g sedimentiert und der Überstand bis auf ca. 500 µl vorsichtig abgenommen. Vor oder nach der Fixierung wurden die Zellen mittels 4minütiger Cytospin-Zentrifugation bei 800 rpm auf Polysine™-Objektträger aufgebracht. Wurden die Zellen erst im Anschluss fixiert, platzten sie dabei auf, so dass später Gruppen freier Merozoiten zu sehen waren. Vor der Cytospin-Zentrifugation wurde um die Stelle, auf der die Zellen sedimentieren, mit *Liquid-Barrier*-Marker eine wachsartige Rahmen aufgetragen, um die anschließenden Inkubationen zu ermöglichen. Die Fixierung, Permeabilisierung, das Blockieren freier Bindungsstellen, Waschschritte und Färbungen erfolgten wie oben beschrieben, indem die jeweilige Lösung vorsichtig auf den Objektträger gegeben und nach der Inkubationszeit mit einem Filterpapier oder einer Absaugvorrichtung abgesaugt wurde. Der Objektträger wurde schließlich mit einem Tropfen DAKO Fluorescent Mounting Medium (DAKO, Carpinteria, USA) versehen und ein Deckglas aufgeklebt.

Fixierungspuffer

Paraformaldehyd (Fluka, Steinheim) 4 %
in PBS
→ pH-Wert 7,4

Permeabilisierung / Lagerung

Methanol (Roth, Karlsruhe) eiskalt (-20 °C)

Blockierungspuffer

FCS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) 5 - 10 %
in PBS (→ pH-Wert 7,4; siehe 2.2)

Antikörperpuffer

FCS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) 2,5 - 10 %
in PBS (→ pH-Wert 7,4; siehe 2.2)

2.30.2 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von infizierten Blutzellen

Die Färbung von Blutzellen wurde in Suspension durchgeführt. Die Blutzellen wurden aus einer infizierten Maus entnommen (z.B. 20 µl Blut aus der Schwanzvene) und mehrmals mit PBS oder Alsever's Solution (Sigma, Steinheim) gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 2000 x g für 2 Minuten. Um mehr junge Stadien zu bekommen (Merozoiten, Ringe), kann die Zentrifugationsgeschwindigkeit auf 4000 x g erhöht werden. Allerdings beeinträchtigt dies die Morphologie der Blutzellen und damit die Qualität der Durchlichtbilder. Die Blutzellen wurden in Fixierungspuffer aufgenommen und für 30 Minuten auf einem Laborroller inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 Minuten im Permeabilisierungspuffer inkubiert. Nach 3 Waschschrritten wurden die Zellen mit den Erstantikörpern in 1 % BSA/PBS für 1 Stunde auf dem Laborroller bei Raumtemperatur inkubiert. Alternativ wurden die Zellen zuvor mit 10 % FCS/PBS für 20 Minuten inkubiert (Blockieren freier Bindungsstellen). Die Zellen wurden erneut gewaschen und mit den Zweitantikörpern in 1 % BSA/PBS und den DNA-Farbstoffen unter Lichtausschluss für 1 Stunde auf dem Laborroller bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 Waschschrritten mit PBS wurde etwa 2 µl der Blutsuspension zusammen mit DAKO Fluorescent Mounting Medium (DAKO, Carpinteria, USA) oder Glycerol auf einen Objektträger pipettiert und ein Deckglas vorsichtig aufgelegt, so dass sich die Blutzellen unter dem Deckglas verteilen. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4 °C unter Lichtausschluss aufbewahrt, damit das Eindeckmedium aushärten konnte. Am nächsten Tag wurden die Präparate am Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe des Programms Openlab (Version 4.01) analysiert.

Fixierungspuffer

| | |
|--|-------------------|
| 10%ige Formaldehydlösung, MeOH-frei (Sigma, Steinheim) | 2 ml (4 %) |
| 25%ige Glutaraldehydlösung (Roth, Karlsruhe) | 1,5 µl (0,0075 %) |
| 20 x PBS | 250 µl |
| H ₂ O | ad 5 ml |
| | → pH-Wert 7,4 |

Permeabilisierungspuffer

0,1 % Triton-X-100 (Sigma, Steinheim) in PBS (→ pH-Wert 7,4; siehe 2.2)

Tabelle 2-20: Erstantikörper für Immunfluoreszenzanalysen

| Antikörperbezeichnung | Verdünnung | Quelle |
|--|------------|---------------------------------------|
| Anti-His-PbICP-C ^{GDEK} (Maus) | 1:2000 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Anti-His-PbICP-C ^{GDEK} (Kaninchen) | 1:2000 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Anti-PbICP-N ^{SFNH} (Maus) | 1:500 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Anti-Expl (Huhn) | 1:250 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Anti-Hsp90 (Huhn) | 1:250 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Anti-GST-SERA2 (Maus) | 1:500 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Anti-GFP (Kaninchen) | 1:1000 | Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| Anti-GFP (Maus) | 1:1000 | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| Anti-cleaved Caspase 3 (Kaninchen) | 1:100 | Cell Signalling, Boston, USA |

Tabelle 2-21: Zweitantikörper und DNA-Farbstoffe für Immunfluoreszenzanalysen

| Antikörperbezeichnung | Verdünnung | Quelle |
|---|------------|---------------------------------------|
| Anti-Maus IgG, Alexa Fluor [®] 594-Konjugat | 1:7000 | Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| Anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor [®] 594-Konjugat | 1:7000 | Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| Anti-Huhn IgG, Alexa Fluor [®] 594-Konjugat | 1:7000 | Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| Anti-Maus IgG, Cy TM 2-Konjugat | 1:250 | Jackson Immuno Research, Dianova |
| Anti-Kaninchen IgG, Cy TM 2-Konjugat | 1:250 | Jackson Immuno Research, Dianova |
| Anti-Huhn IgG, Cy TM 2-Konjugat | 1:250 | Jackson Immuno Research, Dianova |
| Anti-Huhn IgG, Cy TM 5-Konjugat | 1:200 | Jackson Immuno Research, Dianova |
| DAPI 100 µg/ml (4', 6-Diamidino-2-Phenylindol) | 1:100 | Sigma, Steinheim |

2.31 Lebendfärbung von Sporozoiten

Speicheldrüsen von ca. 12 mit PbmCherry-Parasiten infizierten *A. stephensi*-Mücken wurden in 100 µl kaltes PBS in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit einem Elektromörser aufgeschlossen. Die Sporozoiten-Suspension wurde auf 300 µl mit kaltem PBS aufgefüllt, in drei 100 µl-Fractionen aufgeteilt und jeweils 1 µl des Antiserums hinzugegeben. Als Antiserum wurde Anti-His-PbICP-C^{GDEK} (Kaninchen), das zugehörige Präimmunserum und Anti-His-CSP (Maus) verwendet. Die Proben wurden für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 1 ml PBS aufgefüllt und die Sporozoiten bei 8000 x g für 5 Minuten sedimentiert. Nach Wiederholung des Waschschrilles wurden die Sporozoiten mit einer 1:200 Verdünnung der Zweitantikörper Anti-Kaninchen IgG, CyTM2-Konjugat bzw. mit Anti-Maus IgG, CyTM2-Konjugat (Jackson Immuno Research, Dianova) und einer 1:1000 Verdünnung des membrangängigen DNA-Farbstoffs Hoechst 33258 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in PBS für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zwei Waschschrilles mit PBS wurde möglichst viel vom Überstand verworfen und die Sporozoiten mit etwa 5 µl DAKO Fluorescent Mounting Medium (DAKO, Carpinteria, USA) auf einen Objektträger überführt. Vorsichtig wurde ein Deckgläschen aufgelegt und die Präparate sofort am Fluoreszenzmikroskop (Leitz DM RB, Leica) ausgewertet.

Tabelle 2-22: Antiseren, Zweitantikörper und DNA-Farbstoff für die Lebendfärbung

| Antikörperbezeichnung | Verdünnung | Quelle |
|---|------------|---------------------------------------|
| Anti-His-CSP (Maus) | 1:100 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Anti-His-PbICP-C ^{GDEK} (Kaninchen) | 1:100 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Präimmunserum (Kaninchen) | 1:100 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Anti-Maus IgG, Cy TM 2-Konjugat | 1:200 | Jackson Immuno Research, Dianova |
| Anti-Kaninchen IgG, Cy TM 2-Konjugat | 1:200 | Jackson Immuno Research, Dianova |
| Hoechst 33258 | 1:1000 | Molecular Probes, Leiden, Niederlande |

2.32 Neutralisationsexperimente mit Sporozoiten

Die Neutralisierungsexperimente erfolgten im Wesentlichen nach dem Protokoll von Kumar et al. 2004¹⁴⁶. Es wurden etwa 50.000 HepG2-Zellen pro Ansatz auf Glasdeckgläschen in 24-*well*-Kulturschalen ausgesät (siehe 2.2). Am Folgetag wurden Speicheldrüsen infizierter *A. stephensi*-Mücken isoliert, in 100 µl kaltes Infektionsmedium (siehe 2.2) in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit einem Elektromörser aufgeschlossen. Zum Auszählen der Sporozoiten wurde 1 µl der Suspension mit 9 µl Infektionsmedium verdünnt, in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und für 2 Minuten stehen gelassen, damit sich die Sporozoiten absetzten. Für jeden Ansatz eines Versuchsdurchlaufs wurden $2 \cdot 10^4$ Sporozoiten in 30 µl Infektionsmedium benötigt. Für jeden Versuchsdurchlauf wurden mindestens eine Präimmunserum-Kontrolle (Kaninchen), eine Anti-CSP-Positivkontrolle (Kaninchen) und drei Proben mit verschiedenen Konzentrationen des Anti-His-PbICP-C^{GDEK} (Kaninchen) angesetzt. Die Antiseren wurden 1:5 (6 µl in 30 µl), 1:10 (3 µl in 30 µl) oder 1:50 (0,6 µl in 30 µl) verdünnt und mit den Sporozoiten für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 170 µl warmes Kulturmedium (siehe 2.2) in jeden Ansatz zugegeben, die Sporozoitensuspensionen jeweils auf die ausgesäten HepG2-Zellen gegeben und die Kulturschalen zurück in den Brutschrank gestellt. Nach 3 Stunden wurde der Überstand gegen 1 ml vorgewärmtes Kulturmedium ersetzt. Nach etwa 26 Stunden wurden die Zellen fixiert, eine Immunfluoreszenzanalyse mit Anti-Expl-Antiserum (Huhn) durchgeführt (siehe 2.30.1) und die infizierten Zellen am Fluoreszenzmikroskop (Leitz DM RB, Leica) ausgezählt.

Tabelle 2-23: Antiseren für die Vorinkubation bei den Neutralisationsexperimenten

| Antikörperbezeichnung | Verdünnung | Quelle |
|--|-----------------|--------------------------|
| Anti-CSP (Kaninchen) | 1:5, 1:10, 1:50 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Anti-His-PbICP-C ^{GDEK} (Kaninchen) | 1:5, 1:10, 1:50 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Präimmunserum (Kaninchen) | 1:5, 1:10, 1:50 | BNI AG Heussler, Hamburg |

2.33 Immunoelektronenmikroskopie

Herstellen und Fixieren der Präparate

Mitteldärme (14 bis 18 Tage nach Infektion) und Speicheldrüsen (18 bis 25 Tage nach Infektion) wurden aus infizierten *A. stephensi*-Mücken isoliert und sofort in die Fixierlösung überführt.

HepG2-Zellen wurden auf kleinen Stücken (ca. 3 x 4 mm) aus Thermanox™ ausgesät (statt der Glasdeckgläser, siehe 2.2). Am Folgetag wurden diese mit einer Pinzette vorsichtig in eine passende, mit einem Wachsstift hergestellte Form überführt, so dass der Kulturüberstand ein möglichst kleines Volumen hatte (ca. 50 µl). Es wurden die Speicheldrüsen aus ungefähr fünf sehr gut infizierten *A. stephensi*-Mücken isoliert und für 2 Ansätze in 100 µl Infektionsmedium aufgeschlossen. Der Zellüberstand von zwei Thermanox-Feldern wurde durch die Sporozitenlösungen ersetzt und die Zellen zusammen mit den Sporoziten für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und durch Fixierlösung ersetzt.

Die Präparate wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur fixiert.

Fixierlösung (frisch ansetzen)

| | |
|---|----------------|
| 10%ige Paraformaldehyd-Lösung (Lagerung bei -20 °C) | 1 ml (2 %) |
| 25%ige Glutaraldehyd-Lösung (Lagerung bei 4 °C) | 5 µl (0,025 %) |
| Natriumcacodylatpuffer | ad 5 ml |

Natriumcacodylatpuffer

| | |
|--|---------------|
| Na(CH ₃) ₂ AsO ₂ · 3H ₂ O | 5,35 g |
| Saccharose (100 mOsm) | 8,56 g |
| CaCl ₂ | 0,055 g |
| ddH ₂ O | 230 ml |
| HCl (0,1N) | 20 ml |
| | → pH-Wert 7,2 |

Dehydrierung und Einbettung der Präparate mit LR White™ Resin

Die fixierten Präparate wurden zunächst dreimal für 10 Minuten in Na-Cacodylatpuffer gewaschen. Die Speicheldrüsen wurden zuvor in 3 % Low-Melting-Agarose eingebettet, um sie bei der Dehydrierung und Einbettung nicht zu verlieren. Nachdem die Fixierlösung durch Puffer ersetzt worden war, erfolgte die Dehydrierung schrittweise durch eine jeweils zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur mit 70 % Ethanol, 80 % Ethanol und 90 % Ethanol. Anschließend wurde erneut für 10 Minuten 90 % Ethanol hinzugegeben und die Proben bei 4 °C inkubiert. Um den Alkohol langsam durch LR White™ Resin (London Resin Company, Berkshire) zu ersetzen, wurden die Präparate jeweils über Nacht bei 4 °C mit den folgenden Mischungen aus

90 % Ethanol und LR White™ Resin inkubiert: 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 und 1:3. Anschließend wurde zweimal konzentriertes LR White™ Resin zugegeben. Um LR White™ Resin auspolymerisieren zu lassen, wurden 10 ml LR White™ Resin mit einem Tropfen LR White™ Accelerator gemischt, die Präparate in Gelatinekapseln überführt und mit dem Gemisch überschichtet. Die Aushärtung erfolgte zunächst bei 4 °C über Nacht und anschließend bei Raumtemperatur im Tageslicht.

Trimmen der Präparate

Die Präparate wurden unter mikroskopischer Kontrolle mit einer Rasierklinge oder einer elektrischen Fräsmaschine aus dem LR White™ Resin-Block freigelegt, mit einem Histo-Diamanten (DIATOME) am Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert-Jung) angeschnitten und über Semi-Dünnschnitte analysiert (siehe 2.33.2).

Anfertigung der Ultradünnschnitte

Nickel-Grids (200 mesh; 3,05 nm; Agar) wurden auf der matten Seite mit 0,6% Pioloform/Chloroform beschichtet.

Am Ultramikrotom wurden mit einem Ultra-45°-Diamanten (DIATOME) Ultradünnschnitte (graue Interferenzfarbe) angefertigt und mit Hilfe einer Drahtschleife aus dem Wassertrog auf die matte, befilmte Seite der Grids überführt. Die Schnitte wurden über Nacht getrocknet.

Immunogoldfärbungen und Kontrastierung

Die mit den Ultradünnschnitten belegten Nickel-Grids wurden am Folgetag für 15 Minuten mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 10 % BSA/PBS geblockt. Anschließend wurden die Schnitte zunächst für eine Stunde bei 37 °C und dann bei 4 °C über Nacht mit den entsprechenden Erstantikörper-Verdünnungen in 1 % BSA/PBS in feuchter Atmosphäre inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte viermal für jeweils 2 Minuten mit 0,1 % BSA/PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den entsprechenden Zweitantikörper-Verdünnungen in 1 % BSA/PBS inkubiert. Die Schnitte wurden dann zweimal für jeweils 2 Minuten mit 0,1 % BSA/PBS und zweimal für jeweils 2 Minuten mit PBS gewaschen. Um die Antikörperbindungen zu stabilisieren, wurden die Schnitte für 2 Minuten mit 2 % Glutaraldehyd in Na-Cacodylatpuffer fixiert. Anschließend wurden sie zweimal für jeweils 2 Minuten mit PBS und zweimal für jeweils 2 Minuten mit ddH₂O gewaschen. Vor der Kontrastierung wurden die Schnitte über Nacht getrocknet.

Für die Kontrastierung wurden eine 2%ige wässrige Uranylacetatlösung und eine Bleicitratlösung nach Reynolds verwendet. Alle hier verwendeten Lösungen wurden vorher zentrifugiert oder sterilfiltriert, um mögliche Sedimente abzutrennen. Die

Schnitte wurden zunächst für 10 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur mit 2 % Uranylacetat inkubiert, zweimal mit ddH₂O gewaschen, auf einem Filterpapier getrocknet und in eine Trockenkammer mit KOH-Plättchen überführt. Die Bleicitratlösung nach Reynolds wurde 1:10 in 0,01 N NaOH verdünnt. Anschließend wurden an die Schnitte in der Trockenkammer Tropfen der Bleicitratlösung angelegt und nach 5 Minuten durch dreimaliges Waschen mit 0,01 N NaOH und mit ddH₂O wieder entfernt. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden sie im Transmissionselektronenmikroskop (FEI Tecnai) analysiert.

Blockpuffer

10 % BSA (Sigma, Steinheim) in PBS (→ pH-Wert 7,4; siehe 2.2), sterilfiltrieren

Antikörperpuffer

1 % BSA (Sigma, Steinheim) in PBS (→ pH-Wert 7,4; siehe 2.2), sterilfiltrieren

Waschpuffer

0,1 % BSA (Sigma, Steinheim) in PBS (→ pH-Wert 7,4; siehe 2.2), sterilfiltrieren

Bleicitratlösung nach Reynolds

| | |
|--|--------------------------------|
| Bleicitrat | 1,33 g |
| Natriumcitrat*2H ₂ O | 1,76 g |
| ddH ₂ O | 30 ml |
| 1 Minute schütteln, 30 Minuten stehen lassen | |
| 1 N NaOH | 8 ml (Lösung muss klar werden) |
| ddH ₂ O | ad 50 ml |
| | → pH-Wert 12 |

Tabelle 2-24: Erstantikörper für IEM

| Antikörperbezeichnung | Verdünnung | Quelle |
|--|------------------|--------------------------|
| Anti-His-PbICP-C ^{GDEK} (Kaninchen) | 1:500 bis 1:2000 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Anti-CSP (Maus) | 1:5000 | BNI AG Heussler, Hamburg |
| Anti-TRAP (Maus) | 1:2000 | BNI AG Heussler, Hamburg |

Tabelle 2-25: Zweitantikörper für IEM

| Antikörperbezeichnung | Verdünnung | Quelle |
|----------------------------|------------|--|
| Anti-Maus IgG, 10 nm-Gold | 1:30 | Electron Microscopy Sciences, Hatfield |
| Protein A-Gold 10 nm-Gold | 1:70 | Universität Utrecht |
| Protein A-Gold, 25 nm-Gold | 1:1 | Electron Microscopy Sciences, Hatfield |

2.33.1 Doppel-IEM-Färbungen

Die mit den Ultradünnschnitten belegten Nickel-Grids wurden für 10 Minuten mit PBS gewaschen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 10 % BSA/PBS geblockt. Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der entsprechenden Verdünnung des Maus-Erstantikörpers inkubiert. Die Schnitte wurden viermal für jeweils 2 Minuten mit 0,1 % BSA/PBS gewaschen und anschließend für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Anti-Maus-Zweitantikörper (10 nm Gold) inkubiert. Erneut wurden die Schnitte viermal für jeweils 2 Minuten mit 0,1 % BSA/PBS gewaschen und anschließend ein zweites Mal für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 10 % BSA/PBS geblockt. Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem zweiten Erstantikörper aus Kaninchen inkubiert. Die Schnitte wurden viermal für jeweils 2 Minuten mit 0,1 % BSA/PBS gewaschen und anschließend für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Anti-Kaninchen-Zweitantikörper (25 nm Gold) inkubiert. Dann wurden die Schnitte zweimal für jeweils 2 Minuten mit 0,1 % BSA/PBS und zweimal für jeweils 2 Minuten mit PBS gewaschen. Um die Antikörperbindungen zu stabilisieren, wurden die Schnitte für 2 Minuten mit 2 % Glutaraldehyd in Na-Cacodylatpuffer fixiert. Anschließend wurden sie zweimal für jeweils 2 Minuten mit PBS und zweimal für jeweils 2 Minuten mit ddH₂O gewaschen. Vor der Kontrastierung wurden die Schnitte über Nacht getrocknet.

Die Kontrastierung erfolgte wie oben beschrieben (siehe 2.33).

2.33.2 Semi-Dünnschnitte

Um das Material nach Einbettung zu analysieren, wurden die Präparate zunächst mit einer Rasierklinge oder einer elektrischen Fräsmaschine getrimmt. Anschließend wurden mit einem Histo-Diamanten (DiATOME) am Ultramikrotom etwa 200 nm dicke Schnitte (Interferenzfarben: grün bis rosa) angefertigt und in ddH₂O für 20 Minuten bei 60 °C erwärmt, so dass die Schnitte sich ausdehnen konnten. Die Schnitte wurden mit einer Drahtschlinge in einen Wassertropfen auf einen staubfreien Objektträger überführt und bei 60 °C getrocknet. Die Schnitte wurden für 15 Minuten bei 60 °C mit der Färbelösung nach Richardson gefärbt und anschließend die Färbelösung durch Waschen mit Leitungswasser und ddH₂O wieder entfernt. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden sie am Leitz DM RB Leica-Mikroskop untersucht.

Färbelösung nach Richardson

Lösung A: 1 % Azur II in ddH₂O

Lösung B: 1 % Methylenblau, 1 % Di-Natriumtetraborat ddH₂O

Lösungen A und B im Verhältnis 1:1 zusammengeben und über Filterpapier filtrieren

2.34 Kultivierung und Transfektion von CHO-Zellen

CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary; BNI AG Heussler, Hamburg) wurden in 10 ml Kulturmedium in 250ml-Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter sterilen Bedingungen kultiviert. Zum Verdünnen der Kultur oder zum Überführen der Zellen in Kulturschalen wurde der Zellrasen mit sterilem PBS (siehe 2.2) gewaschen und die CHO-Zellen mittels limitierter Trypsin/EDTA- oder Accutasebehandlung (PAA Laboratories GmbH, Österreich) abgelöst. Mit 5 ml des Kulturmediums wurde die Trypsin- oder Accutaseaktivität gestoppt und die Zellen anschließend bei 460 x g für 3 Minuten sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in den gewünschten Verdünnungen in eine 250ml-Zellkulturflasche oder in die Vertiefungen einer Kulturschale gegeben. Bei Bedarf wurde die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Kulturmedium von CHO-Zellen

| | |
|--|---------------------------------|
| RPMI 1640 * | 500 ml |
| foetal calf serum (FCS)* | 5-10 % (v/v) |
| L-Glutamin (100x)* | 2 mM |
| Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x)* | 100 U/ml Pen., 100 µg/ml Strep. |

*PAA Laboratories GmbH, Österreich

2.34.1 Magnetassoziierte Transfektion (MaTRA)

Am Tag vor der Transfektion wurden etwa 50.000 CHO-Zellen/well in die Vertiefungen einer 24-well-Zellkulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Kultur-Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 500 µl serumfreies OptiMEM-Medium (PAA) hinzugefügt. Die zu transfizierende Plasmid-DNA (3 µg der pEGFPC2-Plasmide, 1 µg/µl) wurde in 50 µl OptiMEM-Medium aufgenommen und 3 µl MATra-A Reagenz (IBA, Göttingen) hinzugefügt. Die Probe wurde gut gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Suspension aus DNA-Magnetpartikel-Komplexen in den OptiMEM-Überstand der CHO-Zellen gegeben, gemischt und für 15 Minuten auf einer Universal-Magnetplatte (IBA, Göttingen) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das OptiMEM-Medium wieder durch das Kultur-Medium ersetzt. Etwa 24 Stunden nach der Transfektion konnte die Transfektionseffizienz am inversen Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss) analysiert und mit Hilfe des Programms Openlab (Version 5.0) dokumentiert werden. Da die G418-Behandlung (Selektion mit Hilfe der Neomycin-Resistenz, die durch den pEGFPC2-Vektor vermittelt wird) nicht effizient war, wurden die GFP-positiven Zellen durch FACS-Sorting (BD FACSAria™) von den nicht transfizierten Zellen getrennt und weiterkultiviert.

2.34.2 CHO-Stabilate

Ungefähr 1 Millionen CHO-Zellen wurden in 500 μ l FCS resuspendiert. Nach Zugabe von 500 μ l einer 20%igen DMSO-Lösung (in FCS) wurden die Zellen sofort bei -70 °C eingefroren. Beim Auftauen wurden die Proben regelmäßig mit dem warmen Kulturmedium überspült, so dass die DMSO-haltige Lösung sofort verdünnt wurde.

2.35 Zelltodstudien

Mit pEGFPC2-PbICP-C (GFP-PbICP-C) oder mit dem Vektor (GFP) transfizierte CHO-Zellen wurden durch FACS-Sorting angereichert (ca. 90 % GFP-positive Zellen) und etwa 50.000 CHO-Zellen/*well* auf Glas-Deckgläsern in die Vertiefungen einer 24-*well*-Zellkulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Kultur-Medium gewechselt und die Zellen mit tert-Butylhydroperoxide (TBHP; Sigma, Steinheim; Endkonzentration im Kulturmedium 70 μ M) inkubiert, um oxidativen Stress auszulösen. Die Morphologie der Zellen wurde regelmäßig am inversen Lichtmikroskop verfolgt. Wenn sich die Zellen im Kontrollansatz abrundeten, wurden die Zellen fixiert und für Immunfluoreszenz-Analysen (siehe 2.30) verwendet.

2.36 Lebendfärbungen von infizierten HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden auf Glasboden-Petrischalen (WillCoWells) ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit Sporozysten des PbICP-C-GFP-exprimierenden *P. berghei*-Stamms infiziert (siehe 2.2). Nach 48 Stunden wurden für 30 Minuten 50 nM Lyotracker Red DND-99 und eine 1:1000-Verdünnung des DNA-Farbstoffes Hoechst 33258 in den Zellkulturüberstand gegeben. Die Inkubation erfolgte unter Lichtausschluss im Brutschrank. Der Kulturüberstand wurde anschließend durch frisches, warmes Medium ersetzt und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ im LSM 5 LIVE-Mikroskop von Zeiss mit Hilfe von Laserquellen analysiert.

Tabelle 2-26: Lebendfarbstoffe

| Bezeichnung | Verdünnung | Quelle |
|-----------------------------|------------|---------------------------------------|
| Lyotracker Red DND-99 | 50 nM | Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| Hoechst 33258 (Bisbenzimid) | 1:1000 | Molecular Probes, Leiden, Niederlande |

2.37 Kristallisation von PbICP-C^{GDEK} im Komplex mit der Parasitenprotease Falcipain-2

His-PbICP-C^{GDEK} wurde in großen Mengen in *E. coli* BL21 DE3 pAPIacl hergestellt (siehe 2.18) und über Affinitätschromatographie (siehe 2.21.1) gereinigt. Aus 6 L Bakterienkultur konnten mit einer sehr guten Reinheit etwa 15 bis 20 mg Protein gewonnen werden. Das Protein wurde bei 4 °C im Elutionspuffer gelagert und am nächsten Tag zu unseren Kooperationspartnern der Universität Lübeck (Institut für Biochemie, Dr. Guido Hansen) geschickt. Alle folgenden Schritte wurden von Dr. Guido Hansen durchgeführt und werden hier nur kurz zusammengefasst:

Eine inaktive Mutante von Falcipain-2 (FP-2 C285A), die abgesehen von der Mutation des aktiven Cysteins der reifen prozessierten Protease aus *P. falciparum* entsprach, wurde in *E. coli* Origami (DE3) als unlösliches Protein hergestellt. Das rekombinante Protein wurde aus den bakteriellen Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) gereinigt und rückgefaltet.

His-PbICP-C^{GDEK} und FP-2 C285A wurden aufkonzentriert (6 mg/ml bzw. 2 mg/ml) und gegen einen Tris-Puffer dialysiert. Anschließend wurden jeweils 5 mg FP-2 C285A mit 5 mg von His-PbICP-C^{GDEK} in 5 ml eines Tris-Puffers (500 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5) gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Komplexe aus Inhibitor und Protease über Gelfiltrationschromatographie (Superdex 75 column, 16 mm x 600 mm; GE Healthcare) isoliert. Die Komplexe waren über mehrere Monate bei 4 °C stabil.

Im 96-well-Intelli-Plattenformat (Dunn Laboratories) wurden zunächst verschiedene kommerziell erhältliche Kristallisierungslösungen bei 20 °C getestet (*sitting-drop vapor diffusion*). Um anschließend das Kristallwachstum zu optimieren, wurden 1 µl der Proteinlösung (2 mg/ml Protein in Tris-Puffer) und 1 µl der Reservoirlösung in 24-well-Cryschem-Platten (Hampton Research) zusammengegeben, wobei ebenfalls die *sitting drop*-Methode angewendet wurde. Die besten Ergebnisse wurden nach Zusatz von Cd²⁺-Ionen erhalten (200 mM NaAc, 27.5 mM CdCl₂ und 100 mM MES, pH-Wert 5). Innerhalb von 2 bis 4 Wochen wurden stabförmige Kristalle erhalten, die eine finale Größe von 0,5 mm x 0,05 mm x 0,05 mm aufwiesen.

Für die anschließenden Diffraktionsmessungen wurde 30 % Glycerol zur Reservoirlösung gegeben, Kristalle kurz in diese Lösung überführt, auf CryoLoops (Hampton Research) aufgebracht und in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Die Diffraktionsmessungen wurden in den Synchrotonanlagen BESSY (Berlin), DESY (Hamburg) und MAX-lab (Lund, Schweden) durchgeführt. Die besten Daten mit einer Auflösung von 2.6 Å wurden am BESSY erhalten (100 K, MX225 CCD-Detektor). Die Kristalle gehörten zur P4₃-Raumgruppe (Parameter der Einheitszelle: a = b = 71.15 Å, c = 120.09 Å, α = β = γ = 90°).

Die Struktur des PbICP-C:FP-2-Komplexes wurde durch molekularen Ersatz mit Hilfe der bereits bekannten Kristallstruktur von Falcipain-2 gelöst (Programm: PHASER;

PDB ID von FP-2: 2GHU, monomer A) ¹⁴⁷. Zur Strukturlösung und Validierung wurden folgende Programme verwendet: COOT, REFMAC, PHENIX und PROCHECK.

Die Abbildungen wurden mit Pymol erstellt.

3 Ergebnisse

PbICP (*P. berghei* inhibitor of cysteine proteases) ist der bisher einzige Cysteinproteaseinhibitor des Malariaerregers *P. berghei*, der für die exoerythrozytäre Phase des Parasiten beschrieben wurde¹⁴². Die vollständige Aminosäuresequenz von PbICP befindet sich im Anhang.

Das *pbicp* Gen besteht aus zwei Exons (Exon 1: 63 bp; Exon 2: 999 bp) und einem Intron (519 bp) (Abbildung 3-1). Das kurze Exon kodiert für ein klassisches Signalpeptid, das Datenbankvorhersagen zufolge während der kotranslationalen Translokation in das endoplasmatische Retikulum abgespalten wird.



Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des *pbicp* Gens

Exon 1 (1 - 63 bp) kodiert für das klassische Signalpeptid, *Exon 2* (582 - 1581 bp) kodiert sowohl für die N-terminale Region als auch für die Chagasin-ähnliche Domäne von PbICP (siehe Abschnitt 3.1).

3.1 Strukturelle Besonderheiten von PbICP

PbICP ist ein ungewöhnliches Mitglied der Inhibitorfamilie der Chagasine (ICPs, MEROPS-Famile 142). Die Chagasinfamilieninhibitoren, die bisher in anderen Protozoen und Bakterien identifiziert wurden, bestehen aus einer einzigen kompakten Proteindomäne mit einer Immunglobulin-ähnlichen, β -Faltblatt-reichen Struktur und besitzen ein durchschnittliches Molekulargewicht von 13 kDa. Im Gegensatz dazu weisen PbICP und die homologen ICPs aus *P. yoelii* und *P. falciparum* ein Molekulargewicht von 40 (PbICP, PyICP) beziehungsweise 47 kDa (PfICP) auf. Die Größe der Plasmodien-ICPs resultiert aus einer sehr langen N-terminalen Sequenzverlängerung sowie aus Sequenzeinschüben innerhalb der Chagasin-ähnlichen Domäne. Abbildung 3-2 zeigt schematisch die mittels Datenbanken vorhergesagte Sekundärstruktur von PbICP im Vergleich zu Chagasin von *T. cruzi*, dem Prototypen der Inhibitorfamilie.

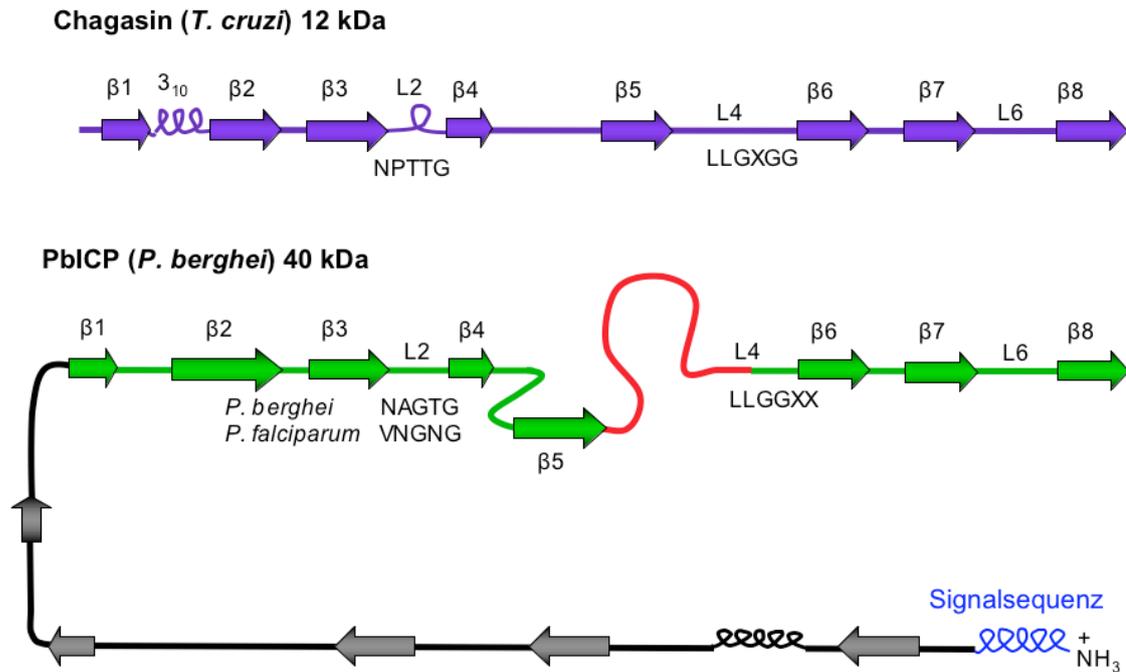


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von PbICP im Vergleich zu Chagasin

Die Strukturvorhersagen wurden mit Hilfe der Kristallstruktur von Chagasin (violett)¹³⁶ und dem Programm Jpred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) gemacht. PbICP weist eine lange N-terminale Region (grau), Sequenzeinschübe (rot) in der Chagasin-ähnlichen Proteindomäne (grün) und ein klassisches N-terminales Signalpeptid (blau) auf, das mit Hilfe der Datenbank SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) vorhergesagt wurde. Wie Chagasin besitzt PbICP viele β -Faltblattstränge (symbolisiert durch die Pfeile), die über Schleifenstrukturen (Loops) verbunden sind. Bei Chagasin bilden L2, L4 und L6 zusammen eine dreidimensionale, keilartige Struktur aus, die mit dem aktiven Zentrum der Protease interagiert. Die Plasmodien-ICPs besitzen selbst in den hochkonservierten Motiven von L2 und L4 eine andere Aminosäuresequenz.

Inhibitoren der Chagasinfamilie verfügen über konservierte Struktur motive, die für die Inhibitorfunktion essentiell sind, weisen aber nur eine sehr geringe allgemeine Sequenzhomologie auf. Interessanterweise besitzen die *Plasmodium*-Homologe sogar in den wenigen hochkonservierten Motiven der Inhibitorfamilie Aminosäureaustausche. Besonders auffällig ist das Fehlen des hochkonservierten Motives "NPTTG" in der Schleifenstruktur L2 der Plasmodien-Proteine (PbICP und PyICP "NAGTG"; PfICP "VNGNG"), das bei Chagasin für die Interaktion mit Zielproteasen eine wichtige Bedeutung hat. In Abbildung 3-3 ist ein multiples Sequenzalignment der C-terminalen Domäne von PbICP und dessen Homologen aus *P. yoelii* und *P. falciparum* mit den Chagasinfamilienmitgliedern aus *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. mexicana* und *E. histolytica* dargestellt, der mit Hilfe des Programms ClustalW erstellt wurde.

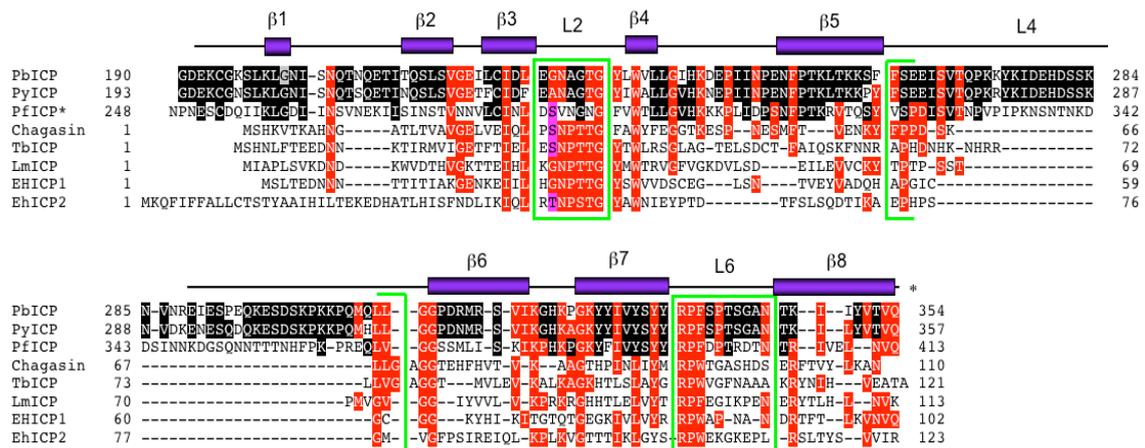


Abbildung 3-3: Sequenzvergleich der Chagasinfamilienmitglieder

Das multiple Sequenzalignment (ClustalW) zeigt die Chagasin-ähnliche C-terminale Domäne von PbICP und von dessen Homologen aus *P. yoelii* (PyICP) und *P. falciparum* (PfICP, *auch Falstatin genannt) im Vergleich mit den Inhibitoren von *T. cruzi* (Chagasin), *T. brucei* (TbICP), *L. mexicana* (LmICP) und *E. histolytica* (EhICP1 und EhICP2). Die konservierten Aminosäuren der Chagasininhibitoren sind rot unterlegt, die innerhalb der Plasmodien-ICPs konservierten Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Über der Sequenzanordnung ist die Sekundärstruktur von Chagasin dargestellt, wobei die violetten Balken β -Faltblattstränge symbolisieren. Die durch grüne Boxen markierten Schleifen-Strukturen (loops) L2, L4 und L6 formen zusammen eine dreidimensionale keilartige Struktur, die mit dem aktiven Zentrum der Protease interagiert.

Die Aminosäuresequenzen von PbICP und PyICP sind recht gut konserviert. Die Sequenzidentität der beiden homologen Proteine liegt bei etwa 85 %. PfICP (auch als Falstatin bezeichnet) weist dagegen nur eine Übereinstimmung von 40 % mit PbICP auf. Selbst ohne Berücksichtigung der langen N-terminalen Sequenz von PbICP ähnelt es Chagasin nur zu etwa 21 %. Nur das Tryptophan in dem β -Faltblattstrang β 4 und das Motiv "RPX" (wobei X eine große hydrophobe Aminosäure ist) in L6 sind in allen gezeigten ICPs vorhanden.

3.2 Inhibitorstudien mit rekombinant hergestelltem PbICP

Der Nachweis, dass es sich bei PbICP um einen funktionalen Cysteinproteaseinhibitor handelt, wurde in der vorangegangenen Diplomarbeit mit einer verkürzten Version des Proteins durchgeführt, das der Chagasin-ähnlichen Domäne entsprach (PbICP-C^{GDEK}). Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden verschiedene rekombinante PbICP-Fusionsproteine in *E. coli* hergestellt, die dem Volllängenprotein ohne Signalpeptid entsprachen. (His)₁₀-PbICP blieb bei allen getesteten Expressionsbedingungen in der unlöslichen Fraktion und war damit für Kinetikstudien unbrauchbar. MBP-PbICP war dagegen löslich und konnte gut über Affinitätschromatographie gereinigt werden. Auch nach anschließender Entfernung des MBP-Anhangs durch die Serinprotease Faktor Xa und Ionenaustauschchromatographie blieb das rekombinante Protein löslich.

Die nach den unterschiedlichen Reinigungsschritten erhaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3-4A). Im Gel läuft PbICP ohne MBP-Fusionsanhang bei etwa 55 kDa und damit 15 kDa höher als das rechnerisch kalkulierte Molekulargewicht des Proteins. Da auch das endogene PbICP aus *P. berghei* Extrakten auf dieser Höhe im Gel läuft (siehe Abschnitt 3.4), kann eine Molekulargewichtszunahme des Proteins durch bakterienspezifische Modifikationen ausgeschlossen werden.

Für die *in vitro* Experimente mit den rekombinant hergestellten Proteinen wurden verschiedene Cysteinproteasen der C1-Familie (Papain-Superfamilie) verwendet, von denen bekannt war, dass sie von Chagasin-ähnlichen Inhibitoren gehemmt werden können. Die klassische Modellprotease Papain, die *P. falciparum* Cysteinprotease Falcipain-2 sowie die zwei Wirtsproteasen Cathepsin L und Cathepsin B wurden in Anwesenheit der rekombinanten Proteine MBP-PbICP, PbICP ohne MBP-Anhang oder in Anwesenheit des Kontrollproteins MBP mit den entsprechenden p-Nitroanilin-Substraten inkubiert und die Substrathydrolyse photometrisch verfolgt. Unabhängig von dem MBP-Anhang fungierte das rekombinante Vollängen-PbICP als sehr potenter Inhibitor der Proteasen Papain, Falcipain-2 und Cathepsin L, nicht jedoch von Cathepsin B. In Abbildung 3-4B ist exemplarisch die prozentuale Restaktivität von Papain in Anwesenheit der verschiedenen rekombinanten Proteine im Diagramm dargestellt, die vollständigen Ergebnisse der Kinetikstudien mit allen Proteasen sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Die Zugabe von 1 μ M MBP-PbICP führte im Vergleich zur MBP-Kontrolle zu einer 100%igen Hemmung der Proteaseaktivitäten von Falcipain-2 und Cathepsin L sowie zu einer 97%igen Inhibition von Papain, hatte jedoch keinen Effekt auf die Cathepsin B-Hydrolyseaktivität. Der Zusatz von 100 nM PbICP führte durchschnittlich zu einer 88%igen Inhibition von Papain, einer 84%igen Inhibition von Cathepsin L und einer 76%igen Inhibition von Falcipain-2. Wie erwartet war auch hier keine Inhibition von Cathepsin B zu beobachten. Der N-terminale MBP-Anhang hatte keine störende Wirkung auf die Inhibitoraktivität. Bei dem Zusatz von 100 nM der rekombinanten Proteine MBP-PbICP und PbICP wurde beispielweise die Papainaktivität in beiden Fällen um etwa 90 % verringert (prozentuale Restaktivität von 9 % im Fall von MBP-PbICP, 12 % im Fall von PbICP ohne Fusionsanhang).

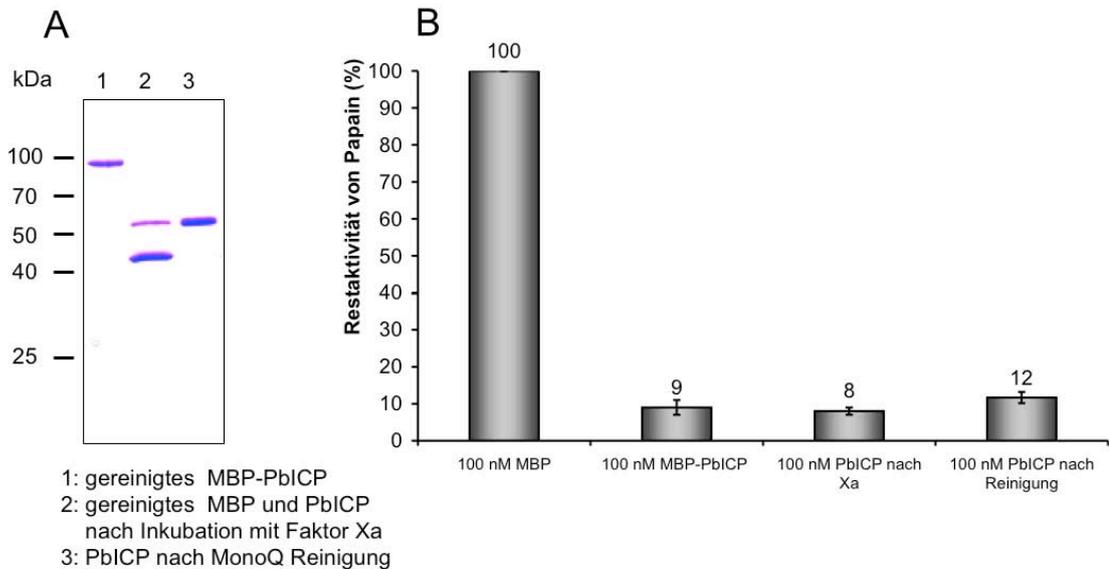


Abbildung 3-4: Rekombinantes PbICP ist ein effizienter Inhibitor von Papain.

Analyse der gereinigten rekombinanten Proteine mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (A). PbICP wurde in *E. coli* als lösliches MBP-Fusionsprotein hergestellt und mittels Affinitätschromatographie aus dem Bakterientotallysat gereinigt (Spur 1). Anschließend wurde bei einem Teil des gereinigten MBP-PbICP mit Hilfe der Faktor Xa-Schnittstelle der MBP-Anhang abgespalten (Spur 2) und PbICP mit Hilfe einer MonoQ Ionenaustauschersäule gereinigt (Spur 3). In vitro Inhibitorstudie mit den rekombinanten Proteinen und der Modellprotease Papain (B). Die Hydrolyse des Proteasesubstrates Z-FR-pNA durch Papain wurde in Anwesenheit des Kontrollproteins MBP oder in Anwesenheit von PbICP nach verschiedenen Reinigungsschritten photometrisch bestimmt und die prozentuale Restaktivität von Papain berechnet. Dabei wurde die Proteaseaktivität in der MBP-Kontrolle als 100 %ige Aktivität betrachtet.

Tabelle 3-1: Prozentuale Restaktivität der Proteasen in Anwesenheit von PbICP

| | Papain | Cathepsin L | Falcipain-2 | Cathepsin B |
|---------------------|------------|-------------|-------------|---------------|
| 1 μ M MBP | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 1 μ M MBP-PbICP | 3 \pm 1 | 0 \pm 0,2 | 0 \pm 0,1 | 100 \pm 2 |
| 100 nM MBP | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 100 nM MBP-PbICP | 9 \pm 2 | 1 \pm 1 | n.d. | 102 \pm 0,1 |
| 100 nM PbICP | 12 \pm 2 | 16 \pm 13 | 24 \pm 5 | 103 \pm 2 |

Die Hydrolyse der jeweiligen *p*-Nitroanilin-Proteasesubstrates wurde in Anwesenheit des Kontrollproteins MBP oder in Anwesenheit von MBP-PbICP bzw. PbICP nach Abspaltung des MBP-Anhangs photometrisch gemessen. Die prozentuale Restaktivität der Proteasen wurde unter der Annahme berechnet, dass die Proteaseaktivität in der MBP-Kontrolle 100 % beträgt (dunkelgrau unterlegt). Cathepsin B wurde im Gegensatz zu den anderen Proteasen nicht durch PbICP inhibiert. Die Versuchsansätze, bei denen eine Inhibition beobachtet wurde, sind rot hervorgehoben. n.d. = nicht durchgeführt

3.3 Expression und Lokalisation von PbICP

Um die Expression von PbICP zu verschiedenen Zeitpunkten im *P. berghei* Lebenszyklus zu analysieren, wurde zunächst die Transkription des *pbicp* Gens und anschließend PbICP auf Proteinebene untersucht.

Aus Mitteldärmen und Speicheldrüsen infizierter *A. stephensi* Mücken, aus dem Blut einer infizierten NMRI Maus sowie aus infizierten humanen Hepatomazellen (HepG2) wurde die Gesamt-RNA isoliert. Nach der cDNA-Synthese wurde eine Duplex-PCR mit spezifischen Primern für *pbicp* und dem konstitutiv transkribiertem Gen *tubulin* durchgeführt (Abbildung 3-5). Um Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen, wurden jeweils parallel Negativkontrollen angefertigt, bei denen keine reverse Transkriptase zugesetzt worden war. Mit diesem Versuchsansatz konnte in allen analysierten *P. berghei*-Stadien eine Transkription von *pbicp* nachgewiesen werden. Es gab kleinere Änderungen im Verhältnis des *tubulin* mRNA-Niveaus und des *pbicp* mRNA-Niveaus im Sporozystenstadium und am Ende der Leberphase, die für eine etwas verstärkte *pbicp* Transkription sprechen. Im Vergleich zu bekannten stadienabhängig regulierten Genen von *P. berghei* (z.B. die SERA-Proteasen⁷⁷) sind diese Schwankungen allerdings gering.

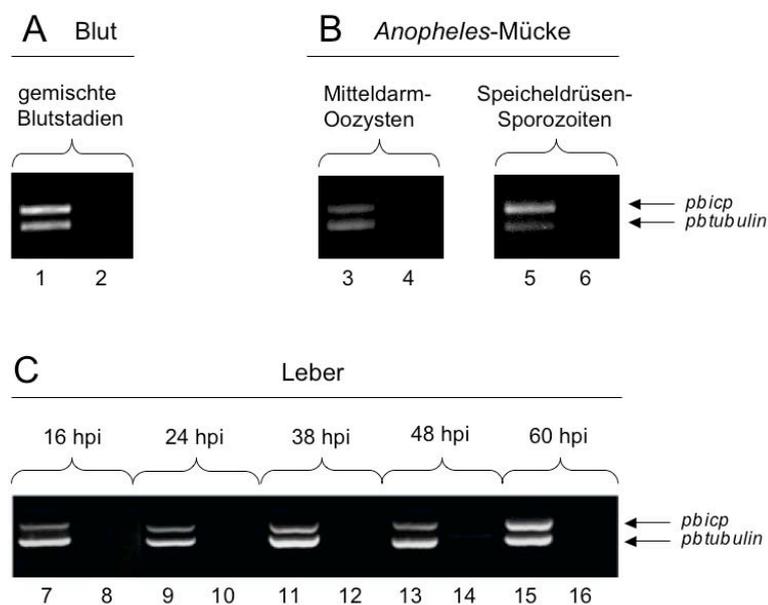


Abbildung 3-5: Das Gen *pbicp* wird während der Blut-, der Mücken- und der Leberphase transkribiert.

RNA wurde von *P. berghei*-Blutstadien (A), Mückenstadien (B) oder Leberstadien (C) isoliert, mit reverser Transkriptase (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15) oder ohne reverse Transkriptase inkubiert (Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16) und anschließend Sequenzabschnitte der *pbicp* cDNA und der *ptubulin* cDNA in einer Multiplex-PCR amplifiziert.

Um PbICP auf Proteinebene zu untersuchen, wurden spezifische Antiseren gegen verschiedene rekombinante PbICP-Konstrukte hergestellt und ihre Spezifität überprüft (siehe 2.27). Anschließend wurden die spezifischen Seren für indirekte Immunfluoreszenzanalysen eingesetzt. Es wurden erythrozytäre Stadien, Speicheldrüsen-Sporozoit und verschiedene Leberstadien von *P. berghei* analysiert.

In Übereinstimmung mit der vorgefundenen Transkription des *pbicp* Gens wurde sowohl in den analysierten Blutstadien (Abbildung 3-6), in Sporozoit, als auch in allen Leberstadien (Abbildung 3-7) das Protein PbICP nachgewiesen. Die genaue Lokalisation von PbICP wird in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

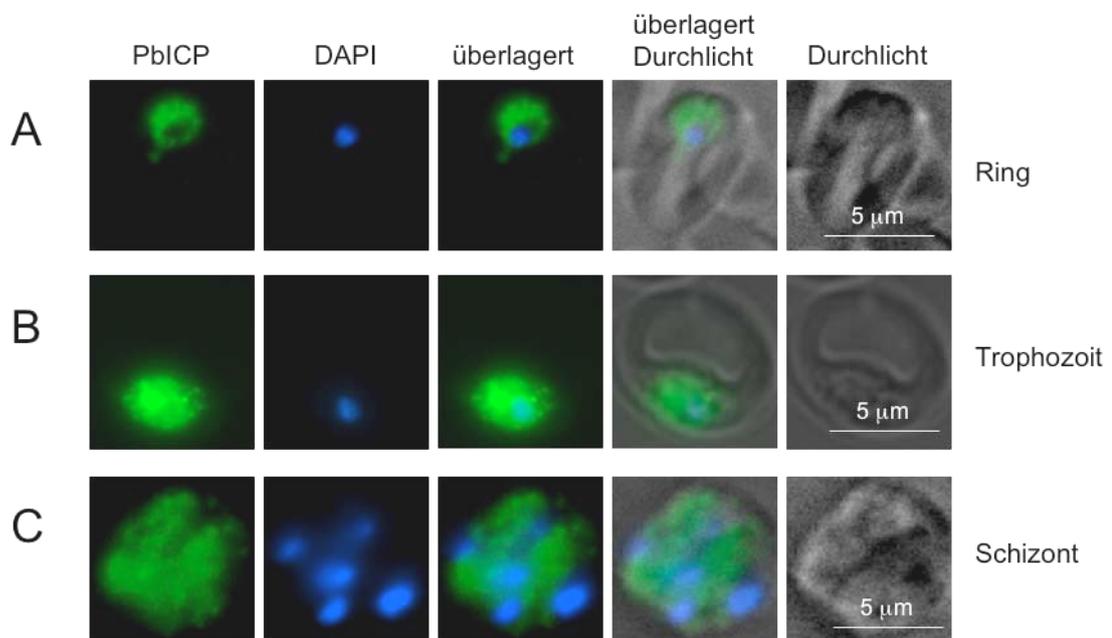


Abbildung 3-6: PbICP kann in erythrozytären Stadien von *P. berghei* nachgewiesen werden.

Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von unterschiedlichen P. berghei Blutstadien. Es wurde Blut von einer P. berghei infizierten NMRI Maus entnommen, die Blutzellen fixiert, permeabilisiert und mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C inkubiert. Als fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper wurde Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Cy2 (grün) verwendet. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

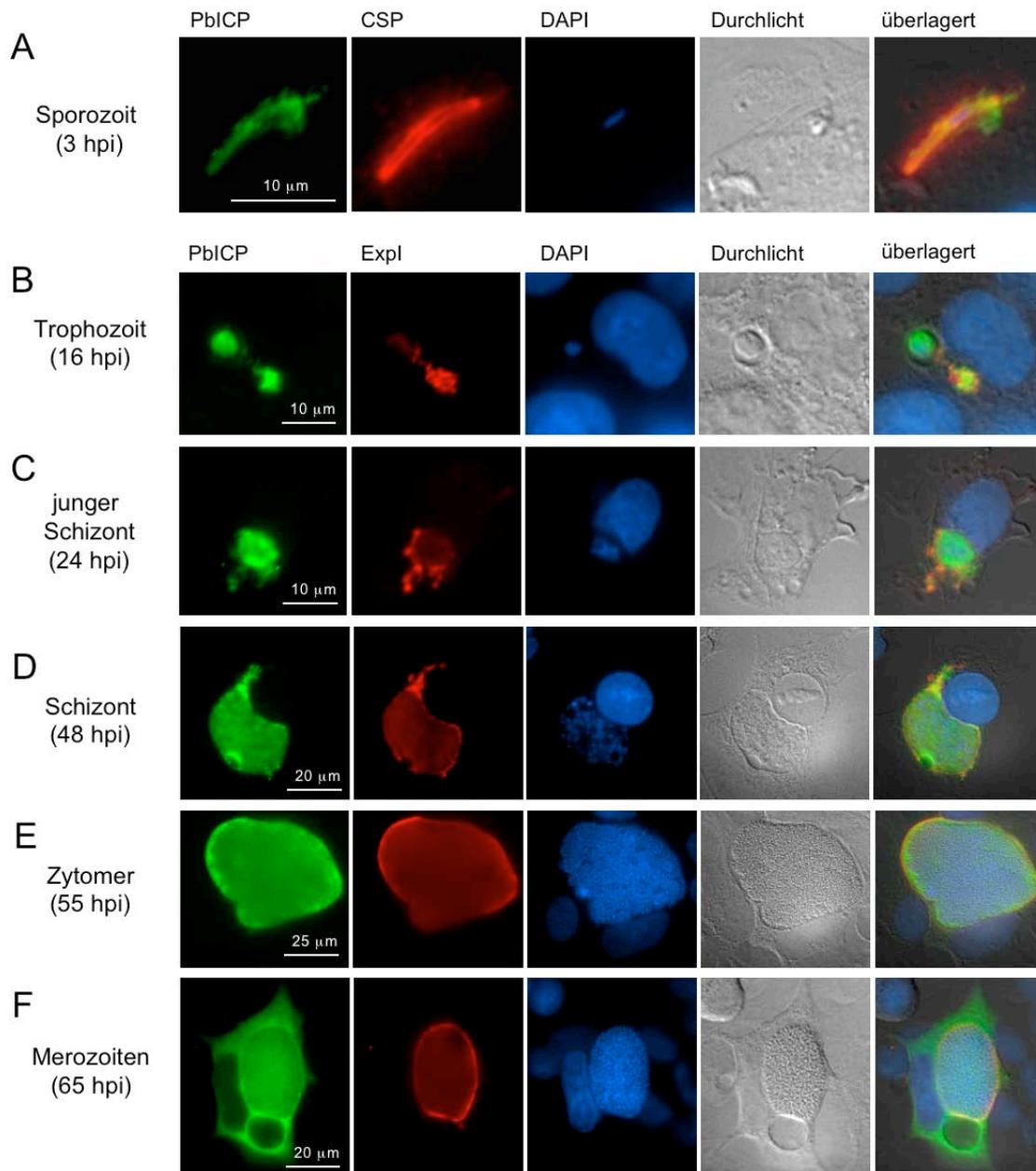


Abbildung 3-7: PbICP kann im Sporozitenstadium und während der gesamten Leberphase von *P. berghei* nachgewiesen werden.

Indirekte Immunfluoreszenzanalyse eines *P. berghei* Sporozoiten (A) und infizierter HepG2 Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion (*hours post infection*) mit *P. berghei* (B-F). Sporozoiten und infizierte Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C und mit polyklonalem Maus-Antiserum gegen CSP oder polyklonalem Hühner-Antiserum gegen Expl inkubiert. Als fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper wurden Anti-Maus-IgG oder Anti-Huhn-IgG konjugiert mit Alexa594 (rot) sowie Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Cy2 (grün) verwendet. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt. CSP ist das Haupt-Oberflächenprotein der Sporozoiten und Expl (exported protein I) ist ein Transmembranprotein der PVM.

3.3.1 *P. berghei* Sporozoiten und junge Leberstadien sezernieren PbICP

Interessanterweise wiesen Sporozoiten in der indirekten Immunfluoreszenzanalyse Vesikel auf, die PbICP enthielten und sezerniert wurden. Dies traf sowohl auf extrazelluläre Sporozoiten als auch auf intrazelluläre Sporozoiten in HepG2-Zellen und die nachfolgenden frühen Leberstadien zu.

PbICP wurde wie CSP und TRAP von freien, kreiselnden Sporozoiten sezerniert (Abbildung 3-8A und 3-8C). Innerhalb der Sporozoiten befindet sich PbICP in Vesikeln, die besonders gut in Abbildung 3-8B zu erkennen sind. Es wurde postuliert, dass der Kontakt mit Wirtszellen eine Akkumulation von TRAP im apikalen Pol der Sporozoiten auslöst⁴⁵. Sporozoiten, die eine solche TRAP-Akkumulation am Vorderende aufwiesen, zeigten auch eine apikale Verdichtung für PbICP (Abbildung 3-8D). Konfokale Aufnahmen der Sporozoiten bestätigten, dass TRAP und PbICP am apikalen Pol kolokalisieren (Daten nicht gezeigt). Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich ein Teil von PbICP wie TRAP in den Mikronemen befindet.

Die Beobachtung, dass PbICP von Sporozoiten sezerniert wird, wurde bestärkt durch Immunfluoreszenzanalysen von unfixierten Sporozoiten (Abbildung 3-9). Dabei wurden zur leichteren Handhabung Sporozoiten verwendet, die zytosolisches mCherry exprimierten. Sie wiesen teilweise nach Inkubation mit Anti-PbICP-C-Antiserum und dem zugehörigen fluoreszierenden Zweitantikörper eine Markierung an einem der Sporozoitenenden auf, bei dem es sich demnach wahrscheinlich um den apikalen Pol handelt. Das zugehörige Präimmenserum führte dagegen zu keiner Markierung der Sporozoiten. Im Fall des Anti-CSP-Antiserums kam es wie erwartet zu einer gleichmäßigen Oberflächenmarkierung der Sporozoiten. Da die Markierung in Suspension erfolgte, konnten keine Protein-Spuren entstehen.

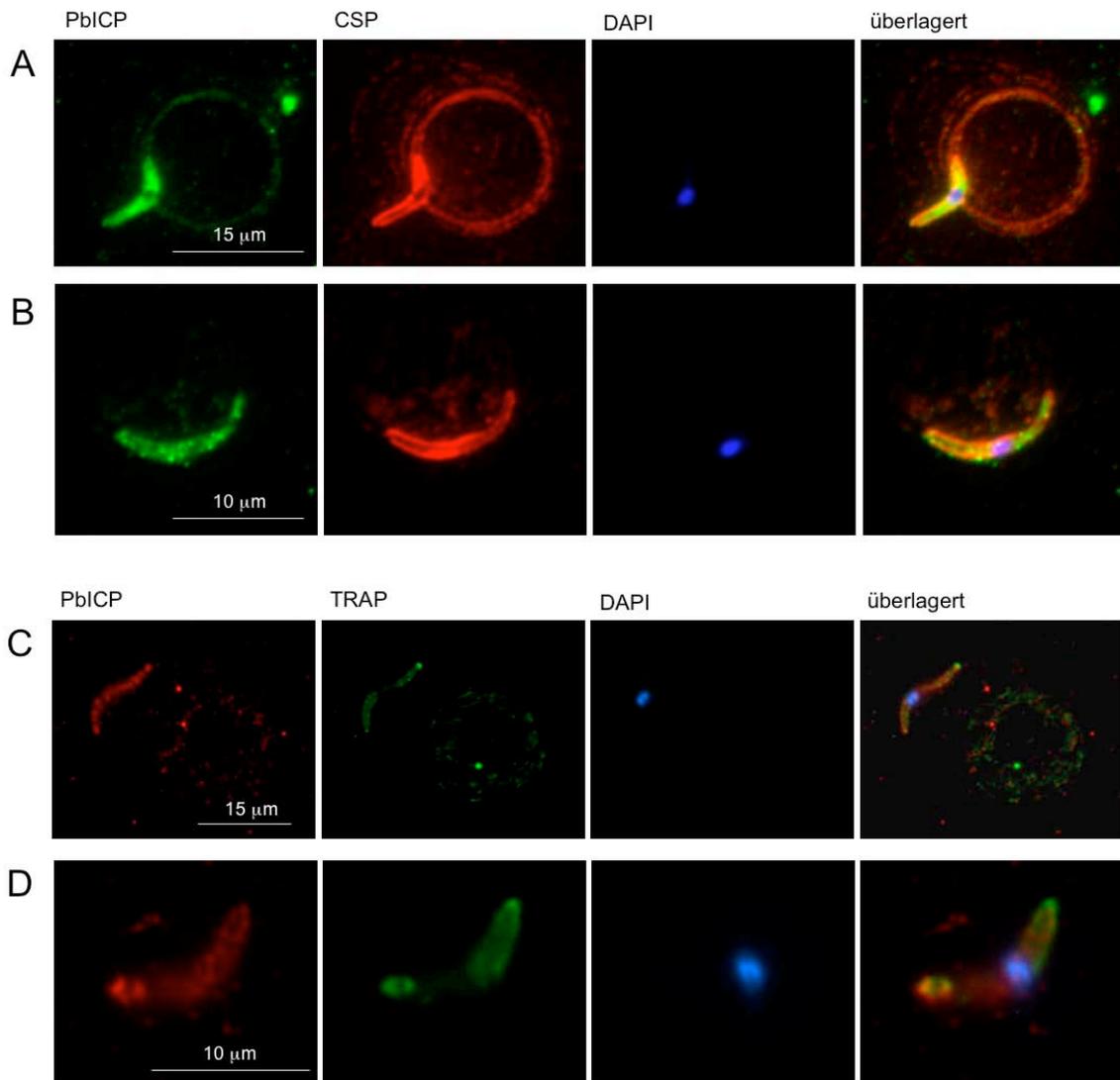


Abbildung 3-8: PbICP wird von extrazellulären Sporozoiten sezerniert.

Indirekte Immunfluoreszenzanalyse freier P. berghei Sporozoiten in Abwesenheit (A, B) oder Anwesenheit von HepG2-Zellen (C, D). Die Sporozoiten wurden auf Deckgläschen ohne oder mit ausgesäten HepG2-Zellen inkubiert, fixiert, permeabilisiert und mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C und polyklonalem Maus-Antiserum gegen CSP (A, B) oder TRAP (C, D) behandelt. Als fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper wurden Anti-Maus-IgG konjugiert mit Alexa594 (rot) und anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Cy2 (grün) verwendet. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt. PbICP kann in den Proteinspuren der Sporozoiten nachgewiesen werden (A, C), befindet sich in Vesikeln im Sporozoiten (B) und akkumuliert wie TRAP am apikalen Pol der Parasiten (D).

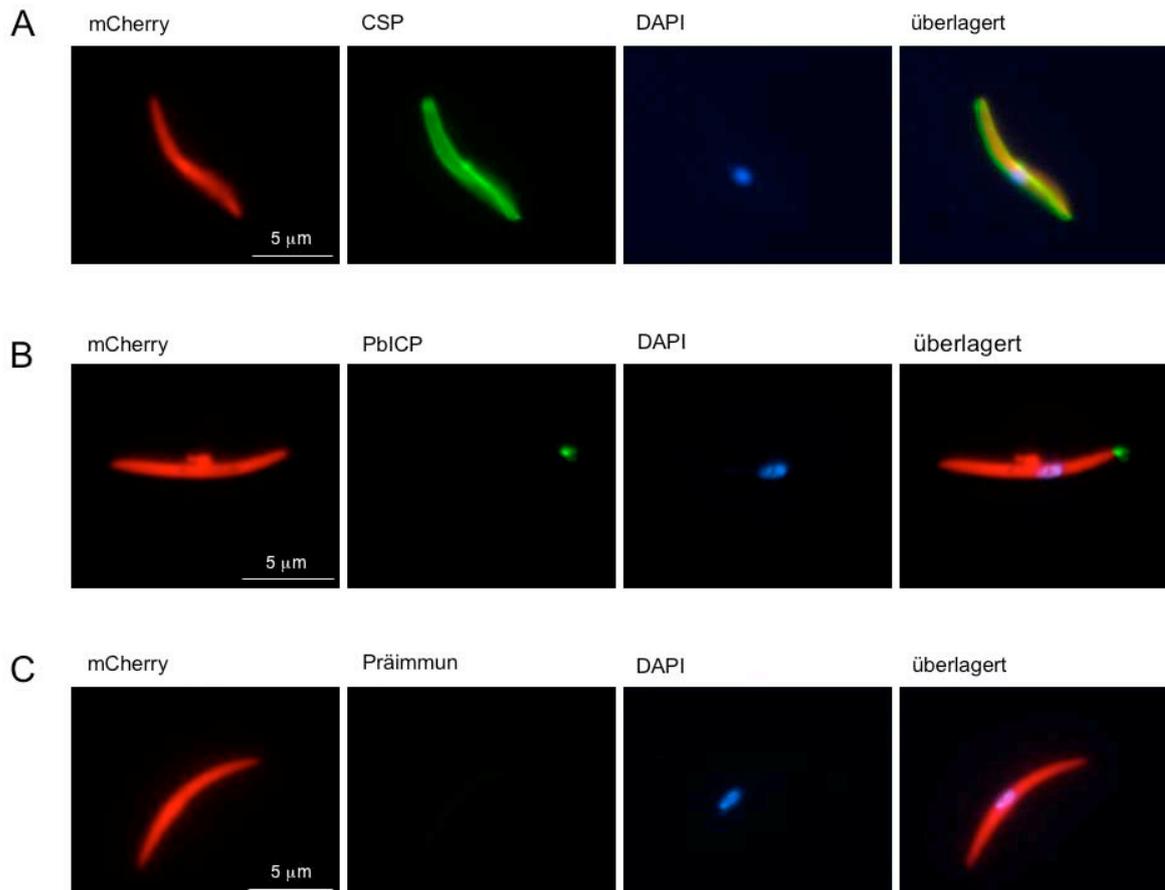


Abbildung 3-9: PbICP ist an einem Pol unfixierter Sporozoiten lokalisiert.

Aus Speicheldrüsen isolierte m-Cherry Sporozoiten (rot) wurden auf Eis mit polyklonalem Mausantiserum gegen CSP (A), mit polyklonalem Kaninchenantiserum gegen PbICP (B) oder dem zugehörigen präimmunem Kaninchenantiserum (C) inkubiert, gewaschen und anschließend mit Cy2-markiertem Anti-Maus-IgG oder Anti-Kaninchen-IgG (grün) behandelt. Die DNA wurde mit Hoechst (blau) markiert. Nach weiteren Waschschritten wurden die Sporozoiten sofort auf ein Deckglas überführt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Nicht nur freie Sporozoiten, sondern auch intrazelluläre Sporozoiten und die nachfolgenden Entwicklungsstadien (Lebertrophozoiten und junge Leberschizonten) zeigten in den Immunfluoreszenzanalysen eine Sezernierung von PbICP (Abbildung 3-10 und Abbildung 3-11). Mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass PbICP - ähnlich wie es für CSP beschrieben wurde - in unregelmäßigen Strukturen in der Nähe des Wirtszellkerns von den Parasiten abgesondert wurde (Abbildung 3-12).

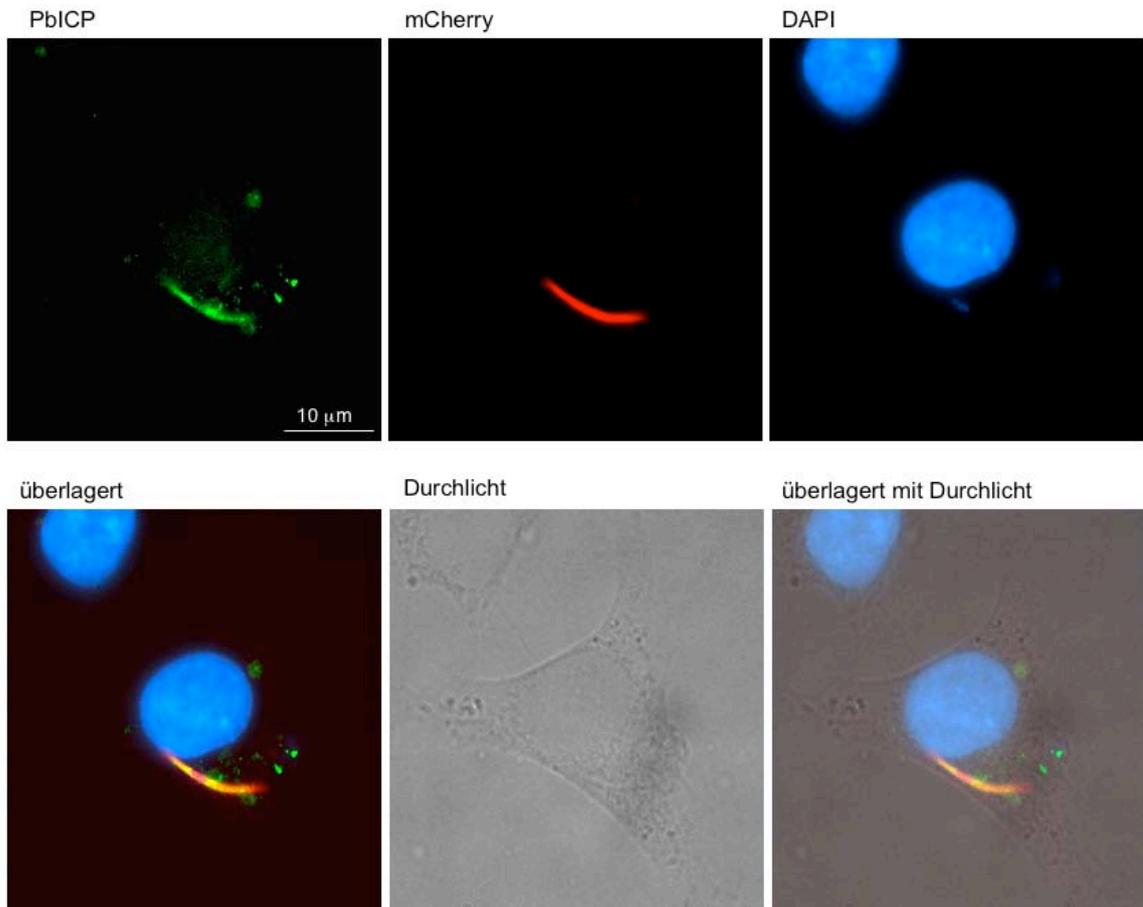


Abbildung 3-10: PbICP wird von intrazellulären Sporozoiten sezerniert.

Aus Speicheldrüsen isolierte mCherry-Sporozoiten wurden zusammen mit adhärenenten HepG2-Zellen inkubiert, 4 Stunden nach Infektion fixiert, permeabilisiert und für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet. Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C wurde als Erstantikörper und Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Cy2 (grün) als Zweitantikörper verwendet. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

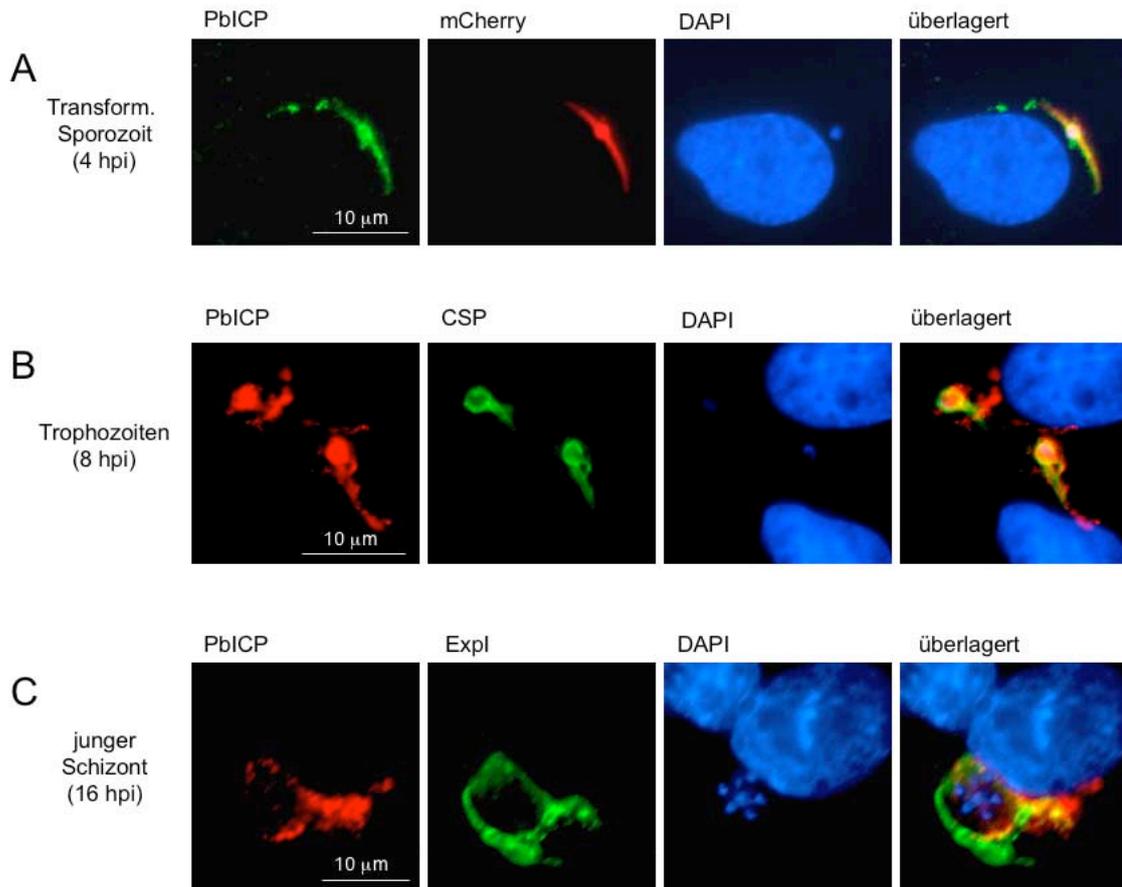


Abbildung 3-11: PbICP wird von transformierenden Sporozoiten, Lebertrophozoiten und jungen Leberschizonten in der Nähe des Wirtszellkerns sezerniert.

Aus Speicheldrüsen isolierte *mCherry*-Sporozoiten (**A**) oder WT Sporozoiten (**B**, **C**) wurden zusammen mit adhärenenten HepG2-Zellen inkubiert, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion fixiert (*hours post infection*), permeabilisiert und für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet. Bei den *mCherry*-Parasiten (rot) wurde polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C und Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Cy2 (grün) verwendet. Zur Färbung der WT-Trophozoiten wurde das polyklonale Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C und Maus-Antiserum gegen CSP verwendet, bei dem jungen Schizonten wurde das Anti-PbICP-C-Antiserum mit Hühner-Antiserum gegen Expl kombiniert. Als fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper wurden Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Alexa594 (rot) und Anti-Maus- bzw. Anti-Huhn-IgG konjugiert mit Cy2 (grün) verwendet. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

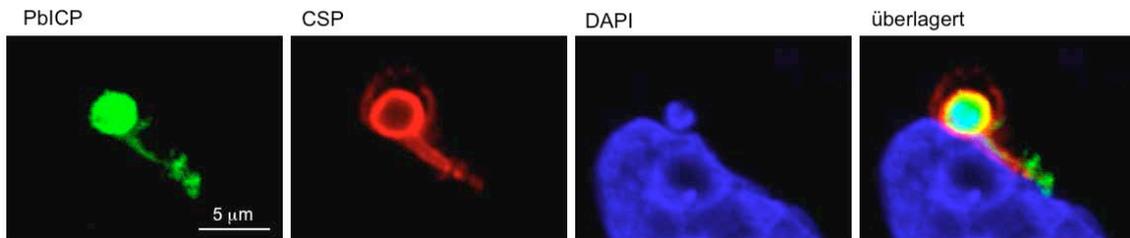


Abbildung 3-12: Konfokale Aufnahmen bestätigen die Sekretion von PbICP in der Nähe des Wirtszellkerns.

Konfokales Immunofluoreszenzbild von P. berghei Sporozoiten nach Invasion von HepG2-Zellen. Die Färbung erfolgte wie in Abbildung 3-8A, B.

Die Lokalisation von PbICP in Vesikeln der Sporozoiten konnte durch immunoelektronenmikroskopische Studien von Mitteldarm-Sporozoiten und Speicheldrüsen-Sporozoiten bestätigt werden (Abbildung 3-13). Zudem konnte mit Hilfe der Immunoelektronenmikroskopie bestätigt werden, dass PbICP von extrazellulären Sporozoiten und intrazellulären Sporozoiten, die HepG2-Zellen unter Ausbildung einer PV invadiert hatten, sekretiert wurde (Abbildung 3-14).

Ob PbICP auch in transmigierte Zellen abgesondert wird, ist Gegenstand der derzeitigen Forschung.

Um die partielle Kolokalisation von TRAP und PbICP in sekretorischen Vesikeln der Sporozoiten auf subzellulärer Ebene genauer zu untersuchen, wurden immunoelektronenmikroskopische Doppelmarkierungen von Speicheldrüsen-Sporozoiten angefertigt (Abbildung 3-15). In Übereinstimmung mit den Immunfluoreszenzbildern enthielten die Sporozoiten Vesikel, die sowohl TRAP als auch PbICP enthielten. Dies unterstützt die Annahme, dass PbICP über die Mikronemen sezerniert werden kann.

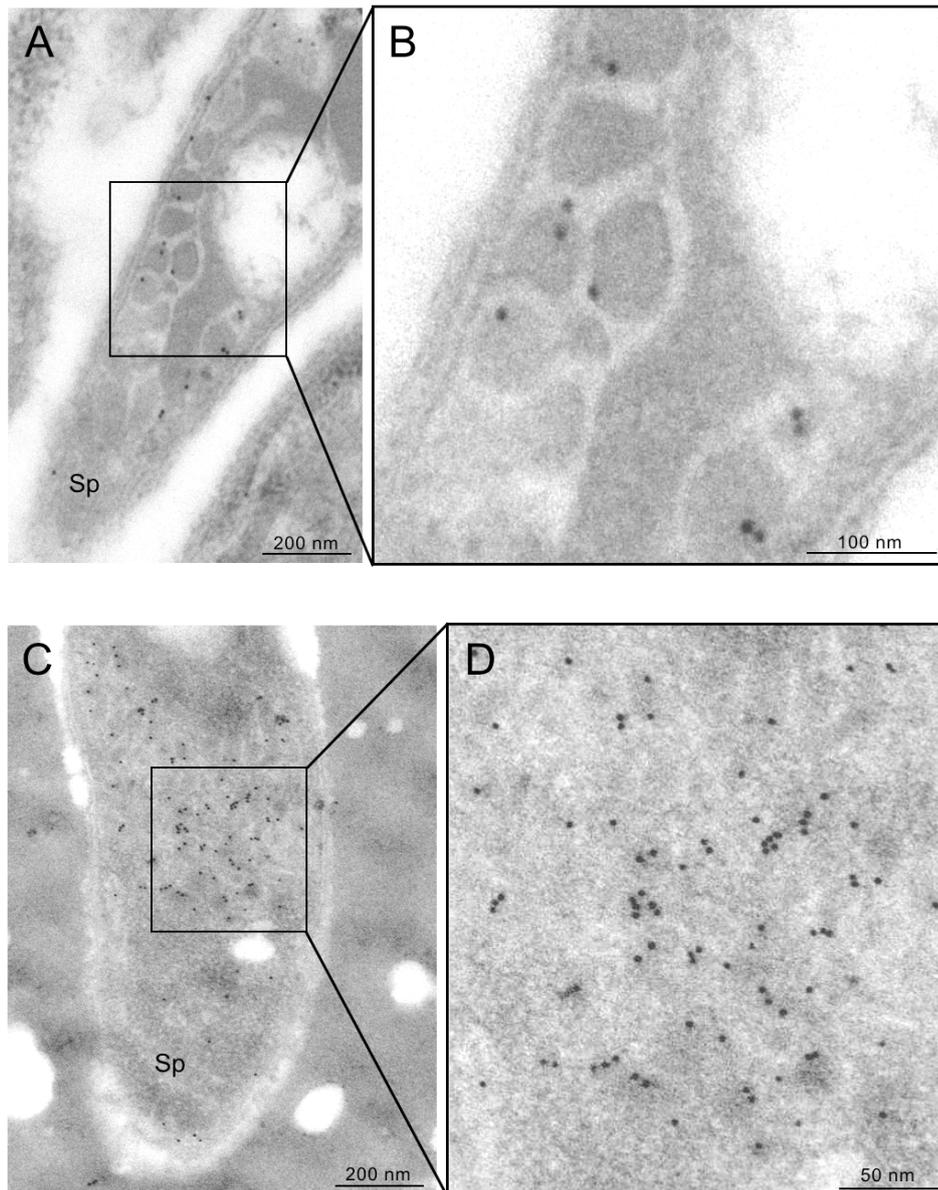


Abbildung 3-13: PbICP befindet sich in Vesikeln von *P. berghei* Sporozoiten.

Mitteldarm-Sporozoit (A, B) und Speicheldrüsen-Sporozoit (C, D) in einer immunelektronenmikroskopischen Studie. Die Dünnschnitte wurden mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C und anschließend mit ProteinA-Gold (10 nm) inkubiert. Die Kontrastierung der Schnitte erfolgte mit Uranylacetat und Bleicitrat. Sp = Sporozoit

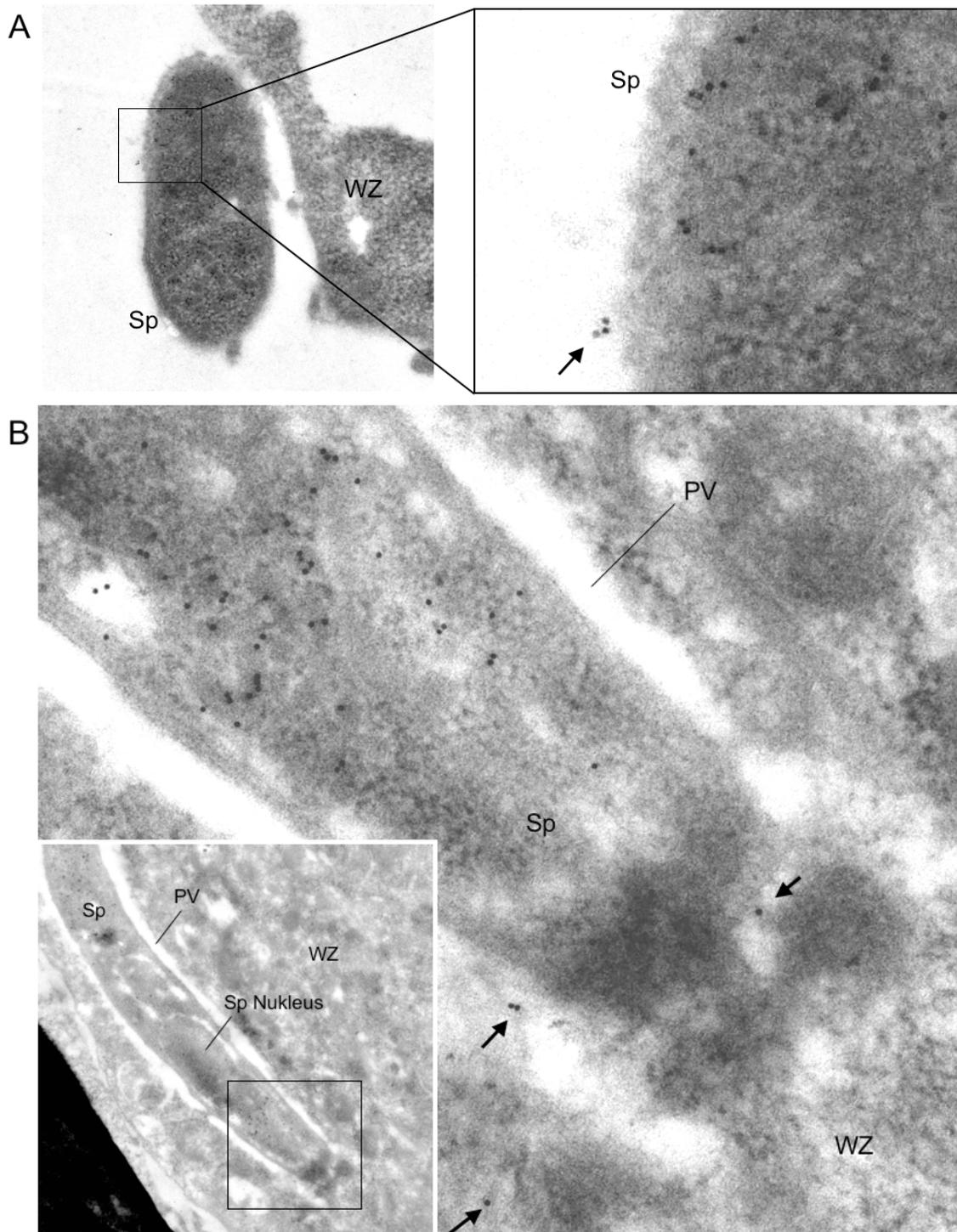


Abbildung 3-14: IEM-Studien bestätigen, dass PbICP von freien und intrazellulären Sporozoiten sezerniert wird.

Sporozoiten (Sp) wurden aus Speicheldrüsen infizierter Mücken isoliert, zu den HepG2-Wirtszellen (WZ) gegeben, nach 4 Stunden fixiert und für immunoelektronenmikroskopische Studien präpariert. Die Dünnschnitte wurden mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C und anschließend mit ProteinA-Gold (10 nm) inkubiert. Die Kontrastierung der Schnitte erfolgte mit Uranylacetat und Bleicitrat. Es befanden sich sowohl extrazelluläre (A) als auch intrazelluläre (B) Sporozoiten in den Präparaten. PV = parasitophore Vakuole

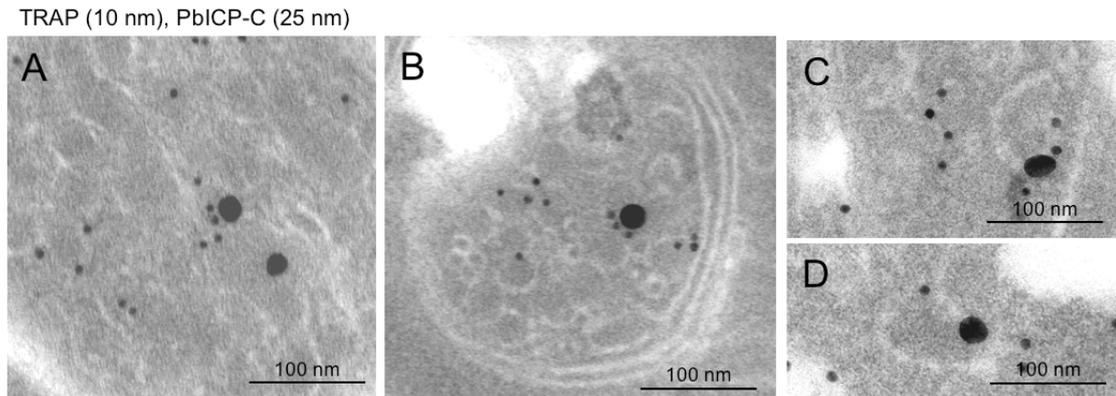


Abbildung 3-15: PbICP kolokalisiert in Vesikeln mit TRAP und CSP (IEM).

*Speicheldrüsen-Sporozoit*en wurden für immunelektronenmikroskopische Studien präpariert. Die Dünnschnitte wurden mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C und polyklonalem Maus-Antiserum gegen TRAP inkubiert. Kaninchen-Antikörper wurden anschließend mit ProteinA-Gold (25 nm) und Maus-Antikörper mit 10 nm-Goldpartikel-markierten Anti-Maus-IgG sichtbar gemacht. Die Kontrastierung der Schnitte erfolgte mit Uranylacetat und Bleicitrat.

3.3.2 Ein Teil von PbICP wird in die PV transportiert

Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass PbICP teilweise in die parasitophore Vakuole von Leberschizonten transportiert wird, während ein anderer Teil des Inhibitors im Parasitenzytosol zu finden ist (Abbildung 3-16, Abbildung 3-17 und Abbildung 3-19A). PbICP weist eine partielle Kolokalisation mit dem PVM-Markerprotein Expl sowie mit dem PV-Markerprotein SERA2 auf und unterscheidet sich am Randbereich der Parasiten klar von den Parasitenzytosolmarkern Hsp90 und GFP in GFPcon Parasiten. Es konnte allerdings im Gegensatz zu den frühen Stadien keine Sezernierung von PbICP in die Wirtszelle nachgewiesen werden. Es ist aber denkbar, dass PbICP in so kleinen Mengen sezerniert wird, dass Immunfluoreszenzanalysen für den Nachweis nicht sensitiv genug sind.

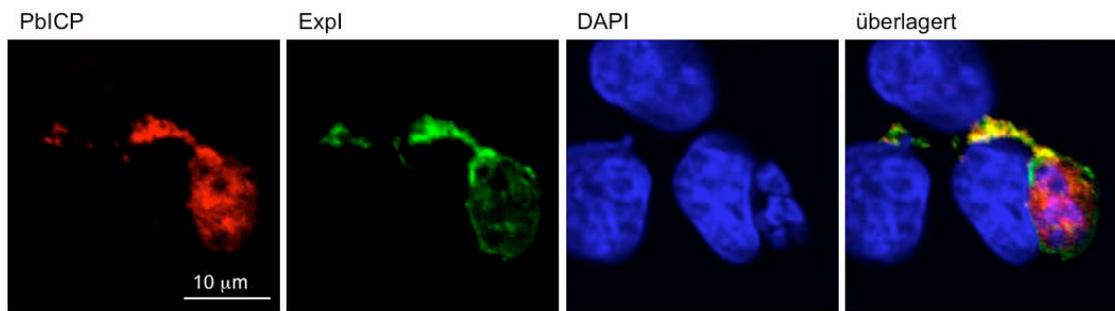


Abbildung 3-16: PbICP kolokalisiert partiell mit dem PVM-Marker Expl.

Konfokales Immunfluoreszenzbild eines Leberschizonten 30 Stunden nach Infektion. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und anschließend mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C und Huhn-Antiserum gegen Expl inkubiert. Als fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper wurden Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Alexa594 (rot) und Anti-Huhn-IgG konjugiert mit Cy2 (grün) verwendet. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

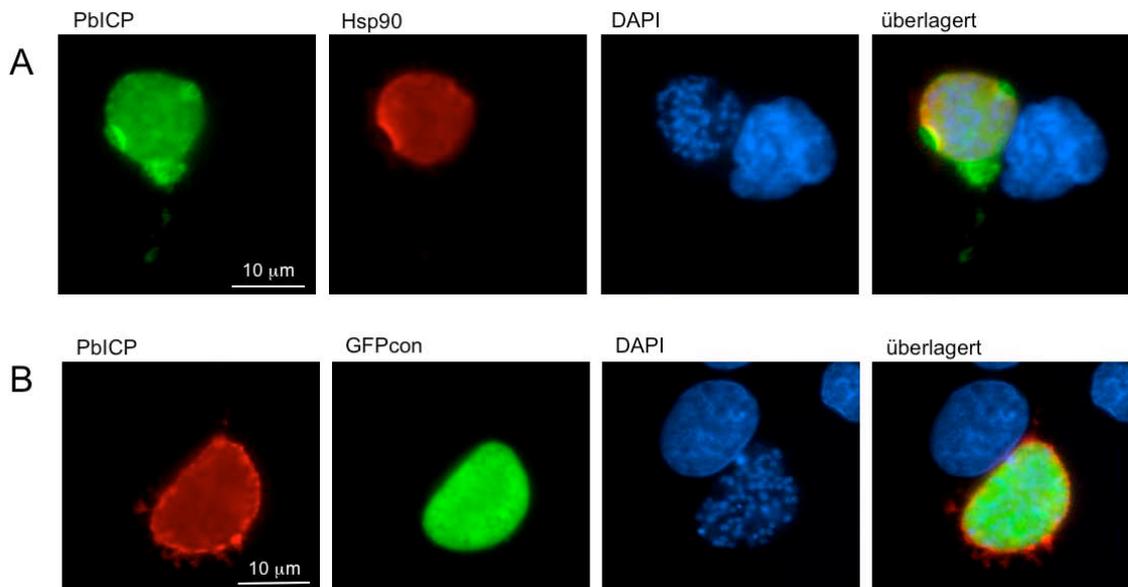


Abbildung 3-17: Ein großer Teil von PbICP ist außerhalb des Parasitenzytosols lokalisiert.

Immunfluoreszenzanalyse von WT (A) oder GFPcon (B) Leberschizonten 48 Stunden nach Infektion. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und anschließend mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C und Hühner-Antiserum gegen Hsp90 bzw. Maus-Antiserum gegen GFP inkubiert. Als fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper wurden Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Cy2 (grün) oder Alexa594 (rot) und Anti-Huhn-IgG konjugiert mit Alexa594 (rot) bzw. Anti-Maus-IgG konjugiert mit Cy2 (grün) verwendet. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

Auch in den erythrozytären Parasitenstadien war ein Teil von PbICP innerhalb des Parasiten und der andere Teil des Inhibitors in der PV lokalisiert (Abbildung 3-18).

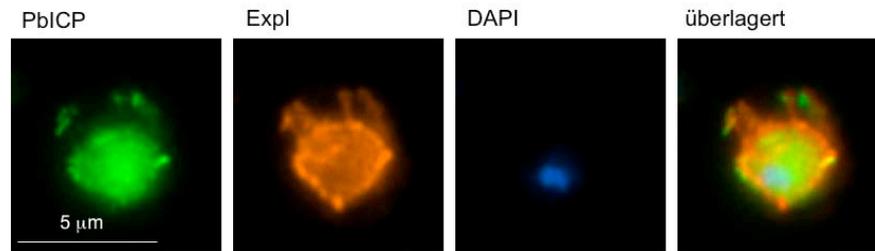


Abbildung 3-18: PbICP kolokalisiert auch in erythrozytären Stadien partiell mit dem PVM-Marker Expl und kann in PV-assoziierten vesikulären Strukturen nachgewiesen werden.

Indirekte Immunfluoreszenzanalyse eines erythrozytären P. berghei Parasiten. Es wurde Blut von einer P. berghei infizierten NMRI Maus entnommen, die Blutzellen fixiert, permeabilisiert und mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C sowie mit Hühner-Antiserum gegen Expl inkubiert. Als Zweitantikörper wurden Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Cy2 (grün) und Anti-Huhn-IgG konjugiert mit Cy5 (orange) verwendet. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

3.3.3 PbICP-Freisetzung in das Hepatozytenzytoplasma am Ende der Leberphase

Nachdem die Parasiten sich in den Hepatozyten zu Merozoiten differenziert haben, wird die PVM degradiert und die Merozoiten verteilen sich im Wirtszellzytosol. Wie die SERA-Proteasen von *P. berghei* wurde PbICP am Ende der Leberphase in das Wirtszellzytosol freigesetzt (Abbildung 3-19B). Oftmals konnte PbICP bereits im Wirtszellzytosol lokalisiert werden, bevor eine mikroskopisch sichtbare Auflockerung der ringförmigen Expl-Färbung zu sehen war und bevor durch kondensierte Wirtszellkerne und Wirtszellabrundung der eingeleitete Zelltod angezeigt wurde (Abbildung 3-20A).

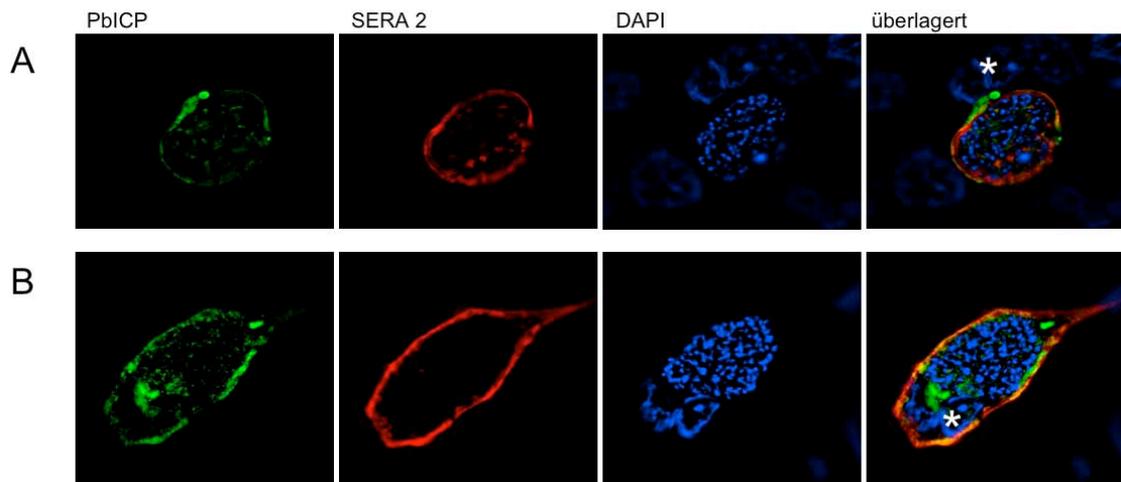


Abbildung 3-19: PbICP kolokalisiert mit dem PV-Marker SERA2 im Schizontenstadium in der PV und am Ende der Leberphase im Wirtszellzytosol.

Immunfluoreszenzbilder (nach Dekonvolution) von infizierten HepG2-Zellen 48 Stunden (A) und 58 Stunden (B) nach Infektion. Die Position der Wirtszellkerne ist in den überlagerten Bildern mit einem Stern gekennzeichnet. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und anschließend mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C und Maus-Antiserum gegen SERA2 inkubiert. Als fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper wurden Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Cy2 (grün) und Anti-Maus-IgG konjugiert mit Alexa594 (rot) verwendet. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

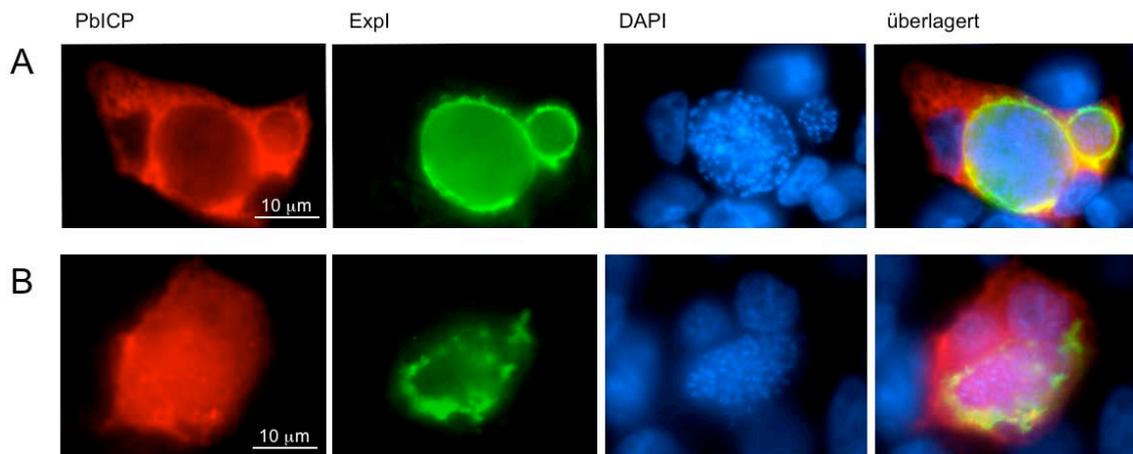


Abbildung 3-20: PbICP wird am Ende der Leberphase in die Wirtszelle freigesetzt.

Immunfluoreszenzbilder von *P. berghei* infizierten HepG2-Zellen am Ende der Leberphase vor einer offensichtlichen PVM-Degradation und vor dem Eintreten des Wirtszelltods (A) sowie nach Auflösung der PVM und morphologischer Veränderungen der Wirtszelle (B). Die Durchführung erfolgte wie in Abbildung 3-16 beschrieben.

3.4 PbICP wird posttranslational prozessiert

Interessanterweise zeigten Western Blot-Analysen von erythrozytären Schizonten und Speicheldrüsen-Sporoziten eine posttranslationale Prozessierung von PbICP (Abbildung 3-21). Das Antiserum, das gegen die C-terminale Chagasin-ähnliche Domäne (PbICP-C) gerichtet war, erkannte nicht nur ein 55 kDa-Protein, das dem Volllängen-Protein entsprach, sondern zusätzlich eine prozessierte Form des Inhibitors auf der Höhe von 23 kDa. Das Volllängen-Protein lief auf der Höhe des rekombinanten PbICP und somit 15 kDa höher als das eigentlich errechnete Molekulargewicht. Spezifisches Peptid-Antiserum, das gegen die N-terminale Verlängerungsregion von PbICP (PbICP-N) gerichtet war, erkannte dagegen im gleichen Lysat der erythrozytären Schizonten nur das 55 kDa-Protein. Dies lässt vermuten, dass die *Plasmodium*-spezifische N-terminale Verlängerung bei der Prozessierung des Inhibitors abgebaut wird. In Sporozitenextrakten lag nahezu das gesamte PbICP in der prozessierten Form vor.

Aufgrund der sehr geringen Infektionsraten in der Leberphase war es zunächst nicht möglich, PbICP in Lysaten infizierter HepG2-Zellen mittels Western Blot-Analysen nachzuweisen. Allerdings zeigten Immunfluoreszenzanalysen von infizierten HepG2-Zellen auch in der Leberphase deutliche Anzeichen für eine Prozessierung des Inhibitors, bei der die N-terminale Region degradiert wird (Abbildung 3-22). PbICP-N und PbICP-C kolokalisierten in Vesikeln und in der PV von Leberschizonten, aber es gab auch Regionen innerhalb des Parasiten und in der PV, in denen nur PbICP-C nachgewiesen werden konnte.

Um die Prozessierung von PbICP in der Leberphase auch mittels Western Blot-Analyse zu bestätigen, wurden transgene *P. berghei* Parasiten generiert, die PbICP als GFP-Fusionsprotein in großen Mengen exprimierten. Das mit Hilfe eines Expressionsplasmids eingeführte *pbicp-gfp*-Gen stand unter der Kontrolle des konstitutiven und sehr starken Promotors des Gens *pbeef1aa*. Eine schematische Darstellung des Expressionsplasmids befindet sich in Abbildung 3-23A.

Durch die Überexpression war es nun möglich, die Prozessierung des PbICP-GFP-Proteins auch in den Lysaten infizierter HepG2-Zellen im Western Blot nachzuweisen (Abbildung 3-23B, C). Die unter Einbeziehung des besonderen Laufverhaltens von PbICP berechnete Größe des Fusionsproteins lag bei ca. 80 kDa und nach Prozessierung bei 46 kDa. Mit dem Anti-GFP-Antiserum wurden im Western Blot von Sporoziten und späten Leberparasiten, bei denen die Stadien vor und nach dem Ablösen der Wirtszellen berücksichtigt wurden, hauptsächlich die prozessierte Form des Fusionsproteins vorgefunden. In Blutstadien wurde sowohl das Volllängen-PbICP-GFP als auch die prozessierte Form nachgewiesen. Der Grad der Prozessierung des Inhibitors PbICP variierte allerdings in verschiedenen Experimenten, was darauf hindeutet, dass die Prozessierung nicht stadienabhängig ist.

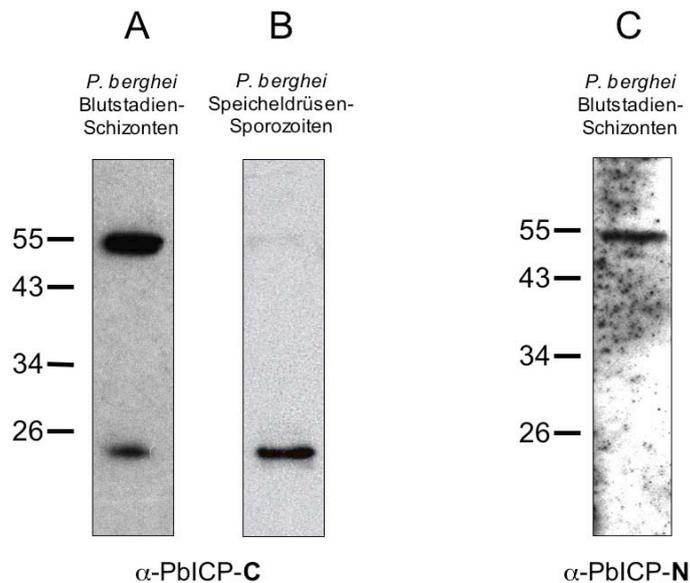


Abbildung 3-21: PbICP wird während der Blutphase und im Sporozoitienstadium posttranslational prozessiert.

Western Blot-Analyse von *P. berghei* Blutstadienextrakten (A, C) and Lysaten von Speicheldrüsen-Sporozoitien (B). Die Schizonten wurden über eine Übernacht-Kultur im Blut infizierter Mäuse angereichert, über Dichtegradientenzentrifugation isoliert und in Probenpuffer aufgenommen (A, C). Aus infizierten Anopheles-Mücken wurden Speicheldrüsen direkt in Probenpuffer überführt (B). Sowohl das Schizontentotallysat als auch das Speicheldrüsen-Totallysat wurde mit Benzonase behandelt, um die enthaltene DNA zu zerkleinern. Zum Nachweis des Inhibitors wurden entweder polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C oder ein Kaninchen-Antiserum verwendet, das gegen ein Peptid innerhalb von PbICP-N gerichtet war.

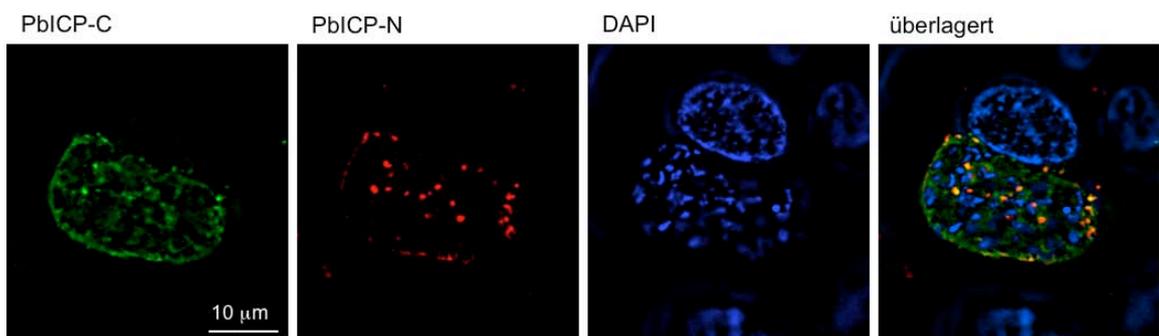


Abbildung 3-22: PbICP wird im Leberschizonten posttranslational prozessiert.

Immunfluoreszenzanalyse eines *P. berghei* Leberschizonten nach Dekonvolution. Infizierte HepG2-Zellen wurden nach 48 Stunden fixiert, permeabilisiert und anschließend mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C und Maus-Antiserum gegen PbICP-N inkubiert. Als fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper wurden Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Cy2 (grün) und Anti-Maus-IgG konjugiert mit Alexa594 (rot) verwendet. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

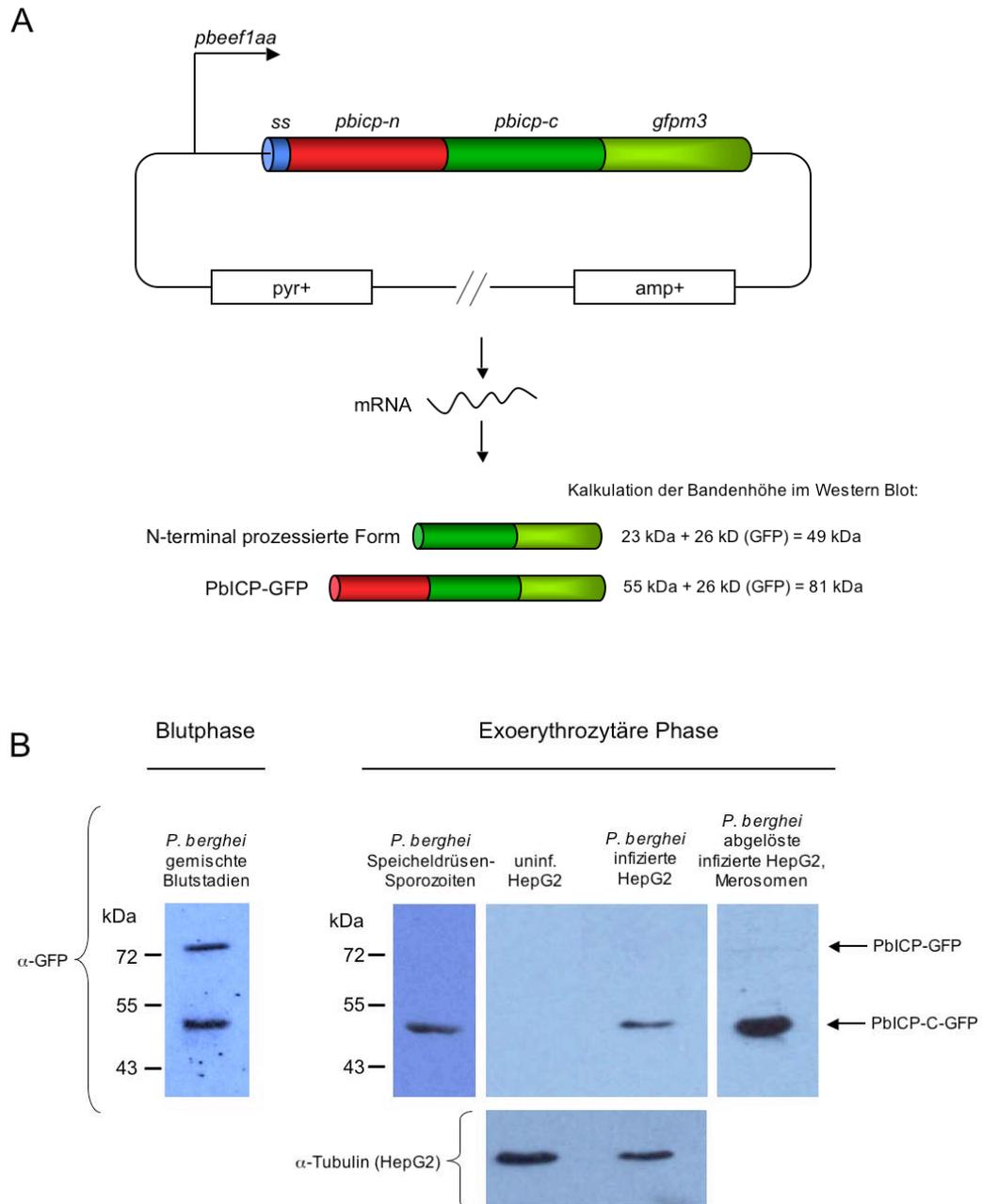


Abbildung 3-23: Western Blot-Analysen von Blutstadien, Sporozoiten und Leberstadien der PbICP-GFP exprimierenden Parasiten bestätigten die Prozessierung von PbICP.

Schematische Darstellung des Transfektionsplasmids pL0017-pbicip-gfp (A). Der pbicip-gfp-codierende Bereich steht unter der Kontrolle des konstitutiven starken Promotors von pbeef1aa und der Vektor vermittelt eine Ampicillinresistenz (amp⁺) in *E. coli* und eine Pyrimethaminresistenz (pyr⁺) in den transfizierten Plasmodien. Die Abkürzung ss steht für die endogene Signalsequenz von PbICP. (B) Anti-GFP-Western Blot-Analysen von *P. berghei* Blutstadienextrakten, von Speicheldrüsen-Sporozoiten, infizierten HepG2-Zellen 60 Stunden nach Infektion und von abgelösten parasitengefüllten HepG2-Zellen / Merosomen zeigten eine Bande auf der Höhe, die der kalkulierten Größe der N-terminal prozessierten PbICP-GFP-Form (46 kDa) entspricht. Lysate uninfizierter HepG2-Zellen dienen als Spezifitätskontrolle und Wirtszelltubulin als Ladekontrolle.

Die transgenen Parasiten wurden auch für Lokalisationsstudien genutzt, um die Ergebnisse der zuvor durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen (Abbildung 3-7) mittels Lebendfluoreszenzmikroskopie zu überprüfen (Abbildung 3-24). Der hier gezeigte PbICP-GFP exprimierende Sporozoit wies eine verstärkte GFP-Fluoreszenz an einem der zwei Pole auf, bei dem es sich demnach wahrscheinlich um das apikale Ende handelt (Abbildung 3-24A). Allerdings konnte keine PbICP-GFP-Sekretion beobachtet werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich der Inhibitor nach der Sezernierung sofort im Medium verteilt. Ein großer Teil des PbICP-GFP befand sich im Sporozoitenzytosol, was die Visualisierung der sekretorischen Vesikel nahezu unmöglich machte und höchstwahrscheinlich durch die starke Überexpression verursacht wurde. Nach der Invasion von HepG2-Zellen konnte dagegen eine Sekretion von PbICP-GFP in die Wirtszelle nachgewiesen werden (Abbildung 3-24B). Im frühen und späten Schizontenstadium war PbICP-GFP wie erwartet sowohl in der PV als auch im Parasitenzytosol zu finden (Abbildung 3-24C, D). Am Ende der Leberphase befand sich PbICP-GFP im Wirtszellzytosol der abgelösten, Parasiten-gefüllten HepG2-Zellen (Abbildung 3-24E).

Die Überexpression von PbICP-GFP führte zu keinem auffälligen Phänotyp. Die transgenen Parasiten konnten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* den gesamten Lebenszyklus durchlaufen (Daten nicht gezeigt).

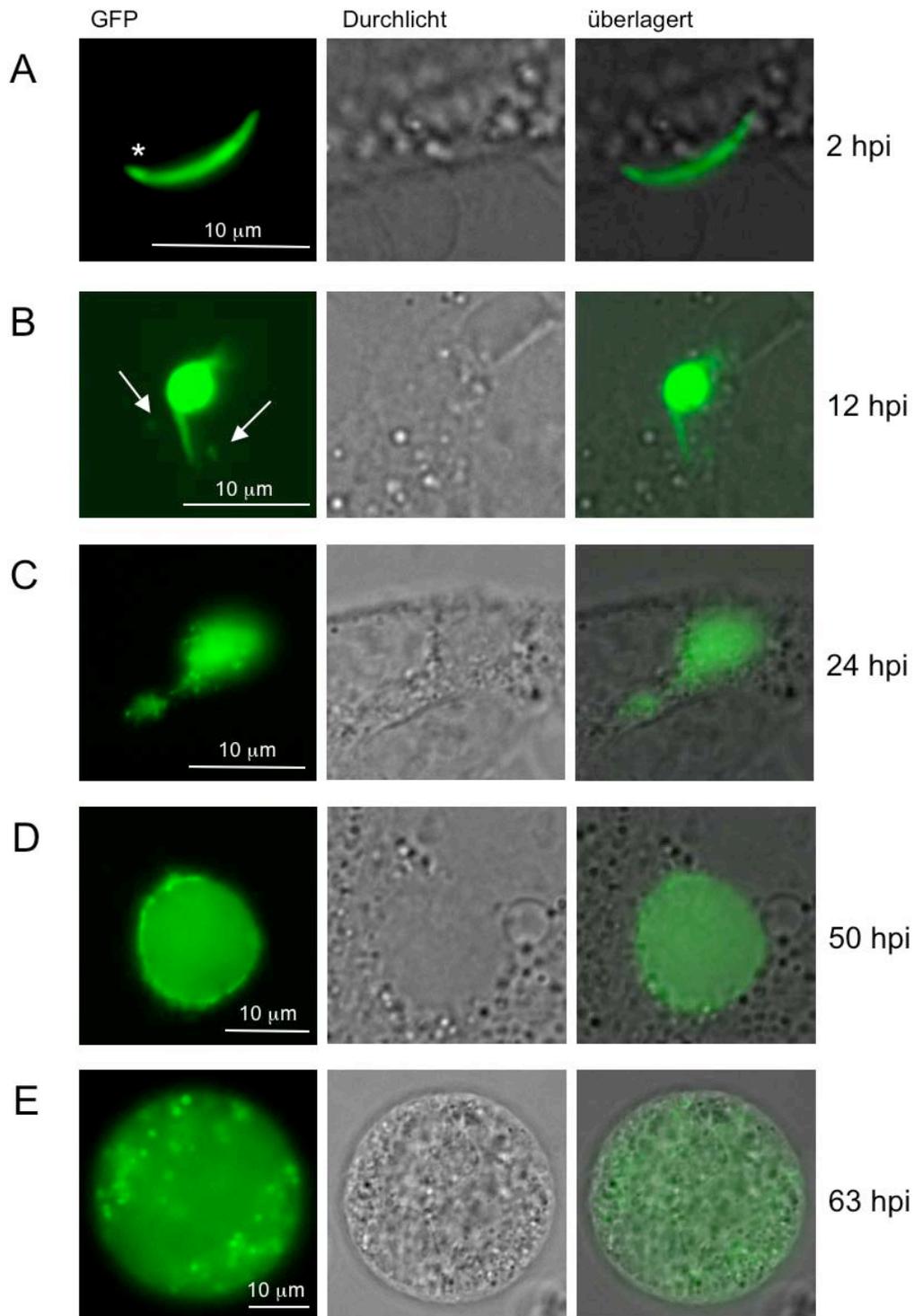


Abbildung 3-24: Lebendmikroskopische Aufnahmen von Leberstadien der PbICP-GFP exprimierenden *P. berghei*-Parasiten

Die mit den PbICP-GFP exprimierenden *P. berghei*-Parasiten infizierten HepG2-Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion (hours post infection) im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Der hier gezeigte Sporozoit (A) zeigte eine GFP-Akkumulation an einem Pol (*) und im frühen Leberparasitenstadium (B) wurde PbICP-GFP sekretiert (Pfeile). Im Schizontenstadium war PbICP-GFP sowohl in der PV als auch im Parasitenzytosol zu finden (C, D). Am Ende der Leberphase befand sich PbICP-GFP im Wirtszellzytosol der abgelösten, Parasiten-gefüllten HepG2-Zelle (E).

3.5 Die N-terminale Region von PbICP ist nicht notwendig für die Inhibitorfunktion

Die charakteristischen Inhibitormotive der Chagasinfamilie befinden sich ausschließlich in der C-terminalen Domäne von PbICP und sind somit nach der Prozessierung des Proteins noch vorhanden. In der vorangegangenen Diplomarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass rekombinantes His₁₀- und GST-PbICP-C^{GDEK} (Aminosäuren 190 - 354 von PbICP) ohne die N-terminale Sequenz starke Inhibitoren von Papain und Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen aus *E. histolytica*-Lysaten sind.

Obwohl klar gezeigt werden konnte, dass PbICP prozessiert wird, war nicht bekannt, an welcher Stelle das Protein proteolytisch geschnitten wird. Versuche, die Sequenz der endogenen prozessierten Form von PbICP mit Hilfe der Massenspektrometrie zu ermitteln, waren aufgrund des geringen Ausgangsmaterials bisher nicht erfolgreich.

Um trotzdem eine genauere Vorstellung von der Prozessierungsstelle zu bekommen, wurde zunächst das Molekulargewicht des endogen prozessierten Inhibitors in Blutstadienextrakten mit Hilfe von Gradientengelen bestimmt (Daten nicht gezeigt). Das ermittelte Molekulargewicht betrug 21 kDa. Unter der Annahme, dass PbICP nur vom N-Terminus her prozessiert wird, wurde mit Datenbanken die zugehörige Aminosäuresequenz ermittelt. Das im Vergleich zu PbICP-C^{GDEK} um 23 Aminosäuren verlängerte PbICP-C^{KS} (Aminosäuren 166 - 354 von PbICP) besitzt rechnerisch ein Molekulargewicht von 21 kDa. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Prozessierungsstelle von PbICP in der Sequenzregion INI(165) - K(166)SN liegt. Sequenzvergleiche zeigten, dass auch PylCP und PflCP an dieser Stelle eine kleine aliphatische Aminosäure und eine basische Aminosäure aufweisen (Abbildung 3-25A, oben), die nach Vorhersagen der Datenbank MEROPS eine potentielle Serinproteaseschnittstelle ist. PbICP-C^{KS} wurde rekombinant in *E. coli* ohne Fusionsanhang hergestellt. Als Vergleich diente rekombinantes PbICP-C^{GDEK} ohne Fusionsanhang. Beide Proteine waren löslich, ließen sich mittels Ionenaustauschchromatographie direkt aus dem *E. coli*-Lysat reinigen und wurden zusammen mit dem rekombinanten Vollängenprotein und PbICP-C^{GDEK} im Western Blot mit dem endogenen prozessierten PbICP aus Blutstadienextrakten verglichen (Abbildung 3-25B). In der Tat lief PbICP-C^{KS} im Western Blot auf der gleichen Höhe wie die prozessierte Inhibitorform im *P. berghei* Lysat. PbICP-C^{GDEK} wies erwartungsgemäß ein kleineres Molekulargewicht auf und das rekombinante Vollängenprotein lief wie das endogene unprozessierte PbICP auf einer Höhe von 55 kDa.

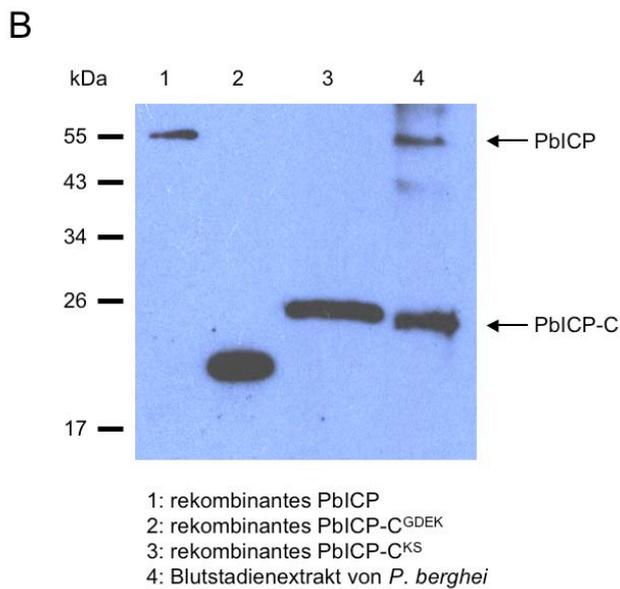
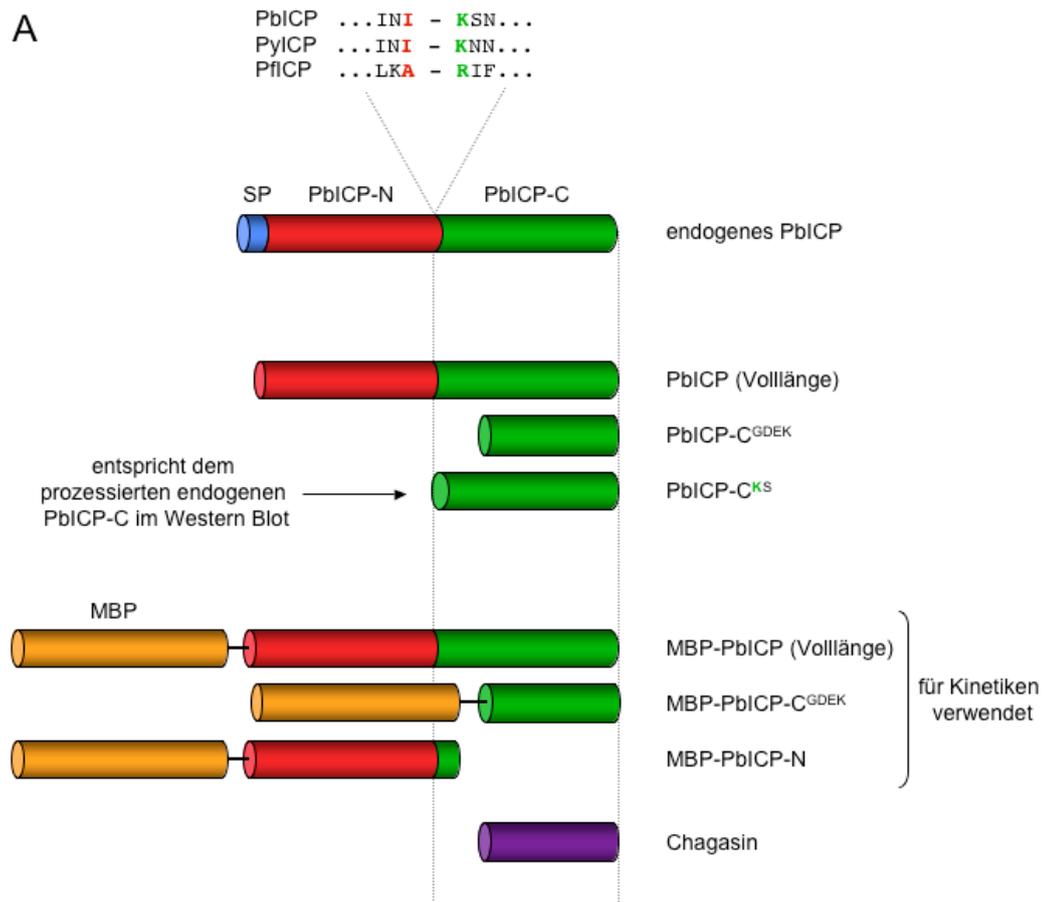


Abbildung 3-25: Rekombinante PbICP-Konstrukte im Vergleich zum endogen prozessierten PbICP

(A): Schematische Darstellung der hypothetischen Prozessierungsstelle von PbICP und der hergestellten PbICP-Konstrukte. (B): Western Blot-Analyse von rekombinantem Vollängen-PbICP, PbICP-C^{GDEK} und PbICP-C^{KS} (alle ohne Fusionsanhang) im Vergleich mit den PbICP im *P. berghei* Blutstadienextrakt. Zum Nachweis des Inhibitors wurden polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C verwendet.

Da die rekombinanten Proteine PbICP-C^{GDEK} und PbICP-C^{KS} in ersten Experimenten die Cysteinprotease Papain gleich gut hemmten (Daten nicht gezeigt), wurde darauf verzichtet, alle Kinetikstudien mit PbICP-C^{KS} zu wiederholen. Die hier für die Kinetikstudien benutzten Konstrukte PbICP-C und PbICP-N beziehen sich also nicht auf die hypothetische natürliche Prozessierungsstelle, sondern beruhen auf Sequenzvergleichen mit Chagasin. Im Vergleich zur hypothetischen Prozessierungsstelle ist PbICP-N demnach um 23 Aminosäuren verlängert und PbICP-C^{GDEK} um 23 Aminosäuren verkürzt (Abbildung 3-25A, unten).

PbICP-C^{GDEK} und das komplementäre Protein PbICP-N wurden als MBP-Fusionsprotein in *E. coli* hergestellt und affinitätschromatographisch gereinigt. PbICP-C^{GDEK} ohne Fusionsanhang wurde ebenfalls für die Kinetiken verwendet, um es direkt mit dem Vollängeninhibitor ohne Anhang vergleichen zu können (siehe Abschnitt 3.2).

Die nach der Reinigung erhaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3-26A) und in photometrischen Proteaseaktivitätstests mit dem rekombinanten Vollängen-Protein verglichen. Abbildung 3-26B zeigt exemplarisch die Inhibitorstudie mit Cathepsin L als Diagramm. Tabelle 3-2 beinhaltet die vollständigen Ergebnisse, die mit den C1-Cysteinproteasen Papain, Cathepsin L, Falcipain-2 und Cathepsin B erhalten wurden. MBP-PbICP-N wies bei einer Konzentration von 1 μ M keine inhibitorische Aktivität auf. Warum bei Falcipain-2 nach Zugabe von MBP-PbICP-N eine verstärkte Proteaseaktivität gemessen wurde, ist unklar. Möglicherweise wurden durch die Zugabe von MBP-PbICP-N die Assaybedingungen geringfügig verändert, was bei den anderen Proteasen keine Bedeutung für ihre Aktivität hatte. Dagegen zeigten sowohl MBP-PbICP-C^{GDEK} als auch PbICP-C^{GDEK} ohne MBP-Anhang eine vergleichbare inhibitorische Wirkung auf die Cysteinproteasen Papain, Cathepsin L und Falcipain-2 wie das entsprechende Vollängen-Protein (vergleiche Tabelle 3-1). Die Aktivität von Cathepsin L wurde sowohl durch die Anwesenheit von 1 μ M MBP-PbICP-C^{GDEK} als auch durch die Anwesenheit von 1 μ M MBP-PbICP (Volllänge) vollständig unterdrückt. Bei einer Inhibitorkonzentration von 100 nM der MBP-freien Proteine betrug die prozentuale Restaktivität von Cathepsin L durchschnittlich 16 % in Anwesenheit von PbICP (Volllänge) und 21 % in Anwesenheit von PbICP-C^{GDEK}. Wie der Vollängeninhibitor hemmte keines der PbICP-C-Konstrukte Cathepsin B.

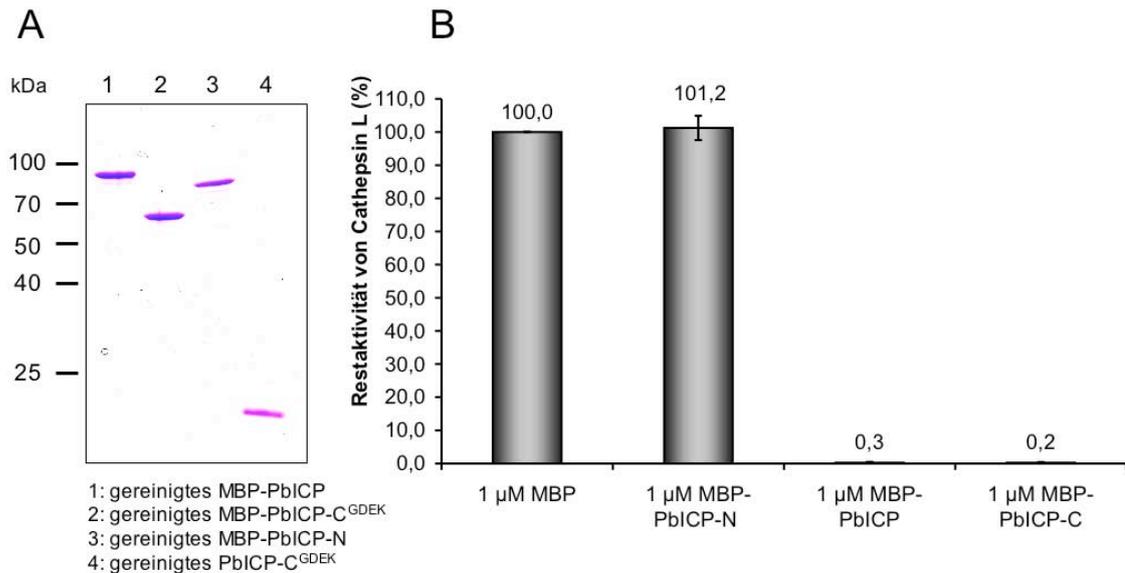


Abbildung 3-26: Die N-terminale Domäne von PbICP ist nicht notwendig für die Inhibitorfunktion.

MBP-PbICP, MBP-PbICP-N, MBP-PbICP-C^{GDEK} und PbICP-C^{GDEK} ohne Fusionsanhang wurden in E. coli exprimiert und mittels Affinitätschromatographie oder Ionenaustauschchromatographie aus dem Bakterientotallysat gereinigt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch die anschließende Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (A). Exemplarische in vitro Inhibitorstudie mit den rekombinanten Proteinen und der Wirtsprotease Cathepsin L (B). Die Hydrolyse des Proteasesubstrates Z-FR-pNA durch Cathepsin L wurde in Anwesenheit des Kontrollproteins MBP, MBP-PbICP-N, dem Volllängenprotein MBP-PbICP oder in Anwesenheit von MBP-PbICP-C^{GDEK} photometrisch bestimmt und die prozentuale Restaktivität von Cathepsin L berechnet. Dabei wurde angenommen, dass die Proteaseaktivität im MBP-Ansatz einer 100%igen Proteaseaktivität entspricht.

Tabelle 3-2: Prozentuale Restaktivität der Proteasen in Anwesenheit von PbICP-N / -C

| | Papain | Cathepsin L | Falcipain-2 | Cathepsin B |
|------------------|--------|-------------|-------------|-------------|
| 1 µM MBP | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 1 µM MBP-PbICP-N | 89 ± 1 | 101 ± 4 | 128 ± 2 | 93 ± 7 |
| 1 µM MBP-PbICP-C | 5 ± 2 | 1 ± 0,2 | 0 ± 0,1 | 100 ± 1 |
| 100 nM MBP | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 100 nM PbICP-C | 12 ± 2 | 21 ± 10 | 18 ± 0,1 | 105 ± 2 |

Die Hydrolyse des jeweiligen p-Nitroanilin-Proteasesubstrates wurde in Anwesenheit des Kontrollproteins MBP oder in Anwesenheit von MBP-PbICP-N und MBP-PbICP-C bzw. PbICP-C ohne MBP-Anhang photometrisch gemessen. Die prozentuale Restaktivität der Proteasen wurde unter der Annahme berechnet, dass die Proteaseaktivität in der MBP-Kontrolle 100 % beträgt (dunkelgrau unterlegt). MBP-PbICP-N hemmte keine der Proteasen, MBP-PbICP-C hatte hingegen nur auf Cathepsin B keine inhibitorische Wirkung. Cathepsin-L und Falcipain-2 wurden dagegen unabhängig vom MBP-Anhang sehr gut von PbICP-C inhibiert (rot hervorgehoben).

Unter der Annahme, dass sich die rekombinanten Proteine wie das endogene PbICP verhalten, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die *Plasmodium*-spezifische N-terminale Domäne auf die Inhibitorfunktion und die Proteasespezifität keinen Einfluss hat. Da die N-terminale Region zwischen den verschiedenen Plasmodien-ICPs aber ebenso gut konserviert ist wie die C-terminale Region, übernimmt sie wahrscheinlich eine andere wichtige biologische Funktion.

3.6 PbICP übernimmt eine wichtige Funktion bei der Infektion von HepG2-Zellen durch Sporozoiten

Da PbICP von Sporozoiten sezerniert wird und das *P. falciparum*-Homolog Falstatin eine wichtige Rolle bei der Invasion von Merozoiten in der Blutphase übernimmt¹³⁵, stellte sich die Frage, ob PbICP für die Invasion der Sporozoiten in Leberzellen von Bedeutung ist. Deshalb wurden *in vitro* Neutralisationsexperimente mit *P. berghei* Wildtyp-Parasiten durchgeführt. Dazu wurden die Sporozoiten mit verschiedenen Verdünnungen eines Anti-PbICP-C-Hyperimmunserums vorinkubiert, bevor sie zu HepG2-Zellen gegeben wurden. Als Kontrolle wurden Sporozoiten mit den gleichen Verdünnungen des Präimmunserums oder als Positivkontrolle mit einem Hyperimmunserum vorinkubiert, das gegen das CSP Protein gerichtet war (Positivkontrolle). Nach ungefähr 30 Stunden wurden die Zellen fixiert, eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt und die infizierten Zellen gezählt.

Wenn 2×10^4 Speicheldrüsen-Sporozoiten mit einer Verdünnung von 1:5 oder 1:10 des polyklonalen Anti-PbICP-C-Kaninchenantiserums inkubiert und anschließend auf HepG2-Zellen gegeben wurden, reduzierte sich die Anzahl der infizierten Zellen signifikant um 46 % ($p < 0,00004$) oder 26 % ($p < 0,0003$) im Vergleich zu den entsprechenden Präimmunkontrollen (Abbildung 3-27). Zudem war dieser Effekt dosisabhängig, eine 1:50-Verdünnung des Anti-PbICP-C-Antiserums hatte bereits keinen Einfluss mehr auf die Sporozoiteninvasion. Eine Vorinkubation mit einer 1:10 Verdünnung des polyklonalen Anti-CSP-Kaninchenantiserums führte wie erwartet ebenfalls zu einer starken Reduktion der Sporozoiteninfektiosität um ungefähr 75 % ($p < 0,00003$).

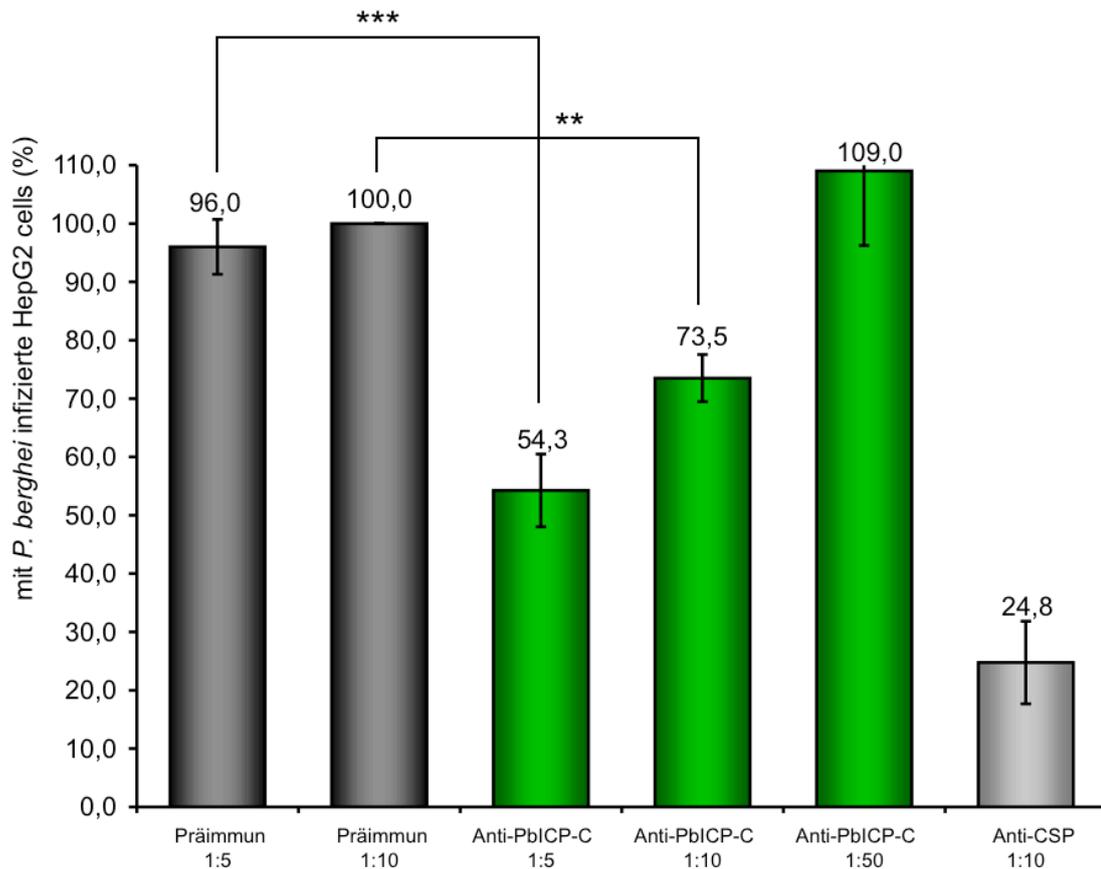


Abbildung 3-27: Blockierung von PbICP durch spezifisches Antiserum reduziert die Infektiösität von *P. berghei* Sporozoiten *in vitro*.

2×10^4 *P. berghei* Sporozoiten wurden mit präimmunem Kaninchenserum, mit polyklonalem Anti-PbICP-C-Kaninchenantiserum oder mit polyklonalem Anti-CSP-Kaninchenantiserum als Positivkontrolle vorinkubiert und anschließend zu HepG2-Zellen gegeben. Nach 30 Stunden wurden die Zellen fixiert und mittels Immunfluoreszenzanalyse die Anzahl der infizierten Zellen ermittelt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, bei denen jeweils mehr als 200 infizierte Zellen in den Präimmunkontrollen gezählt wurden. Die Inkubation mit verschiedenen Verdünnungen des Anti-PbICP-C-Antiserums führte zu einer signifikanten Dosis-abhängigen Reduktion der Sporozoiteninfektiösität.

3.7 Kristallstruktur von PbICP-C in Komplex mit Falcipain-2

Im Gegensatz zu den bisher bekannten Chagasinfamilieninhibitoren aus anderen Spezies inhibieren weder PbICP noch Falstatin die Cysteinprotease Cathepsin B. Auch das rekombinante PbICP-C^{GDEK} konnte nicht Cathepsin B hemmen. Möglicherweise führen die zusätzlichen Regionen in der C-terminalen Chagasin-ähnlichen Domäne von PbICP zu dieser veränderten Proteasespezifität. Um die Besonderheiten der PbICP-Struktur und deren Funktion zu verstehen, wurde zusammen mit der Gruppe "Structural Basis of Bacterial and Protozoal Infections" am Institut für Biochemie der Universität Lübeck (Gruppenleiter: Dr. Guido Hansen, Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Rolf Hilgenfeld) ein gemeinsames Kristallisationsprojekt initiiert. Ziel war es, die

Kristallstruktur von PbICP-C^{GDEK} im Komplex mit Falcipain-2 zu bestimmen. Dabei wurde eine Falcipain-2-Mutante verwendet, bei der das Cystein im aktiven Zentrum gegen Alanin ausgetauscht war. Es konnten mehrere Kristalle generiert werden, die aber zunächst keine zufriedenstellenden Auflösungen ergaben. Erst die Zugabe von Cd²⁺-Ionen führte zu ausreichend stabilen Kristallen und ermöglichte die Strukturaufklärung des Protease-Inhibitor-Komplexes. Bei der finalen Messung am BESSY (Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung) wurde eine Auflösung von 2,6 Å erreicht.

Wie erwartet ragen die Schleifenstrukturen L2, L4 und L6 in die Furche zwischen den zwei Proteasendomänen, in der sich das aktive Zentrum befindet (Abbildung 3-28).

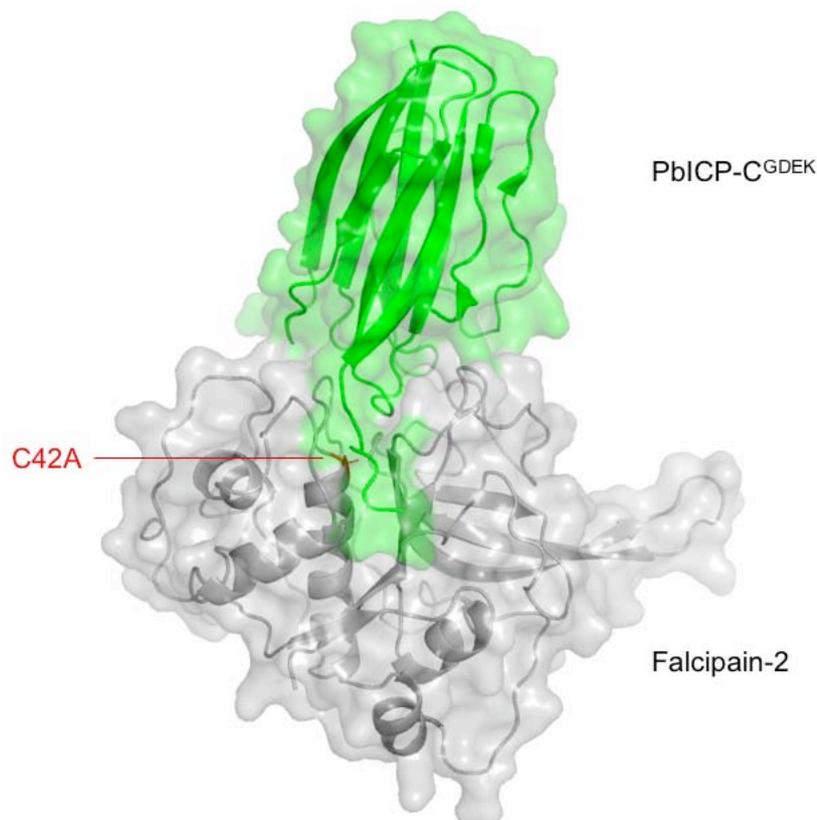


Abbildung 3-28: Kristallstruktur von PbICP-C in Komplex mit der *Plasmodium*-Cysteinprotease Falcipain-2.

PbICP-C^{GDEK} (grün) bindet wie ein Keil in die Spalte von Falcipain-2 (grau), in der sich das aktive Zentrum befindet. Hier wurde eine Falcipain-2-Mutante verwendet, bei der das Cystein an Position 42 im aktiven Zentrum gegen Alanin ausgetauscht war (C42A). Die Auflösung betrug 2,6 Å. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Guido Hansen (Universität Lübeck) zur Verfügung gestellt.

In Abbildung 3-29 ist die Kristallstruktur von PbICP-C^{GDEK} im Detail dargestellt und in Abbildung 3-30 wird sie mit der Kristallstruktur von Chagasin verglichen ^{136, 138-140}.

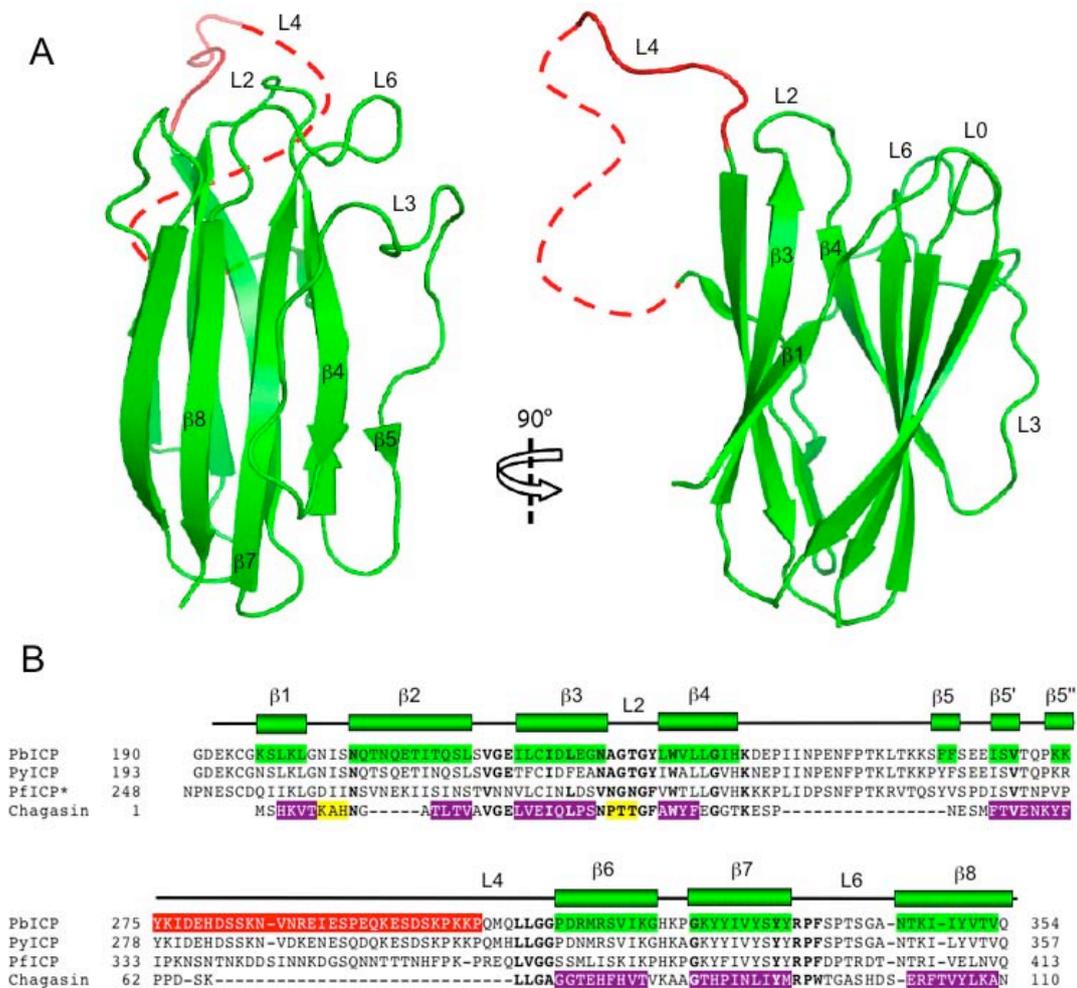


Abbildung 3-29: Die Kristallstruktur von PbICP-C^{GDEK} im Detail

Kristallstruktur von PbICP-C^{GDEK} im 90°-Winkel gedreht (A). Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Guido Hansen (Universität Lübeck) zur Verfügung gestellt. Die Pfeile stellen β -Faltblattstränge dar. Die L4-Schleifenstruktur ist rot markiert; die gestrichelte Linie zeigt an, wo die L4-Struktur noch unklar ist. Sequenzvergleich von PbICP-C^{GDEK} und den C-terminalen Domänen von PyICP und PfICP mit Chagasin (B). Die Aminosäuren in den β -Faltblattsträngen von PbICP-C^{GDEK} sind grün unterlegt und durch Balken oberhalb der Sequenzen symbolisiert. Die zusätzliche Sequenz von L4 ist rot unterlegt. Die Aminosäuren in den β -Faltblattsträngen von Chagasin sind violett unterlegt, Helices sind gelb hervorgehoben.

PbICP-C^{GDEK} besitzt zwei β -Faltblattstränge mehr als Chagasin^{136, 138}. Sie werden als $\beta 5'$ und $\beta 5''$ bezeichnet, da sie zwischen dem Faltblattstrang $\beta 5$ und der Schleifenstruktur L4 liegen. Die Kristallstruktur zeigt, dass ein für die Plasmodien-ICPs einzigartiger Sequenzeinschub innerhalb der L4-Schleifenstruktur liegt und diese somit verlängert. Der genaue Verlauf der langen L4-Schleifenstruktur konnte in der jetzigen Kristallstruktur jedoch nicht vollständig gelöst werden, da dieser Bereich eine sehr hohe Flexibilität aufweist und im Kristall deshalb keine feste Konformation einnimmt. PbICP-C^{GDEK} ist insbesondere durch die verlängerte Schleifenstruktur L3, den verlängerten β -Faltblattstrang $\beta 4$ und durch den verlängerten β -Faltblattstrang $\beta 2$, der eine veränderte Position von $\beta 1$ und L0 nach sich zieht, insgesamt sterisch anspruchsvoller als Chagasin, da es sowohl in der Breite als auch in der Höhe mehr Raum einnimmt.

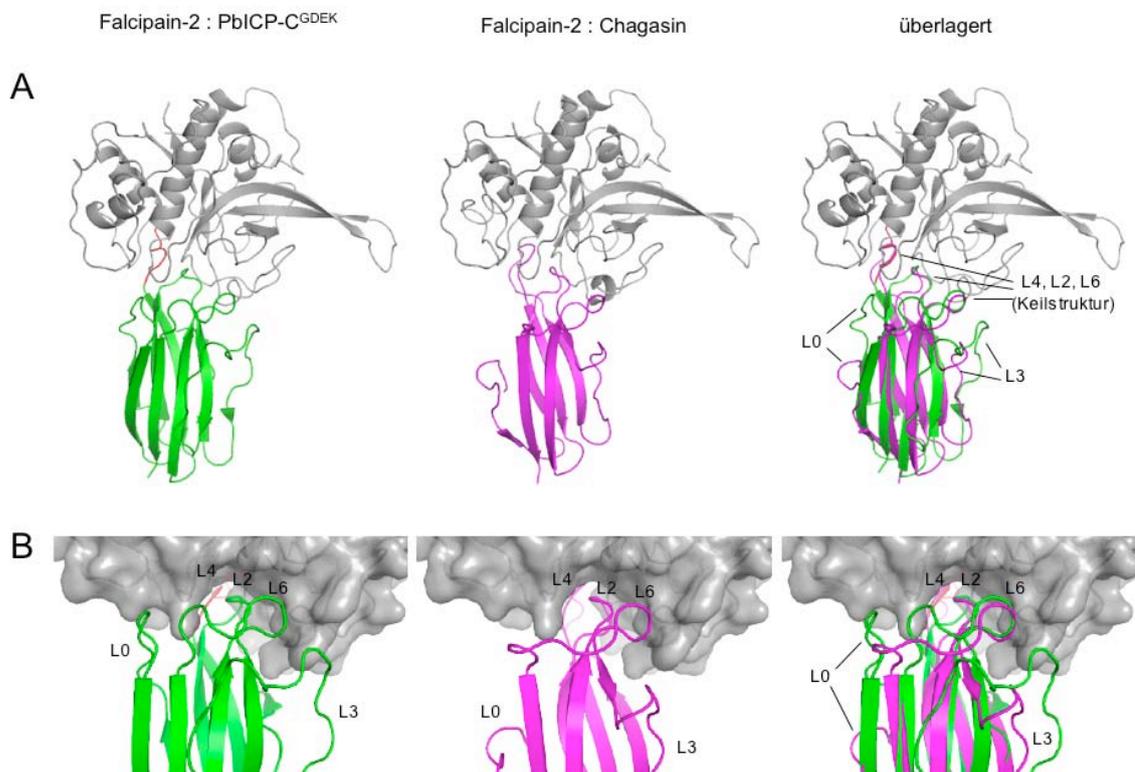


Abbildung 3-30: Vergleich der Kristallstrukturen von PbICP-C^{GDEK} und Chagasin im Komplex mit Falcipain-2

Übersicht (A) und Nahansicht (B) der Interaktionen von PbICP-C^{GDEK} bzw. Chagasin mit Falcipain-2. PbICP-C^{GDEK} besitzt zwei β -Faltblattstränge ($\beta 5'$ und $\beta 5''$) mehr als Chagasin¹³⁶. Insbesondere durch die Positionen von L0 und L3 nimmt PbICP-C^{GDEK} mehr Raum ein als Chagasin. Sowohl bei Chagasin als auch bei PbICP-C^{GDEK} bilden L2, L4 und L6 eine Keilstruktur aus, die in die Furche von Falcipain-2 ragt, in der sich das aktive Zentrum der Protease befindet. Der Sequenzeinschub nach $\beta 5''$ verlängert L4. Der Verlauf des langen L4 konnte noch nicht vollständig gelöst werden. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Guido Hansen (Universität Lübeck) zur Verfügung gestellt.

In den Kinetikstudien (siehe Abschnitt 3.5) konnte PbICP-C^{GDEK} Cathepsin L sehr effizient hemmen, nicht jedoch Cathepsin B. Cathepsin B besitzt eine zusätzliche Sequenz (*occluding loop*) in der Nähe des aktiven Zentrums, durch die es auch die Funktion einer Exopeptidase übernehmen kann. Strukturmodelle von PbICP-C^{GDEK} in Komplex mit Cathepsin L und PbICP-C^{GDEK} in Komplex mit Cathepsin B (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Guido Hansen, Universität Lübeck) zeigten, dass die Schleifenstrukturen L0 und L6 sowie die β -Faltblattstränge β 2, β 4 und β 5 von PbICP-C^{GDEK} mit dem *occluding loop* von Cathepsin B sterisch interferieren (Abbildung 3-31). Aus diesem Grund kann der Inhibitor offenbar nicht Cathepsin B hemmen.

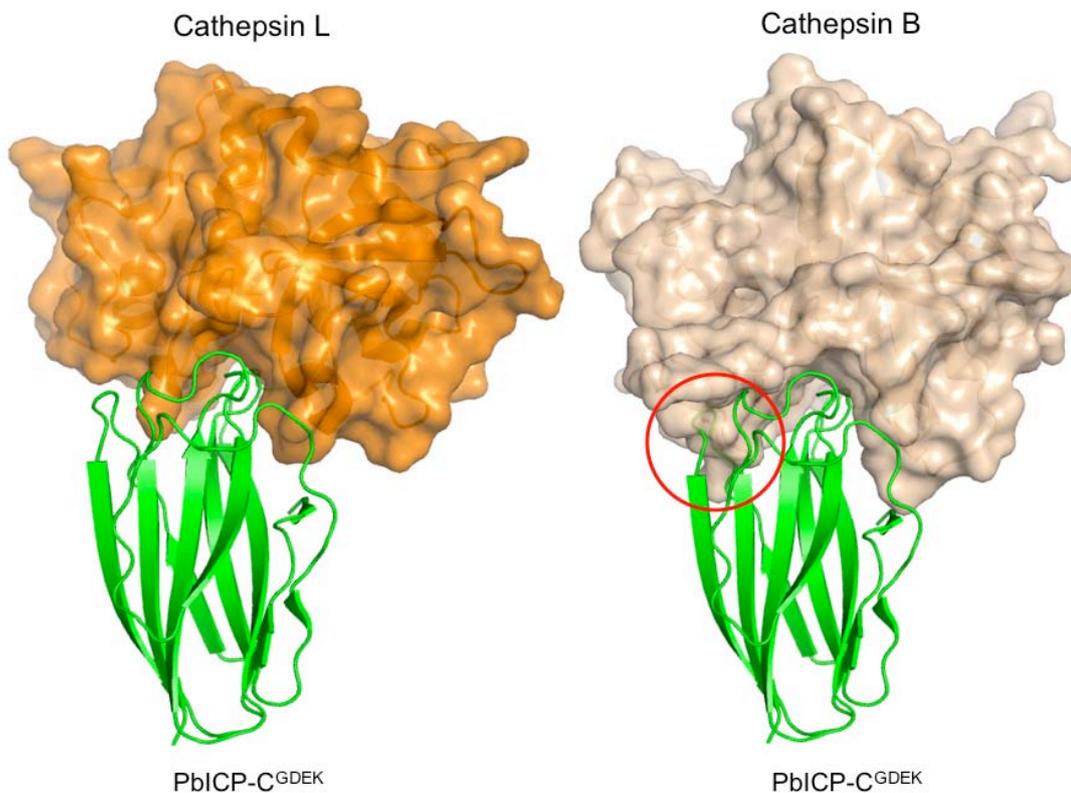


Abbildung 3-31: Modell von PbICP-C^{GDEK} im Komplex mit Cathepsin L und B

PbICP-C^{GDEK} konnte in den Kinetikstudien Cathepsin L inhibieren, nicht aber Cathepsin B. Der rote Ring zeigt die Region im Strukturmodell an, in der sich der die zusätzliche Region (*occluding loop*) von Cathepsin B und L0 sowie L6 von PbICP-C^{GDEK} sterisch behindern. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Guido Hansen (Universität Lübeck) zur Verfügung gestellt.

3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse von weiteren PbICP-Teilprojekten

Während meiner Doktorarbeit habe ich drei Diplomarbeiten betreut, wobei Teile der Experimente von mir zusammen mit den Diplomanden durchgeführt wurden. Die wichtigsten Ergebnisse der Diplomarbeiten werden in den folgenden Abschnitten zusammengefasst.

3.8.1 Mutagenesestudien mit rekombinantem PbICP-C^{GDEK}

Um Einblicke in die Funktion der zusätzlichen PbICP-Sequenzen und der veränderten Aminosäuremotive zu erhalten, wurde eine Diplomarbeit¹⁴⁸ initiiert, bei der Mutanten des rekombinanten Proteins PbICP-C^{GDEK} ("Wildtyp", Aminosäuren 190 - 354 von PbICP) hergestellt wurden.

Zwei der Mutanten werden hier kurz vorgestellt (Abbildung 3-32). Bei PbICP-C~~del~~ (Deletionsmutante) wurde die in Chagasin nicht vorhandene Sequenz von S(268) bis Q(295) (also $\beta 5'$, $\beta 5''$ und ein großer Bereich der L4-Verlängerung) deletiert. Bei PbICP-CL2mut (Loop2-Mutante) wurde das Motiv "NAGTG" in L2 von PbICP durch "NPTTG" ersetzt, ein Motiv, das bei den ICPs der anderen Protozoen und Bakterien hochkonserviert ist.

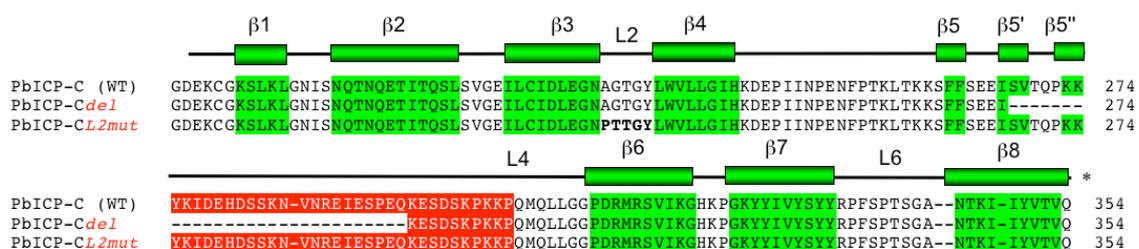


Abbildung 3-32: Übersicht über die Sequenzen der PbICP-C^{GDEK}-Mutanten

Ausgehend von dem rekombinanten Protein PbICP-C^{GDEK} ("Wildtyp", Aminosäuren 190 - 354 von PbICP) wurden zwei verschiedene Mutanten hergestellt. Bei PbICP-C~~del~~ (Deletionsmutante) wurde die in Chagasin nicht vorhandene Sequenz von S(268) bis Q(295) ($\beta 5'$, $\beta 5''$ und ein großer Bereich der L4-Verlängerung) deletiert. Bei PbICP-CL2mut (Loop2-Mutante) wurde das Motiv "NAGTG" in L2 von PbICP in das hochkonservierte "NPTTG"-Motiv von Chagasin umgeändert. Die β -Faltblattstränge sind grün unterlegt und oberhalb der Sequenzanordnung als Balken dargestellt. Die für die Plasmodien-ICPs spezifische Sequenzregion, die nicht in Chagasin vorkommt, ist rot hervorgehoben.

Beide Mutanten hemmten die Cysteinproteasen Papain, Falcipain-2 und *E. histolytica*-Cysteinproteasen mit ähnlicher Effizienz wie das Wildtyp-PbICP-C^{GDEK} (Daten nicht gezeigt). Zudem konnte wie beim Wildtyp-Inhibitor mit keiner der zwei Mutanten eine Inhibition von Cathepsin B beobachtet werden. In Übereinstimmung mit der Kristallstruktur ist also nicht die L4-Verlängerung dafür verantwortlich, dass der Inhibitor das sterisch anspruchsvolle Cathepsin B nicht binden kann. Zudem ist dieser Bereich der Struktur nicht am Proteingrundgerüst beteiligt. Obwohl L2 (NPTTGY) von Chagasin und L2 (NAGTGY) von PbICP-C^{GDEK} eine unterschiedliche Struktur einnehmen (Helix in Chagasin, Schleifenstruktur in PbICP) und sicherlich zu anderen Protein-Protein-Interaktionen führen, hatte der Austausch der L2-Sequenz keinen Einfluss auf die Inhibitorfunktion. Offenbar existieren verschiedene Konformationen der L2-Schleife, die eine Interaktion mit Papain, Falcipain-2 und *E. histolytica*-Cysteinproteasen erlauben.

3.8.2 N-terminal verkürztes PbICP-C-GFP wird nicht von frühen Parasitenstadien sezerniert und ist ein PV-Marker für lebendmikroskopische Studien

Um zu untersuchen, ob die N-terminale Verlängerungssequenz von PbICP eine Translokationsfunktion übernimmt, wurden im Rahmen einer Diplomarbeit¹⁴⁹ transgene Parasiten generiert, die die verkürzte Form PbICP-C^{KS} als GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des *pbeef1aa*-Promotors exprimierten. Das klassische Signalpeptid blieb dabei erhalten und reichte aus, um PbICP-C-GFP in die PV zu transportieren (siehe Abbildung 3-34). Im Gegensatz zu dem endogenen PbICP und dem Volllängen-PbICP-GFP wurde das N-terminal verkürzte PbICP-C-GFP jedoch nicht mehr von frühen Parasitenstadien sekretiert (Abbildung 3-33).

Wie im Fall der Parasiten, die das Volllängen-PbICP-GFP überexprimieren, konnten die transgenen PbICP-C-GFP produzierenden *P. berghei*-Parasiten den gesamten Lebenszyklus durchlaufen.

Da sich PbICP-C-GFP als sehr stabiler PV-Marker herausstellte, wurden die transgenen Parasiten für erste videomikroskopische Lebendstudien verwendet, um mehr Einblicke in die Interaktion der Leberparasiten mit dem sekretorischen Apparat der Wirtszelle zu gewinnen. Abbildung 3-34 und die zwei Bilder aus einer Filmsequenz in Abbildung 3-35 zeigen, dass mit LysoTracker angefärbte Organellen, bei denen es sich wahrscheinlich um Wirtszelllysosomen handelt, teilweise mit der PV des Leberparasiten assoziiert sind. Eine Verschmelzung von Lysosomen mit der PV konnte jedoch bislang nicht beobachtet werden. Bei vielen Schizonten schnürten sich mit PbICP-C-GFP gefüllte Vesikel von der PV in das Wirtszellzytosol ab (Abbildung 3-34A). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass PbICP auch im Schizontenstadium weiterhin in die Wirtszelle gelangt.

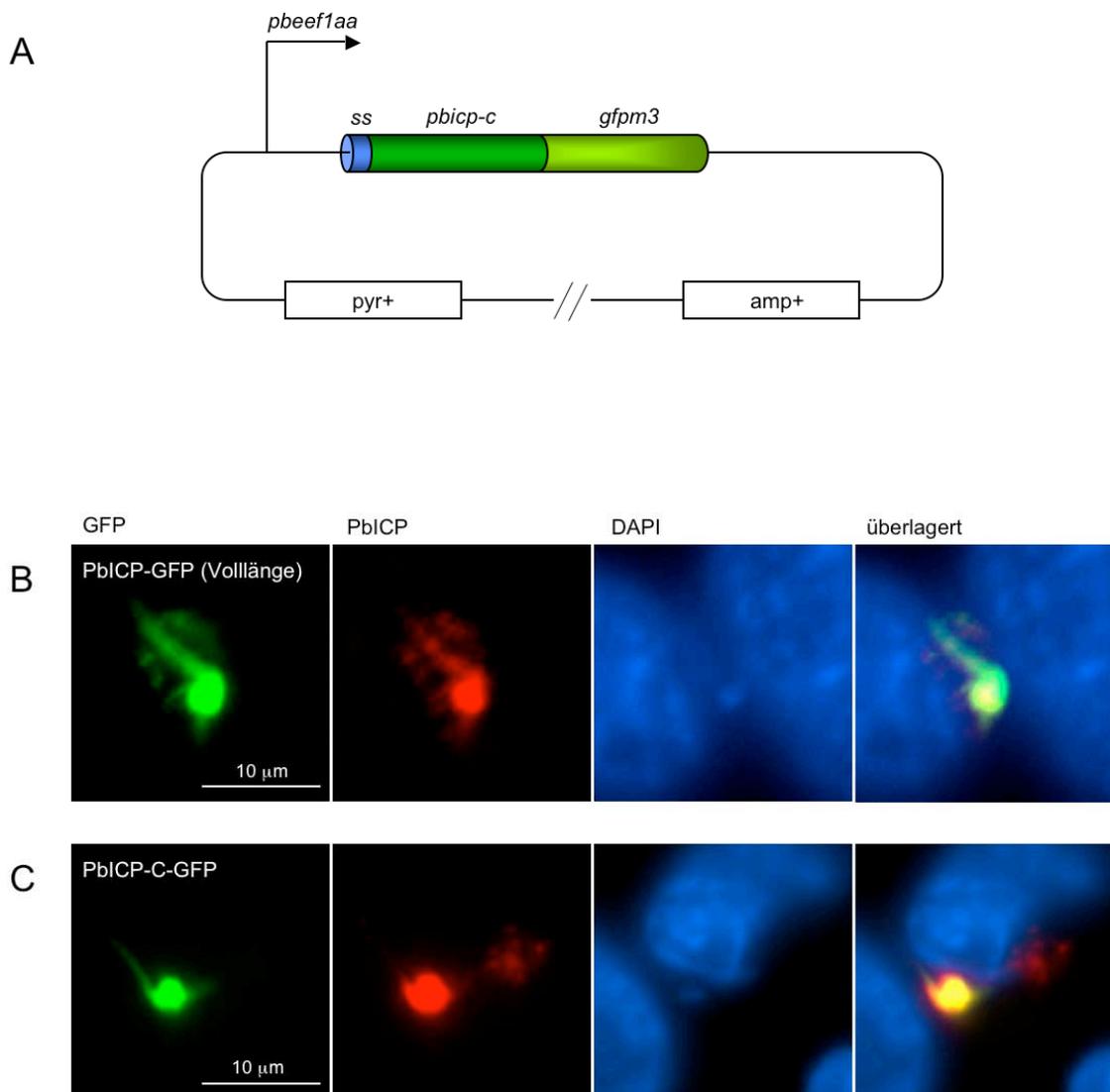


Abbildung 3-33: N-terminal deletiertes PbICP-C-GFP wird im Gegensatz zum Vollängen-PbICP-GFP und zum endogenen PbICP nicht von jungen exoerythrozytären Parasitenstadien sezerniert.

Schematische Darstellung des Transfektionsplasmides pL0017-pbicip-c-gfp (A). Das pbicip-c-gfp-Gen steht unter der Kontrolle des konstitutiven starken Promotors von pbeef1aa und der Vektor vermittelt eine Ampicillinresistenz (amp+) in E. coli und eine Pyrimethaminresistenz (pyr+) in den transfizierten Plasmodien. Das endogene Signalpeptid (ss) blieb erhalten. Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von PbICP-GFP (Volllänge) (B) bzw. PbICP-C-GFP (C) exprimierenden P. berghei Leberstadien. Infizierte HepG2-Zellen wurden nach 4 Stunden fixiert, permeabilisiert und anschließend mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen PbICP-C und Maus-Antiserum gegen GFP inkubiert. Als fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper wurden Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Alexa594 (rot) und Anti-Maus-IgG konjugiert mit Cy2 (grün) verwendet. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

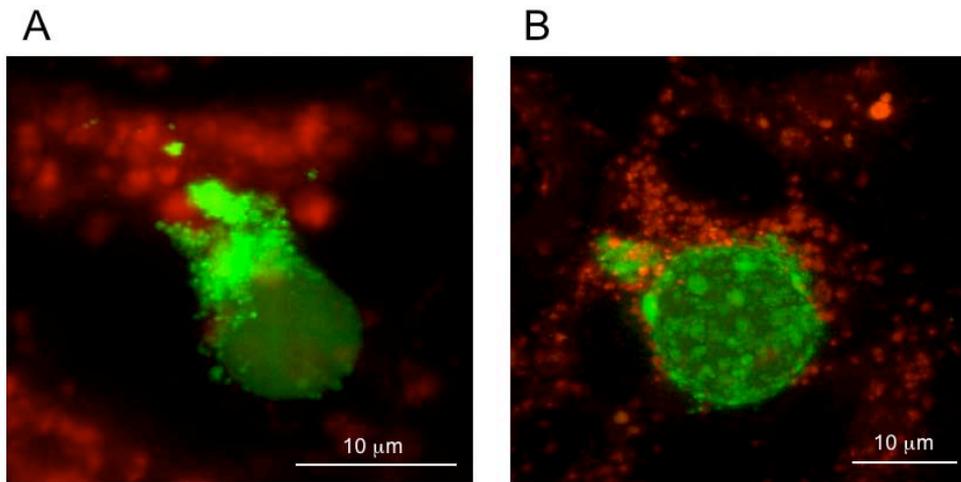


Abbildung 3-34: PbICP-C-GFP ist ein stabiler PV-Marker (3D-Lebendmikroskopie)

HepG2-Zellen wurden mit PbICP-C-GFP exprimierenden P. berghei-Parasiten infiziert. Die infizierten HepG2-Zellen wurden nach 48 Stunden mit Lysotracker (rot) inkubiert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der Z-Stack-Funktion analysiert. PbICP-C-GFP (grün) stellte sich als stabiler PV-Marker heraus und wurde von vielen Schizonten in Vesikeln in die Wirtszelle abgesondert.

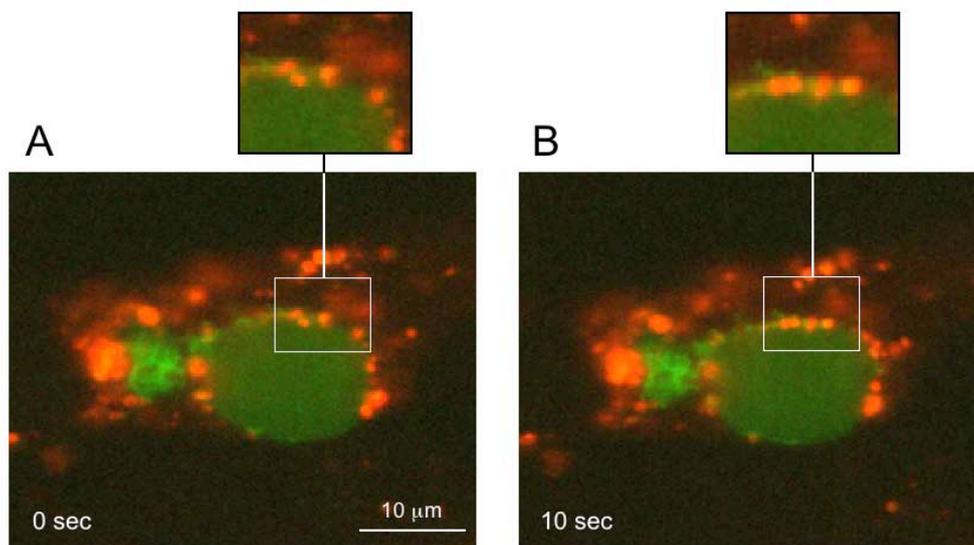


Abbildung 3-35: Wirtszelllysosomen assoziieren mit der PV, ohne jedoch mit dieser zu fusionieren (konfokale Videomikroskopie)

Die Durchführung erfolgte wie in Abbildung 3-34. Statt der 3D-Bilder-Konstruktion wurde hier die Interaktionen von Lysosomen und PV auf konfokaler Ebene zeitlich verfolgt. Die Lysosomen wechselten ihre Positionen ohne mit der PV zu fusionieren, blieben aber mit ihr assoziiert.

3.8.3 Rekombinantes PbICP-C fördert die Integrität der Wirtszellen

Die Wirtszellapoptose wird während der gesamten Leberphase von *P. berghei* unterdrückt. Am Ende der Leberphase tritt zwar ein ungewöhnlicher Wirtszelltod ein, aber er unterscheidet sich deutlich von der klassischen Apoptose. Über die molekularen Mechanismen ist allerdings noch wenig bekannt. Da PbICP zumindest am Anfang und am Ende der Leberphase im Hepatozytenzytosol zu finden ist und Cysteinproteasen Schlüsselenzyme bei dem Apoptose-Vorgang darstellen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der *Plasmodium*-Cysteinproteaseinhibitor einen Beitrag zur Erhaltung der Wirtszellintegrität leistet. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden eine CHO-Zelllinie hergestellt, die GFP-PbICP-C exprimiert. Das zugehörige Expressionsplasmid ist in Abbildung 3-36 schematisch dargestellt. Zusätzlich wurde als Vektor-Kontrolle eine weitere CHO-Zelllinie generiert, die nur GFP herstellte. Die Zellen wurden für 7 Stunden mit der Zelltod-auslösenden Substanz tert-Butylhydroperoxid (TBHP) behandelt und mittels Immunfluoreszenzanalyse analysiert (Abbildung 3-37).

Viele der GFP-Kontrollzellen hatten sich abgelöst oder wiesen einen geschrumpften Phänotyp mit kondensiertem Chromatin auf. Teilweise konnte auch eine Aktivierung der Cysteinprotease Caspase-3 beobachtet werden (Abbildung 3-37C). Dagegen waren die TBHP-behandelten CHO-Zellen, die GFP-PbICP-C exprimierten, nicht von der unbehandelten Kontrolle zu unterscheiden.

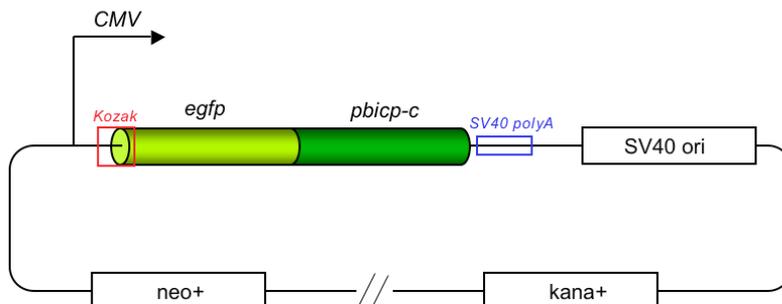


Abbildung 3-36: Schematische Darstellung des Transfektionsplasmides pEGFPC2gfp-pbicp-c.

Das *gfp-pbicp-c*-Gen ist unter der Kontrolle des konstitutiven starken Promotors des humanen Cytomegalovirus (CMV). Die Kozak-Sequenz fördert die hohe Translationseffizienz in eukaryotischen Zellen. SV40 Polyadenylationssignale (SV40 polyA) sorgen für eine korrekte Prozessierung der mRNA am 3'-Ende. Durch die SV40 origin-Sequenz (SV40 ori) kann sich das Plasmid in Säugerzellen replizieren. Der Vektor vermittelt eine Kanamycinresistenz (*kana+*) in *E. coli* und eine Neomycinresistenz (*pyr+*) in den transfizierten eukaryotischen Zellen.

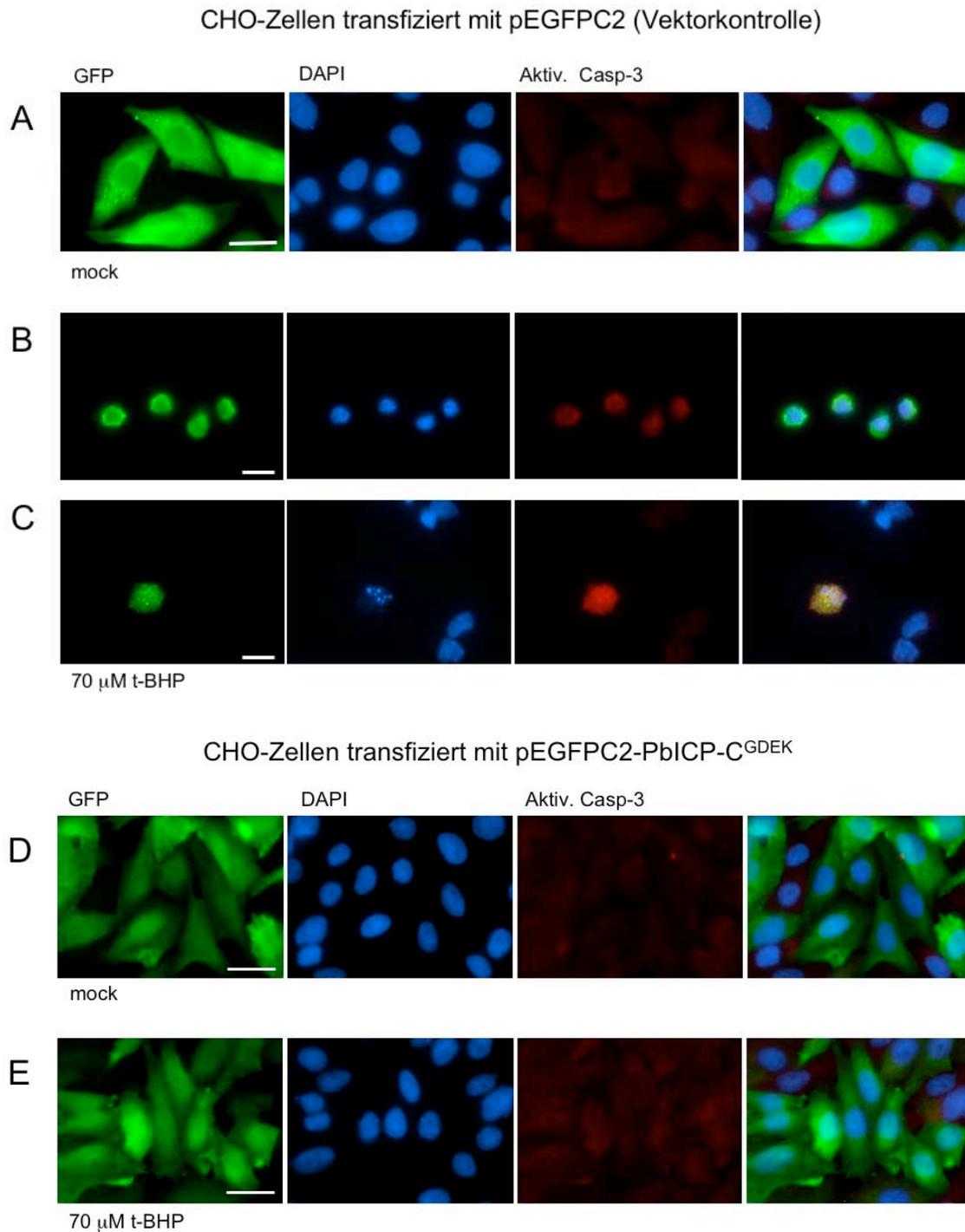


Abbildung 3-37: Immunfluoreszenzanalyse von GFP bzw. GFP-PbICP-C^{GDEK}-exprimierenden CHO-Zellen nach TBHP-Behandlung

Immunfluoreszenzanalyse der transgenen CHO-Zellen 7 Stunden nach Behandlung mit TBHP (B, C, E) oder der mock-Kontrollen (A, D). Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und anschließend mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen GFP und Maus-Antikörper gegen die prozessierte und damit aktivierte Form der Caspase-3 inkubiert. Als fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper wurden Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Cy2 (grün) und Anti-Maus-IgG konjugiert mit Alexa594 (rot) verwendet. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

Das Projekt wurde erfolgreich in einer Diplomarbeit bearbeitet ¹⁵⁰. Dabei wurde der Effekt quantifiziert, den zytosolisches PblCP-C auf das Überleben von HepG2-Zellen hat. Um den Einfluss von PblCP in lebenden Zellen auszuwerten, wurden die membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffe TMRE und Hoechst 33258 verwendet. TMRE färbt nur intakte Mitochondrien in lebenden Zellen an und durch die Anfärbung der DNA mit Hoechst 33258 konnte das Ausmaß der Chromatinkondensation beobachtet werden. Es stellte sich heraus, dass HepG2-Zellen, die PblCP-C exprimierten, signifikant resistenter gegenüber Zelltod-auslösenden Substanzen waren als die entsprechenden Kontrollzellen. Nach einer siebenstündigen Inkubation mit 70 μ M TBHP waren durchschnittlich nur noch 26 % der GFP-Kontrollzellen und 36 % der untransfizierten Nachbarzellen vital (TMRE-positive Mitochondrien, nur partiell kondensiertes Chromatin). Von den Zellen, die PblCP-GFP exprimierten, hatten hingegen noch durchschnittlich 80 % ($p < 0,001$) bei einer vergleichbaren Transfektionsrate einen vitalen Phänotyp ^{150, 151}. Experimente mit Camphotericin, das ebenfalls den programmierten Zelltod von Säugerzellen auslöst, lieferten vergleichbare Ergebnisse ¹⁵¹.

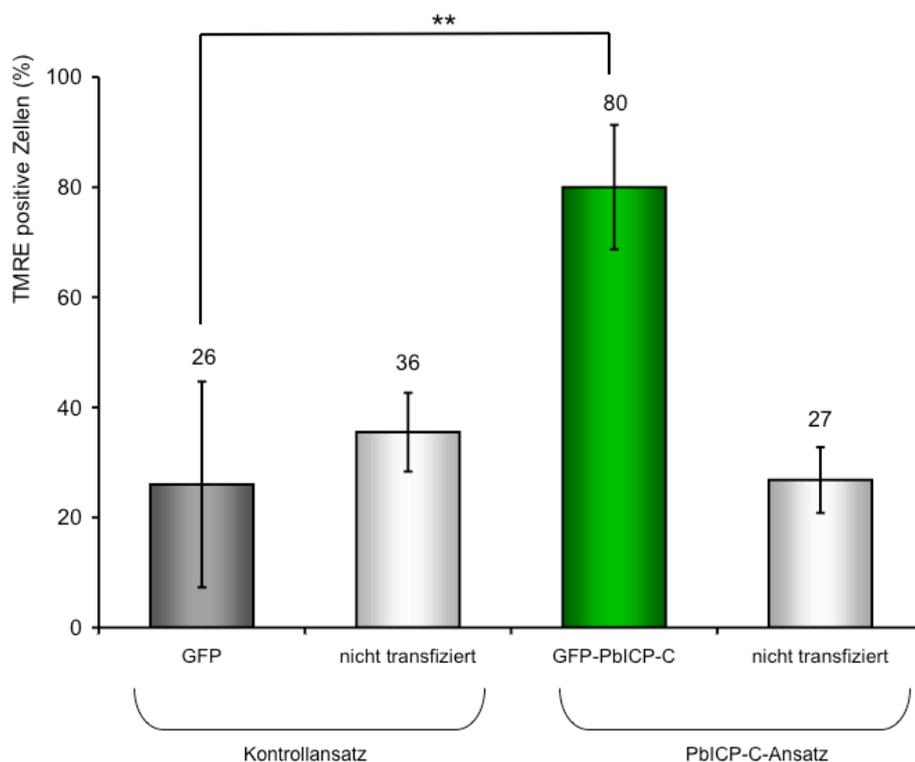


Abbildung 3-38: GFP-PblCP-C Expression in HepG2-Zellen schützt vor Zelltod.

HepG2-Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, das die Expression von GFP-PblCP-C vermittelte. Als Kontrolle wurde der leere Vektor transfiziert, der zur Expression von GFP führte. Anschließend wurden die Zellen für ungefähr 7 Stunden mit TBHP behandelt, intakte Mitochondrien mit TMRE und die DNA mit Hoechst 33258 angefärbt. Es wurden transfizierte und nicht-transfizierte TMRE-negative und TMRE-positive Zellen ausgezählt.

4 Diskussion

Die Cysteinproteasen des Malariaerregers *Plasmodium* übernehmen wichtige Funktionen bei der Hepatozyteninfektion durch Sporozoiten, bei der Entwicklung in der Leber und beim Freisetzungprozess der Lebermerozoiten in den Blutstrom^{12, 35, 77}. In der Blutphase sind Cysteinproteasen an der Invasion der roten Blutzellen beteiligt, verstoffwechseln Hämoglobin und sind auch hier essentiell für die Freisetzung der Merozoiten aus ihrer Wirtszelle^{135, 152-155}. Durch Behandlung der Parasiten mit dem Peptid-Cysteinproteaseinhibitor E-64 konnte der Lebenszyklus des Malariaerregers im Vertebratenwirt sowohl während der exoerythrozytären als auch während der erythrozytären Entwicklungsphase unterbrochen werden^{12, 35, 156}. Die Cysteinproteasen des Malariaerregers sind somit attraktive Zielstrukturen, um neue Antimalariamedikamente zu entwickeln.

Jeder Organismus muss die Aktivität seiner Proteasen streng überwachen. Parasiten müssen zusätzlich noch zahlreiche Proteasen des Wirtes hemmen, die wichtige Funktionen bei der Pathogenabwehr übernehmen. Sowohl extrazelluläre Parasiten (Nematoden und Zecken) als auch intrazelluläre Erreger (Viren, Bakterien und Protozoen) sezernieren Cysteinproteaseinhibitoren, die sowohl ihre eigenen Proteasen als auch die Proteasen des Wirtes kurzfristig kontrollieren^{98, 108, 120, 128, 129, 157}.

In meiner vorangegangenen Diplomarbeit wurde erstmals ein Cysteinproteaseinhibitor von *P. berghei* identifiziert, der unter anderem während der exoerythrozytären Entwicklungsphase des Malariaerregers exprimiert wird¹⁴². PbICP (*Plasmodium berghei inhibitor of cysteine proteases*) ist ein ungewöhnliches Mitglied der Chagasinfamilie (auch ICPs genannt, MEROPS-Familie 142). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PbICP während der exoerythrozytären Entwicklungsphase ein wichtiges Regulationselement des Malariaerregers darstellt, um die Proteasen in seiner Umgebung kurzfristig zu kontrollieren.

PbICP ist ein sekretorisches Protein, das während des gesamten Lebenszyklus von *P. berghei* exprimiert wird. Der Inhibitor wird unabhängig vom Parasitenstadium posttranslational prozessiert, wobei die Plasmodien-spezifische N-terminale Verlängerungsregion abgebaut wird. Interessanterweise gelangt PbICP im Verlauf der Parasitenentwicklung in unterschiedliche Mikroumgebungen (Parasitenzytosol, PV, Wirtszellzytosol und Extrazellulärraum), in denen der Inhibitor sowohl mit unterschiedlichen Wirtsproteasen als auch mit verschiedenen Parasitenproteasen in Kontakt kommt. Rekombinantes PbICP konnte unabhängig von der N-terminalen Verlängerungsregion in den Kinetikstudien sowohl Wirtsproteasen (Cathepsin L) als auch Parasitenproteasen (Falcipain-2) vom Cathepsin L-Typ inhibieren.

PbICP im Sporozitenstadium

Sporoziten sind die invasiven Stadien von *Plasmodium*, die von *Anopheles*-Mücken zunächst in die Haut des Vertebratenwirts übertragen werden und den weiten Weg zur Leber zurücklegen müssen, ohne vom Immunsystem eliminiert zu werden. Sie sezernieren PbICP über Vesikel in den Extrazellulärraum und hinterlassen den Inhibitor teilweise in den CSP- und TRAP-Spuren, die bei der gleitenden Fortbewegung entstehen. Im Gegensatz zu den Oberflächenproteinen TRAP und CSP besitzt PbICP keine bekannte Adhäsionsdomäne, so dass sich der Inhibitor zum größten Teil wahrscheinlich im umgebenden Medium löst und deshalb nicht immer in den Proteinspuren nachweisbar ist. Die Lokalisation von PbICP in den Sporozitenspuren beruht wahrscheinlich auf der Interaktion mit anderen sezernierten Plasmodienproteinen, die an Glasoberflächen binden. Allerdings könnte auch eine direkte Wechselwirkung zwischen dem Inhibitor und dem Substratuntergrund vorliegen. Interessanterweise befand sich der Inhibitor bei einigen unfixierten Sporoziten nach einer Färbung mit Anti-PbICP-Antiserum nicht nur am apikalen Pol, sondern war teilweise auch mit der Oberfläche der Sporoziten assoziiert. Neben Protein-Protein-Wechselwirkungen könnte auch eine über Datenbanken vorhergesagte amphipathische Helix in der N-terminalen Verlängerungsregion von PbICP zur Adhäsion des Inhibitors an die Plasmamembran der Sporoziten führen. Die Membranassoziation durch amphipathische Helices wurde unter anderem für das Protein GRA2 von *Toxoplasma gondii* beschrieben, einem nahen Verwandten von *Plasmodium*. GRA2 wird in die parasitophore Vakuole von *T. gondii* sezerniert und bindet hier über zwei solcher Helices an spezifische Membran-Stapel innerhalb der Vakuole^{158, 159}. Allerdings müsste in diesem Fall PbICP unprozessiert vorliegen. Der weitaus größte Teil des Inhibitors lag jedoch zumindest bei den Speicheldrüsen-Sporoziten in der prozessierten Form vor, so dass eine Oberflächenassoziation durch Protein-Protein-Wechselwirkungen wahrscheinlicher ist. Möglicherweise übernimmt PbICP hier die Funktion eines regulatorischen Inhibitors für eine membranassoziierte Parasitenprotease, wie es später in diesem Abschnitt für Chagasin und Cruzipain von *T. cruzi* beschrieben wird. Der Inhibitor könnte aber auch ein Strukturmembranprotein binden, so dass die Inhibitor-domäne zum Extrazellulärraum hin frei zugänglich ist. Auf diese Weise könnte PbICP die Sporoziten vor Wirtsproteasen abschirmen.

In der Haut, im Blut und bei der Transmigration unterschiedlicher Wirtszelltypen kommen die Sporoziten unweigerlich mit verschiedenen extrazellulären und intrazellulären Proteasen in Kontakt, vor denen sie sich schützen müssen. Extrazelluläre Tachyzoiten von *T. gondii* wehren die Serinproteasen des Wirtes ab, indem sie verschiedene Serinproteaseinhibitoren sowohl auf ihrer Oberfläche aufweisen als auch in den Extrazellulärraum sezernieren¹⁶⁰⁻¹⁶³. Der Oberflächenassoziierte Serinproteaseinhibitor TgTI vermittelt beispielsweise selbst in Anwesenheit von sehr hohen Trypsinkonzentrationen noch Schutz vor dessen hydrolytischer Aktivität¹⁶⁰. PbICP könnte ebenfalls eine solche Schutzfunktion übernehmen und die

Sporozoitien beispielsweise vor den lysosomalen Cysteinproteasen schützen, die von Immunzellen als Abwehr gegen extrazelluläre Parasiten freigesetzt werden^{111, 112}. Der Inhibitor könnte auch wie die Cystatine von verschiedenen parasitär lebenden Nematoden und Zecken die lokale Immunantwort unterdrücken^{108, 110, 115-120}. Nematoden und Zecken sind große Parasiten, die über Tage oder sogar Jahre mit dem Extrazellulärraum des Wirtes in Kontakt stehen und damit effiziente Strategien entwickeln mussten, um das Immunsystem des Wirtes zu manipulieren. Für intrazelluläre Protozoen sind die Sporozoitien von *Plasmodium* ebenfalls sehr lange mit dem Extrazellulärraum des Wirtes in Kontakt, da sie einen relativ langen Weg von der Einstichstelle in der Haut bis zur Leber zurücklegen müssen. Für diesen Zeitraum könnten sie ähnliche Abwehrmechanismen entwickelt haben wie Nematoden und Zecken. Sezernierte Nematoden- und Zecken-Cystatine unterdrücken die lokale Immunantwort auf vielfältige Weise, indem sie beispielsweise die T-Zellantwort unterbinden oder die Zytokinantwort verändern^{108, 110, 115-120}. Die genauen Mechanismen sind allerdings noch nicht vollständig verstanden. Offenbar werden die sezernierten Cystatine entweder zunächst von Immunzellen aufgenommen oder hemmen die Effektorfunktionen von extrazellulären Proteasen¹²⁰. Wenn phagozytierende Makrophagen oder dendritische Zellen die Cystatine aufnehmen, gelangen die Inhibitoren in den sekretorischen Apparat der Immunzellen. Hier können die Inhibitoren Wirtsproteasen der Papain-Superfamilie inhibieren, die indirekt an der Antigenprozessierung und an der Zytokinaktivierung beteiligt sind^{110, 116}. Cystatine von *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus* und weiteren Filarien besitzen sogar ein zusätzliches Motiv (SND), über das sie eine Asparaginy-Endopeptidase hemmen können, die direkt an der Antigenpräsentation über MHC Klasse II-Moleküle beteiligt ist^{116, 164}. Andere Cystatine wie beispielsweise Sialostatin L, ein sezerniertes Cystatin der Zecke *I. scapularis*, können auf unbekannte Weise mit zytotoxischen T-Zellen interagieren und ihre Proliferation verhindern¹²⁰.

Leishmanien exprimieren einen endogenen Cysteinproteaseinhibitor (LmICP), der wie PblCP zur Chagasinfamilie gehört^{114, 128}. Im Fall von LmICP war sowohl die Abwesenheit als auch die Überexpression des Inhibitors für die *in vivo* Infektiosität der Parasiten von Nachteil¹¹⁴. Da die Infektiosität der transgenen Leishmanien dagegen *in vitro* im Zellkultursystem nicht reduziert war, geht man davon aus, dass auch im Fall von LmICP die Wechselwirkung zwischen dem Proteaseinhibitor und dem Immunsystem des Wirtes eine Rolle spielt¹¹⁴. Wie stark die immunmodulatorischen Wirkungen der Cysteinproteaseinhibitoren an die Lebensweise der Parasiten angepasst sind, zeigte sich im Mausmodell mit Leishmanien und einem parasitenfremden Hühner-Cystatin¹⁶⁵. Wie viele Nematoden-Cystatine begünstigte der Inhibitor eine Th1-Antwort, mit der zwar intrazelluläre Protozoen, aber nicht die großen extrazellulären Nematoden effizient bekämpft werden können. Im Fall der *Leishmania*-Infektion konnte dagegen ein protektiver Schutz erreicht werden, wenn das immunmodulatorische Cystatin verabreicht wurde¹⁶⁵. Das Cystatin löste in den infizierten Makrophagen über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) und NFκB-Aktivierung die oxidative Stressreaktion (*respiratory burst*) aus¹⁶⁶. Hierbei

werden große Mengen an IFN- γ und Stickstoffmonoxid produziert, mit deren Hilfe die Makrophagen die intrazellulären Leishmanien eliminieren können¹⁶⁶.

PbICP reguliert zudem sezernierte Parasitenproteasen und/oder sezernierte Proteasen der Hepatozyten. Antikörper, die PbICP binden und mit den Sporozoiten vorinkubiert wurden, reduzierten dosisabhängig die Anzahl der infizierten Hepatozyten. Eine mögliche Zielprotease für PbICP ist hierbei eine Papain-ähnliche Cysteinprotease des Malariaerregers, die wie PbICP von Sporozoiten sezerniert wird und das Oberflächenprotein CSP nach Kontakt mit den leberspezifischen hochsulfatierten Heparansulfatproteoglykanen (HSPGs) prozessiert³⁵. Ohne diese Proteaseaktivität können die Plasmodien weder *in vivo* noch *in vitro* Hepatozyten infizieren. Oftmals verstärken Heparansulfate direkt oder indirekt die Aktivität von Proteasen und übernehmen damit regulatorische Funktion bei wichtigen physiologischen Vorgängen¹⁶⁷. Auch Pathogene nutzen die oftmals organspezifischen Heparansulfate des Wirtes, um die Aktivität ihrer Proteasen zu steuern. Beispielsweise wird im Blut die Hydrolyse von Kininogen zu den proinflammatorisch wirksamen Oligopeptidyl-Kininen durch Cruzipain in Anwesenheit von Heparansulfaten deutlich erhöht¹⁶⁸. Cruzipain ist eine sezernierte Cathepsin L-ähnliche Cysteinprotease von *T. cruzi*, die wie die sezernierte Papain-ähnliche Protease von *Plasmodium* eine wichtige Funktion bei der Wirtszellinvasion übernimmt^{157, 169}. Cruzipain setzt aus dem Wirts-Kininogen das Kinin Bradykinin frei, das an die Bradykinin-Rezeptoren auf der Wirtszelle bindet und damit in der Wirtszelle ein starkes Ca²⁺-Signal auslöst¹⁶⁹. Dies wiederum führt offenbar in der Wirtszelle zu Reaktionen, die insgesamt die Invasion des Parasiten begünstigen¹⁵⁷. Cruzipain wird durch Chagasin, dem ICP-Homolog von *T. cruzi*, reguliert^{127, 130}. Bei Amastigoten und Trypomastigoten konnten sowohl Cruzipain als auch Chagasin in intrazellulären Vesikeln, in der Geißeltasche und auf der Zelloberfläche der Parasiten nachgewiesen werden¹²⁷. Wie PbICP besitzt Chagasin keine Transmembrandomäne und im Gegensatz zu PbICP noch nicht einmal eine klassische N-terminale Signalsequenz, gelangt aber trotzdem in die sekretorische Maschinerie des Parasiten und liegt teilweise membranassoziiert vor¹²⁷. Cruzipain und Chagasin bilden nachweislich *in vivo* stabile Komplexe und sowohl die Überexpression von Chagasin als auch der Zusatz von rekombinantem Chagasin führte zu einer signifikanten Reduktion der Wirtszellinvasion durch Trypomastigote^{127, 130}. Möglicherweise kann bei den Wildtyp-Parasiten die Menge an endogenem Chagasin die Aktivität von Cruzipain in Abwesenheit vom Heparansulfat der Wirtszelle kontrollieren, nicht jedoch nach der verstärkten Proteaseaktivierung in Anwesenheit vom Heparansulfat. Auf diese Weise könnte Cruzipain nach Bindung an die Wirtszelle seine Effektorfunktionen ausführen, nicht jedoch in Abwesenheit der Wirtszelle, so dass unerwünschte Aktivitäten von Cruzipain unterbunden werden. Da bei der *T. cruzi*-Invasion oftmals Wirtszelllysosomen mit der Plasmamembran verschmelzen und ihren sauren, hydrolytischen Inhalt freisetzen, kommt es im Bereich der Eintrittsstelle zur Absenkung des pH-Wertes¹⁵⁷. Interessanterweise scheint die Inhibition zwischen Chagasin und Cruzipain pH-abhängig zu sein, so dass die Ansäuerung der Mikroumgebung ein weitere Mechanismus sein könnte, um eine schnelle Freigabe von Cruzipain zu

gewährleisten¹⁵⁷. Gleichzeitig könnte das freie Chagasin die Parasiten nun vor den lysosmalen Wirtsproteasen schützen. In Analogie zu Chagasin und Cruzipain könnte PbICP für die sezernierte Papain-ähnliche Protease der Sporozoiten ebenfalls eine Funktion als regulatorischer Inhibitor übernehmen. Nach dieser Theorie würde die Protease in Abwesenheit der Leberspezifischen HSPGs durch PbICP gehemmt werden. Sobald die Sporozoiten die Leber erreicht haben, wird die Aktivität der Protease durch die HSPGs entweder indirekt durch die CSP-Konformation (Änderung der Substrat-Konformation) oder durch eine direkte Interaktion (Änderung der Protease-Konformation) so verstärkt, dass die reversible Hemmung durch PbICP keine physiologische Relevanz mehr hat. Die Protease kann daher in Anwesenheit der Hepatozyten CSP prozessieren und die Sporozoiteninvasion einleiten. Die Ansäuerung der Mikroumgebung wird dagegen bei der Plasmodien-Invasion keine Bedeutung haben. Die Sporozoiten haben bei der Wirtszellinvasion in der Regel keine Wirkung auf das Verhalten der Wirtslisosomen und zudem ist zumindest die Inhibition von Papain durch PbICP sehr pH-stabil¹⁴².

Wahrscheinlich sezernieren die Sporozoiten bei der Transmigration und der Wirtszellinvasion weitere Parasitenproteasen, die von PbICP kontrolliert werden können. Bisher gibt es noch keinen direkten Nachweis, dass PbICP in transmigrierte Zellen sezerniert wird. Allerdings kolokalisiert PbICP zumindest partiell mit dem Mikronemenprotein TRAP in Vesikeln der Sporozoiten, so dass sich zumindest ein Teil des Inhibitors in den Mikronemen befindet. Da die Sezernierung weiterer Mikronemenproteine wie beispielsweise SPECT1 unbedingt notwendig ist für die Transmigration²⁶, gelangt PbICP mit hoher Wahrscheinlichkeit in das Zytosol der transmigrierten Wirtszellen. PbICP könnte hier als Notfall-Inhibitor zytosolische Wirtszellproteasen hemmen, die wichtige Parasitenproteine inaktivieren würden oder den aktiven Wirtszelltod förderten. Unsere *in vitro* Versuche mit transfizierten Säugerzelllinien, die PbICP im Zytosol exprimierten, zeigten bereits das Potential von PbICP, die Wirtszellintegrität unter Stress zu erhalten^{150, 151}. Zudem setzen transmigrierte Zellen zytosolisches Material frei, so dass auch Proteasen aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum gelangen. Calpaine sind zytosolische, Ca^{2+} -abhängige Cysteinproteasen, von denen bereits bekannt ist, dass sie von verletzten Leberzellen in den Extrazellulärraum freigesetzt werden¹⁷⁰. Im extrazellulären Milieu werden die Calpaine stark aktiviert, hydrolysieren Proteine auf der Plasmamembran von Nachbarzellen und verstärken so die lokale Gewebszerstörung in der Leber¹⁷⁰. Da die Sporozoiten bei der Transmigration die Plasmamembran der Wirtszellen durchbrechen können, werden sie wahrscheinlich auch intrazelluläre membranumgebene Kompartimente wie beispielsweise die Lysosomen zerstören. Durch die Sezernierung von PbICP könnten die Sporozoiten die proinflammatorische Immunantwort abmildern, die als Reaktion auf die freigesetzten Calpaine und lysosomalen Cathepsine entsteht und eine verstärkte Immunantwort gegen die Plasmodien zur Folge hätte. Einige Studien zeigten, dass die Transmigration in der Leber in der Tat eher ein Nachteil für die Parasiten sein kann und die Anzahl der infizierten Hepatozyten reduziert, während

sie für die Überwindung der natürlichen Haut- und Endothelbarrieren unbedingt notwendig ist^{24, 49}.

Um die Endothel-Barriere in den Lebersinusoiden zu überwinden, migrieren die Sporozoitien unter Ausbildung einer Vakuole Kupffer-Zellen^{9, 42}. Kupffer-Zellen sind Makrophagen der Lebersinusoiden, die eng mit dem Sinusoidendothel assoziiert sind und teilweise Ausstülpungen in das Lebergewebe hinein ausbilden¹⁷¹. Warum die Sporozoitien ausgerechnet Immunzellen als Tor zur Leber nutzen, ist noch unklar. Man weiß allerdings mittlerweile, dass die Sporozoitien die Immunantwort von Kupffer-Zellen unter anderem über den Botenstoff cAMP massiv beeinflussen können. Sie verhindern die oxidative Stressreaktion (*respiratory burst*), reduzieren die Antigenpräsentation über MHC Klasse I-Moleküle, induzieren die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 und können *in vitro* die Makrophagen sogar zerstören¹⁷¹. Analog zu den Cystatinen von Nematoden und Zecken könnte PbICP auch hier eine wichtige immunmodulatorische Funktion zukommen, falls der Inhibitor in die sekretorische Maschinerie oder in das Zytosol der Kupffer-Zellen gelangt.

Während ihrer Entwicklung in der Leber unterbinden die Plasmodien den programmierten Tod ihrer Wirtszelle^{48, 71}. Dieses Prinzip ist von zahlreichen intrazellulären Pathogenen bekannt und die molekularen Mechanismen, über die sie den Wirtszelltod verhindern, sind sehr vielfältig¹⁷²⁻¹⁷⁷. Einige Pathogene sezernieren spezifische Cysteinproteaseinhibitoren, um die am programmierten Wirtszelltod beteiligten Proteasen zu hemmen^{125, 178, 179}. Wichtige Cysteinproteasefamilien, die am programmierten Zelltod von Hepatozyten beteiligt sein können, sind die Caspasen, die Cathepsine und die Calpaine¹⁸⁰. Die Inhibitoren der Chagasinfamilie hemmen vorwiegend C1-Cysteinproteasen, zu denen zwar die Cathepsine, aber weder die Calpaine (MEROPS-Clan A, Familie C2) noch die Caspasen (MEROPS-Clan D, Familie C14) gehören. Interessanterweise konnte aber PflICP, das *P. falciparum* Homolog von PbICP, die Proteasen Calpain-1 (K_i 0,196 ± 0,058 nM), Caspase 3 (K_i 376 ± 47 nM) und Caspase 8 (K_i 80 ± 23 nM) *in vitro* im piko- bis nanomolaren Bereich inhibieren¹³⁵. Wie bereits im Fall von Cathepsin B könnte PbICP die gleiche außergewöhnliche Spezifität wie PflICP besitzen, allerdings müsste die Inhibition über einen völlig anderen Mechanismus verlaufen als bei den C1-Cysteinproteasen. Die im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärte Kristallstruktur von PbICP-C^{GDEK} zeigte, dass der Inhibitor wie Chagasin^{136, 138, 139, 181} mit drei zu einem Keil geformten Schleifenstrukturen (L2, L4 und L6) das aktive Zentrum der C1-Cysteinprotease Falcipain-2 sterisch blockiert, das in der Furche zwischen den zwei Proteasedomänen liegt. Calpaine und Caspasen besitzen diese Furche aber nicht, sondern weisen völlig unterschiedliche Strukturen auf⁸⁹. Möglicherweise besitzen die Plasmodien-ICPs weitere, Serpin-ähnliche Inhibitorfunktionen. Serpine sind kovalente Inhibitoren, von denen einige Mitglieder sowohl Serinproteasen als auch verschiedene Cysteinproteasefamilien hemmen können^{90, 182}. Eine hypervariable Schleifenstruktur (*reactive site loop*, RSL) der Serpine bindet wie das jeweilige Substrat an das Serin

oder Cystein im aktiven Zentrum der Protease^{90, 182}. Oftmals erfolgt anschließend eine sehr schnelle, ausgeprägte Konformationsänderung des Enzyms, wobei ein Inhibitor-Acylenzym-Intermediat entsteht und das aktive Zentrum des Enzyms irreversibel zerstört wird^{182, 183}. Man spricht hier von einem *Trapping*-Mechanismus, da der Inhibitor das Substrat nachahmt. Der Protease-Köder (*bait*) ist dabei die RSL-Struktur. Ihre Sequenz bestimmt, welche Proteasespezifität der jeweilige Inhibitor hat^{182, 184, 185}. Beispielsweise ermöglichen die zahlreichen Proteaseschnittstellen im 39 Aminosäure langen RSL von α_2 -Makroglobulin die Inhibition sämtlicher Endoproteasenklassen (Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteinasen) im Blutplasma⁹⁹. Das Inhibitionsspektrum von dem rekombinanten α_2 -Makroglobulin konnte durch Modifizierung des RSL sogar noch erweitert werden¹⁸⁴. Das virale Serpin CrmA (*cowpox virus-encoded cytokine response modifier A*) kann den programmierten Wirtszelltod und proinflammatorische Immunantworten unterdrücken, indem es Caspasen und die Serinprotease Granzym B des Wirtes hemmt^{125, 179, 182}. CrmA bindet über eine RSL-Struktur kovalent an die Zielproteasen, was eine starke Konformationsänderung des Inhibitors zur Folge hat und bei den Caspasen zusätzlich zur Dissoziation in ihre Untereinheiten führt^{182, 186}. Interessanterweise kann CrmA wie PflCP die Initiatorcaspase 8 besser hemmen als die Effektorcaspase 3¹⁷⁹, was aus Sicht der Proteasekaskaden-Hierarchie durchaus sinnvoll ist. Die Kristallstruktur von PbICP-C^{GDEK} zeigte, dass der Sequenzeinschub nach dem Faltblattstrang $\beta 5''$ in die Schleifenstruktur L4 integriert wird, was im Vergleich zu Chagasin zu einer deutlichen Verlängerung der L4-Schleifenstruktur führte. Der Verlauf von L4 konnte in der aktuellen Kristallstruktur noch nicht vollständig aufgeklärt werden, möglicherweise weil er wie die RSL der Serpine flexibel ist. Eventuell ermöglicht die verlängerte L4-Sequenz den Plasmodien-ICPs, über einen Serpin-ähnlichen Inhibitionsmechanismus weitere Cysteinproteaseklassen zu inhibieren.

Um in die unterschiedlichen Mikroumgebungen zu gelangen, muss der Inhibitor neben dem klassischen Signalpeptid weitere Exportmotive enthalten, die Proteine in spezifische Organellen einsortieren, zu ihrer Sezernierung in den Extrazellulärraum führen oder sie innerhalb des sekretorischen Apparates einbehalten. Um in die Mikronemen der Sporozoiten zu gelangen, muss PbICP eine spezifische Mikronemen-Signalsequenz beinhalten. Es gibt allerdings kein einheitliches Mikronemen-Signalmotiv. Bei einigen Mikronemenproteinen wie TRAP führt beispielsweise ein Tyrosin-Motiv (Yxx Φ , mit Φ als große hydrophobe Aminosäure) zu dem Transport in die Mikronemen¹⁸⁷, bei Mitgliedern der EBL-Familie dagegen ein cysteinreiches Motiv¹⁸⁸. Es ist also schwierig, ohne empirische Studien mit Deletionsmutanten die Mikronemen-Signalsequenz von PbICP zu finden. Immunfluoreszenzanalysen mit den transgenen Parasiten, die PbICP-C-GFP überexprimierten, lieferten bereits Hinweise darauf, dass sich die Mikronemesignalsequenz in der N-terminalen Region von PbICP befindet. Während das endogene PbICP und das Vollängen-PbICP-GFP von

Sporozoiten sekretiert wurde, konnte dies für PbICP-C-GFP nicht nachgewiesen werden.

Sporozoiten, die unter Ausbildung einer PV HepG2-Zellen invadiert hatten, konnten weiterhin PbICP über die PVM hinaus ins Wirtszellzytosol sezernieren. Viele Plasmodienproteine, die in über die PVM hinaus in die Wirtszelle transportiert werden, weisen ein sogenanntes PEXEL-Motiv (*Plasmodium export element*) auf, das synonym auch als VTS (*vacuolar transport signal*) bezeichnet wird^{189 190}. Es gibt allerdings auch einige Proteine, die unabhängig von dem PEXEL-Motiv in die Wirtszelle gelangen (PEXEL negative exported proteins, PNEPs)¹⁹¹. In der Leberphase wurde bisher lediglich der Export von CSP über die PVM hinaus beschrieben⁷⁵. CSP besitzt zwei PEXEL-Motive, die beide funktional sind. CSP wird von Sporozoiten ins Wirtszellzytosol sezerniert und befindet sich in 12 bis 24 Stunden alten Parasiten als äußerer Ring um den Wirtszellkern⁷⁵. Zusätzlich zu den PEXEL-Exportmotiven besitzt CSP eine Kernlokalisationssequenz (NLS, nuclear localization signal), die CSP in den frühen Leberstadien (ca. 3 Stunden nach Infektion) in den Wirtszellkern einschleust⁷⁵. CSP konkurriert dabei mit dem Transkriptionsfaktor NFκB um die Bindungsstellen von Importinen und beeinflusst so indirekt die Genregulation des Wirtshepatozyten⁷⁵. Interessanterweise wird PbICP ebenfalls von Sporozoiten in der Nähe des Wirtszellkerns sezerniert. Es ist allerdings schwer zu unterscheiden, ob PbICP dabei wirklich mit dem Wirtszellzytosol in Kontakt steht oder Teil der parasitophoren Vakuole ist, die sich ebenfalls als Ring um den Wirtszellkern legen kann. Zudem ist bekannt, dass sich die Sporozoiten bevorzugt direkt neben dem Wirtszellkern entwickeln und die PV teilweise mit dem Wirtszell-ER in Kontakt steht⁷⁰. Erste Kofärbungen von PbICP und dem Wirtszell-Golgi lieferten Hinweise darauf, dass mit PbICP angereicherte Vesikel, die teilweise Verbindungen mit der PV aufwiesen, mit der sekretorischen Maschinerie des Wirtszellhepatozyten in Kontakt treten könnten (Daten nicht gezeigt). Die Lebendstudien mit den PbICP-C-GFP exprimierenden Parasiten zeigten zudem, dass sich mit dem Inhibitor angereicherte Vesikel von der PV in das Wirtszellzytosol abschnüren können. In Immunfluoreszenzanalysen mit Wildtyp-Parasiten lassen sich diese Vesikel bislang nur mit dem Anti-Expl-Antiserum nachweisen (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise kann PbICP Wirtsproteasen regulieren, die indirekt an der Antigenpräsentation von MHC Klasse I-Molekülen beteiligt sind. Im Gegensatz zu CSP besitzt PbICP kein PEXEL-Motiv. Sequenzvergleiche zeigten, dass sich in der N-terminalen Verlängerungsregion ein ähnliches Exportmotiv befinden könnte wie im REX-1 (*ring exported protein 1*) von *P. falciparum*¹⁹². Rex-1 ist ein lösliches Protein ohne PEXEL-Motiv, das im Ringstadium der erythrozytären Parasiten über die PVM hinaus in sekretorische Parasitenstrukturen (Maurer's clefts) gelangt¹⁹². Ob PbICP wirklich in der N-terminalen Region ein Exportmotiv aufweist, soll zukünftig durch weitere Mutationsstudien überprüft werden. Hinweise lieferten bereits die transgenen Parasiten, die PbICP-C-GFP exprimierten. PbICP-C-GFP konnte im Gegensatz zu dem endogenen PbICP und dem Vollängen-PbICP-GFP nach der Sporozoiteninvasion nicht mehr im Wirtszellzytosol nachgewiesen werden. PbICP-C-GFP gelangte zwar weiterhin durch

das klassische N-terminale Signalpeptid in den sekretorischen Apparat des Parasiten und später im Schizontenstadium in die PV, besaß durch die Deletion der N-terminalen Verlängerungsregion zwischen dem Signalpeptid und der C-terminalen Inhibitor-domäne aber offensichtlich kein Exportmotiv mehr.

PbICP im Schizontenstadium

Im Schizontenstadium befindet sich PbICP sowohl im Parasitenzytosol als auch in der PV. Möglicherweise werden auch weiterhin kleine Mengen des Inhibitors in die Wirtszelle abgegeben, die in den Immunfluoreszenzanalysen nicht mehr erfasst werden konnten. Da die sekretorischen Organellen der Sporozoit in diesem Stadium nicht existieren, müssen die Schizonten eine andere Sekretionsmaschinerie entwickelt haben, die noch nicht gut verstanden ist. Damit PbICP in die PV gelangt, könnten die Mikronemen einfach durch Transportvesikel ersetzt werden, die Proteine in die PV einschleusen. Beispielsweise befindet sich der Serinproteaseinhibitor TgPI-1, der von extrazellulären *T. gondii*-Tachyzoiten über Mikronemen-ähnliche Vesikel in den Extrazellulärraum sezerniert wird, nach der Invasion ebenfalls in der PV der Tachyzoiten¹⁶². Inhibitorstudien mit intrazellulären *T. gondii* Tachyzoiten und MALDI-TOF-massenspektrometrische Analysen der erythrozytären Stadien von *P. falciparum* zeigten, dass die PV sehr viele Proteasen beinhaltet^{193, 194}. PbICP könnte hier als regulatorischer Inhibitor vom Puffertyp oder vom Verzögerungstyp die endogenen Proteasen des Parasiten kontrollieren, die beispielsweise wie die lysosomalen Proteasen und das Proteasom der Säugerzellen am Nährstoffumsatz beteiligt sein könnten. Als Puffertyp-Inhibitor könnte PbICP seine Zielprotease nur in Abwesenheit des Substrates binden und damit die gewünschte Effektorfunktion der Protease erlauben, während unspezifische hydrolytische Aktivitäten verhindert werden. Als Verzögerungstyp-Inhibitor erlaubt PbICP nur für einen bestimmten Zeitraum die Aktivität seiner Zielprotease. Wie im Fall von Chagasin¹²⁷, TbICP¹³¹, LmICP¹¹⁴ und EhICP2^{133, 134} befindet sich der Inhibitor unter anderem auch in Vesikeln innerhalb des Parasiten. Beispielsweise könnten die Protease und PbICP in getrennten Transportvesikeln in die PV gelangen. Nach einer definierten Zeit könnte PbICP die Protease mit einer niedrigen Dissoziationskonstante binden und der Komplex zur Wiederverwertung durch Endozytose wieder zurück in den Parasiten geschleust werden. In späten Schizontenstadien befinden sich auch die SERA-Proteasen zusammen mit PbICP in der PV. Die SERA-Familie beinhaltet sowohl Serin- als auch Cysteinproteasen, die strukturell in die Familie der C1-Cysteinproteasen gehören und durch Serinproteasen der Subtilisinfamilie aktiviert werden¹⁹⁵. Da es bisher nicht gelungen ist, aktive SERA-Proteasen rekombinant herzustellen, bleibt unklar, ob PbICP die SERA-Proteasen hemmen kann. Das Strukturmodell einer SERA-Protease (*P. berghei* SERA 3, freundlicherweise durchgeführt von Krishna Nagarajan, Universität Lübeck) lieferte allerdings Hinweise darauf, dass die SERAs wie Cathepsin B eine Schleifenstruktur (*occluding loop*) am aktiven Zentrum besitzen, die wahrscheinlich die Inhibition sterisch verhindert. Im Gegensatz zu EhICP1, das

Cathepsin B sehr effizient inhibierte (Daten nicht gezeigt, EhICP1 freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Mirela Šarić), zeigte selbst 1 μ M des rekombinanten PbICP-C^{GDEK} oder des Volllängen-Proteins keine inhibitorische Wirkung auf Cathepsin B. Auch PfICP konnte Cathepsin B nicht hemmen¹³⁵. Anhand der Struktur von PbICP-C^{GDEK} im Komplex mit Falcipain-2 wurde ein Strukturmodell von PbICP-C^{GDEK} im Komplex mit Cathepsin B erstellt (freundlicherweise durchgeführt von Dr. Guido Hansen, Universität Lübeck). Hier zeigte sich, dass die Schleifenstrukturen L0 und L6 von PbICP-C^{GDEK} mit dem *occluding loop* von Cathepsin B sterisch interferieren. Nach dem Modell hatte dagegen die verlängerte L4-Schleifenstruktur keinen störenden Einfluss, was mit den Ergebnissen der Mutationsstudien übereinstimmt. Durch die Wechselwirkung mit dem *occluding loop* können die Schleifenstrukturen L2, L4 und L6 von PbICP nicht mehr in die Furche von Cathepsin B-ähnlichen Proteasen gelangen und diese somit auch nicht mehr sterisch blockieren. Obwohl sich der Inhibitor zeitgleich mit den SERA-Proteasen in der PV befindet, hat er demnach höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf ihre Aktivität.

Interessanterweise besitzt *E. histolytica* zwei verschiedene ICP-Mitglieder, die sich in ihrer Proteasespezifität leicht unterscheiden¹³²⁻¹³⁴. Während EhICP2 in Vesikeln lokalisiert ist, befindet sich EhICP1 im Parasitenzytosol. In Analogie zu den Cystatinen, die in Säugern sowohl den Intrazellulärraum als auch den Extrazellulärraum vor unerwünschter Proteaseaktivität schützen⁹¹, könnte EhICP1 vorwiegend als zytosolischer Notfall-Inhibitor fehlgeleitete Parasiten-Proteasen abfangen, während EhICP2 am Transport und der proteolytischen Aktivierung sekretorischer Proteasen beteiligt sein könnte. Bei den *P. berghei* Leberschizonten könnte PbICP beide Funktionen übernehmen, da er sowohl im Parasitenzytosol als auch in Vesikeln und in der PV lokalisiert ist.

Die Immunfluoreszenzanalysen mit den domänenspezifischen Antisera deuteten darauf hin, dass die Prozessierung von PbICP die Lokalisation des Inhibitors steuert. Während sich das Volllängenprotein in Vesikeln und in der PV befand, war die prozessierte Form von PbICP vorwiegend im Parasitenzytosol und teilweise ebenfalls in der PV lokalisiert. Möglicherweise findet die Prozessierung von PbICP in der proteasereichen PV statt und die verkürzte Inhibitorform wird anschließend in das Parasitenzytosol transportiert. Das Prinzip, das ein einzelner Proteaseinhibitor in verschiedene Kompartimente transportiert wird, ist nicht neu. In der Taufliege *Drosophila melanogaster* kodiert ein einzelnes Gen (*spn4*) für verschiedene Isoformen eines Proteaseinhibitors, die nicht nur in verschiedene Kompartimente gelangen, sondern auch über unterschiedliche Serpin-RSL verschiedene Proteaseklassen regulieren¹⁸⁵.

PbICP am Ende der Leberphase

Am Ende der Leberphase wird PbICP in großem Umfang ins Wirtszellzytoplasma freigesetzt. Wahrscheinlich wird der Inhibitor passiv aus der PV entlassen, da kurze Zeit später die Membran der PV deutlich degradiert ist und sich die Merozoiten im Wirtszellzytosol verteilen. Zudem gelangte auch PbICP-C-GFP am Ende der Leberphase in das Wirtszellzytosol (Daten nicht gezeigt), obwohl dem Protein wahrscheinlich durch die Deletion der N-terminalen Verlängerungssequenz das Exportmotiv fehlt. Cysteinproteasen sind sowohl für die Perforation der PVM als auch für den ungewöhnlichen Wirtszelltod verantwortlich, der das Ablösen der infizierten Leberzelle aus dem Zellverband ermöglicht¹². Potentielle Kandidaten hierfür sind die SERA-Cysteinproteasen⁷⁷. Sie werden am Ende der Leberphase auf RNA- und Proteinebene stark hochreguliert, gelangen in die PV und werden wie PbICP am Ende der Leberphase in das Wirtszellzytosol freigesetzt. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt wurde, besitzen die SERA-Proteasen wahrscheinlich eine Cathepsin B-ähnliche Struktur und werden daher möglicherweise nicht von PbICP gehemmt. Während die Parasitenproteasen des Cathepsin B-Typs somit ungestört ihre Effektorfunktionen ausführen können, kontrolliert PbICP möglicherweise Cathepsin L-ähnliche Proteasen von Parasit und Wirtszelle, deren Aktivität in diesem Stadium unerwünscht ist. Die SERA-Proteasen könnten in der Wirtszelle eine ähnliche Funktion wie die Cysteinprotease YopT (*Yersinia outer protein T*) von *Yersinia*-Bakterien ausführen. YopT wird zusammen mit mindestens fünf weiteren Yop-Proteinen über das Typ III Sekretionssystem der extrazellulären Bakterien in Wirtszellen eingeschleust^{196, 197}. Die Injektion von YopT führt innerhalb einer halben Stunde zur Abrundung der Wirtszellen, indem die Protease RhoGTPasen spaltet, die am Aufbau des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind¹⁹⁶⁻²⁰⁰. Während der Umbau des Zytoskeletts durch YopT die *Yersinia*-Bakterien vor phagozytierenden Makrophagen schützt^{201, 202}, ermöglicht dies im Fall der Plasmodien die Merosomenbildung und damit den Austritt aus der Leber¹². Da die Zellabrundung der Hepatozyten innerhalb weniger Minuten nach der PVM-Zerstörung auftritt (unveröffentlichte Fluoreszenzvideomikroskopie von Stefanie Gräwe), könnten auch osmotische Effekte durch die freigesetzten Metabolite aus der PV eine Rolle spielen. Nicht nur beim Infektionsprozess, sondern auch beim Freisetzungsprozess der Plasmodien ist die hypothetische Aktivität des Inhibitors gegen Calpaine und Caspasen der Wirtszelle von großem Interesse. Beide Proteasenfamilien übernehmen wichtige Funktionen beim programmierten Zelltod von Hepatozyten¹⁸⁰, die für den Freisetzungsprozess der Plasmodien kritisch sein können. Einerseits erlauben die Parasiten am Ende der Leberphase den Wirtszelltod für die Merosomenbildung, auf der anderen Seite müssen sie aber auch klassische Zelltodsignale unterdrücken, die sonst Makrophagen aktivieren würden. Beispielsweise kommt es am Ende der Leberphase zwar zur Chromatinkondensation und Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien, nicht aber zur Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Plasmamembranseite¹². Letzteres würde ein Signal für Makrophagen sein, die Parasiten-gefüllten Merosomen zu phagozytieren. Die genauen molekularen

Mechanismen, die den ungewöhnlichen Wirtszelltod am Ende der Leberphase ermöglichen, sind noch nicht bekannt. Selbst uninfizierte Hepatozyten können auf sehr unterschiedliche Weise ihren programmierten Zelltod ausführen¹⁸⁰. Sehr oft handelt es sich dabei um Zwischenformen von den bekannten Zelltodarten Apoptose, Autophagie oder Nekrose. Auch andere Pathogene wie beispielsweise *Chlamydia pneumoniae* veranlassen ihre Wirtszellen dazu, einen ungewöhnlichen Zelltod einzuleiten, der als "Aponekrose" bezeichnet wurde²⁰³. Wie die Plasmodien können die Chlamydien den Tod ihrer Wirtszelle sowohl verhindern als auch induzieren²⁰⁴. Interessanterweise können Chlamydien ihre Wirtszellen auf zwei verschiedene Wege verlassen, die beide Parallelen zum Freisetzungprozess der Merozoiten aus der Leber aufweisen²⁰⁵: Zum einen können sie mit Hilfe von Proteasen die Membran ihrer parasitophoren Vakuole aufschließen, sich im Wirtszellzytoplasma verteilen und anschließend die Wirtszelle lysieren. Zum anderen können sie aber auch unter Beteiligung von RhoGTPasen Merosomen-ähnliche Abschnürungen ausbilden, in denen sich die Bakterien allerdings zusätzlich noch in der PV befinden. Vielleicht können die Plasmodien Parasiten- und Wirts-Proteasen so spezifisch regulieren, dass sie die zwei Austrittsmechanismen der Chlamydien zu einem komplexen Freisetzungsprozess kombinieren konnten. Durch die strikte Kontrolle bestimmter Proteasen, die bei den Chlamydien nach der PV-Zerstörung zur Wirtszelllyse führen, könnten die Plasmodien die Struktur der Wirtszelle bis zu einem gewissen Grad erhalten und damit die Merosomenbildung ermöglichen. Hier wiederum könnte PbICP eine wichtige Rolle spielen, da der Inhibitor unseren *in vitro* Versuchen nach das Potential hat, die Wirtszellintegrität unter Stress zu bewahren^{150, 151} und zudem wahrscheinlich verschiedene Cysteinproteaseklassen kontrollieren kann.

Medizinische Relevanz von PbICP

Cysteinproteasen von *Plasmodium* sind aufgrund ihrer vielfältigen überlebenswichtigen Funktionen hervorragende Kandidaten für die Entwicklung von Antimalaria-medikamenten. Proteaseinhibitoren werden zum Beispiel bei AIDS, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs bereits standardmäßig als Medikament eingesetzt⁹³. In der Regel werden niedermolekulare, membrangängige Inhibitoren mit einer langen Halbwertszeit verwendet, doch neuerdings sind auch große Proteininhibitoren für die pharmazeutische Industrie von Interesse⁹³. Man gewinnt immer mehr Erkenntnisse über ihre immunmodulatorischen Wirkungen und ihre Funktionen bei der Blutgerinnung. Zudem bieten die hochmolekularen Proteininhibitoren eine Vielzahl von Möglichkeiten, um ihre Proteaseselektivität zu erhöhen. Da sie wie alle Proteine im Körper abgebaut werden, eignen sie sich besonders für akute Erkrankungen, bei denen ein kurzfristig wirksamer Notfall-Inhibitor gefragt ist. Beispielsweise befindet sich der Proteaseinhibitor rNAP, der normalerweise von dem parasitisch lebenden Nematoden *Ancylostoma caninum* als Blutagglutinationshemmer abgesondert wird, als Mittel gegen ACS (acute coronary syndromes) bereits in der klinischen Phase IIa (Corvas Pharmaceuticals und Nuvelo)⁹³. Große Proteininhibitoren bilden zudem oft die Grundlage für die Entwicklung von kleinen membrangängigen Peptidinhibitoren. Insbesondere die Aufklärung der Proteinstrukturen mittels Röntgenkristallographie stellt dabei ein wichtiges Werkzeug dar. Die Kristallisation von Proteinkomplexen ermöglicht es, die Interaktion zwischen Proteininhibitoren und ihren Zielproteasen genauer zu charakterisieren und somit selektive Inhibitoren zu entwickeln. Anhand der Proteinstrukturdaten kann anschließend mit Hilfe von Computerprogrammen die Interaktion der Protease mit weiteren Inhibitormolekülen nachgestellt werden (*virtual screening*)⁹³. In der Pharmazie wird diese Methode oftmals mit dem automatisierten Austesten von Molekül-Bibliotheken kombiniert, die bis zu einer Millionen Substanzen umfassen können (*high-throughput screening*, HTS). Auf diese Weise kann auch die Kristallstruktur von PbICP-C einen Beitrag zur Entwicklung eines selektiven, niedermolekularen Inhibitors gegen Plasmodienproteasen leisten. Zukünftig wollen unsere Kooperationspartner der Universität Lübeck das gesamte Inhibitormolekül einschließlich der Plasmodien-spezifischen N-terminalen Verlängerung kristallisieren.

Falls es sich bewahrheitet, dass PbICP immunsuppressiv wirkt und ein Abfangen von PbICP auch *in vivo* die Sporozoitenerkrankung verhindert, könnte dies ein sehr interessanter Aspekt für die Vakzineentwicklung sein. Zudem wird PbICP während des gesamten Lebenszyklus im Vertebratenwirt exprimiert und kommt bereits an der Einstichstelle in der Haut mit dem Immunsystem des Wirtes in Kontakt. In der Haut befinden sich verschiedene Immunzellen (z.B. Dendritische Zellen und Makrophagen), die den Inhibitor als Fremdartigen erkennen und sowohl eine B-Zell-Antwort (und damit die Produktion spezifischer Antikörper) als auch eine CD8⁺-T-Zell-Antwort auslösen können. Sporozoitenerkrankung sezernieren auch während der Hepatozyteninvasion PbICP, so dass der Inhibitor bereits zu Anfang der Leberinfektion in das

Wirtszellzytosol gelangt und theoretisch über MHCI-Komplexe präsentiert werden kann. Die Antigen-Präsentation durch MHCI-Komplexe aktiviert normalerweise zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL), die daraufhin in der infizierten Zelle Apoptose auslösen und somit eine Ausbreitung der Erreger unterbinden. Durch die zahlreichen Studien mit attenuierten Sporozoiten weiß man, dass es in der Tat eine effiziente Immunantwort gegen Sporozoiten und infizierte Leberzellen gibt⁷⁸. Allerdings wird durch die anschließende Blutphase die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnis verhindert, so dass es selbst in Endemiegebieten immer wieder zu Reinfektionen mit dem Malariaerreger kommt⁷⁹⁻⁸¹.

Für den Serinproteaseinhibitor TgPI-1 von *T. gondii*, der wie PbICP bei der Parasiteninvasion von Bedeutung ist, konnten im Mausmodell nach Vakzinierung mit dem rekombinanten Inhibitor bereits erste Erfolge verzeichnet werden²⁰⁶. Allerdings könnte der hypothetische immunsuppressive Effekt von PbICP natürlich bereits bei der Vakzinierung mit dem rekombinanten Protein auftreten, so dass man eventuell nur mit Peptiden von PbICP immunisieren kann, die man zuvor an Trägermaterialien (*Carrier*) gekoppelt hat. Zur Zeit testen wir im Mausmodell, ob die Immunisierung mit PbICP vor einer Infektion mit *P. berghei* schützt oder anderweitig den Verlauf der Krankheit beeinflusst.

Schlusswort

Zusammengefasst ergeben sich für PbICP zahlreiche verschiedene Funktionen, da der Inhibitor

- (1) während des gesamten Lebenszyklus von *P. berghei* exprimiert wird,
- (2) in Abhängigkeit vom Parasitenstadium in den Extrazellulärraum, in die PV, in das Parasitenzytosol und in das Wirtszellzytosol gelangt und damit mit verschiedenen Wirts- und Parasiten-Proteasen in Kontakt kommt,
- (3) sowohl Cathepsin L-ähnliche Wirtsproteasen als auch Parasitenproteasen regulieren kann
- (4) und die potentiellen Zielproteasen sehr vielfältig in ihren biologischen Funktionen sind.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bereits zwei biologische Funktionen von PbICP bestimmt werden: Zum einen reguliert PbICP Cysteinproteasen, die am Invasionsprozess der Sporozoiten beteiligt sind und zum anderen erhält zytosolisches PbICP unter oxidativen Stressbedingungen die Wirtszellintegrität (Abbildung 4-1).

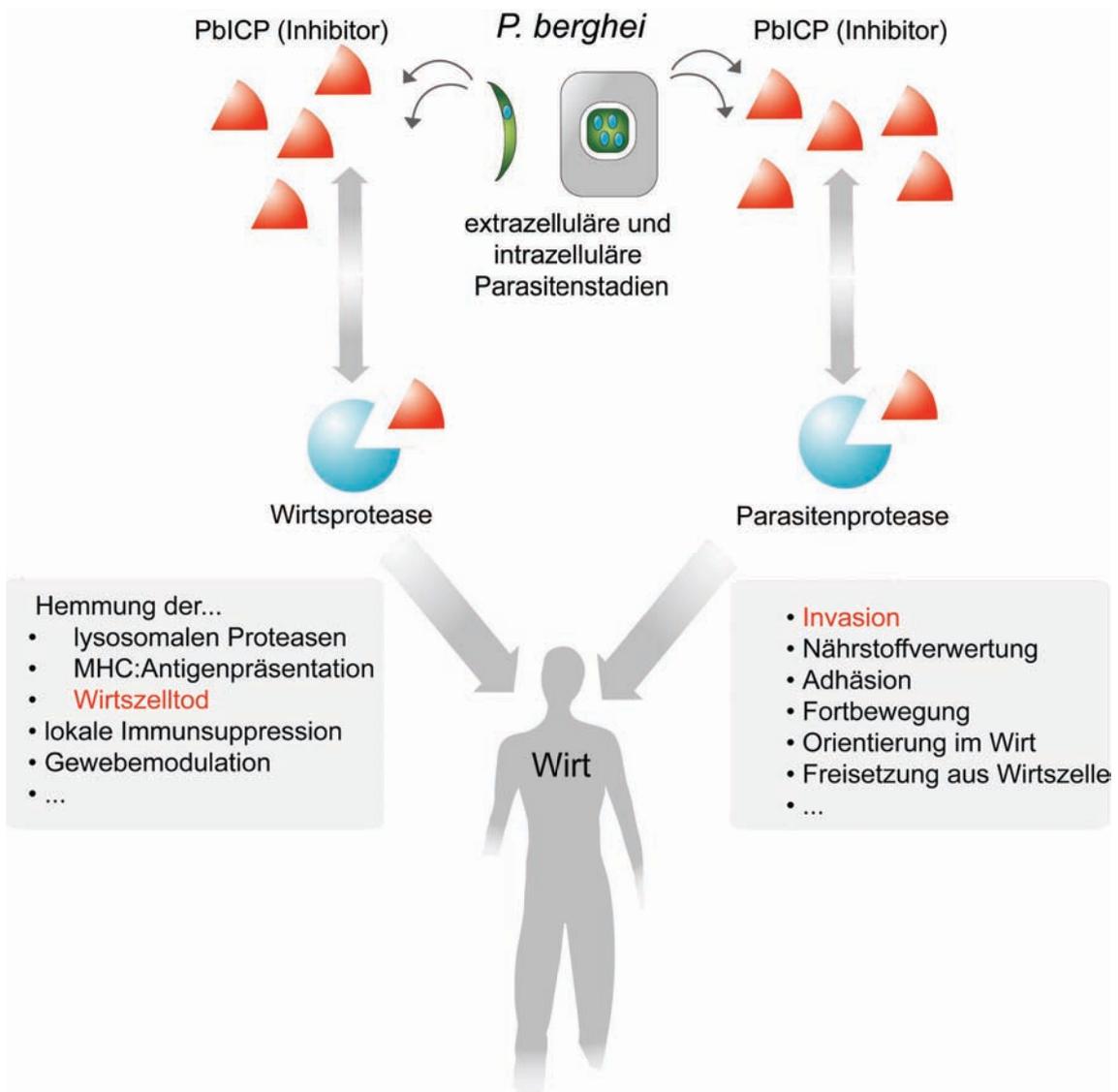


Abbildung 4-1: PbICP kann eine Vielzahl von biologischen Funktionen übernehmen

Im Verlauf der exoerythrozytären Phasen wird PbICP in den Extrazellulärraum sezerniert und gelangt ins Wirtszellzytosol, in die parasitophore Vakuole und ins Parasitenzytosol. Auch von der Proteasespezifität her kann PbICP potenziell sowohl Wirtspoteasen als auch Parasitenproteasen regulieren. Durch die vielfältigen Aufgaben von Proteasen bei Infektionskrankheiten ergeben sich für PbICP zahlreiche hypothetische biologische Funktionen. In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass PbICP für die Sporozooteninvasion wichtig ist und die Vitalität der Wirtszelle beeinflussen kann.

Möglicherweise hat die Charakterisierung von PbICP langfristig auch medizinischen Nutzen (Abbildung 4-2). Die Erkenntnisse, die man aus der Kristallstruktur von PbICP-C^{GDEK} im Komplex mit der Parasitenprotease Falcipain-2 gewinnen kann, könnten bei der Entwicklung selektiver Proteaseinhibitoren helfen. Zudem soll zukünftig getestet werden, ob sich PbICP als Vakzinekandidat eignet. Um das PbICP-Projekt erfolgreich fortzuführen und möglichst viele Aspekte zu berücksichtigen, ist in Zukunft eine intensive Zusammenarbeit mit Kristallographen, Proteasespezialisten und Immunologen geplant.

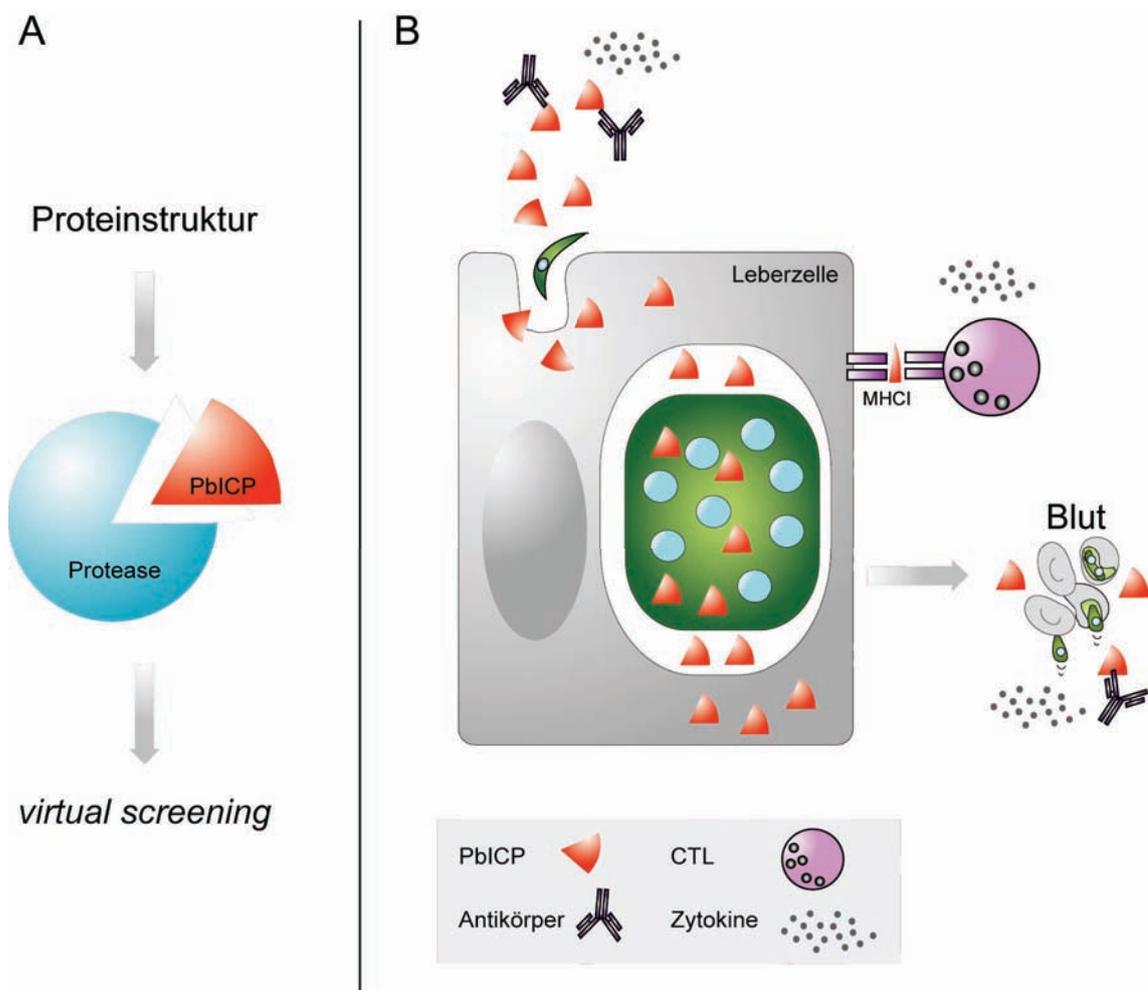


Abbildung 4-2: Potentielle medizinische Nutzen von PbICP

A: Die Aufklärung der Kristallstruktur von PbICP-C^{GDEK} im Komplex mit der Parasitenprotease Falcipain-2 kann für die Entwicklung spezifischer Proteaseinhibitoren nützlich sein. B: Da PbICP sowohl während der exoerythrozytären Entwicklungsphase als auch in der Blutphase dem Immunsystem zugänglich ist, könnte der Inhibitor ein guter Vakzinekandidat sein. Das Abfangen von PbICP durch Antikörper kann die Hepatozyteninfektion durch Sporoziten hemmen, infizierte Leberzellen könnten durch MHC-I-Präsentation von zytotoxischen T-Zellen (CTL) erkannt werden und als Fremdartigen könnte der Inhibitor die proinflammatorische Zytokinantwort stimulieren.

5 Anhang: Vollständige PbICP-Sequenz

Kodogene Sequenz von *pbicp* (1062 nt)

```

ATGAAAAGTATAACTTTTTTCGTGTTTAATATATGCTCCATCCTAGCCCTTTTATCACATTGTGAAGATA
ACGACATATACTCTTTTGATATCGTAAACGAAACAAATTGGCTAAAAATCGCAAAGAACATTTTTAAAG
GAAAATCCCCTTCAAATTTACAATCATACTTTTAATAATACGGGAAGTTCAAACGATAACGAAAGTA
ATAAAGAAGAATCAGTATTATTAATTAGAAAAAAAATAAAATCAAATAAAAACCATGACAGTAGTATAAT
ATCTGGAGATACTGTTAATGGCGATATTAGTGATTTAAATTATACAGCAAGTAATTTTTCTGATAATAGC
GAAGATATAGAAGATAATCAAAAATACCCAACACTTTCATACAACACTATTTAACCATCTTAATTCTAATA
TAGCATTTAACGAAGAATCCGAATACATCGAAATAAATTCGGAATCAGATTTAGAGAATAAAATTAAG
ATATAAATATTTAAAGCAATTTAGAAGAAAACAACACAATGAATGAAAGTGGTAAAGTTGATAGTAAATA
TGAATTGACTGGAGATGAAAAATGTGGTAAATCATTTAAACTAGGAAATATTTCAAATCAAACAAATCA
AGAAACTATTACCCAATCATTATCTGTTGGTGAATATTATGTATTGACCTCGAAGGAAATGCTGGTAC
TGGATATTTATGGGTATTATTAGGAATACACAAGGATGAACCCATTATAAATCCTGAGAATTTCCCCAC
AAAATTAACCAAAAAATCATTTTTTTCAGAAGAAATTTCTGTTACTCAGCCAAAAAATATAAAATCGAT
GAGCATGATAGTTCAAAAAATGTAAATAGGGAAATCGAATCACCAGAGCAAAAAGAAAGTGATTCTAA
ACCCAAGAAACCCCAAATGCAATTACTTGGAGGCCCAGATAGGATGCGAAGTGTAATTAAGGGCATA
AACCAGGAAAATATTATATTGTTTATTCATATTATAGACCATTTTCACCAACTTCAGGAGCAAACACTAA
AATTATATACGTGACTGTCCAA

```

Aminosäuresequenz von PbICP (354 AS; 40 kDa)

```

MKSITFFVFNICSILALLSHCEDNDIYSFDIVNETNWLKIAKNIFKGKSPSNFTIIPFNNTGSSNDNESNKEESV
LLIRKKIKSNKNHDSIIISGDTVNGDISDLNYTASNFSNSEDIEDNQKYPTTSYNSFNHLNSNIAFNEESEYI
EINSESDLENKIKDINIKSNLEENNTMNESGKVDSKYELTGDEKCGKSLKLGNISNQTNQETITQSLVGEIL
CIDLEGNAGTGYLWVLLGIHKDEPIINPENFPTKLTKKSFFSEEISVTQPKKYKIDEHDSSKNVNREIESPEQ
KESDSKPKPKMQLLGGPDRMRSVIKGHKPGKYYIVYSYRPFSPSTSGANTKIIYVTVQ

```

blau: Signalpeptid

grün: C-terminale Chagasin-ähnliche Domäne

grün und kursiv: PbICP-C^{GDEK}

Abbildung 5-1: Vollständige Sequenz von PbICP im Vergleich mit Chagasinfamilienmitgliedern.

*Der multiple Clustal W Sequenzabgleich zeigt die vollständige PbICP-Sequenz und dessen Homologe PylCP (*P. yoelii*) und PflCP (auch Falstatin genannt, *P. falciparum*) im Vergleich mit den Inhibitoren von *L. mexicana* (LmICP), *L. major* (LmaICP), *T. cruzi* (Chagasin), *T. brucei* (TbICP), *E. histolytica* (EhICP1 und EhICP2) und *Cryptosporidium parvum* (CpICP). Die N-terminale Region der Plasmodium-ICPs ist grau unterlegt. Die C-terminale Region von PbICP und Chagasin, der Prototyp der Inhibitorfamilie, sind grün und die zusätzliche Sequenz von PbICP ist in rot hervorgehoben. Die wichtigsten konservierten Aminosäuren der ICPs sind fett gedruckt. Das klassische Signalpeptid der Plasmodium-ICPs ist blau hervorgehoben. Dazu ist die hypothetische Prozessierungsstelle von PbICP und die für die Inhibition essentiellen Schleifenstrukturen L2, L4 und L6 eingezeichnet.*

6 Literaturverzeichnis

1. Snow, R. W., Guerra, C. A., Noor, A. M., Myint, H. Y. & Hay, S. I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434, 214-7 (2005).
2. Cox-Singh, J. et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis* 46, 165-71 (2008).
3. Haldar, K., Murphy, S. C., Milner, D. A. & Taylor, T. E. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annu Rev Pathol* 2, 217-49 (2007).
4. Schöneberg, I., Krause, G., Ammon, A., Strobel, H. & Stark, K. Erfassung der Malaria in Deutschland - Daten und Fakten zu den Erkrankungen in Deutschland 2000/2001. Übergang zu einem neuen Meldesystem. *Das Gesundheitswesen* 65, 263-269 (2003).
5. Kaiser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J. & Zinkernagel, R. M. *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag (1998).
6. Sherman, I. W. *Molecular approaches to malaria*. ASM Press (2005).
7. Amino, R. et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med* 12, 220-4 (2006).
8. Kebaier, C., Voza, T. & Vanderberg, J. Kinetics of mosquito-injected *Plasmodium* sporozoites in mice: fewer sporozoites are injected into sporozoite-immunized mice. *PLoS Pathog* 5, e1000399 (2009).
9. Frevert, U. et al. Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol* 3, e192 (2005).
10. Mota, M. M. et al. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* 291, 141-4 (2001).
11. Sturm, A. et al. Alteration of the parasite plasma membrane and the parasitophorous vacuole membrane during exo-erythrocytic development of malaria parasites. *Protist* 160, 51-63 (2009).
12. Sturm, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 313, 1287-90 (2006).
13. Baer, K., Klotz, C., Kappe, S. H., Schnieder, T. & Frevert, U. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog* 3, e171 (2007).
14. Carter & Diggs. *Plasmodia of rodents*. *Parasitic Protozoa* 3, 359-465 (1977).
15. Sidjanski, S. & Vanderberg, J. P. Delayed migration of *Plasmodium* sporozoites from the mosquito bite site to the blood. *Am J Trop Med Hyg* 57, 426-9 (1997).
16. Matsuoka, H., Yoshida, S., Hirai, M. & Ishii, A. A rodent malaria, *Plasmodium berghei*, is experimentally transmitted to mice by merely probing of infective mosquito, *Anopheles stephensi*. *Parasitol Int* 51, 17-23 (2002).
17. Vanderberg, J. P. & Frevert, U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. *Int J Parasitol* 34, 991-6 (2004).

18. Medica, D. L. & Sinnis, P. Quantitative dynamics of *Plasmodium yoelii* sporozoite transmission by infected anopheline mosquitoes. *Infect Immun* 73, 4363-9 (2005).
19. Amino, R. et al. Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nat Protoc* 2, 1705-12 (2007).
20. Jin, Y., Kebaier, C. & Vanderberg, J. Direct microscopic quantification of dynamics of *Plasmodium berghei* sporozoite transmission from mosquitoes to mice. *Infect Immun* 75, 5532-9 (2007).
21. Yamauchi, L. M., Coppi, A., Snounou, G. & Sinnis, P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol* 9, 1215-22 (2007).
22. Sinnis, P. & Coppi, A. A long and winding road: the *Plasmodium* sporozoite's journey in the mammalian host. *Parasitol Int* 56, 171-8 (2007).
23. Tardieux, I. & Menard, R. Migration of Apicomplexa across biological barriers: the *Toxoplasma* and *Plasmodium* rides. *Traffic* 9, 627-35 (2008).
24. Amino, R. et al. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe* 3, 88-96 (2008).
25. Kappe, S. et al. Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J Cell Biol* 147, 937-44 (1999).
26. Ishino, T., Yano, K., Chinzei, Y. & Yuda, M. Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLoS Biol* 2, E4 (2004).
27. Matuschewski, K. & Schuler, H. Actin/myosin-based gliding motility in apicomplexan parasites. *Subcell Biochem* 47, 110-20 (2008).
28. Stewart, M. J. & Vanderberg, J. P. Malaria sporozoites release circumsporozoite protein from their apical end and translocate it along their surface. *J Protozool* 38, 411-21 (1991).
29. Sultan, A. A. et al. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Cell* 90, 511-22 (1997).
30. Yoshida, N., Nussenzweig, R., Potocnjak, P., Nussenzweig, V. & Aikawa, M. Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. *Science* 207, 71-73 (1980).
31. Frevert, U. et al. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med* 177, 1287-98 (1993).
32. Ying, P. et al. The malaria circumsporozoite protein: interaction of the conserved regions I and II-plus with heparin-like oligosaccharides in heparan sulfate. *Exp Parasitol* 85, 168-82 (1997).
33. Pinzon-Ortiz, C., Friedman, J., Esko, J. & Sinnis, P. The binding of the circumsporozoite protein to cell surface heparan sulfate proteoglycans is required for *Plasmodium* sporozoite attachment to target cells. *J Biol Chem* 276, 26784-91 (2001).
34. Pradel, G., Garapaty, S. & Frevert, U. Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Mol Microbiol* 45, 637-51 (2002).
35. Coppi, A., Pinzon-Ortiz, C., Hutter, C. & Sinnis, P. The *Plasmodium* circumsporozoite protein is proteolytically processed during cell invasion. *J Exp Med* 201, 27-33 (2005).

36. Carolo, M. et al. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nat Med* 9, 1363-9 (2003).
37. Kaiser, K. et al. A member of a conserved Plasmodium protein family with membrane-attack complex/perforin (MACPF)-like domains localizes to the micronemes of sporozoites. *Mol Biochem Parasitol* 133, 15-26 (2004).
38. Ishino, T., Chinzei, Y. & Yuda, M. A Plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. *Cell Microbiol* 7, 199-208 (2005).
39. Kariu, T., Ishino, T., Yano, K., Chinzei, Y. & Yuda, M. CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Mol Microbiol* 59, 1369-79 (2006).
40. Bhanot, P., Schauer, K., Coppens, I. & Nussenzweig, V. A surface phospholipase is involved in the migration of plasmodium sporozoites through cells. *J Biol Chem* 280, 6752-60 (2005).
41. Pradel, G. & Frevert, U. Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology* 33, 1154-65 (2001).
42. Baer, K. et al. Kupffer cells are obligatory for Plasmodium yoelii sporozoite infection of the liver. *Cell Microbiol* 9, 397-412 (2007).
43. Usynin, I., Klotz, C. & Frevert, U. Malaria circumsporozoite protein inhibits the respiratory burst in Kupffer cells. *Cell Microbiol* 9, 2610-28 (2007).
44. Klotz, C. & Frevert, U. Plasmodium yoelii sporozoites modulate cytokine profile and induce apoptosis in murine Kupffer cells. *Int J Parasitol* 38, 1639-50 (2008).
45. Mota, M. M., Hafalla, J. C. & Rodriguez, A. Migration through host cells activates Plasmodium sporozoites for infection. *Nat Med* 8, 1318-22 (2002).
46. Kumar, K. A. et al. Exposure of Plasmodium sporozoites to the intracellular concentration of potassium enhances infectivity and reduces cell passage activity. *Mol Biochem Parasitol* 156, 32-40 (2007).
47. Ono, T. et al. Adenylyl cyclase alpha and cAMP signaling mediate Plasmodium sporozoite apical regulated exocytosis and hepatocyte infection. *PLoS Pathog* 4, e1000008 (2008).
48. Leiriao, P. et al. HGF/MET signalling protects Plasmodium-infected host cells from apoptosis. *Cell Microbiol* 7, 603-9 (2005).
49. Torgler, R. et al. Sporozoite-mediated hepatocyte wounding limits Plasmodium parasite development via MyD88-mediated NF-kappa B activation and inducible NO synthase expression. *J Immunol* 180, 3990-9 (2008).
50. Coppi, A. et al. Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to Plasmodium sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell Host Microbe* 2, 316-27 (2007).
51. Pasquetto, V. et al. Plasmodium falciparum sporozoite invasion is inhibited by naturally acquired or experimentally induced polyclonal antibodies to the STARP antigen. *Eur J Immunol* 27, 2502-13 (1997).
52. Lopez, R. et al. Identification of specific Hep G2 cell binding regions in Plasmodium falciparum sporozoite-threonine-asparagine-rich protein (STARP). *Vaccine* 21, 2404-11 (2003).
53. van Dijk, M. R. et al. Genetically attenuated, P36p-deficient malarial sporozoites induce protective immunity and apoptosis of infected liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12194-9 (2005).

54. Fidock, D. A. et al. Cloning and characterization of a novel *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigen, STARP. *Mol Biochem Parasitol* 64, 219-32 (1994).
55. Kappe, S. H. et al. Exploring the transcriptome of the malaria sporozoite stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9895-900 (2001).
56. Gruner, A. C. et al. Expression of the erythrocyte-binding antigen 175 in sporozoites and in liver stages of *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis* 184, 892-7 (2001).
57. Chattopadhyay, R. et al. PfSPATR, a *Plasmodium falciparum* protein containing an altered thrombospondin type I repeat domain is expressed at several stages of the parasite life cycle and is the target of inhibitory antibodies. *J Biol Chem* 278, 25977-81 (2003).
58. Silvie, O. et al. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem* 279, 9490-6 (2004).
59. Ishino, T., Chinzei, Y. & Yuda, M. Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte. *Mol Microbiol* 58, 1264-75 (2005).
60. Labaied, M. et al. *Plasmodium yoelii* sporozoites with simultaneous deletion of P52 and P36 are completely attenuated and confer sterile immunity against infection. *Infect Immun* 75, 3758-68 (2007).
61. Silvie, O., Goetz, K. & Matuschewski, K. A sporozoite asparagine-rich protein controls initiation of *Plasmodium* liver stage development. *PLoS Pathog* 4, e1000086 (2008).
62. Aly, A. S. et al. Targeted deletion of SAP1 abolishes the expression of infectivity factors necessary for successful malaria parasite liver infection. *Mol Microbiol* 69, 152-63 (2008).
63. Mikolajczak, S. A. et al. Distinct malaria parasite sporozoites reveal transcriptional changes that cause differential tissue infection competence in the mosquito vector and mammalian host. *Mol Cell Biol* 28, 6196-207 (2008).
64. van Schaijk, B. C. et al. Gene disruption of *Plasmodium falciparum* p52 results in attenuation of malaria liver stage development in cultured primary human hepatocytes. *PLoS ONE* 3, e3549 (2008).
65. Carruthers, V. B. & Blackman, M. J. A new release on life: emerging concepts in proteolysis and parasite invasion. *Mol Microbiol* 55, 1617-30 (2005).
66. Shakibaei, M. & Frevert, U. Dual interaction of the malaria circumsporozoite protein with the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and heparan sulfate proteoglycans. *J Exp Med* 184, 1699-711 (1996).
67. Silvie, O. et al. Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nat Med* 9, 93-6 (2003).
68. Jethwaney, D. et al. Fetuin-A, a hepatocyte-specific protein that binds *Plasmodium berghei* thrombospondin-related adhesive protein: a potential role in infectivity. *Infect Immun* 73, 5883-91 (2005).
69. Silvie, O. et al. Expression of human CD81 differently affects host cell susceptibility to malaria sporozoites depending on the *Plasmodium* species. *Cell Microbiol* 8, 1134-46 (2006).

70. Bano, N., Romano, J. D., Jayabalasingham, B. & Coppens, I. Cellular interactions of Plasmodium liver stage with its host mammalian cell. *Int J Parasitol* 37, 1329-41 (2007).
71. van de Sand, C. et al. The liver stage of Plasmodium berghei inhibits host cell apoptosis. *Mol Microbiol* 58, 731-42 (2005).
72. Haldar, K. et al. Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. *Cell Microbiol* 4, 383-95 (2002).
73. Maier, A. G., Cooke, B. M., Cowman, A. F. & Tilley, L. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat Rev Microbiol* 7, 341-54 (2009).
74. Khan, Z. M., Ng, C. & Vanderberg, J. P. Early hepatic stages of Plasmodium berghei: release of circumsporozoite protein and host cellular inflammatory response. *Infect Immun* 60, 264-70 (1992).
75. Singh, A. P. et al. Plasmodium circumsporozoite protein promotes the development of the liver stages of the parasite. *Cell* 131, 492-504 (2007).
76. Horrocks, P. & Muhia, D. Pexel/VTS: a protein-export motif in erythrocytes infected with malaria parasites. *Trends Parasitol* 21, 396-9 (2005).
77. Schmidt-Christensen, A., Sturm, A., Horstmann, S. & Heussler, V. T. Expression and processing of Plasmodium berghei SERA3 during liver stages. *Cell Microbiol* 10, 1723-34 (2008).
78. Walther, M. Advances in vaccine development against the pre-erythrocytic stage of Plasmodium falciparum malaria. *Expert Rev Vaccines* 5, 81-93 (2006).
79. Williamson, W. A. & Greenwood, B. M. Impairment of the immune response to vaccination after acute malaria. *Lancet* 1, 1328-9 (1978).
80. Ocana-Morgner, C. et al. Role of TGF-beta and PGE2 in T cell responses during Plasmodium yoelii infection. *Eur J Immunol* 37, 1562-74 (2007).
81. Orengo, J. M., Wong, K. A., Ocana-Morgner, C. & Rodriguez, A. A Plasmodium yoelii soluble factor inhibits the phenotypic maturation of dendritic cells. *Malar J* 7, 254 (2008).
82. Mueller, A. K. et al. Plasmodium liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite-host interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3022-7 (2005).
83. Mueller, A. K. et al. Genetically attenuated Plasmodium berghei liver stages persist and elicit sterile protection primarily via CD8 T cells. *Am J Pathol* 171, 107-15 (2007).
84. Purcell, L. A. et al. Chemically attenuated Plasmodium sporozoites induce specific immune responses, sterile immunity and cross-protection against heterologous challenge. *Vaccine* 26, 4880-4 (2008).
85. Matuschewski, K. Vaccine development against malaria. *Curr Opin Immunol* 18, 449-57 (2006).
86. Nussenzweig, R. Use of radiation-attenuated sporozoites in the immunoprophylaxis of malaria. *Int J Nucl Med Biol* 7, 89-96 (1980).
87. Alonso, P. L. et al. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 364, 1411-20 (2004).
88. Bejon, P. et al. Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *N Engl J Med* 359, 2521-32 (2008).

89. Rawlings, N. D., Morton, F. R. & Barrett, A. J. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 34, D270-2 (2006).
90. Rawlings, N. D., Tolle, D. P. & Barrett, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J* 378, 705-16 (2004).
91. Turk, B., Turk, D. & Salvesen, G. S. Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr Pharm Des* 8, 1623-37 (2002).
92. Sajid, M. & McKerrow, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* 120, 1-21 (2002).
93. Turk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 5, 785-99 (2006).
94. Wiederanders, B., Kaulmann, G. & Schilling, K. Functions of propeptide parts in cysteine proteases. *Curr Protein Pept Sci* 4, 309-26 (2003).
95. Carmona, E. et al. Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. *Biochemistry* 35, 8149-57 (1996).
96. Fox, T., de Miguel, E., Mort, J. S. & Storer, A. C. Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* 31, 12571-6 (1992).
97. Yamamoto, Y., Kurata, M., Watabe, S., Murakami, R. & Takahashi, S. Y. Novel cysteine proteinase inhibitors homologous to the proregions of cysteine proteinases. *Curr Protein Pept Sci* 3, 231-8 (2002).
98. Dubin, G. Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 62, 653-69 (2005).
99. Sottrup-Jensen, L. et al. Primary structure of human alpha 2-macroglobulin. V. The complete structure. *J Biol Chem* 259, 8318-27 (1984).
100. Lecaille, F., Kaleta, J. & Bromme, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev* 102, 4459-88 (2002).
101. McKerrow, J. H., Engel, J. C. & Caffrey, C. R. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg Med Chem* 7, 639-44 (1999).
102. Que, X. & Reed, S. L. Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 13, 196-206 (2000).
103. Tillack, M. et al. The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics* 8, 170 (2007).
104. Rosenthal, P. J., Sijwali, P. S., Singh, A. & Shenai, B. R. Cysteine proteases of malaria parasites: targets for chemotherapy. *Curr Pharm Des* 8, 1659-72 (2002).
105. Rosenthal, P. J. Cysteine proteases of malaria parasites. *Int J Parasitol* 34, 1489-99 (2004).
106. Aly, A. S. & Matuschewski, K. A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium* sporozoite egress from oocysts. *J Exp Med* 202, 225-30 (2005).
107. Blackman, M. J. Malarial proteases and host cell egress: an 'emerging' cascade. *Cell Microbiol* 10, 1925-34 (2008).
108. Schierack, P., Lucius, R., Sonnenburg, B., Schilling, K. & Hartmann, S. Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. *Infect Immun* 71, 2422-9 (2003).

109. Maizels, R. M., Gomez-Escobar, N., Gregory, W. F., Murray, J. & Zang, X. Immune evasion genes from filarial nematodes. *Int J Parasitol* 31, 889-98 (2001).
110. Manoury, B., Gregory, W. F., Maizels, R. M. & Watts, C. Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing. *Curr Biol* 11, 447-51 (2001).
111. Blott, E. J. & Griffiths, G. M. Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 122-31 (2002).
112. Luzio, J. P., Pryor, P. R. & Bright, N. A. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 622-32 (2007).
113. Clem, R. J., Fechheimer, M. & Miller, L. K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254, 1388-90 (1991).
114. Besteiro, S., Coombs, G. H. & Mottram, J. C. A potential role for ICP, a Leishmanial inhibitor of cysteine peptidases, in the interaction between host and parasite. *Mol Microbiol* 54, 1224-36 (2004).
115. Hartmann, S. & Lucius, R. Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *Int J Parasitol* 33, 1291-302 (2003).
116. Murray, J., Manoury, B., Balic, A., Watts, C. & Maizels, R. M. Bm-CPI-2, a cystatin from *Brugia malayi* nematode parasites, differs from *Caenorhabditis elegans* cystatins in a specific site mediating inhibition of the antigen-processing enzyme AEP. *Mol Biochem Parasitol* 139, 197-203 (2005).
117. Gregory, W. F. & Maizels, R. M. Cystatins from filarial parasites: evolution, adaptation and function in the host-parasite relationship. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1389-98 (2008).
118. Schnoeller, C. et al. A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages. *J Immunol* 180, 4265-72 (2008).
119. Zavasnik-Bergant, T. Cystatin protease inhibitors and immune functions. *Front Biosci* 13, 4625-37 (2008).
120. Kotsyfakis, M. et al. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem* 281, 26298-307 (2006).
121. Hartmann, S., Kyewski, B., Sonnenburg, B. & Lucius, R. A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production. *Eur J Immunol* 27, 2253-60 (1997).
122. Dainichi, T. et al. Nippocystatin, a cysteine protease inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response. *Infect Immun* 69, 7380-6 (2001).
123. Clem, R. J. & Miller, L. K. Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. *Mol Cell Biol* 14, 5212-22 (1994).
124. Zhou, Q. et al. Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry* 37, 10757-65 (1998).
125. Zhou, Q. & Salvesen, G. S. Viral caspase inhibitors CrmA and p35. *Methods Enzymol* 322, 143-54 (2000).
126. Bryant, B. & Clem, R. J. Caspase inhibitor P35 is required for the production of robust baculovirus virions in *Trichoplusia ni* TN-368 cells. *J Gen Virol* 90, 654-61 (2009).

127. Monteiro, A. C., Abrahamson, M., Lima, A. P., Vannier-Santos, M. A. & Scharfstein, J. Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci* 114, 3933-42 (2001).
128. Sanderson, S. J., Westrop, G. D., Scharfstein, J., Mottram, J. C. & Coombs, G. H. Functional conservation of a natural cysteine peptidase inhibitor in protozoan and bacterial pathogens. *FEBS Lett* 542, 12-6 (2003).
129. Santos, C. C., Scharfstein, J. & de, A. L. A. P. Role of chagasin-like inhibitors as endogenous regulators of cysteine proteases in parasitic protozoa. *Parasitol Res* (2006).
130. Santos, C. C. et al. Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. *J Cell Sci* 118, 901-15 (2005).
131. Santos, C. C., Coombs, G. H., Lima, A. P. & Mottram, J. C. Role of the *Trypanosoma brucei* natural cysteine peptidase inhibitor ICP in differentiation and virulence. *Mol Microbiol* 66, 991-1002 (2007).
132. Riekenberg, S., Witjes, B., Saric, M., Bruchhaus, I. & Scholze, H. Identification of EhICP1, a chagasin-like cysteine protease inhibitor of *Entamoeba histolytica*. *FEBS Lett* 579, 1573-8 (2005).
133. Saric, M., Vahrman, A., Bruchhaus, I., Bakker-Grunwald, T. & Scholze, H. The second cysteine protease inhibitor, EhICP2, has a different localization in trophozoites of *Entamoeba histolytica* than EhICP1. *Parasitol Res* 100, 171-4 (2006).
134. Sato, D., Nakada-Tsukui, K., Okada, M. & Nozaki, T. Two cysteine protease inhibitors, EhICP1 and 2, localized in distinct compartments, negatively regulate secretion in *Entamoeba histolytica*. *FEBS Lett* 580, 5306-12 (2006).
135. Pandey, K. C., Singh, N., Arastu-Kapur, S., Bogyo, M. & Rosenthal, P. J. Falstatin, a cysteine protease inhibitor of *Plasmodium falciparum*, facilitates erythrocyte invasion. *PLoS Pathog* 2, e117 (2006).
136. Figueiredo da Silva, A. A. et al. Crystal structure of chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor from *Trypanosoma cruzi*. *J Struct Biol* 157, 416-23 (2007).
137. Smith, B. O. et al. The structure of *Leishmania mexicana* ICP provides evidence for convergent evolution of cysteine peptidase inhibitors. *J Biol Chem* 281, 5821-8 (2006).
138. Wang, S. X. et al. The structure of chagasin in complex with a cysteine protease clarifies the binding mode and evolution of an inhibitor family. *Structure* 15, 535-43 (2007).
139. Ljunggren, A. et al. Crystal structure of the parasite protease inhibitor chagasin in complex with a host target cysteine protease. *J Mol Biol* 371, 137-53 (2007).
140. Redzynia, I. et al. Crystal structure of the parasite inhibitor chagasin in complex with papain allows identification of structural requirements for broad reactivity and specificity determinants for target proteases. *FEBS J* 276, 793-806 (2009).
141. Redzynia, I. et al. Displacement of the occluding loop by the parasite protein, chagasin, results in efficient inhibition of human cathepsin B. *J Biol Chem* 283, 22815-25 (2008).
142. Rennenberg, A. Charakterisierung eines Cysteinproteaseinhibitors von *Plasmodium berghei* (Vincke & Lips, 1948) (2006).

143. Franke-Fayard, B. et al. A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 137, 23-33 (2004).
144. Graewe, S., Retzlaff, S., Struck, N., Janse, C. J. & Heussler, V. T. Going live: A comparative analysis of the suitability of the RFP derivatives RedStar, mCherry and tdTomato for intravital and in vitro live imaging of *Plasmodium* parasites. *Biotechnol J* (2009).
145. Janse, C. J., Ramesar, J. & Waters, A. P. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc* 1, 346-56 (2006).
146. Kumar, K. A., Oliveira, G. A., Edelman, R., Nardin, E. & Nussenzweig, V. Quantitative *Plasmodium* sporozoite neutralization assay (TSNA). *J Immunol Methods* 292, 157-64 (2004).
147. Hogg, T. et al. Structural and functional characterization of Falcipain-2, a hemoglobinase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 281, 25425-37 (2006).
148. Witt, T. Mutagenese des Proteaseinhibitors PbICP von *Plasmodium berghei* (2007).
149. Heitmann, A. Herstellung transgener *Plasmodium berghei* Parasiten, die die Inhibitor-domäne des Cysteinproteaseinhibitors PbICP überexprimieren (Vincke und Lips, 1948). (2008).
150. Lehmann, C. Interaktion eines Cysteinproteasen-Inhibitors von *Plasmodium berghei* (Vincke & Lips, 1948) mit Wirtszellproteasen während der Hepatozyteninfektion. (2008).
151. Rennenberg, A. et al. A novel cysteine protease inhibitor of the malaria parasite plays a role in sporozoite invasion and host cell vitality. (in preparation).
152. Rosenthal, P. J. *Plasmodium falciparum*: effects of proteinase inhibitors on globin hydrolysis by cultured malaria parasites. *Exp Parasitol* 80, 272-81 (1995).
153. Salmon, B. L., Oksman, A. & Goldberg, D. E. Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 271-6 (2001).
154. Shenai, B. R., Semenov, A. V. & Rosenthal, P. J. Stage-specific antimalarial activity of cysteine protease inhibitors. *Biol Chem* 383, 843-7 (2002).
155. Dahl, E. L. & Rosenthal, P. J. Biosynthesis, localization, and processing of falcipain cysteine proteases of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 139, 205-12 (2005).
156. Eksi, S. et al. Inhibition of *Plasmodium falciparum* oocyst production by membrane-permeant cysteine protease inhibitor E64d. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 1064-70 (2007).
157. Scharfstein, J. & Lima, A. P. Roles of naturally occurring protease inhibitors in the modulation of host cell signaling and cellular invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Subcell Biochem* 47, 140-54 (2008).
158. Cornell, R. B. & Taneva, S. G. Amphipathic helices as mediators of the membrane interaction of amphitropic proteins, and as modulators of bilayer physical properties. *Curr Protein Pept Sci* 7, 539-52 (2006).

159. Mercier, C., Cesbron-Delauw, M. F. & Sibley, L. D. The amphipathic alpha helices of the toxoplasma protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *J Cell Sci* 111 (Pt 15), 2171-80 (1998).
160. Lindh, J. G., Botero-Kleiven, S., Arboleda, J. I. & Wahlgren, M. A protease inhibitor associated with the surface of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 116, 137-45 (2001).
161. Morris, M. T., Coppin, A., Tomavo, S. & Carruthers, V. B. Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor 1. *J Biol Chem* 277, 45259-66 (2002).
162. Morris, M. T. & Carruthers, V. B. Identification and partial characterization of a second Kazal inhibitor in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 128, 119-22 (2003).
163. Pszenny, V. et al. Molecular cloning, sequencing and expression of a serine proteinase inhibitor gene from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 107, 241-9 (2000).
164. Lustigman, S., Brotman, B., Huima, T., Prince, A. M. & McKerrow, J. H. Molecular cloning and characterization of onchocystatin, a cysteine proteinase inhibitor of *Onchocerca volvulus*. *J Biol Chem* 267, 17339-46 (1992).
165. Das, L., Datta, N., Bandyopadhyay, S. & Das, P. K. Successful therapy of lethal murine visceral leishmaniasis with cystatin involves up-regulation of nitric oxide and a favorable T cell response. *J Immunol* 166, 4020-8 (2001).
166. Kar, S., Ukil, A. & Das, P. K. Signaling events leading to the curative effect of cystatin on experimental visceral leishmaniasis: involvement of ERK1/2, NF-kappaB and JAK/STAT pathways. *Eur J Immunol* 39, 741-51 (2009).
167. David, G. Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *Faseb J* 7, 1023-30 (1993).
168. Lima, A. P. et al. Heparan sulfate modulates kinin release by *Trypanosoma cruzi* through the activity of cruzipain. *J Biol Chem* 277, 5875-81 (2002).
169. Scharfstein, J. et al. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J Exp Med* 192, 1289-300 (2000).
170. Mehendale, H. M. & Limaye, P. B. Calpain: a death protein that mediates progression of liver injury. *Trends Pharmacol Sci* 26, 232-6 (2005).
171. Frevert, U., Usynin, I., Baer, K. & Klotz, C. Plasmodium sporozoite passage across the sinusoidal cell layer. *Subcell Biochem* 47, 182-97 (2008).
172. Heussler, V. T., Kuenzi, P. & Rottenberg, S. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int J Parasitol* 31, 1166-76 (2001).
173. Heussler, V., Sturm, A. & Langsley, G. Regulation of host cell survival by intracellular Plasmodium and Theileria parasites. *Parasitology* 132 Suppl, S49-60 (2006).
174. Bruchhaus, I., Roeder, T., Rennenberg, A. & Heussler, V. T. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends Parasitol* 23, 376-83 (2007).
175. Hacker, G., Kirschnek, S. & Fischer, S. F. Apoptosis in infectious disease: how bacteria interfere with the apoptotic apparatus. *Med Microbiol Immunol* 195, 11-9 (2006).
176. Galluzzi, L., Brenner, C., Morselli, E., Touat, Z. & Kroemer, G. Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog* 4, e1000018 (2008).

177. Ying, S., Pettengill, M., Ojcius, D. M. & Hacker, G. Host-Cell Survival and Death During Chlamydia Infection. *Curr Immunol Rev* 3, 31-40 (2007).
178. Hacker, G., Hawkins, C. J., Smith, K. G. & Vaux, D. L. Effects of viral inhibitors of apoptosis in models of mammalian cell death. *Behring Inst Mitt*, 118-26 (1996).
179. Zhou, Q. et al. Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem* 272, 7797-800 (1997).
180. Berry, M. N. & Edwards, A. M. *The Hepatocyte Review* Springer (2000).
181. Salmon, D. et al. Solution structure and backbone dynamics of the Trypanosoma cruzi cysteine protease inhibitor chagasin. *J Mol Biol* 357, 1511-21 (2006).
182. Rzychon, M., Chmiel, D. & Stec-Niemczyk, J. Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochim Pol* 51, 861-73 (2004).
183. Otlewski, J., Jelen, F., Zakrzewska, M. & Oleksy, A. The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *Embo J* 24, 1303-10 (2005).
184. Van Rompaey, L., Proost, P., Van den Berghe, H. & Marynen, P. Design of a new protease inhibitor by the manipulation of the bait region of alpha 2-macroglobulin: inhibition of the tobacco etch virus protease by mutant alpha 2-macroglobulin. *Biochem J* 312 (Pt 1), 191-5 (1995).
185. Bruning, M. et al. The Spn4 gene from Drosophila melanogaster is a multipurpose defence tool directed against proteases from three different peptidase families. *Biochem J* 401, 325-31 (2007).
186. Dobo, J., Swanson, R., Salvesen, G. S., Olson, S. T. & Gettins, P. G. Cytokine response modifier a inhibition of initiator caspases results in covalent complex formation and dissociation of the caspase tetramer. *J Biol Chem* 281, 38781-90 (2006).
187. Bhanot, P., Frevert, U., Nussenzweig, V. & Persson, C. Defective sorting of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) inhibits Plasmodium infectivity. *Mol Biochem Parasitol* 126, 263-73 (2003).
188. Treeck, M. et al. A conserved region in the EBL proteins is implicated in microneme targeting of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *J Biol Chem* 281, 31995-2003 (2006).
189. Hiller, N. L. et al. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* 306, 1934-7 (2004).
190. Marti, M., Good, R. T., Rug, M., Knuepfer, E. & Cowman, A. F. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* 306, 1930-3 (2004).
191. Spielmann, T. et al. A cluster of ring stage-specific genes linked to a locus implicated in cytoadherence in Plasmodium falciparum codes for PEXEL-negative and PEXEL-positive proteins exported into the host cell. *Mol Biol Cell* 17, 3613-24 (2006).
192. Dixon, M. W. et al. Targeting of the ring exported protein 1 to the Maurer's clefts is mediated by a two-phase process. *Traffic* 9, 1316-26 (2008).
193. Nyalwidhe, J. & Lingelbach, K. Proteases and chaperones are the most abundant proteins in the parasitophorous vacuole of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Proteomics* 6, 1563-73 (2006).

194. Shaw, M. K., Roos, D. S. & Tilney, L. G. Cysteine and serine protease inhibitors block intracellular development and disrupt the secretory pathway of *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect* 4, 119-32 (2002).
195. Yeoh, S. et al. Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes. *Cell* 131, 1072-83 (2007).
196. Zumbihl, R. et al. The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J Biol Chem* 274, 29289-93 (1999).
197. Iriarte, M. & Cornelis, G. R. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* 29, 915-29 (1998).
198. Sorg, I., Goehring, U. M., Aktories, K. & Schmidt, G. Recombinant *Yersinia* YopT leads to uncoupling of RhoA-effector interaction. *Infect Immun* 69, 7535-43 (2001).
199. Shao, F., Merritt, P. M., Bao, Z., Innes, R. W. & Dixon, J. E. A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109, 575-88 (2002).
200. Shao, F. et al. Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 904-9 (2003).
201. Aepfelbacher, M. et al. Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. *J Biol Chem* 278, 33217-23 (2003).
202. Grosdent, N., Maridonneau-Parini, I., Sory, M. P. & Cornelis, G. R. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* 70, 4165-76 (2002).
203. Dumrese, C. et al. *Chlamydia pneumoniae* induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *BMC Microbiol* 5, 2 (2005).
204. Ying, S. et al. Characterization of host cell death induced by *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 74, 6057-66 (2006).
205. Hybiske, K. & Stephens, R. S. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11430-5 (2007).
206. Cuppari, A. F. et al. *Toxoplasma gondii* protease inhibitor-1 (TgPI-1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. *Vaccine* 26, 5040-5 (2008).

Danksagungen

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

Besonders bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Volker Heussler für die Themenstellung, die vielen anregenden Diskussionen und die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit.

Allen Mitgliedern der AG Malaria I danke ich aus ganzem Herzen für die tolle Arbeitsatmosphäre sowie für die große Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor!!! Der Dank geht ebenso auch an die Mitarbeiter unserer Nachbarlabore, die im großen Umfang zur angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Besonders bei Ulrike Fröhlike und bei meinen ehemaligen Diplomandinnen Tina Witt, Christine Lehmann und Anna Heitmann möchte ich mich hiermit noch einmal für die hervorragende Bearbeitung von PbICP-Teilprojekten und für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Dr. Guido Hansen (Universität Lübeck), Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld (Universität Lübeck) und allen in das Kristallisationsprojekt von PbICP involvierten Mitarbeitern danke ich herzlich für die produktive Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Strukturbilder.

Bei Christel Schmetz möchte ich mich an dieser Stelle noch einmal für die herzliche Aufnahme, die hervorragende Einarbeitung am Elektronenmikroskop und die vielen Hilfestellungen bedanken.

Bei Mirela Šarić (Universität Osnabrück) bedanke ich mich für die Bereitstellung des rekombinanten EhICP, bei Prof. Vito Turk (Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenien) für die Bereitstellung von Cathepsin L und bei Krishna Nagarajan (Universität Lübeck) für die Bereitstellung von Falcipain-2.

Mein herzlicher Dank gilt darüber hinaus den Korrekturleser/Innen, die für viele gute Verbesserungsvorschläge gesorgt haben.

Dr. Claudia Walther, Monika Beutelspacher und allen anderen Mitarbeitern des Boehringer Ingelheim Fonds danke ich herzlich für die unkomplizierte Bereitstellung der Reisestipendien, die schönen Hirscheegg- und Lautrach-Seminare und ihr großes persönliches Interesse an uns BIF-Stipendiaten. Mein Dank geht besonders auch an Dr. Hermann Fröhlich, den ich im Bewerbungsgespräch und in Hirscheegg vor seinem plötzlichen Tod noch persönlich kennenlernen durfte.

Zuletzt möchte ich mich an dieser Stelle von ganzem Herzen bei meinem Freund, meinen Freunden und meiner Familie bedanken, auf die ich mich unabhängig von allen Höhen und Tiefen immer verlassen kann und ohne die dies alles nicht möglich wäre.