



Universität Hamburg

Die Invasion und Freisetzung von prä-erythrozytären *Plasmodium*- Parasiten erfordert eine geregelte Proteaseaktivität

Dissertation

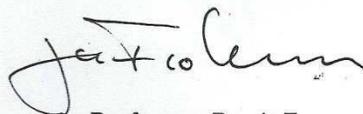
Zur Erlangung der Würde des Doktors der
Naturwissenschaften des Fachbereichs Biologie,
der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften, der Universität Hamburg

vorgelegt von
Anna Heitmann
aus Hamburg

Hamburg, 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. V. HEUSSLER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Professor Dr. I. BRUCHHAUS
Tag der Disputation: 22. März 2013

Hamburg, den 11. März 2013

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Fromm', written in a cursive style.

Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

Für Irmgard Weichselbaum

Die Betreuung der vorliegenden Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. V.T. Heussler übernommen. Die experimentellen Arbeiten wurden von Januar 2010 bis März 2013 am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in der Arbeitsgruppe Malaria I in Hamburg durchgeführt. Diese Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der graduierten Schule SDI (*hamburg school for structure and dynamics in infection*), im Rahmen der Landesexzellenzinitiative Hamburg, gefördert.

Erstgutachter: Prof. Dr. V.T. Heussler

Zweitgutachterin: Prof. Dr. I. Bruchhaus

Zusammenfassung

Cysteinproteasen spielen im Metabolismus aller Organismen eine wichtige Rolle. Besonders für Parasiten ist die Regulation der Proteaseaktivität von großer Bedeutung, da sie neben den endogenen Proteasen auch die Wirtsproteasen, die häufig zur Pathogenabwehr eingesetzt werden, regulieren müssen.

Der Malariaerreger *Plasmodium berghei* exprimiert in allen Lebensphasen den Cysteinproteaseinhibitor PbICP (*P. berghei inhibitor of cysteinproteases*), ein ungewöhnliches Mitglied der Chagasinfamilie. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Inhibitor und seine Bedeutung im Lebenszyklus von *P. berghei* untersucht. Hierbei konnte der N-terminalen Domäne, (PbICP-N) die nur von *Plasmodium* ICPs bekannt ist, eine Funktion für die Lokalisation des Proteins während der Leberphase zugeordnet werden. Bei der Untersuchung des Wirkungsspektrums der C-terminalen Inhibitor-domäne (PbICP-C) konnte eine Inhibitoraktivität gegen Cathepsin L-ähnliche Proteasen gezeigt werden. Caspasen, Calpaine und Cathepsin B wurden dagegen nicht gehemmt, was in Strukturmodell-Analysen bestätigt werden konnte. Mit Hilfe eines PbICP-C-*Knockout*-Stammes konnte eine essentielle Funktion für PbICP in den Sporozoiten aufgedeckt werden. Vermutlich reguliert PbICP die Aktivität einer bisher unbekanntes Cysteinprotease, die für die Prozessierung des multifunktionalen essentiellen Sporozoiten-Proteins CSP (**c**ircum **s**porozoite **p**rotein) verantwortlich ist.. Durch die Deletion von PbICP verlieren die Sporozoiten größtenteils ihre Fähigkeit in die Speicheldrüsen zu migrieren. Zudem scheinen sie in ihrer Motilität erheblich eingeschränkt zu sein. Auch in der Leberphase des Parasiten scheint PbICP eine wichtige Rolle zu übernehmen, während die Deletion von PbICP-C auf Parasiten der Blutphase keinen offensichtlich negativen Einfluss hatte.

Die erfolgreiche Entwicklung des Parasiten während der Leberphase ist von der Aktivität von Cysteinproteasen abhängig. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Cysteinproteaseaktivität am Ende der Leberphase untersucht werden. Mit synthetischen niedermolekularen Inhibitoren wurde die Aktivität von Cathepsin B- und Cathepsin C-ähnlichen Proteasen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass eine Cathepsin B-ähnlichen Protease an der Formation von Tochtermerozoiten beteiligt zu sein scheint, die am Ende der Leberphase gebildeten Merosomen enthielten keine infektiösen Merozoiten mehr. Die Inhibition der Cathepsin C Parasiten-Protease PbDPAP3 (*P. berghei dipeptidyl aminopeptidase*) führte dazu,

dass am Ende der Leberphase der größte Teil der Parasiten arretierte. Die Formation der Tochtermerozoiten verlief normal, die anschließende Auflösung der parasitophoren Vakuole war jedoch gestört, was die erfolgreiche Beendigung der Leberphase blockierte.

Die in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse decken möglicherweise bisher unbekannte parasitäre Proteasen als neue Zielproteine bei der Therapie von Malaria auf. Mit Hilfe der Struktur von PbICP könnten selektive Inhibitoren gegen diese Parasiten-Proteasen entwickelt werden. Dies würde eine Therapie ermöglichen, die schon vor den klinischen Symptomen eingreift, die durch die Parasiten der Blutphase ausgelöst werden.

Abstract

The regulation of protease activity is important for all organisms, in particular for intracellular parasites. They have to control both their own proteases as well as the proteases of their host cell, which are often involved in the defense against parasites. *Plasmodium berghei*, the causative agent of rodent malaria, expresses a cysteine protease inhibitor (PbICP), which is a potential regulator of cysteine proteases. PbICP is an unusual member of the chagasin-like cysteine protease inhibitor family, which are unique to protozoa. In my PhD thesis, I characterize the function of PbICP and the activity of cysteine proteases in the exoerythrocytic stage of the *Plasmodium berghei* parasite.

The chagasin-like C-terminal domain of the protein, PbICP-C, inhibits cathepsin L-like proteases, but does not inhibit calpains, caspases, cathepsin B and potentially also not cathepsin C. The N-terminal domain is unique to *Plasmodium* ICPs and has a function in the export of the protein during the liver stage. Studies with the PbICP-knockout strain showed an essential function for PbICP in sporozoites and an important role during the liver stage, however the deletion of *pbicp* had no influence on the development of blood stage parasites. PbICP-knockout sporozoites are restricted in their motility and lose the ability to enter the salivary glands of mosquitoes. This is probably due to a regulatory function of PbICP in the processing of CSP (circumsporozoite protein), an essential multifunctional protein of sporozoites.

Furthermore I investigated the influence of cathepsin B- and cathepsin C-like proteases on parasite development during the late liver stage. For this, I treated parasites *in vitro* with synthetic low molecular weight inhibitors. The inhibition of cathepsin B-like proteases lead to an abnormal phenotype. The schizont stage nuclei fused to a big vesicle, no formation of daughter merozoites could be observed and the parasites were not infectious. Therefore, a cathepsin B-like protease appears to be essential for the formation of merozoites. Inhibition of the parasite cathepsin C protease PbDPAP3 (*P. berghei* dipeptidyl aminopeptidase 3) at the end of the liver stage blocked parasite egress from the parasitophorous vacuole, which is the initiating step for the release of parasites into the bloodstream.

Pursuing further the results of this study may uncover so far unknown proteases as new drug targets. Using our newfound knowledge of the structure of PbICP, selective inhibitors of parasitic proteases could now be generated.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Abstract.....	5
Inhaltsverzeichnis.....	6
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	12
Abkürzungsverzeichnis	13
1. Einleitung	16
1.1 Malaria	16
1.1.1 Bekämpfung von Malaria	18
1.1.2 Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i>	20
1.1.2.1 Infektion des Vertebratenwirtes durch Sporozoiten.....	21
1.1.2.2 Die exoerythrozytäre Schizogonie.....	23
1.1.2.3 Die erythrozytäre Schizogonie.....	28
1.1.2.4 Gamogonie und Sporogonie in der Mücke.....	29
1.1.3 Erforschung der Leberphase von <i>Plasmodium</i> am Tiermodell	30
1.2 Proteasen.....	31
1.2.1 Cysteinproteasen	33
1.2.2 Cysteinproteasen von <i>Plasmodium</i>	36
1.3 Cysteinproteaseinhibitoren.....	39
1.3.1 Chagasin-ähnliche Cysteinproteaseinhibitoren	39
1.3.2 Cysteinproteaseinhibitoren von <i>Plasmodium</i>	40
1.4 Die Erforschung von Proteaseaktivitäten	44
1.4.1 Die Nutzung synthetischer Inhibitoren für Forschungszwecke.....	44
1.4.2 Der konditionale <i>Knockout</i> von PbICP-C	46
2. Material & Methoden	48
2.1 Materialien	48
2.1.1 Geräte.....	48
2.1.2 Gebrauchsmaterialien.....	50
2.1.3 (Bio-)Chemikalien	52
2.1.4 Kits.....	56
2.1.5 Enzyme und Restriktionsenzyme.....	57
2.1.6 Vektoren	58
2.1.7 Oligonukleotide	59

2.1.8 Antikörper	62
2.1.9 Zellen und Organismen.....	64
2.1.10 Datenbanken und Programme	65
2.2 Methoden	65
2.2.1 Molekularbiologische Methoden zu DNA- und RNA-Analyse.....	65
2.2.1.1 PCR.....	65
2.2.1.2 PCR-Bedingungen.....	66
2.2.1.3 Aufreinigung von DNA	68
2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese.....	68
2.2.1.5 Klonierungsstrategie.....	69
2.2.1.6 Ligation	70
2.2.1.7 A-Tailing	71
2.2.1.8 Hitzeschock-Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	71
2.2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA.....	72
2.2.1.10 Photometrische Bestimmung der DNA- / RNA-Konzentration	74
2.2.1.11 Restriktionsanalyse.....	74
2.2.1.12 Sequenzierung von DNA	75
2.2.2 Proteinchemische molekularbiologische Methoden	75
2.2.2.1 Herstellung von MBP- und His-Fusionsproteinen.....	75
2.2.2.2 Herstellung von aktiven His-Falcipain-2.....	80
2.2.2.3 Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen.....	84
2.2.2.4 Entfernen des Anhangs MBP mit Faktor Xa	85
2.2.2.5 Proteinaufreinigung mit dem Prep Cell System	85
2.2.2.6 Western-Blot-Analyse	86
2.2.3 Kinetikanalysen.....	87
2.2.3.1 Inhibitionsassay	87
2.2.3.2 Aktivitätsbestimmung von Falcipain-2	90
2.2.3.3 Aktivitätsbestimmung von PbICP-C, PfICP-C und TcChagasin	90
2.2.3.4 Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_i).....	90
2.2.3.5 Strukturmodellierung	91
2.2.4 Kultivierung von <i>P. berghei</i>	91
2.2.4.1 Blutstadien.....	91
2.2.4.2 Mückenstadien	98

2.2.4.3 Untersuchung der plasmodialen Leberphase mittels des <i>in vitro</i> Infektionsmodells.....	99
2.2.4.4 Mikroskopische Analysen von <i>P. berghei</i> -Parasiten.....	104
2.2.5 Herstellung von polyklonalen Antikörpern.....	109
2.2.5.1 Herstellung von Antiseren.....	109
2.2.5.2 Aufreinigung des Anti-His-PbICP-C-Antikörpers.....	110
3. Ergebnisse	112
3.1 Untersuchung des Cysteinproteaseinhibitors PbICP.....	112
3.1.1 Proteasenhemmung durch ICPs verschiedener Parasiten	112
3.1.1.2 Wirkungsspektren rekombinanter Inhibitoren verschiedener Protozoen	112
3.1.1.2 Berechnung der Dissoziationskonstante K_i des Enzym-Inhibitor-Komplexes.....	115
3.1.2 PbICP-Lokalisation in pre-erythrozytären <i>P. berghei</i> Parasiten	116
3.1.3 PbICP erfüllt eine wichtige Funktion bei der Infektion von Leberzellen....	123
3.1.4 Charakterisierung der PbICP-C-KO-Parasiten.....	126
3.1.4.1 Der konditionale <i>Knockout</i> von PbICP-C in Speicheldrüsen-Sporoziten führt zu einer negativ beeinträchtigten Entwicklung von Leberparasiten	126
3.1.4.2 Der komplette Verlust von PbICP-C verhindert die Invasion von Sporoziten in Hepatozyten	131
3.1.4.3 PbICP-C-KO _{Mero} - <i>add-back</i> -Parasiten haben einen vitalen Phänotyp	134
3.2 Cathepsin B-Proteasen spielen eine wichtige Rolle am Ende der Leberphase	137
3.2.1 CA-074Me-Behandlung führt zu der Bildung von Merofusosomen	140
3.2.2 CA-074Me-behandelte Leberparasiten können keine Blutphase etablieren	143
3.3 PbDPAP3 spielt eine wichtige Rolle am Ende der Leberphase	144
3.3.1 Der Einfluss einer gesteuerten DPAP3-Expression auf die Parasitenfreisetzung am Ende der Leberphase.....	146
3.3.2 Die Inhibition von DPAP3 führt zu der Arretierung von späten Leberphaseparasiten	149
4. Diskussion	159
4.1 Die Rolle von PbICP für den Lebenszyklus von Plasmodien	159
4.1.1 Sequenz- und Strukturanalysen.....	159
4.1.2 Mögliche Funktionen des Cysteinproteaseinhibitors PbICP.....	165

4.2 Eine unbekannte Cathepsin B-ähnliche Protease ist essentiell an der Merozoitenformation und dem Zusammenbruch des Wirtszellzytoskeletts beteiligt	175
4.3 DPAP3 spielt eine wichtige Rolle am Ende der Leberphase	178
4.4 Fazit	181
Literaturverzeichnis	183
Danksagung	196
Erklärung	197

Abbildungsverzeichnis

1-1	globale Verbreitung von Malaria	16
1-2	Schematische Darstellung des Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i>	21
1-3	schematische Darstellung eines Sporozoiten	22
1-4	Inokulation der Sporozoiten	23
1-5	Sporozoiten invadieren die Leber	24
1-6	exoerythrozytäre Schizogonie	26
1-7	Cytomerstadium	27
1-8	Formation der Merosomen	28
1-9	Proteasenmechanismen	31
1-10	Strukturvergleiche von Cathepsinen	35
1-11	TcChagasin-Struktur	40
1-12	schematische Darstellung von <i>pbicp</i> und PbICP	41
1-13	Sequenzvergleich von Mitgliedern der Familie I42	42
1-14	Struktur von PbICP-C, sowie Überlagerungsmodell von PbICP-C und TcChagasin	43
1-15	Schematische Darstellung der für den konditionalen <i>knock out</i> von <i>pbicp-c</i> vorgenommenen Klonierung	47
2-1	Schemata der klonierten Plasmidkonstrukte	69
2-2	Vergleich Falcipain-2 vor und nach Rückfaltung	84
2-3	Beispieldiagramm zur <i>active-site-titration</i> von Falcipain-2	90
2-4	Berechnung des K_i -Wertes mittels der Morrison-Gleichung	91
2-5	Schematische Darstellung der verwendeten Proteinfragmente für die Herstellung von Antiseren	110
3-1	Hemmung der Aktivität verschiedener Proteasen durch Inhibitoren der Chagasin-Familie	114
3-2	Westen-Blot-Analyse von PbICP-C-GFP- und PbICP-N-GFP-exprimierenden Parasiten	118
3-3	von intrazellulären Sporozoiten sezerniertes PbICP-GFP kolokalisiert mit endogenem PbICP; PbICP-N-GFP und PbICP-C-GFP werden dagegen nur teilweise sezerniert	119
3-4	junge Schizontenstadien der transgenen Parasiten sekretieren PbICP-GFP und PbICP-N-GFP, aber kein PbICP-C-GFP	120
3-5	späte Schizontenstadien der transgenen Parasiten sekretieren PbICP-GFP und PbICP-N-GFP, aber kein PbICP-C-GFP	121
3-6	endogenes PbICP-C liegt in der Wirtszelle vor, bevor das Parasitenzytosol in die Wirtszelle entlassen wird	122
3-7	PbICP-GFP und PbICP-N-GFP Kolokalisieren am Ende der Leberphase mit dem endogenen Protein, auch in der Wirtszelle; PbICP-C-GFP bleibt im Parasitenzytosol lokalisiert, auch wenn das endogene Protein schon in der Wirtszelle vorliegt	122
3-8	Transmigrationsassay	124
3-9	Die Neutralisation von PbICP führt zu einer verringerten Invasionsrate	125
3-10	Die Exzision des <i>pbicp-c</i> -Gens konnte in Sporozoiten der Speicheldrüse nachgewiesen werden 3-11 KO-Bilder	126
3-11	die Entwicklung von PbICP-C-KO _{cond} -Parasiten ist beeinträchtigt und Verspätet	128

3-12	PbICP-C-KO _{cond} -Parasiten haben <i>in vitro</i> eine signifikant beeinträchtigte Entwicklung in der Leberphase	129
3-13	PbICP-C-KO _{cond} -Parasiten sind <i>in vivo</i> weniger infektiös	131
3-14	PbICP-C-KO _{Mero} -Sporozoitien sind <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> nicht mehr infektiös	133
3-15	PbICP-C-KO _{Mero} -add-back-Parasiten weisen einen vitalen Phänotyp auf und entwickeln sich im normalen Zeitrahmen	134
3-16	PbICP-C-KO _{Mero} -add-back-Parasiten zeigen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> einen vitalen Phänotyp	136
3-17	PbICP-C kann Cathepsin B aufgrund sterischer Behinderungen von <i>Loop 0</i> und <i>Loop 6</i> (PbICP-C) mit dem occluding loop (Cathepsin B) nicht inhibieren	138
3-18	CA-074 ist ein spezifischer Cathepsin B Inhibitor; CA-074Me gelangt in HepG2-Zellen	139
3-19	CA-074Me behandelte Parasiten bilden weniger abgelöste Zellen mit einem charakteristischen Phänotyp	141
3-20	CA-074Me-behandelte Parasiten bilden große Vesikelstrukturen aus die eine hohe Elektronendichte aufweisen	142
3-21	PbICP-C kann keine Cathepsin C-ähnlichen Proteasen inhibieren	145
3-22	Expressionsprofil einiger Proteasen-mRNAs in der Leberphase	146
3-23	DPAP3*-Parasiten exprimieren DPAP3 früher als Wildtyp-Parasiten	147
3-24	V5-DPAP3-Parasiten entwickeln sich früher und erfolgreicher	148
3-25	Strukturformel des niedermolekularen PfDPAP3-Inhibitors JCP410	150
3-26	Die Inhibition von DPAP3 führt zu einer Beeinträchtigung des Parasitenwachstums in der späten Leberphase und einer Reduktion abgelöster Zellen.	150
3-27	Die Inhibition von DPAP3 hat einen negativen Einfluss auf die Parasitenentwicklung am Ende der Leberphase	152
3-28	Subtilisin-1 lokalisiert durch JCP410-Behandlung nur in Punktstrukturen, durch ML4188S-Behandlung scheint außergewöhnlich viel Subtilisin-1 im Zytoplasma vorzuliegen	154
3-29	Die Inhibition von DPAP3 hat keine Auswirkung auf die Lokalisation von SERA2	155
3-30	Die Inhibition von DPAP3 führt häufig zu einer Fehllokalisierung des PVM-Markers Expl	157
4-1	Identifizierung und Vergleich putativer PNEP-Motive in Plasmodium ICPs.	161
4-2	hypothetisches Bindungsmodell von PbICP-C und PfSERA5	163
4-3	A: schematische Darstellung des CSP-Proteins. B: Darstellung der CSP-Konformationen im Sporozoitienstadium und die mögliche Funktion von PbICP	169
4-4	DPAP3-Beteiligung an der Merozoiten-Freilassung	179
4-5	Übersicht der Bedeutung von PbICP, einer Cathepsin B-ähnlichen Protease und PbDPAP3 im Lebenszyklus von <i>P. berghei</i>	182

Tabellenverzeichnis

2.1	Auflistung der verwendeten Geräte	48
2.2	Auflistung der verwendeten Gebrauchsmaterialien	50
2.3	Auflistung der verwendeten (Bio-)Chemikalien	52
2.4	Auflistung der verwendeten Kits	56
2.5	Auflistung der verwendeten Enzyme	57
2.6	Auflistung der verwendeten Restriktionsenzyme	58
2.7	Auflistung der verwendeten Vektoren	58
2.8	Auflistung der verwendeten Oligonukleotide	59
2.9	Auflistung der verwendeten primären Antikörper, bzw. Antiseren	62
2.10	Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper	63
2.11	Auflistung der verwendeten Zellen und Organismen	64
2.12	Auflistung der verwendeten Datenbanken und Programme	65
2.13	Reaktionsansätze für die PCR	66
2.14	PCR-Bedingungen	67
2.15	Auflistung der Vektoren und Bakterien und ihre Resistenzen	72
2.16	Auflistung der für den Verdau der Plasmidkonstrukte verwendeten Restriktionsenzyme	75
2.17	Auflistung der verwendeten Plasmidkonstrukte, der jeweiligen Expressionsbakterien und der Verwendung der Proteine	76
2.18	Pipettieransätze für die in der SDS-PAGE verwendeten Sammel- und Trenngele	79
2.19	Kinetikbedingungen	89
2.20	Auflistung der verwendeten Primer für die Integrationsanalyse transgener Parasitenlinien	97
2.21	Auflistung der verwendeten niedermolekularen synthetischen Inhibitoren für die <i>in vitro</i> Behandlung von Leberparasiten	104
3.1	Auflistung der mittels der Morrisongleichung berechneten K_i s von Falcipain-2 und den jeweiligen Inhibitoren	115
3.2	CA-074Me-behandelte Leberparasiten können keine Blutphase etablieren	144

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
<i>A. stephensi</i>	<i>Anopheles stephensi</i>
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMA1	<i>apical membrane antigen 1</i>
AMC	7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Antiserum
ATC	<i>artemisinin-based combination therapies</i>
ATP	Adenosintriphosphat
As	Aminosäuren
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
cDNA	komplementäre DNA
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSP	<i>circumsporozoite protein</i>
C-terminal	am Carboxyende des Proteins
Cy	Cyanin Farbstoff
Da	Dalton
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
DDT	Dichlordipeptidyltrichlorethan
d.h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonukleinase
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DPAP	Dipeptidyl Aminopeptidase
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EhICP-1</i>	<i>Entamoeba histolytica inhibitor of cysteine proteases</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
E-64	L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino)-butane
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
Expl	<i>exported protein I</i>
FCS	fötales Kälberserum
Flp	Flippase
FRT	<i>Flippase recombinase target</i>
g	Gramm
GAPs	<i>genetic attenuated parasites</i>
GEMP	<i>global eradication of malaria programm</i>
gDNA	genomische DNA
GFP	<i>green fluorescent protein</i>

Abkürzungsverzeichnis

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´2-ethansulfonsäure
HepG2	humane Hepatomazelllinie
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSPGs	Herparansulfat Proteoglykan
ICP	<i>inhibitor of cysteine proteases</i>
IMC	<i>inner membrane complex</i>
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid
K	kilo
k.M.	keine Messung
KO	<i>Knockout</i>
L	Liter
LB	Luria Bertani
LISP	<i>liver specific protein</i>
LLINs	<i>long lasting insecticide mosquito nets</i>
LmICP	<i>Leishmania mexicana inhibitor of cysteine proteases</i>
m	milli (10 ⁻³), Meter
M	Molar
MBP	Maltosebindendes Protein
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
μ	mikro (10 ⁻⁶)
Min	Minute
Mio	Millionen
mRNA	messenger RNA
MSP	<i>merozoite surface protein</i>
MTOC	<i>mikrotubuli organizing center</i>
n	nano (10 ⁻⁹)
n.E.	nach Exzision
NMRI	Naval Medical Research Institute
N-terminal	am Aminoende des Proteins
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
p	piko (10 ⁻¹²)
<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. gallinaceum</i>	<i>Plasmodium gallinaceum</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. yoelli</i>	<i>Plasmodium yoelli</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PbDPAP	<i>Plasmodium berghei dipeptidyl aminopeptidase</i>
Pbeef1a	<i>Plasmodium berghei eukaryotic elongation factor 1 alpha</i>
PbICP	<i>Plasmodium berghei inhibitor of cysteine proteases</i>
PbICP-C	C-terminale Domäne von PbICP
PbICP-N	N-terminale Domäne von PbICP
Pbsub1	<i>Plasmodium berghei Subtilisin 1</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PchICP	<i>Plasmodium chabaudi inhibitor of cysteine proteases</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Abkürzungsverzeichnis

PEXEL	<i>plasmodium exported protein</i>
PfDPAP	<i>Plasmodium falciparum dipeptidyl aminopeptidase</i>
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein</i>
PfICP	<i>Plasmodium falciparum inhibitor of cysteine proteases</i>
PfICP-C	C-terminale Domäne von PfICP
PfICP-N	N-terminale Domäne von PfICP
PgICP	<i>Plasmodium gallinaceum inhibitor of cysteine proteases</i>
PkICP	<i>Plasmodium knowlesi inhibitor of cysteine proteases</i>
PyICP	<i>Plasmodium yoelii inhibitor of cysteine proteases</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PNEP	pexel negative exported protein
PV	parasitophore Vakuole
PVM	parasitophore Vakuolenmembran
PyICP	<i>Plasmodium yoelii inhibitor of cysteine proteases</i>
RAPs	<i>radioated attenuated sporozoites</i>
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERA	<i>serine repeat antigen</i>
SP	Signalpeptid
SPECT	<i>sporozoite microneme protein essential for cell traversal</i>
SSR	<i>site-specific recombination system</i>
Std.	Stunden
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Tab.	Tabelle
TbICP	Trypanosoma brucei inhibitor of cysteine proteases
TBS	Tris-bufferd saline
TBS-t	Tris-bufferd saline with Tween 20
TcChagasin	<i>Trypanosoma cruzi</i> Chagasin (TcICP)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TgICP	<i>Toxoplasma gondii inhibitor of cysteine proteases</i>
TRAP	thrombospondin related adhesive protein
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethen
TSR	<i>type I thrombospondin repeat</i>
U	<i>Unit</i>
UIS	<i>upregulated in sporozoites</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V5	V5-Epitop
v.E.	vor Exzision
VSG	<i>variant surface glycoproteins</i>
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Malaria

Malaria zählt zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten der Welt. 3,3 Milliarden Menschen, rund die Hälfte der Weltbevölkerung, lebt mit dem Risiko einer Malaria Infektion (WHO, 2011). Die heutigen Endemiegebiete der Malaria sind hauptsächlich tropische Gebiete: Afrika, Südostasien sowie Teile Süd-und Mittelamerikas (Abb. 1-1). Bis in die 1960er Jahre war Malaria weiter verbreitet, so auch in der nördlichen Hemisphäre. Durch das Malaria-Ausrottungsprogramm der WHO, GMEP (**g**lobal **e**radication of **m**alaria **p**rogramm; 1955 – 1970), konnte die Malaria jedoch in der nördlichen Hemisphäre und Industriestaaten wie Australien ausgerottet werden. So spielt in Deutschland nur noch die allochthone Malaria eine Rolle, die durch Rückkehrer von Tropenreisen eingeschleppt wird.

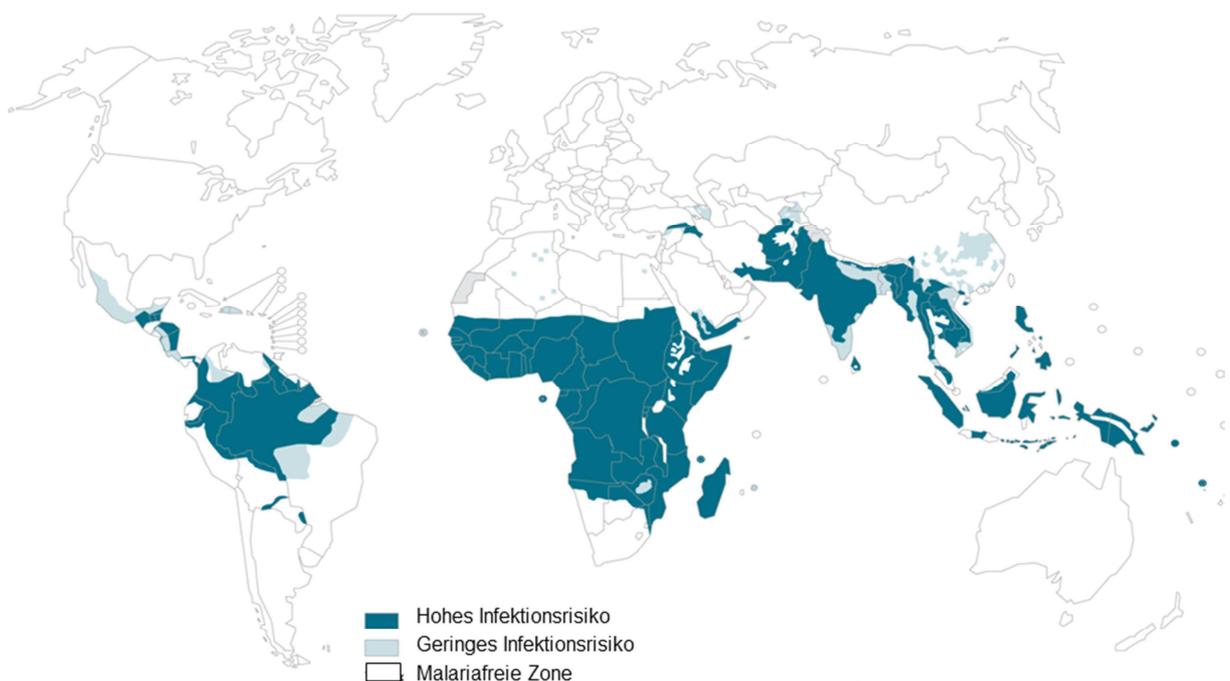


Abbildung 1-1: globale Verbreitung von Malaria (WHO, 2011)

2010 wurden fast 250 mio. Malariainfektionen mit über 650 000 Todesfälle gemeldet (WHO 2011). Über 90% der Todesfälle sind in Afrika zu verzeichnen, wovon über 80% Kinder unter 5 Jahren sind (WHO, 2011). Eine hohe Infektionsrate in den betroffenen Ländern hat nicht nur hohe Kosten für das Gesundheitssystem zur

Folge, es führt auch zu wirtschaftlichen Wachstumseinbußen von bis zu 1,3% (WHO, 2010).

Die Krankheit Malaria wird durch den eukaryotischen Einzeller *Plasmodium*, welcher zum Stamm der Apikomplexa gehört, ausgelöst. Es gibt über hunderte verschiedener *Plasmodium*-Arten die Säuger, Reptilien oder Vögel infizieren können (CDC, 2012b). Die Übertragung der Parasiten findet durch weibliche Mücken der Gattung *Anopheles* statt, wobei von den 430 beschriebenen *Anopheles*-Arten nur 30-40 als Vektor für Plasmodien bekannt sind (CDC, 2012c). In chinesischen Schriften wurde schon vor über 4000 Jahren eine Krankheit beschrieben, die später als Malaria bezeichnet wurde (CDC, 2012a). Zu den schon seit langem bekannten vier humanpathogenen Arten *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* und *P. falciparum* muss seit einigen Jahren noch eine weitere gezählt werden: die eigentlich für Affen beschriebene Art *P. knowlesi* (Cox-Singh, 2008). Das Krankheitsbild wird durch Grippe-ähnliche Symptome wie Mattigkeit, Übelkeit und Kopfschmerzen geprägt, dann treten die für Malaria typischen Fieberschübe ein (Garcia *et al.*, 2010). Der Abstand zwischen den Fieberschüben ist charakteristisch für die unterschiedlichen Plasmodium-Arten: *P. knowlesi* löst alle 24 Stunden. Fieberschübe aus, *P. ovale* und *P. vivax* alle 48 Stunden. (Malaria tertiana), *P. malariae* alle 72 Stunden. (Malaria quartana). *P. falciparum* (Malaria tropica) ist für über 90% der Malaria-Todesfälle verantwortlich und löst unregelmäßige Fieberschübe aus, da der Zyklus der Parasiten sich nicht wie bei den anderen Plasmodien-Arten synchronisiert (Miller, L.H. *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2010; Hafalla *et al.*, 2011). Die von Plasmodien verursachten Fieberschübe werden durch die Freisetzung der Parasiten, mitsamt Zellrestbestandteilen, aus den infizierten Erythrozyten ausgelöst. So wird eine Entzündungsantwort des Wirtes ausgelöst, zusätzlich kann durch eine für *P. falciparum* typische hohe Parasitämie auch Anämie ausgelöst werden (Mehlhorn & Piekarski, 2002; Miller, L.H. *et al.*, 2002). Einige Malariaerreger haben die Fähigkeit entwickelt Dauerformen in den Hepatozyten ausbilden, sogenannte Hypnozoiten. Diese können jahrelang in den Leberzellen überdauern und nach Jahren zu einem erneuten Ausbruch der Krankheit führen (Mehlhorn & Piekarski, 2002). Hierzu zählen die humanpathogenen Stämme *P. ovale* und *P. vivax*, aber auch einige affenpathogene Stämme, bspw *P. cynomolgi* (Hulden *et al.*, 2011). Der Mechanismus der Aktivierung von Hypnozoiten ist bis heute nicht aufgeklärt. Möglicherweise werden die Hypnozoiten durch bestimmte Proteine aktiviert, die

durch den Stich einer *Anopheles*-Mücke in den Blutkreislauf des Wirtes gelangen (Hulden *et al.*, 2011). Dieser Mechanismus würde dem Parasiten helfen Trocken- und Kälteperioden, in denen es keine *Anopheles*-Mücken gibt, zu überdauern. Erst durch die Anwesenheit des Vektors wird der Parasit so wieder aktiviert sexuelle Stadien zu entwickeln, die durch die *Anopheles*-Mücken aufgenommen werden und die weitere Verbreitung garantieren.

1.1.1 Bekämpfung von Malaria

Da Malaria schon seit fast 4000 Jahren als Krankheit für Menschen bekannt ist, ist auch die Therapie von Malariaerkrankungen schon lange ein wichtiges Forschungsgebiet der Menschheit. Schon im 2. Jahrhundert wurde die Pflanze *Artemisia annua* als Heilkraut gegen Malaria beschrieben, der in ihr enthaltene Stoff Artemisinin wird heute noch verwendet (CDC, 2012a). Anfang des 17. Jahrhunderts wurde der Jesuitentrunk in Südamerika gegen die eingeschleppte Malaria eingesetzt, der aus der Rinde von *Chinchona pubescens* hergestellte Trank enthielt den Wirkstoff Quinin (CDC, 2012a). Dieser Wirkstoff ist Grundlage des bis heute am meisten eingesetzten Antimalariamittels Chloroquin, das in der Produktion am günstigsten ist (CDC, 2012c). Allerdings gibt es mehrere Gebiete in denen Resistenzen gegen Chloroquin aufgetreten sind, weshalb das Medikament der Wahl zurzeit Artemisinin-basiert ist. Kürzlich wurde eine neue Methode der Artemisinin-Gewinnung vorgestellt, die durch eine 400fach erhöhte Effizienz bei der Gewinnung Hoffnung auf günstigere Artemisininprodukte macht (Levesque *et al.*, 2012). Da seit 2009 auch Resistenzen gegen Artemisinin in Südostasien aufgetreten sind, wird eine Kombinationstherapie aus Artemisinin und anderen Medikamenten, meist Antibiotika; empfohlen (ATC: artemisinin-based combination therapies) (WHO, 2010). So kann die Ausbildung von neuen Resistenzen, bzw. die Verbreitung bereits vorhandener Resistenzen eingeschränkt werden.

Die Mortalität von Malaria konnte in den letzten 12 Jahren um 25% herabgesetzt werden, was unter anderem durch die stark erhöhte Abgabe von ATC-Präparaten begründet werden kann. Wurden 2005 11 mio. ATC-Präparate ausgegeben, so waren es 2010 schon 181 mio. (WHO, 2011). Ein anderer wichtiger Aspekt für den Rückgang der Mortalität ist die bessere, bzw. verfügbarere Diagnose von Malariaerkrankungen, wodurch eine Behandlung eingeleitet werden kann. Zudem

wird die Vektorkontrolle durch die Verteilung von LLINs (long lasting insecticide mosquito nets) und insektiziden Raumsprays gefördert, eine einfache aber effektive Methode zur Einschränkung von Malaria. Der Einsatz von DDT (Dichlorodipeptidyltrichlorethan) als Insektizid wurde wegen mangelnder Alternativen ebenfalls wieder aufgenommen (WHO, 2011). Bis in die 70er Jahre wurde DDT breitflächig im Rahmen des GMEPs der WHO eingesetzt, aber aufgrund von Resistenzbildung bei den Mücken und Zweifeln an der Gesundheitsverträglichkeit wurde der Einsatz längere Zeit ausgesetzt. Es wurden mittlerweile auch biologische Insektizide entwickelt, die jedoch noch nicht großflächig eingesetzt werden. Hierbei handelt es sich bspw. um Bakterien der Spezies *Bacillus sphaericus* oder *Bacillus thuringiensis israelensis*, die toxisch in den Mitteldärmen der Larven wirken (Raghavendra *et al.*, 2011).

Bis heute ist es nicht gelungen einen Impfstoff gegen Plasmodien zu entwickeln. Auch Bewohner von Endemiegebieten entwickeln nur eine Teil-Immunität, die sich jedoch nur gegen die Blutphase richtet und verloren wird, sobald der Patient nicht mehr regelmäßig mit dem Erreger in Kontakt kommt (Bormann & Matuschewski, 2011). Der Wirt ist nicht in der Lage eine sterile Immunität gegen die Parasiten zu entwickeln, da die Malariaparasiten über hochpolymorphe Oberflächenproteine verfügen, bei *P. falciparum* durch die *var*-Gene codiert. Ein sehr prominenter Vertreter dieser Proteine ist PfEMP1 (erythrocyte membrane protein), welches den Parasiten zu der Adhäsion an Blutepithelien und anderen Blutzellen befähigt. Damit wird die Passage des Parasiten durch die Milz umgangen. Die sogenannte Sequestrierung und Rosettenbildung der Parasiten kann allerdings auch zu zerebraler Malaria führen, die meist tödlich verläuft. Zudem wird vermutet, dass Plasmodien in der Lage sind das Immunsystem zu beeinflussen (Orengo *et al.*, 2008).

Der vielversprechendste Ansatz für einen Impfstoff ist RTS,S/AS01 der in klinischen Tests zur Zeit in Phase 3 ist (WHO, 2011). Hierbei handelt es sich um einen Impfstoff aus mehreren rekombinanten Komponenten aus der exoerythrozytären Phase, unter anderem ein Teil des CSP-Proteins (Cohen *et al.*, 2010). In bisherigen Tests erreichte dieser Impfstoff eine Effizienz von lediglich 65%, verhinderte aber den schweren Verlauf der Malaria (Aponte *et al.*, 2007; Bejon *et al.*, 2008).

Eine weitere Möglichkeit für die Entwicklung von Vakzinen ist die Generierung von Lebendimpfstoffen, Parasiten die in der Leber arretieren. Hierfür können sogenannte GAPs (**g**enetic **a**ttenuated **p**arasites) oder RAPs (**r**adioated **a**ttenuated **p**arasites) verwendet werden, die möglichst über mehrere letale Mutationen verfügen. Es hat sich herausgestellt, dass Parasiten, die am Ende der Leberphase arretieren besonders gut geeignet sind, da diese Proteine aus unterschiedlichen Entwicklungszyklen exprimieren, bspw. MSP1 (Butler *et al.*, 2011; Nagel *et al.*, 2013).

Die Therapie von Malariaerkrankungen wird stetig verbessert und auch die Zahl der Toten konnte in den letzten Jahren reduziert werden. Bedenkt man aber, dass trotz der Vermeidbarkeit einer Erkrankung und der Möglichkeit einer erfolgreichen Behandlung immer noch über 600 000 Menschen pro Jahr sterben, so ist klar, dass nach wie vor akuter Handlungsbedarf im Kampf gegen die Malaria herrscht. Da die Anzahl der Malariaerkrankungen mit der Armut der Menschen zunimmt (WHO, 2010), ist die Entwicklung eines Impfstoffes immer noch als effektivstes Mittel im Kampf gegen Malaria anzusehen.

1.1.2 Der Lebenszyklus von *Plasmodium*

Der Lebenszyklus von Plasmodien ist, für Sporozoen typisch, in Sporogonie, Schizogonie und Gamogonie unterteilt. Die sexuelle Fortpflanzung und die darauf folgende Sporogonie findet in der *Anopheles* Mücke, dem Endwirt, statt. Nach dem obligaten Wirtswechsel in einen Vertebraten, dem Zwischenwirt, finden die Schizogonie (wobei zwischen exoerythrozytärer und erythrozytärer Schizogonie unterschieden wird) und die Gametenbildung statt. In Abbildung 1-2 ist der Lebenszyklus dargestellt und wird nun in den folgenden Abschnitten (1.1.1.1 – 1.1.1.4) genauer erläutert, wobei die in 1.1.1.3 beschriebene Leberphase ausführlicher beschrieben wird, da der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Leberphase liegt.

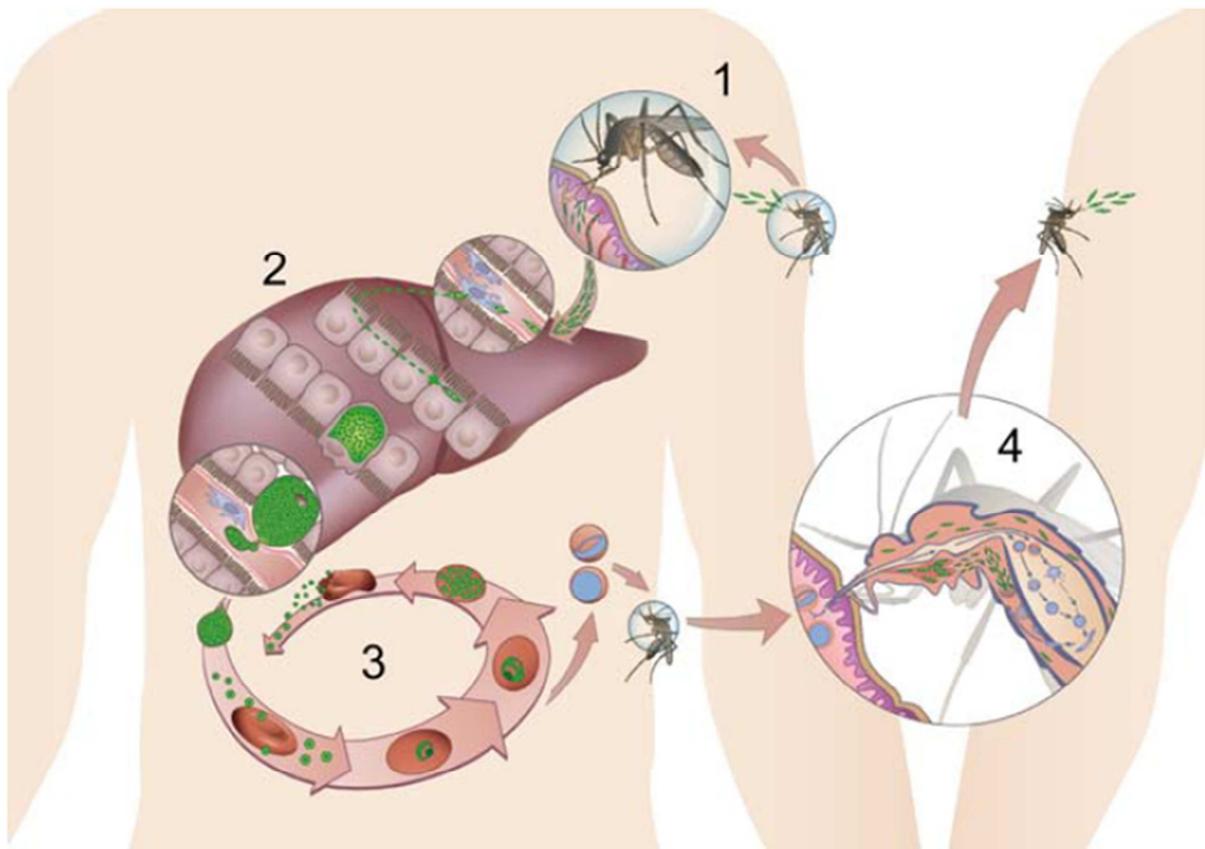


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *Plasmodium* (Sturm & Heussler, 2007) **1: Inokulation der Sporozoiten.** Durch die Blutmahlzeit einer infizierten Mücke werden Sporozoiten aus der Speicheldrüse auf den Vertebratenwirt übertragen. Nach der Inokulation dringen die Sporozoiten in den Blutkreislauf ein, um in die Sinusoide der Leber zu gelangen. **2: exoerythrozytäre Schizogonie.** Zunächst transmigrieren Sporozoiten einige Leberzellen, anschließend findet die Infektion von Hepatozyten statt. In der darauffolgenden Schizogonie werden tausende von Merozoiten gebildet, die in Merosomen in den Blutkreislauf gelangen. **3: erythrozytäre Schizogonie.** Die aus den Merosomen entlassenen Merozoiten infizieren Erythrozyten, in denen ein weiterer Schizogoniezyklus vollzogen wird. Nach der Bildung von bis zu 36 Merozoiten werden diese durch die Ruptur der Erythrozyten in den Blutkreislauf entlassen und infizieren erneut Erythrozyten; einige differenzieren sich jedoch zu weiblichen und männlichen Gametozyten. **4: Gamogonie und Sporogonie in der Mücke.** Die Gametozyten entwickeln sich im Gastrointestinaltrakt der Mücke zu weiblichen Makrogameten und männlichen Mikrogameten, diese verschmelzen zu einem Ookineten. Der Ookinete wandert unter die Basalmembran und differenziert sich zu einer Oozyste, in der die Sporogonie vollzogen wird. Mehrere tausend Sporozoiten werden in das Hämocoel der Mücke entlassen und migrieren in die Speicheldrüsen der Mücke.

1.1.2.1 Infektion des Vertebratenwirtes durch Sporozoiten (Abb. 1-2, 1)

Durch den Stich einer *Anopheles* Mücke werden die Sporozoiten in die Haut des Vertebratenwirtes inokuliert (Abb. 1-4), wobei nur ca. 10 – 100 Sporozoiten pro Stich übertragen werden, obwohl tausende in den Speicheldrüsen vorrätig sind (Frischknecht *et al.*, 2004; Amino *et al.*, 2006). Die Sporozoiten müssen sich nun auf den langen Weg in die Leber machen, Barrieren überwinden und sich dabei vor dem

Immunsystem des Wirtes schützen. Dafür verfügen die invasiven Stadien des Stammes der Apikomplexa über spezielle Sekretionsorganellen: die Mikronemen und die Rhoptrien (schematische Darstellung eines Sporozoiten in Abb.1-3). Diese bilden gemeinsam mit dem als Polring bezeichneten Aufhängungszentrum der Mikrotubuli (MTOC, **m**ikrotubuli **o**rganizing **c**enter) den Apikalkomplex aus, der namensgebend für den Stamm der Apikomplexa ist.

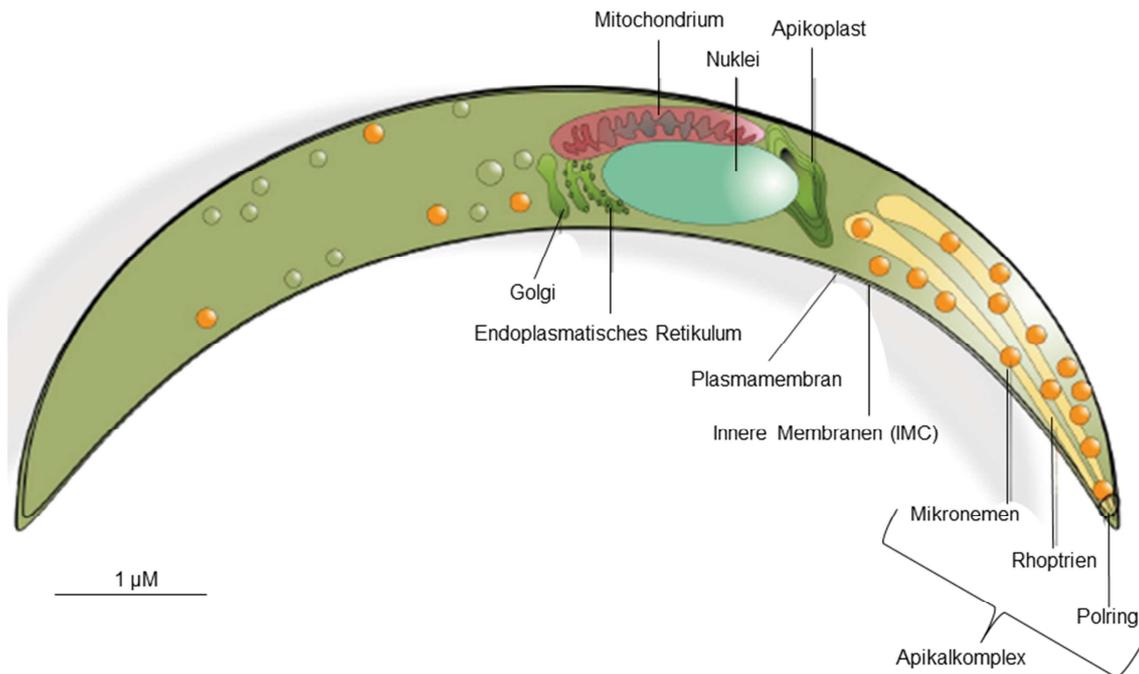


Abbildung 1-3: schematische Darstellung eines Sporozoiten (modifiziert nach Rennenberg, 2009)

Die Sporozoiten werden während des Stiches nicht direkt in die Blutvesikel inokuliert, sondern in das avaskuläre Hautgewebe (Abb. 1-4) (Sidjanski *et al.*, 1997; Matusoka *et al.*, 2002). Dort beginnen sie nun mit der Migration des Gewebes, wobei sie sich mit Hilfe eines subpellikularen Aktin-Myosin-basierten Mechanismus in gleitender Bewegung fortbewegen (Amino *et al.*, 2006; Kappe *et al.*, 1999). Hierfür ist die Sezernierung von Adhäsionsproteinen aus den Organellen des Apikalkomplexes essentiell, auch der IMC (inner **m**embrane **c**omplex) übernimmt eine wichtige Rolle (siehe Abb. 1-3). Der Aktin-Myosin-Motor der Sporozoiten ist in dem IMC verankert, verfügt aber mittels sezernierter Adapterproteine über eine Verbindung mit der äußeren Oberfläche (Matuschewski & Schuler, 2008). Zu diesen kontinuierlich sezernierten Adhäsionsproteinen gehören unter anderem CSP (**c**ircumsporozoite

protein) und TRAP (thrombospondin related adhesive protein), die beide eine essentielle Rolle für die Motilität von Sporozoiten spielen (Stewart & Vanderberg, 1991; Frevert *et al.*, 1993; Sultan *et al.*, 1997; Ejigiri *et al.* 2012).

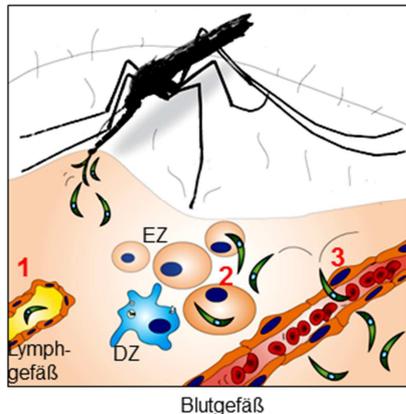


Abbildung 1-4: Inokulation der Sporozoiten. Eine Anophlesmücke inokuliert Sporozoiten in die Haut des Wirtes. Die Sporozoiten beginnen Epithelzellen (EZ) und phagozytierende Immunzellen, bspw. Dendritische Zellen (DZ) zu transmigrieren. **1:** ca. 20% der Sporozoiten transmigrieren in das Lymphsystem. **2:** Die Sporozoiten verbleiben an der Inokulationsstelle, einige wenige vollziehen dort die exoerythrozytäre Schizogonie. **3:** Die Sporozoiten erreichen Blutvesikel und gelangen über den Blutstrom in die Lebersinusoide. (modifiziert nach Rennenberg, 2009)

Die migrierenden Sporozoiten schlagen nun drei unterschiedliche Wege ein: die Migration in ein Blutvesikel und die anschließende Invasion eines Hepatozyten (Abb. 1-4, 3; Abschnitt 1.1.1.2), die Wanderung in das lymphatische System (Abb. 1-4, 1) oder das Verharren in der Haut (Abb. 1-4, 2). Verbleiben die Sporozoiten in der Haut endet dies größtenteils in der Eliminierung der Sporozoiten durch das Immunsystem. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass Sporozoiten auch in Zellen der Haut eine Schizogonie vollziehen können, bei der infektiöse Merozoiten gebildet werden (Gueirad *et al.* 2010; Coppi *et al.*, 2011). 20 % der injizierten Sporozoiten wandern in das lymphatische System ab, wo sie von dendritischen Zellen eliminiert werden (Amino *et al.*, 2006; Amino *et al.*, 2008). Nur 35% der inokulierten Sporozoiten finden ihren Weg in die Leber (Gräwe & Stanway *et al.*, 2012), die dort vollzogene exoerythrozytäre Schizogonie wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

1.1.2.2 Die exoerythrozytäre Schizogonie (Abb. 1-2, 2)

Erreicht der Sporozoit die Lebersinusoide, tritt er mit den Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs) der Hepatozyten in Kontakt, dies wird durch den dort vorherrschenden verlangsamten Blutfluss ermöglicht (Abb. 1-5) (Frevert *et al.*, 1993; Coppi *et al.*, 2007). Hepatozyten besitzen eine hohe Zahl von HSPGs, die durch den Disse'schen Raum und die *Fenestrae*, feine Unterbrechungen des Leberepithels, in

das Lumen der Sinusoide ragen (Frevert *et al.*, 1993). So adhären die Sporozoiten an das Sinusoidepithel.

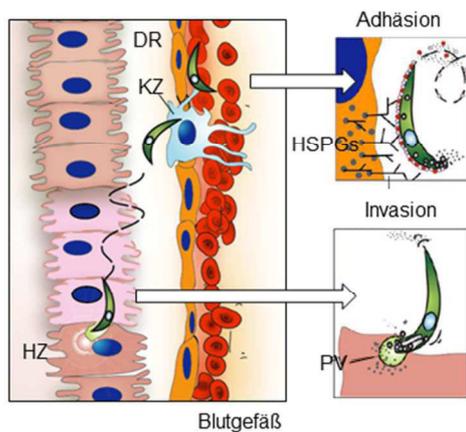


Abbildung 1-5: Sporozoiten invadieren die Leber.

Die Sporozoiten adhären über Oberflächenproteine an den HSPGs der Hepatozyten (HZ) die durch den Diss'schen Raum (DZ) in die Lebersinusoide ragen. Dann beginnen sie mit der Transmigration von Kupfferschen Zellen (KZ), den sesshaften Makrophagen in der Leber, und gelangen so in das Lebergewebe. Nach der Transmigration einiger Hepatozyten findet anschließend die Invasion eines Hepatozyten unter Ausbildung der Parasitophoren Vakuole (PV) statt. (modifiziert nach Rennenberg, 2009)

Die bis vor kurzem gängige Annahme die TSR-Domäne (**t**hrombospondin **r**epeat) von CSP sei für die Bindung der HSPGs zuständig, wurde kürzlich von Coppi *et al.* widerlegt (2011). Durch die N-terminale Prozessierung von CSP wird die vorher verdeckte C-terminale TSR-Domäne erst freigelegt. Die TSR-Domäne von CSP adhärert dann über ein bisher unbekanntes Adapterprotein an den HSPGs der Hepatozyten (Coppi *et al.*, 2011). Dieser Prozess scheint wichtig für das Umschalten vom Transmigrations- zum Invasionsmodus zu sein. Die Barriere des Leberepithels überwindet der Parasit durch die Transmigration von Kupferzellen (Mota *et al.*, 2001; Pradel & Frevert, 2001). Nachdem die Sporozoiten in den Diss'schen Raum gelangt sind, transmigrieren sie einige Hepatozyten, bevor sie mit der Invasion fortfahren (Mota *et al.*, 2001). Der genaue Mechanismus und die Funktion der Transmigration sind bis heute nicht gänzlich geklärt. Es gibt unterschiedliche Modelle für den Mechanismus der Transmigration: die aggressive Transmigration, bei der die Zellmembran verwundet wird (Mota *et al.*, 2001) oder die Transmigration durch die Invagination der Wirtszellmembran bei Zelleintritt, bei der eine tunnelartige Struktur gebildet wird (Pradel & Frevert, 2001).

Außerdem scheint die Transmigration für die darauffolgende Invasion nicht essentiell zu sein (Ishino *et al.*, 2004). So konnte durch Deletionsmutanten von SPECT1 und SPECT2 (**s**porozoite **m**icroneme **p**rotein **e**ssential for **c**ell **t**raversal) gezeigt werden, dass diese Sporozoiten zwar nicht mehr in der Lage waren Zellen zu transmigrieren, aber ihre Fähigkeit der Infektion von Hepatozyten blieb ihnen erhalten (Kaiser *et al.*, 2004; Bhanot *et al.*, 2005; Ishinu *et al.*, 2005a). Im Gegenzug ist durch Deletionsmutanten von Pbs36p und Pbs36 (Mitglieder der *Plasmodium berghei* 6-

Cys-Domäne Proteinfamilie) gezeigt worden, dass Parasiten zwar in der Lage waren Zellen zu transmigrieren, sie jedoch keine Hepatozyten mehr invadieren konnten (Ishino *et al.*, 2005b). Die Transmigrationsfähigkeit von Sporozoiten setzt also nicht immer auch ihre Infektiösität voraus. Außerdem wurde postuliert, dass durch die Sporozoiten-Transmigration von Hepatozyten eine Sekretion von HGF (**h**epatocyte **g**rowth **f**actor) in den transmigrierten Zellen induziert wird (Carrolo *et al.*, 2003; Leiriario *et al.*, 2005). HGF soll dann einen anti-apoptotischen Effekt auf benachbarte Hepatozyten haben, was diese für Infektionen empfänglicher machen soll (Carrolo *et al.*, 2003; Huh *et al.*, 2004).

Unter Ausbildung einer parasitophoren Vakuole (PV) invadiert der Sporozoit den Hepatozyten (Abb. 1-5) (Mota *et al.*, 2001; Prudêncio *et al.*, 2006). Hierzu wird die Wirtszellmembran invaginiert während der Sporozoit in die Zelle eintritt, so dass die Membran der Wirtszelle die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) bildet. Die PVM wird durch den Parasiten nachträglich modifiziert, wobei der genaue Mechanismus hierfür noch nicht aufgeklärt werden konnte. Für die PVM in erythrozytären Stadien konnte jedoch gezeigt werden, dass der Parasit die Wirtsproteine größtenteils entfernt und durch eigene ersetzt (Dowse *et al.*, 2008). In Untersuchungen der PVM von Leberparasiten konnten die parasitären Proteine UIS3, UIS4 und Expl in der PVM lokalisiert werden (Simmons *et al.*, 1987; Müller *et al.*, 2005a; Müller *et al.*, 2005b), auch der Cysteinproteaseinhibitor PbICP lokalisiert teilweise in der PVM (Rennenberg *et al.*, 2010). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die PVM für Proteine >855 Da durchlässig ist (Bano *et al.*, 2007), was darauf hindeutet dass ein Austausch von Proteinen zwischen Parasit und Wirtszelle stattfindet.

Der Sporozoit beginnt sich in seiner weiteren Entwicklung abzurunden und geht in das Stadium des Trophozoiten über. Dies geschieht bei *in vitro* gehaltenen *P.berghei*-Parasiten innerhalb der ersten 20 Std. Hierbei spielen die eben erwähnten PVM-Proteine UIS3 und UIS4 eine essentielle Rolle, die Deletion dieser Gene führt zu einer Arretierung der Parasiten im frühen Leberstadium (Müller *et al.*, 2005a; Müller *et al.*, 2005b).

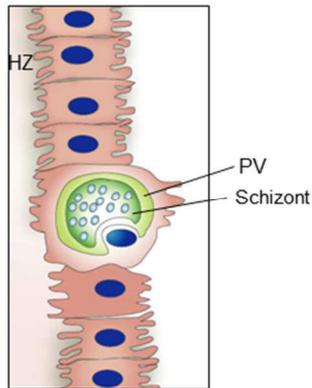


Abbildung 1-6: exoerythrozytäre Schizogonie. Nachdem sich der Sporozoit abgerundet hat und sich zu einem Trophozoiten weiterentwickelt hat kann die ungeschlechtliche Vermehrung beginnen. In der Schizogonie startet der Schizont mit der Vervielfältigung der Zellkerne, die Separierung der Zellorganellen findet erst im darauf folgenden Cytoemerstadium statt. HZ = Hepatozyt, PV= parasitophore Vakuole. (modifiziert nach Rennenberg, 2009)

Nach Infektion beginnt der Parasit mit der Vervielfältigung des Zellkerns (Abb.1-6). Hierbei handelt es sich um eine der höchsten Replikationsraten die für Eukaryoten bekannt sind. Innerhalb weniger Tage werden bis zu 30 000 Merozoiten ausgebildet (Bano *et al.*, 2007; Gräwe & Stanway *et al.*, 2012). Die dafür nötige Aufnahme von Nährstoffen ist bisher nicht aufgeklärt, so verfügen die Leberparasiten, genau wie die erythrozytären Parasiten, zwar über ein putatives Cytostom (Zellmund) (Graewe & Stanway *et al.*, 2012). Allerdings konnte die Funktionalität des Cytostoms bisher nur für erythrozytären Parasiten nachgewiesen werden. Die Lokalisation des Parasiten nahe dem Wirtszellkern und dem endoplasmatischen Reticulum (ER) der Wirtszelle könnte jedoch auf eine Versorgung durch die Wirtszelle hinweisen, da dort viele Nährstoffe zur Verfügung stehen (Bano *et al.*, 2007; Gräwe & Stanway *et al.*, 2012). Bisher konnte nur die Aufnahme von Cholesterin durch Leberparasiten nachgewiesen werden, der genaue Mechanismus jedoch nicht (Labaeid *et al.*, 2011). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Aufnahme von Liponsäuren aus der Wirtszelle essentiell für die Leberphasenentwicklung von *Plasmodium berghei*-Parasiten ist (Deschermeier *et al.*, 2012). Die häufig beobachtete Assoziation der PVM mit dem Mitochondrium der Wirtszelle weist auf die Aufnahme der Liponsäuren aus dem Wirtsmitochondrium hin (Deschermeier *et al.*, 2012; Gräwe & Stanway *et al.*, 2012). Für *Toxoplasma gondii*, auch dem Stamm der Apikomplexa zugehörig, konnte die Assoziation von PVM und Wirtsmitochondrium, sowie die Aufnahme von Liponsäuren durch den Parasiten gezeigt werden (Crawford *et al.*, 2006)

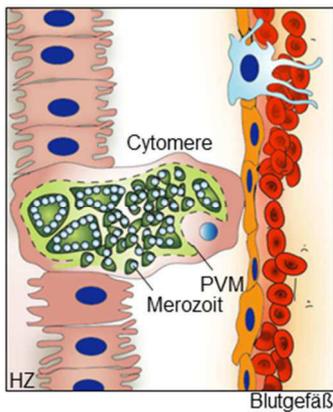


Abbildung 1-7: Cytomerstadium. Das vielkernige Synzytium erreicht nun eine erhebliche Größe. Nach Aufteilung der Zellorganellen beginnt sich die Parasitenmembran einzustülpen und die Bildung von Merozoiten beginnt. Nach der Ausbildung von bis zu 30 000 Merozoiten beginnt die Auflösung der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM). HZ = Hepatozyt. (modifiziert nach Rennenberg, 2009)

Nach der Ausbildung eines vielkernigen Synzytiums wird das Cytomerstadium eingeleitet (Abb. 1-7). Hierbei ist zu erwähnen, dass während der Schizogonie zunächst nur eine Kernteilung stattfindet, Organellen wie bspw. Mitochondrium und Apikoplast elongieren und verzweigen sich zwar stark, die Aufteilung auf die einzelnen Merozoiten beginnt jedoch erst im Cytomerstadium (Stanway *et al.*, 2009). Zunächst bildet die Plasmamembran Einstülpungen und die Nuklei werden zur Peripherie transportiert. Dann beginnt die Aufteilung der Apikoplasten, anschließend die der Mitochondrien (Stanway *et al.*, 2011; Gräwe & Stanway *et al.*, 2012). Auf die Merozoitenformation folgt die Perforierung der PVM und schnell darauffolgend deren vollständige Degradation (Sturm *et al.*, 2006; Sturm *et al.*, 2009; Graewe *et al.*, 2011). Die Merozoiten füllen nun die gesamte Wirtszelle aus. Der genaue Prozess der PVM-Degradation ist bisher nicht aufgeklärt. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Cysteinproteasen hierbei eine essentielle Rolle spielen, weil durch die Inhibition von Cysteinproteasen mittels dem Cysteinproteaseinhibitor E-64 der PVM-Abbau verhindert werden konnte (Sturm *et al.*, 2006). Die verantwortliche Cysteinproteasen konnten jedoch noch nicht identifiziert werden. Bisher konnte nur ein direkt am PVM-Zusammenbruch beteiligtes Protein identifiziert werden: LISP1 (liver specific protein 1). Allerdings gibt es keine Hinweise auf eine Proteaseaktivität durch LISP1, da es eine membranassoziierte Domäne besitzt, fungiert es wohl als Adapterprotein für Proteasen (Ishino *et al.*, 2009).

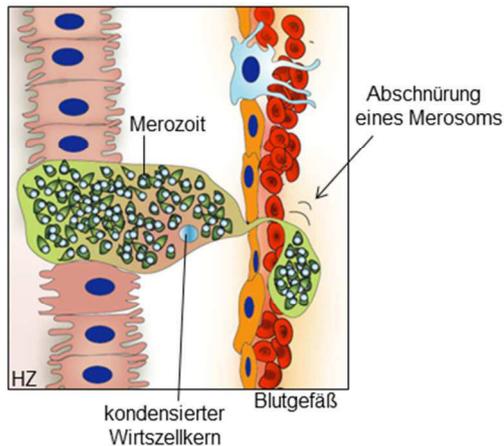


Abbildung 1-8: Formation der Merosomen. Nach der Auflösung der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) beginnt der Parasit mit der Einleitung des ungewöhnlichen Wirtszelltodes. Der Zellkern der Wirtszelle kondensiert, nach Außen zeigt die Zelle jedoch einen vitalen Phänotyp. Mehrere tausend Merozoiten werden in Ausstülpungen, Merosomen, in die Lebersinusoide entlassen. So können sie unentdeckt bis in die pulmonaren Kapillare gelangen, wo die Merozoiten freigesetzt werden. (modifiziert nach Rennenberg, 2009)

Nach der Freisetzung der Tochtermerozoiten in die Wirtszelle wird ein ungewöhnlicher, bisher nicht aufgeklärter parasiteninduzierter Wirtszelltod eingeleitet (van de Sand *et al.*, 2005; Sturm *et al.*, 2006). Hierbei beginnt die Zelle sich aus dem Zellverband zu lösen und der Wirtszellkern kondensiert (Sturm *et al.*, 2006). Trotz der Ausschüttung von Cytochrom C, welches normalerweise zur Aktivierung des apoptotischen Zelltods führt, findet jedoch keine Apoptose-typische Caspasenaktivierung statt (Sturm & Heussler, 2007). Zudem zeigt die Wirtszelle nach außen einen vitalen Phänotyp an, so dass sie nicht von Zellen des Immunsystems erkannt wird. Die Merozoiten werden zu mehreren tausend in Vesikeln, Merosomen, abgeschnürt und in die Lebersinusoide entlassen (Abb. 1-8) (Sturm *et al.*, 2006; Baer *et al.*, 2007). Da die Parasiten sich immer noch innerhalb der Wirtszellmembran aufhalten, werden sie nicht vom Immunsystem erkannt (Baer *et al.*, 2007). Die Freilassung der Merozoiten erfolgt in den Kapillaren der Lunge, wo die Parasiten innerhalb kürzester Zeit Erythrozyten invadieren und so die symptomatische Blutphase einleiten (Baer *et al.*, 2007).

1.1.2.3 Die erythrozytäre Schizogonie (Abb. 1-2, 3)

Nach der schnellen Anlagerung an den Erythrozyten orientiert sich der Merozoit mit seinem apikalen Pol an die Erythrozytenoberfläche und bildet sogenannte *tight junctions* aus, enge Verbindungen mit der Oberfläche des Erythrozyten (Cowman & Crabb, 2006). An diesen Prozessen sind unter anderem das Oberflächenprotein MSP (**m**erozoite **s**urface **p**rotein) und das in den Mikronemen lokalisierte AMA-1 (**a**pical **m**embrane **a**ntigen) beteiligt, beide Proteine gelten daher als interessante Kandidaten für die Vakzinentwicklung (Treeck *et al.*, 2009). Wie in der Leberphase

bilden die Parasiten bei der Infektion eine PV aus und entwickeln sich über einen Trophozoiten zu einem Schizonten, in dem bis zu 32 Tochtermerozoiten entstehen. Die Nahrungsaufnahme der Blutphaseparasiten ist wesentlich besser erforscht als die der Leberphasenparasiten. Die Parasiten nehmen über das Cytostom Hämoglobin der Erythrozyten auf und bauen es in Nahrungsvakuolen zu Aminosäuren ab (Rosenthal & Meshnick, 1996; Elliot *et al.*, 2008). In den Nahrungsvakuolen findet der enzymatische Abbau von Hämoglobin statt, wobei eine ganze Kaskade von Proteasen beteiligt ist. Unter anderem zählen hierzu Cysteinproteasen, wie die Falcipaine und die **Die**peptidyl **Amino**peptidase 1 (DPAP1), sowie Serinproteasen, wie Subtilisine (Rosenthal *et al.*, 1988; Klemba *et al.*, 2004; Withers-Martinez *et al.*, 2004). Diese werden im späteren Verlauf noch genauer vorgestellt. Bei dem Abbau des Hämoglobins entsteht das toxische Abbauprodukt Häm, welches in der Nahrungsvakuole zu dem nicht mehr toxischen Hämozoin kristallisiert wird (Goldie *et al.*, 1990; Rosenthal & Meshnick, 1996). Die Freilassung der Merozoiten aus der Wirtszelle am Ende des Zyklus ist wesentlich einfacher als bei infizierten Leberzellen, da die Merozoiten direkt in den Blutstrom entlassen werden können, wo sie sofort neue Erythrozyten befallen können. Der Prozess der Auflösung der PVM gefolgt von der Auflösung der Erythrozytenmembran erfolgt sehr schnell hintereinander. Der PVM-Zusammenbruch kann mittels des Cysteinproteaseinhibitors E-64 blockiert werden, die Serin- und Cysteinproteaseinhibitoren Chymostatin und Leupeptin blockieren auch den Zusammenbruch der Erythrozytenmembran (Salmon *et al.*, 2001; Wickham *et al.*, 2003; Soni *et al.*, 2005; Blackman, 2008; Yeoh *et al.*, 2007). Auch die an diesem Prozess beteiligten Cystein- und Serinproteasen werden im weiteren Verlauf genauer vorgestellt.

Einige der Merozoiten entwickeln keine Schizonten in den Erythrozyten, sondern die geschlechtlichen Gametozyten. Diese werden während der Blutmahlzeit einer Anopheles-Mücke aufgenommen und die sexuelle Entwicklungsphase der Plasmodien folgt.

1.1.2.4 Gamogonie und Sporogonie in der Mücke (Abb.1-2, 4)

Die weibliche Anopheles Mücke nimmt während einer Blutmahlzeit *Plasmodium* Gametozyten auf, die in dem Gastrointestinaltrakt der Mücke die sexuelle

Entwicklung vollziehen. Hierzu differenzieren sich die Makrogametozyten in einen Makrogameten und die Mikrogametozyten in mehrere, meist acht, begeißelte Mikrogameten. Der Freisetzungprozess der Mikrogameten aus den Erythrozyten wird als Exflagellation bezeichnet, kann *in vitro* induziert werden und ist mikroskopisch zu beobachten (Rada *et al.*, 2008). Die Mikrogameten sind motil und suchen aktiv Makrogameten. Die Verschmelzung von Makro- und Mikrogamet führt zu der Entwicklung einer beweglichen Zygote, dem sogenannten Ookineten. Der Ookinet durchquert aktiv das Darmepithel und lässt sich zwischen Basalmembran und Mitteldarmwand nieder. Dort findet die Differenzierung des Ookineten zu einer Oozyste statt. In der Oozyste wird anschließend die Sporogonie vollzogen, in der mehrere tausend Sporozoiten gebildet werden (Aly *et al.*, 2009). Die Sporozoiten werden in das Hämocoel der Mücke entlassen und gelangen passiv zu den Speicheldrüsen. Die Invasion der Speicheldrüsen findet durch die Interaktion von Parasitenproteinen mit der Speicheldrüsenmembran statt, hierzu zählen bspw. die *Plasmodium* Proteine TRAP und CSP (Myung *et al.*, 2004; Ghosh *et al.*, 2009). Die Sporozoiten lokalisieren in den oberen Hohlräumen der Speicheldrüsen, nur wenige wandern in die Leitkanäle zum Stechrüssel und werden so bei der nächsten Blutmahlzeit in den Vertebratenwirt übertragen (Frischknecht *et al.*, 2004). Die Dauer der Mückenphase beträgt 8 – 16 Tage, abhängig von Plasmodium-Spezies und Außentemperatur.

1.1.3 Erforschung der Leberphase von *Plasmodium* am Tiermodell

Die Kultivierung von intrazellulären Parasiten stellt immer eine besondere Herausforderung dar. *P. falciparum*-Blutstadien können seit 1976 kultiviert werden, so konnten bis heute viele Erkenntnisse über Blutstadien gewonnen werden (Trager *et al.*, 2005). Die Kultivierung von exoerythrozytären Parasiten gestaltet sich wesentlich schwieriger, zumal die Sicherheitsstufe 3 für humanpathogene Plasmodien eingehalten werden muss. Konnten exoerythrocytäre *P. falciparum*-Parasiten bisher nur in den kurzlebigen Primärhepatozyten und in immunsupprimierten Schimpansen kultiviert werden, ist seit kurzem auch die Kultivierung in humanisierten Mäusen publiziert (Mazier *et al.*, 1985; Daubersies *et al.*, 2000; Perlaza *et al.*, 2003; Ashley *et al.*, 2012; Vaughan *et al.*, 2012). Als

attraktiver Modellorganismus für die Erforschung der Mücken- und Leberphase gilt aber das Nagetiermodell. Hierbei werden die nagetierpathogenen Plasmodienspezies *P. berghei*, *P. chabaudi* und *P. yoelii* eingesetzt, die in Morphologie, Physiologie und den verursachten Krankheitssymptomen den humanen Plasmodienspezies sehr ähneln (Carter & Diggs, 1977). So ist es möglich den kompletten Lebenszyklus der Plasmodien *in vivo* zu beobachten, zudem kann die Leberphase auch *in vitro* dokumentiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen an dem Nagetiermodell *P. berghei* vorgenommen, hierbei wurde die Regulation und Aktivität von Cysteinproteasen untersucht. Daher wird im folgenden Abschnitt genauer auf die Funktion von Cysteinproteasen und Cysteinproteaseinhibitoren eingegangen.

1.2 Proteasen

Proteasen zeichnen sich als leistungsstarke hochspezifische Katalysatoren von chemischen Reaktionen aus. Sie sind bei allen Organismen in hohem Maße an biologischen Prozessen beteiligt, spielen aber auch im Alltag eine Rolle. So werden beispielsweise bakterielle Serinproteasen als Waschpulver eingesetzt. Zudem basieren viele Medikamente auf der Inhibition von pathogenspezifischen Proteasen, bspw. ist der Asparaginrest der HIV-1-Protease des HI-Virus ein Hauptangriffsziel in der Therapie HIV infizierter Patienten (Sayer *et al.*, 2010).

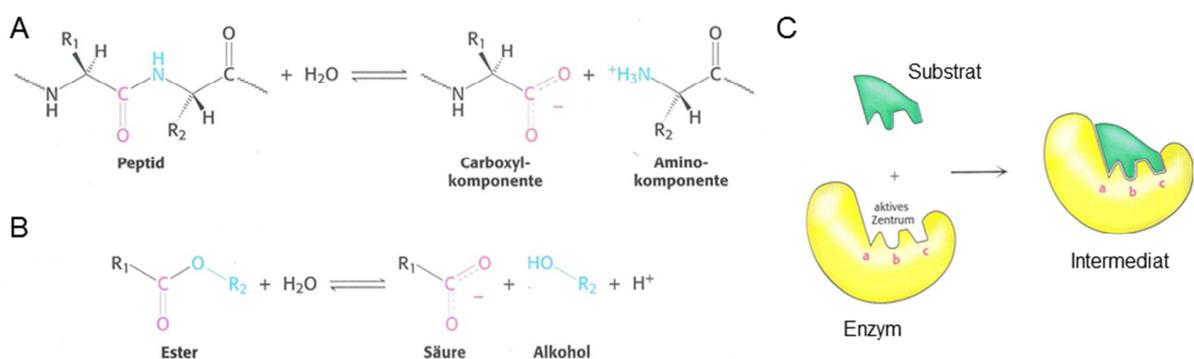


Abbildung 1-9: Proteasenmechanismen. **A:** Hydrolyse von Peptidbindungen. **B:** Hydrolyse von Estern. **C:** Intermediatbildung. Das Substrat bindet am aktiven Zentrum des Enzyms, in welchem die katalytische Triade bestimmt wird. Die Aminosäuren a, b, c sind für jeden Proteasen-*clan* charakteristisch. (Stryer *et al.*, 2003)

Der Reaktionsmechanismus von Proteasen ist die Hydrolyse von Peptid- oder Esterverbindungen durch das Hinzufügen des Protons eines Wassermoleküls (Abb. 1-9A & B). Hierbei kommt es zu einem nukleophilen Angriff auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom der Substrat-Aminosäurenkette, der kurzfristigen Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes (Intermediat) und anschließend zu einer Peptidketten-Spaltung. Die Bindung des Substrates erfolgt in der Substrattasche der Protease in der das aktive Zentrum eingebettet ist, dieses zeichnet sich durch eine katalytische Triade aus, die je nach *Clan*-Zugehörigkeit variiert (Abb. 1-9C). Für die Definition der verschiedenen Bindungen der Interaktionspartner, wurde die Spaltstelle des Substrates als Mittelpunkt definiert. Ausgehend von diesem Punkt bezeichnet man die Bindungsstellen in die eine Richtung als S1-5 (*non primed*) und in die andere als S'1-5 (*primed*). Dies gilt auch für das Substrat, das in N-terminaler Richtung die Bindungsstellen P1-5 hat, in die C-terminale Richtung P'1-5. Die Spezifität eines Enzyms resultiert aus den Wechselwirkungen des Substrats und der Protease, die durch die komplizierte dreidimensionale Struktur der Interaktionspartner bedingt ist. Um die Effizienz von Enzymen angeben zu können, wird die Michaelis-Menten-Gleichung angewendet.

$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Sie beschreibt mit V_{max} die Höchstgeschwindigkeit der Substratumsetzung durch das Enzym. K_M , die Michaeliskonstante gibt die Substratkonzentration (S) an, die für das Erlangen der Hälfte von V_{max} nötig ist. V_0 gibt das Verhältnis von Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit an. Bei kleinen Substratkonzentrationen ($[S]$ ist viel kleiner als K_M) ist die Geschwindigkeit proportional zu der Substratkonzentration, bei hohen Substratkonzentrationen ($[S]$ ist viel größer als K_M) ist die Geschwindigkeit maximal und unabhängig von der Substratkonzentration. Die Proteasen werden unter Berücksichtigung ihres evolutionären Verwandtschaftsgrades, Strukturhomologien und der daraus resultierenden Substratspezifität nach dem MEROPS-System in Familien und *Clans* unterteilt (Rawlings *et al.*, 2006). Hierbei wird in 8 Familien unterteilt:

- Aspartatproteasen (A)
- Cysteinproteasen (C)
- Glutaminproteasen (G)
- Metalloproteasen(M)
- Asparaginproteasen (A)
- Serinproteasen (S)
- Threonylproteasen (T)
- Unbekannte Proteasen (U)

Im Rahmen dieser Arbeit werden Cysteinproteasen und deren Regulation genauer untersucht, daher soll im Folgenden näher auf die Familie C eingegangen werden.

1.2.1 Cysteinproteasen

Im Reich der Eukaryoten sind Cysteinproteasen im Laufe der Evolution mindestens zweimal unabhängig voneinander entstanden: die Cathepsine (*Clan* CA) und die Caspasen (*Clan* CD). Beide weisen zwar ein ähnliches aktives Zentrum auf, weichen aber in ihrer Gesamtstruktur stark voneinander ab (Stryer *et al.*, 2003).

Die größte Unterfamilie des *Clans* CA bildet die Papain-Superfamilie, Unterfamilie C1, zu denen neben Papain auch die Cathepsine zählen. Die Grundstruktur dieser Proteasen besteht immer aus den beiden ähnlich großen R- und L-Domänen, in deren Mitte sich eine Spalte befindet, die Substrattasche (Lecaille *et al.*, 2002). Die in die Substrattasche eingelagerte katalytische Triade der Cysteinproteasen wird durch die Aminosäuren Cystein, Histidin und Asparagin gebildet (Sajid *et al.*, 2002). Hierbei wird das Cystein durch Histidin basenkatalytisch aktiviert und kann so den nukleophilen Angriff mit der aktivierten Thiolgruppe auf das Substrat ausführen, es entsteht das Intermediat. Histidin überträgt nun ein Proton an den N-terminalen Teil des Substrates, wodurch dieser abgespalten wird. Asparagin übernimmt eine wichtige Rolle in der Spezifität der Protease, so wird der Imidazolring des Histidins durch Wasserstoffbrückenbindungen mit Asparagin in die richtige Orientierung gebracht. Die meisten C1-Proteasen werden als Zymogene im rauen ER synthetisiert und sie besitzen zusätzlich zu der katalytischen Domäne eine meist N-terminale Prodomäne. Die Prodomäne übernimmt unterschiedliche Funktionen, zum einen bei der Faltung der Proteine durch Chaperone, der Inhibition der Proteaseaktivität unter bestimmten physiologischen Bedingungen (häufig über den pH-Wert) oder eine

Signalfunktion, um den gerichteten Transport der Proteasen an ihren intrazellulären Bestimmungsort zu vermitteln (Sajid *et al.*, 2002).

Eine große Gruppe der Unterfamilie C1 wird von den Cathepsinen gebildet, die eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Prozessen spielen. So besitzt der Mensch bspw. 11 verschiedene Cathepsine (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W, X) (Turk, B. & Turk, V., 2009). Die meisten Cathepsine lokalisieren in den Lysosomen der Zelle, wo sie das Recycling von Proteinen übernehmen. Außerdem degradieren sie Antigene und vermitteln diese für die MHCII-Präsentation, beispielsweise durch Immunzellen und Hepatozyten. Daher haben die meisten Cathepsine auch ihr pH-Optimum im sauren Bereich, viele Proteasen verlieren sogar ihre Aktivität im neutralen Bereich (Jordans *et al.*, 2009). Desweiteren sind Cathepsine an Prozessen in der Apoptose und der Autophagie beteiligt. Bei der Apoptose werden die Cathepsine, im Gegensatz zur Autophagie, aus den Lysosomen ins Wirtszellzytosol entlassen, wo sie die Apoptose-Kaskade durch die schrittweise Aktivierung von Caspasen einleiten. Die in der Autophagie eintretende Verschmelzung von Autophagosomen und Lysosomen zu Autolysosomen ist durch eine Deletion der Cathepsine B, D, F & L blockiert (Turk, B. *et al.*, 2007; Turk, B. & Turk, V., 2009). Der *Knockout* eines einzelnen Cathepsins hat häufig keine Auswirkungen, da andere Cathepsine die Aufgaben übernehmen können. So hat die Deletion von Cathepsin L oder B alleine keine Auswirkungen, die Deletion beider zusammen führt jedoch zu nicht gänzlich aufgeklärten zerebralen Fehlfunktionen die den vollständigen Ausfall der Hirnfunktionen bei Mäusen verursachen (Turk, B. *et al.*, 2007; Turk, B. & Turk, V., 2009).

Fast alle Cathepsine haben eine Endopeptidase-Aktivität, einzig Cathepsin B verfügt sowohl über eine Endo- als auch über eine Exopeptidase-Aktivität, während Cathepsin X (auch als Cathepsin Z bezeichnet) nur eine Exopeptidase-Aktivität besitzt (Musil *et al.*, 1999; Sivaraman *et al.*, 2000; Choe *et al.*, 2006). Über die Exopeptidase-Aktivität verfügen beide Proteine aufgrund eines zusätzlichen *Loops*. So verfügt humanes Cathepsin B über eine Insertion von 20 Aminosäuren, in denen typischerweise zwei Histidine enthalten sind (H110, H111), diese vermitteln die Bildung des Cathepsin B-typischem *occluding Loops* (Abb. 1-10A). Durch diesen *occluding Loop* wird die S'2-Bindungsstelle des Enzyms teilweise verdeckt und verhindert so die Bindung einiger Substrate. Nur im deprotonierten Zustand des His110 ist der *occluding Loop* beweglich und aktiviert so die Endopeptidase-Aktivität

des Enzyms (Redzynia *et al.*, 2008). Diese Eigenschaft macht Cathepsin B auch zu einem medizinisch interessanten Zielprotein (Mirkovic *et al.*, 2011). Cathepsin X verfügt über eine Insertion von drei Aminosäuren, die in der Nähe des aktiven Zentrums einen *mini Loop* bilden, so dass ausschließlich eine Exopeptidase-Aktivität möglich ist (Sivaraman *et al.*, 2000; Staudt *et al.*, 2010).

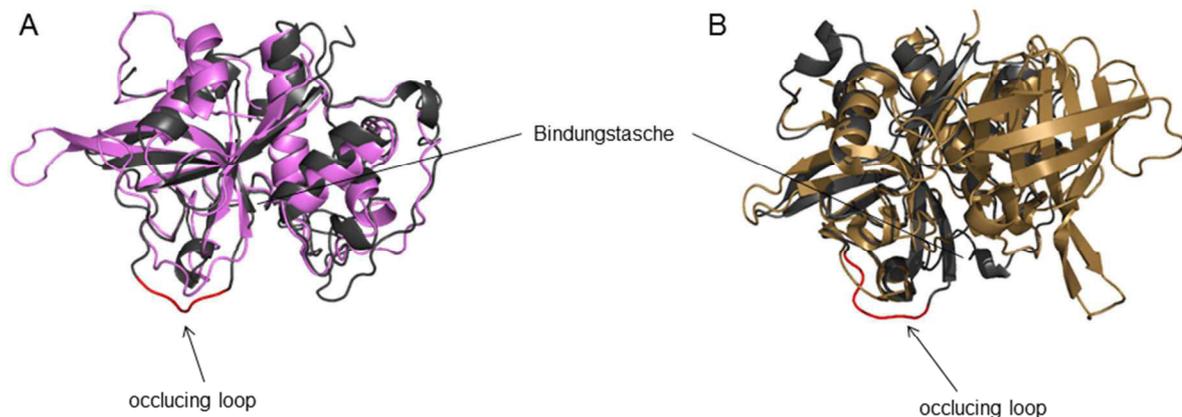


Abbildung 1-10: Strukturvergleiche von Cathepsinen. **A:** Überlagerung von humanen Cathepsin L (rosa; PDB: 2NQG. *Ljunggren et al.*, 2007) und humanen Cathepsin B (grau; PDB: 3CBJ. Redzynia *et al.*, 2008). *Occluding Loop* von Cathepsin B in rot hervorgehoben. **B:** Strukturvergleich von humanem Cathepsin C (gelb; PDB: 1K3B. Turk, D. *et al.*; 2002) und humanen Cathepsin B (grau). Cathepsin C hat eine schmalere Substrattasche, jedoch keinen *occluding loop*.

Cathepsine liegen als Monomere vor, einzig für die Aktivität von Cathepsin C ist die Ausbildung von Tetrameren aus vier identischen Untereinheiten erforderlich. Die Bindungstasche der Untereinheiten ist wesentlich schmäler als die der anderen Cathepsine (Abb. 1-10B). Cathepsin C ist auch in den Lysosomen der Zellen vorhanden, eine der Hauptaufgaben ist jedoch die Aktivierung von Serinproteasen in Immunzellen (Turk, D. *et al.*, 2001).

Eine weitere Unterfamilie des *Clans* CA wird von den Calpainen gebildet, diese bilden die Unterfamilie C2. Calpaine sind Heteromere aus mehreren Untereinheiten die für ihre Aktivität, bis auf einige wenige Ausnahmen, als Kofaktor ein Calciumion benötigen. Optimale Aktivität weisen Calpaine im neutralen pH-Bereich auf, sie sind unter anderem an der Prozessierung von Kernproteinen, Zytoskelettkompartimenten, Proteinkinasen, und der Ca^{2+} -ATPase von Erythrozyten beteiligt (Guroff, 1964; Goll *et al.*, 2003).

Die evolutionär unabhängig von den Cathepsinen gebildeten Caspasen werden in dem *Clan* CD, Unterfamilie C14 zusammengefasst. Caspasen liegen als Procaspasen in den Zellen vor und sind für viele Prozesse während der Apoptose wichtig. Durch die Ausschüttung von Cytochrom C wird die Einleitung der Apoptose aktiviert. Zunächst werden nun die Caspasen durch Prozessierungsprozesse von unter anderem Cathepsin L & S aktiviert. Angefangen wird die Aktivierungskaskade hierbei über die Prozessierung von Caspase 9, diese wiederum aktiviert weitere Caspasen. Die Caspasen aktivieren nun ihrerseits eine Kaskade weiterer Enzyme, die zu dem Abbau von Zellstrukturen, Proteinen und der Fragmentierung der DNA usw. führen und so einen geregelten Zelltod einleiten (Turk, B. *et al.*, 2007; Stryer *et al.*, 2003).

1.2.2 Cysteinproteasen von *Plasmodium*

Proteasen sind ein wichtiger Pathogenitätsfaktor vieler Parasiten. Sie übernehmen eine essentielle Funktion bei der Invasion des Wirtes, für den Metabolismus und die Vermehrung des Parasiten. Zusätzlich sind sie bei verschiedensten Strategien zur Umgehung des Immunsystems des Wirtes involviert (Besteiro *et al.*, 2004; Copeland, 2005; Matthiesen *et al.*, 2013). Mittels Genomsequenzanalysen konnten für *P. falciparum* 92 putative Proteasen identifiziert werden, im folgenden Abschnitt sollen nun einige der *Plasmodium*-Proteasen des *Clans* C vorgestellt werden (Wu *et al.*, 2003). Die Proteasen sind bisher für Blutphase-Parasiten gut charakterisiert, werden aber teilweise auch während der Leberphase exprimiert.

Falcipaine, Cathepsin L-ähnliche Proteasen

Das Genom von *P. falciparum* kodiert für 4 Falcipaine. Eine der wichtigsten Aufgaben der Falcipaine ist die Degradation von Hämoglobin, weshalb sie hauptsächlich in der Nahrungsvakuole der Parasiten lokalisieren (Salas *et al.*, 1995; Shenai *et al.*, 2000; Sijwali *et al.*, 2001). Durch die Inhibition von Falcipain-1 konnte eine weitere, essentielle, Funktion dieser Protease bei der Invasion von Erythrozyten aufgezeigt werden. Durch die Inhibition von Falcipain-1 konnte keine Invasion mehr stattfinden, die Inhibitorbehandlung zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Entwicklung der Blutphaseparasiten (Greenbaum *et al.*, 2002). Die Deletion des Gens führte zu einer verminderten Oocystenzahl (Sijwali *et al.*, 2006). Auch Falcipain-2 übernimmt

vermutlich eine weitere Aufgabe beim Abbau des Zytoskelettes der Erythrozyten, was wiederum zum Verlust der Integrität der Erythrozyten-Plasmamembran beiträgt (Hanspal *et al.*, 2002). Zusätzlich führt die Deletion des Gens zu einer Akkumulation von Hämoglobin in der Nahrungsvakuole und einer Blockade der Hämoglobinhydrolyse (Sijwali *et al.*, 2006). Die Deletion von Falcipain-2' hat keinerlei Auswirkungen auf den Parasiten, vermutlich liegt die Aufgabe dieser Protease nur in der Hydrolyse des Hämoglobins, was durch andere Proteasen übernommen werden kann. Hingegen ist der *Knockout* von Falcipain-3 bisher erfolglos verlaufen, es übernimmt offensichtlich eine essentielle Rolle schon während der Blutphase (Sijwali *et al.*, 2006).

Calpain

Es konnte auch eine putative Calpain-Protease im *Plasmodium*-Genom identifiziert werden. Durch Sequenzvergleiche wird angenommen, dass sie ähnlich wie das humane Calpain-7 funktioniert. Diese Calpaine sind durch eine Mutation an der S2-Position in der Lage Ca^{2+} -unabhängig zu agieren. Die Funktion des *Plasmodium*-Calpains konnte bisher nicht definiert werden. Alle bisherigen *Knockout* Versuche verliefen erfolglos, was auf eine essentielle Funktion während der Blutphase schließen lässt. (Wu *et al.*, 2003).

Dipeptidylaminopeptidasen, Cathepsin C-ähnliche Proteasen

Es gibt drei Cathepsin C-ähnliche Proteasen in *Plasmodium*, DPAP1-3. Die Funktion von PfDPAP1 ist gut erforscht, es ist am Abbau des Hämoglobins beteiligt. Hierbei übernimmt PfDPAP1 am Ende der Kaskade die Degradation der Oligopeptide in einzelne Aminosäuren (Klemba *et al.*, 2004). Sowohl durch die Deletion als auch durch die Inhibition von PfDPAP1 konnte gezeigt werden, dass PfDPAP1 hierbei eine essentielle Rolle übernimmt, der *Knockout* des Gens ist lethal (Klemba *et al.*, 2004; Dalal & Klemba, 2007; Deu *et al.*, 2010). PfDPAP2 ist bisher nicht charakterisiert, vermutlich übernimmt es Funktionen während der Entwicklung in der Mücke (Arastu-Kapur *et al.*, 2008). PfDPAP3 hingegen kann eine wichtige Funktion in der Prozessierungskaskade am Ende der Blutphase zugesprochen werden. So konnte in Studien gezeigt werden, dass vor und während der parasiten-induzierten Ruptur des Erythrozyten fast 120 Proteine prozessiert werden, knapp die Hälfte dieser Prozessierungsvorgänge sind PfDPAP3-abhängig (Bowyer *et al.*, 2010). Ein *Knockout* des Gens in *P. falciparum* ist bisher nicht beschrieben.

Überraschenderweise schein dagegen der *Knockout* in *P. berghei* nicht essentiell zu sein (Fifi Masduki, Max-Planck-Institut, Berlin; persönliche Mitteilung).

SERA Proteasen (serine repeat antigens)

Für *P. falciparum* wurden neun weitere Cysteinproteasen beschrieben, wobei PfSERA1-5 im aktiven Zentrum statt einem Cysteinrest ein Serinrest besitzen (Knapp *et al.*, 1999; Hodder *et al.*, 2003). Bisher ist es jedoch nicht gelungen die Aktivität von SERA-Proteasen nachzuweisen. Wahrscheinlich ist, dass SERAs untereinander ähnliche Funktionen übernehmen, da Deletionen teilweise zu der Hochregulation der Expression anderer SERAs führen. So führt die Deletion des *pfsera4*-Gens zu einer Verdopplung der PfSERA5 Expression (Miller *et al.*, 2002; McCoubrie *et al.*, 2007). Die Deletion von PfSERA5 & 6 hat einen letalen Phänotyp (Miller *et al.*, 2002). Wie in Abbildung 1-11 dargestellt, ist PfSERA5 an der Auflösung der PVM / Erythrozytenmembran vor der Freilassung der Merozoiten beteiligt. In *P. berghei* gibt es nur sechs SERAs, bisher konnte für PbSERA5 (entspricht PfSERA8) eine essentielle Funktion bei der Freisetzung der Sporozoiten aus den Oozysten beschrieben werden (Aly *et al.*, 2005). Interessanterweise gibt es keine SERA-Proteasen in *P. gallinaceum*, einer vogelpathogenen Plasmodiumspezies. Vogelpathogene Plasmodien vollziehen auch keine klassische Leberphase, da sie keine Hepatozyten infizieren, die exoerythrozytäre Schizogonie findet in unterschiedlichen Zelltypen, bspw. Fibroblasten oder Kupferzellen statt. Durch welche Proteasen die SERAs in *P. gallinaceum* ersetzt werden ist bisher nicht aufgeklärt worden (La Crue *et al.*, 2006; Frevert *et al.*, 2008).

Die Regulation von Proteasen ist essentiell für einen Organismus, weil eine unbeabsichtigte Aktivierung verheerende Folgen haben kann. Deshalb haben sich während der Evolution verschiedene Regulationsmechanismen entwickelt. So gibt es die Zymogene, die erst durch pH-Wert-Änderung oder Prozessierung aktiviert werden. Andere Enzyme werden posttranslational modifiziert und erst so aktiv oder sie benötigen Kofaktoren für die Substratbindung. Eine Variante der Regulation, die weitgehend unabhängig von den vorherrschenden Bedingungen ist, ist die Regulation von Proteasen über intrazelluläre Inhibitoren. Diese sollen nun im folgenden Teil vorgestellt werden.

1.3 Cysteinproteaseinhibitoren

Die Regulation von Cysteinproteasen durch intrazelluläre Cysteinproteaseinhibitoren ist für alle untersuchten Organismen beschrieben. Die Mechanismen der Inhibition können sehr vielfältig sein: zunächst kann der Inhibitionsmechanismus reversibel oder irreversibel sein. Bei der irreversiblen Inhibition wird häufig die Konformation des Enzyms so verändert, dass die Bindungstasche Veränderungen erfährt. Bei der reversiblen Inhibition unterscheidet man in kompetitive und nichtkompetitive Inhibition. Während kompetitive Inhibitoren mit dem Substrat um die Bindungsstelle konkurrieren, besitzen nichtkompetitive Inhibitoren einen separaten Bindungsort. Generell wirken intrazellulär hergestellte Inhibitoren über einen reversiblen, kompetitiven Mechanismus (Dubin, 2005).

Die Nomenklatur der Cysteinproteaseinhibitoren erfolgt nach MEROPS (Rawlings *et al.*, 2004), wobei die Tertiärstruktur der Proteine die Einteilung in die *Clans* IA – JF bestimmt und die Sequenzhomologie die Einteilung der Familien I1 – I78. Im Pflanzen- und Tierreich bilden die Cystatine (Familie I25) die wichtigste Gruppe der Cysteinproteaseinhibitoren. Den Protozoen fehlen die Inhibitoren der Familie I25 jedoch gänzlich.

1.3.1 Chagasin-ähnliche Cysteinproteaseinhibitoren

Der erste in Protozoen identifizierte Cysteinproteaseinhibitor war Chagasin, ein 12 kDa großes Protein aus *Trypanosoma cruzi*. Dieser bildete die neue Familie I42 der Cysteinproteaseinhibitoren (Monteiro *et al.*, 2001; Salmon *et al.*, 2006). Mittlerweile sind auch für andere Kinetoplastidae (Trypanosomen und Leishmanien) sowie für *Entamoeba histolytica* und *T. gondii* Inhibitoren dieser Familie beschrieben (Beisteiro *et al.*, 2004; Riekenberg *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005; Saric *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007). Auch in allen untersuchten Plasmodienspezies konnte ein Inhibitor dieser Familie identifiziert werden, wozu auch *P. falciparum* und *P. berghei* zählen (Pandey *et al.*, 2006; Rennenberg *et al.*, 2010). Außer in Protozoen wurden Inhibitoren der Familie I42 nur in dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben (Sanderson *et al.*, 2003). Alle Inhibitoren der Familie I42, auch als ICPs bezeichnet (inhibitor of cysteine proteases), inhibieren ihre Zielprotease, die dem *Clan C* der Proteasen angehört, über einen reversiblen, kompetitiven Mechanismus. Die Sequenzhomologie unter den ICPs ist mit teils weniger als 15% sehr gering,

während die 3D-Struktur jedoch recht konserviert ist. Durch mehrere β -Faltblattstränge (bei TcChagasin 8) wird eine Immunglobulin-ähnliche β -Sandwich-Struktur gebildet (Abb. 1-11A) (Smith *et al.*, 2006). Die Verbindung der β -Faltblattstränge wird durch Schleifenstrukturen, sogenannten *Loops*, erzielt. Hierbei bilden die *Loops* 2,4 & 6 eine Keilstruktur aus, die in die Substrattasche bindet (Abb. 1-11A & B). In den *Loops* sind teilweise hochkonservierte Domänen, die die spezifische Bindung der Protease vermitteln. So ist in *Loop* 2 das Motiv NPTTGY hochkonserviert. In Untersuchungen von EhICP-1 konnte gezeigt werden, dass nur durch den rekombinant hergestellten *Loop* 2 eine Inhibition von Papain erreicht wird (Riekenberg *et al.*, 2005). Bei den Zielproteasen kann es sich sowohl um Wirtszellproteasen als auch um endogene Proteasen handeln.

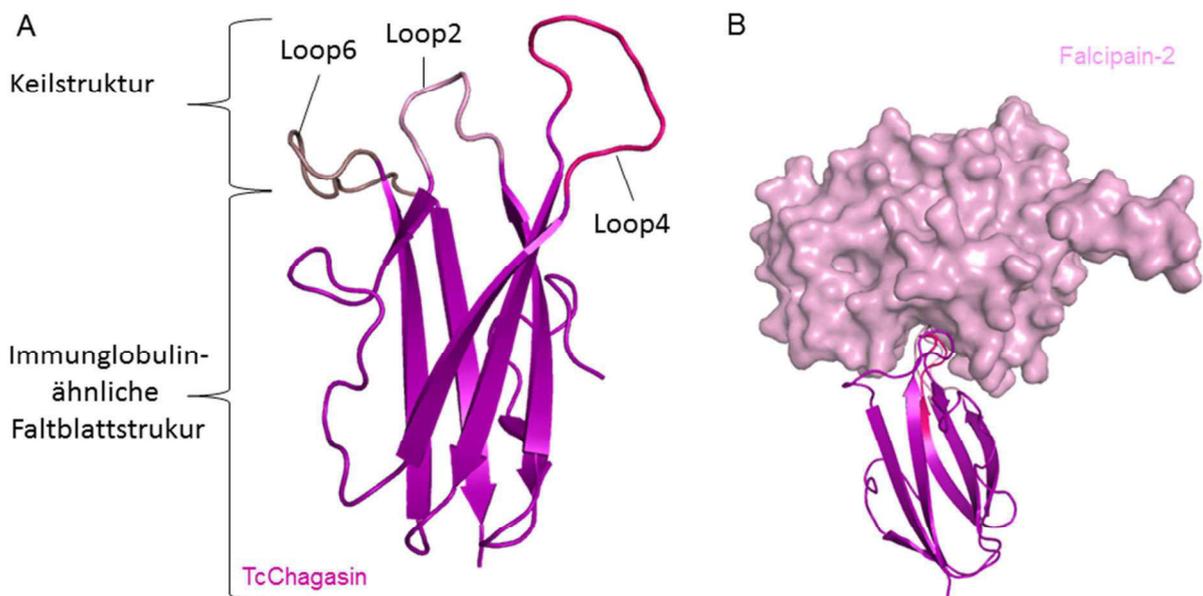


Abbildung 1-11: TcChagasin-Struktur. **A:** TcChagasin Die acht β -Faltblattstränge bilden eine immunglobulinähnliche β -Sandwichstruktur aus. Die Verbindung der β -Faltblattstränge bilden Schleifenstrukturen, *Loops*. *Loop* 2 (hellrosa), *Loop* 4 (pink) und *Loop* 6 (lila) bilden eine Keilstruktur, die in die Substrattasche der Proteasen bindet. (PDB: 2H7W. Da Silva *et al.*, 2007) **B:** TcChagasin (lila) im Komplex mit Falcipain-2 (PDB: 2GHU. Hogg *et al.*, 2006).

1.3.2 Cysteinproteaseinhibitoren von *Plasmodium*

Wie erwähnt, konnten durch Sequenzvergleiche auch in allen untersuchten Plasmodien ICPs nachgewiesen werden (LaCrue *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2006; Rennenberg *et al.*, 2010). Eine Besonderheit bei allen Plasmodium ICPs ist das sehr unterschiedliche Molekulargewicht im Vergleich zu allen anderen bekannten

Vertretern dieser Familie. Generell liegt das Molekulargewicht der ICPs zwischen 10 und 20 kDa, die ICPs der Plasmodien weisen jedoch mindestens eine Größe von 40 kDa auf, PglICP hat sogar eine Größe von 63 kDa. Diese Größe ist durch eine lange Insertion am N-terminalen Ende der Proteine zu erklären. Wie in Abb. 1-12 exemplarisch an PbICP dargestellt, liegt zwischen dem Signalpeptid und der C-terminalen Inhibitor-domäne eine N-terminale Insertion. Die Funktion dieser N-terminalen Domäne, PbICP-N, war bis zu Beginn meiner Arbeit noch nicht abschließend geklärt und war auch Gegenstand meiner Forschungsarbeiten für die vorliegende Arbeit.

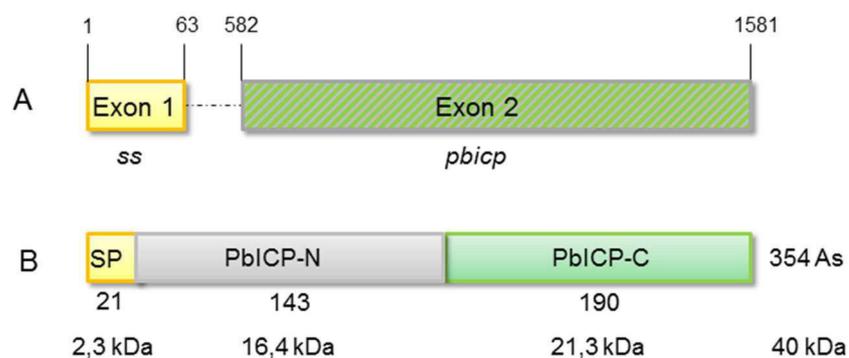


Abbildung 1-12: schematische Darstellung von *pbicp* und PbICP. **A:** das *pbicp*-Gen besteht aus zwei Exons, wobei Exon 1 nur für das Signalpeptid codiert und Exon 2 für den Rest des Proteins. Die Zahlen geben die Anzahl der Basenpaare an. **B:** PbICP-Protein, Unterteilt in Signalpeptid (SP), PbICP-N, mit bisher unbekannter Funktion und PbICP-C, der Inhibitor-domäne. Die Zahlen geben die Anzahl der Aminosäuren an, darunter aufgeführt die Größe in kDa.

Die Homologie zwischen den *Plasmodium* ICPs variiert stark, ist aber besser erhalten als gegenüber ICPs anderer Spezies (Abb. 1-13). Vergleicht man nur die Inhibitor-domäne der Proteine so haben die ICPs der Nagetier-Plasmodien eine Homologie von 90% (PbICP-C und PyICP-C), PbICP-C und PflICP-C weisen nur noch eine Homologie von gut 50% auf und die Homologie von PbICP-C und PglICP-C liegt nur noch bei knapp 40%. Die Homologie von PbICP-C gegenüber TglICP-1, TcChagasin und LmICP liegt hingegen nur noch bei knapp 25%. Das in *Loop 2* konservierte Motiv NPTTGY ist unter den Apikomplexa nicht erhalten, vielmehr wird dieses Motiv durch GxGYxW(F/L) ersetzt (Abb. 1-13, türkiser Kasten). Der *Loop 4* von Plasmodien enthält eine Insertion von über 30 Aminosäuren (Abb. 1-13, lila

Kasten). Das hochkonservierte Motiv RFP in *Loop 6* ist in nahezu allen dargestellten Sequenzen erhalten (Abb. 1-13, blauer Kasten).

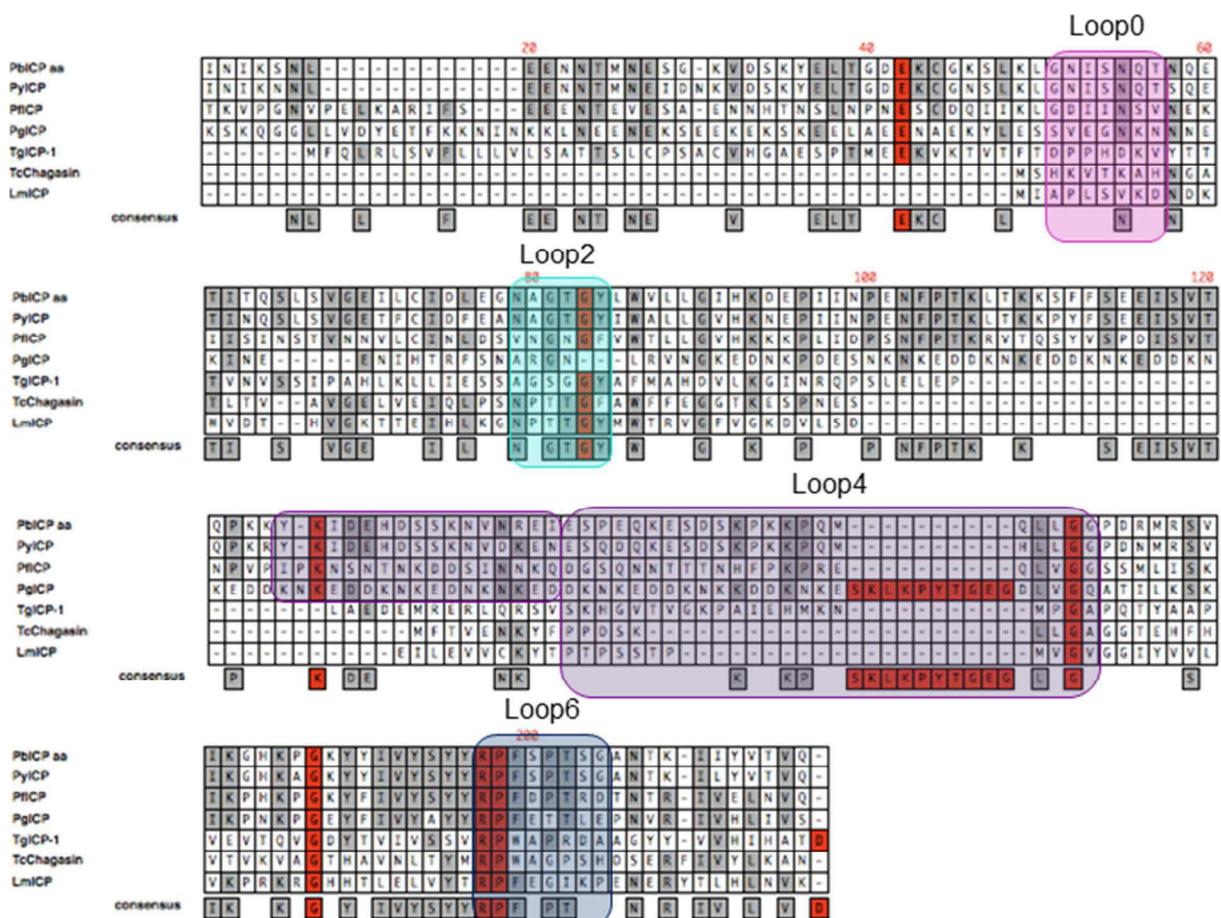


Abbildung 1-13: Sequenzvergleich von Mitgliedern der Familie I42

Da die Struktur von PbiCP-C durch Kristallisation aufgeklärt werden konnte, können auch Strukturvergleiche vorgenommen werden (Abb. 1-14) (Hansen *et al.*, 2011). Die Grundstruktur des Proteins gleicht der von TcChagasin (Abb. 1-14B), PbiCP-C verfügt jedoch über einen zusätzlichen *Loop*, *Loop 0* (Abb. 1-13, rosa Kasten; Abb. 1-14). Wie auch schon der Sequenz zu entnehmen, weisen Plasmodien Insertionen in *Loop 3* und *Loop 4* auf. Da *Loop 4* an der Substratbindung beteiligt ist, sollte die Struktur Aufschlüsse über die Spezifität des Inhibitors geben. Leider konnte die Struktur von *Loop 4* jedoch als einzige Ausnahme nicht definiert werden, was auf eine hohe Flexibilität des *Loops* hindeutet. Durch verschiedenste Mutationen von *Loop 4* konnte jedoch gezeigt werden, dass *Loop 4* keinen essentiellen Einfluss auf die Inhibitoraktivität ausübt (Witt, 2007; Hansen *et al.*, 2011). Allerdings verändert der

zusätzliche *Loop 0* die Spezifität der Plasmodien-ICPs. So sind diese, unter anderem aufgrund von *Loop 0*, nicht in der Lage Cathepsin B-ähnliche Proteasen zu inhibieren (Kosec *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2009; Hansen *et al.*, 2011). Dieser Unterschied wurde in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht (Abschnitt 3.2).

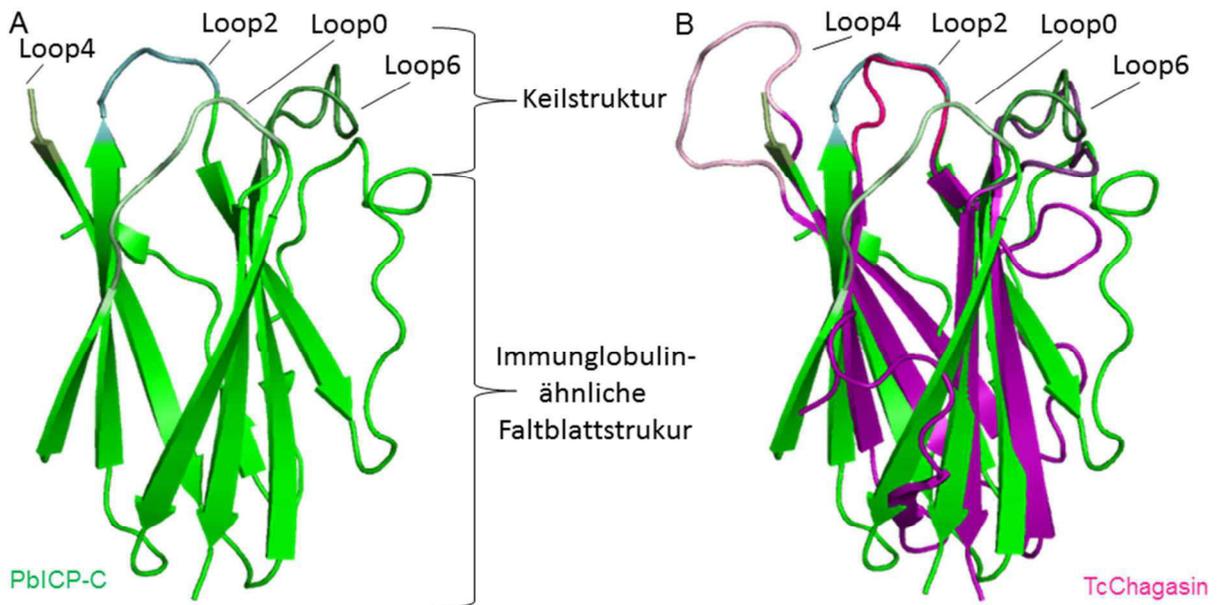


Abbildung 1-14: Struktur von PbICP-C, sowie Überlagerungsmodell von PbICP-C und TcChagasin. **A:** PbICP-C. β -Faltblattstränge bilden auch bei PbICP-C eine immunglobulinähnliche β -Sandwichstruktur aus. Die Verbindung der β -Faltblattstränge bilden Schleifenstrukturen, *Loops*. *Loop 0* (hellgrün), *Loop 2* (Minzgrün), *Loop 4* (Militärgrün) und *Loop 6* (Dunkelgrün) bilden eine Keilstruktur, die in die Substrattasche der Proteasen bindet. (PDB: 3PNR. Hansen *et al.*, 2011) **B:** Überlagerung von PbICP-C und TcChagasin (lila, PDB: 2H7W. Da Silva *et al.*, 2007). Nur PbICP-C verfügt über *Loop 0*. Farbmarkierung der TcChagasin *Loops*: *Loop 2* (pink), *Loop 4* (hellrosa) und *Loop 6* (lila).

PbICP wird über den ganzen Lebenszyklus weitgehend konstant exprimiert. Die Expression von PglICP dagegen, nimmt in den Sporozoitien der Speicheldrüse zu. Für PflICP ist nur die Expression in der Blutphase beschrieben. Sie ist, ähnlich wie die PbICP Expression, weitgehend konstant, allerdings ist sie in den Trophozoiten etwas stärker. Für PbICP ist eine Prozessierung des Proteins während des gesamten Lebenszyklus beschrieben, wobei PbICP-N vermutlich nach der Prozessierung degradiert. Die Lokalisation von PbICP und PglICP ist in Sporozoitien hauptsächlich an der Oberfläche, für PbICP wurde auch eine Sezernierung des Proteins beschrieben. PflICP weist eine membranständige Lokalisation in Ringstadien

und frühen Schizonten auf, in späteren Stadien ist es vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert (LaCrue *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2006; Rennenberg *et al.*, 2010).

Während die Funktion von PglCP noch nicht geklärt werden konnte, konnte für PflCP eine Funktion bei der Invasion von Erythrozyten durch Merozoiten nachgewiesen werden. Die *in vitro* Behandlung mit Anti-PflCP-Antiserum reduzierte die Invasionsrate erheblich (LaCrue *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2006). Die weitere Aufklärung der PblCP-Funktionen sind Gegenstand dieser Arbeit.

1.4 Die Erforschung von Proteaseaktivitäten

Die hohe Spezifität von Proteasen führt dazu, dass sie attraktive Ziele für die Medikamentenentwicklung sind. Der genaue Wirkungsmechanismus einiger Malariamedikamente ist zwar nicht bis auf molekulare Ebene geklärt, ein häufiges Ziel ist jedoch die proteaseabhängige Hämoglobindegradation (dies gilt unter anderem für Artemisinin-Derivate).

Um einer Protease, bzw. Proteaseinhibitor, essentielle Funktionen im Lebenszyklus des Pathogens zuordnen zu können, müssen diese jedoch zunächst erforscht werden. Dies kann zum Einen durch die Inhibition der Protease geschehen und zum Anderen durch die Deletion des Proteasegens, bzw. Proteaseinhibitorgens. Beide Methoden werden nun vorgestellt.

1.4.1 Die Nutzung synthetischer Inhibitoren für Forschungszwecke

Der Einsatz von niedermolekularen synthetischen Inhibitoren ist eine verbreitete Methode, um Proteasefunktionen zu überprüfen, so auch in der Malariaforschung. Durch den Einsatz von Inhibitoren kann ein Rückschluss auf die Funktion der inhibierten Protease / Proteasegruppe geschlossen werden. Durch die Möglichkeit mit kommerziell erhältlichen Inhibitoren bestimmte Proteasefamilien zu blockieren, kann die Aktivität dieser Proteasefamilien bei bestimmten Prozessen überprüft werden. Die Aktivität von Cysteinproteasen kann so mittels des generellen Cysteinproteaseinhibitors E-64 überprüft werden (Barret *et al.*, 1981). Mittlerweile wurden auch viele Analoga von E-64 entwickelt die spezifisch gegen bestimmte

Cysteinproteasen wirken, so beispielsweise der Cathepsin B-spezifische Inhibitor CA-074 (Murata *et al.*, 1991).

Auch in der Malariaforschung wurden Experimente mit E-64 durchgeführt, um die Beteiligung von Cysteinproteasen an bestimmten Punkten der Entwicklung zu überprüfen. So konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Sporozoiten mit E-64 *in vitro* die Invasion, aber nicht die Transmigration, von Hepatozyten blockiert. Auch *in vivo* ist die Invasionsrate erheblich reduziert (Coppi *et al.*, 2005). Die Behandlung von späten Leberphaseparasiten mit E-64 blockiert den PVM-Zusammenbruch und verhindert so die Merosomenbildung (Sturm *et al.*, 2006). Im Blutstadium wiederum verursacht E-64 das Aufschwellen der Nahrungsvakuole und eine Akkumulierung von unverdaulichem Hämoglobin, was die bereits erwähnte Beteiligung von Cysteinproteasen an der Degradation von Hämoglobin bestätigt. Späte Stadien der Blutphase können unter E-64-Behandlung nicht mehr die PVM-Degradation vollziehen, die Serin- und Cysteinproteaseinhibitoren Chymostatin und Leupeptin blockieren sowohl den Zusammenbruch der PVM als auch den der Erythrozytenmembran (McKerrow *et al.*, 1993; Salmon *et al.*, 2001; Wickham *et al.*, 2003; Soni *et al.*, 2005; Blackman, 2008; Yeoh *et al.*, 2007). Auch die E-64-Behandlung reifer Gametozyten blockiert die Parasitenentwicklung, so sind die Gametozyten nach einstündiger E-64-Inkubation und anschließender Blutmahlzeit durch Mücken nicht mehr in der Lage Oozysten zu bilden (Eksi *et al.*, 2007).

Nachdem durch Inhibitor-Behandlung die Beteiligung bestimmter Protease-Familien an den untersuchten Prozessen nachgewiesen werden konnte, beginnt die Identifikation der spezifischen Protease und die Aufdeckung der Protease-Regulation, die bspw. durch einen Proteaseinhibitor vorgenommen werden kann. Unter anderem bietet sich dazu die Deletion der für die Protease, bzw. Proteaseinhibitor kodierenden Gene an, ein Verfahren hierfür soll im nächsten Abschnitt vorgestellt werden.

1.4.2 Der konditionale *Knockout* von PbICP-C

Durch die Deletion von Genen, auch als *Knockout* bezeichnet, kann häufig auf die Funktion der kodierten Proteine geschlossen werden. Um die Funktion des Cysteinproteaseinhibitors PbICP zu klären, sollte in vorangegangenen Studien auch ein *Knockout* des Genes, bzw. von Teilen des Genes durchgeführt werden. Da alle bisherigen Versuchsansätze einen *pbicp-Knockout*-Stamm zu generieren fehlschlügen, wurde zunächst angenommen, dass PbICP eine essentielle Funktion in der Blutphase hat (Rennenberg *et al.*, 2010; Lehmann, 2012). Um dennoch die Funktionen von PbICP in der Leberphase untersuchen zu können, wurde von Dr. Christine Lehmann (Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg) ein konditionaler *Knockout* des *pbicp-c*-Gens vorgenommen. Hierbei wird in das Genom von Blutphaseparasiten ein Plasmidkonstrukt in das Genom integriert, die Deletion des Genes findet aber erst zu einem späteren Zeitpunkt statt. Hierzu wurde das Flp/FRT *site-specific recombination system* (SSR-System) angewendet (Branda *et al.*, 2004). Das SSR-System beruht auf der Verwendung eines Parasitenstammes der unter einem phasenspezifischen Promotor das Enzym Flippase (Flp) exprimiert. Die Flippase schneidet die zwischen zwei FRT-sites (Flp recombinase target) liegende DNA aus, es findet die sogenannte Exzision der DNA statt. Die Exzision von *pbicp-c* ist in der Abbildung 1-16 schematisch dargestellt. Die Expression der Flippase wurde durch den UIS4-Promotor reguliert, der bei Sporozoiten der Speicheldrüsen hochreguliert wird, der Parasitenstamm wird als PbNK65Flp@UIS4 definiert und wurde freundlicherweise durch das Institut Pasteur, Paris, zur Verfügung gestellt (Combe *et al.*, 2009). Hierbei ist zu erwähnen, dass die Klonierung dieses *Deleter*-Stammes über einen *single-crossover* durchgeführt wurde, somit also mit der Revertierung einiger Parasiten gerechnet werden muss.

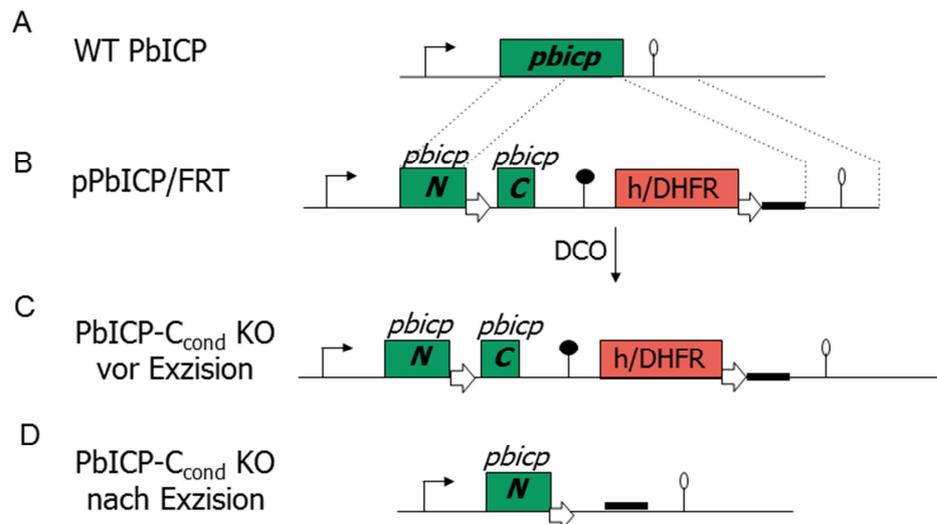


Abbildung 1-15: Schematische Darstellung der für den konditionalen *knock out* von *pbicp-c* vorgenommenen Klonierung. Mittels des Plasmids pPbICP/FRT (B) wurden die FRT-sites (⇔) samt einer Pyrimethaminresistenzkassette über einen *double-crossover* (DCO) in das endogene *pbicp-c*-Gen (A) der PbNK65Flp@UIS4-Parasiten integriert. Die FRT-sites flankierten so das *pbicp-c*-Gen samt der Pyrimethaminresistenzvermittelnden Kassette (h/DHFR) (C). Durch die unter dem UIS4-Promotor regulierte Expression der Flippase begann die Exzision des *pbicp-c*-Gens und der Resistenzkassette in den Sporozoiten der Speicheldrüsen (D). ↗ = Promotor φ = 3'UTR (modifiziert nach Dr. Lehmann, Klonierung von Dr. Lehmann durchgeführt)

Für die Generierung der PbICP-C-KO_{cond}-Parasiten wurde ein Plasmid kloniert, welches zur Flankierung des *pbicp-c*-Gens mit FRT-sites führte, zudem vermittelte es eine Pyrimethaminresistenz für die Selektion der Parasiten (Abb.1-15B & C). Durch die Expression der Flippase in den Sporozoiten wurde das *pbicp-c*-Gen, sowie die Pyrimethaminresistenz, ausgeschnitten. Zurück blieb nur die N-terminale Sequenz mitsamt dem Signalpeptid (Abb. 1-15D). So konnte die Inhibitor-domäne, *pbicp-c*, deletiert werden. Die Charakterisierung des PbICP-C-KO_{cond}-Parasitenstammes wurde im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen und wird in Abschnitt 3.1.4 erläutert.

2. Material & Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Geräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Acrylamidgelkammer	Hoefer Mighty Small II, Modell 45-101-i	Amersham Biosciences; PEQLAB, Erlangen, D
Affinitätssäule	HiTrap™ HP 5 mL	GE Healthcare, UK
Agarosegelkammer	PerfectBlue™	PEQLAB; Erlangen, D
Analysewaage	KERN 410	Kern & Sohn GmbH, Ballingen- Frommern, D
Binokular	47 50 52 9901	Zeiss; Hamburg, D
Blotting Tank	Modell EB10	Labtec Int.; Burkhardtsdorf, D
Brutschrank (Bakterien)	B6200	Heraeus; Hannover, D
Brutschrank (Zellen)	B5060EK-CO ₂	Heraeus; Hannover, D
Digitalkamera	C4742-95 E 4500	Hamamatsu; Hamamatsu City, JP Nikon; Düsseldorf, D
Einschweißgerät	Polystar® 423	Rische; Herfurth, D
Elektroporationsgerät	Nucleofector II manual	Amaza biosystems; Köln, D
Entwickler	Curix 60	AGFA; Mortsel, B
Entwicklerkassette	IEC 60406	Rego X-Ray; Augsburg, D
Fraktionssammler	Fraction Collector 2110	BioRad; Kalifornien, USA
Fotometer	NanoDrop™2000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Fluoreszenzbinokular	SMZ 800	Nikon; Düsseldorf, D
Fluoreszenzmikroskop	Leitz DM RB Axiovert 200 FluoView 1000	Leica; Bentheim, D Zeiss; Hamburg, D Olympus, Hamburg, D
Fluorimeter	Infinite F200	Tecan; Crailsheim, D
Gradientenpumpe	Econo pump	BioRAD; Hercules, USA
Geltrocknungsrahmen	14 x14 cm	Roth; Karlsruhe, D
Inkubator (Mücken)	Climacell-707	MMM-Group; Graefelfing, D

Laborroller	RM5 Stuart SRT6	Assistent; Sondenheim, D Sigma-Aldrich Chemie Gmbh; München, D
Lichtmikroskop	V365 Axiovert 25 (invers)	Hund; Wetzlar, D Heraeus; Hannover, D
Magnetrührer	IKAMAG [®] RCT RET basic	IKA Labortechnik; Hamburg, D
Mikrowelle	R-208	Sharp Electronics; Hamburg, D
Multipette	Handy Step [®] electronic	Brand; Wertheim, D
pH-Meter	pH Level 1	InoLab; Weilheim, D
Pinzette	neoLab-Dumont Pinzette Inox Nr.5	neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH; Heidelberg, D
Pipetten	Pipetman [®] P	Gilson; Den Haag, NL
Pipettierhilfe	Pipetus [®] -akku	Hirschmann; Eberstadt, D
Power Supply	Consort E835 Consort EV231 EPS 3500	Consort; Turnhout, B Consort; Turnhout, B Amersham Biosciences; Freiburg, D
Präzisionswaage	TP-3002	Denver Instrument, Göttingen, D
Prep Cell System	Model 491	BioRad; Kalifornien, USA
Quarzküvette		Hellma; Müllheim, D
Schüttler	Innova [™] 4400 KS250 basic	New Brunswick; Nürtingen, D IKA Labortechnik; Hamburg, D
Sterilbank	BSB 6A Herasafe MSC-Advantage	Gelaire Flow Laboratories; Opera, I Heraeus Instruments; Osterode, D Thermo fisher scientific, Waltham, USA
Sonifikator	Sonifier 250 Sonifier celldisreptior B15	Branson; Dietzenbach, D
Sonifizierkammer		Heinemann; Schwäbisch Gmünd, D
Thermoblock	Thermomixer 5436	Eppendorf; Hamburg, D

	Thermomixer compact Thermomixer comfort	
Thermocycler	MJ Mini™ T3000	Bio-Rad; München, D Biometra®; Göttingen, D
Ultraschallbad	Sonorex super	Bandelin Schalltec GmbH; Mörfelden-Walldorf, D
Ultrafiltrations Einheit	Amicon Zelle	Amicon GmbH;Schorndorf, D
UV-Strahler	UVStratalinker® 1800	Stratagene; Amsterdam, NL
UV-Transilluminator	UV-Flächenstrahler	Konrad Bender; Wiesloch, D
Vortexer	VF2 Vortex Genie 2	IKA Labortechnik; Hamburg, D Scientific industries Inc.; New York, USA
Wasserbad	FBH 604 SW 20	Fisherbrand®; Schwerte, D Julabo; Seelbach, D
Zählkammer	Neubauer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Zentrifuge	Zentrifuge 5415 D Kühlzentrifuge 5417R Kühlzentrifuge 4K10 Kühlzentrifuge J2-H5 Kühlzentrifuge J2-21 Minifuge T Cytospin 3	Eppendorf; Hamburg, D Eppendorf; Hamburg, D Sigma; Steinheim, D Beckmann; Krefeld, D Beckmann; Krefeld, D Heraeus Sepatech; Hannover, D SHANDON, life sciences international GmbH; Frankfurt, D

2.1.2 Gebrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Bezeichnung	Hersteller
Blottingpapier	Rotilabo® 1,5 mm Rotilabo® 1,0 mm	Roth; Karlsruhe, D
Cellophanblätter	14 x 14	Roth; Karlsruhe, D
Reaktionsgefäß für Stickstoff-Stabilate	Cryo Tube™ Vialis	Nunc; Roskilde, DK

Deckgläschen	rund 13 mm Ø 21 x 26 mm	Menzel&Glaser; Braunschweig, D Assisten; Sondheim, D R. Langenbrick; Emmendingen, D
Dialysemembran	Spectra / Por, MWCO 6 – 8 kDa	Roth; Karlsruhe, D
Einmalkanülen	Sterican 23 G; 27 G	Braun; Melsungen, D
Einmalküvetten	Halbmikro Einmalküvette 1,5 - 3 mL	Eppendorf; Hamburg, D
Einmalspritzen	1 mL	Braun; Melsungen, D
Entwicklerfilm	Medical X-Ray Medical X-Ray	AGFA; Mortsel, BL CEA; Hamburg, D
Falcon-Röhrchen	13 mL / 15 mL / 50 mL	Sarstedt; Nürnberg-Rommelsdorf, D
Glaspetrischalen (Glass Bottom Dish)	Willco-Dish®	WillCo Wells BV; Amsterdam, NL
Insulinspritzen	BD-Micro-Fine 0,5 mL	BD Medical; Franklin Lakes, USA
Kunststoffpipetten- spitzen	5 mL / 10 mL / 25 mL	Sarstedt; Nürnberg-Rommelsdorf, D
Küvette	Uvette®	Eppendorf; Hamburg, D
Mikrotiterplatten	96 Well, Polystyrol, Flachboden unbeschichtet schwarz transparent	Greiner bio-one; Solingen, D Nunc; Wiesbaden, D
Mounting Medium	Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation; Hamburg, D
Multipettenspitzen	Präzisions Dispencer Tipps 5,0 mL	Brand; Wertheim, D
Nylonmembran	Hybond™ -N	Amersham; Buckinghamshire, UK
Objektträger	SuperFrost®	Roth; Karlsruhe, D

	orange Polysine slides	Mentel GmbH; Braunschweig, D
Parafilm	Parafilm „M“ [®]	American Can Company; Greenwich, GB
Pasteurpipetten		Brand; Wertheim, D
Petrischalen	9 mm Ø	Sarstedt; Nürnbrecht-Rommelsdorf, D
Pipettenspitzen	10 µl; 200 µl; 1000µl	Sarstedt; Nürnbrecht-Rommelsdorf, D
Pipettenspitzen, gestopft	10 µl; 200 µl; 1000µl	Greiner Bio-one; Solingen, D
Polypropylen Säulen	Disposable Columns (5 mL)	Qiagen; Hilden, D
Reaktionsgefäße	1,5 mL / 2 mL Cups 1,5 mL Nerbe- Cups PCR Softtubes 0,2 mL	Eppendorf; Hamburg, D Nerbe plus; Winsen/Luhe, D Biozym; Oldendorf, D
Sterilfilter	Celltris 30 µl	Partec; Münster, D
Ultrafiltrationsmembran	NMWL:3,000 für Amiconzelle	Merck Millipore; Billerica, USA
Wattepads		Aro; AT EMST, N
Whatman- Nitrozellulose	Transfer Membran Protan ^R	Whatman GmbH; Dassel, D
Zellkulturflaschen	250 mL	Sarstedt; Nürnbrecht-Rommelsdorf, D
Kultur-Platte	24-Well 6-Well	Greiner Bio-one; Solingen, D

2.1.3 (Bio-)Chemikalien

Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten (Bio-)Chemikalien

(Bio-)Chemikalien	Hersteller
Acrylamid	Roth; Karlsruhe, D
Accutase	PAA Laboratories GmbH; Pasching, A
Ac-DEVD-CMK	Calbiochem, Merck KGaA; Darmstadt, D

Agarose	Bio&Sell; Nürnberg, D
Alserver's solution	Sigma; Steinheim, D
Amphotericin	PAA Laboratories GmbH; Pasching, A
Ampicillin	Sigma-Aldrich; Taufkirche, D
Amylose Resin	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D
Antisedan®	Pfizer GmbH; Karlsruhe, D
APS (Ammoniumpersulfat)	Biomol; Hamburg, D
Augensalbe	Bepanthen, Bayer; Leverkusen, D
Barrier Marker liquid, Roti®	Roth; Karlsruhe, D
Braunswasser (RNase-Dnase-frei)	Braun; Melsungen, D
BSA (Rinderserumalbumin)	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D
CA-074	Calbiochem, Merck KGaA; Darmstadt, D
CA-074Me	Calbiochem, Merck KGaA; Darmstadt, D
Calciumchlorid	Roth; Karlsruhe, D
Calciumdinatrium-ethylendiamin-tetraacetat	Roth; Karlsruhe, D
Calpain-1 Substrat (H-K(FAM)-EVY-GMMK(-DABYL)-OH)	Calbiochem, Merck, KGaA; Darmstadt, D
Caspase-3 Substrat II (Ac-DEVD-AMC)	Calbiochem, Merck, KGaA; Darmstadt, D
Caspase-8 Substrat II (Ac-IETD-AFC)	Calbiochem, Merck, KGaA; Darmstadt, D
Cathepsin B Substrat (Z-Arg-Arg-AMC)	Calbiochem, Merck, KGaA; Darmstadt, D
CHAPS	Roth; Karlsruhe, D
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich; Taufkirche, D
Chloroform	Roth; Karlsruhe, D
Coomassie Brilliant Blue R 250	Sigma; Steinheim, D
Cysteinproteasen Substrat (Z-Phe-Arg-AMC·HCL)	Bachem AG; Bubendorf, CH
DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol)	Sigma; Steinheim, D

Dextran, Fluorescein 10 000 MW	Molecular probes, Invitrogen; Karlsruhe, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma; Steinheim, D
dNTP-Mix (10 mM jeweils)	Roth; Karlsruhe, D
Domitor [®]	Pfizer GmbH; Karlsruhe, D
DTT (Dithiothreitol)	Biomol; Hamburg, D
E-64	Calbiochem, Merck KGaA; Darmstadt, D
EDTA (Ethyldiamin-Tetraessigsäure)	Gerbu biotechnik GmbH; Gaiberg, D
Eindeckmedium: Dako Cytomation fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation; Hamburg, D
Essigsäure (100%)	Roth; Karlsruhe, D
Ethanol (100%)	Roth; Karlsruhe, D
Ethidiumbromid (1%)	Biomol; Hamburg, D
Foetal Bovine / Calf Serum (FBS / FCS)	PAA Laboratories GmbH; Pasching, A
Formaldehyd	Merck; Darmstadt, D
Fructose	Roth; Karlsruhe, D
Gentamicin-ratiopharm [®] 80 SF	Ratiopharm GmbH; Ulm, D
Glukose	Roth; Karlsruhe, D
Glycerin	Roth; Karlsruhe, D
GoTaq [®] Reaktionspuffer	Promega; Mannheim, D
Glutathion (GSH)	Roth; Karlsruhe, D
Glutathion-Disulfid (GSSG)	Roth; Karlsruhe, D
Guanidine-hydrochlorid	Roth; Karlsruhe, D
Heparin – Natrium - 25000	Ratiopharm; Ulm, D
Hepes	Roth; Karlsruhe, D
Hoechst 33542	Molecular Probes; Leiden, NL
Hoechst 33258	Molecular Probes; Leiden, NL
Hyperladder I	Bioline, Luckenwalde, D
Hyperladder IV	Bioline, Luckenwalde, D
Imidazol	Sigma; Steinheim, D
IPTG (Isopropyl- β -D- thilgalaktopyranosid)	Biomol; Hamburg, D
Isopropanol	Roth; Karlsruhe, D

Kaliumacetat	Roth; Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	Roth; Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth; Karlsruhe, D
Kanamycin	Sigma-Aldrich; Taufkirche, D
Ketavet®	Pfizer GmbH; Karlsruhe, D
L-Arginin	Roth; Karlsruhe, D
LB-Agar (Lennox)	Roth; Karlsruhe, D
LB-Medium (Lennox)	Roth; Karlsruhe, D
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH; Pasching, A
Liquify No.2	Interpet Ltd; Surrey, GB
Magnesiumchlorid	Roth; Karlsruhe, D
Magnesiumsulfat	Roth; Karlsruhe, D
Maltose	Roth; Karlsruhe, D
Meersalz	Danival®; Andiran, F
MEM with Earle's Salts ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH; Pasching, A
Methanol	Roth; Karlsruhe, D
Milchpulver	Roth; Karlsruhe, D
Natriumacetat	Roth; Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Roth; Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat	Roth; Karlsruhe, D
Natrium-Ethylendiamin-tetraacetat	Biomol; Hamburg, D
Natriumhydroxid	Merck; Darmstadt, D
Natriumiodid	Roth; Karlsruhe, D
Natronlauge	Roth; Karlsruhe, D
Ni-NTA-Superflow- Partikel (Nickel-Nitrilotriessigsäure)	Quiagen; Hilden, D
Nycodenz	AXIS-SHIELD Poc AS; Oslo, N
PABA (p-Aminobenzoessäure)	Fluka, Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas; St.Leon-Roth, D
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas, St.Leon-Roth, D
Paraformaldehyd	Fluka; Steinheim, D

Phenylhydrazin	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Polyethylenglykol 6000	Roth; Karlsruhe, D
Ponceau	Roth; Karlsruhe, D
Protease inhibitor cocktail tablets, complete Mini, EDTA-free	Roche; Mannheim, D
Pyrimethamin	Sigma; Steinheim, D
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories GmbH; Pasching, A
Salzsäure	Roth; Karlsruhe, D
Saponin	Sigma; Steinheim, D
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth; Karlsruhe, D
SOC-Medium	Invitrogen™; Karlsruhe, D
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH; Pasching, A
Sucrose	Roth; Karlsruhe, D
Restore™ Western Blot Stripping Puffer	Pierce; Bonn, D
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylaminomethan)	Biomol; Hamburg, D
Tris	Biomol; Hamburg, D
Tris-HCl	Biomol; Hamburg, D
Triton-X 100	Sigma; Steinheim, D
Trypanblau	Merck KGaA; Darmstadt, D
Tween	Merck KGaA; Darmstadt, D
Urea	Roth; Karlsruhe, D
Wright's Stain	Sigma; Steinheim, D

2.1.4 Kits

Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Kits

Reagenssätze (Kits)	Hersteller
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Fermentas, Thermo scientific; Waltham, USA
Immun-Star™ WesternC™	Bio Rad; Hercules, USA
Nucleofector™ Kit	amaxa biosystems; Köln, D
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel; Düren, D

NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel; Düren, D
NucleoSpin® RNA II	Macherey-Nagel; Düren, D
NucleoSpin® Tissue XS	Macherey-Nagel; Düren, D
NucleoSpin® Blood Quick pure	Macherey-Nagel; Düren, D
BCA-Protein-Assay-Kit	Pierce; Bonn, D
SuperSignal West-Pico chemiluminescent substrat	Pierce; Bonn, D
SuperSignal West femto Maximum Sensitivity Substrat	Pierce; Bonn, D
NucleoBond® PC100 (Midi Kit)	Macherey-Nagel; Düren, D

2.1.5 Enzyme und Restriktionsenzyme

Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten Enzyme

Enzyme	Hersteller
Alkaline Phosphatase, CIP (calf intestinal)	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D
Calpain-1	Calbiochem, Merck KGaA; Darmstadt, D
Caspase-3	Calbiochem, Merck KGaA; Darmstadt, D
Caspase-8	Calbiochem, Merck KGaA; Darmstadt, D
Cathepsin B	Sigma; Steinheim, D
Cathepsin L	Vito Turk, Jozef Stefan Institute; Ljubljana, Slowenien
Falcipain-2	Eigene Herstellung in der AG Hansen; Universität Lübeck, D
Go Taq Polymerase	Promega; Mannheim, D
Lysozym	Roche diagnostics; Mannheim, D
Papain	Sigma; Steinheim, D
Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes / NEB; Frankfurt/Main, D
T4 DNA Ligase	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D

Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen	DNA-Sequenz	Hersteller
<i>ApaI</i>	5' GGGCC / C 3'	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D
<i>AvrII</i>	5' CCTAGG 3'	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D
<i>BamHI</i>	5' G / GATCC 3'	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D
<i>Clal</i>	5' AT / CGAT 3'	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D
<i>DpnI</i>	5' GA / TC 3'	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D
<i>EcoRI</i>	5' G / AATTC 3'	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D
<i>EcoRV</i>	5' GAT / ATC 5'	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D
<i>HindIII</i>	5' A / AGCTT 3'	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D
<i>NotI</i>	5' GC / GGCCGC 3'	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D
<i>SacII</i>	5' CCGC / GG 3'	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D

2.1.6 Vektoren

Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten Vektoren

Plasmid	Größe	Hersteller
MRA-786 pL0017	11068 bp	MR4/American Type Culture Collection; Wesel, D
pGEM®-T Easy	3015 bp	Promega; Mannheim, D
pJC45	2400 bp	AG Clos, BNI; Hamburg, D
pMAL-crl	6131 bp	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D

2.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 2.8: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Nr.	Sequenz	T _m (°C)	Enzym	Beschreibung
164	TGAATTCAAACATGTAGAAC AATGGGTTGC	50		cDNA – Expressionsanalyse; SERA2, sense
166	TGTGGCGGCCGCTCACATT TGTTCTTTCTGGA	50		cDNA – Expressionsanalyse; SERA2, antisense
172	TGAATTCCATTGCTTGAGTA GGCATGTGG	50		cDNA – Expressionsanalyse; DPAP3, sense
176	TGTGGCGGCCGCTCATCAA CCATGCTATTACGTG	50		cDNA – Expressionsanalyse; DPAP3, antisense
179	GTGTGAATTCAAATCGGCC ATGTTAAGGAA	50		cDNA – Expressionsanalyse; SERA1, sense
180	TGTGGCGGCCGCTTTCCGT GTAAGAAACAATCG	50		cDNA – Expressionsanalyse; SERA1, antisense
342	CGGGATCCAAAGTAACTGC TAAAGTGATGAAGA	50		cDNA – Expressionsanalyse; SERA3, sense
358	AACTGCAGAATTGAATCAC TATCTGGCTCCAT	50		cDNA – Expressionsanalyse; SERA3, antisense
492	GGGAATTC GAAGATAACGA CATATACTCTTTTGATATC	50	EcoRI	cDNA – Expressionsanalyse; PbICP, sense
588	CCC AAGCTTTT TATTGGACA GTCACGTATATAAT	50	HindIII	cDNA – Expressionsanalyse; Klonierungs- und Integrations-primer; PbICP- C*, antisense
595	CTGGGATCC ATGAAAAGTA TAACTTTTTTCGTGTTTAAT	55	BamHI	PbICP-komplett, sense
596	CTGGGATCC TTGGACAGTC ACGTATATAATTTTAGTGTT		BamHI	PbICP-komplett, antisense
598	TTGGATCC TTATTGGACAG TCACGTATATAAT		BamHI	PbICP-komplett*, antisense
616	GCATCACCTTCACCCTCTC C	-	-	Sequenzierungs-primer; pL0017 antisense

652	ATACTGTATAACAGGTAAG CTGTTATTGTG	55	-	Integrations-primer; d-loci sense
653	TTTCCCAGTCACGACGTTG	55	-	Integrations-primer; pL0017 antisens
654	GTGTAGTAACATCAGTTATT GTGTG	55	-	Integrations-primer; c-loci sense
655	CTTAGTGTTTTGTATTAATG ACGATTTG	55	-	Integrationsprimer; c-/d-loci antisense
679	CGTCAGACTGTCGATGAAG C	-	-	pMALcrl-left, sense, Sequenzierungs-primer
680	GGCGATTAAGTTGGGTAAC G	-	-	pMALcrl-right, antisense, Sequenzierungsprimer
763	ATAT GGATCC ATGAGTAAA GGAGAAGAAC	55	BamHI	Integrations-primer; pL0017 sense
774	TCAAAAATAAATATAATTG TTGTGA	-	-	pL0017, sense, Sequenzierungs-primer
908	CGCTCGAGACCACCCCATG CAATTTTATT	50	-	cDNA – Expressionsanalyse; Subtilisin-1, antisense
941	CGGGATCCCAGGAGATCCA TGGGATGAT	50	-	cDNA – Expressionsanalyse; Subtilisin-1, sense
1033	AAAAGCAATTTAGAAGAAAA CAACACAATG	55	BamHI	Del.-Mut.:PbICP ohne N, sense
1035	ACAATGTGATAAAAGGGCT AGGATGG	54	BamHI	Del.-Mut.:PbICP ohne N, antisense
1119	TTAAGCCT TTTAAATATTTA TATCTTTAATTTTATTCTCTA AATCTGA	55	HindIII	PbICP-N, antisense
1168	CGTCGT GAATT CAAAAGCA ATTTAGAAGAAAAC	55	EcoRI	Klonierungs- und Integrations-primer; PbICP-C ohne Signalpeptid, sense
1194	TGTTACGTTTATACATGTCA ATACC	-	-	Sequenzierungs-primer; pL0017-PbLSA4 sense
1275	ACGGGATCTTCTAGACTAC GTAGA	-	-	Sequenzierungs-primer; pL0017-3'UTR

1340	GTAAAACGACGGCCAGT	-	-	Sequenzierungs-primer; pGem-t-easy-M13 sense
1341	CAGGAAACAGCTATGAC	-	-	Sequenzierungs-primer; pGem-t-easy-M13 antisense
1391	ATGCATGCGAAATTGTGGA AAGAATGAAAAGGGGTG	50	-	Integrationsprimer; PblCP- 3'UTR antisense
1556	CTG GGATCC ATCTTTAATTT TATTCTCTAAATCTGATTCC GAAT	55	BamHI	PblCP-N-IKD antisense
1806	GCGCTCTAGAATGAAAAGT ATAACTTTTTTCGTGTTTAA T	55	-	Integrations-primer; PblCP-N sense
1970	GCGC GCGCCG CATGATT CTAATACCTCTATTTTTT	46.8	NotI	DPAP3 sense
1971	GCGC CCTAGG CCTAATTTA ACATTTTTATTCTTAACA	46.8	AvrII	DPAP3 antisense
2051	CGGTTGATGGGGAAGAGAT A	50	-	cDNA – Expressionsanalyse; DPAP2, sense
2052	TCCAACAAGGAATGGAAAC C	50	-	cDNA – Expressionsanalyse; DPAP2, antisense
2071	GCGC CCTAGG TTATAATTT AACATTTTTATTCTTAACA	46.8	AvrII	DPAP3-stopp antisense
2074	GGGAGTCGTTAGTATGTAT CATTTG	-	-	Sequenzierungs-primer; DPAP3 (500 bp) sense
2075	GGAGTGATAAATAATCCAC CTAC	-	-	Sequenzierungs-primer; DPAP3 (500 bp) sense

2.1.8 Antikörper

Tabelle 2.9: Auflistung der verwendeten primären Antikörper, bzw. Antiseren

primäre Antiseren	Verdünnung für IFA-Färbungen	Verdünnung für Western blot	Spezies	Hersteller
α -CSP	1:100		Maus	AG Heussler, BNI; Hamburg, D
α -CSP	1:1000		Kaninchen	Eurogentec; Köln, D
α -DPAP3	1:100		Maus	AG Heussler, BNI; Hamburg, D
α -Exp1	1:1000		Huhn	AG Heussler BNI; Hamburg, D
α -GFP	1:1000	1:2000	Kaninchen	Roche; Freiburg, D
α -GFP	1:1000	1 : 2000	Maus	Roche; Freiburg, D
α -MSP1	1:1000	1:500	Maus	AG Heussler BNI; Hamburg, D
α -PbICP-C	1:250	1:500	Ratte	AG Heussler, BNI; Hamburg, D
α -PbICP-C	1:1000	1:500	Kaninchen	AG Heussler, BNI; Hamburg, D
α -P. berghei	1:400		Maus	AG Heussler, BNI; Hamburg, D
α -RFP	1:1000		Ratte	Roche; Freiburg, D
α -PbSERA-1-C	1:250		Ratte	AG Heussler, BNI; Hamburg, D
α -PbSERA-2-M	1:250		Maus	AG Heussler, BNI; Hamburg, D
α -PbSERA-3-M	1:250		Maus	AG Heussler, BNI; Hamburg, D
α -PbSub-1	1:1000		Kaninchen	AG Blackman,

				MRC; London, USA
α -UIS4	1:1000		Kaninchen	AG Photini; Boston, USA

Tabelle 2.10: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper

sekundäre Antikörper	Verdünnung für IFA's	Verdünnung für Western blot	Spezies	Hersteller
α -rabbit IgG dylite 488	1:1000		Ziege	Cell Signalling; Boston, USA
α -chicken IgG Alexa Fluor [®] 594	1:8000		Ziege	Molecular Probes / Invitrogen; Karlsruhe, D
α -rat IgG Alexa Fluor [®] 594	1:5000		Esel	Molecular Probes / Invitrogen; Karlsruhe, D
α -mouse IgG Alexa Fluor [®] 594	1:8000		Ziege	Molecular Probes / Invitrogen; Karlsruhe, D
α -rabbit IgG Alexa Fluor [®] 594	1:5000 für Blutstadien		Ziege	Molecular Probes / Invitrogen; Karlsruhe, D
α -rabbit IgG Alexa Fluor [®] 647	1:1000		Ziege	Anaspec; Johannisburg, South africa
α -rat IgG Alexa Fluor [®] 647	1:1000		Ziege	Molecular Probes / Invitrogen; Karlsruhe, D

α -mouse Cy TM 2	1:250		Esel	Dianova; Hamburg, D
α -rabbit Cy TM 2	1:250		Esel	Dianova; Hamburg, D
α -chicken Cy TM 2	1:250		Esel	Dianova; Hamburg, D
α -chicken Cy TM 5	1:4000		Esel	Dianova; Hamburg, D
α -mouse- HRP-linked		1:5000	Ziege	Pierce; Bonn, D
α -rabbit- HRP-linked		1:10000	Ziege	Cell Signalling; Boston, USA
α -rat-HRP- linked		1:10000	Ziege	Dianova; Hamburg, D

2.1.9 Zellen und Organismen

Tabelle 2.11: Auflistung der verwendeten Zellen und Organismen

Zellen und Organismen	Firma
<i>E. coli</i> BL21-paplac	AG Heussler, BNI; Hamburg, D
<i>E. coli</i> BL21-rig	AG Heussler, BNI; Hamburg, D
<i>E. coli</i> M15	AG Hansen, Universität Lübeck; Lübeck, D
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene; Amsterdam, NL
<i>Mus musculus</i>	NMRI BNI; Hamburg, D Charles River Laboratory; Sulzfeld, D
<i>Homo sapiens sapiens</i> HepG2	European Collection Of Cell Culture; Porton Down, GB
<i>Plasmodium berghei</i> ANKA	AG Heussler, BNI; Hamburg, D
<i>Plasmodium berghei</i> NK65	R. Menard, Institute Pasteur; Paris, F
<i>Anopheles stephensi</i>	AG Heussler, BNI; Hamburg, D

2.1.10 Datenbanken und Programme

Tabelle 2.12: Auflistung der verwendeten Datenbanken und Programme

Datenbank, Programm	Verwendung
ExpASY, bioinformatics resource portal	Berechnung von Proteineigenschaften; Alignment Analysen
GeneDB	Datenbank für Plasmodiumgenom
MacPyMOL	Strukturanalysen
MacVector™ Version 8.1.2	Sequenzanalysen, Primererstellung und Primertest, Alignment-Analysen
MEROPS	Datenbank für Nomenklatur der Proteasen und Proteaseinhibitoren
NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov	Literatur-Datenbank, Blast
Olympus Fluoview Version 3.1a	Aufnahme konfokaler Immunfluoreszenzbilder
Openlab Version 5.0.2	Bearbeitung von Immunfluoreszenzbildern
Primer3	Berechnung der Annealing-Temperatur von Primern
Prism	Statistische Datenauswertung, Berechnung kinetischer Parameter
Photoshop CS3	Bearbeitung der konfokalen Immunfluoreszenzbilder
PlasmoDB	Datenbank für Plasmodiumgenom
RCSB protein data bank	Datenbank für Proteinstrukturen
Tecan i-control	Kinetik-Analysen
Unicorn 5.10	Bedienung des Äktasystems (FPLC)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden zu DNA- und RNA-Analyse

2.2.1.1 PCR

Die PCR (polymerase chain reaction) dient zur *in vitro* - Amplifikation von DNA-Sequenzen. Das Verfahren, das von Kary Mullis 1983 entwickelt wurde, beruht auf der exponentiellen Vervielfältigung der DNA mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase. Die *Annealing*-Temperatur wurde mit Mac Vector™, bzw. Primer3

berechnet, sie sollte bei ca. 55°C liegen. Zudem wurden auch Temperaturgradienten-PCRs durchgeführt, um die *Annealing*-Temperatur zu optimieren.

Für eine direkte Klonierung wurden zusätzlich an den Enden der Primer Restriktionsschnittstellen hinzugefügt.

Die Synthese der Primer wurde bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) in Auftrag gegeben (verwendete Primer siehe Tabelle 2.8), der Entwurf der Primer wurde mit MacVector vorgenommen.

2.2.1.2 PCR-Bedingungen

Die Zusammensetzungen der Reaktionsansätze und die PCR-Programme sind im Folgenden aufgelistet (Tab. 2.13, 2.14). Für analytische Ansätze wurde die GoTaq-Polymerase verwendet. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurde die Phusion-Polymerase eingesetzt, da es sich hier um ein *proofreading*-Enzym handelt welches eine sehr niedrige Fehlerrate aufweist. Im Anschluss an das PCR-Programm wurde ein Restriktionsverdau mit dem Enzym DpnI vorgenommen, wenn es sich bei dem verwendeten Template um ein Plasmid handelte. DpnI restringiert methylierte Nukleinsäuren, diese werden von Bakterien hergestellt und sind daher nur im Plasmid-Template vorhanden, nicht jedoch im PCR-Produkt. So kann das Template aus dem PCR-Ansatz entfernt werden und mit dem reinen PCR-Produkt weiter gearbeitet werden. Es wurde 1µL DpnI zu dem PCR-Ansatz hinzugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die PCR-Produkte wurden anschließend über Agarosegelelektrophorese (2.2.1.4) aufgetrennt und analysiert.

Tabelle 2.13: Reaktionsansätze für die PCR

Reagenz	Volumen (µL)		Reagenz	Volumen (µL)
Phusion	0,5		Go Taq	0,5
Primer sense	1		Primer sense	2
Primer antisense	1		Primer antisense	2
dNTPs	2		dNTPs	2

Template	100 ng		Template	100 ng
Puffer	10		Puffer	10
H ₂ O	ad 50 µL		H ₂ O	ad 50 µL

Tabelle 2.14 : PCR-Bedingungen

Phusion						
	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen			
Initiale Denaturierung	98	2 min	1 x			
Denaturierung	98	30 sek	30 x			
Annealing	siehe Primer	1 min				
Elongation	72	1 min/1000 bp				
finale Elongation	72	10 min	1 x			
Abkühlen	4	∞				
Go Taq (Expressionsanalyse)				Go Taq (Integrationsanalyse)		
	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2 min	1 x	95	2 min	1 x
Denaturierung	95	1 min	29 x	95	30 sek	30 - 40 x
Annealing	50	1 min				
Elongation	60	1,5 min		64	1 min/1000 bp	
finale Elongation	60	10 min	1 x	64	10 min	1 x
Abkühlen	4	∞		4	∞	

2.2.1.3 Aufreinigung von DNA

DNA-Fragmente wurden mit dem Kit NucleoSpin® Extract II nach der Vorschrift des Herstellers aufgereinigt. Die Vorkulturen der Bakterien wurden in 5 mL LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum (siehe Tab. 2.15) über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Elution fand abweichend in 30 – 50 µL H₂O, dest. statt. Anschließend wurde die DNA-Ausbeute mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.1.4) analysiert. Zusätzlich wurde die DNA-Konzentration der Proben photometrisch gemessen (2.2.1.10).

LB-Medium

20 g / L in dH₂O

2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Größenauftrennung, Identifizierung und Isolierung von DNA-Fragmenten. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit eines DNA-Fragments indirekt proportional zum Logarithmus seines Molgewichts.

Abhängig von den zu analysierenden Fragmentgrößen wurde ein 1%iges bis 2%iges Agarosegel mit TAE-Puffer und 0,1 % Ethidiumbromid hergestellt und 5 µL eines entsprechenden Größenstandards mit auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker wurde der HyperLadder I (200 bis 10.000 bp) bzw. der HyperLadder IV (100 bis 1000 bp) verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden mit dem als Ladepuffer verwendeten 5x GoTaq-Reaktionspuffer versetzt. Der Reaktionspuffer enthält einen blauen (5000 bp) und einen gelben Farbstoff (50 bp), so dass die Auftrennung der Proben visuell zu beobachten war. Die so vorbereiteten Proben wurden in die Taschen des Gels pipettiert, in Abhängigkeit von der Größe des Gels wurde eine Spannung von 80 bis 120 V für ca. eine Stunde angelegt.

Das in der DNA interkalierende Ethidiumbromid wurde mittels UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera dokumentiert.

20x TAE-Puffer

40 mM Tris

5 mM Natriumacetat

2 mM Tris EDTA

→ pH 7.9

2.2.1.5 Klonierungsstrategie

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Plasmidkonstrukte pL0017-PbICP-N^{IKD}-GFP und pL0017-IsDPAP3* kloniert. Die Klonierungen der Plasmide pL0017-PbICP-C^{KS*}, pL0017-PbICP-C^{KS}-GFP, pMal-PbICP-C^{KS} und pMal-PbICP-N^{IKD} wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt (Heitmann, 2008). Schemata der Plasmide sind in Abbildung 2-1 dargestellt.

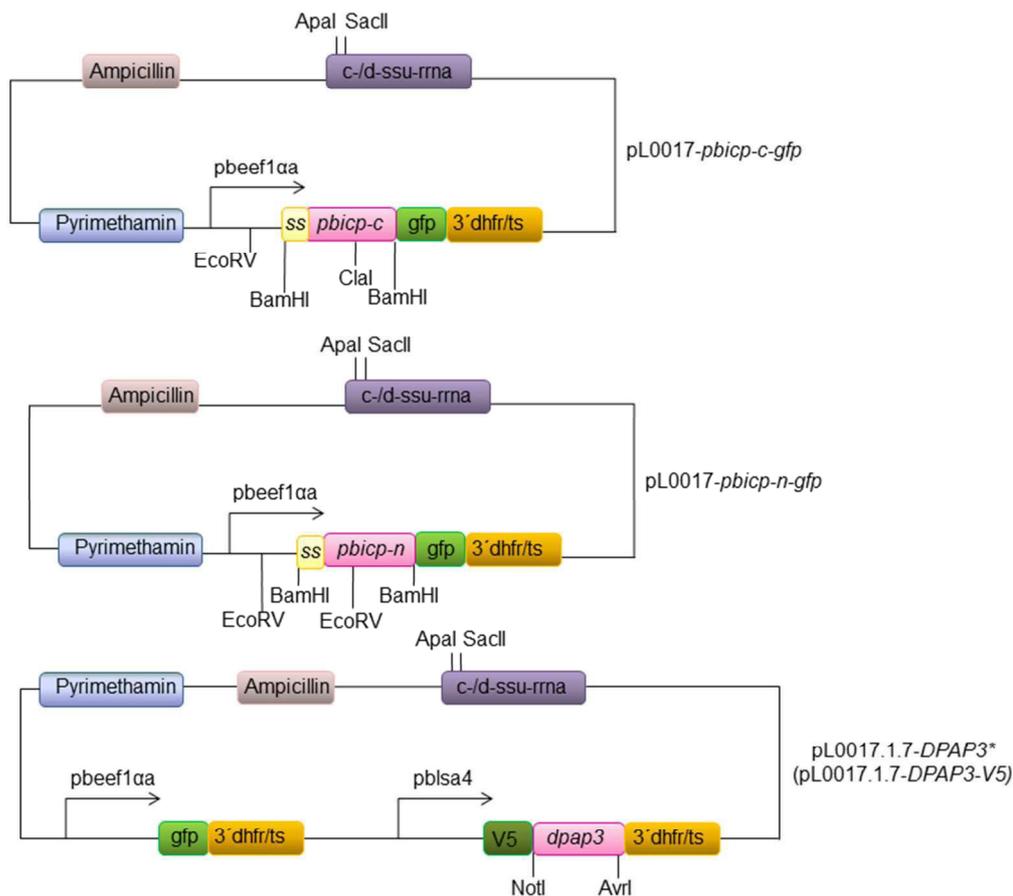


Abbildung 2-1: Schemata der klonierten Plasmidkonstrukte Ampicillin-Resistenz (helllila), Pyrimethaminresistenz (hellblau), gfp = **green fluorescent protein** (grün), V5 = V5-Epitop (Southern et al; 1991) (dunkelgrün), c-/d-ssu-rna (lila) Integrationskassette für Plasmodiumgenom, Promotoren (Pfeil): konstitutiver pbeef1αa und leberphasen spezifischer pblsa4; überexprimierte Gene (rosa), 3'dhfrts (dunkelgelb) = **Dihydrofolat-Reduktase-Thymidylat-Synthetase**. Schnittstellen für Integration des Inserts, die Orientierungsüberprüfung und die Integration des Vektors in das Plasmodiumgenom sind eingezeichnet. Für die Herstellung der Plasmidkonstrukte wurden zunächst die nötigen Inserts durch eine PCR hergestellt und dann, wie im folgenden Abschnitt beschrieben in die jeweiligen Plasmide kloniert.

2.2.1.6 Ligation

Hierbei wird ein lineares DNA-Fragment (Insert) mit einem linearisierten Vektor inkubiert und mittels der T4-DNA-Ligase die Bildung einer Verbindung katalysiert. Zuvor müssen sowohl Insert als auch Vektor passende Enden aufweisen, damit eine Ligation möglich ist. Dies kann bei einigen Vektoren (bspw. pGem-T-easy) durch A-Tailing (2.2.1.7) erreicht werden. Im anderen Fall werden durch die Amplifizierung des PCR-Produktes mittels Primer, die an ihren Enden eine Schnittstelle aufweisen, an 3'- und 5'-Ende des Inserts spezifische Schnittstellen angefügt, über die auch der Vektor verfügt und Insert und Vektor werden zur Vorbereitung auf die Ligation mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten (Auflistung der verwendeten Restriktionsenzyme in Tab. 2.1.5), damit die Enden der jeweiligen DNA-Stränge kompatibel sind. Die so präparierten Inserts und Vektoren wurden im Verhältnis 1:3 eingesetzt, dies garantierte die höchste Erfolgsquote bei der Ligation. Es wurden immer ca. 100 ng Vektor eingesetzt, woraus sich die einzusetzende Menge des Inserts nach folgender Formel berechnen lässt:

$$\frac{100 \text{ ng Vektor} \times x \text{ kb Insert}}{x \text{ kb Vektor}} = \text{Insertmenge (ng)}$$

Das Volumen eines Ligationsansatzes betrug 10 µL, woraus sich folgender Ansatz ergab:

x µL Vektor (100 ng)

x µL Insert

1 µL T4-DNA-Ligase (400 Units)

1 µL T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)

ad 10 µL H₂O, dest

Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur für 1-2 Stunden oder bei 4°C über Nacht. Im Anschluss erfolgte eine Transformation in kompetente *E. coli* Bakterien (2.2.1.8).

2.2.1.7 A-Tailing

Für die Klonierung der Inserts in den Vektor pGem-T-easy mussten die Inserts keine spezifische Schnittstelle an den Enden aufweisen, sondern einen Anhang aus mehreren ATP-Resten. Um PCR-Produkten einen Anhang aus mehreren ATP-Resten an die Enden zu setzen, wurde folgender Ansatz zusammen pipettiert und für 30 Minuten bei 70°C inkubiert.

2 µL Green Go Taq reaction buffer (5x)

2 µL dATP's (10 mM)

1 µL Go Taq-Polymerase

5 µL PCR-Produkt

2.2.1.8 Hitzeschock-Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Bei der Transformation wird genetische Information (Plasmid-DNA) in Bakterien übertragen. Es wurden 50 µL kompetenter Zellen mit 5 µL eines Ligationsansatzes oder 1 µL eines schon bekannten Vektors mit integriertem Insert versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann fand ein 45 sekundiger Hitzeschock statt, erneut wurde die Probe für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 500 µL SOC-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37°C im Thermocycler geschüttelt. Um die Bakteriensuspension aufzukonzentrieren wurde die Suspension kurz zentrifugiert, 400 µL Medium-Überstand abgenommen und das Pellet im restlichen Medium resuspendiert. Abhängig von der Größe des Pellets, wurden 40-100 µL auf LB-Selektionsplatten ausplattiert. Die Selektion fand über die Antibiotika Ampicillin, Chloramphenicol und Kanamycin statt, je nach Bakterien und Vektoren konnte hier variiert werden (Tab. 2.15). Die Inkubation der LB-Selektionsplatten fand bei 37 °C über Nacht im Brutschrank statt. Am Folgetag wurden die gewachsenen Kolonien mit einer Pipettenspitze punktiert und in 3 – 5 mL LB-Medium, wiederum versetzt mit den jeweiligen Antibiotika; überführt. Diese Bakterienkulturen wurden über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C hochgezüchtet.

Tabelle 2.15: Auflistung der Vektoren und Bakterien und ihre Resistenzen

Vektor / Bakterium	Resistenzen
<i>E. coli</i> BI21-paplac	Kanamycin
<i>E. coli</i> BI21-rig	Chloramphenicol
PGem-T-easy	Ampicillin
pJC25	Ampicillin
pL0017	Ampicillin
pMal	Ampicillin
pQE	Kanamycin
QIAexpress <i>E. coli</i> M15	Ampicillin
XI1 blue	-
Antibiotika Ansätze	
Ampicillin - Stocklösung (x 1000)	100 mg/mL in dH ₂ O
Chloramphenicol-Stocklösung (x 1000)	34 mg/mL in EtOH
Kanamycin-Stocklösung (x 1000)	50 mg/mL in dH ₂ O

LB-Agarplatten

35 g LB Agar ad 1 L H₂O (20 Platten)

2.2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Die verschiedenen Methoden für die Isolierung von Plasmid-DNA sind in den Abschnitten 2.2.1.9.1 – 2.2.1.9.3 aufgeführt. Die Analyse der Plasmid-DNA erfolgte durch Restriktionsverdau (siehe 2.2.1.11) und Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.4). Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.1.9.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Minipräparation)

Zunächst wurden Flüssigkulturen mit 5 mL LB-Medium angefertigt und mit Antibiotikum versetzt, über Nacht wurden diese bei 37°C geschüttelt. Am Folgetag wurden die Flüssigkulturen für 30 Sekunden bei 11 000 x g zentrifugiert und das Bakterienpellet in 100 µL Lösung 1 resuspendiert. Die Zellyse wurde durch die Zugabe von Lösung 2 und einer dreiminütigen Inkubation vollzogen. Die Fällung der genomischen DNA fand anschließend durch die Zugabe von 150 µL Lösung 3 und fünfminütiger Inkubation auf Eis statt. Durch zehninütige Zentrifugation (11 000 x g,

4°C) konnte die DNA im Überstand von den restlichen Bestandteilen die sich im Pellet befanden, beispielsweise Zelltrümmer und Proteine, getrennt werden. Die Fällung der Plasmid-DNA wurde mit 96%igen Ethanol und fünfminütiger Inkubation durchgeführt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA gewaschen, dies wurde durch Zentrifugation (16 000 x g, 10 min.) und anschließender Resuspendierung in 70%igen Ethanol erreicht. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde die Plasmid-DNA kurz getrocknet und in 25 µL TE-RNase-Puffer gelöst, hierfür wurde die Lösung für 30 min. bei 37°C inkubiert. Die Überprüfung der Plasmid-DNA erfolgte durch die Restriktionsanalyse (2.2.1.11) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1.4).

Lösung 1

50 mM Glukose
25 mM Tris-HCl, pH 8.0
10 mM EDTA

Lösung 3

3 M Kaliumacetat
2 M Essigsäure

Lösung 2

200 mM NaOH
1 % SDS

2.2.1.9.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit Kit

Wenn in 2.2.1.9.1 positive Klone identifiziert werden konnten wurden diese mit dem Plasmidpräparations Kit Nucleo Spin[®] Plasmid nach Protokoll für Sequenzierungen vorbereitet. Die Elution erfolgte in 50 µL Aqua dest. . Die Konzentration der eluierten DNA wurde fotometrisch bestimmt. (2.2.1.10).

2.2.1.9.3 Isolierung von größeren Mengen Plasmid-DNA (Midipräparation)

Nach erfolgreicher Sequenzierung eines Klons erfolgte die Gewinnung einer größeren Plasmid-DNA Menge mit dem Kit NucleoBond[®] PC 100. Hierzu wurde eine 100 ml Flüssigkultur (LB-Medium, mit entsprechendem Antibiotikum versetzt) angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Am Ende der Präparation wurde das Plasmid-DNA-Pellet in 50 µL aqua dest. gelöst.

2.2.1.10 Photometrische Bestimmung der DNA- / RNA-Konzentration

Um die Konzentration der DNA- und RNA-Lösungen zu ermitteln wurde die optische Dichte mittels eines NanoDrop™ Spektralphotometers bestimmt. Hierbei wurde 1 µl der Lösung eingesetzt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen. Liegt bei 260 nm eine optische Dichte von 1,0 vor, so entspricht dies einer Konzentration von ca. 50 µg dsDNA/mL Probe oder 40 µg RNA/mL.

$$\frac{OD\ 280}{OD\ 260} = \text{Quotient für Reinheitsgrad}$$

Der Reinheitsgrad für die DNA-, bzw. RNA-Probe kann mit dem oben aufgeführten Quotienten beschrieben werden, liegt der Quotient bei 1,8 (DNA) bzw. 2,0 (RNA) so handelt es sich um eine reine DNA-Lösung.

2.2.1.11 Restriktionsanalyse

Bei der Restriktionsanalyse wird die Eigenschaft der Restriktionsendonukleasen ausgenutzt, dass diese spezifische doppelsträngige DNA Sequenzen erkennen und spalten. Die Erkennungssequenzen sind für jedes Restriktionsenzym spezifisch und umfassen in der Regel 4-6 Basenpaare (Tab. 2.6); meist handelt es sich dabei um eine palindromische Sequenz. Die Spaltung der DNA erfolgt über eine Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen, wobei die Enden der so entstehenden DNA-Stränge glatt (blunt ends) oder überhängend (sticky ends) sein können. So können Plasmide linearisiert werden und Inserts aus Plasmiden herausgeschnitten werden, was auf einem Agarosegel elektrophoretisch überprüft werden kann (siehe 2.2.1.4).

Zur Überprüfung des Klonierungserfolges wurde ca. 1 µg der isolierten Plasmid-DNA mit 0,5 µL des entsprechenden Restriktionsenzymes (Tab. 2.16) in einem 20 µL Ansatz verdaut. Der Verdau fand für eine Stunde statt, die Temperatur betrug in der Regel 37°C, einige Enzyme bevorzugen jedoch auch niedrige Temperaturen (bspw. Apal 25°C). Um das Ergebnis zu verbessern, wurde die Enzymzugabe teilweise in zwei Schritten durchgeführt, in diesem Fall fand die Enzymzugabe nach 0 Minuten und nach 60 Minuten statt und der Verdau wurde für zwei Stunden inkubiert.

Tabelle 2.16: Auflistung der für den Verdau der Plasmidkonstrukte verwendeten Restriktionsenzyme

Plasmidkonstrukt	Restriktionsenzyme
pL0017-PbICP-C*	BamHI; zur Bestimmung der Orientierung des Inserts wurden EcoRV / ClaI eingesetzt
pL0017-PbICP-C	BamHI; zur Bestimmung der Orientierung des Inserts wurden EcoRV / ClaI eingesetzt
pMal-PbICP-C	EcoRI / HindIII
pMal-PbICP-N	EcoRI / HindIII
pL0017-PbICP-N	BamHI; zur Bestimmung der Orientierung des Inserts wurde EcoRV eingesetzt
pL0017-PbDPAP3-V5	NotI / AvrI
pL0017-PbDPAP3*	NotI / AvrI

2.2.1.12 Sequenzierung von DNA

Die Proben wurden zur Sequenzierung bei der Firma SeqLab (Göttingen) in Auftrag gegeben.

2.2.2 Proteinchemische molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von MBP- und His-Fusionsproteinen

2.2.2.1.1 Proteinexpression

Die Expression von aktivem Falcipain-2 wird in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben und wurde in der AG Hansen an der Universität Lübeck durchgeführt, alle anderen Proteine wurde nach dem folgendem Protokoll exprimiert. Eine Übersicht der verwendeten Plasmidkonstrukte und der eingesetzten Expressionsbakterien ist in Tabelle 2.17 dargestellt.

Zur Herstellung der rekombinanten Proteine erfolgte zunächst eine Transformation (2.2.1.8) des jeweiligen Plasmidkonstruktes in die jeweiligen kompetenten *E.coli*-Expressionsbakterien (Tab. 2.18). Am Folgetag wurde eine Flüssigkultur mit 50 mL LB-Medium, versetzt mit den jeweilig einzusetzenden Antibiotika (Tab. 2.15), durch eine Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Über-Nacht-Kultur wurde dann zum Animpfen einer 2 L-Kultur (versetzt mit Antibiotikum) verwendet, die bis zu einer optischen Dichte von 0,7 - 0,9 nm kultiviert wurde und dann durch Zugabe von 1 mM IPTG (ein Allolactose-Analoga) induziert wurde die

Proteinsynthese zu starten. Nach zwei Stunden Expression wurden die Bakterien bei 4000 x g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert und die Pellets anschließend in 40 mL Lysepuffer (siehe 2.2.2.1.3) aufgenommen und bei -20°C gelagert. Um unkontrollierte Proteaseaktivität zu verhindern wurden dem Lysepuffer Protease-Inhibitor-Tabletten hinzugefügt (1 Tablette / 10 mL Lysepuffer). Zur Kontrolle einer erfolgreichen Induktion wurde vor und nach der Induktion ein Aliquot entnommen, welches für die SDS-PAGE-Analyse verwendet wurde, die im weiteren Versuchsverlauf folgt (2.2.2.1.4). Die Menge des Aliquots wurde anhand der optischen Dichte nach folgender Formel bestimmt:

$$100 \mu\text{L} / \text{OD} \times 4 = x \mu\text{L Aliquot}$$

Das Aliquot wurde für 10 min bei 10000 x g und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 40 µL 1 x Lämmli (siehe 2.2.2.1.4) resuspendiert.

Tabelle 2.17: Auflistung der verwendeten Plasmidkonstrukte, der jeweiligen Expressionsbakterien und der Verwendung der Proteine

Plasmid	<i>E.coli</i> Stamm	Verwendung	Zur Verfügung gestellt von...
pMal	BL21-rig	Kinetikanalyse	New England BioLabs® GmbH
pMal-PbICP	BL21-rig	Kinetikanalyse	Annika Rennenberg, Bernhard-Nocht-Institut Hamburg
pMal-PbICP-C	BL21-rig	Kinetikanalyse	Klonierung selbst durchgeführt
pMal-PbICP-N	BL21-rig	Kinetikanalyse	Klonierung selbst durchgeführt
pMal-PfICP	BL21-rig	Kinetikanalyse	Ulrike Ruch, Bernhard-Nocht-Institut Hamburg
pMal-PfICP-C	BL21-rig	Kinetikanalyse	Ulrike Ruch, Bernhard-Nocht-Institut Hamburg
pMal-PfICP-N	BL21-rig	Kinetikanalyse	Ulrike Ruch, Bernhard-Nocht-Institut Hamburg
pMal-TcChagasin	BL21-paplac	Kinetikanalyse	Christine Lehmann, Bernhard-Nocht-Institut Hamburg
pMal-90b-10-1 (MSP1)	BL21-rig	Antikörperherstellung	Rebecca Stanway, Universität Bern

pJC45-PbICP-C	BL21-paplac	Antikörperherstellung, g, Kinetikanalyse	Annika Rennenberg, Bernhard- Nocht-Institut Hamburg
pQE-Falcipain- 2	M15	Kinetikanalyse	AG Hansen, Universität Lübeck

IPTG-Stocklösung (1000x)

1 M in dH₂O (autoklaviert)

2.2.2.1.3 Affinitätschromatographische Proteinaufreinigung

Um zunächst einmal die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen zu trennen wurden die Proben 4 x 30 Sekunden auf Eis sonifiziert (Stärke 3) um die Bakterienmembranen aufzuschließen und anschließend für 30 Minuten bei 9000 x g und 4°C zentrifugiert. Für die SDS-PAGE-Analyse wurden zwei Proben entnommen: die lösliche Fraktion wurde 1:1 in 60 µL 2x Lämmli aufgenommen, ein Teil des Pellets (unlösliche Fraktion) wurde in 60 µL 1x Lämmli gelöst.

Im weiteren Versuchsverlauf wurde nun eine Affinitätsäulen chromatographie mit der löslichen Fraktion vorgenommen. Hierfür wurde die Proteinlösung zunächst für eine Stunde bei 4°C mit 500 µL des Trägermaterials (Amylose Resin für MBP-Fusions-Proteine, Ni-NTA-Partikel für His-Fusions-Proteine) in der Säule auf einem Roller inkubiert. Nachdem eine Bindung der Proteine an das Säulenmaterial stattgefunden hatte, wurden zunächst unspezifisch gebundene Bestandteile der Proteinlösung heraus gewaschen. Dies geschah über folgende Waschschrirte: 3 x mit je 10 mL Lysepuffer, 3 x mit je 10 mL Waschpuffer 1, im Falle von His-Fusionsproteinen zusätzlich 3 x mit je 10 mL Waschpuffer 2, und erneut 3 x mit je 10 mL Lysepuffer. Die Elution der Proteine erfolgte anschließend in 500 µL-Fractionen mit Elutionspuffer. Der Elutionspuffer enthält 10 mM Maltose, bzw. 250 mM Imidazol, diese konkurrieren mit den Fusionsproteinen um die Bindungsstellen und verdrängen diese, so dass die Fusionsproteine wieder in Lösung gehen.

MBP-Lysepuffer

200 mM NaCl
20 mM Tris HCL, pH 7.4
1 mM EDTA

MBP-Waschpuffer 1

2 M NaCl
20 mM Tris, pH 7.4
1 mM EDTA

MBP-Elutionspuffer

10 mM Maltose in Lysepuffer

His-Lysepuffer

300 mM NaCl
50 mM NaH₂PO₄
10 mM Imidazol
→ pH 8.0

His-Waschpuffer 1

300 mM NaCl
50 mM NaH₂PO₄
20 mM Imidazol
→ pH 8.0

His-Waschpuffer 2 (stringend)

2 M NaCl
50 mM NaH₂PO₄
50 mM Imidazol
→ pH 8.0

His-Elutionspuffer

300 mM NaCl
250 mM Imidazol
50 mM NaH₂PO₄
→ pH 8.0

2.2.2.1.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden zur Analyse nach ihrer molekularen Masse elektrophoretisch aufgetrennt, dies geschah nach Lämmli im diskontinuierlichen System unter denaturierenden Bedingungen als SDS-Protein-Komplex (Laemmli, 1970). Für die rekombinanten Proteine wurden 12%ige Acrylamid-Trenngele verwendet, für die Parasitenextrakte 14%ige (siehe 2.2.4.1.4). Ein Pipettierschema für die Gele ist in Tabelle 2.18 dargestellt. Die Proben wurden mit Lämmli-Puffer versetzt, je nach Konzentration der Proben im Verhältnis 1:1 oder in höheren Verdünnungen. Vor dem Gelauftrag wurden die Proben für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Die Parasitenextrakte wurden zur Denaturierung zusätzlich 3 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Die Elektrophorese fand bei 25 mA pro Gel im Laufpuffer statt. Pro Tasche wurden 10-20 µl der Proben aufgetragen. Als Größenmarker für einfache SDS-Acrylamidgele wurde der unstained PageRuler™

Protein Ladder (10-200kDa) verwendet, für SDS-Acrylamidgele die in Western-Blot-Analysen weiter verwendet wurden, wurde der prestained PageRuler™ Protein Ladder (10-170kDa) verwendet.

Lämmli-Probenpuffer (2x)

125 mM Tris HCl
 20 mM DTT
 20 % Glycerol
 2 % SDS
 0,001% Bromphenolblau-Natriumsalz
 → pH 6.8

Laufpuffer (10x)

500 mM Glycin
 250 mM Tris
 1 % SDS

Trenngelpuffer (4x)

1,5 M Tris HCl
 0,4 % SDS
 → pH 8.8

Sammelgelpuffer (4x)

500 mM Tris HCl
 0,4 % SDS
 → pH 6.8

APS-Stocklösung

25 % APS (Ammoniumpersulfat)

Tabelle 2.18: Pipettieransätze für die in der SDS-PAGE verwendeten Sammel- und Trenngele

	Sammelgel	Trenngel (12 %)	Trenngel (14 %)
Gelpuffer	1,25 mL	2,5 mL	2,5 mL
30 % Acrylamid	650 µL	4,0 mL	4,66 mL
d H ₂ O	3,05 mL	3,4 mL	2,8 mL
25% APS-Stocklösung	25 µL	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL	5 µL

2.2.2.1.5 Coomassie-Färbung von SDS-Acrylamidgelen

Zur Färbung der Proteingele wurde die Methode von Weber *et al.* (1969) angewendet, hierzu wurden die SDS-Gele in Coomassie-Lösung für mindestens eine Stunde (auch über Nacht möglich) inkubiert und dabei leicht geschwenkt. Zur Entfärbung der Gele wurde Entfärbelösung genutzt, in der die Gele für ca. 1 Stunde inkubiert wurden, bis nur noch die Proteinbanden eine blaue Färbung aufwiesen.

Coomassie-Färbelösung

40 % Methanol

10 % Essigsäure

0,1 % Coomassie Brilliant blue R 250

Entfärbelösung

20 % Methanol

10 % Essigsäure

2.2.2.1.6 Dialyse der Proteinlösungen

Anhand der SDS-Gele konnte ermittelt werden, in welchen Eluaten rekombinante Proteine enthalten sind. Die Eluate in denen das meiste rekombinante Protein enthalten war, wurden vereint und in einen Dialyseschlauch gegeben. Der Dialyseschlauch hatte einen MWCO-Wert (**m**olecular **w**eight **cut-off**) von 6 bis 8 kDa und wurde mit dem Eluatenpool in 500 mL Dialysepuffer bei 4°C inkubiert. Nach 2 Stunden wurde der Puffer erneuert und die Dialyse fand, weiterhin bei 4°C, über Nacht statt.

Dialysepuffer

100 mM NaAc

→ pH 5.5

2.2.2.2 Herstellung von aktiven His-Falcipain-2

2.2.2.2.1 Expression

Für die Expression von aktivem His-Falcipain-2 wurden zunächst 8 L vorgewärmtes Medium mit 200 mL einer Vorkultur angeimpft. Die Vorkultur wurde am vorherigen Tag mit einer entsprechenden Kolonie des QIAexpress *E.coli* Stammes M15 angeimpft, die mit pQE-Falcipain-2 transformiert wurde. Die 8 L Bakterienkultur wurde bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei 37°C geschüttelt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte mit 0,5 mM IPTG und fand für 4 Stunden bei 37°C im Schüttler statt. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert (5020 x g, 25 Minuten) und bei -20°C gelagert.

2 x YT Medium

16 g / L Bacto-Trypton

10 g / L Bacto-Hefeextrakt

5 g / L NaCl

100 µg / mL Ampicillin

50 µg / mL Kanamycin

→ pH 7.2

2.2.2.2.2 Zellyse

Das Pellet wurde in 120 mL Lysepuffer resuspendiert, für die SDS-PAGE wurde Fraktion 1 genommen (ein sehr kleines Stück des Pellets in Lämmli-puffer aufgenommen). Anschließend wurde die Bakteriensuspension 6 Minuten sonifiziert (30 Sekunden „pulse“, 15 Sekunden „break“, Stufe 6), wobei das Reaktionsgefäß mittels Eiswasser gekühlt wurde. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 30 Minuten bei 27 000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet enthielt neben Zelltrümmern auch die sogenannten Einschlusskörperchen (engl. Inclusion bodies), die das Falcipain-2 enthielten. Einschlusskörperchen können durch die Überexpression von Proteinen in Bakterien entstehen und bis zu 50% des Zellvolumens ausmachen. Sie enthalten teilweise unvollständig gefaltete Proteine.

Lysepuffer

100 mM Tris

10 mM EDTA

→ pH 7.4

2.2.2.2.3 Waschen der Einschlusskörperchen

Im Anschluss an die nach der Zellyse durchgeführte Zentrifugation wurde für den ersten Waschschrift zunächst der Überstand abgenommen. Das Pellet wies 2 Schichten auf: eine obere zähflüssige Schicht und eine feste untere Schicht. Die obere Schicht wurde entfernt und das Pellet der unteren Schicht in 80 mL Puffer A resuspendiert. Die Homogenisierung der Suspension wurde nach dem Potter-Elvehjem Verfahren (Simpson, 2010) durchgeführt. Hierbei werden die Zellen durch die mittels Potter erzeugten Scherkräfte zerstört, die Zellorganellen, also auch die Einschlusskörperchen, werden jedoch erhalten. Anschließend wurde die

Zellsuspension erneut sonifiziert (30 Sekunden „pulse“, 15 Sekunden „break“, Stufe 6) und es wurde Fraktion 2 für die anschließende SDS-PAGE genommen. Die Zellsuspension wurde bei 27 000 x g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und für einen zweiten Waschschrift in 80 mL Puffer A resuspendiert. Waschschrift zwei wurde wie der eben beschriebene Waschschrift 1 durchgeführt, es wurde Fraktion 3 genommen. Auch Waschschrift 3 und 4 wurden nach dem eben beschrieben Protokoll durchgeführt, allerdings wurden jeweils 60 mL Puffer B für die Resuspendierung verwendet. Im fünften Waschschrift wurde das Pellet in 40 mL Puffer C aufgenommen und für 1 Minute sonifiziert (30 Sekunden „pulse“, 15 Sekunden „break“, Stufe 6). Um die verbleibenden Stücke zu lösen wurde die Suspension für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Zellsuspension wurde bei 27 000 x g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert, Fraktion 5 aus dem Überstand genommen und der Überstand bei 4°C gelagert. Um jegliche verbliebenen Stücke zu entfernen wurde die Suspension gefiltert, die Porendichte des Filters betrug 0,2 µm. Die Konzentration der Proteinlösung sollte nach diesem Schritt mindestens 10 mg/mL betragen.

Puffer A

2 M Urea
20 mM Tris
2,5 % Triton-X-100
→ pH 8.0

Puffer C

6 M Guanidine-HCl
500 mM NaCl
20 mM Tris
10 mM Imidazol
→ pH 8.0

Puffer B

20 mM Tris
20 % Sucrose
→ pH 8.0

2.2.2.2.4 Aufreinigung

Die Aufreinigung von His-Falcpain-2 wurde mit dem Äktasystem, in dem drei hintereinander geschaltete His-Affinitätssäulen (je 5 ml Volumen) angeschlossen waren, durchgeführt. Die Bedienung des Äktasystems wurde mit dem Programm Unicorn durchgeführt. Die Äquilibriumierung der Säulen wurden mit dem sechsfachen

Volumen der 3 Säulen durchgeführt, anschließend wurde die Proteinlösung auf die Säule geladen. Die peristaltische Gradientenpumpe wurde auf eine Durchlaufgeschwindigkeit von 2 mL / min eingestellt und nach ca. 35 mL Durchfluss wurden die Säulen mit 10 mL Puffer C gewaschen. Das Programm wurde nun auf FPLC (fast protein liquid chromatography) umgeschaltet und ein weiterer Waschschrift mit 90 mL Puffer D wurde durchgeführt. Der letzte Waschschrift wurde mit 45 mL 3%igem Puffer E (in H₂O) durchgeführt. Im Anschluss konnte der Gradient (bis zu 100%igem Puffer E) gestartet werden und die Fraktionen wurden aufgefangen. Die Durchlaufgeschwindigkeit wurde hierzu auf 1 mL / min eingestellt, das Volumen der Fraktionen betrug 2 mL. Um die Proteinenthaltenden Fraktionen zu identifizieren wurden je 10 µl der Fraktionen mit Lämmli-puffer versetzt, für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und über SDS-PAGE (2.2.2.1.4) analysiert. Nach dem Poolen der His-Falcpain-2 enthaltenen Fraktionen betrug die Konzentration der Proteinlösung 3,05 mg / mL, das Volumen 34 mL.

Puffer D

8 M Urea
20 mM Tris
→ pH 8.0

Puffer E

8 M Urea
1 M Imidazol
20 mM Tris
→ pH 8.0

2.2.2.2.5 Rückfaltung

Um aktives Falcpain-2 zu erhalten musste eine Rückfaltung des Proteins vorgenommen werden. Hierzu wurde die Proteinlösung 10 mM mit DTT versetzt und für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Die Proteinlösung wurde mit Puffer F stark verdünnt, hierzu wurde die Proteinlösung tröpfchenweise dem vorgekühlte Puffer (4°C) zugefügt und für sechzehn Stunden bei 4°C gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert mittels 3 M NaOH auf 6.0 herabgesenkt. Durch eine Filtration (0,45 µm Porendicke) wurden präzipitierte Proteine entfernt. Die finale DTT Konzentration des Durchflusses wurde auf 2,5 mM erhöht und die Proteinlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Rückfaltung sollte nach diesem Schritt abgeschlossen sein, mittels SDS-PAGE konnte diese überprüft werden (Abb. 2-2). Für die Rückfaltung des Enzyms findet eine Autoprozessierung statt, hierbei wird ein 5 kDa Stück entfernt. Ein Aufkonzentrieren der Proteinlösung wurde mittels Amicon

Ultrafiltration (10 kDa *cut off*) erreicht, hierbei wurde die Proteinlösung innerhalb von 48 Stunden von 2,5 L auf 30 mL konzentriert. Die anschließende Dialyse wurde in 5 L Puffer G über Nacht bei 4°C durchgeführt. Eine erneute Aufkonzentrierung der Proteinlösung mittels der Amicon Ultrafiltration führte zu einem Endvolumen des Proteins von 3 mL mit einer Konzentration von 1,64 mg / mL. Die Aktivität des Enzyms wurde über die *active site* Titration ermittelt (2.2.3.2).

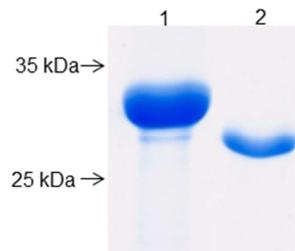


Abbildung 2-2: Vergleich Falcipain-2 vor und nach Rückfaltung, Falcipain-2 wurde auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Um die durch Autoprozessierung stattfindende Rückfaltung zu überprüfen. Spur 1: Falcipain-2 vor Rückfaltung (32 kDa), Spur 2: Falcipain-2 nach Rückfaltung (27 kDa)

Puffer F

400 mM L-Arginin
100 mM Tris
1 mM EDTA
1 mM GSH
1 mM GSSG
30 % Glycerol
→ pH 9.4

Puffer G

100 mM NaCl
20 mM Tris
→ pH 7.5

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen

Die Proteinkonzentrationen wurden entweder mit dem Nanodrop™ Spektralphotometer gemessen oder mit dem BCA-Protein-Assay Kit. Die Messung mit dem Spektralphotometer ist nur für eine homogene Proteinlösung möglich und findet bei A280 nm statt, es wurden 2 µL der Proteinlösung in die Messeinheit pipettiert. Bei dieser Methode werden sowohl das Molekulargewicht des zu messenden Proteins, also auch dessen Extinktionskoeffizient berücksichtigt. Beide Werte wurden unter Eingabe der Aminosäuresequenz des zu messenden Proteins

mittels der ExPASy Datenbank (ProtParamtool) ermittelt. Das BCA-Protein-Assay Kit basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der eine BSA-Eichreihe als Standard dient (2 mg / mL – 0,03 mg / mL), mit dieser Methode können auch heterogene Proteinlösungen gemessen werden. Zur Messung wurden die Proteine 1:5 und 1:10 verdünnt. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung der Proteinlösungen vorgenommen, eingesetzt wurden pro Well 10 µL die zu 200 µL BCA-Assay-Reagenziengemisch hinzupipettiert wurden. Danach erfolgte für 30 Minuten eine Inkubation bei 37°C, in der die Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen reduziert wurden und so einen Komplex mit BSA eingingen der violett ist. Diese Farbreaktion wurde anschließend in einem Elisa-Reader bei 570 nm quantifiziert und der Proteingehalt der Proben ermittelt.

2.2.2.4 Entfernen des Anhangs MBP mit Faktor Xa

Durch den Einsatz der Serinprotease Faktor Xa konnte der MBP-Anhang der MBP-Fusionsproteine entfernt werden. Die Entfernung des MBP-Anhangs war für drei Versuchsansätze notwendig: bei kinetischen Analysen, um den Einfluss des MBP-Anhangs auf die inhibitorischen Eigenschaften der rek. Proteine ausschließen zu können; für die Kristallisation von PblCP-N; sowie für die Herstellung von Antikörpern (2.2.5).

Hierzu wurde die Proteinlösung zunächst in Faktor-Xa-Puffer dialysiert, anschließend wurden je 50 µg Protein mit 1 µg Faktor Xa in einem 100 µL Ansatz über Nacht bei 21°C verdaut.

Faktor Xa-Puffer

100 mM NaCl

20 mM Tris

2 mM CaCl

—> pH 8.0

2.2.2.5 Proteinaufreinigung mit dem Prep Cell System

Für die Aufreinigung und Auftrennung von mit Faktor Xa (2.2.2.4) verdauten Proteinen die für die Antikörperherstellung verwendet werden sollten wurde das Prep Cell System genutzt. Hierzu wurden die Proteine zunächst über Nacht (4°C) in MonoQ-Puffer A dialysiert. Ein 10-14%iges zylindrisches SDS-PAGE Trenngel (Tab. 2.18) wurde gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der

Auspolymerisation nach ca. 5 Stunden konnte das Sammelgel (Tab. 2.18) über das Trenngel geschichtet werden und über Nacht bei 4°C auspolymerisieren. Um ein Austrocknen zu verhindern wurde erneut mit Isopropanol überschichtet. Am Folgetag wurde die Aussenkammer der Aparatur mit Elutionspuffer befüllt, die mit dem SDS-PAGE-Gel beladene Innenkammer wurde mit Laufpuffer aufgefüllt. Die zu trennende Proteinlösung wurde in Lämmli-Probenpuffer (2.2.2.1.4) aufgenommen und in die Säule injiziert, ein Aufkochen der Probe ist hierbei nicht erforderlich. Die Proteinlösung lief für ca. 2 Stunden bei 40 mA im Sammelgel, anschließend für ca. 4 Stunden bei 60 mA im Trenngel. Nachdem die blaue Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte begann die Fraktionierung der Proben. Mittels einer Pumpe sowie eines Fraktionssammlers wurden ca. 70 Fraktionen genommen, je nach Bedarf zwischen 0,5 - 1 mL Volumen. Die Protein enthaltenden Fraktionen konnten im weiteren Versuchsverlauf über SDS-PAGE (2.2.2.1.4) ermittelt werden. Da in den meisten Fällen die Proteinkonzentration der Fraktionen gering ist, wurde eine Einengung der Proteinlösung mit Polyethylenglykol (PEG) 6000 durchgeführt. Hierzu wurde die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch (MWCO-Wert 6 – 8 kDa) gegeben und dieser mit PEG 6000 Partikel umschichtet, der Dialyseschlauch wurde solange mit PEG inkubiert bis die zu erwartende Proteinkonzentration mindestens 500 µg / mL betrug.

2.2.2.6 Western-Blot-Analyse

Zur Vorbereitung der Western-Blot-Analyse wurden die Proteinproben auf einem 14%igen Acrylamidgel mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.2.1.4), hierbei wurde der Größenstandard PageRuler™ prestained ProteinLadder eingesetzt. Mit der *Western Blotting*-Methode wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Hierbei wurden Membran und Whatman-Filterpapiere zuvor in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 400 mA in Transferpuffer. Im Anschluss wurden die freien Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran durch einstündige Inkubation der Membran in 5%igem Milchpulver (in TBS) blockiert. Darauf folgten 3 Waschrinne mit TBS-T. Der 1. Antikörper wurde in 2,5 %igem Milchpulver (in TBS-T) verdünnt und auf die Membran gegeben, die Inkubation fand über Nacht bei 4°C statt. Danach wurden wieder drei Waschrinne TBS-T vorgenommen. Der Zweitantikörper, der mit der Merretichperoxidase (HRP) markiert ist, wurde in 2,5 %igem Milchpulver verdünnt. Die Inkubation fand für eine Stunde bei

Raumtemperatur statt. Anschließend wurden wieder drei Waschschritte mit TBS-T und ein zusätzlicher Waschschritt mit H₂O, dest vorgenommen. Die Antikörperkomplexe konnten mittels ECL-Reagenzien (Tab. 2.1.4) auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Die Entwicklung des Röntgenfilmes fand in einem Entwicklergerät statt.

Bei Bedarf wurde die Membran nach dem ersten Durchlauf des Western Blot Verfahrens mit 5 mL Stripp-Puffer behandelt, dieser löst alle Bindungen und so kann ein erneuter Blot mit anderen Antikörpern durchgeführt werden. Der Stripp-Puffer wurde für 15 Minuten mit der Membran auf einem Laborroller inkubiert und die Membran danach 4 x mit TBS-T gewaschen. Anschließend konnte die Antikörperfärbung erneut durchgeführt werden, angefangen beim Blocken der Membran.

Transferpuffer

192 mM Glycin

25 mM Tris

1,3 mM SDS

20 % Methanol

pH 8.3

TBS (10x)

1,5 M NaCl

100 mM Tris HCl

pH 7.4

TBS-T

0,05 % Tween in TBS

2.2.3 Kinetikanalysen

2.2.3.1 Inhibitionsassay

Die kinetischen Analysen wurden am Fluorimeter mit dem Programm Tecan i-control durchgeführt. Die Analyse wurde in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Flachboden, schwarze Seitenbeschichtung) durchgeführt, das Endvolumen in den Vertiefungen betrug 150 µL. Die verwendeten Proteasen und Substrate, sowie die spezifischen Messeinstellungen können Tab.2.19 entnommen werden. Die MBP-Fusionsproteine wurden für die einfache Aktivitätsmessung 1 µM eingesetzt. Die rek. Proteine, bzw. die niedermolekularen Inhibitoren wurden mit dem Enzym in dem jeweiligen Kinetikpuffer (Tab. 2.19) zusammengeführt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Messung wurde direkt nach dem hinzufügen des Substrates gemessen. Alle Messeinstellungen konnten mit dem Programm Tecan-i-control erstellt werden. Es wurden 100 Messwerte alle 10 Sekunden durchgeführt. Zwischen

den Messungen wurden die Proben für 2 Sekunden geschüttelt. Die Signalverstärkung, der sogenannte *Gain*, wurde für alle Messungen auf 42 festgelegt. Zusätzlich zu den Messansätzen mit den MBP-Fusionsproteinen wurden noch zwei weitere Ansätze untersucht: eine Messung nur mit Substrat und Puffer (Leerwert), die die Fluoreszenz ohne Umsetzung des Substrates ermittelte und eine Messung nur mit Substrat, Puffer und Protease in der die Substratumsetzung ungehindert stattfinden konnte. Um ausschließen zu können, dass MBP die Umsetzung des Substrates, bzw die Aktivität der Protease beeinflusst, wurde auch MBP alleine in die Messung mit aufgenommen. Die Messdaten wurden automatisch durch das Programm Tecan-i-control in eine Exceltabelle überführt. Der Leerwert wurde nach jeder Messung von den anderen Werten abgezogen, um die Eigenfluoreszenz des Substrates bei der weiteren Auswertung ausschließen zu können. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt.

Für eine anschauliche Darstellung der Ergebnisse wurden zunächst in einer Beispielgraphik einer Messung die Fluoreszenzwerte gegen die Zeit dargestellt. Die Erstellung der Graphiken wurde mit Excel durchgeführt. Für die Aktivitätsbestimmung wurde ein linearer Abschnitt aus der Aktivitätskurve ermittelt und die Steigung der Geraden bestimmt.

$$\frac{\Delta \text{Emissionsänderung}}{\Delta \text{Zeit (sek)}} = \text{Steigung, entspricht Proteaseaktivität (\%)}$$

Die Aktivität der Enzyme in Anwesenheit des Proteins MBP wurde gleich hundert Prozent gesetzt. Die Werte von allen drei Messungen wurden zur Berechnung der Aktivität zusammengefasst und in einem Säulendiagramm mit dem Programm Prism dargestellt.

Tabelle 2.19: Kinetikbedingungen. Auflistung der für die Kinetik verwendeten Enzyme, Puffer und Substrate; sowie deren Konzentrationen, und den Messeinstellungen des Programmes Tecan-i-control

Enzym	Puffer	Substrat	Temperatur °C	Anregungswellenlänge / Emissionwellenlänge (nm)
10 nM Calpain-1	3	2,5 nM H-K(FAM)-EVY- GMMK(DABYL)-OH	25	485 / 535
5 nM Caspase-3	4	25 µM Z-DEVD-AMC	30	340 / 430
5 nM Caspase-8	4	25 µM ZIETD-AFC	30	360 / 485
4 nM Cathepsin B	2	30,8 µM Z-Arg-Arg- AMC	30	340 / 430
64 nM Cathepsin L	1	30,8 µM Z-Phe-Arg- AMC	30	340 / 430
140 nM Falcipain-2	1	30.8 Z-Phe-Arg-AMC	30	340 / 430
33 nM Papain	1	30,8 µM Z-Phe-Arg- AMC	30	340 / 430

Kinetikpuffer 1

100 mM NaAc
10 mM DTT
→ pH 5.5

Kinetikpuffer 2

100 mM KH₂PO₄
10 mM DTT
2 mM EDTA
→ pH 6.0

Kinetikpuffer 3

250 mM NaCl
50 mM Hepes
20 mM CaCl₂
5 mM EDTA
1 mM DTT
→ pH 7.0

Kinetikpuffer 4

100 mM NaCl
100 mM EDTA
50 mM Hepes
10 mM DTT
10 % Glycerol
0.1 % CHAPS
→ pH 7.4

2.2.3.2 Aktivitätsbestimmung von Falcipain-2

Zur Bestimmung der Aktivität von Falcipain-2 wurde eine *active site*-Titration mit E-64 durchgeführt (Abrahamson, 1994). Hierzu war es erforderlich die Steigung der Fluoreszenz in realen Werten angeben zu können. Zunächst wurde daher die Umsetzung der Substratmenge auf die Zunahme der Fluoreszenz umgerechnet. Bei einer Umsetzung von 6 nmol Substrat erhöhte sich die gemessene Fluoreszenz um 40000, so konnte definiert werden dass die Zunahme von 100 Fluoreszenz 15 pmol/sek entsprach.

Die Konzentration des Substrates Z-Phe-Arg-AMC wurde für die *active-site-titration* zwischen 40 μM – 500 nM variiert, E-64 wurde zwischen 1-1000 nM eingesetzt. Die Auftragung der Werte wird in Abbildung 2-3 beispielhaft dargestellt, der Wert für die Konzentration aktiven Falcipain-2s konnte bei $Y = 0$ abgelesen werden.

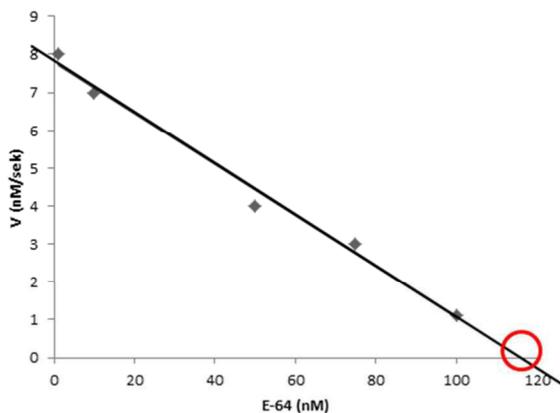


Abbildung 2-3: Beispieldiagramm zur *active-site-titration* von Falcipain-2. Die Konzentration von E-64 wurde auf die x-Achse aufgetragen, der Substratumsetzung auf die y-Achse. Der Wert aktiven Falcipains konnte bei $y = 0$ abgelesen werden (rot eingekreist)

2.2.3.3 Aktivitätsbestimmung von PbICP-C, PfICP-C und TcChagasin

Die Aktivität der inhibitorischen MBP-Fusionsproteine wurde ebenfalls über die *active site*-Titration unter Verwendung von Falcipain-2 ermittelt. Die Inhibitoren wurden hierbei 100 mM eingesetzt, das Substrat 30,8 μM und die Konzentration von Falcipain-2 wurde zwischen 10 nM – 750 nM variiert.

2.2.3.4 Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_i)

Die Ermittlung des K_i von Falcipain-2 und den rekombinanten Inhibitoren wurde mittels der Morrison-Gleichung (Morrison; 1969) durchgeführt, da sich herausstellte dass es sich bei den ICPs um sogenannte kompetitive *tight binding*-Inhibitoren handelt (Copeland; 2005). Die Auswertung wurde mit PRISM (>Enzymevaluation)

durchgeführt, ein Beispielgraf ist in Abbildung 2-4 dargestellt. In Region A sollten 3 Werte eingetragen werden, in Region B möglichst viele Punkte und in Region C sind 2 Werte ausreichend. Der K_i -Wert kann einer dem Graphen angehängten Tabelle in PRISM entnommen werden. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt.

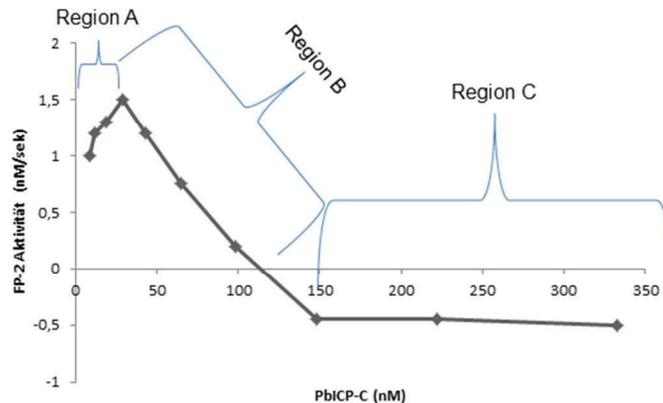


Abbildung 2-4: Berechnung des K_i -Wertes mittels der Morrison-Gleichung. Die Konzentration des Inhibitors wurde auf die x-Achse aufgetragen, die Aktivität von Falcipain-2 auf die y-Achse. Hieraus konnte mittels PRISM der K_i berechnet werden.

2.2.3.5 Strukturmodellierung

Um in theoretischen Modellen die Bindung von Inhibitoren und Enzymen zu analysieren, wurden die Strukturen der Proteine aus der Datenbank RCSB heruntergeladen und mit dem Programm Pymol modelliert.

2.2.4 Kultivierung von *P.berghei*

2.2.4.1 Blutstadien

2.2.4.1.1 Infektion von Mäusen mit *P.berghei*-Parasiten

Um Mäuse mit *Plasmodium berghei* zu infizieren, wurden vier alternative Methoden angewandt: Bei der ersten Methode wurde eine Maus mit einem Blutstabilat (2.2.4.1.6), welches intraperitoneal injiziert wurde, infiziert. Diese Methode wurde für die Produktion der transgenen Parasiten PbGFPcon, Pbmcherry (AG Heussler), PbiCP-GFP (Rennenberg, 2009), PbiCP-C-KO_{cond} (freundlicher Weise von Dr. Christine Lehmann zur Verfügung gestellt) und mit dem Wildtyp Stabilat *P. berghei*, angewandt. Bei der zweiten Methode wurde eine Maus mit Schizonten infiziert, die vorher einer Transfektion (2.2.4.1.5) unterzogen wurden. Desweiteren wurden zur Subklonierung oder zur Überprüfung der Infektiosität der transgenen Parasiten

entweder Sporozoiten oder abgelöste infizierte Zellen (Stanway *et al.*, 2009) intravenös in die Schwanzvene injiziert (hierbei entstehen S_0 -Parasiten).

Wenn die transgenen Parasiten über eine Resistenz verfügten, wurde ab dem Folgetag der Infektionen eine Pyrimethaminselektion durchgeführt. Pyrimethamin ist ein Antimalariamedikament welches die Dihydrofolat-Reduktase hemmt. Das bifunktionale Enzym Dihydrofolat-Reduktase-Thymidylat-Synthetase (DHFR/TS) spielt eine essentielle Rolle bei der Purinsynthese der Parasiten. Nachdem Folsäure zu Dihydrofolat umgesetzt wurde, wird dieses durch die DHFR/TS zu Tetrahydrofolat umgewandelt, aus Tetrahydrofolat werden unter anderem Purine und Thymidin synthetisiert. Der Vektor pL0017 trägt das Resistenzgen *pbdhfr/ts*, hierbei handelt es sich um das Gen *tgdhfr* aus *Toxoplasma gondii*, welches eine Resistenz gegenüber Pyrimethamin vermittelt. Durch die Zugabe von Pyrimethamin in das Trinkwasser der Maus ist eine positive Selektion der transgenen Parasitenpopulationen möglich. 2 Tage nach der Infektion wurden zwei weitere Mäuse mit je 200 μ L Phenylhydrazin über eine intraperitoneale Injektion behandelt. Phenylhydrazin bewirkt das Absterben roter Blutkörperchen, sodass viele neue Retikulozyten gebildet werden, welche von *P. berghei* bevorzugt infiziert werden, was wiederum zu einem schnelleren Anstieg der Parasitämie führt. Am Tag 3 nach der Phenylhydrazinbehandlung wurden die Mäuse mit ca. 50 bis 150 μ L Blut (abhängig von der Parasitämie des injizierten Blutes, diese sollte zwischen 5% und 15% liegen) der zuvor infizierten Maus intraperitoneal infiziert. 3 Tage später wurde die Parasitämie der Maus über einen Blutaussstrich überprüft (2.2.4.1.2), die Parasitämie sollte für die Infektion von Mücken möglichst nicht unter 10% liegen. Zudem wurde die Exflagellation der Parasiten überprüft. Dies erfolgte mittels der Entnahme eines Blutropfens aus der Schwanzspitze. Der Blutstropfen wurde auf einen Objektträger luftdicht unter einem Deckglas fixiert und für 15 Minuten bei 21°C inkubiert. Nach der Inkubation sollte eine Exflagellation der männlichen Gametocyten zu beobachten sein. Nachdem alles überprüft wurde und den Voraussetzungen zur Infektion der Mücken entsprach, wurde die Maus anästhesiert und auf den Mückenkäfig gelegt (2.2.4.2.2).

Anästhesie (2 Mäuse)

159 µL 1 x PBS

12,5 µL Domitor®

27 µL Ketavet

100 µL i.p. pro Maus

Phenylhydrazin

7 mg / mL

Pyrimethamin-Trinkwasser

7 mg Pyrimethamin in 10 mL DMSO

10 mL DMSO-Pyrimethamin-Lösung in

1 L Leitungswasser

Antisedierungslösung (2 Mäuse)

100 µL 1 x PBS

10 µL Antisedan

55 µL i.p. pro Maus

2.2.4.1.2 Bestimmung der Parasitämie mittels Wright's Stain-Färbung

Um zu überprüfen, ob die Infektion der Mäuse erfolgreich war sowie um den Parasitämiestatus zu ermitteln, wurde den Mäusen ein Tropfen Blut aus der Schwanzvene entnommen und auf einem Objektträger ausgestrichen. Auf den Blutausschlag wurden 10 Tropfen Wright-Stain-Färbelösung gegeben und für 2 Minuten inkubiert, anschließend wurden für weitere 2 Minuten 10 Tropfen H₂O hinzugefügt. Der Objektträger wurde mit Leitungswasser gespült und luftgetrocknet. Zur Bestimmung der Parasitämie, die das prozentuale Verhältnis der infizierten Retikulozyten zu den nicht infizierten Retikulozyten beschreibt, wurden die Blutzellen und die Parasiten in 10 Sichtfeldern ausgezählt und die Werte anschließend in folgende Formel eingesetzt:

$$\frac{\text{Anzahl der Parasiten}}{\text{Anzahl der Erythrocyten}} \times 100 = \text{Parasitämie (\%)}$$

Wright-Stain-Färbelösung

1 mg / mL Wright-Stain-Färbelösung in Methanol

2.2.4.1.3 Lebend-Aufnahmen von P.berghei im Blutstadium

Für die Überprüfung, Aufnahme oder Zählung von lebenden Parasiten wurden die Zellkerne mit der Hoechst-Färbung eingefärbt. Hierzu wurden 500 µL 1 x PBS mit 0,5 µL Hoechst 33528 (Blutstadien) versetzt und ein 20 µL Aliquot entnommen und mit einem Tropfen Blut aus der Schwanzvene gut vermengt. Nach 10 Minuten Inkubation

wurden 2 μL auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Probe musste dann zügig unter dem Mikroskop analysiert werden.

2.2.4.1.4 Saponinlyse

Die Saponinlyse hat das Ziel, Parasitenextrakt aus Blut zu erhalten. Hierfür müssen die Parasiten aus den Erythrozyten isoliert werden. Saponin ist ein Detergenz welches die Membranpermeabilität beeinflusst, hämolytische Aktivität aufweist und Cholesterin komplexiert. Dadurch wird die Erythrozytenmembran, sowie die Membran der parasitophoren Vakuole zerstört, wobei die Parasitenmembran jedoch erhalten bleibt.

Zunächst wurde einer infizierten Maus durch Herzpunktion 200 μL Blut entnommen, dieses wurde sofort mit ca. 10 μL Heparin versetzt, um eine Agglutination zu verhindern. Das Blut wurde dann für 5 Minuten bei 2800 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Blutzellen ca. 5 x mit 1 mL 1 x PBS gewaschen (bis der Überstand klar blieb). Das Zellsediment wurde in 1 mL 0,05%iger Saponinlösung aufgenommen und für 8 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 10 Minuten bei 2800 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde nun erneut ca. 5 x mit 1 mL 1 x PBS gewaschen, bis der Überstand keine rötliche Färbung mehr aufwies. Das entstandene Parasitensediment wies eine bräunliche Färbung auf.

Das erhaltene Pellet wurde für die Western-Blot-Analyse in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um sicher zu gehen dass die Parasiten aufgeschlossen wurden fand zusätzlich eine zwei-minütige Inkubation der Probe in einem Ultraschallbad statt.

Zusätzlich konnte das erhaltene Saponinpellet auch für die Herstellung von gDNA (2.2.4.1.7) verwendet werden.

Saponinlösung

0,05 % in 1 x PBS

2.2.4.1.5 Transfektion von *P.berghei* (Janse et al., 2006)

Ansetzen der Blut-Übernachtkultur

Zunächst wurde einer mit *P.berghei*-Wildtyp infizierten Maus mittels Herzpunktion ein möglichst großes Volumen Blut entnommen, die Parasitämie der Maus sollte zwischen 1% und 3% liegen, damit ausreichend Parasiten vorhanden sind aber

möglichst keine Mehrfachinfektionen eines Erythrozyten vorliegen. Die Blutprobe wurde zügig mit 300 µL Heparin versetzt und in 5 mL RPMI 1640 Kulturmedium gegeben. Nach behutsamem Mischen fand eine acht minütige Zentrifugation bei 450 x g statt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 mL Kulturmedium resuspendiert und tröpfchenweise auf 50 mL Kulturmedium in eine Zellkulturflasche gegeben. Anschließend wurde die Zellkulturflasche für 90 Sekunden mit 5% O₂, 5% CO₂ und 90% N₂ mit 2 bar begast, damit die Blutzellen ihr gewohntes Milieu erhalten. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C und 5% CO₂, die Zellkulturflasche sollte hierbei leicht geschwenkt werden. Während der Inkubation über Nacht entwickeln sich junge Ringformen der Parasiten und Trophozoiten zu reifen Schizonten.

Gewinnung der reifen Schizonten

Von der Übernachtskultur wurde ein Blutausschlag gefärbt (2.2.4.1.2) und der Grad der Parasitämie, sowie die Anwesenheit von möglichst vielen reifen Schizonten überprüft. Bei positivem Ergebnis wurde die Blutsuspension auf drei 50 mL Falcon Röhren verteilt und je Röhren mit 10 mL einer 50%igen Nycodenz-PBS-Lösung unterschichtet. Anschließend fand eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 450 x g ohne Bremse statt. Die Lösung wirkt als Gradientennetz und trennt die uninfizierten von den infizierten Retikulozyten, so entsteht durch die Zentrifugation zwischen den zwei Suspensionen eine gräuliche dünne Schicht aus Schizonten. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde die Schizontenschicht abgesaugt in einem Falcon Röhren gesammelt. Die Schizonten wurden mit 40 mL Kulturmedium versetzt und erneut bei 459 x g für 8 Minuten zentrifugiert, das Pellet aus Parasiten wurde in 1 mL Kulturmedium resuspendiert und anschließend pro Transfektionsvorgang 1:1 mit Kulturmedium verdünnt eingesetzt.

Vorbereitung der DNA

Zur Vorbereitung der DNA für die Transfektion wurden 30 µg Plasmid-DNA der Plasmidkonstrukte pL0017-PbICP-C, pL0017-PbICP-N, pL0017-IsDPAP3* und pL0017-IsDPAP3-V5 linearisiert, dies wurde in einem Restriktionsansatz mit Apal und SacII für 30 Minuten bei 25°C und 1 Stunde bei 37°C durchgeführt. Im Anschluss wurde die linearisierte Plasmid-DNA aufgereinigt (2.2.1.3) und die Konzentration photometrisch (2.2.1.10) und über eine Agarosegel (2.2.1.4) bestimmt.

Transfektion der Schizonten und anschließende Infektion einer Maus

5 bis 10 µg der linearisierten Plasmid-DNA wurden für die Transfektion in 100 µL der Lösung Nucleofector™ 88A6 aufgenommen. Die Parasiten wurden durch kurzes Zentrifugieren und dem Verwerfen des Überstandes aufkonzentriert und zu der vorbereiteten DNA-Lösung gegeben und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Küvette wurde in das Amaxa-Nucleofector-Gerät gestellt und die Transfektion in dem Programm U33 durchgeführt. Zur Abkühlung der Suspension wurden 100 µL Kulturmedium in die Küvette pipettiert und 200 µL der Lösung intravenös in die Schwanzvene einer Maus injiziert.

RPMI1640 Kulturmedium

100 mL RPMI1640 Medium
25 mL FBS
150 µL Gentamicin (80 mg)

Nycodenz-Dichte-Gradient

(50 mL Stocklösung)
13,8 g Nycodenz
Ad 50 mL Buffered Medium

Buffered Medium (1L)

500 mL dH₂O
5 mM Tris HCl
3 mM KCl
0,3 mM CaNa₂EDTA
pH 7.5
ad 1 L dH₂O

2.2.4.1.6 Herstellung von P.berghei-Blutstabilaten

Für eine längerfristige Lagerung der Parasiten wurden Stabilate der Blutphase angefertigt, die zu einem späteren Zeitpunkt für eine erneute Infektion einer Maus genutzt werden können. Hierzu wurden 100 µL Blut, welches durch Herzpunktion einer infizierten Maus entnommen wurde, zu 200 µL Einfrierlösung gegeben und in ein 2 mL Kryoröhrchen überführt, welches in Flüssigstickstofftanks gelagert wird.

Einfrierlösung

10 % Glycerin in Alserver's Solution

2.2.4.1.7 Gewinnung genomischer DNA

Zur Gewinnung von genomischer DNA (gDNA) wurde zunächst das Blut einer infizierten Maus mittels Herzpunktion entnommen und in ein Saponinpellet hergestellt (2.2.4.1.4). Die Isolierung der genomischen DNA (gDNA) aus dem Saponinpellet erfolgte über das Kit NucleoSpin® Blood Quick pure. Die Konzentration und der Reinheitsgrad der Proben wurden fotometrisch (2.2.1.10) ermittelt. Mit der erhaltenen gDNA wurde eine Integrationsanalyse (2.2.4.1.8) durchgeführt.

2.2.4.1.8 Integrationsanalyse

Zur Überprüfung der Integration des Vektors in den Parasiten wurde eine PCR auf gDNA-Ebene durchgeführt. Hierbei konnte anhand der PCR-Produkte ermittelt werden, ob eine Integration des Plasmids in das Genom des Parasiten stattgefunden hat (c-Locus oder / und d-Locus), ob es sich um Wildtypparasiten handelt oder der Vektor episomal vorliegt (Tab. 2.2.9).

Auch die Exzision des PbICP-C Gen's in der *knock-out*-Parasitenlinie PbICP-C-KO_{cond} und deren Klone wurde mittels PCR-Analysen der gDNA überprüft (Tab. 2.20).

Tabelle 2.20: Auflistung der verwendeten Primer für die Integrationsanalyse transgener Parasitenlinien. Die Sequenzen der Primer können der Tabelle 2.8 entnommen werden

Primerpaar	PCR-Produkt
652 / 653	Integration des Vektors in den d-Locus 5'
654 / 653	Integration des Vektors in den c-Locus 5'
652 / 655	Wildtyp d-Locus 5'
654 / 655	Wildtyp c-Locus 5'
763 / 653	Episomale Integration des Vektors
763 / 655	Integration im d-Locus am 3'-Ende
1806 / 1391	Exzisionsüberprüfung PbICP-C-KO Genomintegration
1168 / 588	Excisionsüberprüfung PbICP-C-KO, endogenes Genom

2.2.4.1.9 Proliferationstest von *P.falciparum*-Parasiten in der Blutphase unter Inhibitorzugabe

Um den Einfluss des Inhibitors CA-074Me auf Blutstadien zu testen wurde das (Gupta *et al.*, 2005) Hypoxanthin-Einbau-Verfahren durchgeführt. Die Ausführung des Versuches wurde freundlicher Weise von der Laborgruppe Dr. Müller (BNI) vorgenommen. Bei diesem Verfahren wird das H³-markierte Hypoxanthin zu Purin umgewandelt, welches von den Parasiten in DNA und RNA eingebaut wird. Durch die Behandlung der Parasiten mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (1 – 100 µM CA-074Me) konnte der IC₅₀-Wert von CA-074Me ermittelt werden. Als Positivkontrolle wurden die Parasiten mit DMSO behandelt, die Proliferationsrate dieser Parasiten wurde als 100% gesetzt. Der IC₅₀-Wert beschreibt die Inhibitorkonzentration die nötig ist um eine 50%ige Hemmung des Parasitenwachstums zu erreichen.

CA-074Me

20 mg/mL Stocklösung

2.2.4.2 Mückenstadien

2.2.4.2.1 Mückenzucht

Die Zucht der verwendeten *Anopheles stephensi* Mücken erfolgte bei 29°C und 80% Luftfeuchtigkeit, hierbei wurden die Mücken einem 12-stündigem Tag-und-Nacht-Zyklus unterzogen. Für die Verpflegung der Mücken wurden Wattepadts in einer 8%igen Fructoselösung, versetzt mit 2 mg / L PABA (Vitamin H), getränkt und auf den Käfig gelegt. Für die stetige Zucht der Mücken wurde je nach Bedarf 1 – 2 mal wöchentlich eine Blutmahlzeit durchgeführt. Hierfür wurde humanes Spenderblut 1:1 mit FCS versetzt und in einen sogenannten *Feeder* pipettiert, der durch die Verbindung mit einem Wasserbad (37°C) erwärmt wurde. Zwei Tage nach der Blutmahlzeit wurde den Mücken ein Messbecher mit feuchtem Filterpapier in den Käfig gestellt, wo sie wiederum in den folgenden 2 Tagen ihre Eier ablegten. Die Eier wurden mit 70%igem Ethanol gespült und in eine Schale mit Salzwasser überführt (0,2 g / L), als Nahrung wurde 1 Tropfen Liquifry No.2 hinzugegeben. Ab Tag 2 der Larven konnten Algentabletten als Nahrung verwendet werden. Nach ca. 9 Tagen begannen die Larven sich zu verpuppen, die Puppen wurden täglich abgesammelt

und in einer Schale in einen Käfig überführt. Dort schlüpfen die adulten Mücken innerhalb von ca. 36 Stunden.

2.2.4.2.2 Mückeninfektion mit *P.berghei*

Nach der Überprüfung von Parasitämie und Exflagellation der Parasiten wurde die Maus anästhesiert (2.2.4.1) und für ca. 40 Minuten auf einen Käfig mit etwa 150 weiblichen Mücken der Gattung *A. stephensi* gelegt, die 3-8 Tage alt sein sollten. Diese nahmen *P. berghei* durch die Blutmahlzeit auf. Bei 21°C und 80% Luftfeuchtigkeit entwickelten sich nach ca. 12 Tagen Oocysten und nach ca. 16 Tagen Sporozoiten, die wiederum zur Infektion von Mäusen sowie HepG2-Zellen genutzt werden konnten.

2.2.4.2.3 Gewinnung von gDNA

Für die Gewinnung von gDNA aus Oozysten im Mitteldarm der Mücke oder von Sporozoiten aus den Speicheldrüsen der Mücke wurde das Kit NucleoSpin® Tissue XS verwendet. Es wurden, wie in 2.2.4.3.5 beschrieben, Mitteldärme oder Speicheldrüsen präparativ der Mücke entnommen und die gDNA nach Anleitung des Kits gewonnen. Hierzu wurden jeweils ca. 20 infizierte Mücken pro Ansatz verwendet.

2.2.4.3 Untersuchung der plasmodialen Leberphase mittels des *in vitro* Infektionsmodells

2.2.4.3.1 Kultivierung von HepG2-Zellen

Humane, adhärent wachsende Hepatomazellen, HepG2-Zellen, wurden in 25 mL MEM-Komplettmedium in einer 75 cm² Zellkulturflasche bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter sterilen Bedingungen im Brutschrank kultiviert. Zur Überführung bzw. zum Aussäen der Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 mL 1 x PBS gewaschen. Das 1 x PBS wurde nach 1 – 2 Minuten Inkubation wieder abgesaugt und 1,5 mL Accutase auf den Zellrasen gegeben, dabei muss beachtet werden, dass alle Hepatozyten bedeckt werden. Die Zellen wurden nun für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Accutase ist ein proteolytisches Enzym, welches ein Ablösen der Zellen vom Flaschenboden verursacht. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen in 5 mL Komplettmedium aufgenommen und bei 1200 x g für 2 Minuten sedimentiert. Anschließend wurden die

Zellen in 5 mL Komplettmedium resuspendiert. Zur Überführung der Zellen in eine neue Zellkulturflasche wurde 1 mL der Zellsuspension mit 25 mL Komplettmedium in eine neue 250 mL Zellkulturflasche gegeben.

Komplettmedium

500 mL MEM with Earle's Salts
50 mL FBS (hitzeinaktiviert)
100 µg / mL Streptomycin
2 mM L-Glutamin 100 x

2.2.4.3.2 Aussäen von HepG2-Zellen in 24-Well-Kulturplatten

Um die HepG2-Zellen in der benötigten Dichte aussäen zu können, wurden die HepG2-Zellen mit Trypanblau gefärbt (1:10) und mittels der NEUBAUER-Zählkammer gezählt. Die HepG2-Zellen wurden in einer Dichte von 4×10^4 – 6×10^4 Zellen pro mL im MEM-komplett-Medium auf runde Deckgläschen in einer 24-Well Platte ausgesät, je Well 1 mL. Die Dichte der Zellen variierte abhängig von dem später anschließenden Fixierzeitpunkt, da die Zellen möglichst nicht übereinander gewachsen sein sollten. Das Medium wurde täglich erneuert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

Trypanblau

0,25 % in 1 x PBS

2.2.4.3.3 Transfektion von HepG2-Zellen

Für die Transfektion wurden 2×10^6 abgelöste HepG2-Zellen in FCS aufgenommen und sedimentiert (200 x g, 5 Minuten). Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 100 µL Nucleofector V Lösung aufgenommen und 3 µg Plasmid-DNA hinzugefügt. Die Lösung wurde in eine Amaxa-Transfektionsküvette überführt und durch Elektroporation (Programm T-28) transfiziert, unmittelbar danach wurden 500 µL vorgewärmtes RPMI-Medium hinzugefügt um eine Überhitzung der Zellen zu vermeiden. Nach Überführen der Lösung in ein Eppendorf Reaktionsgefäß wurden die Zellen für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen je nach Bedarf ausgesät.

2.2.4.3.4 Gewinnung von Zellextrakten

Zellextrakte wurden für zwei Zwecke gewonnen: Zum einen für die Überprüfung von in HepG2-Zellen exprimierten protozoischen Inhibitoren und zum anderen zur Überprüfung, ob synthetische niedermolekulare Inhibitoren in die Zellen eindringen können. Für Ersteres wurden zunächst HepG2-Zellen mit entsprechenden Plasmiden transfiziert (2.2.4.3.3) und je 1×10^6 Zellen in einer Vertiefung einer 6-Well-Kulturplatte ausgesät. Hierbei wurden die Plasmide pEG-Chagasin-GFP und pEG-PbICP-C-GFP (freundlicher Weise von Dr. Christine Lehmann zur Verfügung gestellt), sowie pEG-GFP (AG Heussler) verwendet. Am Folgetag wurden die Zellen durch zehnmütige Inkubation mit Accutase im Brutschrank abgelöst und durch 3 minütiges Zentrifugieren ($900 \times g$) pelletiert. Das Aufschließen der Zellen wurde durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und sofortigem Auftauen im 37°C Wasserbad erreicht. Anschließend wurde das Pellet in $80 \mu\text{L}$ Kinetikpuffer 1, bzw. 2 (je nach eingesetztem Enzym, siehe Tabelle 2.2.8) aufgenommen und für 30 Minuten bei $16\ 000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand konnte für kinetische Analysen verwendet werden. Zur Überprüfung ob synthetische niedermolekulare Inhibitoren in die Zellen eindringen können wurden die Zellen mit Medium, welches mit den entsprechenden Inhibitoren versetzt wurde, für 24 Stunden inkubiert. Die Gewinnung des Zellextraktes wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

2.2.4.3.5 Infektion von HepG2-Zellen mit *P.berghei*-Sporoziten

Zur Überprüfung der Mückeninfektionen wurden nach 12 Tagen die Mitteldärme der Mücken isoliert und unter dem Mikroskop auf die Anwesenheit von Oocysten überprüft. Die Präparation der Mitteldärme wurde, wie in folgendem Text für die Präparation der Sporoziten beschrieben, durchgeführt.

P. berghei-Sporoziten können ab dem 16. Tag nach der Mückeninfektion aus den Speicheldrüsen von infizierten *A. stephensi* Mücken präpariert werden. Für die Sporozitenpräparation wurden die Mücken zunächst mit Chloroform betäubt und vor der Präparation einmal in Ethanol (70%) getränkt, um etwaige Kontaminationen zu vermeiden. Danach wurden die Mücken in $1 \times \text{PBS}$ gelagert. Die Präparation der zwei Speicheldrüsen aus dem Thorax erfolgte am Binokular bei einer 20,5- bis 50fachen Vergrößerung in Präparations-Medium oder in PBS. Die sechs Lappen des Speicheldrüsenpaares wurden anschließend mit einem Elektromörser

aufgeschlossen und unter einem inversen Mikroskop bei einer 400fachen Vergrößerung auf die Anwesenheit von Sporozoiten überprüft und gegebenenfalls in einer Neubauerkammer ausgezählt. Ca. 5000 – 20000 Sporozoiten wurden in 200 µL Präparationsmedium auf die Zellen gegeben. Die Fixierung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten vorgenommen, um die Parasiten in verschiedenen Stadien dokumentieren zu können. Eine Stunde nach der Infektion wurde das Medium gewechselt und 1 mL MEM-Komplettmedium, das 1:1000 mit Amphotericin versetzt wurde auf die Zellen gegeben. Amphotericin verhindert eine Pilzinfektion der Zellen, die durch die Kontaminierung der Zellen, bzw. des Mediums durch die Sporozoiten und etwaige Mückenteile stark erhöht wird. Während der Kultivierung der infizierten Zellen wurde das Medium täglich 1-2 x gewechselt. Die Effizienz der HepG2-Infektionen mit fluoreszierenden Parasiten konnte am inversen Fluoreszenzmikroskop überprüft.

Um eine bessere Infektionsrate für *P.berghei*-Parasiten des NK65-Stammes zu erreichen wurde die Kulturplatte nach der Zugabe der Sporozoiten für 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert.

Präparations-Medium

500 mL MEM with Earle's Salts
100 µg / mL Streptomycin
2 mM L-Glutamin 100

2.2.4.3.6 Lebend-Aufnahmen von *P.berghei* im Leberstadium

Für die Überprüfung, Aufnahme oder Zählung von lebenden Leberstadien wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt. Hierzu wurde eine 1:10 000 Verdünnung von Hoechst 33542 in MEM-Medium vorgenommen (entspricht 1µg / ml) und dieses auf die Zellen gegeben. Nach 10 minütiger Inkubation im Brutschrank konnte die Analyse der Parasiten am Mikroskop durchgeführt werden. Die Hoechst-Färbung konnte nur an Zellen durchgeführt werden die nicht für weitere Analysen dienen sollten, da Hoechst nach ca. 2 Stunden eine toxische Wirkung auf die Zellen ausübt.

Um die Vitalität der Zellen zu überprüfen wurden TMRE- oder pSIVA-Färbungen vorgenommen. TMRE (25 nM) färbt Mitochondrien mit intaktem Membranpotential an. pSIVA (20 µg / ml) färbt Phosphatidylserinreste in der äußeren Membran an, diese werden nur von sterbenden Zellen angezeigt (Graewe *et al.*, 2011).

2.2.4.3.7 Quantifizierung des erfolgreichen Beendens der Leberphase *in vitro*

Das Ablösen von infizierten HepG2-Zellen *in vitro* wird als Indikator für das erfolgreiche Beenden der Leberphase definiert. Für die Quantifizierung dieses Parameters wurden HepG2-Zellen in einer 24-well-Kulturplatte mit Sporozoitien infiziert (je Ansatz 3 Wells) und die Anzahl der Parasiten 48 h nach Infektion ermittelt. Bei fluoreszenten Parasiten konnte dies mikroskopisch an den lebenden Parasiten durchgeführt werden, bei nicht fluoreszenten Parasiten wurden jeweils 6 Wells pro Ansatz infiziert und 3 Deckgläschen nach 48 h fixiert. Die anderen drei Deckgläschen wurden in eine neue Vertiefung versetzt, so dass Parasiten die am Rand, somit also nicht auf dem Deckgläschen waren, aus der Zählung ausgeschlossen werden konnten. Der durchschnittliche Wert der Parasitenanzahl 48 h nach Infektion wurde als 100% gesetzt. 65 h nach Infektion haben die meisten infizierten Zellen sich abgelöst und beginnen mit der Knospung von Merosomen. Diese abgelösten Zellen konnten mit dem Überstand mittels einer Pipette abgenommen werden und in ein neues Well überführt werden. Die verbleibenden HepG2-Zellen wurden ggf. erneut mit Medium überschichtet und weiter inkubiert. Die weitere Durchführung des Experimentes fand am Fluoreszenzmikroskop statt (200fache Vergrößerung). Die überführten Zellen konnten ausgezählt werden, wobei der große Wirtszellkern als Merkmal für die zu zählenden abgelösten Zellen diente, Merosomen enthalten nur kleine Parasitenkerne. Die DNA-Färbung wurde wie in 2.2.4.3.6 beschrieben durchgeführt. Der durchschnittliche Wert der abgelösten Zellen wurde mit dem 48-Stunden-Ausgangswert ins Verhältnis gesetzt.

2.2.4.3.8 *In vitro* Behandlung mit niedermolekularen synthetischen Inhibitoren

Um die Importanz verschiedener Proteasen im Lebenszyklus der Parasiten untersuchen zu können, wurden zu bestimmten Zeitpunkten in der Leberphase Inhibitorstudien durchgeführt. Hierfür wurden infizierten HepG2-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit Medium inkubiert, welches mit unterschiedlichen Inhibitoren versetzt wurde. Die eingesetzten Inhibitoren und deren Konzentrationen können Tabelle 2.21 entnommen werden. Alle Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, weshalb die Behandlung der Zellen mit 0,03%ig DMSO haltigem Medium als Kontrolle verwendet wurde. Die Inkubation der Zellen erfolgte weiterhin nach den Standardbedingungen (2.2.4.3.2). Um eine Auswirkung auf die Wirtszellen

ausschließen zu können wurden die Zellen in einem Vorversuch zunächst für 40 Stunden mit dem Inhibitor inkubiert und auf ihre Fitness überprüft.

Tabelle 2.21: Auflistung der verwendeten niedermolekularen synthetischen Inhibitoren für die *in vitro* Behandlung von Leberparasiten

Inhibitor	Zielprotease	eingesetzte Endkonzentration	Firma
CA-074Me	Cathepsin B	150 µM	Calbiochem, Merck KGaA
E-64	Cysteinproteasen	50 µM	Calbiochem, Merck KGaA
JCP-410	PfDPAP3 (Cathepsin C)	100 µM	Group of Bogyo; Stanford University; USA
ML4188S	PbDPAP3 (Cathepsin C)	50 µM	Group of Bogyo; Stanford University; USA

2.2.4.3.9 Gewinnung von cDNA

Zunächst wurden am Vortag HepG2-Zellen in einer 24-Well-Kulturplatte ausgesät, am Folgetag wurden je zwei Wells pro Ansatz infiziert, wobei eine hohe Infektionsrate vonnöten ist. Zu dem gewünschten Zeitpunkt konnten die infizierten Zellen mit dem RA-1-Puffer aus dem Kit NucleoSpin® RNA II abgelöst werden und die RNA konnte nach Anleitung gewonnen werden. Mittels des Kits First Strand cDNA Synthesis konnte die RNA in cDNA umgeschrieben werden und für die Expressionsanalyse von verschiedenen Proteine verwendet werden.

2.2.4.4 Mikroskopische Analysen von *P.berghei*-Parasiten

2.2.4.4.1 indirekte Immunfluoreszenzanalyse an mit *P.berghei* infizierten HepG2-Zellen

Die Fixierung der Zellen fand zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion statt, um die Parasiten in ihren unterschiedlichen Stadien untersuchen zu können. Zu den festgelegten Zeitpunkten wurden die mit Zellrasen behafteten Deckgläschen in PBS gewaschen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 4%iger Formaldehyd-Lösung (in 1x PBS) fixiert. Im Anschluss wurden drei Waschschrte mit PBS und je 5minütiger Inkubation vorgenommen, bevor die Zellen zur Permeabilisierung in eiskalten Methanol gegeben wurden, wo sie mehrere Monate bei -20°C aufbewahrt

werden können. Vor dem weiteren Gebrauch der Deckgläschen mussten restliche Methanolspuren durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt werden.

Zur Blockierung der freien Bindungsstellen in dem Zellrasen wurden die Deckgläschen für 30 Minuten in 10% FCS in PBS inkubiert. Anschließend fand die Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Verdünnungen der ersten Antikörper (Tab. 2.1.9) über Nacht bei 4°C in feuchter Atmosphäre statt. Die Antikörper-Verdünnungen wurden in 10% FCS in PBS vorgenommen. Am Folgetag wurden drei Waschschriffe mit PBS und je 5minütiger Inkubation durchgeführt bevor die zweite Antikörper-Verdünnung auf die Zellen gegeben wurde. Die Inkubation mit den Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpern (Tab. 2.1.10) fand für 1 Stunde unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur und in feuchter Atmosphäre statt, zusätzlich zu den Zweitantikörpern wird hier noch ein fluoreszierender DNA-Farbstoff, DAPI, hinzugegeben (100 µg / ml). Erneut werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und ein vierter Waschschriff mit H₂O wurde hinzugefügt. Im Anschluss wird der Flüssigkeitsfilm möglichst weitgehend mit Filterpapier entfernt und die Deckgläser in DAKO Fluoreszent-Eindeckmedium auf Objektträger geklebt, wobei die Seite der Deckgläschen, auf denen sich der Zellrasen befindet, dem Objektträger zugewandt sein muss. Zum Erhärten des Eindeckmediums wurden die Objektträger unter Lichtausschluss bei 4°C über Nacht gelagert. Die weitere Lagerung fand ebenfalls bei 4°C unter Lichtausschluss statt.

Etwa 65 Stunden nach der Infektion der HepG2-Zellen beginnen normalerweise die infizierten Zellen sich abzulösen und Merosomen zu bilden, die frei im Zellkulturmedium schwimmen. Um die abgelösten Zellen und Merosomen auf einem Objektträger fixieren zu können, wurde eine Cytospin-Zentrifugation vorgenommen, bei der die Merosomen bei 4minütiger Zentrifugation bei 800 rpm auf PolysineTM-Objektträger aufzentrifugiert wurde. Durch einen *Barrier Marker* werden die Parasiten auf einem Quadrat von ca. 0,5 cm eingezentert, dort findet im Anschluss an die Zentrifugation die Fixierung, die Permeabilisierung, das Blockieren der freien Bindungsstellen und die Färbung wie im oberen Text beschrieben statt. Die aufgetragenen Merosomen wurden hierbei mit ca. 100 µL Volumen bedeckt, anschließend wurden die aufgetragenen Lösungen mit Hilfe von Filterpapier wieder entfernt. Nach dem letzten Schriff der Färbung wurde ein Tropfen DAKO Fluoreszent-Eindeckmedium auf die Zellen gegeben und ein Deckgläschen aufgeklebt. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei 4°C unter Lichtausschluss.

Die Dokumentation wurde am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, dabei wurden das Programm Open lab oder Olympus Fluoview (konfokale Aufnahmen) verwendet. Die Bearbeitung der Bilder wurde mit Photoshop vorgenommen.

2.2.4.4.2 Messung der Parasitengröße

Um die Entwicklung der Parasiten *in vitro* beurteilen zu können wurde die Parasitengröße zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Hierfür wurden HepG2-Zellen ausgesät (2.2.4.3.2), mit Sporozoiten infiziert (2.2.4.3.5) und nach einem festgelegten Zeitpunkt fixiert. Nachdem die Deckgläschen mit dem Antikörper Anti-*P.berghei* (Maus oder Ratte) wie in 2.2.4.4.1 beschrieben gefärbt wurden konnte die Ausmessung der Parasiten durchgeführt werden. Hierzu wurden die Parasiten am Fluoreszenzmikroskop fotografiert, wobei für alle die gleichen Einstellungen eingehalten wurden. Anschließend konnten die Parasiten mit Hilfe der OpenlabEinstellung *density slicing* ausgemessen werden, die Auswertung und graphische Darstellung der Werte wurde mit Prism durchgeführt. Das Experiment wurde dreimal unabhängig durchgeführt.

2.2.4.4.3 Invasionsassay

Für die Überprüfung der Infektiosität von transgenen Parasiten wurde der Invasionsassay durchgeführt. Hierzu wurden 40 000 HepG2-Zellen pro Well einer 24-Well-Kulturplatte auf Cover ausgesät und am Folgetag mit 10 000 Sporozoiten der entsprechenden transgenen Parasiten und Kontrolle infiziert. Die Fixierung der Parasiten wurde zu definierten Zeitpunkten nach Infektion vorgenommen. Im Anschluss wurde die Anzahl der Parasiten pro Deckgläschen am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und ins Verhältnis mit der absoluten Sporozoitenzahl gesetzt. Das Experiment wurde dreifach durchgeführt. Im Falle der PbICP-C-KO_{Mero}- und PbICP-C-KO-add-back-Parasiten wurde das Experiment nur zweifach durchgeführt.

2.2.4.4.4 Neutralisation von Sporozoiten und anschließende Infektionsüberprüfung

Es wurden 50 000 HepG2-Zellen pro Vertiefung einer 24-Well-Kulturplatte auf einem Deckgläschen ausgesät. Am Folgetag wurden Sporozoiten isoliert (2.2.4.3.5) und jeweils 10 000 Sporozoiten in 30 µL Medium vorbereitet. Die Neutralisation der

Sporozoitensuspension wurde durch die Inkubation mit Antiseren erreicht. Hierfür wurden die Sporozoitensuspension mit 6 µL Antiserum, bzw. PBS für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Hierbei wurden α-CSP-Serum (Kaninchen) als Positivkontrolle, drei Verdünnungen des α-PbICP-C-Serums (Kaninchen) und Präimmenserum (Kaninchen) als Negativkontrolle eingesetzt. Als Verdünnungen des α-PbICP-C-Serums wurde eine 1:5 (6 µL in 30 µL), eine 1:10 (3 µL in 30 µL) und eine 1:50 (0,6 µL in 30 µL) eingesetzt. Alle Ansätze wurden dreifach angesetzt, der Versuch wurde dreifach durchgeführt. Nach der Inkubation auf Eis wurde 170 µL vorgewärmtes Medium in das Reaktionsgefäß hinzugefügt und die Sporozoitensuspension wurde auf die HepG2-Zellen gegeben und im Brutschrank inkubiert.

Nach der Neutralisierung wurde die Transmigrationsrate (2.2.4.4.5) oder die Invasionsrate (2.2.4.4.6) der Parasiten überprüft.

2.2.4.4.5 Transmigrations-Überprüfung

Sporozoitensuspension transmigrieren mehrere Leberzellen, bevor sie eine Leberzelle infizieren. Im Gegensatz zur Infektion, bei der durch die Ausbildung der PVM die Wirtszellen unversehrt bleiben, werden die Zellen bei der Transmigration verwundet. Dieser Unterschied wird für die Transmigrations-Überprüfung genutzt. Gegebenenfalls werden die Sporozoitensuspension vorher wie in 2.2.4.4.4 beschrieben neutralisiert. Es werden 1×10^4 bis 2×10^4 Sporozoitensuspension in 100 µL Präparations-Medium vorbereitet und mit 100 µL einer 1:10 Verdünnung Dextran (in Präparationsmedium; Endkonzentration = 1 mg / ml) vermischt. Die 200 µL Sporozoitensuspension-Dextran-Lösung wurde in ein Well einer 24-Well-Kulturplatte gegeben, in der auf einem Deckglaschen 50 000 HepG2-Zellen am Vortag ausgesät wurden. Pro Parasitenlinie wurden drei Wells infiziert, der Versuch wurde zweifach durchgeführt. Nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen nach Protokoll fixiert (2.2.4.4.1), dabei ist darauf zu achten dass alle Schritte des Experimentes unter Ausschluss von Licht durchgeführt werden, da die Fluoreszenz des Dextrans unter Lichteinfluss stetig abnimmt.

Für die Auswertung wurde die Anzahl der Zellkerne ausgezählt und als 100% gesetzt. Die Fluoreszenten, also verwundeten Zellen, wurden ebenfalls ausgezählt und ins Verhältnis gesetzt. Zusätzlich zu den transgenen Parasiten und der Kontrolle wurde auch ein Leerwert bestimmt, in der die Zellen nur mit Dextran-Medium

inkubiert wurden. Der Leerwert wurde von allen anderen ermittelten Werten vor der Auswertung abgezogen.

Dextran, Fluorescein®

Stocklösung: 20 mg/mL in PBS

2.2.4.4.6 Invasionsüberprüfung

Bei der Durchführung eines sogenannten *inside-outside-assays* konnte bestimmt werden, ob die fixierten Sporozoiten sich inner- oder außerhalb der HepG2-Zellen befanden. So konnte eine Invasionsrate bestimmt werden. Bevor die Sporozoiten auf die Zellen gegeben wurden, fand eine Neutralisierung mit Antiseren statt (2.2.4.4.4). Die Sporozoiten wurden für eine Stunde mit den Zellen unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas für 2 Minuten mit 2%iger PFA-Lösung (in PBS) anfixiert und mit 10%iger FCS-Lösung (in PBS) blockiert. Durch das Fehlen des Permeabilisierungsschrittes werden nur extrazelluläre Sporozoiten angefärbt. Es ist auf vorsichtiges Pipettieren zu achten. Die weitere Färbung wurde wie in 2.2.4.4.1 beschrieben durchgeführt, dabei sollten die Deckgläschen immer im Dunkeln gehalten werden.

2.2.4.4.7 Transmissionselektronenmikroskopie

Wie in 2.2.4.3.5 beschrieben wurden HepG2-Zellen mit GFPcon-Sporozoiten infiziert und 65 Stunden nach der Infektion wurden die abgelösten Zellen geerntet und mit einer 1%igen Formaldehyd- sowie 2%iger Glutaraldehydlösung fixiert. Die Ausführung der folgenden Arbeiten wurde von Silke Retzlaff aus der elektornenmikroskopischen Abteilung durchgeführt. Die Einbettung der Zellen wurde in 3% LM Agarose vorgenommen, hierzu wurden die Zellen bei 300 x g für 5 Minuten sedimentiert. Nach einem Waschschrift mit 0.1 M Natrium-Cacodylat-Puffer (pH 7.2) wurden die Zellen mit 1% OsO₄ nachfixiert. Es folgten weitere Waschschriffe und eine Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe, 1,2-Propylenoxid wurde als Intermedium verwendet. Die Einbettung der Probe wurde in Epon vorgenommen und die Dicke der Ultradünnschnitte betrug 80 nM. Für die Kontrastierung der

Schnitte wurde 2% Uranyl-Acetat in Methanol und Blei-Citrat eingesetzt. Anschließend folgte die Analyse bei 80 kV am Tecnai-Spirit.

2.2.5 Herstellung von polyklonalen Antikörpern

2.2.5.1 Herstellung von Antiseren

Für die Immunisierung von Mäusen, bzw. Ratten wurde zunächst das gewünschte Protein (His-PbICP-C, MSP-1) in PBS dialysiert (Abb. 2-5). Anschließend wurde das Protein 1:1 mit Freud's Adjuvanz complete versetzt und durch häufiges Aufziehen in einer Spritze homogenisiert. Vor der ersten Behandlung der Tiere wurde jeweils ca. 50 µL Präimmunserum entnommen. Die Entnahme konnte bei den Mäusen über die Schwanzvene erfolgen, der Ratte musste das Serum über das Auge entnommen werden. Das Blut wurde kurz zentrifugiert (2 Minuten, 2000 x g) und das Serum im Überstand für die weitere Analyse abgenommen. Die Immun-Lösung wurde den Tieren intraperitoneal injiziert, hierbei wurden 50 µg Protein pro Maus und 200 µg Protein pro Ratte eingesetzt. Zwei Wochen nach der ersten Immunisierung wurde die Immunisierung wiederholt, mit dem Unterschied das nun Freud's Adjuvanz incomplete verwendet wurde. Weitere zwei Wochen später wurde die dritte Immunisierung durchgeführt, auch hier wurde Freud's Adjuvanz incomplete verwendet. Fünf Wochen nach der ersten Immunisierung wurde den Tieren etwas Blut abgenommen und Serum gewonnen um die Antikörperbildung zu überprüfen. Hierzu wurde ein ELISA, sowie IFA-Färbungen durchgeführt. Bei zufriedenstellenden Analyseergebnissen wurde den Tieren 6 Wochen nach der ersten Immunisierung mittels Herzpunktion möglichst viel Blut entnommen und das Serum daraus gewonnen. Das Serum wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur Spezifitätskontrolle wurden IFA-Färbungen mit dem Präimmunserum als Vergleich durchgeführt.

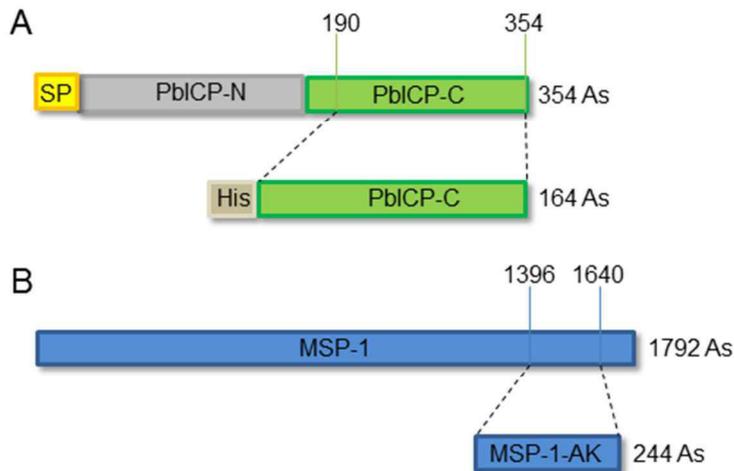


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der verwendeten Proteinfragmente für die Herstellung von Antiseren A: His-PbICP-C B: MSP-1-Fragment (AK = Antikörper)

2.2.5.2 Aufreinigung des Anti-His-PbICP-C-Antikörpers

Da bei polyklonalen Antikörpern die Bindung anderer Proteine nicht ausgeschlossen werden kann, wurde für die Untersuchung der PbICP-C-KO_{cond}-Parasiten der Antikörper Anti-His-PbICP-C (Ratte) aufgereinigt. Hierzu wurden, wie für die Western-Blot-Analyse (2.2.2.6), 200 µg MBP-PbICP-C und der Größenstandard PageRuler™ prestained ProteinLadder auf ein 14%iges SDS-Gel aufgetragen. Im Anschluss wurde das Protein auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Um den Bereich der MBP-PbICP-C-Bande genau definieren zu können wurden der Marker und die Hälfte der ersten Spur aus der Nitrozellulosemembran ausgeschnitten und mit Ponceau-Lösung für 5 Minuten gefärbt. Nach dem die MBP-PbICP-C-Bande sich anfärbte wurde die Nitrozellulosemembranteile wieder aneinander gefügt und die Membran dort ausgeschnitten, wo das MBP-PbICP-C-Protein vermutet wurde. Der proteinhaltige Membranteil wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten mit Blockingpuffer auf dem Rollator inkubiert. Der Blockingpuffer wurde entfernt und 500 µL des Anti-His-PbICP-C-serums hinzugefügt, das Reaktionsgefäß über Nacht bei 4°C auf dem Rollator inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit TBS gewaschen und in kleine Stücke zerschnitten. Diese wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten mit 190 µL Elutionspuffer bei Raumtemperatur geschüttelt. Um die Lösung zu neutralisieren wurden 10 µL Neutralisationspuffer hinzugefügt (der PH-Wert sollte nach Zugabe ca. 7 betragen) und für weitere 5 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß kurz

zentrifugiert, um den Überstand leichter abnehmen zu können. Der aufgereinigte Antikörper im Überstand wurde mit Natriumazid versetzt (Endkonzentration 0,002%), um eine längere Haltbarkeit zu erreichen.

Ponceaulösung

3 % Essigsäure

2 % Ponceau

Elutionspuffer

100 mM Glycine in TBS

→ pH 2-3

Blockingpuffer

2 % BSA in TBS

Neutralisationspuffer

1M Tris

→ pH 9

3. Ergebnisse

Die Expression von PbICP findet während des gesamten Lebenszyklus des Malariaparasiten statt und lässt darauf schließen, dass dieser Inhibitor verschiedene Funktionen übernimmt. Hierbei kann es sich sowohl um die Regulation von Proteasen des Parasiten handeln, als auch um die Inhibition, bzw. Regulation von Wirtszellproteasen. Die Besonderheiten der *Plasmodium* ICPs könnten Hinweise auf spezialisierte Funktionen geben, bspw. die für *Plasmodium* ICPs speziellen Inhibitionsspektren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Proteasehemmung verschiedener ICPs untersucht. Anhand dieser Ergebnisse und struktureller Modellierung wurden Hypothesen über die Funktion von verschiedenen Proteasen des *Clans* CA (Unterfamilie C1A) für die Entwicklung von *Plasmodien* aufgestellt und untersucht. Zudem wurde die Lokalisation von PbICP untersucht, um Hinweise auf die biologische Funktion des Inhibitors, bzw. dessen N- und C-terminale Domäne, zu erlangen. Durch die Untersuchung der Parasitenlinie PbICP-C-KO, bei dem der Teil des *pbicp*-Gens deletiert wurde, der für den C-Terminus des Inhibitors kodiert, konnten weitere Erkenntnisse über die Funktion des Inhibitors ermittelt werden.

3.1 Untersuchung des Cysteinproteaseinhibitors PbICP

3.1.1 Proteasehemmung durch ICPs verschiedener Parasiten

Durch die Aufklärung der Struktur von PbICP-C kann die Inhibition durch Strukturmodellierung voraus gesagt werden (Hansen *et al.*, 2011), jedoch sollte dies auch experimentell überprüft werden.

3.1.1.2 Wirkungsspektren rekombinanter Inhibitoren verschiedener Protozoen

Bei der Charakterisierung der inhibitorischen Eigenschaften von *Plasmodium* ICPs wurden Cysteinproteasen des *Clans* CA und des *Clans* CD untersucht. Für beide ist eine Inhibition durch PfICP beschrieben (Pandey *et al.*, 2006), wobei die Proteasen des *Clans* CD erheblich schlechter inhibiert werden. Es wurden wie auch von Pandey *et al.* beschrieben, Cysteinproteasen der Familie C1 (Cathepsin L, Cathepsin B, Papain, Falcipain-2) und C2 (Calpain-1) aus dem *Clan* CA untersucht, sowie Caspase-3 und Caspase-8 (Familie C14) des *Clans* CD. Die ICP-Proteine wurden rekombinant als MBP-Fusionsprotein hergestellt, die Kinetiken wurden an einem

Fluorimeter erstellt (verwendete Einstellungen und Reagenzien können Tab. 2.19 entnommen werden). Falcipain-2 ist eine Cathepsin-L ähnliche Protease von *P. falciparum* und wurde an der Universität in Lübeck in der AG Hansen hergestellt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 3-1 dargestellt.

Sowohl der Inhibitor mit der vollständigen Aminosäuresequenz (PbICP), als auch die C-terminale Domäne (PbICP-C) wiesen eine deutliche und ähnlich starke Inhibitoraktivität gegenüber den Proteasen Papain, Cathepsin L und Falcipain-2 der C1-Familie auf (Abb. 3-1A, 3-1C). Die N-terminale Domäne (PbICP-N) alleine hat keinerlei inhibitorische Aktivität gegenüber allen getesteten Proteasen (Abb. 3-1E) und sie weist auch keinen negativen Einfluss auf die Inhibitoraktivität des Vollängenproteins auf. Bemerkenswerterweise inhibieren die *Plasmodium* ICPs keine Cathepsin B-ähnlichen Proteasen, im Gegensatz zu TcChagasin und anderen Mitgliedern der Inhibitorfamilie I42 (Sanderson *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2006; Wang *et al.* 2007; Huang *et al.*, 2009). Dieser interessante Aspekt wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht und wird in einem eigenen Kapitel (3.2) besprochen.

Cysteinproteasen des *Clans* CD (Caspase-3, Caspase-8), sowie des *Clans* CA, Familie C2 (Calpain-1) wurden nicht von PbICP oder PbICP-C inhibiert. Da diese Werte von Literaturangaben für PfICP abweichen (Pandey *et al.*, 2006) wurden die Messungen mit PfICP, sowie PfICP-C und PfICP-N wiederholt (Abb. 3-1B, 3-1D, 3-1F). Es konnte jedoch auch hier keine Inhibition festgestellt werden, obwohl die beschriebenen Bedingungen (Pandey *et al.*, 2006) möglichst genau eingehalten wurden. Um auszuschließen, dass der MBP-Anhang die Konformation des Proteins bzw. seine inhibitorische Aktivität beeinflusst, wurden sämtliche Messungen nach Abspaltung des MBP-Anhanges mittels der Serinprotease FactorXa wiederholt. Es konnte weiterhin kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Inhibition der Caspasen wird von Pandey *et al.* mit einem K_i von 376 ± 47 nM (Caspase-3) und 80 ± 23 nM (Caspase-8) angegeben. Diese Werte sind wesentlich höher als die K_i s mit Cysteinproteasen des *Clans* CA, die im zweistelligen picomolaren Bereich liegen. Auch konnte die von Pandey *et al.* beschriebene Inhibition von Calpain-1 nicht nachvollzogen werden.

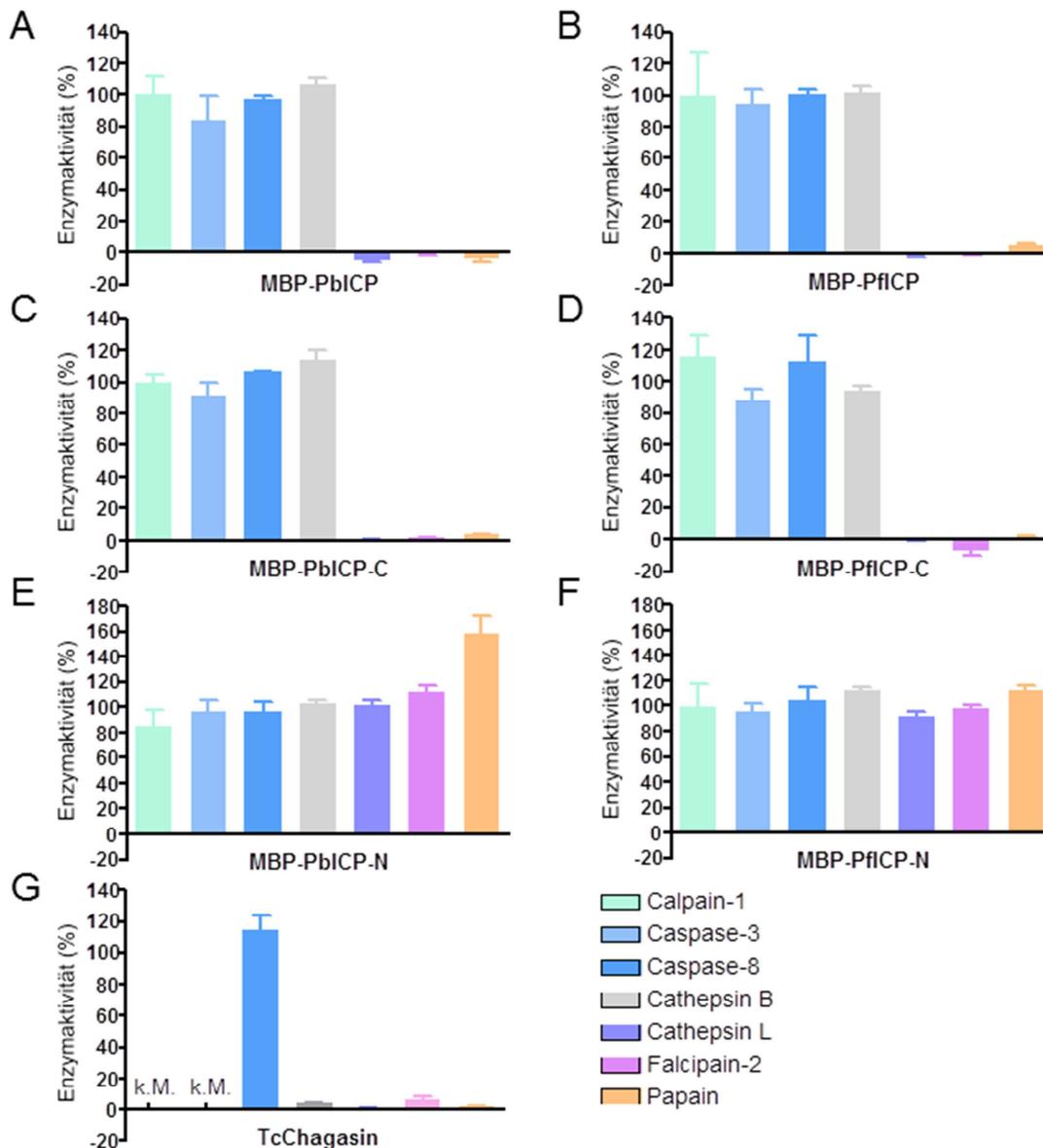


Abbildung 3-1: Hemmung der Aktivität verschiedener Proteasen durch Inhibitoren der Chagasin-Familie. Die Messungen wurden am Fluorimeter durchgeführt. Die Konzentration aller Inhibitoren, bzw. deren Domänen betrug 1 μ M. Die Bedingungen der Messungen können Tabelle 2.2.8 entnommen werden. **A:** MBP-PbICP; **B:** MBP-PfICP; **C:** MBP-PbICP-C; **D:** MBP-PfICP-C; **E:** MBP-PbICP-N; **F:** MBP-PfICP-C; **G:** MBP-TcChagasin k.M. = keine Messung vorgenommen

Wie für andere Mitglieder der Inhibitorfamilie I42 beschrieben, inhibieren die *Plasmodium* ICPs PbICP, PfICP, PbICP-C und PfICP-C die Cathepsin-L ähnlichen Proteasen des Clans CA, Familie C1. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Chagasin-Familie verfügen *Plasmodium* ICPs jedoch über keine Inhibitoraktivität gegenüber Cathepsin B (Monteiro *et al.* 2001; Pandey *et al.*, 2006; Huang *et al.*,

2009). In den folgenden Abschnitten werden Versuche beschrieben, die den Inhibitor PbICP weiter charakterisieren.

3.1.1.2 Berechnung der Dissoziationskonstante K_i des Enzym-Inhibitor-Komplexes

Um die Inhibitoreigenschaften von PbICP quantitativ darstellen zu können wurde die Dissoziationskonstante von Falcipain-2 (FP-2) und PbICP-C berechnet (Tab. 3.1). Zunächst wurde dafür die Aktivität der rekombinanten Proteine über *activ-site-titration* überprüft. So konnte bei einer eingesetzten FP-2 Konzentration von 140 nM für $118,28 \pm 10,2$ nM Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), d. h. 85% der rekombinant hergestellten Protease war aktiv. Gleiches wurde für die Überprüfung der Funktionalität der Inhibitoren durchgeführt. Die Ergebnisse wurden bei der Berechnung der Dissoziationskonstanten berücksichtigt.

Inhibitor	K_i (nM)
PbICP-C	$11,9 \pm 4,7$
MBP-PbICP-C	$8,7 \pm 1,8$
MBP-PbICP	$10,2 \pm 2,9$
PfICP-C	$35,9 \pm 12,65$
MBP-PfICP-C	$23,0 \pm 5,7$
MBP-PfICP	$37,1 \pm 5,4$
MBP-TcChagasin	$4,8 \pm 1,7$

Tabelle 3.1: Auflistung der mittels der Morrisongleichung berechneten K_i s von Falcipain-2 und den jeweiligen Inhibitoren

Die Berechnung der Dissoziationskonstante K_i wurde nach Copeland (Copeland, 2005) vorgenommen. Hierbei spielt es eine wichtige Rolle wie viele Werte in den verschiedenen Konzentrationsbereichen des Inhibitors für die Berechnung der K_i -Werte eingetragen werden (siehe Abb. 2-4). Je nach Inhibortyp weicht die erforderliche Anzahl der Messwerte in den verschiedenen Konzentrations-Regionen ab (Morrison, 1969).

Der für PfICP bekannte K_i -Wert liegt bei 21 ± 8 pM (Pandey et al; 2006) und ist somit um den Faktor 1000 niedriger als in Tabelle 3.1 berechnet. Um ausschließen zu können, dass dieser erhebliche Unterschied nicht durch den MBP-Anhang oder das verkürzte Protein hervorgerufen wurde, wurden die Messungen auch für das vollständige Protein ohne MBP-Anhang durchgeführt. Die Werte blieben jedoch immer im gleichen Bereich. Die Diskrepanz dieses Unterschiedes ist deshalb nicht zu erklären. Um sicher zu gehen, dass die in Tabelle 3.1 berechneten Werte in realistischen Bereichen liegen, wurde auch der K_i -Wert für TcChagasin und FP-2 ermittelt, der laut Literaturangaben $1,7 \pm 0,53$ nM beträgt (Wang et al; 2007). Dieser K_i -Wert stimmt in etwa mit dem berechneten Wert aus Tabelle 3.1 überein ($4,8 \pm 1,7$ nM). Somit kann davon ausgegangen werden, dass der für PbICP-C berechnete K_i -Wert von $11,9 \pm 4,7$ nM durchaus realistisch ist.

Zusammenfassend ist PbICP ein potenter kompetitiver „tight-binding“-Inhibitor von Papain und Cathepsin-L-ähnlichen Proteasen. So beträgt die Dissoziationskonstante K_i von der Cathepsin-L-ähnlichen Protease Falcipain-2 und PbICP-C $11,9 \pm 4,7$ nM. PbICP hemmt ebenso gut die eben genannten Proteasen wie der C-Terminus, PbICP-C, alleine. PbICP-N übernimmt keinerlei inhibitorische Funktionen, da die N-terminale Domäne der Plasmodien ICP's aber ebenso konserviert ist wie die der C-terminalen Domäne, wird der N-Terminus höchstwahrscheinlich eine andere wichtige biologische Funktion übernehmen. Ob es sich dabei um eine Funktion für den Transport, bzw. die Lokalisation des Proteins handelt wird im nächsten Abschnitt untersucht.

3.1.2 PbICP-Lokalisation in pre-erythrozytären *P. berghei* Parasiten

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass PbICP während des gesamten Lebenszyklus exprimiert und prozessiert wird (Rennenberg; 2009). Wie in Abbildung 3-1 gezeigt werden konnte, liegt die Inhibitorfunktion des Proteins nur in der Chagasin-ähnlichen Inhibitor-domäne PbICP-C. Die Funktion der N-terminalen Domäne, PbICP-N, ist bisher unbekannt und sollte mit zwei unterschiedlichen Untersuchungsmethoden genauer bestimmt werden. In einem Versuchansatz sollte mittels der Strukturaufklärung von PbICP-N ein Hinweis auf die Funktion gefunden

werden, in einem weiteren Versuchsansatz sollten Lokalisationsstudien einen Hinweis auf die Funktion liefern.

Ein Ansatz für die Aufklärung der Funktion von PbICP-N im Rahmen dieser Arbeit sollte die Strukturaufklärung der Domäne durch Kristallisation sein. Die Arbeiten für dieses Projekt wurden an der Universität Lübeck in der AG Hansen durchgeführt. Hierzu wurde rekombinantes MBP-PbICP-N hergestellt und der MBP-Anhang mittels der Serinprotease Faktor Xa entfernt. Eine Expression von rekombinantem His-PbICP-N ist in vorangegangenen Arbeiten nicht gelungen (Rennenberg, 2009). Nach der Aufreinigung von PbICP-N mittels der Ionenaustauschchromatographie musste jedoch festgestellt werden, dass PbICP-N ohne Anhang massiv degradiert. Um die Degradationsprodukte zu entfernen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt, bei der das Protein der Größe nach aufgetrennt wird. PbICP-N sollte bei ca. 20 kDa eluieren, es konnte jedoch nur bei ca. 115 kDa Protein nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um eine Aggregation von PbICP-N-Proteinen. Somit war eine Kristallisation von PbICP-N leider aufgrund von Degradation und Aggregation des Proteins nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Ansatz sollte die Funktion der N-terminalen Domäne untersucht werden. Da es nicht gelungen war einen spezifischen Antikörper gegen PbICP-N herzustellen der verlässlich bei Lokalisationsstudien verwendet werden konnte, wurden alternativ transgene Parasiten generiert. Diese exprimierten konstitutiv ein GFP-Fusionsprotein der C-terminalen Domäne (PbICP-C-GFP) oder der N-terminalen Domäne (PbICP-N-GFP), unter Erhalt des Signalpeptids (Abb. 3-2A; Plasmidschemata siehe Abb. 2-1). Nach der Integration der Plasmide durch einen *single-crossover* in den *d/c-ssurra*-Lokus von *P. berghei* wurden die Parasiten mittels Pyrimethamin positiv selektioniert. Durch mikroskopische Überprüfung wurde die Expression des GFP-Fusionsproteins bestätigt. Die Subklonierung der Parasiten erfolgte über die Merosomen-Injektion (2.2.4.1.1) (Stanway *et al.*, 2009). Die Expression der GFP-Fusionsproteine konnte mittels Western-Blot-Analyse bestätigt werden (Abb. 3-2). Erfreulicherweise konnte keine bedeutende GFP-Abspaltung beobachtet werden. Die zusätzliche PbICP-C Bande in Abbildung 3-2C ist durch das endogene prozessierte PbICP-C zu erklären, die Bande des unprozessierten endogenem PbICP weist die gleiche Größe wie das Fusionsprotein PbICP-C-GFP auf und konnte daher nicht einzeln detektiert werden.

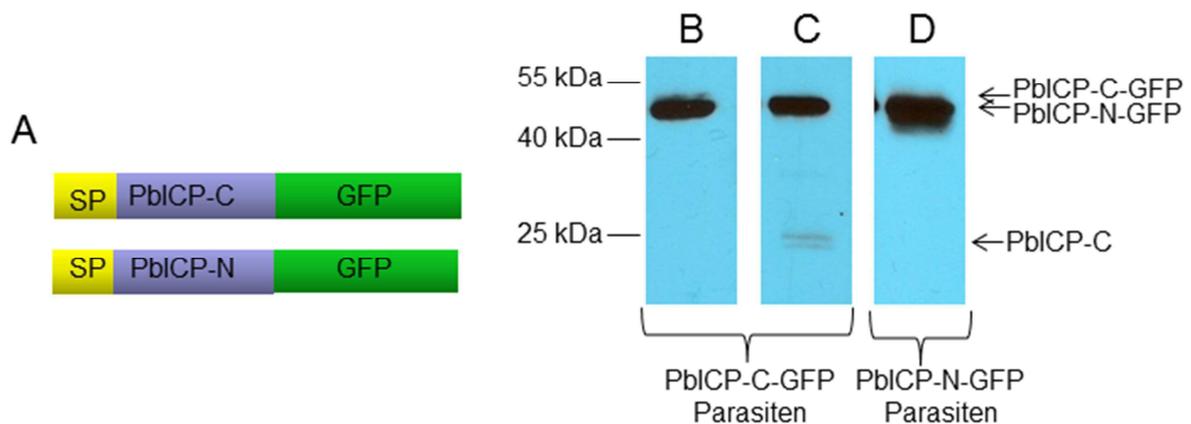


Abbildung 3-2: Westen-Blot-Analyse von PbICP-C-GFP- und PbICP-N-GFP-exprimierenden Parasiten. **A:** schematische Darstellung der Fusionsproteine PbICP-C-GFP und PbICP-N-GFP. SP = Signalpeptid GFP = *green fluorescent protein* **B:** Zellextrakte von PbICP-C-GFP-Parasiten wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und dann mit Anti-GFP-AK (Maus) behandelt. **C:** Adäquat hergestellte Extrakte von PbICP-C-GFP-Parasiten, wobei die Membran anschließend mit Anti-PbICP-C-AK (Kaninchen) inkubiert wurde. **D:** Adäquat hergestellte Extrakte von PbICP-N-GFP-Parasiten die mit einem Anti-GFP-AK (Kaninchen) getestet wurden. Anschließend wurden die HRP-gekoppelten Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-HRP oder Anti-Maus-HRP hinzugefügt. Die erwarteten Größen der Proteine betragen PbICP-C-GFP 50 kDa, PbICP-C 21 kDa, PbICP-N-GFP 46 kDa.

Im Folgenden wurde die Lokalisation der überexprimierten GFP-Fusionsproteine mit der Lokalisation von endogenem PbICP-C im Verlauf des Leberstadiums verglichen. Dazu wurden Parasiten, die ein Fusionsprotein mit der Volllänge des Proteins (PbICP-GFP) exprimierten, freundlicherweise von Dr. Annika Rennenberg (Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg) zur Verfügung gestellt (Rennenberg, 2009).

Die Sezernierung des endogenen PbICP durch Sporozoiten ist bekannt und konnte auch hier bestätigt werden (Abb. 3-3A) (Rennenberg *et al.*, 2010). Bei der Untersuchung der transgenen Parasitenlinien von intrazellulär vorliegenden Sporozoiten konnte eine Sezernierung von allen drei überexprimierten GFP-Fusionproteinen beobachtet werden (Abb. 3-3). Allerdings kolokalisierte nur das Volllängenprotein, PbICP-GFP, vollständig mit dem endogenen Inhibitor, beide verkürzten Formen wiesen nur eine partielle Kolokalisation auf.

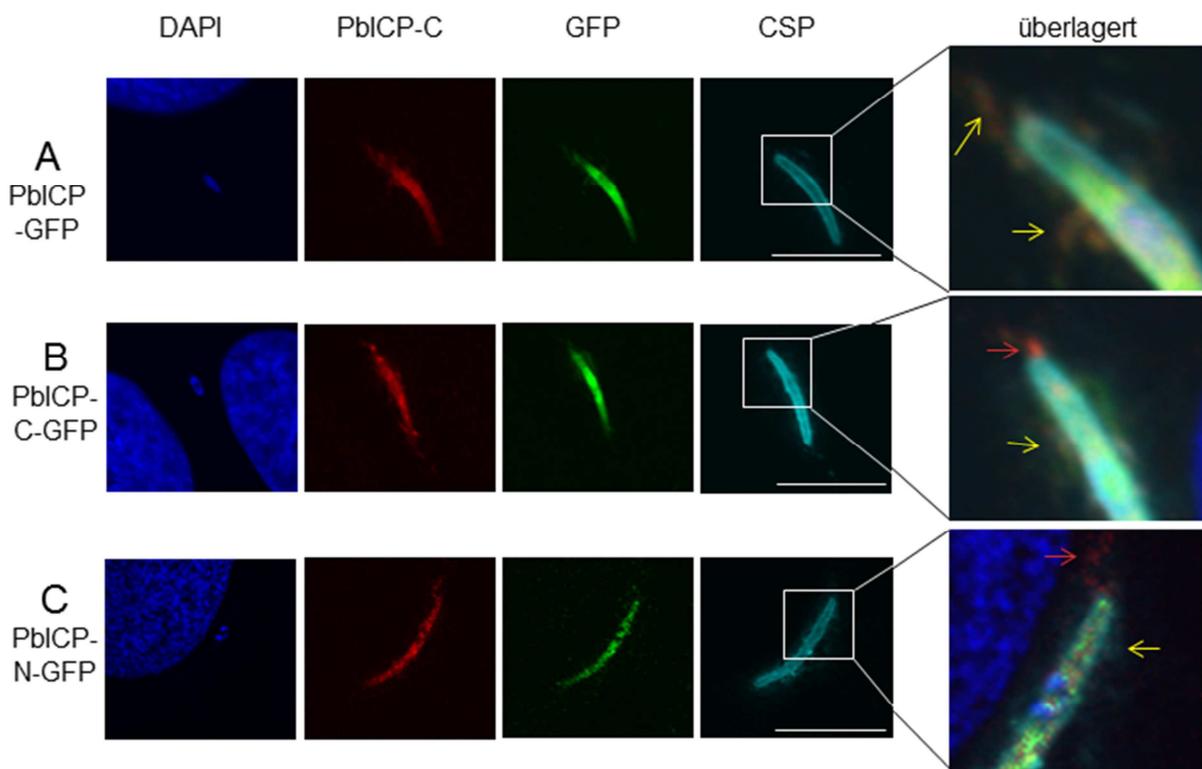


Abbildung 3-3: von intrazellulären Sporozoiten sezerniertes PbICP-GFP kolokalisiert mit endogenem PbICP; PbICP-N-GFP und PbICP-C-GFP werden dagegen nur teilweise sezerniert. HepG2-Zellen wurden mit den transgenen Parasitenlinien **A:** PbICP-GFP, **B:** PbICP-C-GFP und **C:** PbICP-N-GFP infiziert und 2 Stunden nach Infektion fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Anti-PbICP-C-AS (Ratte), Anti-GFP-AS (Maus) und Anti-CSP-AS (Kaninchen) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Ratte-Alexa Fluor® 594 (rot), Anti-Maus-Alexa® 488 (grün), Anti-Kaninchen Alexa® 647 (cyan) und dem DNA-Farbstoff DAPI (blau). Roter Pfeil: nur endogenes PbICP-C; gelber Pfeil: Kolokalisation von endogenem PbICP-C und PbICP-C-GFP. Die Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop konfokal analysiert. Größenbalken: 10 µM

Im frühen Schizontenstadium (Abb. 3-4) wurde endogenes PbICP-C im Zytosol als auch in der PV und der PVM lokalisiert. Ähnlich wie das PVM-Markerprotein UIS4 (upregulated in sporozoites) liegt PbICP in punktförmigen Strukturen in der PV vor und es sind PVM-Ausstülpungen zu erkennen, die zumeist in der Nähe des Wirtszellkernes lokalisieren. Die überexprimierten Proteine PbICP-GFP und PbICP-N-GFP kolokalisieren mit dem endogenen Protein (Abb. 3-4A und C). Das überexprimierte Protein liegt sowohl im Parasitenzytosol als auch in der PV und PVM vor. Im Gegensatz dazu liegt das überexprimierte PbICP-C-GFP nur im Parasitenzytosol vor und wird nicht in die PVM transportiert (Abb. 3-4C).

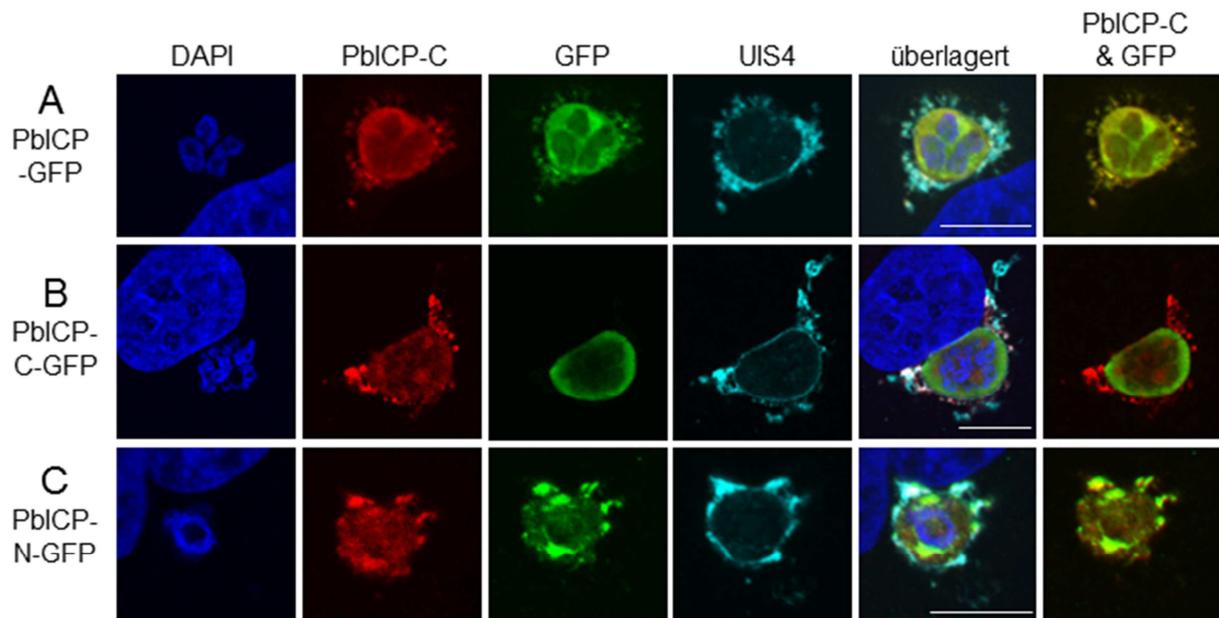


Abbildung 3-4: junge Schizontenstadien der transgenen Parasiten sekretieren PbICP-GFP und PbICP-N-GFP, aber kein PbICP-C-GFP. HepG2-Zellen wurden mit den transgenen Parasitenlinien **A:** PbICP-GFP, **B:** PbICP-C-GFP und **C:** PbICP-N-GFP infiziert und 24 Stunden nach Infektion fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Anti-PbICP-C-AS (Ratte), Anti-GFP-AS (Maus) und Anti-UIS4-AS (Kaninchen) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Ratte-Alexa Fluor[®] 594 (rot), Anti-Maus-Alexa[®] 488 (grün), Anti-Kaninchen Alexa[®] 647 (cyan) und dem DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop konfokal analysiert. Größenbalken: 10 μ M

Im späten Schizontenstadium liegt endogenes PbICP weiterhin zytosolisch und in der PV sowie der PVM vor. Es sind Ausstülpungen in die Wirtszelle zu beobachten, die größtenteils mit dem PVM-Marker Expl (**exported protein I**) kolokalisieren. Genau wie im frühen Schizontenstadium kolokalisieren die überexprimierten Proteine PbICP-GFP und PbICP-N-GFP mit dem endogenen Protein (Abb. 3-5A und C). Ebenso ist auch im späten Schizontenstadium zu beobachten, dass überexprimiertes PbICP-C-GFP nicht überall mit dem endogenen Protein kolokalisiert (Abb. 3-5B). PbICP-C-GFP liegt im Zytosol und der PVM des Parasiten vor, in den Ausstülpungen ist jedoch nur endogenes PbICP-C detektiert.

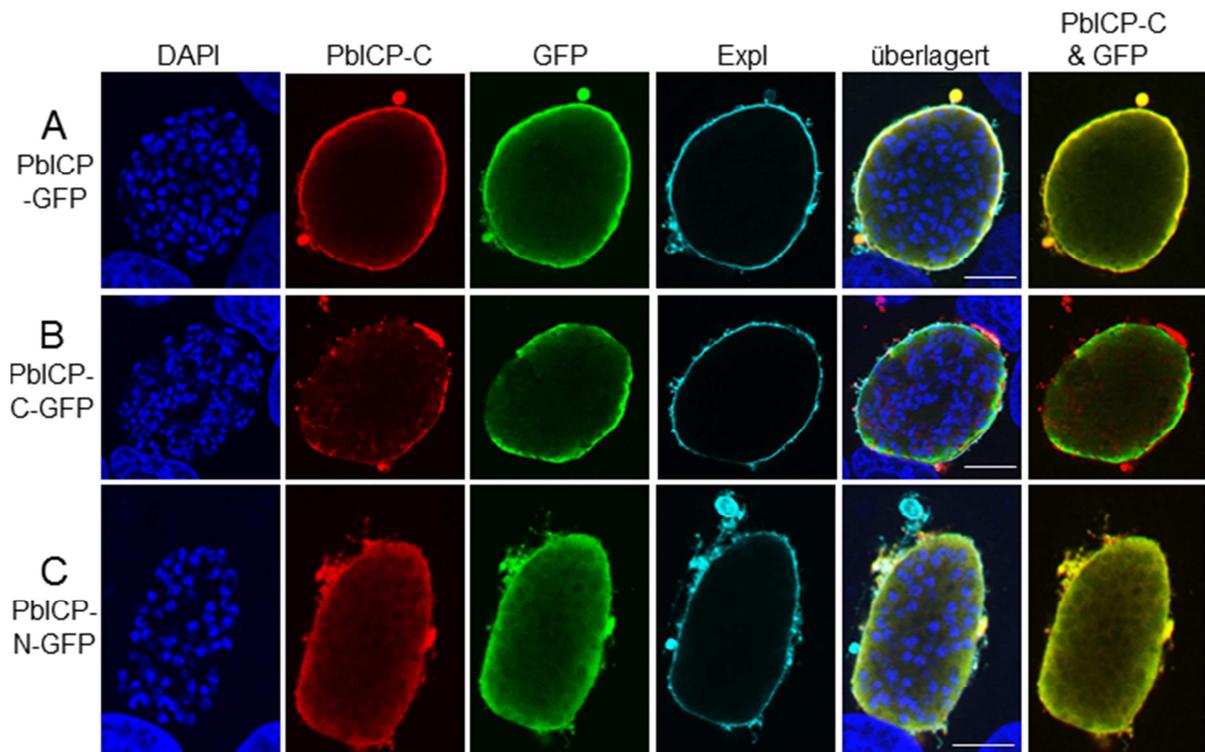


Abbildung 3-5: späte Schizontenstadien der transgenen Parasiten sekretieren PbICP-GFP und PbICP-N-GFP, aber kein PbICP-C-GFP. HepG2-Zellen wurden mit den transgenen Parasitenlinien **A:** PbICP-GFP **B:** PbICP-C-GFP und **C:** PbICP-N-GFP infiziert und 48 Stunden nach Infektion fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Anti-PbICP-C-AS (Ratte), Anti-GFP-AS (Kaninchen) und Anti-Expl-AS (Huhn) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Ratte-Alexa Fluor® 594 (rot), Anti-Kaninchen-Alexa® 488 (grün), Anti-Huhn Cy5 (cyan) und dem DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop konfokal analysiert. Größenbalken: 10 μ M

Bevor die Parasiten die Leberphase beenden, degradiert die PVM und das Parasitenzytosol diffundiert in die Leberzelle. Die Leberzelle löst sich dabei aus dem Zellverband ab, der Wirtszellkern kondensiert und ein untypischer Zelltod wird eingeleitet (Sturm *et al.*, 2006). Durch die Auflösung der PVM gelangen zytosolische Parasitenproteine, sowie Proteine aus der PV, in die Wirtszelle. PbICP scheint jedoch schon kurz vor diesem Prozess im Wirtszellzytosol vorzuliegen (Abb. 3-6).



Abbildung 3-6: endogenes PbICP-C liegt in der Wirtszelle vor, bevor das Parasitenzytosol in die Wirtszelle entlassen wird. HepG2-Zellen wurden mit Pbmcherry-Parasiten (rot) infiziert und 62 Stunden nach Infektion fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Anti-PbICP-C-AS (Ratte) und Anti-Expl-AS (Huhn) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Ratte-Alexa Fluor® 647 (cyan) und Anti-Huhn Cy2 (grün) sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop konfokal analysiert. Größenbalken: 10 µM

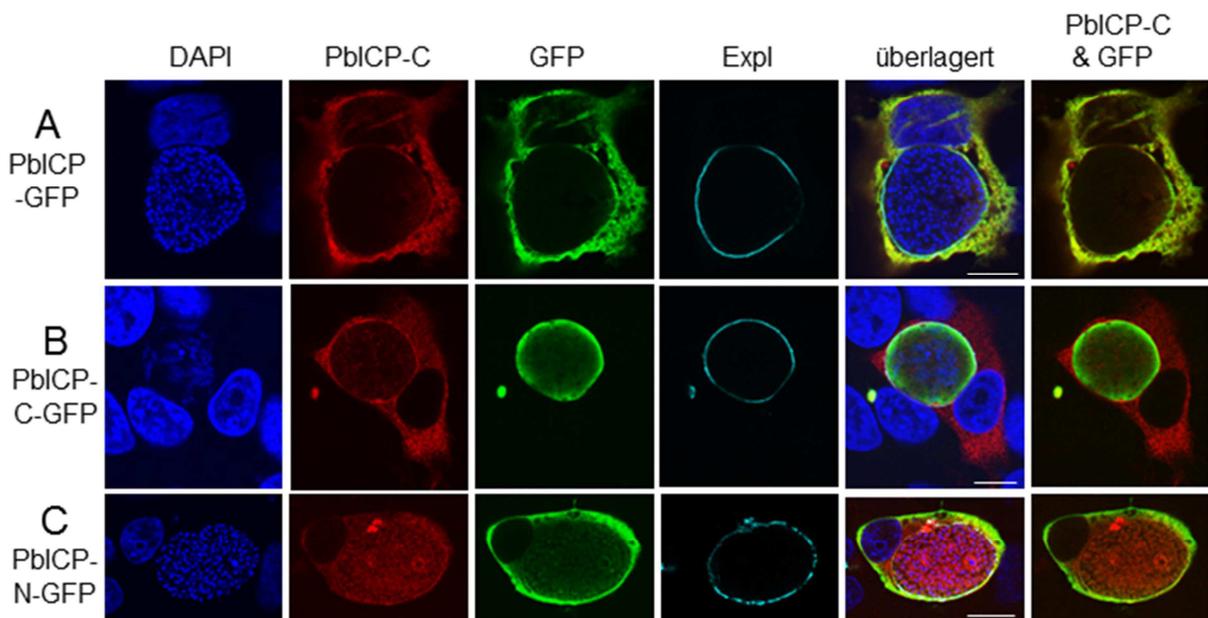


Abbildung 3-7: PbICP-GFP und PbICP-N-GFP Kolokalisieren am Ende der Leberphase mit dem endogenen Protein, auch in der Wirtszelle; PbICP-C-GFP bleibt im Parasitenzytosol lokalisiert, auch wenn das endogene Protein schon in der Wirtszelle vorliegt. HepG2-Zellen wurden mit den transgenen Parasitenlinien **A:** PbICP-GFP, **B:** PbICP-C-GFP und **C:** PbICP-N-GFP infiziert und 62 Stunden nach Infektion fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Anti-PbICP-C-AS (Ratte), Anti-GFP-AS (Kaninchen) und Anti-Expl-AS (Huhn) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Ratte-Alexa Fluor® 594 (rot), Anti-Kaninchen-Alexa® 488 (grün), Anti-Huhn Cy5 (cyan) und dem DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop konfokal analysiert. Größenbalken: 10 µM

Bei der Untersuchung der transgenen Parasiten vor der Beendigung der Leberphase kolokalisierten PbICP-GFP und PbICP-N-GFP weiterhin mit dem endogenen Protein (Abb. 3-7A und C). Das gilt auch für die PbICP-Freisetzung ins Zytosol der Wirtszelle. Hingegen konnte PbICP-C-GFP noch innerhalb des Parasiten festgestellt werden, während endogenes PbICP schon in der Wirtszelle vorlag (Abb. 3-7B).

Es kann also anhand der erhaltenen Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass die N-terminale Domäne von PbICP für die korrekte Lokalisation des Proteins in Hepatozyten zuständig ist. Die Sekretion von PbICP durch Sporozoiten scheint jedoch durch einen anderen Mechanismus reguliert zu werden, alle GFP-Fusionsproteine wurden sezerniert, wenn auch nur PbICP-GFP komplett mit dem endogenen Protein kolokalisierte. Im folgenden Abschnitt soll nun die Funktion von PbICP für Sporozoiten untersucht werden.

3.1.3 PbICP erfüllt eine wichtige Funktion bei der Infektion von Leberzellen

Die Sekretion von PbICP durch infektiöse Sporozoiten lässt auf eine wichtige Funktion des Inhibitors bei der Invasion von Leberzellen schließen. Für die Überprüfung dieser Vermutung wurden extrazelluläre Sporozoiten mit PbICP-C-spezifischen Antiserum neutralisiert und die Transmigration sowie die Invasion überprüft. Als Kontrolle diente die Neutralisation des Oberflächenproteins CSP mit Anti-CSP-Antikörpern, die die Invasion von Sporozoiten weitgehend verhindert, jedoch keinen Einfluss auf die Transmigrationsrate hat (Coppi *et al.*; 2005).

Bevor Sporozoiten die Leberzellen durch die Ausbildung einer PVM invadieren, transmigrieren sie zunächst einige Leberzellen. Die Parasiten bilden hierbei keine PVM aus und verletzen die Zellmembran bei der Transmigration. Durch die Zugabe von Fluorophor-gekoppeltem Dextran in das Medium kann die Verwundung der Zellen dokumentiert werden, da sie fluoreszieren, sobald die Zellmembran verwundet wird.

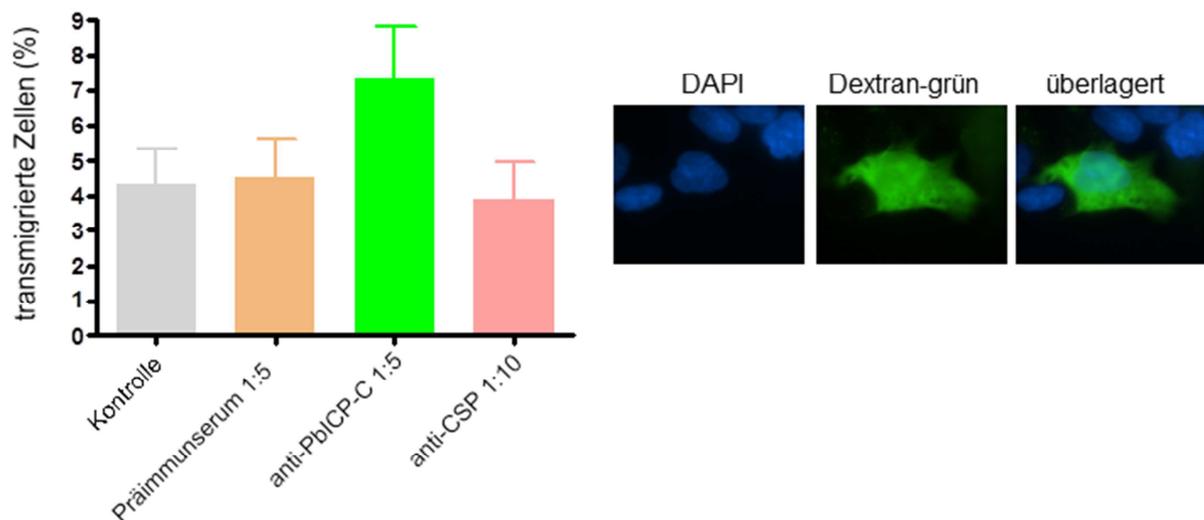


Abbildung 3-8: Die Neutralisation von PbICP führt zu einer erhöhten Transmigrationsrate. Pbmcherry-Sporozoiten wurden vor der Infektion von HepG2-Zellen mit PBS (Kontrolle), Präimmuns Serum (Kaninchen), Anti-PbICP-C-AS (Kaninchen) oder Anti-CSP-AS (Kaninchen) für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Sporozoiten mit dem fluorophorgekoppeltem Dextran Fluorescein (grün) vermischt und für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Nach der Fixierung wurden die Deckgläschen mit Anti-CSP-AS (Maus) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem Sekundärantikörper Anti-Maus-Alexa Fluor® 594 (rot) und dem DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Anzahl der Zellkerne wurde gezählt und auf 100% gesetzt, im Anschluss wurden die transmigrierten und dadurch auch fluoreszenten Zellen gezählt. Auf den Bildern ist ein Beispiel für eine transmigrierte Zelle dargestellt.

Durch die Antiserum-vermittelte Neutralisation von PbICP-C erhöht sich die Transmigrationsrate von Sporozoiten, der Effekt war jedoch nicht signifikant (Abb. 3-8).

Um die Invasionsrate der Parasiten nach Neutralisierung zu untersuchen, wurde ein Assay angewendet bei dem zwischen Sporozoiten innerhalb und außerhalb der Zellen unterschieden werden kann. Hierbei werden fluoreszierende Parasiten verwendet und durch vorsichtiges Fixieren ohne Permeabilisierung der Zellen werden bei einer anschließenden Antikörperfärbung nur die Parasiten außerhalb der Zellen von einem Anti-CSP-Antikörper erkannt (Abb. 3-9).

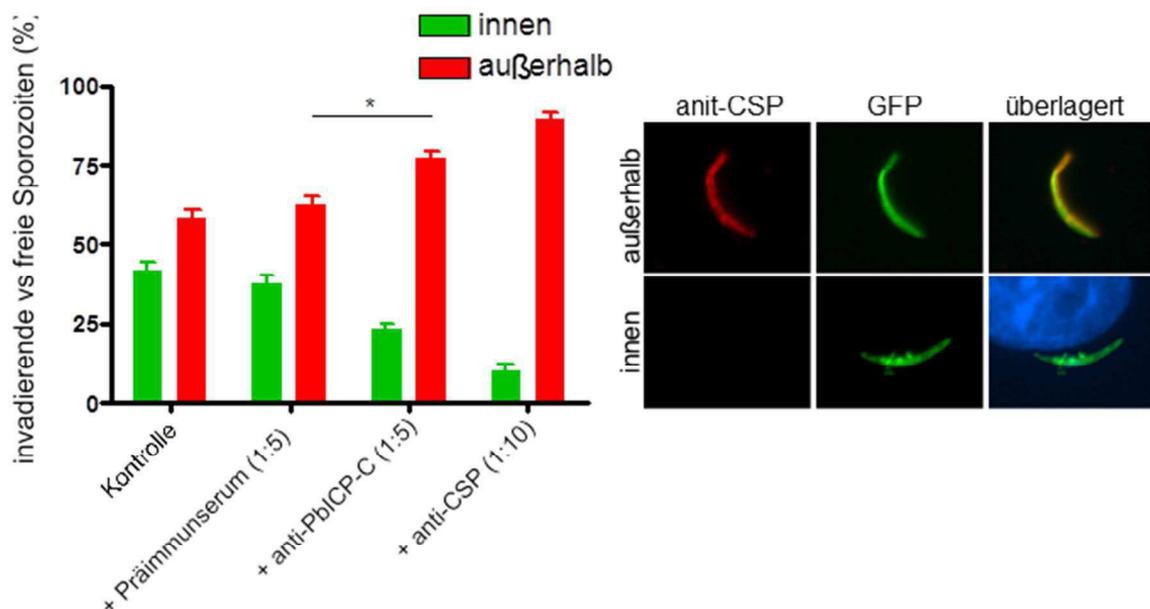


Abbildung 3-9: Die Neutralisation von PbICP führt zu einer verringerten Invasionsrate. GFPcon-Sporozoiten (grün) wurden vor der Infektion von HepG2-Zellen mit PBS (Kontrolle), Präimmunserum (Kaninchen), Anti-PbICP-C-AK (Kaninchen) oder Anti-CSP-AK (Kaninchen) für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Sporozoiten für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Nach der vorsichtigen Fixierung (2% PFA) wurden die Deckgläschen mit Anti-CSP-AK (Maus) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem Sekundäntikörper Anti-Maus-Alexa Fluor® 594 (rot) und dem DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Anzahl der grünen Sporozoiten beschrieb die Gesamtzahl der Sporozoiten, die Zahl der Roten die außerhalb der Zellen. Auf den Bildern ist ein Beispiel für eine Sporozoiten außerhalb (oben) und innerhalb (unten) der Wirtszelle dargestellt.

Die Neutralisation von PbICP-C durch ein Anti-PbICP-Antiserum hat einen negativen Einfluss auf die Invasionsrate der Sporozoiten (Abb. 3-9). Hierbei sinkt die Infektionsrate der Parasiten signifikant um mehr als die Hälfte (von 42 % auf 23 %). Wie erwartet hat die Antikörper-vermittelte Neutralisation von CSP ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Invasionsrate der Sporozoiten (Coppi *et al.*; 2005).

Die Neutralisation von PbICP mit Antiserum hat somit einen positiven Einfluss auf die Transmigrationsrate der Sporozoiten und einen negativen Einfluss auf die Invasionsrate der Parasiten. Es kann also davon ausgegangen werden, dass PbICP für die Regulation von Cysteinproteasen verantwortlich ist, die bei diesen Prozessen eine wichtige Funktion übernehmen. So wird beispielsweise CSP durch eine bisher nicht identifizierte Cysteinprotease prozessiert, deren Aktivität wiederum durch PbICP kontrolliert sein könnte (Coppi *et al.*, 2005).

3.1.4 Charakterisierung der PbICP-C-KO-Parasiten

Um zu überprüfen ob ein Protein für einen Organismus essentiell ist, bedient man sich häufig der reversen Genetik (*Knockout* des entsprechenden Gens). Zudem gibt die Charakterisierung der *Knockout*-Stämme die Möglichkeit, auf Funktionen des Proteins schließen zu können. Wie bereits in der Einleitung (Abschnitt 1.4.2) beschrieben, ist es Dr. Christine Lehmann (BNI) gelungen einen Parasitenstamm zu generieren, der während der Lebensphase in der Mücke einen konditionalen *Knockout* von PbICP-C vollzieht. Dieser PbICP-C-KO-Parasitenstamm wird im Folgenden charakterisiert.

3.1.4.1 Der konditionale *Knockout* von PbICP-C in Speicheldrüsen-Sporozoit en führt zu einer negativ beeinträchtigten Entwicklung von Leberparasiten

Für den konditionalen *Knockout* wurde ein Parasitenstamm benötigt, bei dem die Expression der Flippase, die für die Exzision des *pbicp-c*-Gens verantwortlich ist, durch den UIS4-Promotor reguliert wird. Dieser Promotor ist nur in infektiösen Sporozoit

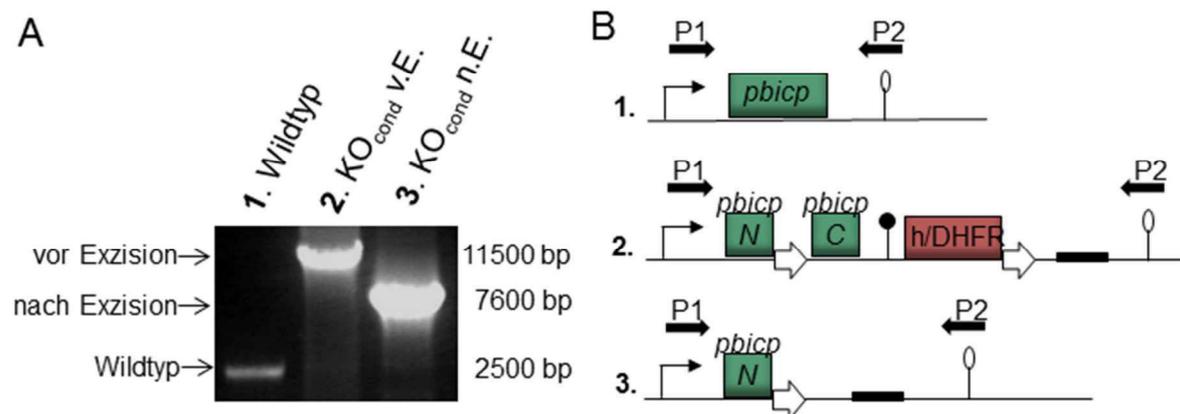


Abbildung 3-10: Die Exzision des *pbicp-c*-Gens konnte in Sporozoit
en der Speicheldrüse nachgewiesen werden. A: Für die PCR-Analyse wurde gDNA der Parasiten aus dem Blut (1. Wildtyp, 2. KO_{cond} v.E. = PbICP-C-KO_{cond} vor Exzision) und aus den Speicheldrüsen (3. KO_{cond} n.E. = PbICP-C-KO_{cond} nach Exzision) gewonnen. Die PCR-Analyse wurde mit dem Primerpaar 1806/1391 durchgeführt. **B:** schematische Darstellung der Primerbindungsstellen. P1 = 1806; P2 = 1391; ⇔ = FRT-sites; h/DHFR = Pyrimethaminresistenzkassette; ↗ = Promotor; ↘ = 3'UTR

Trotz erfolgreicher Exzision konnte das PbICP-C-Protein sowohl in Sporozoiten als auch in Trophozoiten mit IFAs noch mit Anti-PbICP-C-Antiserum detektiert werden (Abb. 3-11A und B). Dies ist durch die Stabilität des Proteins, die laut Vorhersagen zwischen 20 und 30 Stunden liegt (<http://web.expasy.org/protparam/>), und durch die restliche vorhandene mRNA zu begründen. Die Sekretion von PbIPC-C durch Sporozoiten konnte allerdings nicht mehr detektiert werden, was jedoch an der fehlenden Sensitivität der Detektionsmethode liegen kann. Auch die für Sporozoiten typische CSP-Sekretion konnte nur in sehr abgeschwächter Form detektiert werden (Abb. 11A). Ab ca. 24 Stunden nach der Infektion ist in IFAs kein PbICP-C mehr zu detektieren (Abb. 3-11C). In diesem Entwicklungsstadium beginnen die Parasiten mit der Schizogonie, wie bei den Kontrollparasiten deutlich an der zunehmenden Anzahl der Kerne beobachtet werden konnte. Die PbICP-C-KO_{cond}-Parasiten wiesen zu diesem Zeitpunkt nie mehr als einen Kern auf, ihre Entwicklung scheint also verzögert zu sein. Im Cytomerstadium beginnen sich die einzelnen Merozoiten auszubilden, was durch die Färbung des Merozoiten-Oberflächen-Proteins (MSP1) dokumentiert werden kann (Abb. 3-11D). Die PbICP-C-KO_{cond}-Parasiten weisen eine deutlich reduzierte Anzahl von Zellkernen auf und die MSP1-Färbung zeigt eine Fehllokalisierung des Proteins. Das MSP1-Protein liegt in netzartiger Struktur im Zytoplasma des Parasiten vor und es ist keine typische Färbung der Merozoitenmembranen zu beobachten. Zudem liegt ein untypischer Abstand zwischen der Parasitenmembran und der parasitären Vakuolenmembran vor, der auf eine beginnende Degenerierung der Parasiten hinweist.

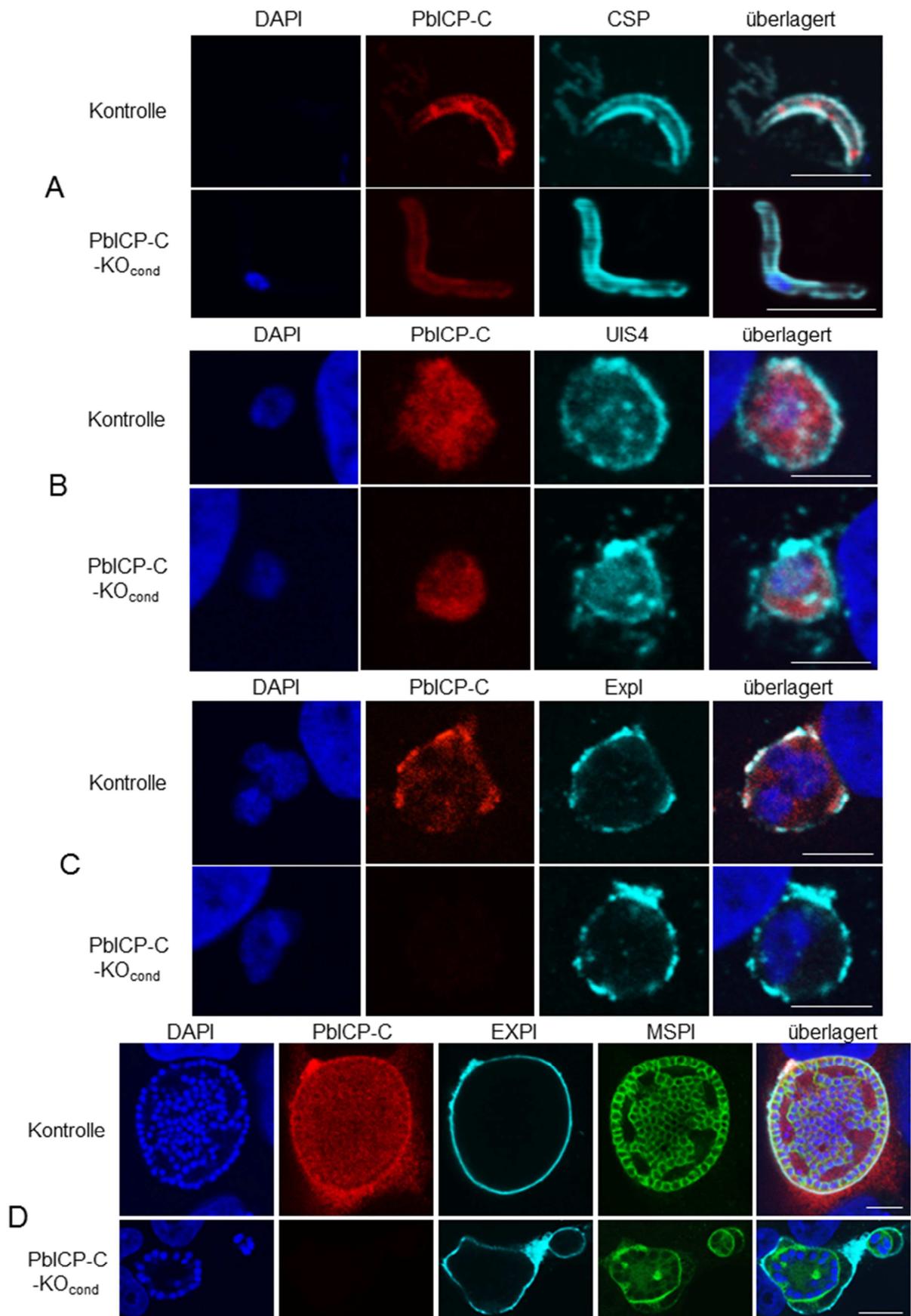


Abbildung 3-11: die Entwicklung von PbICP-C-KO_{cond}-Parasiten ist beeinträchtigt und verspätet. HepG2-Zellen wurden mit den transgenen Parasitenlinien PbNK65-Flp@UIS4 und PbNK65PbICP-C-KO_{cond} infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. >>>

A: Sporozoiten, Fixierung eine Stunde nach Infektion **B:** Trophozoit, Fixierung: 15 Std. nach Infektion **C:** frühes Schizontenstadium, Fixierung: 24 Std. nach Infektion infiziert **D:** Cytomerstadium, Fixierung 55 Std. nach Infektion Anschließend wurden die Deckgläschen mit Anti-PbICP-C-AS (Ratte), Anti-CSP-AS (Kaninchen) / Anti-UIS4-AS (Kaninchen) / Anti-Expl-AS (Huhn) und in D mit Anti-MSP1-AS (Maus) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Ratte-Alexa Fluor® 594 (rot), Anti-Kaninchen-Alexa® 488 (grün), bzw. in D mit Anti-Maus-Alexa® 488 (grün) und Anti-Huhn Cy5 (cyan), sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop konfokal analysiert. Größenbalken: 10 µM

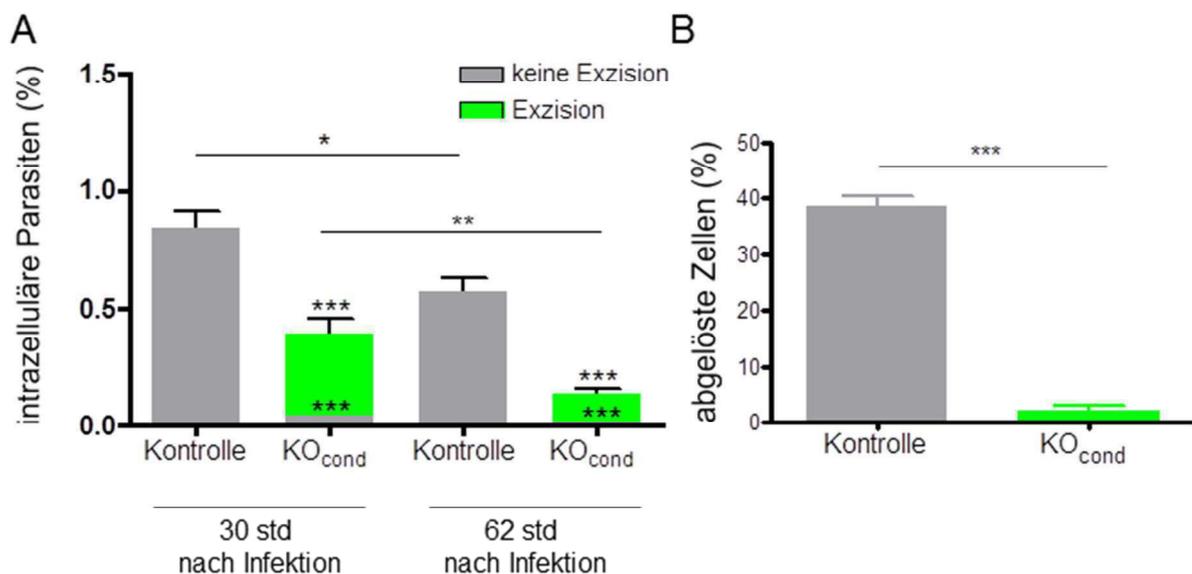


Abbildung 3-12: PblCP-C-KO_{cond}-Parasiten haben *in vitro* eine signifikant beeinträchtigte Entwicklung in der Leberphase. A: Invasionsassay. Es wurden je 10 000 Sporozoiten der Parasitenlinien auf HepG2-Zellen gegeben und 30 / 62 Std. nach Infektion fixiert. Die Anzahl der Parasiten pro Deckgläschen wurde am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und prozentual dargestellt. Da die Flippase nur mit einem single-crossover in die Parasitenlinie kloniert wurde, findet eine teilweise Revertierung statt, so dass keine Flippase exprimiert wird. So gab es auch Parasiten die keine Exzision des PblCP-C-Gens vollzogen, diese wurden separat gezählt und in die Statistik mit aufgenommen. **B:** Quantifizierung der erfolgreichen Beendigung der Leberphase. HepG2-Zellen wurden mit ca. 10 000 Sporozoiten der jeweiligen Parasitenlinien infiziert und die Hälfte der Deckgläschen 48 Std. nach Infektion fixiert. Die Anzahl der Parasiten wurde am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und auf 100 % gesetzt. Die andere Hälfte der Deckgläschen wurde in neue Vertiefungen der Kulturplatte überführt und die Anzahl der abgelösten Zellen 65 Std. nach Infektion gezählt und ins Verhältnis gesetzt. Die Detektion der Parasiten erfolgte mit den Primärantiseren Anti-*P.berghei*-AS (Maus), Anti-PblCP-C-AS (Ratte) und Anti-Expl-AS (Huhn). Anschließend wurde die Detektion mit den Sekundärantikörpern Anti-Maus-Alexa Fluor® 488 (grün), Anti-Ratte-Alexa Fluor® 594 (rot), Anti-Huhn Cy5 (cyan) und dem DNA-Farbstoff DAPI (blau) durchgeführt. Die abgelösten Zellen wurden mit dem DNA-Farbstoff Hoechst angefärbt.

Die beeinträchtigte Entwicklung der PbICP-C-KO_{cond}-Parasiten in der Leberphase in Abbildung 3-11 konnte zudem quantifiziert werden (Abb. 3-12). Schon 30 Std. nach der Infektion war die Anzahl der KO-Parasiten signifikant geringer, 60 Std. nach Infektion war der Unterschied zur Kontrolle noch größer und es war nur noch eine sehr geringe Anzahl der PbICP-C-KO_{cond}-Parasiten festzustellen (Abb. 3-12A). Die erfolgreiche Beendigung der Leberphase wurde um mehr als 90% verringert (Abb. 3-12B).

Die Infektiosität der PbICP-C-KO_{cond}-Parasiten wurde *in vivo* durch die Injektion von Sporozoiten und Merosomen überprüft und die Parasitämie der Mäuse über Blutaussstriche dokumentiert (Abb. 3-13). Während die Sporozoiten zunächst die Leberphasenentwicklung vollziehen müssen, bevor die Parasitämie dokumentiert werden kann, enthalten abgelöste, infizierte Zellen schon Merozoiten, die direkt Erythrozyten infizieren können.

Die Infektiosität der PbICP-C-KO_{cond}-Sporozoiten ist deutlich eingeschränkt, nur 2 von 10 infizierten Mäusen entwickelten eine Parasitämie (Abb. 3-13A und B). Die Injektion einer der wenigen *in vitro* erhaltenen abgelösten Zellen in eine Maus führte überraschenderweise ebenfalls zu der Ausbildung einer Blutphase (Abb. 3-13C). Eigentlich wurde erwartet, dass der *Knockout* des *pbicp-c*-Gens eine Entwicklung von Blutphaseparasiten nicht erlaubt, weil verschiedene Versuche eines *Knockouts* während der Blutphase fehlgeschlagen waren. Die durch die Injektion verschiedener Stadien entstandenen Parasitenlinien werden im Folgenden als PbICP-C-KO_{Sporo} und PbICP-C-KO_{Mero} bezeichnet. Die Parasiten PbICP-C-KO_{Sporo} wiesen zwar größtenteils die Deletion des *pbicp-c*-Gens auf, es konnte jedoch in PCR-Analysen das *pbicp-c*-Gen weiterhin nachgewiesen werden - es handelt sich also um eine Mischpopulation. Da durch die Injektion einer abgelösten Zelle eine klonale Parasitenlinie entstand, wurde bei weiteren Studien der Fokus auf die Untersuchung der Parasitenlinie PbICP-C-KO_{Mero} gesetzt.

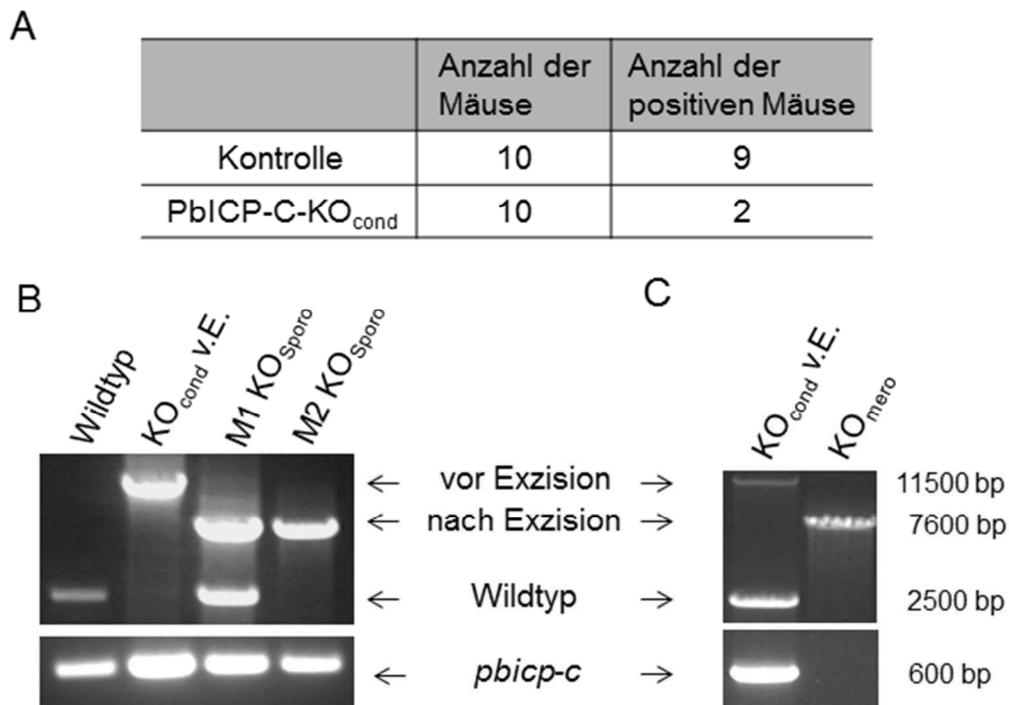


Abbildung 3-13: PbICP-C-KO_{cond}-Parasiten sind *in vivo* weniger infektiös

A: Jeweils 10 Mäuse wurden mit 5000 Sporozoiten der Parasitenlinien PbNK65-Flp@UIS4 oder PbNK65PbICP-C-KO_{cond} intravenös infiziert und die Parasitämie der Mäuse 20 Tage durch Blutaussstriche dokumentiert. **B:** PCR-Analyse der Blutstadien nach Sporozoiteninjektion **C:** PCR-Analyse der Blutstadien nach Merosomeninjektion. Für die PCR-Analyse wurde gDNA der Parasiten aus dem Blut der infizierten Mäuse gewonnen (Wildtyp = Flp@UIS4, KO_{cond} v.E. = PbICP-C-KO_{cond} vor Exzision, M1 KO_{Sporo} & M2 KO_{Sporo} = Parasitenlinie nach Sporozoiteninjektion, KO_{mero} = Parasitenlinie nach Merosomeninjektion). Die PCR-Analyse der Exzision wurde mit dem Primerpaar 1806 / 1391 durchgeführt, die Feststellung des PbICP-C-Gens mit dem Primerpaar 1168 / 588

3.1.4.2 Der komplette Verlust von PbICP-C verhindert die Invasion von Sporozoiten in Hepatozyten

Wie erwartet fand die Exzision von *pbicp-c* in den Sporozoiten der Speicheldrüsen statt. In Immunfluoreszenzanalysen konnten aber noch Reste des PbICP-C-Proteins bis ca. 24 Std. nach *in vitro* Infektion detektiert werden (Abb. 3-11). Dagegen exprimieren die klonierten PbICP-C-KO_{Mero}-Parasiten kein PbICP-Protein mehr. Mit diesen beiden Parasitenstämmen konnten die Auswirkungen des *pbicp-c-Knockouts* in allen Lebensstadien der Parasiten überprüft werden.

Wie bereits in Abbildung 3-13 C gezeigt, waren die PbICP-C-KO_{Mero}-Parasiten in der Lage, eine Blutphase in Mäusen auszubilden. Da die Blutphase weitgehend normal verlief, sollte als nächstes die Entwicklung der Parasiten in der Mücke untersucht werden, indem mit den infizierten Mäusen eine Blutmahlzeit mit *A. stephensi* Mücken

durchgeführt wurde. Allerdings war eine Quantifizierung der verschiedenen Mückenstadien im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, weil durch den Ausfall eines Inkubators keine verlässlichen Mückeninfektionen mehr erreicht werden konnten. In den Mitteldärmen der Mücken bildeten sich Oozysten der PbICP-C-KO_{Mero}-Parasiten, wobei die Anzahl jedoch sehr gering zu sein schien. Auch die Anzahl der Sporozoiten des *Knockout*-Stammes in den Speicheldrüsen schien reduziert zu sein. Eine Quantifizierung der Entwicklungsstadien wird derzeit an der Universität Bern und an der Universität Heidelberg durchgeführt und erste Ergebnisse bestätigen den ersten Eindruck meiner eigenen Analysen (Dr. Rebecca Stanway & Paul Burda, persönliche Mitteilung). Bei der Untersuchung der wenigen PbICP-C-KO_{Mero}-Sporozoiten aus den Speicheldrüsen fiel eine untypische Morphologie auf. Die meisten Sporozoiten wiesen nicht die typische Sichelform auf (Abb. 3-14A). Außerdem konnten weder die typische gleitende Fortbewegung der Sporozoiten noch die sonst typische Sekretion des Proteins CSP beobachtet werden (Abb. 3-14A). Die PbICP-C-KO_{Mero}-Sporozoiten waren auch nicht mehr in der Lage, HepG2-Zellen zu infizieren (Abb. 3-14B). Auch durch die Injektion von PbICP-C-KO_{Mero}-Sporozoiten konnte sich keine Parasitenpopulation etablieren (Abb. 3-14C). Die *in vivo* Experimente wurden gleichzeitig mit den in Abbildung 3-13 durchgeführten Experimenten durchgeführt, deshalb konnten als Vergleich die gleichen Kontroll-Infektionen von Mäusen genutzt werden (PbNK65Flp@UIS4-Parasiten).

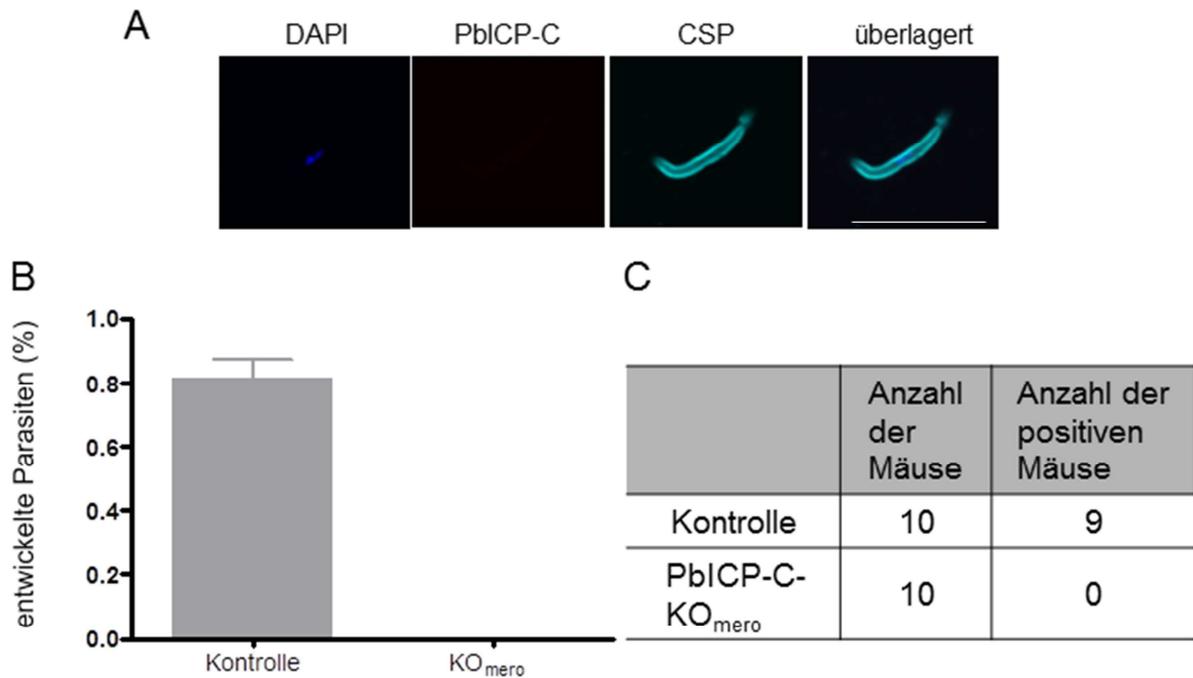


Abbildung 3-14: Pb1CP-C-KO_{Mero}-Sporozoit sind *in vitro* und *in vivo* nicht mehr infektiös. **A:** fixierter Pb1CP-C-KO_{Mero}-Sporozoit. Die Sporozoit

wurden 20 min im Inkubator auf Deckgläschen ohne Zellen inkubiert und im Anschluss fixiert. Die Färbung erfolgte mit den Primärantiseren Anti-CSP-AS (Kaninchen), Anti-Pb1CP-C-AS (Ratte) und den Sekundärantikörpern Anti-Kaninchen-Alexa Fluor® 647 (cyan), Anti-Ratte-Alexa Fluor® 594 (rot) und dem DNA-Farbstoff DAPI (blau) Größ

balken: 10 µM **B:** Invasionsassay. Es wurden je 10 000 Sporozoit

en der Parasitenlinien auf HepG2-Zellen gegeben und 30 Std. nach Infektion fixiert. Die Anzahl der Parasiten pro Deckgläschen wurde am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und prozentual dargestellt. Die Detektion der Parasiten erfolgte mit den Primärantikörpern Anti-P.berghei-AK (Maus), Anti-Pb1CP-C-AK (Ratte) und Anti-Expl-AK (Huhn). Anschließend wurde die Detektion mit den Sekundärantikörpern Anti-Maus-Alexa Fluor® 488 (grün), Anti-Huhn Cy5 (cyan) und dem DNA-Farbstoff DAPI (blau) durchgeführt. **C:** Jeweils 10 Mäusen wurden je 5000 Sporozoit

en der Parasitenlinien PbNK65-Flp@UIS4 oder PbNK65Pb1CP-C-KO_{Mero} intravenös infiziert und die Parasitämie der Mäuse für 20 Tage durch Bluta

usstriche dokumentiert.

Zusammenfassend ist Pb1CP somit nicht essentiell für Blutstadien und behindert nicht die Differenzierung zu Gametozyten. In den Mücken scheint die Entwicklung der Pb1CP-C-KO_{Mero}-Parasiten dagegen beeinträchtigt zu sein und die aus den Speicheldrüsen erhaltenen Sporozoit

en sind weder *in vitro* noch *in vivo* infektiös. Um sicher zu gehen, dass der eben beschriebene Phänotyp der Pb1CP-C-KO_{Mero}-Parasiten durch den Knockout von Pb1CP-C hervorgerufen wurde und nicht durch andere genetische Veränderungen, die durch die Modulation des Parasitengenoms auftreten könnten, wurde ein add-back-Parasitenstamm generiert, der im Folgenden Abschnitt charakterisiert wird.

3.1.4.3 PbICP-C-KO_{Mero}-*add-back*-Parasiten haben einen vitalen Phänotyp

Für die Generierung einer *add-back*-Parasitenlinie wurden die PbICP-C-KO_{Mero}-Parasiten mit einem Plasmid transfiziert, welches zu der konstitutiven Expression von PbICP-GFP führt. Es handelt sich um dasselbe Plasmid, welches für die Generierung der PbICP-GFP-Parasiten verwendet wurde (3.1.2). Als Kontrolle wurden Parasiten transfiziert, die konstitutiv GFP exprimierten.

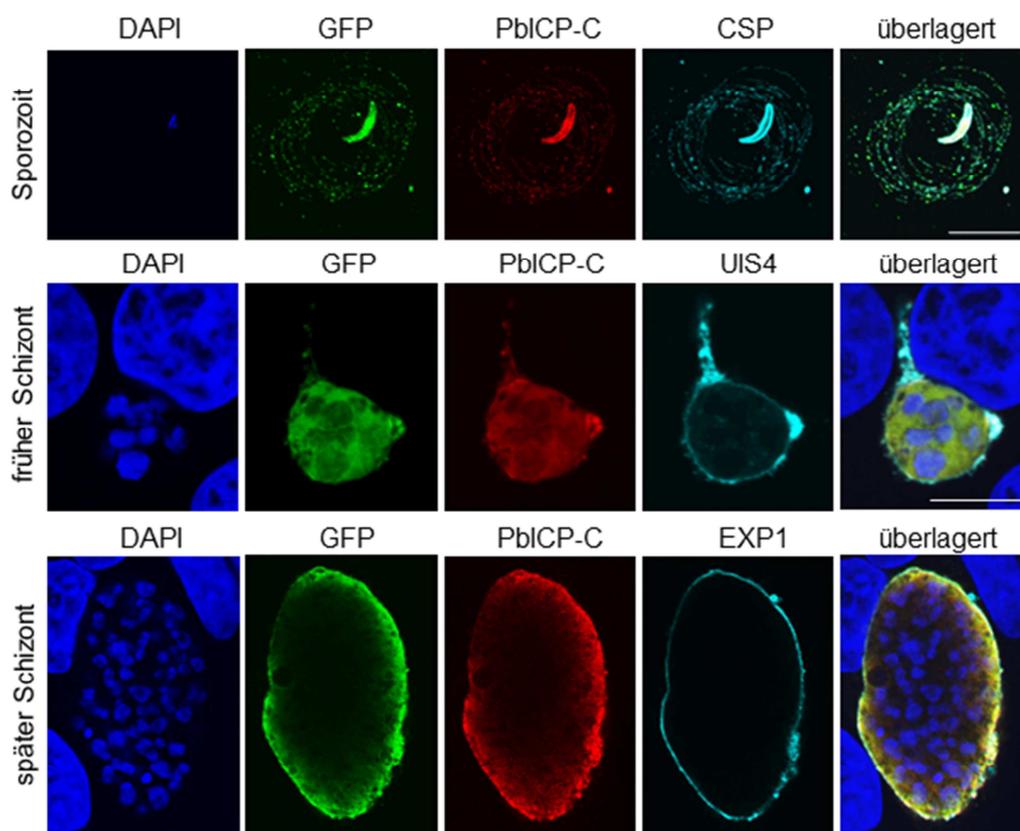


Abbildung 3-15: PbICP-C-KO_{Mero}-*add-back*-Parasiten weisen einen vitalen Phänotyp auf und entwickeln sich im normalen Zeitrahmen. HepG2-Zellen wurden mit PbNK65PbICP-C-KO_{Mero}-*add-back*-Parasiten infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. **A:** Sporozoiten. Vor der Fixierung wurden die Sporozoiten für 20 min im Inkubator auf Deckgläschen gegeben, um eine CSP-Sekretion beobachten zu können. **B:** früher Schizont. Fixierung: 24 Std. nach Infektion **C:** spätes Schizontenstadium, Fixierung: 48 Std. nach Infektion. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Anti-PbICP-C-AS (Ratte), Anti-GFP-AS (Maus) sowie Anti-CSP-AS (Kaninchen) / Anti-UIS4-AS (Kaninchen) oder Anti-Exp1-AS (Huhn) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Ratte-Alexa Fluor[®] 594 (rot), Anti-Maus Cy2 (grün) und Anti-Kaninchen-Alexa[®] 647 oder Anti-Huhn Cy5 (cyan), sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop konfokal analysiert. Größenbalken: 10 µM

Die Parasiten etablierten nach der Transfektion eine Blutphase in den Mäusen, die dann für eine Blutmahlzeit eingesetzt werden konnten. Die Entwicklung der PbICP-C-KO_{Mero}-*add-back*-Parasiten in der Mücke verlief ohne Auffälligkeiten und die aus den Speicheldrüsen gewonnenen Sporozoiten zeigten eine normale Motilität. Auch die *in vitro* Infektion von Leberzellen mit PbICP-C-KO_{Mero}-*add-back*-Parasiten war erfolgreich. Durch mikroskopische Untersuchungen konnte eine Entwicklung der *add-back*-Parasiten im normalen Zeitrahmen dokumentiert werden (Abb. 3-15). 24 Stunden nach Infektion konnte der Beginn der Schizogonie beobachtet werden und auch im späten Schizontenstadium schienen die Parasiten die Fähigkeit, sich normal zu entwickeln, wieder erlangt zu haben.

Diese Beobachtungen bestätigten sich auch durch die in Abbildung 3-16 dargestellten Experimente zur Quantifizierung der Parasitenentwicklung. Die Invasionsrate der PbICP-C-KO_{Mero}-*add-back*-Parasiten war sogar leicht erhöht gegenüber den Kontrollparasiten (Abb. 3-16 A), dies könnte mit der größeren Menge an vorhandenem PbICP zusammenhängen, die nun durch den konstitutiv aktiven *ef1alpha*-Promotor gesteuert ist. Das erfolgreiche Beenden der Leberphase durch die PbICP-C-KO_{Mero}-*add-back*-Parasiten ist geringfügig abgeschwächt (Abb. 3-16B), was ebenfalls an dem veränderten Expressionsmuster oder an dem großen GFP-Anhang liegen könnte. Die Injektion von PbICP-C-KO_{Mero}-*add-back*-Sporozoiten führte bei 4 von 5 Mäusen zu der Etablierung einer Blutphase (Abb. 3-16 C). Demnach vollziehen die Parasiten auch *in vivo* eine weitgehend normale Leberphasenentwicklung. Die *in vivo* Experimente wurden gleichzeitig mit den in Abb. 3-13 durchgeführten Experimenten durchgeführt, deshalb wurden auch hier als Vergleich die gleichen Kontroll-Infektionen von Mäusen gezeigt (PbNK65Flp@UIS4-Parasiten). Die Injektion von Merosomen der *Addback*-Parasiten führte ebenfalls zur Ausbildung einer Parasitenpopulation im Blut (Daten nicht gezeigt).

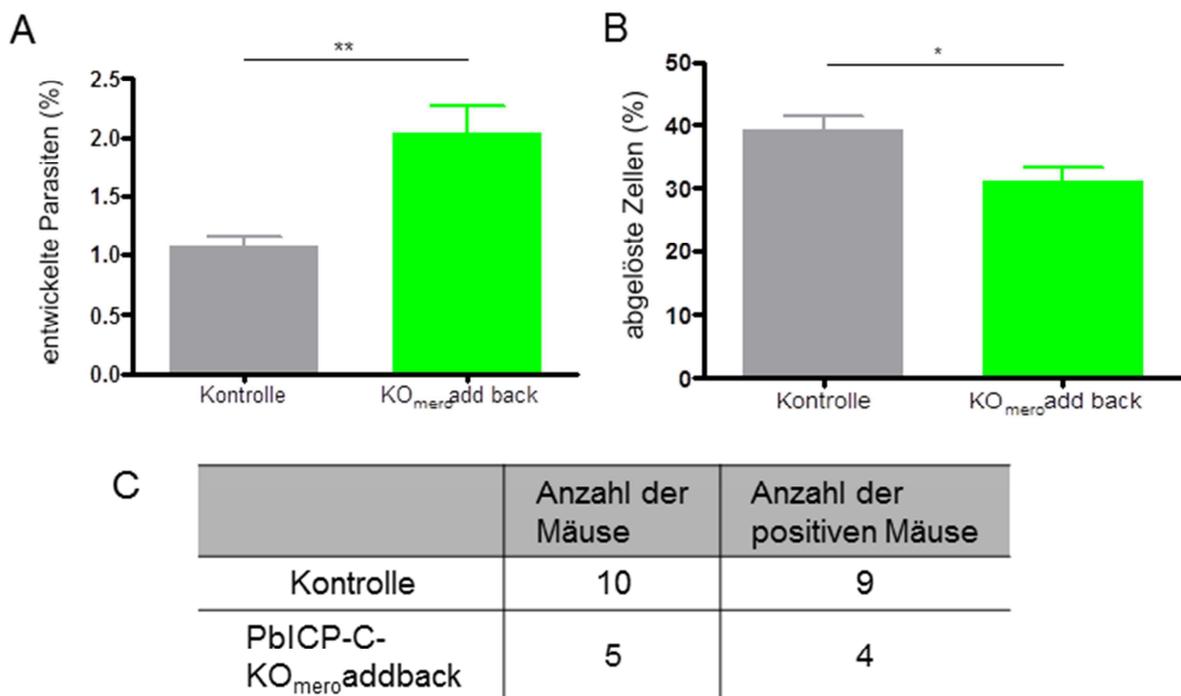


Abbildung 3-16: PbICP-C-KO_{Mero}-add-back-Parasiten zeigen *in vitro* und *in vivo* einen vitalen Phänotyp. **A:** Invasionsassay. Es wurden je 10 000 Sporozoiten der Parasitenlinien auf HepG2-Zellen gegeben und 30 Std. nach Infektion fixiert. Die Anzahl der Parasiten pro Deckgläschen wurde am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und prozentual dargestellt. **B:** Quantifizierung der erfolgreichen Beendigung der Leberphase. HepG2-Zellen wurden mit den jeweiligen Parasitenlinien infiziert und 48 Std. nach Infektion durch Lebendmikroskopie gezählt, diese Zahl wurde auf 100 % gesetzt. Die Anzahl der abgelösten Zellen wurde 65 Std. nach Infektion gezählt und ins Verhältnis gesetzt. Die abgelösten Zellen wurden mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. **C:** Es wurden 10, bzw. 5 Mäuse mit je 5000 Sporozoiten der Parasitenlinien PbNK65-Flp@UIS4 oder PbNK65PbICP-C-KO_{Mero}-add-back intravenös infiziert und die Parasitämie der Mäuse für 20 Tage durch Blutaussstriche dokumentiert.

Der Phänotyp des PbICP-C-*Knockouts* konnte also durch die Überexpression von GFP-PbICP mittels Transfektion eines Plasmides aufgehoben werden. Die PbICP-C-KO_{Mero}-*add-back*-Parasiten wiesen einen in allen Lebensphasen vitalen Phänotyp auf. Die Sporozoiten waren sowohl *in vitro* als auch in *in vivo* wieder infektiös und die Entwicklung der Leberparasiten verlief im normalen Zeitrahmen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der für die PbICP-C-KO-Parasiten beschriebene Phänotyp tatsächlich durch die Deletion des *pbicp-c*-Gens hervorgerufen wurde.

3.2 Cathepsin B-Proteasen spielen eine wichtige Rolle am Ende der Leberphase

Der Cysteinproteaseinhibitor PbICP weist in seinem Inhibitorspektrum eine Auffälligkeit auf, die nur für *Plasmodium* ICPs beschrieben ist: das Fehlen der Cathepsin B-Inhibition. Andere Inhibitoren der Familie I42 dagegen haben sehr wohl die Fähigkeit Cathepsin B zu hemmen (Monteiro *et al.* 2001; Sanderson *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2009). Eine Besonderheit in der Nähe der Proteasenbindungstasche von Cathepsin B ist der sogenannte *occluding Loop*, eine Extension im Vergleich zu Cathepsin L Proteasen (siehe Abb. 1-10A). Dieser *occluding Loop* tritt im hypothetischen Bindungsmodell von PbICP-C und Cathepsin B in einen sterischen Konflikt mit den *Loops* 0 und 6 von PbICP-C (Abb. 3-17A). Die lange Insertion in Loop 4, dessen Struktur nicht gänzlich aufgeklärt werden konnte, nimmt dagegen überraschenderweise keinen Einfluss auf die Bindung mit Cathepsin B. Dieses wurde in Kinetikanalysen mit verschiedenen Mutanten von PbICP-C, die alle eine Verkürzung in *Loop* 4 enthielten, bestätigt (Witt, 2007). Da *TcChagasin* keinen *Loop* 0 besitzt und *Loop* 6 eine andere Konformation als bei PbICP-C einnimmt, ist die Bindung von Cathepsin B und *TcChagasin* möglich (Abb. 3-17B).

Die fehlende Cathepsin B-Inhibition von PbICP könnte demnach auf eine wichtige Funktion einer Cathepsin B Protease hindeuten, die in Gegenwart von PbICP-C agieren soll. Hierzu sollte erwähnt werden, dass bisher keine Cathepsin B-ähnliche Protease für Plasmodien beschrieben wurde (Rosenthal, 2011). In einem gemeinsamen Projekt mit Dr. Christine Lehmann wurde im Folgenden die Funktion von Cathepsin B-ähnlichen Proteasen in der Leberphase von Plasmodien untersucht.

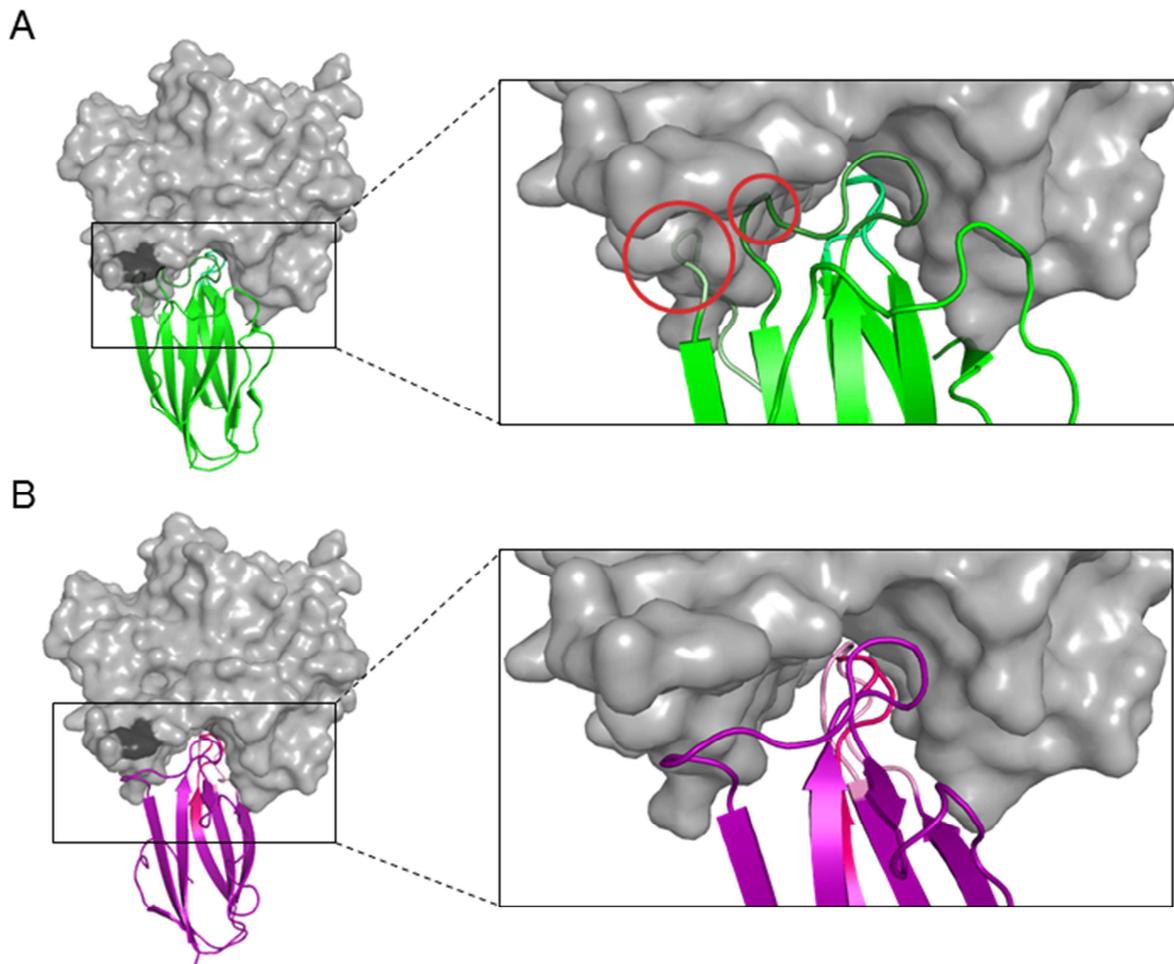


Abbildung 3-17: PblCP-C kann Cathepsin B aufgrund sterischer Behinderungen von Loop 0 und Loop 6 (PblCP-C) mit dem occluding Loop (Cathepsin B) nicht inhibieren. Die Strukturmodellierung und Bindungsüberprüfung wurde mit Pymol durchgeführt. **A:** Hypothetische Bindung von PblCP-C (grün; PDB: 3PNR. Hansen *et al.*, 2011) und Cathepsin B (grau; PDB: 3CBJ. Redzynia *et al.*, 2008). Loop 0: hellminze, Loop 2: mintgrün, Loop 4: Militärgrün, Loop 6: Dunkelgrün. Rote Kreise weisen auf den sterischen Konflikt von Loop 0 und Loop 6 mit dem occluding Loop von Cathepsin B hin. **B:** Bindung von Cathepsin B und TcChagasin (lila; PDB: 2H7W. Da Silva *et al.*, 2007) Loop 2: pink, Loop 4: hellrosa, Loop 6: lila

Die Cathepsin B-Aktivität während der Leberphase sollte durch den Einsatz des Cathepsin B-spezifischen irreversiblen niedermolekularen Inhibitors CA-074 überprüft werden (Abb. 3-18C). Die Cathepsin B-Spezifität von CA-074 konnte *in vitro* in Protease-Assays nachgewiesen werden (Abb. 3-18A). Zum Vergleich wurden die Studien auch mit dem generellen Cysteinproteaseinhibitor E-64 durchgeführt (Abb. 3-18A). Da CA-074 negativ geladen und deswegen nicht die Zellmembran durchdringen kann, ist ein Methylester als Anhang nötig, um Versuche an lebenden Zellen durchzuführen (Peppard and Knap, 1999). Nachdem der Inhibitor CA-074Me

in die Zellen gelangt ist, wird der Methylester entfernt (Buttle *et al.*, 1992). Die Membrangängigkeit des Inhibitors CA-074Me wurde auch experimentell überprüft. Hierzu wurden Zellen zunächst für 24 Std. mit dem Inhibitor inkubiert. Das hiervon gewonnene Zellextrakt wurde mit einem Breitspektrumssubstrat für C1 Proteasen oder mit einem Cathepsin B spezifischen Substrat versetzt und die Umsetzung des Substrates dokumentiert (Abb. 3-17B). Aufgrund der kompletten Hemmung von Cathepsin B-ähnlicher Proteaseaktivität kann davon ausgegangen werden, dass der Inhibitor CA-074Me tatsächlich membrangängig ist. Interessanterweise war kaum Cathepsin L Protease-Aktivität im Zellextrakt festzustellen, sodass eine gewisse unspezifische Hemmung von Cathepsin L-ähnlichen Proteasen in Betracht gezogen werden muss.

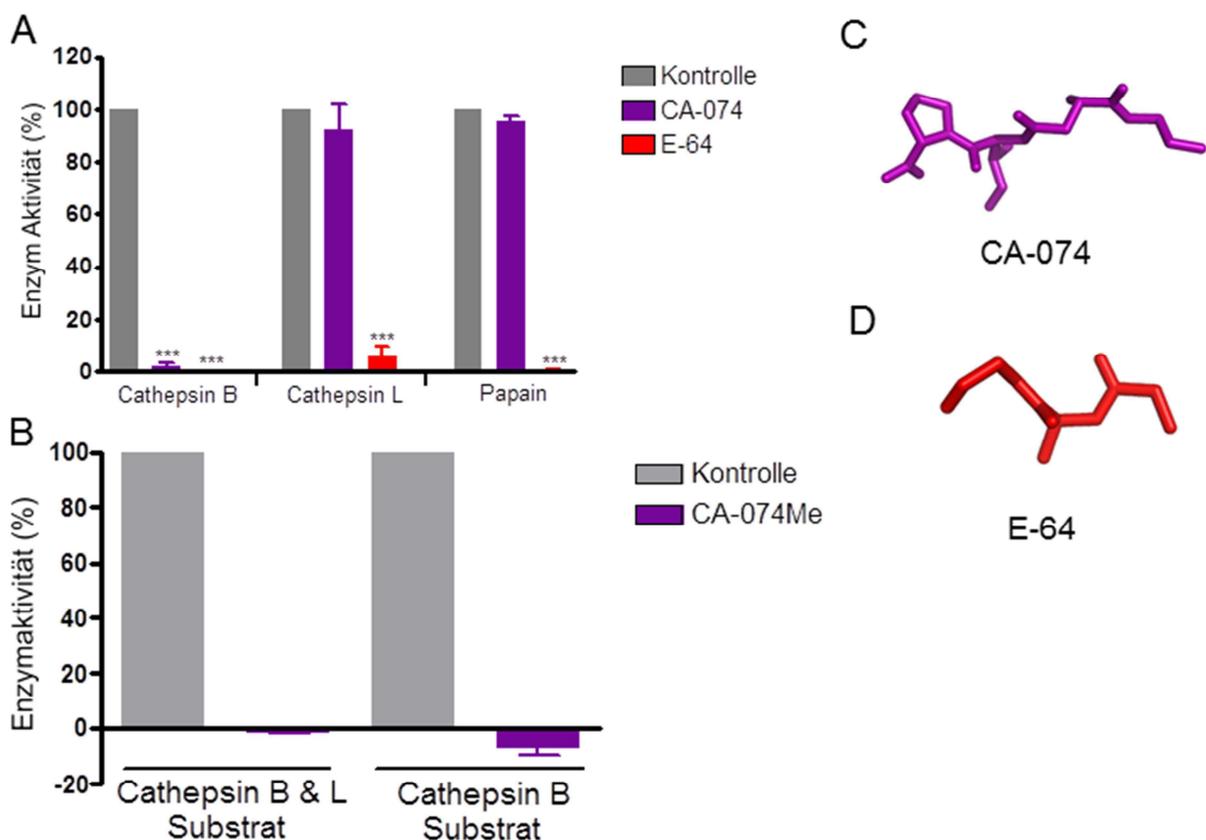


Abbildung 3-18: CA-074 ist ein spezifischer Cathepsin B Inhibitor; CA-074Me gelangt in HepG2-Zellen. **A:** Kinetikanalyse mit rekombinanten Proteasen. Die Messungen wurden am Fluorimeter durchgeführt. Die Konzentration der Inhibitoren betrug 1 μM . Die Bedingungen der Messungen können Tabelle 2.2.8 entnommen werden **B:** Kinetikanalyse mit Zellextrakt. Die Zellen wurden für 24 Std. mit 150 μM CA-074Me inkubiert, überschüssiger Inhibitor anschließend ausgewaschen. **C:** Struktur von CA-074, ein synthetisches Analog von E-64 (PDB: 1QDQ, Yamamoto *et al.*; 2000) **D:** Struktur von E-64 (PDB:3BPF, Kerr *et al.*; 2009)

Im Folgenden sollte nun die Auswirkung einer CA-074ME-Behandlung auf die Entwicklung von Leberparasiten untersucht werden.

3.2.1 CA-074Me-Behandlung führt zu der Bildung von Merofusosomen

Durch die Behandlung von Sporozoiten und späten Leberstadien mit E-64 konnte gezeigt werden, dass Cysteinproteasen eine wichtige Rolle bei der Infektion und der Beendigung der Leberphase spielen (Coppi *et al.*, 2005; Sturm *et al.*, 2006). Um die Funktion von Cathepsin B-ähnlichen Proteasen in der Leberphase zu untersuchen wurden die Experimente mit CA-074Me wiederholt.

Die Inkubation von Sporozoiten mit CA-074Me hatte keinen Einfluss auf deren Invasionsverhalten (Daten nicht gezeigt), was noch einmal die Spezifität des Inhibitors belegt. Bei der Behandlung von Leberphaseparasiten 48 Stunden nach Infektion mit CA-074Me konnten jedoch erhebliche Veränderungen festgestellt werden. Die Anzahl der abgelösten infizierten Zellen war signifikant verringert (Abb. 3-19B). Zudem waren die abgelösten Zellen nicht mehr gleichmäßig mit Merosomen gefüllt, sondern mit großen Vesikeln, die stark komprimiertes Parasitenmaterial enthielten. Diese Vesikel wurden als Merofusosomen bezeichnet, da es sich höchstwahrscheinlich um miteinander fusionierte Merozoiten handelt (Eickel *et al.*, 2013). Die DNA des Merozoiten war in dichten Strukturen gehäuft, so dass keine einzelnen Nuklei zu beobachten waren, obwohl diese zum Zeitpunkt des Behandlungsstarts schon existierten. Außerhalb der Merofusosomen konnten einige merozoitenartige Strukturen beobachtet werden, meist als Ausstülpungen der Merofusosomen. Diese Strukturen waren zwar mit parasitärem Zytoplasma (mcherry) gefüllt, enthielten jedoch keinen Nukleus. Es konnte auch keine Merozoiten-typische Bewegung innerhalb der Wirtszelle festgestellt werden. Zeitverlaufsstudien, die von Dr. Lehmann durchgeführt wurden, bestätigten den Eindruck der fusionierten Nuklei. Die Bildung von separierten Nuklei für die Merozoiten wurde zunächst vollzogen, dann folgte jedoch eine Fusion der Nuklei zu dichten DNA-Häufungen (Lehmann, 2012). Hierbei ist zu erwähnen, dass der Prozess der Merofusosomenbildung immer vor dem Zusammenbruch der PVM stattfand.

Wenn dagegen die Behandlung der Zellen erst 60 Stunden nach Infektion begonnen wurde, konnte weder der Merofusosom-Phänotyp noch eine verringerte Anzahl

abgelöster Zellen festgestellt werden (Abb. 3-19B). Die Störung der Parasitenentwicklung muss also zwischen 48 und 60 Stunden nach Infektion, im Laufe des Cytomerstadiums stattfinden.

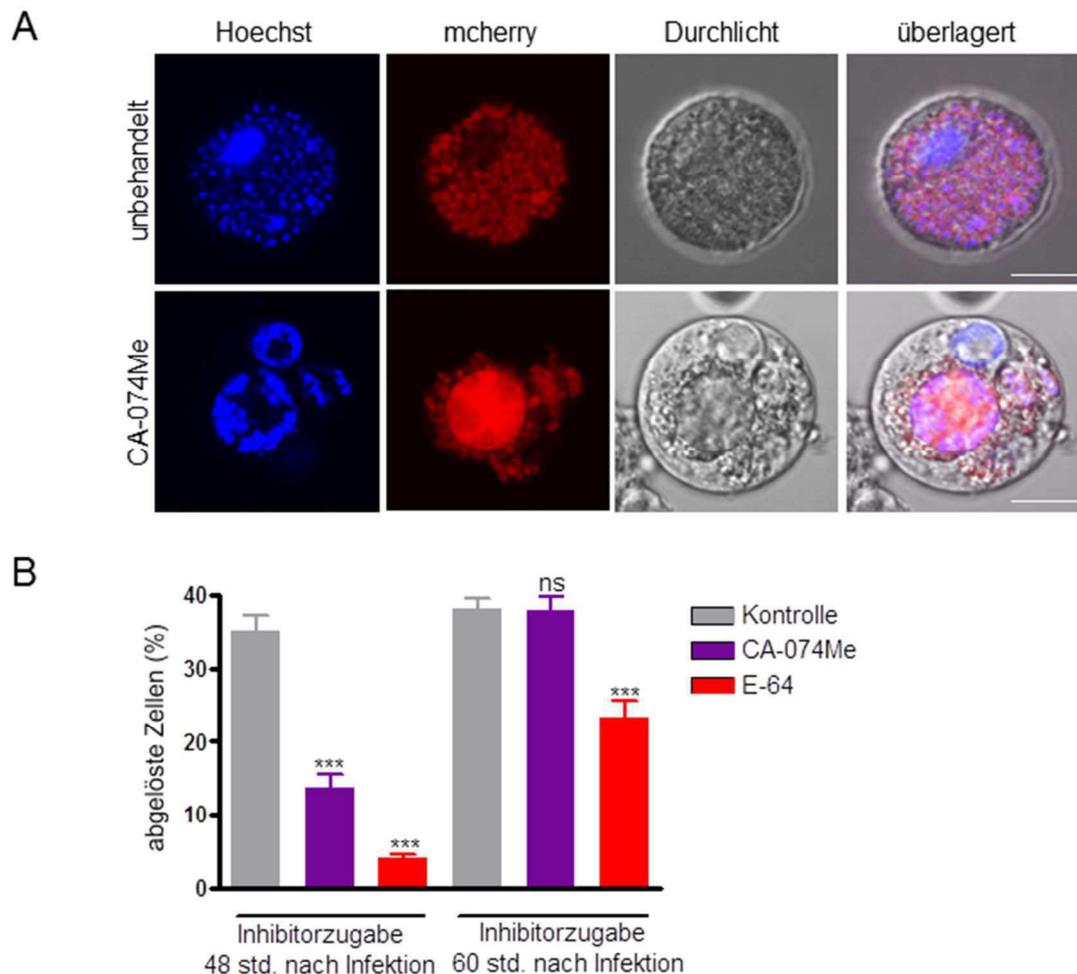


Abbildung 3-19: CA-074Me behandelte Parasiten bilden weniger abgelöste Zellen mit einem charakteristischen Phänotyp. A: konfokale Lebendmikroskopie von Pbmcherry-Parasiten in abgelösten Zellen. Die Inhibitorbehandlung wurde 48 Std. nach Infektion gestartet. Die DNA-Färbung wurde mit Hoechst 33342 vorgenommen. Größenbalken: 10 μ M **B:** Quantifizierung der erfolgreichen Beendigung der Leberphase. HepG2-Zellen wurden mit den jeweiligen Parasitenlinien infiziert und 48 Std. nach Infektion durch Lebendmikroskopie gezählt, diese Zahl wurde auf 100 % gesetzt. Die Behandlung der Parasiten mit 150 μ M CA-074Me (bzw. DMSO) wurde 48 Std oder 60 Std. nach Infektion gestartet. Die Anzahl der abgelösten Zellen wurde 65 Std. nach Infektion gezählt und ins Verhältnis zur der Parasitenzahl nach 48 Std. gesetzt. Die DNA-Färbung wurde mit Hoechst 33342 vorgenommen.

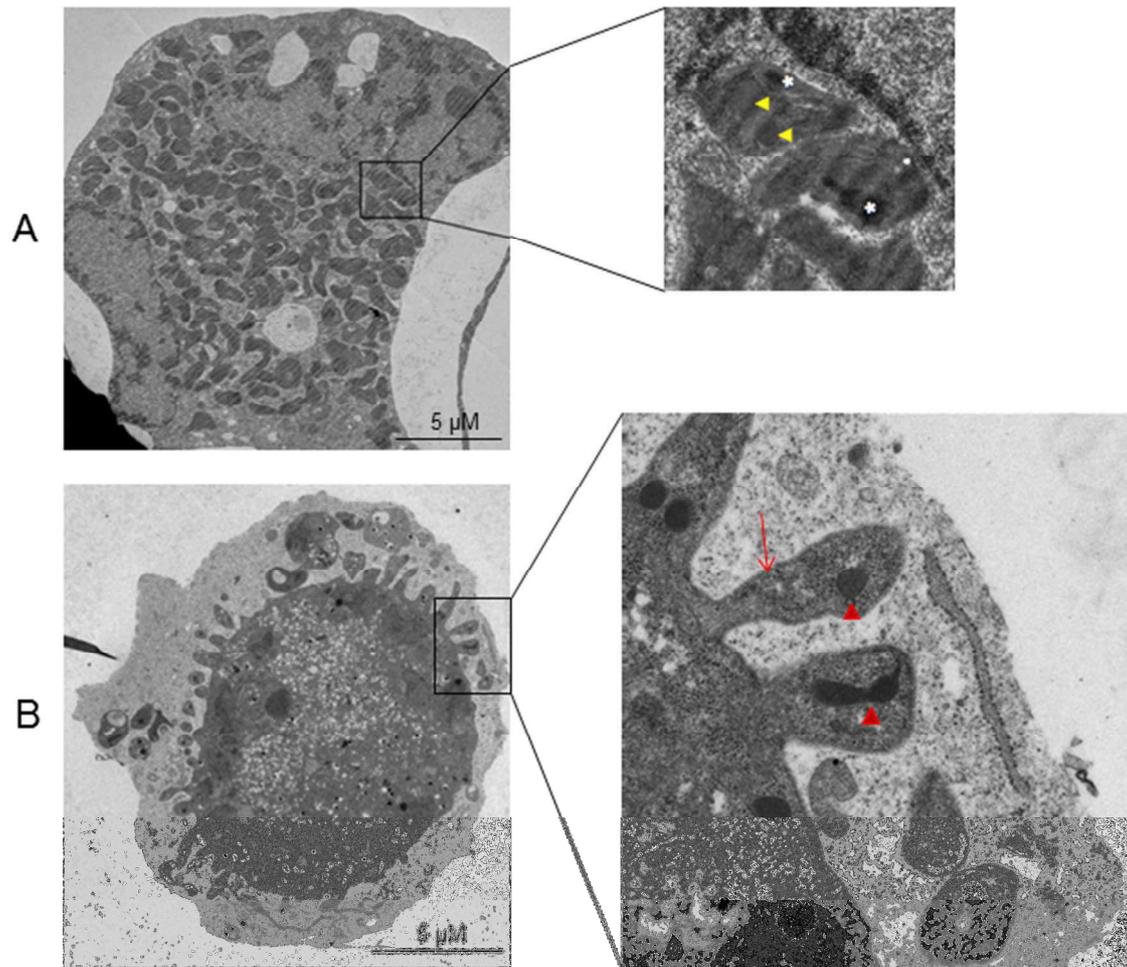


Abbildung 3-20: CA-074Me-behandelte Parasiten bilden große Vesikelstrukturen aus, die eine hohe Elektronendichte aufweisen. 48 Std. nach Infektion behandelte abgelöste Zellen wurden fixiert, anschließend wurden Ultradünnschnitte vorgenommen und elektronenmikroskopisch untersucht. Die Arbeiten am Elektronenmikroskop wurden freundlicherweise von Silke Retzlaff ausgeführt. **A:** DMSO-Behandlung **B:** CA-074Me-Behandlung. Weißer Stern = intakter Zellkern; gelbes Dreieck = Zellorganellen (bspw. Rhoptrien); rotes Dreieck = elektronendichte Strukturen mit untypischer Form; roter Pfeil = Membran

Um ein genaueres Bild der subzellulären Struktur der Merofusosomen zu bekommen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der abgelösten Zellen gemacht (Abb. 3-20). Diese bestätigten die Eindrücke der Lebendmikroskopie. Deutlich zu erkennen war das Merofusosom (Abb. 3-20B), in dem keine fertig ausgebildeten Merozoiten enthalten sind. Die seitlichen Anhänge des Merofusosoms enthielten bisher undefinierte, sehr elektronendichte Strukturen (Abb. 3-20B, rote Dreiecke), die jedoch weder Zellkernen, noch anderen, für Merozoiten-typische Organellen wie Rhoptrien entsprachen, da sie dafür eine zu hohe Elektronendichte aufwiesen. Es sind allerdings bisher undefinierte, sehr elektronendichte Strukturen zu

erkennen. Das Merofusosom wurde von einer doppelschichtigen Membran umschlossen (Abb. 3-20B, roter Pfeil).

Die Vitalität der Merofusosom-enthaltenen abgelösten Zellen wurde mittels TMRE-Färbung überprüft. Hierbei werden intakte Mitochondrien angefärbt. Verlieren die Mitochondrien ihr Membranpotenzial (durch das Absterben der Zelle), findet keine Färbung mehr statt. Die merozoitenartigen Strukturen neben dem Merofusosom zeigten eine Färbung an, auch wenn sie keine Zellkerne enthielten (Daten nicht gezeigt). Zudem wurde eine pSIVA-Färbung vorgenommen, bei der die Phosphatidylserine der äußeren Membranseite der Wirtszelle angezeigt werden (Graewe *et al.* 2011). Ist die Zelle vital, sind die Phosphatidylserinreste nur an der Innenseite der Membran lokalisiert und es findet keine Färbung statt. Es konnte keine Färbung der Membran festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Die CA-074Me-Behandlung von infizierten Zellen 48 Std. nach Infektion führt also zu der Bildung einer reduzierten Anzahl abgelöster Zellen, zudem weisen diese Zellen einen speziellen Phänotyp auf. Die Bildung von Merofusosomen verhindert die Ausbildung intakter Merozoiten, nach außen hin zeigen die Zellen jedoch einen vitalen Phänotyp.

3.2.2 CA-074Me-behandelte Leberparasiten können keine Blutphase etablieren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die abgelösten Merofusosom-enthaltenen Zellen nach außen hin einen vitalen Phänotyp präsentieren, sollte die Infektiosität überprüft werden. Hierzu wurden die abgelösten Zellen Mäusen injiziert (Tab. 3.2). Die CA-074Me behandelten, Merofusosom-enthaltenen, abgelösten Zellen sind nicht mehr infektiös.

	Anzahl der Mäuse	Anzahl der positiven Mäuse
unbehandelt	4	4
CA-074Me behandelt	4	0

Tabelle 3.2: CA-074Me-behandelte Leberparasiten können keine Blutphase etablieren
 Es wurden abgelöste Zellen intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die Dokumentation der Parasitämie wurde mittels Blutaussstrichen dokumentiert und zwei Wochen durchgeführt (sofern die Mäuse keine Parasitämie entwickelten).

Es kann davon ausgegangen werden, dass Cathepsin B-ähnliche Proteasen am Anfang der Leberphase keine Funktion übernehmen, wohl aber in der späten Leberphase. Durch die Behandlung mit CA-074Me bildeten die Parasiten Merofusosomen aus, die Anzahl der abgelösten Zellen nahm signifikant ab. Die abgelösten Zellen verloren ihre Infektiösität.

3.3 PbDPAP3 spielt eine wichtige Rolle am Ende der Leberphase

In Abschnitt 3.2 konnte gezeigt werden, dass eine Cathepsin B-ähnliche Protease eine wichtige Rolle in der späten Leberphasen-Entwicklung des Parasiten spielt. Allerdings scheint diese Protease nicht direkt für die Freisetzung der Merozoiten in die Wirtszelle und den ungewöhnlichen Wirtszelltod verantwortlich zu sein, da die Behandlung mit CA-074Me 60 Stunden nach Infektion keine Beeinträchtigung der Merozoitenfreisetzung aus der PVM in die Wirtszelle aufzeigte (Abb. 3-19 B). Daher wurde nach einer anderen Cysteinprotease gesucht, die nicht von PbICP inhibiert wird. Ein potenzieller Kandidat könnten die drei für Plasmodien beschriebenen Dipeptidylaminopeptidasen (**dipeptidyl aminopeptidasen**) sein, die zu den Cathepsin C Proteasen gehören. In der erythrocytären Phase ist bekannt, dass PfDPAP-1 an der Degradation von Hämoglobin beteiligt ist (Wang *et al.*; 2011); PfDPAP2 wird vermutlich nur in der Mücke exprimiert (Wang *et al.*; 2011). PfDPAP3 steht am Anfang einer Kaskade von Proteasenaktivierungen und übernimmt dadurch eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von Merozoiten in der Blutphase (Abb. 1-11) (Arastu-Kapur *et al.*; 2008). Durch die Blockade von PfDPAP3 in der Blutphase wird die Prozessierung, bzw. Aktivierung von PfSubtilisin-1 (Sub1) verhindert. PfSub1 ist wichtig für die Aktivierung von anderen wichtigen Proteinen wie bspw. PfMSP-1

(merozoite surface protein) oder PfSERA-5 (serine repeat antigen), die eine essentielle Rolle in der Blutphase spielen (Miller et al; 2002).

Anhand von Strukturmodellierung von PbICP-C und humanem Cathepsin C (Abb. 3-21) konnte davon ausgegangen werden, dass PbICP nicht in der Lage ist, Cathepsin C Proteasen zu inhibieren. Der *Loop 4* von PbICP-C verhindert die Bindung in die Substrattasche von Cathepsin C. Zudem könnten auch *Loop 2* und *Loop 6* Probleme bei der Bindung verursachen. Die Annahme, dass *Plasmodium* ICPs nicht Cathepsin C inhibieren können, stimmt mit Literaturangaben über PfICP überein (Pandey et al., 2006).

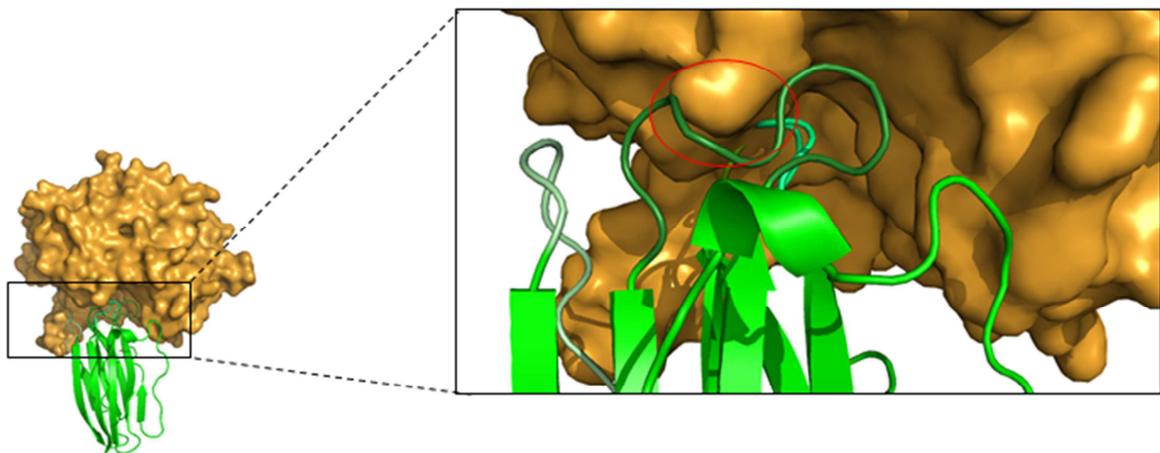


Abbildung 3-21: PbICP-C kann keine Cathepsin C-ähnlichen Proteasen inhibieren. Hypothetisches Bindungsmodell von Cathepsin C (gelb; PDB: 1K3B. Turk, D. et al.; 2002) und PbICP-C (grün. *Loop 0* = hellminze, *Loop 2* = mintgrün, *Loop 4* Militärgrün, *Loop 6* = Dunkelgrün). Roter Kreis: sterische Kollision von *Loop 4* und der Protease.

Über die Funktion von Dipeptidylaminopeptidasen in der Leberphase war noch nichts bekannt und so wurde zunächst das Expressionspektrum der Proteasen in der Leberphase von *Plasmodium berghei* überprüft (Abb. 3-22).

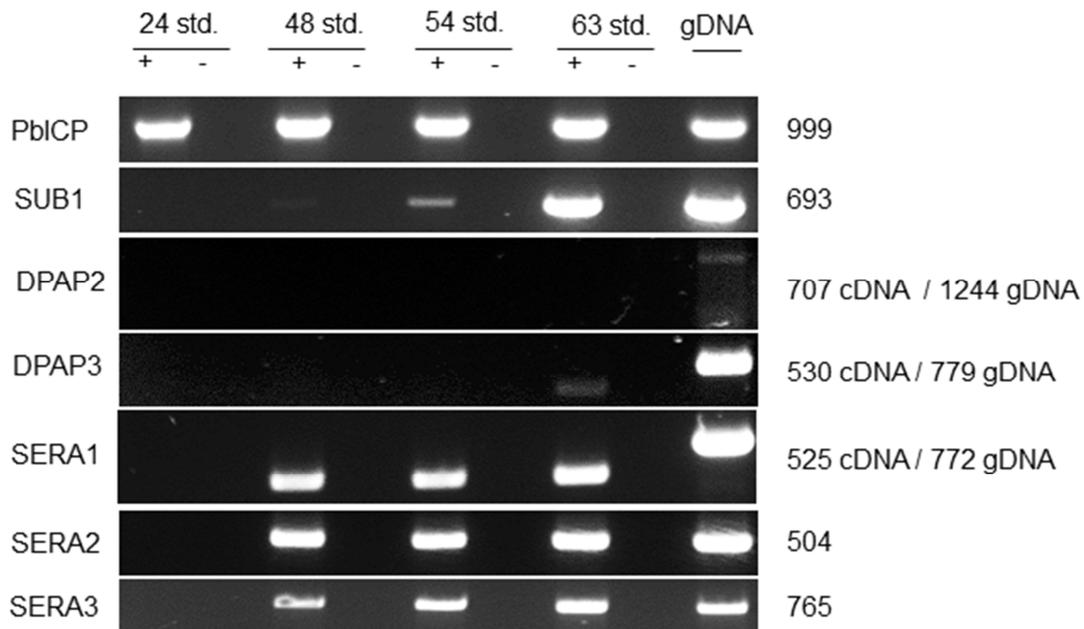


Abbildung 3-22: Expressionsprofil einiger Proteasen-mRNAs in der Leberphase. Es wurde RNA von Leberstadien 24, 48, 54 und 63 Std. nach Infektion isoliert und für eine RT-PCR-Analyse verwendet (+). Die Verunreinigung der cDNA durch gDNA konnte durch PCR-Ansätze ohne reverser Transkriptase (RT) ausgeschlossen werden (-). Die Funktionalität der Primerpaare wurde mit gDNA bestätigt. Größenangaben der Banden in Basenpaaren rechts neben dem Bild. Verwendete Primerpaare: PbICP 588 / 492, PbSub1 941 / 908, PbDPAP2 2051 / 2052, PbDPAP3 172 / 176, PbSERA1 179 / 180, PbSERA2 164 / 166, PbSERA3 342 / 358.

PbDPAP2 mRNA wird wie erwartet in der Leberphase nicht exprimiert, PbDPAP3 mRNA wird jedoch am Ende der Leberphase exprimiert und scheint daher ein interessanter Kandidat für nähere Untersuchungen zu sein. Für die Untersuchungen wurden zwei Versuchsansätze gewählt: die Überexpression von DPAP3 zu einem früheren Zeitpunkt in der Leberphase (3.3.1) und die Inhibition von DPAP3 durch niedermolekulare Inhibitoren (3.3.2).

3.3.1 Der Einfluss einer gesteuerten DPAP3-Expression auf die Parasitenfreisetzung am Ende der Leberphase

Wenn DPAP3 an der Freisetzung tatsächlich beteiligt ist, sollte es durch eine Überexpression von DPAP3 zu einem früheren Zeitpunkt in der Leberphase zu einer vorzeitigen Freisetzung des Parasiten aus der PVM kommen. Um das zu überprüfen wurden Parasiten generiert, die zusätzlich rekombinantes DPAP3 unter einem leberphasenspezifischen Promotor (Helm *et al.*, 2010) exprimierten, welches früher

als das endogene DPAP3 exprimiert wurde. Es wurden zwei Parasitenlinien generiert, wobei beide über einen *single-crossover* integriert wurden. Sie unterschieden sich nur durch einen V5-Anhang an DPAP3 (Plasmidkonstrukte in Abb.2-1). Diese Parasitenlinien werden im Folgenden als DPAP3* und V5-DPAP3 bezeichnet. Die Entwicklung beider Parasitenlinien wurde dokumentiert, es wurden keine Unterschiede festgestellt. Die frühere Expression von DPAP3 wurde durch cDNA-Analysen (Daten nicht gezeigt) und mittels Immunfluoreszenzanalyse bestätigt (Abb. 3-23).

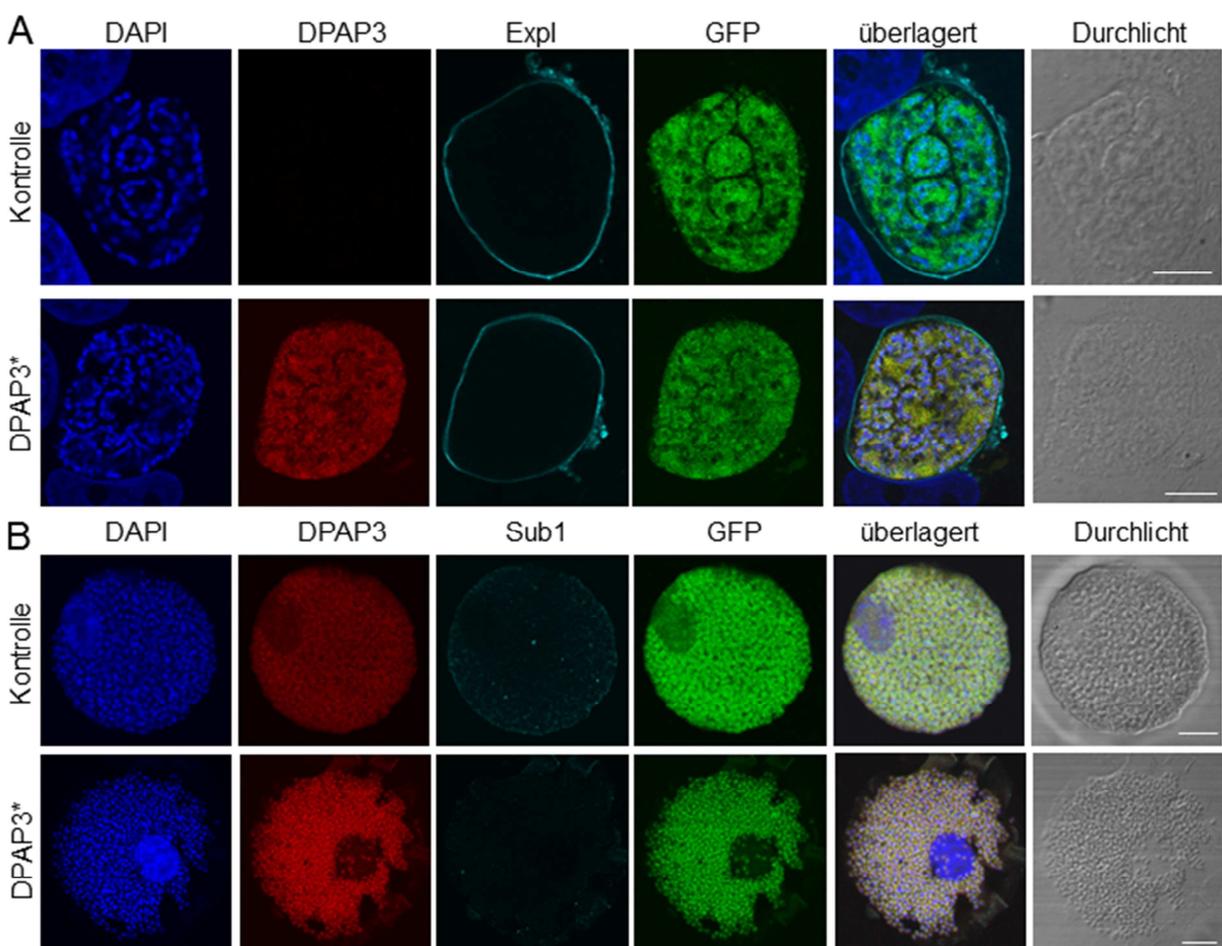


Abbildung 3-23: DPAP3*-Parasiten exprimieren DPAP3 früher als Wildtyp-Parasiten. HepG2-Zellen wurden mit PbANKAGFPcon- oder PbANKADPAP3*-Parasiten infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. **A:** Cytoemerstadien. Die Fixierung: 55 Std. nach Infektion. **B:** abgelöste infizierte Zelle. Fixierung: 65 Std. nach Infektion (Cytospin) Anschließend wurden die Deckgläschen mit Anti-DPAP3-AS (Maus), Anti-GFP-AS (Kaninchen, bzw. Ratte) und Anti-Expl-AS (Huhn) / Anti-Subtilisin-AS (Kaninchen) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Maus-Alexa Fluor® 594 (rot), Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Ratte Alexa® 488 (grün) und Anti-Kaninchen-Alexa® 647 oder Anti-Huhn Cy5 (cyan), sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop konfokal analysiert. Größenbalken: 10 µM

DPAP3*-Parasiten wiesen schon im Schizonten- und Cytomerstadium (Abb. 3-23A zeigt Cytomerstadien) eine DPAP3-Färbung auf, wohingegen Wildtyp-Parasiten erst kurz vor dem Ablösungsprozess der Wirtszelle eine positive DPAP3-Färbung zeigten (Abb. 3-23B zeigt die Färbung von abgelösten Zellen). Die Parasiten zeigten während des gesamten Lebenszyklus einen vitalen Phänotyp. Bei der genaueren Untersuchung der Leberstadien konnten jedoch Unterschiede zu den Wildtyp-Parasiten beobachtet werden (Abb. 3-24).

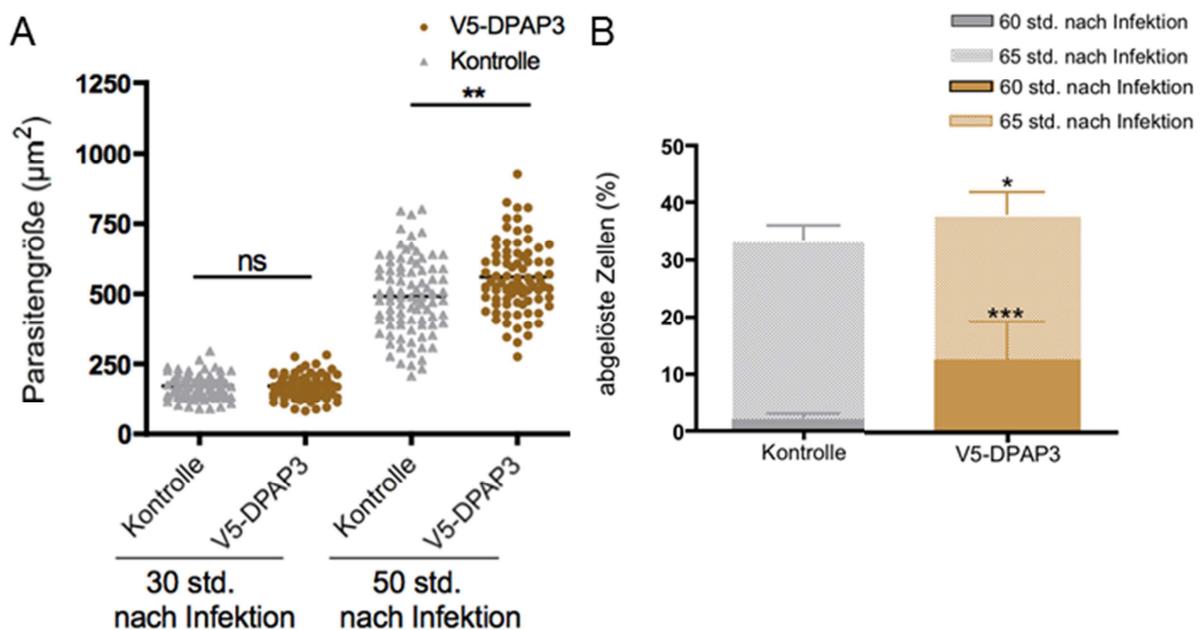


Abbildung 3-24: V5-DPAP3-Parasiten entwickeln sich früher und erfolgreicher **A:** Messung der Parasitengröße mittels *density slicing*. HepG2-Zellen wurden mit den Parasitenlinien PbANKAGFPcon oder PbANKAV5-DPAP3 infiziert und 30, bzw. 50 Std. nach Infektion fixiert und gemessen. Um auszuschließen zu können, dass es sich um einen Unterschied in der GFP-Lokalisation handelt (in PM oder auch in PVM), wurden die Parasiten in fixiertem Zustand vermessen. Die Größenmessung wurde im roten Kanal des Anti-*P.berghei*-Serums durchgeführt. Hierzu wurden die Deckgläser mit Anti-GFP-AK (Kaninchen) und Anti-*P.berghei*-AK (Maus) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Maus-Alexa Fluor® 594 (rot), Anti-Kaninchen Alexa® 488 (grün) sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (blau). **B:** Quantifizierung der erfolgreichen Beendigung der Leberphase. HepG2-Zellen wurden mit den jeweiligen Parasitenlinien infiziert und 48 Std. nach Infektion durch Lebendmikroskopie gezählt, diese Zahl wurde auf 100 % gesetzt. Die Anzahl der abgelösten Zellen wurde 60 und 65 Std. nach Infektion gezählt und ins Verhältnis gesetzt. Die abgelösten Zellen wurden mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt.

Für die Subklonierung der Parasiten wurden abgelöste Zellen 60 Std. nach Infektion abgenommen und intravenös in Mäuse injiziert (Daten nicht gezeigt), anschließend wurde die Entwicklung der Parasiten dokumentiert. Die Parasiten entwickelten sich

zunächst normal (Abb. 3-24A 30 Std. nach Infektion). Zum Ende der Leberphase konnten jedoch Unterschiede beobachtet werden. So waren die V5-DPAP3-Parasiten 50 Std. nach Infektion größer (Abb. 3-24A). Die Annahme, dass es sich hierbei um eine schnellere Entwicklung der Parasiten handelte, wurde durch das frühere Ablösen der infizierten Zellen bestätigt (Abb. 3-24B). Schon 60 Std. nach Infektion lösten sich mit über 13% signifikant mehr infizierten Zellen ab als in der Kontrolle, in der sich zu diesem Zeitpunkt nur knapp 3% der infizierten Zellen abgelöst hatten. 65 Std. nach Infektion war die auch Gesamtzahl der abgelösten Zellen höher als in der Kontrolle, die transgenen Parasiten konnten die Leberphase somit erfolgreicher beenden. Die abgelösten Zellen zeigten einen normalen Phänotyp.

Die frühere Expression von DPAP3 führt zu einer früher und erfolgreicherer Beendigung der Leberphase. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das überexprimierte Protein funktional war, und dass DPAP3 eine Rolle am Ende der Leberphase übernimmt. Diese Annahme wird im folgenden Abschnitt durch die Inhibition von DPAP3 überprüft.

3.3.2 Die Inhibition von DPAP3 führt zu der Arretierung von späten Leberphaseparasiten

Um weitere Hinweise auf die Funktion von DPAP3 in der späten Leberphase zu erhalten, wurden Inhibitorexperimente durchgeführt. In einem Artikel der Arbeitsgruppe Bogyo wurden die für PfDPAP3-spezifische niedermolekulare Inhibitoren, SAK-1 und JCP410, vorgestellt (Arastu-Kapur *et al.*, 2008). Bei dem niedermolekularen Inhibitor JCP410 handelt es sich um ein Dipeptid Vinylsulfon (Abb. 3-25). Durch die Inhibition von PfDPAP3 in Blutstadien wurde die Ruptur der Erythrozyten blockiert (Abb. 1-11). Die Entwicklung der Parasiten von Ringstadien zu Schizonten hingegen verlief normal. Auch die Morphologie der Schizonten wies keine Auffälligkeiten auf (Arastu-Kapur *et al.*, 2008).

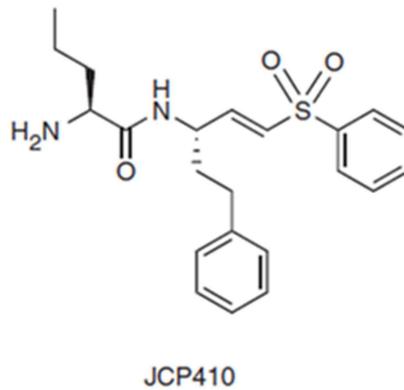


Abbildung 3-25: Strukturformel des niedermolekularen PfDPAP3-Inhibitors JCP410
(Arastu-Kapur *et al.*; 2008)

Freundlicherweise wurde mir der Inhibitor JCP410 zur Verfügung gestellt, sowie der bisher nicht veröffentlichte Inhibitor ML4188S, der über eine Spezifität gegenüber PbDPAP3 verfügt (Edgar deu Sandoval, persönliche Mitteilung). Beide Inhibitoren bilden eine kovalente irreversible Bindung mit der Protease aus.

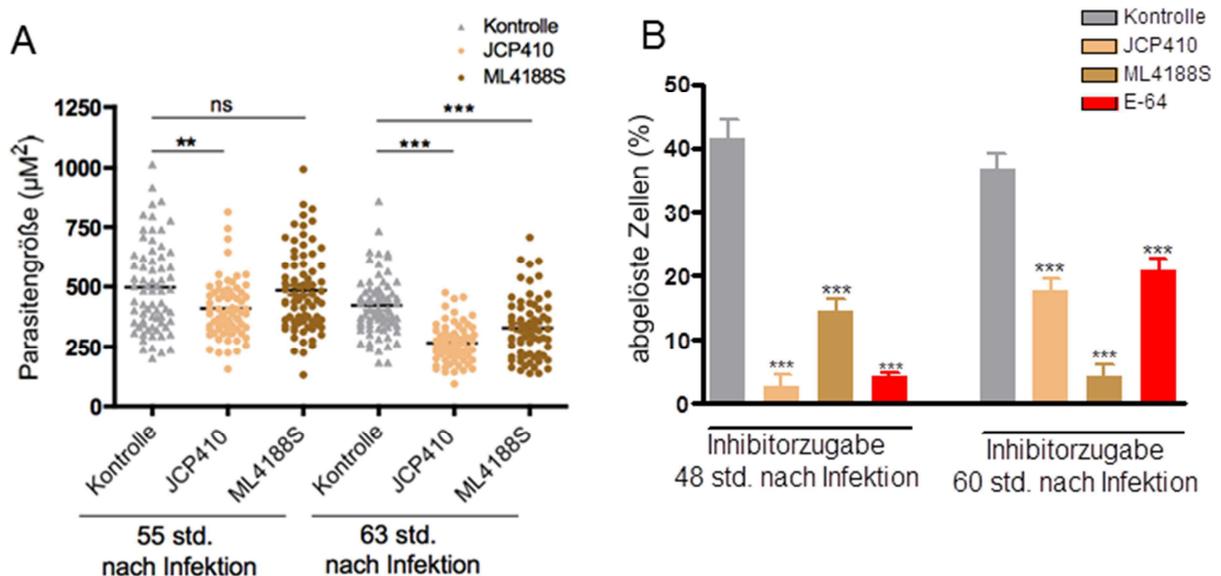


Abbildung 3-26: Die Inhibition von DPAP3 führt zu einer Beeinträchtigung des Parasitenwachstums in der späten Leberphase und einer Reduktion abgelöster Zellen. HepG2-Zellen wurden infiziert, die Behandlung der Parasiten mit 100 µM JCP410 / 50 µM ML4188S / 50 µM E-64 (bzw. DMSO) wurde 48 Std. (A, B) oder 60 Std. (B) nach Infektion gestartet. **A:** Messung der Parasitengröße mittels *density slicing*. Es wurden HepG2-Zellen mit den Parasitenlinien PbANKAGFPcon oder PbANKAmcherry infiziert und 55, bzw. 63 Std. nach Infektion am Fluoreszenzmikroskop lebend gemessen. **B:** Quantifizierung der erfolgreichen Beendigung der Leberphase. HepG2-Zellen wurden infiziert und 48 Std. nach Infektion durch Lebendmikroskopie gezählt, diese Zahl wurde auf 100 % gesetzt. Die Anzahl der abgelösten Zellen wurde 65 Std. nach Infektion gezählt und ins Verhältnis gesetzt. Die abgelösten Zellen wurden mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt.

Die Inhibitoren wurden zunächst auf ihre Toxizität gegenüber HepG2-Zellen getestet, indem die Zellen für 48 Std. in Anwesenheit des Inhibitors inkubiert wurden. Die Vitalität der Wirtszellen wurde mit einer TMRE-Färbung bestätigt (Daten nicht gezeigt). In weiteren Versuchen wurden infizierte Zellen mit den Inhibitoren inkubiert und der Einfluss auf das Parasitenwachstum und die erfolgreiche Beendigung der Leberphase überprüft (Abb. 3-26).

Genau wie der generelle Cysteinproteaseinhibitor E-64 führte JCP410 schon im Cytomerstadium der Parasiten zu einer signifikant verringerten Größe der Parasiten. ML4188S hingegen hatte wie erwartet zu diesem Zeitpunkt noch keinen Einfluss (Abb. 3-26A) auf das Parasitenwachstum, weil zu diesem Zeitpunkt PbDPAP3 nicht exprimiert wird. Erst 60 Std. nach der Infektion war auch durch den Inhibitor ML4188S eine signifikante Beeinträchtigung des Parasitenwachstums zu beobachten. Auch bei der Quantifizierung der Bildung abgelöster Zellen als Zeichen eines erfolgreichen Beendens der Leberphase-Entwicklung (Abb. 3-26B) fiel auf, dass sich der Inhibitor JCP410 ähnlich wie E-64 verhielt. So wurde durch die Inhibitorzugabe 48 Std. nach Infektion eine fast vollständige Blockade der Bildung abgelöster infizierter Zellen erreicht. Wurde der Inhibitor erst 60 Std. nach Infektion auf die Zellen gegeben, konnte zwar eine signifikante Reduktion abgelöster Zellen beobachtet werden, aber nur um ca. die Hälfte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der Effekt des Inhibitors ML4188S war dagegen eher wie erhofft: wurde der Inhibitor erst 60 Std. nach Infektion auf die Zellen gegeben, wurde die Ablösung der Zellen nahezu komplett gehemmt. Um ein verzögertes Ablösen der infizierten Zellen ausschließen zu können, wurden auch 70 Std. nach Infektion die Zahl der abgelösten Zellen bestimmt. Das Verhältnis zwischen der Kontrolle und den Inhibitor-behandelten Zellen blieb auch bei dieser Auszählung gleich (Daten nicht gezeigt).

Die Behandlung der infizierten Zellen mit JCP410 und ML4188S blockiert somit den Ablösungsprozess der Zellen, wobei ML4188S wesentlich spezifischer die Ruptur der PVM und damit die Merozoitenfreisetzung zu blockieren scheint. Um mehr über den Effekt der Inhibitoren herauszufinden, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt (Abb. 3-27, 3-28, 3-29).

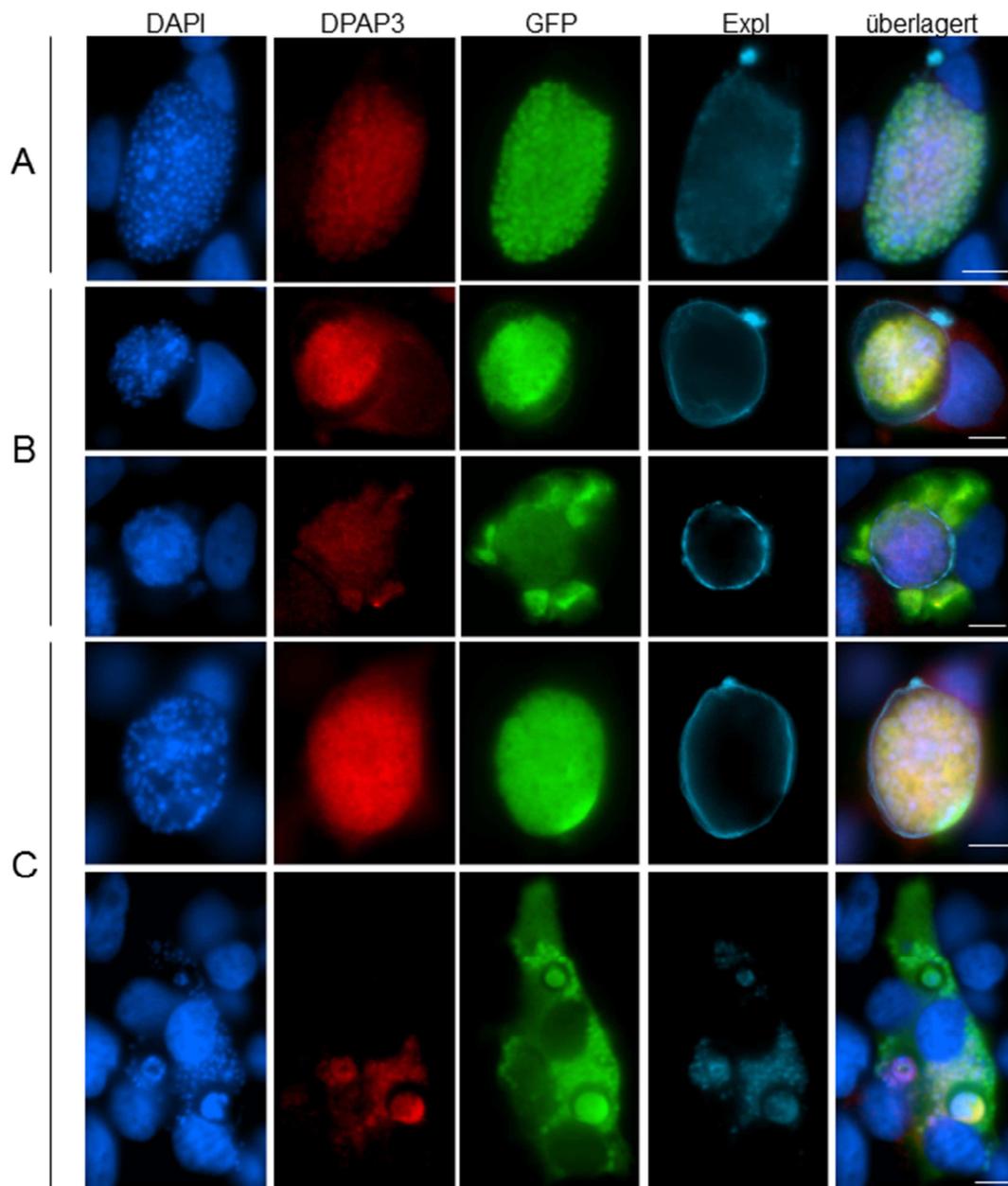


Abbildung 3-27: Die Inhibition von DPAP3 hat einen negativen Einfluss auf die Parasitenentwicklung am Ende der Leberphase. HepG2-Zellen wurden mit PbGFPconParasiten infiziert, 48 Stunden nach Infektion wurde mit der Inhibitorbehandlung gestartet und 63 Stunden nach Infektion wurden die Parasiten fixiert. **A:** unbehandelt (DMSO) **B:** Behandlung mit 100 µM JCP410 **C:** Behandlung mit 100 µM ML4188S. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Anti-DPAP3-AS (Maus), Anti-GFP-AS (Kaninchen) und Anti-Expl-AS (Huhn) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Maus-Alexa Fluor® 594 (rot), Anti-Kaninchen-Alexa Fluor® 488 (grün) und Anti-Huhn Cy5 (cyan), sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Es werden repräsentative Bilder gezeigt. Größenbalken: 10 µM

Kurz vor dem Ablösen der infizierten Zellen lokalisiert DPAP3 zusammen mit dem zytosolischen GFP-Protein in den einzelnen Merozoiten (Abb. 3-27A). Durch die Behandlung mit dem Inhibitor JCP410 (Abb. 3-27B) scheint die Ausbildung der einzelnen Merozoiten gestört, was auch die DPAP3-Lokalisierung diffuser erscheinen lässt. Die Parasiten sind meist kleiner und der teils zu beobachtende große Abstand zwischen Parasit und PVM (Abb. 3-27B oben) deutet auf die beginnende Degenerierung der Parasiten hin. Einige Parasiten scheinen die Membranintegrität der PVM zu verlieren (Abb. 3-27B unten) und es tritt unkontrolliert Parasitenzytosol in die Wirtszelle aus. Die Behandlung der Parasiten mit dem Inhibitor ML4188S nimmt keinen Einfluss auf die Differenzierung der Merozoiten (Abb. 3-27C), hier scheint jedoch der Zusammenbruch der PVM nicht mehr dem geregelten Ablauf folgen zu können. Bei einer großen Anzahl der Parasiten ist eine Fehllokalisierung des PVM-Markerproteins Expl zu beobachten (Abb. 3-27C unten), was mit dem unkontrolliertem Austreten von Parasitenmaterial in die Wirtszelle einhergeht. Auf die Fehllokalisierung von Expl wird in späteren Untersuchungen noch genauer eingegangen (Abb. 3-30).

Da DPAP3 am Anfang einer Prozessierungskaskade vermutet wird, wurde die Lokalisation weiterer Proteasen unter DPAP3-Hemmung in Immunofluoreszenzanalysen untersucht (3-28, 3-29).

Subtilisin-1 lokalisiert in der späten Leberphase hauptsächlich in Punktstrukturen, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um Exonemen handelt. Zudem scheint es in geringem Maße auch im Parasitenzytosol vorzuliegen (Abb. 3-28A). Durch die JCP410-Behandlung scheint Sub-1 fast nur noch in den Punktstrukturen vorzuliegen, auch die Parasiten mit bereits abgebauter PVM weisen kaum zytosolisches Sub1 auf (Abb. 3-28B). Dies könnte darauf hindeuten, dass der Transport von Sub1 aus den Exonemen blockiert wird. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit ML4188S zu einem ähnlichen Sub1-Muster wie in der Kontrolle (Abb. 3-28C). In den Parasiten, die unkontrolliert in die Zelle ausliefen, konnte eine Kolokalisation von Sub-1 und dem Parasitenzytosol (GFP) festgestellt werden, wobei die Punktstrukturen von Subtilisin-1 weiterhin erkennbar blieben (Abb. 3-28C unten).

JCP410-Behandlung der Parasiten verstärkt die Konzentration von Sub1 in den Exonemen, die Behandlung mit ML4188S hat jedoch keinen deutlichen Effekt auf die Sub1-Lokalisation während der späten Leberphase.

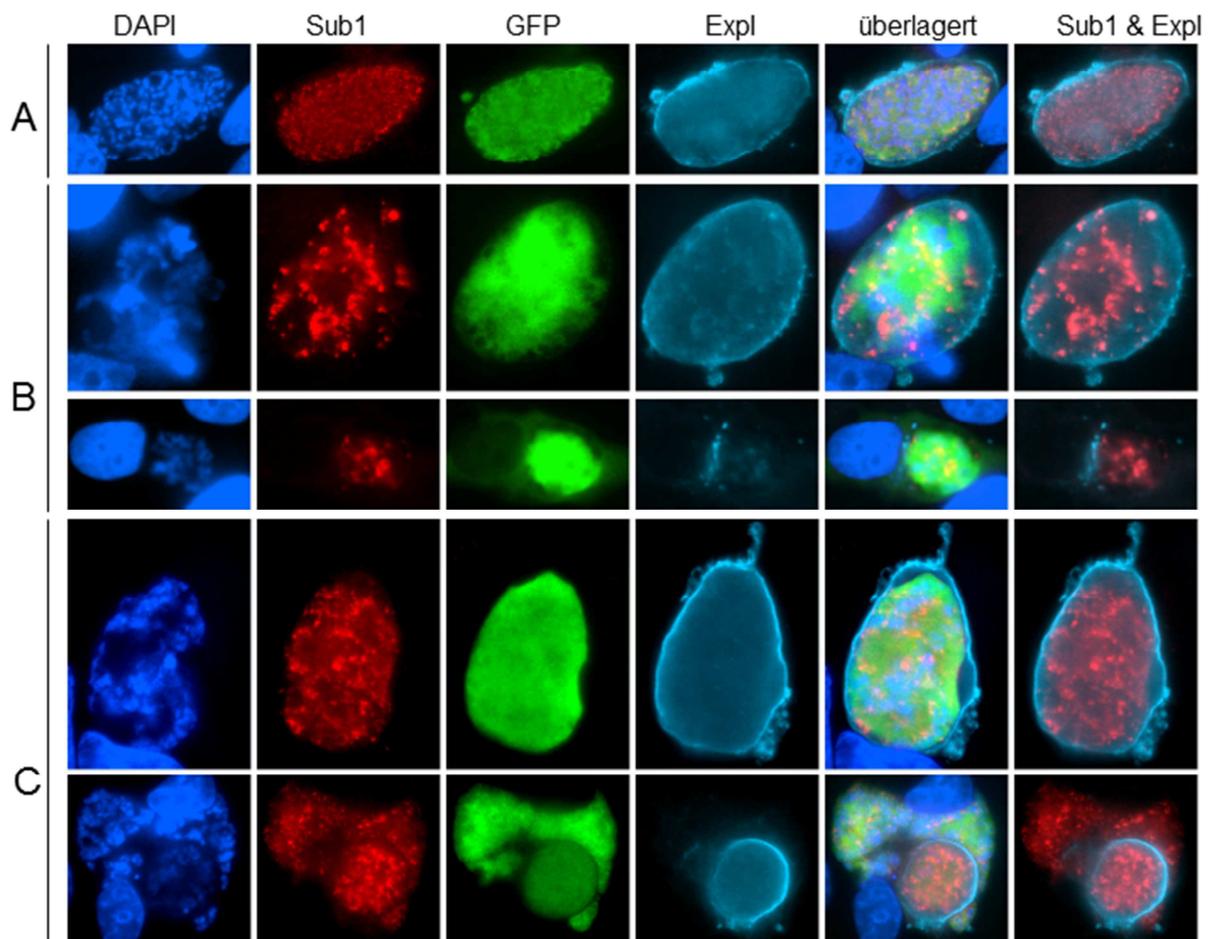


Abbildung 3-28: Subtilisin-1 lokalisiert durch JCP410-Behandlung nur in Punktstrukturen, durch ML4188S-Behandlung scheint außergewöhnlich viel Subtilisin-1 im Zytoplasma vorzuliegen. HepG2-Zellen wurden mit PbGFPconParasiten infiziert, 48 Stunden nach Infektion wurde mit der Inhibitorbehandlung gestartet und 63 Stunden nach Infektion wurden die Parasiten fixiert. **A:** unbehandelt (DMSO) **B:** Behandlung mit 100 μM JCP410 **C:** Behandlung mit 100 μM ML4188S. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Anti-GFP-AK (Maus), Anti-Sub1-AK (Kaninchen) und Anti-Expl-AK (Huhn) inkubiert. Die Färbung erfolgte mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Kaninchen-Alexa Fluor® 594 (rot), Anti-Maus Cy2 (grün) und Anti-Huhn Cy5 (cyan), sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Größenbalken: 10 μM

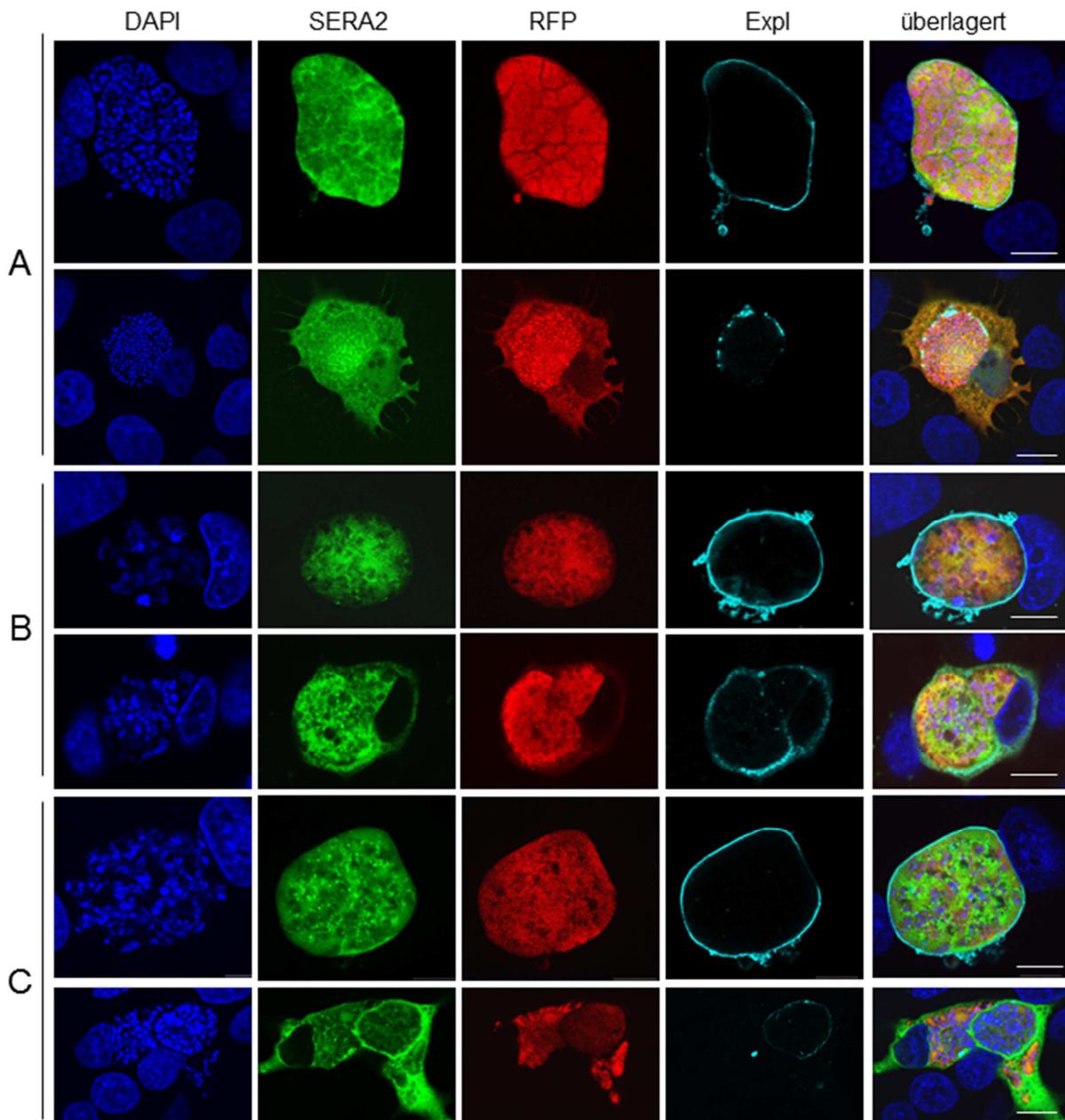


Abbildung 3-29: Die Inhibition von DPAP3 hat keine Auswirkung auf die Lokalisation von SERA2. HepG2-Zellen wurden mit PbmcherryParasiten infiziert, 48 Stunden nach Infektion wurde mit der Inhibitorbehandlung gestartet und 63 Stunden nach Infektion wurden die Parasiten fixiert. **A:** unbehandelt (DMSO) **B:** Behandlung mit 100 μM JCP410 **C:** Behandlung mit 100 μM ML4188S. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Anti-RFP-AK (Ratte), Anti-SERA-AK (Maus) und Anti-Expl-AK (Huhn) inkubiert. Die Färbung erfolgte mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Ratte-Alexa Fluor® 594 (rot), Anti-Maus Cy2 (grün) und Anti-Huhn Cy5 (cyan), sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop konfokal analysiert. Größenbalken: 10 μM

Auch SERA2 wird erst in der späten Leberphase exprimiert und lokalisiert entweder zytosolisch im Parasiten (Abb. 3-29A oben) oder nach PVM-Zusammenbruch zytosolisch in der gesamten Wirtszelle (Abb. 3-29A unten). Durch die Hemmung mit ML4188S konnte ein wesentlicher Unterschied zu unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden (Abb. 3-29C). Nach der Ruptur der PVM verteilt sich SERA2 im gesamten Wirtszellzytosol, während das zytosolische RFP eher in vakuolenartigen Strukturen vorlag (Abb. 3-29C unten). In weiteren Immunfluoreszenzanalysen wurde ebenfalls die Lokalisation von SERA1 und SERA3 unter Inhibitorbehandlung überprüft, auch hier konnten keine eklatanten Unterschiede beobachtet werden. Die Behandlung der infizierten Zellen mit JCP410 oder ML4188S hat somit keine Auswirkung auf die Lokalisation von SERA1, SERA2 und SERA3.

Betrachtet man alle Immunfluoreszenzanalysen der mit DPAP3-Inhibitor behandelten Parasiten, fällt eine häufige Fehllokalisierung des PVM-Markers Expl auf. Dieses Phänomen wurde quantifiziert und ist in Abbildung 3-30 dargestellt.

Expl lokalisiert in der PVM und wird daher auch als PVM-Marker eingesetzt. In konfokalen Immunfluoreszenzanalysen zeigt die Expl-Färbung die klassische PVM-Verteilung an, am Ende der Leberphase kann man die Degradation der PVM durch Unterbrechungen in der Ringstruktur beobachten. In abgelösten Zellen ist dann kein Expl mehr vorhanden. Wie in Abbildung 3-30 zu sehen ist, weisen 80 % der unbehandelten Kontrollparasiten am Ende der Leberphase (63 Std. nach Infektion) noch eine typische Expl-Verteilung auf, bei fast 20 % der Parasiten ist Expl teilweise auch im Wirtszellzytosol lokalisiert. In sehr seltenen Fällen lokalisiert Expl auch in Punktstrukturen im Parasitenzytosol. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Proteinaggregationen durch eine Störung im Proteintransport der Parasiten. In unbehandelten infizierten Zellen kann immer eine Expl-Expression beobachtet werden, bzw. kommt es nie vor, dass nur zytosolische Punktstrukturen vorhanden sind. Durch die Behandlung mit JCP410 weisen nur noch 40 % der Parasiten die typische Expl-Verteilung auf. 20 % der Parasiten weisen zusätzliche Punktstrukturen im Parasitenzytosol auf, die mit Expl gefüllt sind, eine wesentlich höhere Zahl als in der Kontrolle. Zudem exprimieren 20 % der Parasiten überhaupt kein Expl mehr. Durch die Behandlung mit dem Inhibitor ML4188S wird die Fehllokalisierung von Expl noch weiter verstärkt. Nur noch 30 % der Parasiten zeigen die typischen Expl-Verteilung. Der größte Teil der Parasiten (fast 40%) zeigt dagegen eine veränderte

oder gar keine Expl-Verteilung mehr. Diese Zahl entspricht in etwa der von infizierten Zellen, bei denen Parasiten aus der PVM freigesetzt wurden, die aber weiterhin adhären sind. Weitere 30 % der ML4188S-behandelten Parasiten zeigen zwar noch die typische Expl-Verteilung, weisen aber auch Punktstrukturen im Parasitenzytosol auf.

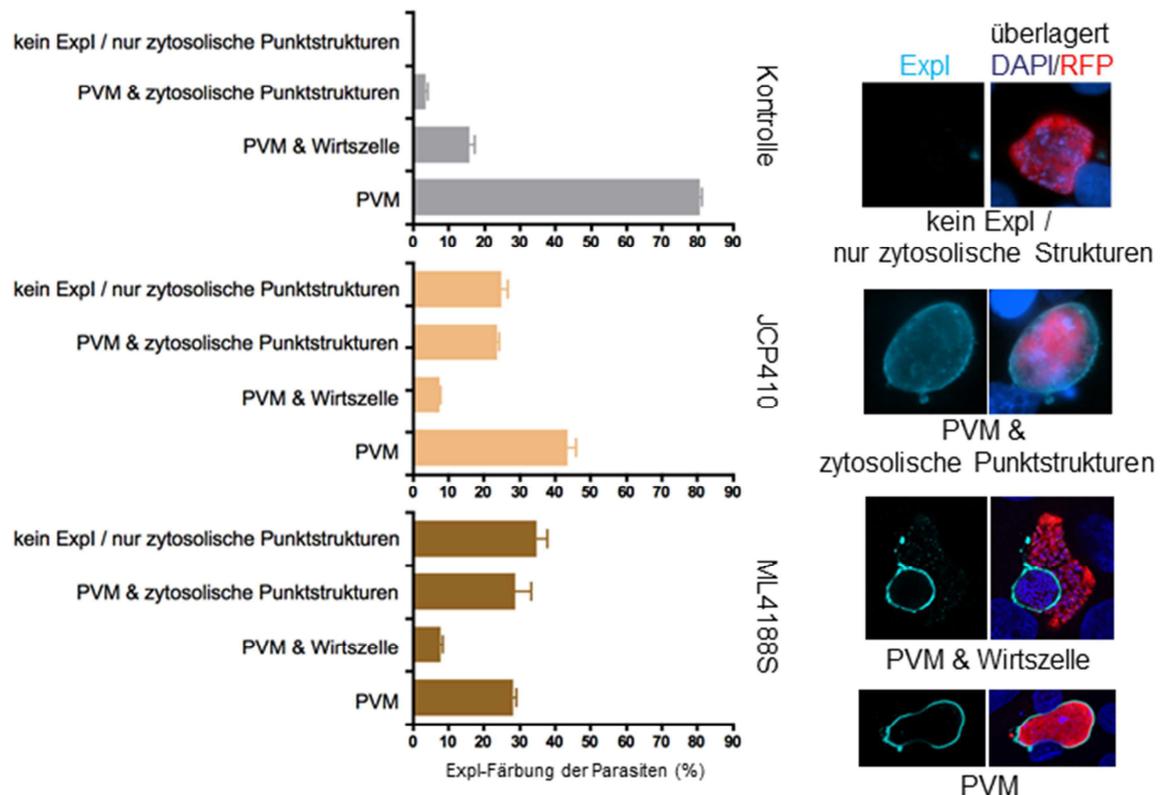


Abbildung 3-30: Die Inhibition von DPAP3 führt häufig zu einer Fehllokalisierung des PVM-Markers Expl HepG2-Zellen wurden mit PbmcherryParasiten infiziert, 48 Stunden nach Infektion wurde mit der Inhibitorbehandlung gestartet und 63 Stunden nach Infektion wurden die Parasiten fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Anti-RFP-AK (Ratte) und Anti-Expl-AK (Huhn) inkubiert. Die Färbung erfolgte mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Ratte-Alexa Fluor® 594 (rot) und Anti-Huhn Cy5 (cyan), sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (blau). Die Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Es wurden jeweils 100 Parasiten pro Inhibitor-typ analysiert. Seitlich rechts Beispielbilder für die in den Graphen angegebenen Lokalisationstypen.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass der Inhibitor JCP410 zu einer Hemmung des Wachstums von späten Leberparasiten führt und das erfolgreiche Beenden der Leberphase, *in vitro* durch das Ablösen der Wirtszelle angezeigt, stark gehemmt ist. Dagegen scheint der Inhibitor ML4188S nur die geregelte Freisetzung der Merozoiten in die Wirtszelle zu hemmen, was auch zu einer Reduktion der abgelösten Zellen führte. Die Lokalisation von SERA2 wird durch beide Inhibitoren nicht wesentlich beeinflusst, während die des PVM-Markers Expl durch beide Inhibitoren stark gestört ist. Zu bemerken ist, dass die Inhibition durch JCP410 und ML4188S nicht in jeder Hinsicht die gleichen Effekte hervorruft, so scheint die Inhibition durch JCP410 früher Auswirkungen zu haben als die durch ML4188S. Da DPAP3 erst 60 Std. nach Infektion von den Parasiten exprimiert wird, lässt diese Beobachtung darauf schließen, dass es sich nur bei ML4188S um einen wirklich spezifischen PbDPAP3-Inhibitor handelt.

4. Diskussion

Cysteinproteasen und deren Regulation spielen bei allen Organismen eine wichtige Rolle. Auch bei den Interaktionen zwischen Wirt und Parasit fällt Cysteinproteasen und Cysteinproteaseinhibitoren eine tragende Rolle zu. Durch die Behandlung von Plasmodien mit dem generellen Cysteinproteaseinhibitor E-64 konnte der Lebenszyklus in verschiedensten Stadien blockiert werden (Coppi *et al.*, 2005; Sturm *et al.*, 2006; Eksi *et al.*, 2007; Blackman, 2008). So stellen Cysteinproteasen und deren Regulatoren attraktive Zielstrukturen für die Entwicklung von Antimalariamedikamenten dar.

4.1 Die Rolle von PbICP für den Lebenszyklus von Plasmodien

PbICP ist ein Mitglied der Familie I42, Cysteinproteaseinhibitoren dieser Familie wurden bisher nur für Protozoen und Bakterien beschrieben. PbICP wird während des gesamten Lebenszyklus exprimiert; so kann davon ausgegangen werden, dass es wichtige regulatorische Funktionen übernimmt. PbICP wird von Sporozoiten sezerniert und kommt daher in Kontakt mit dem Immunsystem des Wirtes - auch dieser Aspekt macht PbICP zu einem interessanten Forschungsobjekt.

4.1.1 Sequenz- und Strukturanalysen

Die N-terminale Domäne von PbICP vermittelt die Einführung des Proteins in den Sekretionsapparat

Proteintransport spielt in allen Lebensphasen des Parasiten eine wichtige Rolle und auch PbICP wird in den verschiedenen Parasitenstadien exportiert. Die extrazellulären Zysten der Apikomplexa verfügen über spezielle Sekretionsorganellen, Mikronemen und Rhoptrien. Mikronemale Proteine werden über den sekretorischen Transportweg durch das ER und den Golgi-Apparat in die apikal angeordneten Mikronemen transportiert, die Sezernierung der Proteine findet anschließend über Exozytose statt. Für diesen Transportweg ist eine ca. 20 Aminosäuren lange Signalsequenz notwendig, die auch bei PbICP am N-terminalen Ende des Proteins enthalten ist (Rennenberg *et al.*, 2010). Auch die durch Sporozoiten sezernierten Proteine CSP und TRAP verfügen über ein Signalpeptid (Coppi & Sinnis, 2007).

Die Proteinsekretion durch intrazelluläre Parasiten stellt einen komplexeren Vorgang dar, da die Exozytose über eine zusätzliche Membran (die PVM) verlaufen muss. Der Mechanismus für die Sekretion von Proteinen in die PVM ist erst in Ansätzen geklärt; besonders in der Leberphase ist aber noch vieles unbekannt. Durch Untersuchungen des erythrozytären Zyklus von *P. falciparum* konnten mehrere Signalsequenzen identifiziert werden, die den Proteintransport vermitteln. Dazu gehört neben den VSG-Proteinen (**v**ariant **s**urface **g**lycoproteins) auch das sogenannte PEXEL-Motiv (**P**lasmodium **e**xport **e**lement) und das sogenannte PNEP-Motiv (**p**exel **n**egative **e**xported **p**rotein), das erstmals in PfREX-1 identifiziert wurde (Marti *et al.*, 2004; Hiller *et al.*, 2004; Spielmann *et al.*, 2006; Dixon *et al.*, 2008; de Koning-Ward *et al.*, 2009; Boddey *et al.*, 2010; Spielmann & Gilberger, 2010).

In der Sequenz von PbICP-N konnte zwar kein PEXEL-Motiv, aber eine PNEP-ähnliche Sequenz identifiziert werden (Abb. 4-1), was die Vermutung nahelegt, dass die Lokalisation des Proteins durch die N-terminale Domäne vermittelt wird (Heitmann, 2008; Rennenberg, 2009). Durch die Generierung der transgenen Parasiten PbICP-GFP, PbICP-C-GFP und PbICP-N-GFP und dem in dieser Arbeit vorgenommenen Vergleich der Lokalisation der überexprimierten GFP-Fusionsproteine konnte diese Hypothese bestätigt werden. Während PbICP-N-GFP vom Trophozoiten bis zum Ende der Leberphase mit dem endogenen Protein kolokalisierte, wurde für PbICP-C-GFP vornehmlich eine zytosolische Verteilung beobachtet. In den Ausstülpungen der PVM konnte nur das endogene Protein, PbICP-GFP und PbICP-N-GFP detektiert werden. PbICP-C-GFP fehlt offenbar das Motiv, um in den sekretorischen Apparat des Parasits eingeschleust zu werden.

PfREX-1	STVQNGTMLL NSIKENAN ----- SK LPALLWNKII
PbICP	NKEESVLLIR KKIKSNKNHDSS --- IISG DTVNGDISDL
PyICP	DKEESVLLIR KKIKSNTKHGSN --- IISD DSVNDDISNL
PchICP	KEESILLIR KKIKSNNGNS ----- IIPG DGSSDDIGDF
PfICP	FTIPYNYVN NSTEENNNKDSBLL-ISK NLKNSSNPVD
PkICP	FTVIPSSYVN NSDAVNSDE-SVLLIRK KLNNSETGV
PgICP	NRSNNGGESN NSGWKGYIPNDYLPVNIAS TIMDNSQEDD

Abbildung 4-1: Identifizierung und Vergleich putativer PNEP-Motive in Plasmodium ICPs. Ausschnitt aus den Proteinsequenzen der Proteine PfREX-1 (As 66-75), PbICP (As 80-98), PyICP (As 80-95), PchICP (As 79-98), PfICP (As 60-79), PkICP (As 60-79), PgICP (As 217-234). As = Aminosäure

Wie in Abbildung 4-1 gezeigt, verfügen alle N-terminalen Domänen der Plasmodien ICPs über ein PNEP-ähnliches Motiv, wobei die Homologie bei Plasmodien mit gleicher Wirtsspezifität wesentlich höher ist. So ist auffällig, dass die putativen PNEPs bei ICPs der Erreger der Nagetiermalaria, *P. berghei*, *P. yoelii* und *P. chabaudi*, untereinander eine Homologie von 70% aufweisen. Hingegen weisen die putativen PNEPs bei ICPs der humanpathogenen Erreger *P. falciparum* und *P. knowlesi* weniger als 20% Homologie gegenüber putativen PNEP-Motiv aus PbICP auf. Die vogelpathogene Spezies *P. gallinaceum* verfügt über keine Homologie in der putativen PNEP-Sequenz. Kürzlich konnte aufgedeckt werden, dass unprozessierte PEXEL-Proteine, sowie PNEP-Proteine auch über einen anderen Mechanismus in die Exportmaschinerie eingeschleust werden können. Hierzu müssen die Proteine ungefaltet und translokal an der Membran vorliegen, damit sie die PM, bzw. PVM überqueren können, die Prozessierung des Proteins findet erst im Anschluss statt (Grüning *et al.*, 2012). Da PbICP über ein putatives PNEP-Motiv verfügt, wäre dieser Mechanismus auch für PbICP vorstellbar.

Eine Überprüfung der PbICP-Prozessierung durch Lokalisationsstudien mit spezifischen Antikörpern gegen den N-terminalen Teil des Proteins war nicht möglich, da es nicht gelang zuverlässige spezifische Antikörper herzustellen. Möglicherweise liegt PbICP-N nur als hochflexible Aminosäurekette ohne definierte Struktur vor, was die Detektion durch Antikörper erschwert. Ein Hinweis in diese Richtung ist, dass es nicht möglich zu sein scheint PbICP-N zu kristallisieren. Zusätzlich könnte PbICP-N membranständig sein und erst nach der Bindung an die

Membran seine endgültige Konformation einnehmen. Da PbICP mit den PVM-Markern UIS4 und Exp1 partiell kolokalisiert, ist dies nicht auszuschließen; allerdings konnte keine Transmembrandomäne identifiziert werden. Die Mutation des putativen PNEP-Motives könnte abschließende Beweise für die Funktionalität des Motivs geben, wobei die Länge des Motivs hierbei eine gewisse Schwierigkeit darstellt, denn durch die Mutation des knapp 20 Aminosäuren langen Motivs könnte auch die Konformation des gesamten Proteins gestört werden. Ein weiterer Ansatz wäre auch die Expression des putativen PNEP-Motivs mit einem GFP-Anhang. Würde man für dieses Protein einen Export in die PVM beobachten, handelte es sich höchstwahrscheinlich um ein funktionales Transportmotiv.

Bisher konnte nicht aufgeklärt werden, wie die Prozessierung von PbICP stattfindet. Die Aufklärung der Prozessierung von PbICP könnte jedoch helfen, Hinweise auf den Transportweg und -mechanismus des Proteins zu erhalten. PbICP weist als putative Schnittstelle das Motiv INI auf (Aminosäuren 164-166) (Rennenberg *et al.*, 2010), das auch in den anderen nagetierpathogenen *Plasmodium*-ICPs enthalten ist (*P. yoelii*_{As 166-168}, *P. chabaudi*_{As 163-165}). ICPs anderer Plasmodienspezies verfügen über ähnliche Motive, die jedoch nicht so konserviert erscheinen (*P. falciparum* INS_{As 262-264}; *P. knowlesi* KNI_{As 179-181}, *P. gallinaceum* INV_{As 276-278}). Die Prozessierung des Proteins PbICP findet im gesamten Lebenszyklus statt, wobei in der exoerythrozytären Schizogonie fast ausschließlich prozessiertes PbICP-C detektiert werden kann (Rennenberg *et al.*, 2010). Eine Mutation des Motivs INI in PbICP könnte ebenfalls zeigen, ob die Prozessierung des Proteins für den Transport des Proteins nötig ist, oder ob das Protein trotz fehlender Schnittstelle in der PVM der Parasiten lokalisiert.

Zusammenfassend konnte die Vermutung bestätigt werden, dass PbICP-N eine Rolle im Transport des Proteins spielt. Die Mutmaßung, dass ein putatives PNEP-Motiv hierfür eine Rolle spielt, müsste jedoch in den erwähnten Folgeversuchen noch bestätigt werden.

Strukturelle Besonderheiten von PbICP-C

Durch die Aufklärung der Struktur von PbICP-C durch Hansen *et al.* können Hinweise auf die Funktion von PbICP-C erhalten werden. Bspw. kann die Interaktion mit verschiedenen Proteasen durch Modellierungen überprüft werden. So konnte gezeigt werden, dass PbICP-C höchstwahrscheinlich nicht an SERA-Proteasen binden kann, somit also keinen Regulator dieser Proteasen darstellt (Abb. 4-2) (Hansen *et al.*, 2011).

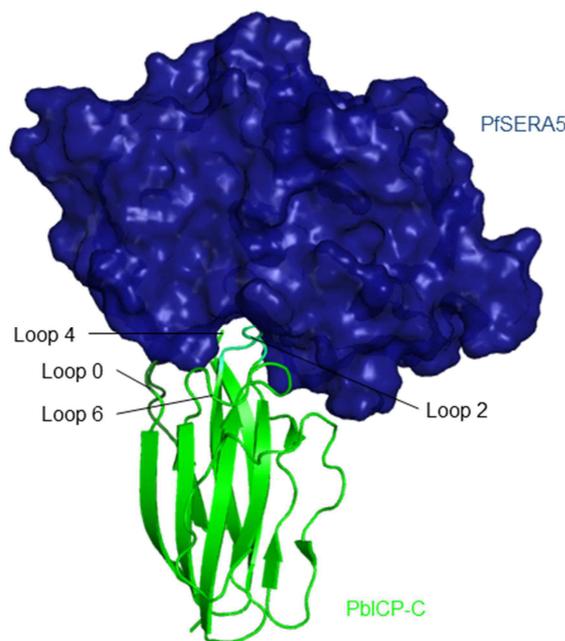


Abbildung 4-2: hypothetisches Bindungsmodell von PbICP-C und PfSERA5. PbICP-C (grün, PDB: 3PNR, Hansen *et al.*, 2011) passt aufgrund sterischer Widersprüche nicht in die Substratbindungstasche von PfSERA5 (entspricht PbSERA2; dargestellt in blau, PDB: 2WBF, Hodder *et al.*, 2009). Loop 4 kann nicht in die S'-Bindungsstellen binden, da dies sterisch ungünstige Bindungen voraussetzen würde. Durch eine stark negative Ladung der S3-Bindungsstelle ist auch hier keine Bindung des Inhibitors möglich.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die ICPs der Plasmodien einen zusätzlichen Loop 0 besitzen, der auch an der Bindung der Proteasen beteiligt ist. Viele Antimalaria-Medikamente zielen auf die Hämoglobindegradation durch Cysteinproteasen ab, wie bspw. die Falcipaine. Auch bei der Entwicklung neuer Ansätze für Medikamente spielen die Falcipaine eine wichtige Rolle (Shenai *et al.*, 2003; Hogg *et al.*, 2006; Verissimo *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Machon *et al.*, 2009; Ettari *et al.*, 2010; Jaskolski, 2011). Durch die Aufklärung der Bindung von PbICP-C

an Falcipain-2 können Erkenntnisse gewonnen werden, die bei der Entwicklung von hochspezifischen Inhibitoren für Falcipain-2 eine hilfreiche Rolle spielen können. Je mehr Informationen zur Verfügung stehen, desto effektiver können Datenbanken virtueller Inhibitoren durchsucht werden (Li *et al.*, 2009).

Eine Besonderheit der ICP-Struktur ist die durch die β -Faltblattstruktur erhaltene Immunglobulin-ähnliche Struktur. Es handelt sich hierbei um die erste Immunglobulinstruktur, die für Protozoen beschrieben wurde. Nicht nur Immunglobuline weisen diese Struktur auf, auch die MHC-Proteine weisen zwei Domänen mit Immunglobulin-ähnlicher Struktur auf (Voet & Voet, 1995). Dient die Mimikry der Immunglobulinstruktur als Strategie das Immunsystem zu beeinflussen? So wäre es beispielsweise vorstellbar, dass PbICP bestimmte Rezeptoren von Immunzellen binden kann, die eigentlich an die MHC-Komplexe binden sollten. Durch die Blockade dieser Rezeptoren könnte PbICP die MHC-vermittelte Immunantwort hemmen. Auch der HI-Virus moduliert die MHC-bindenden T-Helferzellen und verhindert so die Immunantwort des Wirtes. Die Aufklärung der Struktur von ASP-2 (**A**nchylostoma **s**ecreted **p**rotein), einem Sekretionsprotein des humanpathogenen Hakenwurmes *Necator americanus*, zeigte, dass das Protein strukturelle Gemeinsamkeiten mit Chemokinen aufweist. Die Behandlung von infektiösen Larven mit Anti-Sera gegen Na-ASP-2 verminderte die Migration der Würmer *in vitro*. Die Entwicklung eines Vakzins gegen *N. americanus*, das auf Na-ASP-2 basiert, sind mittlerweile in der klinischen Phase I (Asojo *et al.*, 2005; Diemert *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2011). Auch von Viren ist bekannt, dass sie für Proteine kodieren, die Cytokinen ähneln (molekulare Mimikry) (Alcami, 2003). Die Aminosäuren in den *Loops* der Immunglobuline vermitteln eine sehr spezifische Bindung. Es wäre also vorstellbar, dass PbICP an die MHC-Rezeptoren von bestimmten Immunzellen, bspw. T-Zellen, binden kann; ermöglicht durch die Mimikry der MHC-Proteine. Die MHC-Präsentation von Antigenen würde so keine Immunantwort mehr auslösen, da die MHC-Rezeptoren der T-Zellen schon durch PbICP blockiert wären. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung dafür, warum keine Immunität gegen Plasmodien erworben werden kann. Eine Hemmung der Immunantwort, durch die Modulation des Immunsystems mittels PbICP, würde alle extrazellulären Parasitenstadien im Vertebraten schützen. Sowohl die PbICP-sekretierenden Sporoziten, als auch die gerade entlassenen Merozoiten. Denn bei

der Freilassung der Merozoiten, sowohl nach der Leberphase, als auch nach einem Blutzyklus, wird auch das PbICP-enthaltende Parasitenzytosol freigesetzt.

4.1.2 Mögliche Funktionen des Cysteinproteaseinhibitors PbICP

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen des PbICP-C-*Knockout*-Stammes ermöglichen eine Aussage über die Bedeutung des Proteins in den verschiedenen Stadien. So ist die Deletion von PbICP-C für Blutstadien ohne ersichtliche Konsequenzen; auch die Differenzierung und Entwicklung der sexuellen Stadien scheint weitgehend unbeeinflusst. Im Sporozitenstadium spielt PbICP-C hingegen eine wichtige Rolle, sowohl für die Entwicklung in der Mücke, als auch für die anschließende Infektion von Leberzellen. PbICP-C scheint also für die Infektiosität der Sporoziten eine essentielle Rolle zu spielen. Die Bedeutung von PbICP für Leberparasiten kann nur bedingt beurteilt werden. Denn in den PbICP-C-KO_{cond}-Parasiten konnte am Anfang der Leberphase noch PbICP-C detektiert werden; erst am Ende der Leberphase schien kein PbICP mehr vorhanden zu sein. Da die PbICP-C-KO_{mero}-Parasiten nicht mehr infektiös für Hepatozyten waren, kann nicht geklärt werden, ob PbICP in der frühen Leberphase eine essentielle Rolle übernimmt. In der späteren Leberphase scheint es wichtig, aber nicht essentiell zu sein.

PbICP-C spielt keine tragende Rolle in der Entwicklung von Blutstadien-Parasiten

Als überraschend kann die Tatsache gelten, dass die Deletion von PbICP-C keine negativen Folgen für Blutstadien-Parasiten hatte, da alle vorherigen Versuche des *Knockouts* von PbICP fehlschlugen (Rennenberg *et al.*, 2010; Lehmann, 2012). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, können Transfektionen nur mit erythrozytären Schizonten durchgeführt werden. Das Fehlschlagen eines klassischen *Knockouts* führt daher häufig zu der Schlussfolgerung, dass dieses Protein für Blutstadien essentiell ist. Es gibt jedoch noch eine Reihe von anderen Gründen für ein Misslingen, denn durch den Eingriff in das Genom eines Organismus kann nie ausgeschlossen werden, dass es auch zu ungewollten Veränderungen kommt. Ein konditionaler *Knockout* kann helfen, eine abschließende Sicherheit über die Bedeutung eines Proteins in bestimmten Stadien geben. Die transfizierte Parasitenpopulation kann sich zunächst normal etablieren; erst wenn der

stadienspezifische *Knockout* vollzogen wird, können Veränderungen des Phänotyps auftreten. Ist das Protein in allen Stadien essentiell, kann diese Methode nicht als Alternative zu dem klassischen *Knockout* dienen. Die konstitutive Expression von PbICP in der Blutphase lässt auf eine Funktion von PbICP schließen; diese scheint jedoch nicht essentiell zu sein. Die Hämoglobindegradation stellt die Hauptquelle von Aminosäuren für erythrozytäre Plasmodien dar und wird größtenteils durch Cysteinproteasen durchgeführt. So könnte der Inhibitor Teil eines „Notfall-Kommandos“ sein, der versehentlich ins Zytosol gelangte Proteasen inaktiviert. Wenn bei den meisten Parasiten kein „Notfall“ eintritt, zeigt die Deletion von PbICP-C keinen negativen Einfluss auf die Entwicklung der Blutstadienpopulation. Dass zytosolische Inhibitoren die Aufgabe des „Notfall-Kommandos“ für fehlgeleitete Proteaseaktivität übernehmen, ist für viele Organismen bekannt (Turk, V. *et al.*, 1991; Ochieng & Chaudhuri, 2010; Irene *et al.*, 2012).

Die Differenzierung und Entwicklung von sexuellen Stadien findet auch in Abwesenheit von PbICP-C statt

Bei der Untersuchung von Blutaussstrichen des PbICP-C-*Knockout*-Stammes konnten keine Auffälligkeiten bei der Entwicklung von Gametozyten notiert werden. In ersten Beobachtungen scheint auch die Differenzierung zu Gameten sowie die Bildung eines Ookineten und dessen Differenzierung zur Oozyste trotz PbICP-C Deletion normal zu verlaufen. Erste Ergebnisse von an der Universität Heidelberg durchgeführten Versuchen, deuten darauf hin, dass auch die Sporogonie erfolgreich vollzogen werden kann (persönliche Mitteilung von Paul Burda).

PbICP-C spielt eine essentielle Rolle für Sporozoiten

Die Anzahl der PbICP-C-KO_{mero}-Sporozoiten in den Speicheldrüsen war erheblich reduziert und die Sporozoiten waren weder *in vitro* noch *in vivo* infektiös, zudem konnte keine sporozoitentypische Bewegung beobachtet werden. Der Einfluss der PbICP-C-Deletion auf die Sporozoiten in der Mücke konnte bisher nicht quantifiziert werden, da der Ausfall eines Inkubators zu Unregelmäßigkeiten in der Infektion der Mücken führte. Daher sind Quantifizierungsexperimente Gegenstand derzeitiger Experimente an der Universität Heidelberg. Hierbei soll quantifiziert werden, zu welchem Zeitpunkt die Sporozoitenzahl von der Norm abweicht. Bei der Betrachtung der PbICP-C-KO_{mero}-Sporozoiten stellt sich die Frage, bei welchem

Entwicklungsprozess ein Defekt auftritt. Kann die Evasion der Sporozoiten aus den Oozysten stattfinden **(1)**? Verlieren die Sporozoiten ihre Fähigkeit in die Speicheldrüsen einzuwandern **(2)**? Können sie noch Zellen transmigrieren, bzw. invadieren **(3)**? Verfügen die Sporozoiten noch über ihren Bewegungsapparat **(4)**? Diese Fragen sollen nun in den nächsten 3 Abschnitten diskutiert werden.

(1) Die Anzahl der PbICP-C-KO_{mero}-Sporozoiten in den Oozysten schien geringfügig verringert zu sein, die Sporogonie schien jedoch vollzogen werden zu können. Es ist bekannt, dass eine Cysteinprotease wichtig für den Austritt der Sporozoiten aus der Oozyste ist. Durch die Deletion von PbECP1 –auch bekannt als PbSERA5 (Homolog zu PfSERA8)- konnte gezeigt werden, dass dieses Protein essentiell für den Austritt der Sporozoiten aus der Oozyste ist (Coppi *et al.*, 2005; Aly *et al.*, 2005). Da PbSERA5 voraussichtlich nicht von PbICP-C reguliert wird, sollte die Deletion von PbICP-C keinen Einfluss auf die Freisetzung der Sporozoiten in das Hämozoel haben. Die Sporogonie sowie die Oozystenruptur sollten somit unbeeinflusst von der PbICP-C-Deletion sein, was sich in den anstehenden Quantifizierungsexperimenten an der Universität Heidelberg zeigen wird.

(2) Die Deletion des multifunktionalen Oberflächenproteins der Sporozoiten, CSP, führt zu einer Blockade in der Sporogonie. CSP verfügt, neben dem klassischen Signalpeptid, über Region I, sowie einer Wiederholungssequenz, über die zelladhäsive Region II und eine Ankerregion am C-terminalen Ende (Abb. 4-3A) (McCutcham *et al.*, 1996). Bei Region II handelt es sich um ein *cluster* aus hochkonservierten positiv geladenen Aminosäuren, welche die Bindung von HSPGs vermitteln (Sinnis *et al.*, 1994). Diese Bindungsdomäne wird auch als TSR bezeichnet (type I thrombospondin repeat). CSP kann in zwei Konformationen vorliegen, die die jeweilige Funktion des Proteins ermöglichen (dargestellt in Abb. 4-3B). Wird die TRS-Domäne aus Region II präsentiert kann die Adhäsion der Sporozoiten vermittelt werden (Abb. 4-3B grün), in der anderen Konformation wird diese Region durch den N-terminalen Teil des Proteins maskiert (Abb. 4-3B rot). In den Oozysten wird die Präsentation der TSR-Domäne vermutlich durch die Faltung des CSP-Proteins mit Hilfe von Chaperonen ermöglicht (Coppi *et al.*, 2011). Nach

der Freisetzung aus der Oozyste maskiert die N-terminale Domäne die TRS-Domäne und die Sporozoiten werden zur Speicheldrüse transportiert. Dieser Transport geschieht zunächst passiv in der zirkulierenden Hämolymphe des Insekts (Ghosh *et al.*, 2009). Die Bindung der Sporozoiten an das Epithel der Speicheldrüsen wird über verschiedene Rezeptorproteine vermittelt, unter anderem konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne von CSP spezifisch an das Speicheldrüsenepithel bindet (Sidjanski *et al.*, 1997; Myung *et al.*, 2004). An der hochkonservierten, fünf Aminosäuren langen Sequenz der Region I, findet vermutlich die Prozessierung von CSP statt. Diese wird durch eine bisher unbekannte Cysteinprotease vorgenommen und durch den Kontakt mit Hepatozyten induziert (Coppi *et al.*, 2005, Coppi *et al.*, 2011).

Die Regulation dieser CSP-prozessierenden Cysteinprotease ist bisher ungeklärt und könnte durch PbICP vorgenommen werden. So würde die Deletion von PbICP dazu führen, dass CSP frühzeitig prozessiert wird da die Proteaseaktivität nicht mehr reguliert werden kann. Wenn CSP schon bei den Sporozoiten der Oozyste prozessiert werden würde, so würde die TSR-Domäne der Region II schon in der Hämolymphe präsentiert. Die N-terminale Domäne aber, die die Bindung an das Speicheldrüsenepithel vermittelt, wäre nicht mehr vorhanden. In diesem Fall müsste die PbICP-C-KO_{Mero}-Sporozoitenanzahl in der Hämolymphe normal sein, in den Speicheldrüsen jedoch stark reduziert.

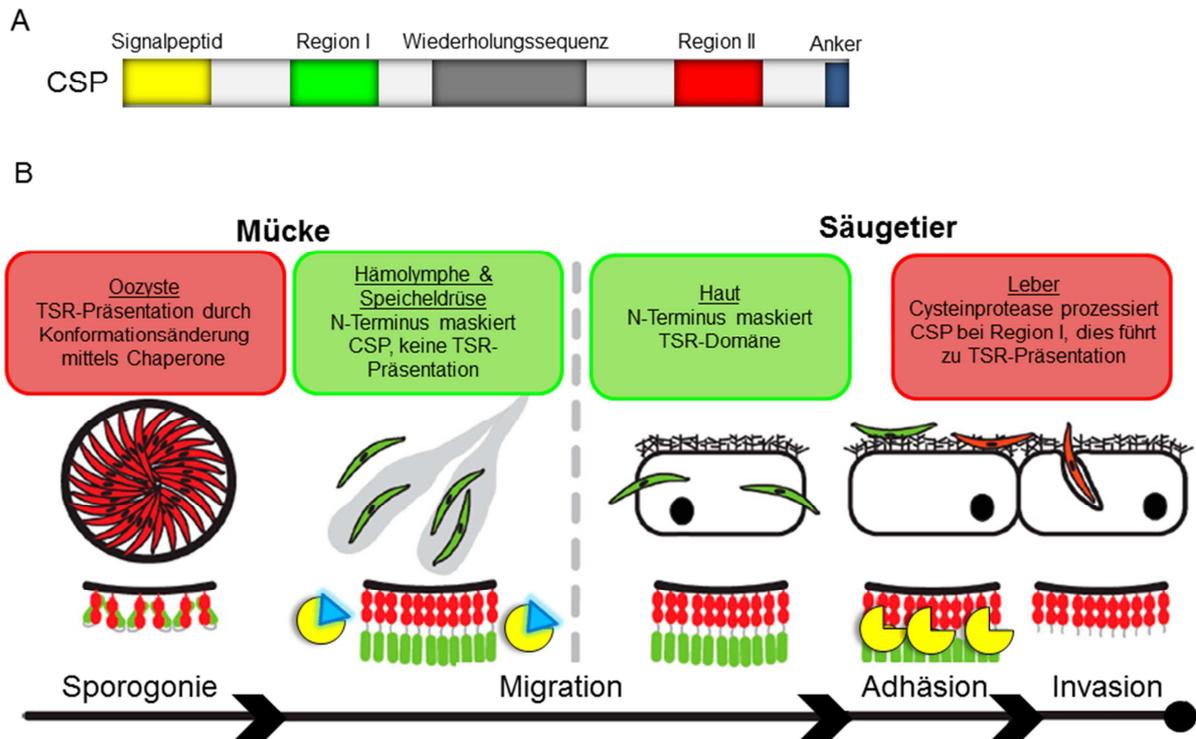


Abbildung 4-3: A: schematische Darstellung des CSP-Proteins. B: Darstellung der CSP-Konformationen im Sporozitenstadium und die mögliche Funktion von PbICP. Oben: Rote Sporoziten präsentieren die N-terminale Domäne des Proteins, grüne Sporoziten präsentieren die das TRS-Motiv enthaltende Region I am C-Terminus des Proteins. Unten: CSP-Protein auf Sporozitenoberfläche, in grün der N-Terminus, in rot der C-Terminus, dazwischen in grau die Wiederholungssequenz. Die für die CSP-Prozessierung zuständige Cysteinprotease ist in gelb dargestellt, PbICP in türkis. (modifiziert aus Coppi *et al.*, 2011)

(3) Gelangen die Sporoziten in den Säugerwirt findet zunächst die Transmigration einiger Hautepithelzellen statt, bis die Sporoziten in die Leber gelangen, weitere Zellen transmigrieren und dann von dem Migrationsmodus in den Invasionsmodus umschalten. Zunächst präsentiert der Sporozoit dabei die N-terminale Domäne von CSP; erst durch die Prozessierung von CSP wird die TSR-Domäne präsentiert. Durch diese von einer Cysteinprotease vorgenommenen Prozessierung wird die Bindung von HSPGs vermittelt und es findet die Umschaltung von Migrationsmodus auf Invasionsmodus statt (Coppi *et al.*, 2005, Coppi *et al.*, 2007, Coppi *et al.*, 2011). Die Bindung der HSPGs ist, genau wie die Bindung des Speicheldrüsenepithels, durch die N-terminale Domäne von CSP vermittelt (Rathore *et al.*, 2001, Rathore *et al.*, 2002). Die Deletion der N-terminalen Domäne von CSP blockiert die Transmigration von Zellen, die Sporoziten sind sofort im Invasionsmodus. Das erklärt, warum die Parasitenanzahl *in vitro* erhöht, *in vivo* jedoch stark reduziert wird. Einige Sporoziten können *in vivo* direkt an der Einstichstelle dermale Zellen

invadieren und die exoerythrozytäre Schizogonie hier erfolgreich vollziehen. Durch die Mutation von Region I, die für die Prozessierung des Proteins wichtig ist, sind die Sporozoiten nur noch stark abgeschwächt infektiös, da nicht mehr in den Invasionsmodus geschaltet werden kann (Coppi *et al.*, 2011).

Die verfrühte Prozessierung von CSP, ausgelöst durch die fehlende Regulation durch PbICP, könnte somit zur sofortigen Umschaltung in den Invasionsmodus führen. Die Parasiten könnten *in vivo* keine Transmigration mehr durchführen und daher nicht mehr in die Leber gelangen. Dies bestätigt sich durch die *in vivo* durchgeführten Experimente, in denen nach der intravenösen Sporozoiteninjektion keine Infektion festgestellt werden konnte. Allerdings erklärt dies nicht, warum die Parasiten auch *in vitro* keinerlei Infektionen etablieren konnten. Region II wird in der Hämolymphe der Mücke normalerweise nicht präsentiert, möglicherweise bindet ein Substrat aus der Hämolymphe an Region II, so dass diese besetzt ist. Die verfrühte Prozessierung könnte auch zu einer veränderten Konformation von CSP führen. Verursacht durch die unterschiedlichen Milieus, könnte dies eine mögliche Erklärung dafür sein, dass die Bindung der Wirtszellen nicht mehr möglich ist.

(4) Eine weitere Erklärung für die fehlende Infektiösität der PbICP-C-KO_{mero}-Sporozoiten könnte ein Defekt in der sogenannten *gliding-motility* sein, die Bewegung der Sporozoiten. Durch mikroskopische Beobachtungen erschienen die PbICP-C-KO_{mero}-Sporozoiten in ihrer Bewegung stark eingeschränkt. Auch die fehlende CSP-Spur bei zirkelnden Sporozoiten könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Sporozoiten sich nicht mehr fortbewegen können. Die Bewegung der Sporozoiten ist ein aktiver substratabhängiger Prozess, bei dem ein stetiger Wechsel des Anheften und Lösens von Proteinen im Zusammenspiel mit der Aktindynamik im Sporozoiten die Bewegung ermöglicht (Münter *et al.*, 2009). Eine wichtige Rolle bei diesem Prozess übernimmt TRAP, ein transmembranes Protein mit einer extrazellulären Adhäsionsdomäne und einer zytoplasmatischen Domäne, die die Vermittlung zum Aktin-Myosin-Motor darstellt (Ejigiri *et al.*, 2012). Während der kontinuierlichen, zirkulierenden Vorwärtsbewegung der Sporozoiten findet eine kontinuierliche Prozessierung mit anschließendem *shedding* von TRAP statt. *Shedding* ist die Bezeichnung für das Abstreifen des prozessierten Proteins und essentiell für den Ablösungsprozess. Für viele der in Apikomplexa beschriebenen

Invasionsproteine ist das *shedding* beschrieben, so auch für verschiedene Plasmodiumproteine wie PfAMA1, PfMSP1 und, wie eben beschrieben, für PbTRAP (Zhou *et al.*, 2004; Howell *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 2006; Ejigiri *et al.*, 2012). Bisher konnte nur Rhomboid-ähnlichen Serinproteasen des *Clans* ST eine Beteiligung an *shedding*-Prozessen nachgewiesen werden. Während das membranständige PfSub2 für das *shedding* von PfAMA1 und PfMSP1 zuständig ist, findet das *shedding* von PbTRAP durch die Rhomboid-ähnliche Protease PbROM4 statt. Durch die Mutation der *shedding*-Motive in TRAP verlieren die Sporoziten jegliche Gleitfähigkeit. Das *shedding* von CSP wurde noch nicht detailliert untersucht; es wird jedoch vermutet, dass auch hier eine Rhomboid-ähnliche Protease beteiligt ist. So kann PbICP höchstwahrscheinlich nicht direkt an der Regulation des *sheddings* von CSP beteiligt sein. Allerdings könnte die vorzeitige Prozessierung von CSP, ausgelöst durch die PbICP-C-Deletion, zu einer verfrühten Präsentation der Rhomboiderkennungsequenz führen. Läge die Rhomboiderkennungsequenz in der Nähe von Region II, wäre sie normalerweise durch die N-terminale Domäne sowohl in der Hämolymphe als auch im Vertebratenwirt verdeckt. Erst durch den Kontakt mit HSPGs würde das *shedding* von CSP ermöglicht, da normalerweise erst dann die Prozessierung von CSP stattfindet. Das *shedding* von CSP könnte für die Invasion möglicherweise essentiell sein. Durch die verfrühte Prozessierung und das verfrühte *shedding* von CSP wären die PbICP-C-KO_{mero}Sporoziten so nicht mehr in der Lage zu invadieren. Eine genauere Untersuchung des Defektes in der *gliding-motility* von PbICP-C-KO_{mero}-Sporoziten ist derzeit ebenfalls Gegenstand der Untersuchungen an der Universität Heidelberg.

Interessanterweise weist das CSP bei *P. gallinaceum* weder die positiv geladene Region II auf, noch die Cysteinprotease-Schnittstelle in der Region I. Ein Austausch von PbCSP mit PgCSP in *P. berghei*-Parasiten war nicht erfolgreich; die Funktionen der CSP-Proteine weichen wohl zu stark voneinander ab (McCutcham *et al.*, 1996; Coppi *et al.*, 2005; Tewari *et al.*, 2005). Auch die Funktion von PfCSP ist anders reguliert; so wird die TSR-Region der Region II durchgehend präsentiert, auch durch das unprozessierte PfCSP. Die Deletion der Region I hatte keinen Einfluss auf die Infektiosität der Sporoziten. Der Austausch von endogenem PbCSP mit PfCSP, mit deletierter Region I, hatte keinen Einfluss auf die Infektiosität der Parasiten. Allerdings wurden bei diesem Parasitenstamm weniger Sporoziten in den Speicheldrüsen notiert (Tewari *et al.*, 2002). So scheint die Bindung der *P.*

falciparum-Sporozoit an das Speicheldrüsenepithel über einen zusätzlichen Mechanismus geregelt zu sein, der unabhängig von Region I ist. Die Untersuchung von PfICP-C-KO-Sporozoit könnte Aufschluss darüber geben, denn trotz der vorzeitigen Prozessierung von PfCSP sollte eine Adhäsion der Sporozoit an das Speicheldrüsenepithel hier möglich sein. So sollte der durch die Deletion von ICP-C hervorgerufene, Phänotyp von *P. berghei* abweichend von dem zu erwartenden Phänotyp für PfICP-C-KO-Sporozoit sein. Trotz der spezifischen Funktionen von CSP innerhalb der verschiedenen Plasmodien spielt es in allen Modellen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Impfstoffen (Grim *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2010).

PbICP-C spielt eine wichtige Rolle in der Leberphase

Da PbICP-C eine essentielle Rolle während der Sporozoitphase übernimmt, ist es schwierig, die Aufgabe von PbICP-C in der Leberphase zu beurteilen. Die PbICP-C-KO_{cond}-Sporozoit verfügten noch über ein Reservoir an PbICP-C, Proteinvorräte sowie mRNA, die nach der Genexzision von *pbicp-c* noch vorhanden waren. So gelang es einer sehr geringen Anzahl von Sporozoit weiterhin zu invadieren. Die geringe Restaktivität des PbICP-C-Reservoirs könnte ausreichen, die Regulation von Cysteinproteasen, wie der CSP-prozessierenden Cysteinprotease, zu kontrollieren. Nach ca. 24 Std. konnte mittels Immunofluoreszenzanalysen kein PbICP-C mehr detektiert werden und die Parasiten schienen in ihrer Entwicklung gehemmt. Nur wenigen Parasiten gelang das erfolgreiche Beenden der Leberphase. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass PbICP-C eine wichtige, jedoch nicht essentielle Rolle in der Leberphase übernimmt. Eine Möglichkeit könnte sein, wie bereits für die Blutphase diskutiert, dass auch in der Leberphase PbICP-C eine „Notfall-Funktion“ hat. Die Nährstoffversorgung der Parasiten in der Leberphase ist nicht vollständig aufgeklärt. Es konnten bisher keine Nahrungsvakuolen oder ähnliches beschrieben werden. Da Hepatozyten, im Gegensatz zu Erythrozyten, über einen kompletten Syntheseapparat für Aminosäuren und Lipide verfügen, ist es wahrscheinlich, dass die Parasiten die nötigen Nährstoffe direkt aufnehmen. So wäre keine zentrale Nahrungsvakuole vonnöten. Trotzdem kann es auch im Zytosol der Leberparasiten zu der unspezifischen Freisetzung oder Aktivierung von Proteasen kommen, die durch PbICP-C als „Notfall-Funktion“ verhindert wird. Eine weitere

mögliche Funktion für PbICP-C wäre die Manipulation der Wirtszelle, auf die im folgenden Absatz näher eingegangen wird.

Mögliche Funktionen von PbICP-C in der Wirtszelle

Die Fähigkeit von PbICP, die Wirtszelle zu modulieren, konnte schon in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden (Lehmann, 2008; Rennenberg *et al.*, 2010). So konnte durch die Überexpression von PbICP-C in HepG2-Zellen Apoptose verhindert werden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, inhibiert PbICP-C zwar keine Caspasen, aber möglicherweise Cysteinproteasen, die während der Apoptose aktiviert werden. Die Aktivierung der Caspasen startet unter anderem mit der Prozessierung von Caspase-9, diese wird durch eine Cathepsin L-ähnliche Protease aktiviert. Die Cathepsin L-ähnliche Protease würde voraussichtlich durch PbICP inhibiert werden und so die Einleitung der Apoptose blockiert werden. Da PbICP-C sowohl von Sporozoitensekretiert wird, als auch in der späten Leberphase im Hepatozytenzytosol vorliegt, könnte also die Einleitung der Apoptose-Kaskade durch PbICP-C-Aktivität verhindert werden. Dies würde sowohl bei der Transmigration als auch bei der Invasion die Vitalität der Wirtszellen erhalten.

Auch die MHC-vermittelte Antigenpräsentation ist durch Cathepsine katalysiert, so wäre eine weitere mögliche Aufgabe von PbICP-C die Blockade der MHC-Antigenpräsentation. Hepatozyten präsentieren sowohl MHCI- als auch MHCII-Komplexe, um mit Immunzellen interagieren zu können. Die kernlosen Erythrozyten verfügen über keinen dieser Mechanismen. Dies wäre eine weitere mögliche Erklärung dafür, dass PbICP in der Blutphase keine wichtige Rolle übernimmt. Die MHCI-Präsentation von Antigenen führt zu einer Erkennung durch T-Zellen, die die Zelle in die Apoptose leiten würden. Bei der MHCI-Präsentation werden intrazelluläre Antigene prozessiert und durch die MHCI-Moleküle auf der Oberfläche der Zelle präsentiert. Hierzu werden zytosolische Proteine, also auch Parasiten-Proteine, die ins Wirtszellzytoplasma gelangt sind, von verschiedenen Cathepsinen degradiert und die Peptide über den MHCI-Komplex präsentiert (Janeway *et al.*, 2001). Die Beladung der MHCI-Komplexe findet hauptsächlich am ER statt (Pamer *et al.*, 1998), in dessen Nähe PbICP verstärkt lokalisiert. Eine tragende Rolle bei der Degradation übernimmt Cathepsin L, welches durch PbICP gehemmt werden könnte. So könnte PbICP durch die Hemmung von Cathepsin L eine Prozessierung der Antigene und damit eine Beladung der MHCI-Komplexe verhindern. Findet keine MHCI-

Präsentation von Parasiten-Proteinen mehr statt, wäre der intrazelluläre Parasit vor Immunzellen versteckt. So würde PbICP die durch Immunzellen induzierte Einleitung der Apoptose verhindern. Die MHCII-Präsentation dient der Präsentation extrazellulärer Antigene und wird nur von dendritischen Zellen, Makrophagen, Hepatozyten und B-Zellen ausgeführt. Die extrazellulären Antigene werden phagozytotisch aufgenommen und von verschiedenen Proteasen degradiert. Hierzu zählen verschiedene Cathepsine, wobei Cathepsin L und S essentielle Aufgaben übernehmen (Yang *et al.*, 1999; Hsing *et al.*, 2005). Anschließend werden die Peptide über den MHCII-Antigen-Komplex an T-Helferzellen präsentiert, welche dann durch die Ausschüttung von Cytochrom C eine Immunreaktion des Körpers auslösen (Stryer *et al.*, 2003). Wird das extrazellulär sekretierte PbICP bei der Phagozytose mit aufgenommen, würde der Inhibitor das Cathepsin L im Phagosom hemmen und die Degradation von Proteinen verhindern. Es können keine MHCII-Komplexe mit PbICP-Peptiden präsentiert werden. Die Sekretion von PbICP durch transmigrierende Sporozoitien könnte also auch für die Unterdrückung der MHCII-Präsentation dienen. Dies könnte auch eine weitere Erklärung dafür sein, warum der Mensch keine dauerhafte Immunität gegen Plasmodien erlangen kann.

Es scheint sich bei PbICP um ein multifunktionales Protein zu handeln, welches in den verschiedenen Lebensphasen des Parasiten unterschiedliche Aufgaben übernimmt. Sowohl eine Interaktion mit parasitären Proteasen (CSP-prozessierende Cysteinprotease), als auch eine Interaktion mit Wirtsproteasen (MHC-Peptid degradierende Proteasen) wäre möglich. Zudem wäre auch die Bindung spezieller Wirtszellrezeptoren möglich, wobei PbICP hier nicht als klassischer Inhibitor wirken würde. Auch die ICPs anderer Organismen erfüllen verschiedenste Aufgaben. So konnte gezeigt werden, dass LmICP mit Wirtszellproteasen interagiert, die für die Abwehr von Pathogenen zuständig sind (Besteiro *et al.*, 2004). *Trypanosoma cruzi*, der Erreger der Chagas-Krankheit, exprimiert zwei Cruzipaine, Cathepsin B-ähnliche Proteasen, die an der Invasion und der Differenzierung der Parasiten beteiligt sind. Die Regulation dieser Proteasen findet durch TcICP, Chagasin, statt (Santos *et al.*, 2005 Kosec *et al.*, 2006). *Trypanosoma brucei*, der Erreger der Schlafkrankheit, reguliert ebenfalls mittels TbICP die Aktivität endogener Proteasen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Deletion von TbICP zu einer Verdreifachung der Proteaseaktivität in den Parasiten führt (Santos *et al.*, 2007). Auch die zwei ICPs von *Toxoplasma gondii* dienen der Regulation endogener Proteasen (Huang *et al.*, 2009).

Durch die Aufklärung der PblCP-Funktionen können neue potentielle Zielstrukturen für die Entwicklung von Antimalariamedikamenten aufgedeckt werden.

4.2 Eine unbekannte Cathepsin B-ähnliche Protease ist essentiell an der Merozoitenformation und dem Zusammenbruch des Wirtszellzytoskeletts beteiligt

Mit der Bildung von bis zu 30 000 Merozoiten in der Leberphase handelt es sich um eine der schnellsten Replikationsraten im Reich der Eukaryoten. Die Aufteilung der Nuklei und der Organellen auf die einzelnen Merozoiten muss gut organisiert sein und ist noch nicht gänzlich aufgeklärt. In der Blutphase konnten schon viele Details über die Merozoitenformation aufgedeckt werden, hier werden jedoch maximal 32 Merozoiten gebildet. Durch die Behandlung von Leberparasiten mit dem Cathepsin B-spezifischen Inhibitor CA-074Me konnte eine essentielle Rolle für Cathepsin B-ähnliche Proteasen bei der Aufteilung der Tochtermerozoiten im Leberstadium gezeigt werden. In Folgeversuchen konnte auch ein Einfluss der CA-074Me-Behandlung auf Blutstadien festgestellt (Daten nicht gezeigt). Auch hier löste die Cathepsin B-Inhibition einen Defekt bei der Freilassung der Merozoiten aus. In *P. berghei* konnte bisher keine Cathepsin B-ähnliche Protease identifiziert werden; allerdings kann die Sequenz der Proteasen nicht viel Aufschluss über ihre Aktivität geben, wesentlich mehr Aufschluss kann über die Struktur gewonnen werden. Die einzige bisher identifizierte Protease mit Cathepsin B-Aktivität, die für Plasmodien beschrieben wurde, ist PvVX4 (Vivapain-4). Die Anordnung der Aminosäuren an der P2-Position dieser Protease, die die Cathepsin B-Aktivität ermöglichen, konnte jedoch bei keiner anderen Plasmodien-Protease gefunden werden (Na *et al.*, 2010).

Die Inhibition einer Cathepsin B-ähnlichen Protease in der späten Leberphase verhindert die korrekte Aufteilung der Nuklei auf die Merozoiten

Durch die Behandlung später Leberschizonten mit CA-074Me wurde ein veränderter Phänotyp der Parasiten beobachtet. Zunächst schien die Aufteilung normal zu verlaufen; kurz vor der finalen Merozoitenformation wurden die Nuklei jedoch in einem großem Vesikel, dem Merofusosom, zusammengezogen. Die Abfolge der

Prozesse konnte in Filmaufnahmen bestätigt werden (Lehmann, 2012). Der Prozess der Formation von Tochtermerozoiten ist für die Leberphase noch nicht detailliert aufgeklärt, für die Blutphase sind jedoch viele Details bekannt. Ein wichtiger Teil des Prozess der Merozoitenformation ist die Organisation des Zytoskeletts, sowohl des parasiteneigenen als auch das der Wirtszelle. Nach der Beendigung der geschlossenen Mitose, bei der die Kernmembran erhalten bleibt, werden die Nuklei über Mikrotubuli an die PM geführt. Die Mikrotubuli sind in Blutstadien radial in dem Parasiten angeordnet, so dass eine gleichmäßige Aufteilung möglich ist. Nachdem die Nuklei an die PM geführt wurden, werden auch die weiteren Organellen über diesen Mechanismus aufgeteilt (Bano *et al.*, 2007; Gerald *et al.*, 2011; Fowler *et al.*, 1998). Im Anschluss umhüllt der IMC (inner membrane complex) die Tochtermerozoiten und die finale Formierung wird vollzogen. Abschließend werden die Tochtermerozoiten von den radialen Mikrotubuli abgeschnürt und diese degradiert (Fowler *et al.*, 1998). Auch in der Leberphase werden zunächst die Nuklei aufgeteilt; darauf folgen die Organellen (Stanway *et al.*, 2011). Die Organisation kann hier aufgrund der hohen Komplexität vermutlich nicht über ein zentrales radiales Mikrotubuli-System stattfinden. Da CA074Me den Ablösungsprozess der Nuklei von den Mikrotubuli verhinderte, ist möglicherweise eine Cathepsin B-ähnliche Protease beteiligt. Das Merofusosom könnte ein Vesikel sein, in dem normalerweise die Mikrotubuli degradiert werden. Durch die Hemmung der Degradation und der damit verbundenen Tatsache, dass sich die Nuklei nicht ablösen, schwillt das Vesikel dann zu dem Merofusosom an.

Eine Cathepsin B-ähnliche Protease ist essentiell am Abbau des Wirtszellzytoskeletts beteiligt

Nachdem die Tochtermerozoiten in die Wirtszelle entlassen werden, muss das Zytoskelett der Wirtszellen abgebaut werden, damit die Merozoiten sich frei bewegen können und in Merosomen verpackt werden können. In Immunofluoreszenzanalysen konnte gezeigt werden, dass die CA-074Me-Behandlung von Leberparasiten dazu führt, dass das Aktinskelett der behandelten abgelösten Zellen erhalten bleibt (Lehmann, 2012). Dies steht im Gegensatz zu normal entwickelten abgelösten Zellen, bei denen das Wirts-Aktin komplett degradiert wird. Möglicherweise ist dies eine Erklärung dafür, dass sich die merozoitenartigen Strukturen im Merofusosom

nicht bewegen. Zudem führte auch die Expression von TcChagasin in Hepatozyten zu einem veränderten Phänotyp der Parasiten. Die Anzahl der abgelösten Zellen wurde deutlich reduziert und die Merozoiten schienen auch hier nicht mehr frei beweglich zu sein. Der abweichende Phänotyp trat in diesem Fall erst nach dem Zusammenbruch der PVM auf (Lehmann, 2012). So könnte sowohl die Inhibition durch CA-074Me als auch die Expression von TcChagasin zu demselben Phänotyp führen: der Blockade des Wirtszellzytoskelettabbaus.

Sowohl für Plasmodien als auch für *Toxoplasma* konnte gezeigt werden, dass die Parasiten für den Abbau des Wirtszellzytoskeletts das wirtseigene Calpain-1 einsetzen, welches sie mittels der Ca^{2+} -Konzentration in der Wirtszelle regulieren. Durch die Inhibition der Translation von Calpain-1 mittels RNAi, sowie durch den *Knockout* des Genes konnte gezeigt werden, dass die Parasiten nicht mehr in der Lage waren, die Ruptur des Erythrozyten, bzw. Fibroblasten einzuleiten (Chandramohanadas *et al.*, 2009). Auch in Hepatozyten liegt Calpain-1 vor, so wäre es möglich, dass auch Leberparasiten das wirtseigene Calpain-1 für den Abbau des Wirtsskeletts einsetzen. Dagegen spricht jedoch, dass Calpain-1 Ca^{2+} -abhängig ist und auch die Parasiten Ca^{2+} aus der Wirtszelle aufnehmen. Zudem ist der Prozess der PVM-Auflösung und der Freisetzung der Merozoiten bei Blutstadien sehr schnell hintereinander geschaltet, bei Leberstadien dauert dies jedoch mehrere Stunden (Graewe *et al.*, 2011). Um zu überprüfen, ob bei Leberstadien auch Calpain-1 am Abbau des Wirtsskeletts beteiligt ist, böte sich an Leberparasiten mit einem Calpain-spezifischen Inhibitor zu behandeln. Festzuhalten ist, dass sowohl in Blut- als auch in Leberstadien eine Cathepsin B-ähnliche Protease an dem Abbau des Wirtsskeletts beteiligt ist, da beide durch CA-074Me beeinträchtigt werden.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche deuten darauf hin, dass durch die Inhibition mit CA-074Me erstens die Abschnürung der Tochtermerozoiten von den Mikrotubuli verhindert wird und zweitens der Abbau des Wirtszellenzytoskeletts nach PVM-Zusammenbruch blockiert ist. Fraglich ist jedoch, ob es sich bei den beteiligten Proteasen um Wirts- oder Parasitenproteasen handelt. Da die Abschnürung der Tochtermerozoiten innerhalb des Parasiten stattfindet, handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine parasiteneigene Cathepsin B-ähnliche Protease. Die parasiteneigene Protease Plasmepsin II (*Clan A*) ist an der Degradation des Erythrozytenskeletts beteiligt. Gleiches gilt für die Cathepsin Protease PvVX4, die im

sauren Milieu der Nahrungsvakuole als Cathepsin L-Protease am Hämoglobinabbau beteiligt ist. Im neutralen Milieu zeigt PvVX4 Cathepsin B-Aktivität und es konnte gezeigt werden, dass rekombinantes PvVX4 Aktin abbauen kann. Da PvVX4 am Ende der Blutphase im Zytosol vorliegt, ist also eine Beteiligung von PvVX4 am Aktinabbau wahrscheinlich (Na *et al.*, 2010). Der Abbau des Wirtsskeletts könnte jedoch auch durch eine Wirtszell-Protease stattfinden. Denn dies geschieht direkt nach dem PVM-Zusammenbruch, bei dem das Parasitenzytosol in die Wirtszelle entlassen wird. Interessanterweise nimmt die Anzahl der Lysosomen in der Wirtszelle nach dem PVM-Zusammenbruch stark ab, so dass das Cathepsin B aus den Lysosomen zytosolisch vorliegen könnte (Gräwe, 2010). Möglicherweise setzt der Parasit dieses Cathepsin B während des ungewöhnlichen Wirtszelltodes für die Degradation des Wirtszellzytoskeletts ein. Um die Cathepsin B-ähnliche Protease zu identifizieren, könnte das *active-site-labeling* angewendet werden (Bogyo *et al.*, 2000). Hierbei wird der Inhibitor biotinyliert, um den Inhibitor-Protease-Komplex isolieren zu können.

Diese Erkenntnisse könnten einen interessanten Ansatz für die Entwicklung von neuen Antimalariamedikamenten bilden, die gegen sowohl Leber- als auch Blutphaseparasiten wirken. Interessanterweise ist CA-074Me schon in anderen Gebieten der Forschung als mögliches Therapeutikum getestet worden, so wurden *in vitro* und *in vivo* Versuche mit Mäusen durchgeführt, da CA-074Me gegen metastatische Melanome wirkt (Mataresse *et al.*, 2010). Dies könnte die Entwicklung von möglichen Antimalariamedikamenten auf der Basis von CA-074Me erheblich beschleunigen.

4.3 DPAP3 spielt eine wichtige Rolle am Ende der Leberphase

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein vorzeitiges Überexprimieren von PbDPAP3 zu einer schnelleren Entwicklung der Parasiten führt. Zudem war die Anzahl der Parasiten, die erfolgreich die Leberphase beenden, signifikant erhöht. Durch Experimente mit dem PbDPAP3-spezifischen Inhibitor ML4188S konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass PbDPAP3 eine wichtige Rolle am Ende der Leberphase spielt. PbDPAP3 übernimmt höchstwahrscheinlich, wie auch im Blutstadium, eine Aufgabe bei dem Abbau der Parasiten- und Wirtszellmembran. Der Inhibitor JCP410 zeigte auch schon einen negativen Einfluss

auf Parasiten im Cytomerstadium, da in diesem Stadium noch gar kein PbDPAP3 exprimiert wird, ist davon auszugehen, dass dieser Inhibitor mit weiteren Proteasen interagiert. Diese Ergebnisse werden durch Beobachtungen bestätigt, die ähnliche unspezifische Effekte bei der Behandlung von Leberphaseparasiten mit JCP410 *in vitro* notierten (Fifi Masduki, Max-Planck-Institut, Berlin; persönliche Mitteilung).

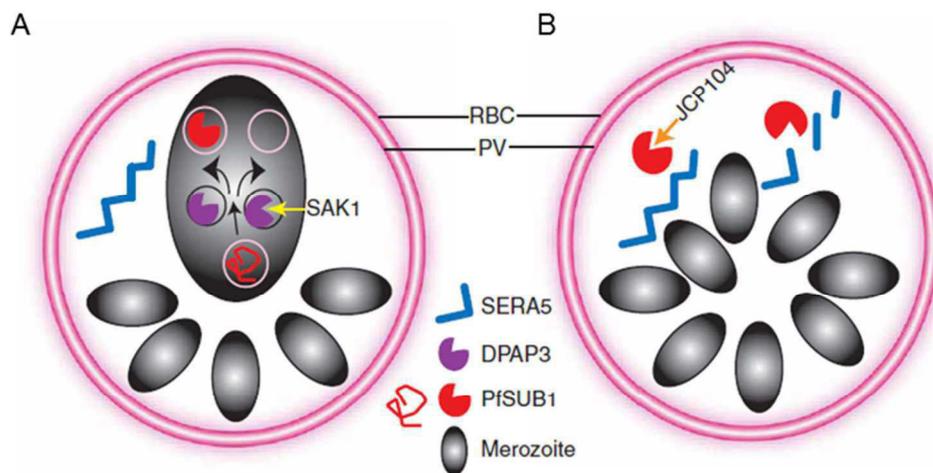


Abbildung 4-4: DPAP3-Beteiligung an der Merozoiten-Freilassung. DPAP3 prozessiert Sub1, welches dadurch aktiviert wird und über Exonemen in die PVM transportiert wird. In der PVM beginnt Sub1 mit der Prozessierung anderer Proteine, hier dargestellt SERA5. **A:** Die Inhibition von DPAP3 durch SAK1 findet verhindert die Aktivierung von Sub1. **B:** Die Inhibition von Sub1 durch JCP104 verhindert die Prozessierung von SERA5. RBC = Erythrozyt (Red blood cell); PV = parasitophore Vakuole (Arastu-Kapur *et al.*, 2008)

PfDPAP3 nimmt in der Blutphase eine Schlüsselposition in der Prozessierungskaskade ein, an deren Ende die Freilassung der Tochtermerozoiten steht. So prozessiert PfDPAP3 bspw. PfSub1, das aktivierte PfSub1 wird in die Sekretionsorganellen der Parasiten eingeleitet und in die PVM sezerniert (Abb. 4-4). Dort prozessiert PfSub1 wiederum PfSERA5, eine putative Cysteinprotease mit einem Serinrest anstelle des Cysteinrestes in der katalytischen Triade. PfSERA5 ist an der Auflösung der PVM beteiligt (Arastu-Kapur *et al.*, 2008). PfSub1 prozessiert jedoch auch eine Reihe anderer Proteine, bspw. PfSERA5, PfAMA1, PfMSP1 (Withers-Martinez *et al.*, 2004; Kousis *et al.*, 2009; Yeoh *et al.*, 2007; Bowyer *et al.*, 2010; de Monerri *et al.*, 2011). Die Subtilisine sind nach bisherigem Erkenntnisstand in allen Plasmodienspezies vorhanden und verfügen über hochkonservierte Motive (Withers-Martinez *et al.*, 2004). *P. falciparum* verfügt über 2 Subtilisine, die beide

eine wichtige Rolle bei der Invasion und der Entlassung der Merozoiten spielen (Howell *et al.*, 2005; Blackman, 2008). Die Inhibition von PfDPAP3 durch den Inhibitor SAK-1 führt dazu, dass die Tochtermerozoiten nicht mehr freigesetzt werden können (Abb. 4-4A). Eine Deletion des *dpap3*-Genes bei *P. falciparum* konnte bisher nicht erfolgreich durchgeführt werden. Deswegen wird davon ausgegangen, dass PfDPAP3 essentiell an der Freilassung der Merozoiten beteiligt ist (Arastu-Kapur *et al.*, 2008; Bowyer *et al.*, 2010). Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist anzunehmen, dass DPAP3 eine ähnliche Aufgabe in der Leberphase übernimmt wie für die Blutphase beschrieben. Ein deutlicher Hinweis hierauf ist bspw., dass die Lokalisation des PVM-Markerproteins Exp1 verändert ist, wenn DPAP3 inhibiert wird. Zudem ist das Ablösen der Zellen nahezu gänzlich blockiert. Nicht zu vergessen ist allerdings, dass die Beendigung der Leberphase einer komplexeren Regulation bedarf, als die der Blutphase. Denn die Auflösung von PVM und Erythrozytenmembran erfolgt innerhalb kürzester Zeit aufeinander und die Merozoiten werden direkt ins Blut entlassen, wo sie neue Erythrozyten invadieren können. Die Merozoiten der Leberphase müssen nach PVM-Zusammenbruch zunächst unerkannt in die Lebersinusoide gelangen, was durch die Einleitung des ungewöhnlichen Wirtszelltodes und die Merosomenbildung ermöglicht wird (van de Sand *et al.*, 2005; Sturm *et al.*, 2006; Baer *et al.*, 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass auch in der Leberphase DPAP3 die Aktivierung von Sub1 übernimmt. Allerdings scheint es so, dass es noch eine weitere, wenn auch weniger effektive Methode gibt, durch die Sub1 aktiviert wird. So wird bspw. auch MSP1 bevorzugt durch Sub1 prozessiert und verfügt über 2 unabhängige Schnittstellen für Sub1, wobei eine klar bevorzugt wird. Werden beide Sub1-Erkennungssequenzen mutiert so findet weiterhin, wenn auch weniger effizient, eine Prozessierung von MSP1 statt (Blackman, 2008). Kürzlich konnte eine dritte Erkennungssequenz in PfMSP1 identifiziert werden; diese Erkennungssequenz ist jedoch nicht für Sub1, die Protease konnte bisher nicht identifiziert werden. Wird die dritte Erkennungssequenz ebenfalls mutiert, kann keine Prozessierung von MSP1 mehr stattfinden, die Parasitenentwicklung wird blockiert (Sujaan Das, National Institute for Medical Research, London; persönliche Mitteilung). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für die Subtilisinprozessierung vorstellbar, so dass DPAP3 zwar bevorzugt die Prozessierung von Sub1 übernimmt, es jedoch eine Alternativstrategie gibt. Hierfür würde auch sprechen, dass es in *P. berghei*-Parasiten der Stämme NK65 und ANKA

gelingen ist eine Deletion von *pbdpap3* durchzuführen (Fifi Masduki, Max-Planck-Institut, Berlin; persönliche Mitteilung). Die Entwicklung der Leberparasiten war zwar verzögert, aber sie konnte vollendet werden und die Parasiten etablierten eine Blutphase. Trotz der Deletion von PbDPAP3 konnte eine Prozessierung von PbSERA2 (Homolog zu PfSERA5) beobachtet werden, welche durch PfSub1 vorgenommen wird. Diese Beobachtung spricht dafür, dass PbSub1 auch in Abwesenheit von PfDPAP3 aktiviert wird und es eine Alternativprotease zu PbDPAP3 gibt. Eine Deletion des *sub1*-Gens konnte nicht durchgeführt werden, was auf die wichtige Bedeutung von PbSub1 hindeutet (Fifi Masduki, AG Matuschewski, persönliche Mitteilung).

Die Tatsache, dass PbDPAP3 nicht essentiell für die *P. berghei*-Parasiten ist muss den bisherigen Annahmen, dass das *P. falciparum* Homolog von DPAP3 essentiell für Blutstadien ist, nicht widersprechen. Möglicherweise verfügt *P. berghei* über eine alternative Protease für PbDPAP3-Funktionen, *P. falciparum* jedoch nicht. Für eine Überprüfung dieser Vermutung böte sich der konditionale *Knockout* von *pbdpap3* an. Wird die Deletion des Gens erst in der Mücke oder Leber vollzogen, so könnte sich zunächst eine transgene Parasitenpopulation etablieren. Stellt sich das Protein als essentiell heraus, so würde der Parasitenstamm nach vollzogener Exzision vermutlich schon am Ende der Leberphase eine Entwicklungsblockade erfahren, spätestens jedoch nach dem ersten Zyklus der Blutparasiten. Stellt sich PfDPAP3 nicht als essentiell heraus, ist davon auszugehen, dass der Inhibitor SAK1 auch andere Proteasen hemmt.

4.4 Fazit

Eine schematische Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Bedeutung von PbICP, einer Cathepsin B-ähnlichen Protease und PbDPAP3 im Lebenszyklus von *P. berghei* ist in Abbildung 4-5 dargestellt. PbICP ist essentiell für Sporozoiten, möglicherweise weil PbICP die Regulation des essentiellen Proteins CSP übernimmt. Auch während der Leberphase scheint PbICP wichtig für die Parasitenentwicklung sein. Weiterhin konnte eine essentielle Aufgabe für eine bisher unbekannte Cathepsin B-ähnliche Protease am Ende der Leberphase aufgedeckt werden. Sowohl für die Aufteilung der Nuklei auf die Tochtermerozoiten, als auch für den Abbau des Wirtszytoskeletts scheint die Aktivität einer Cathepsin B-

ähnlichen Protease nötig. PbDPAP3 Expression ist nicht essentiell für die Parasitenentwicklung während der Beendung der Leberphase, scheint aber eine wichtige Funktion zu haben, die offenbar durch andere Proteasen kompensiert werden kann.

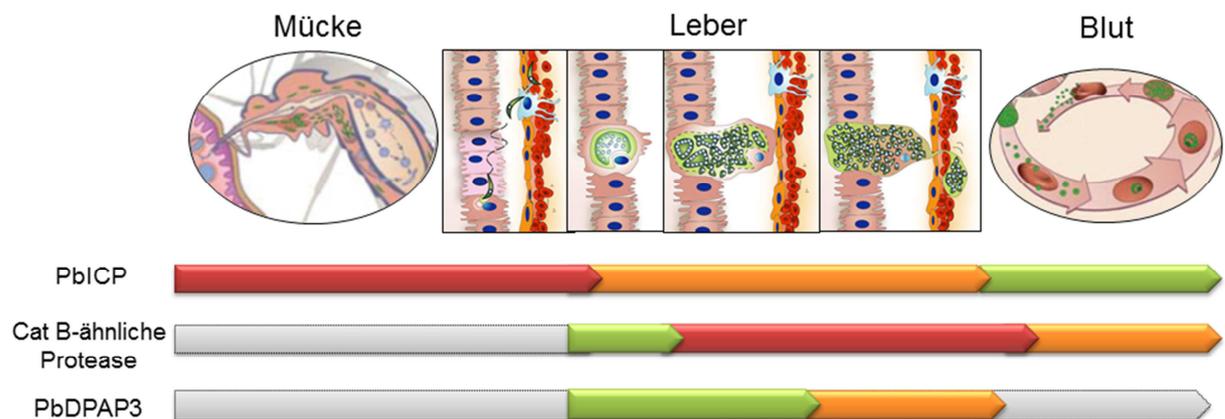


Abbildung 4-5: Übersicht der Bedeutung von PbICP, einer Cathepsin B-ähnlichen Protease und PbDPAP3 im Lebenszyklus von *P. berghei*. Roter Balken = essentiell; gelber Balken = wichtig; grüner Balken = nicht essentiell; weisser Balken = nicht untersucht.

Die neu gewonnenen Erkenntnisse könnten zur Identifizierung neuer Zielproteasen für Antimalariamedikamente genutzt werden und bei der Entwicklung von Inhibitoren gegen parasitenspezifische Proteasen helfen.

Literaturverzeichnis

- Abrahamson, M. (1994). **Cystatins**. *Methods Enzymol* 244:685-700
- Alcami, A. (2003). **Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors**. *Nat Rev Immunol* 3(1): 36-50
- Aly, A.S., Matuschewski, K. (2005). **A malarial cysteine protease is necessary for Plasmodium sporozoite egress from oocysts**. *J Exp Med* 202(2): 225-230
- Aly, A.S.I., Vaughan, A.M., Kappe, S.H.I. (2009). **Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host**. *Annu Rev Microbiol* 63: 195-221
- Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., Menard, R. (2006). **Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal**. *Nat Med* (2): 220-224
- Amino, R., Giovanini, D., Thiberge, S., Gueirard, P., Boisson, B., Dubremetz, J.F., Prevost, M.C., Ishino, T., Yuda, M., Menard, R. (2008). **Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis of the mammalian host**. *Nature protocols* (2): 1705-1712
- Aponte, J.J. et al. (2007). **Safety of the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in a highly endemic area of Mozambique: a double blind randomized controlled phase I/IIb trial**. *Lancet* 370(9598):1543-1551
- Arastu-Kapur, S., Ponder, E.I., Fonović, U.P., Yeoh, S., Yuan, F., Fonović, M., Grainger, M., Phillips, C.I., Powers, J.C. & Bogoy, M. (2008). **Identification of proteases that regulate erythrocyte rupture by the malaria parasite Plasmodium falciparum**. *Nat Chem Biol* 4(3): 203-213
- Ashley, M.V., Kappe, S.H.I., Ploss, A., Mikolajczak, S.A. (2012). **Development of humanized mouse models to study human malaria parasite infection**. *Future Microbiol* 7(5):657-665
- Asojo, O.A., Goud, G., Dhar, K., Loukas, A., Zhan, B., Deumic, V., Liu, S., Borgstahl, G.E., Hotez, P.J. (2005). **X-ray structure of Na-ASP-2, apathogenesis-related-1 protein from the nematode parasite, Necator americanus, and a vaccine antigen for human hookworm infection**. *J Mol Biol* 346(3): 801-814
- Baer, K., Klotz, C., Kappe, S.H., Schieder, T., Frevert, U. (2007). **Release of hepatic Plasmodium yoelii merozoites into the pulmonary microvasculature**. *PLoS Pathog* 3(11): e171
- Bano, N., Romano, J.D., Javabalasingham, B., Coppens, I. (2007). **Cellular interactions of Plasmodium liver stage with its host mammalian cell**. *Int J Parasitol* 37(12):1329-1341
- Barrett, A.J., Kembhavi, A.A., Hanada, K. (1981). **E-64 [L-trans-epoxysuccinyl-leucyl-amido(4(guanidine)butane)] and related epoxides as inhibitors of cysteine proteinases**. *Acta Biol Med Ger* 40(10-11): 1513-1527
- Barrett, A.J., Kembhavi, A.A., Brown, M.A., Kirschke, H., Knight, C.G., Tamai, M. & Hanada, K. (1982). **L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L**. *Biochem J* 201: 189-198
- Baruch, D.I., Pasloske, B.L., Singh, H.B., Bi, X., Ma, X.C., Feldmann, M., Taraschi, T.F., Howard, R.J. (1995). **Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes**. *Cell* 14 82(1):77-87
- Beijon, P., et al. **Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age**. *N Engl J Med* 359(24):2521-2532
- Besteiro, S., Coombs, G.H. & Mottram, J.C. (2004). **A potential role for ICP, a Leishmanial inhibitor of cysteine peptidases, in the interaction between host and parasite**. *Mol Microbiol* 54, 1224-1236

- Bhanot, P., Schauer, K., Coppens, I., Nussenzweig, V. (2005). **A surface phospholipase is involved in the migration of Plasmodium sporozoites through cells.** J Biol Chem 280(8): 6752-6760
- Blackman, M.J. (2008). **Malarial proteases and host cell egress: an 'emerging' cascade.** Cell Microbiol 10(10): 1925-1934
- Boddey, J.A., Hodder, A.N., Günther, S., Gilson, P.R., Patsiouras, H., Kapp, E.A., Pearce, J.A., de Koning-Ward, T.F., Simpson, R.J., Crabb, B.S., Cowman, A.F. (2010). **An aspartyl protease directs malaria effector proteins to the host cell.** Nature 463(7281): 627-631
- Bogyo, M., Verhelst, S., Belingard-Dubouchaud, V., Toba, S., Greenbaum, D. (2000). **Selective targeting of lysosomal cysteine protease with radiolabeled electrophilic substrate analogs.** Chem Biol 7(1): 27-38
- Bormann, S. & Matuschewski, K. (2011). **Targeting Plasmodium liver stages: better late than never.** Trends Mol Med 17(9): 527-536
- Bowyer, P.W., Simon, G.M., Cravatt, B.F., Bogyo, M. (2011). **Global profiling of proteolysis during rupture of Plasmodium falciparum from the host erythrocyte.** Mol Cell Proteomics 10(5): M110.001636
- Branda, C.S., Dymecki, S.M. (2004). **Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice.** Dev Cell 6(1): 7-28
- Butler, N.S., Schmidt, N.W., Vaughan, A.M., Aly, A.S., Kappe, S.H., Harty, J.T. (2011). **Superior antimalarial immunity after vaccination with late liver stage-arresting genetically attenuated parasites.** Cell Host Microbe 9(6):451-462
- Buttle, D.J., Murata, M., Knight, C.G., Barrett, A.J. (1992). **CA074 methyl ester: a prohibitor for intracellular cathepsin B.** Arch Biochem Biophys 299(2): 377-380
- Carrolo, M., Giordano, S., Cabrita-Santos, L., Corso, S., Vigário, A.M., Silva, S., Leirião, P., Carapau, D., Armas-Portela, R., Comoglio, P.M., Rodriges, A., Mota, M.M. (2003). **Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection.** Nat Med 9(11): 1363-1369
- Carter & Diggs. (1977). **Plasmodia of rodents.** Para Prot (3): 359-365
- CDC (2012a). **Malaria – history.** <http://www.cdc.gov/malaria/about/history/>
- CDC (2012b). **Malaria – parasites.** <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites>
- CDC (2012c). **Malaria-mosquitoes.** <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes>
- Chandramohanadas, R., Davis, P.H., Beiting, D.P., Harbut, M.B., Darling, C., Velmourougane, G., Lee, M.Y., Greer, P.A., Roos, D.S., Greenbaum, D.C. **Apicomplexan parasites co-opt host calpains to facilitate their escape from infected cells.** Science 324(5928): 794-797
- Choe, Y., Leonetti, F., Greenbaum, D.C., Lecaille, F., Bogyo, M., Brömme, D., Ellman, J.A., Craik, C.S. (2006). **Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities.** J Bio Chem 281(18):12824-12832
- Cockburn, I.A., Tse S.W., Radtke, A.J., Srinivasan, P., Chen, Y.C., Sinnis, P. & Zavala, F. (2011). **Dendritic cells and Hepatocytes Use Distinct Pathways to Process Protective Antigen from Plasmodium in vivo.** PLoS Pathog 7(3): e1001318
- Cohen, J., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R., Vekemans, J., Leach, A. (2010). **From the circumsporozoite protein to the RTS,S/AS candidate vaccine.** Human vaccines 6:90-96
- Combe, A., Giovannini, D., Carvalho, T.G., Spath, S., Boisson, B., Loussert, C., Thiberge, S., Lacroix, C., Gueirard, P., Ménard, R. (2009). **Clonal conditional mutagenesis in malaria parasites.** Cell Host Microbe 5(4): 386-396

- Copeland, R.A. **Evaluation of Enzyme inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists** (2005). *Methods of Biochemical Analysis*, kapitel 7
- Coppi, A., Pinzon-Ortiz, C., Hutter, C., Sinnis, P. (2005). **The Plasmodium circumsporozoite protein is proteolytically processed during cell invasion.** *J Exp Med* 3;201(1):27-33
- Coppi, A., Tewari, R., Bishop, J.R., Bennett, B.L., Lawrence, R., Esko, J.D., Billker, O., Sinnis, P. (2007). **Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to Plasmodium sporozoites to stop migrating and productively invade host cells.** *Cell host Microbe* 2(5): 316-327
- Coppi, A. & Sinnis, P. (2007). **A long and winding road: the Plasmodium sporozoites journey in the mammalian host.** *Parasitol Int* 56(3): 171-178
- Coppi, A., Nararajan, R., Pradel, G., Bennett, B.L., James, E.R., Roggero, M.A., Corradin, G., Persson, C., Tewari, R. Sinnis, P. (2011). **The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host.** *J Exp Med* 208(2): 341-356
- Cowman, A.F. & Crabb, B.S. (2006). **Invasion of red blood cells by malaria parasites.** *Cell* 124: 755-788
- Cox-Singh, J., Davis, T.M.E., Lee, K.S., Shamsul, S.S.G., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H.A., Conway, D.J., Singh, B. (2008). **Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life-threatening.** *Clin Infect Dis* 46(2): 165-171
- Crawford, M.J., Thomsen-Ziegler, N., Ray, M. Schachtner, J., Roos, D.S., Seeber, F. (2006). **Toxoplasma gondii scavenges host-derived lipoic acid despite its de novo synthesis in the apicoplast.** *EMBO J* 25(13): 3214-3222
- Dalal, S. & Klemba, M. (2007). **Roles for two aminopeptidases in vacuolar hemoglobin catabolism in Plasmodium falciparum.** *J Biol Chem* 282(49): 35978-35987
- Da Silva, F.A.A., Vieira, L.C., Krieger, M.A., Goldenberg, S., Zanchin, N.I., Guimaraes, B.G. (2007). **Crystal structure of chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor from Trypanosoma cruzi.** *J Struct Biol* 157(2): 416-423
- Daubersies, P. et al. (2000). **Protection against Plasmodium falciparum malaria in chimpanzees by immunization with the conserved pre-erythrocytic liver-stage antigen 3.** *Nat Med* 6(11): 1258-1263
- de Koning-Ward, T.F., Gilson, P.R., Boddey, J.A., Rug, M., Smith, B.J., Papenfuss, A.T., Sanders, P.R., Lundie, R.J., Maier, A.G., Cowman, A.F., Crabb, B.S. (2009). **A newly discovered protein export machine in malaria parasites.** *Nature* 459(7249): 945-649
- Deschermeier, C., Hecht, L.S., Bach, F., Rützel, K., Stanway, R.R., Nagel, A., Seeber, F., Heussler, V.T. (2012). **Mitochondrial lipoic acid scavenging is essential for Plasmodium berghei liver stage development.** *Cell Microbiol* 14(3):416-430
- Diemert, D.J., Bethony, J.M., Hotez, P.J. (2008). **Hookworm vaccines.** *Clin Infect Dis* 46(2): 282-288
- Dixon, M.W.A., Hawthorne, P.L., Spielmann, T., Anderson, K.L., Trenholme, K.R., Gardiner, D.L. (2008). **Targeting of the ring exported protein 1 to the Maurer's clefts is mediated by a two phases process.** *Traffic* 9(8): 1316-1326
- Dowse, T.J., Koussis, K., Blackman, M.J., Soldati-Favre, D. (2008). **Roles of proteases during invasion and egress by Plasmodium and Toxoplasma.** *Subcell Biochem* 47: 121-139
- Dubin, G. (2005). **Proteinaceous cysteine protease inhibitors.** *Cell Mol Life Sci* 62,653-669
- Ejigiri, I., Ragheb, D.R.T., Pina, P., Coppi, A., Bennett, B.L., Soldati-Favre, D., Sinnis, P. (2012). **Shedding of TRAP by a Rhomboid Protease from the Malaria Sporozoite Surface Is Essential for Gliding Motility and Sporozoite Infectivity.** 8(7):e10002725

- Eksi, S., Czesny, B., van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W., Eling, W., Williamson, K.C. (2007). **Inhibition of Plasmodium falciparum oocyst production by membrane-permeant cysteine protease inhibitor E64d.** Antimicrob Agents Chemother 51(3): 1064-1070
- Elliott, D.A., McIntosh, M.T., Hosgood, H.D. 3rd, Chen, S., Zhang, G., Baevova, P., Joiner, K.A. (2008). **Four distinct pathways of hemoglobin uptake in the malaria parasite Plasmodium falciparum.** Proc Natl Acad Sci U S A 105(7): 2463-2468
- Ettari, R., Zappalà, M., Micale, N., Schirmeister, T., Gelhaus, C., Leippe, M., Evers, A., Grasso, S. (2010). **Synthesis of novel peptidomimetics as inhibitors of protozoan cysteine proteases falcipain-2 and rhodesain.** Eur J Med Chem 45(7): 3228-3233
- Fowler, R.E., Fookes, R.E., Lavin, F., Bannister, L.H., Mitchell, G.H. (1998). **Microtubules in Plasmodium falciparum merozoites and their importance for invasion of erythrocytes.** Parasitol 117(5): 425-433
- Frevert, U, Sinnis, P., Cerami, C., Shreffler, W., Takacs, B., Nussenzweig, V. (1993). **Malaria circumsporozoite protein binds to heparin sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes.** J Exp Med 177(5): 1287-1298
- Frevert, U., Späth, G.F., Yee, H. (2008). **Exoerythrocytic development of Plasmodium gallinaceum in the white leghorn chicken.** Int Parasitol 38(6): 655-672
- Frischknecht, F., Baldacci, P., Martin, B., Zimmer, C., Thiberge, S., Olivo-Marin, J.C., Shorte, S.L., Ménard, R. (2004). **Imaging movement of malaria parasites during transmission by Anopheles mosquitoes.** Cell Microbiol 6(7): 687-694
- Garcia, L.S. (2010). **Malaria.** Clinics in laboratory medicine 30: 93-129
- Gerald, N., Mahajan, B., Kumar, S. (2011). **Mitosis in the human malaria parasite Plasmodium falciparum.** Eukaryot Cell 10(4): 474-482
- Goldie, P., Roth, E.F., Oppenheim, J., Vanderberg, J.P. (1990). **Biochemical characterization of Plasmodium falciparum hemozoin.** Am J Trop Med Hyg 43(6): 584-596
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W. & Cong, Y. (2003). **The Calpain System.** Physiol Rev 83:731-801
- Gosh, A.K., Devenport, M., Jethwaney, D., Kalume, D.E., Pandey, A., Anderson, V.E., Sultan, A.A., Kumar, N., Jacobs-Lorena, M. (2009). **Malaria parasite invasion of the mosquito salivary gland requires interaction between the Plasmodium TRAP and the Anopheles Saglin proteins.** PLoS Pathog 5(1):e1000265
- Gräwe, S. (2010). **Alterations of host cell physiology in the late phase of Plasmodium hepatocyte infection.** Dissertation
- Graewe, S., Rankin, K.E., Lehmann, C., Deschermeier, C., Hecht, L., Froehlike, U., Stanway, R.R., Heussler, V.T. (2011). **Hostile takeover by Plasmodium: reorganization of parasite and host cell membranes during liver stage egress.** PLoS Pathog 7(9): e1002224
- Graewe, S. & Stanway, R.R., Rennenberg, R., Heussler, V.T. (2012). **Chronicle of a death foretold: Plasmodium liver stage parasites decide on the fate of the host cell.** FEMS Microbiol Rev (36): 111-130
- Greenbaum, D.C., Baruch, A., Grainger, M., Bozdech, Z., Medzihradzky, K.F., Engel, J., DeRisi, J., Holder, A.A., Bogyo, M. **A role for the protease falcipain-1 in host cell invasion by the human malaria parasite.** Science 298(5600): 2002 2006
- Grüning, C., Heiber, A., Kruse, F., Flemming, S., Franci, G., Colombo, S.F., Fasana, E., Schoeler, H., Borgese, N., Stunnenberg, H.G., Przyborski, J.M., Gilberger, T.W., Spielmann, T. (2012). **Uncovering common principles in protein export of malaria parasites.** Cell Host Microbe 12(5): 717-729

- Gueirard, P., Tavares, J., Thiberge, S., Bernex, F., Ishino, T., Milon, G., Franke-Fayard, B., Janse, C.J., Menard, R., Amino, R. (2010). **Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host.** Proc Natl Acad Sci U S A 107(43):18640-18645
- Gupta, R., Krause-Ihle, T., Bergmann, B., Müller, I.B., Khomutov, A.R., Müller, S., Walter, R.D., Lüersen, K. (2005). **3-Aminoxy-1-aminopropane and derivatives have an antiproliferative effect on cultured Plasmodium falciparum by decreasing intracellular polyamine concentrations.** Antimicrob Agents Chemother 49(7):2857-2864
- Guroff, G. (1964). **A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain.** J Biol Chem 239: 149-155
- Hansen, G., Heitmann, A., Witt, T., Li, H., Jiang, H., Shen, X., Heussler, V.T., Rennenberg, A., Hilgenfeld, R. (2011). **Structural basis for the regulation of Cysteine-Protease Activity by a new class of Protease Inhibitors in Plasmodium.** Structure 19(7): 919-929
- Hafalla, J.C., Silvie, O., Matuschewski, K. (2011). **Cell biology and immunology of malaria.** Immun rev 240: 297-316
- Hanspal, M., Dua, M., Takakuwa, Y., Chishti, A.H., Mizuna, A. (2002). **Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane skeletal proteins at late stages of parasite development.** Blood 100(3):1048-1054
- Heitmann, A. (2008). **Herstellung transgener Plasmodium berghei Parasiten, die die Inhibitor-domäne des Cysteinproteaseinhibitors PblCP überexprimieren.** Diplomarbeit
- Helm, S., Lehmann, C., Nagel, A., Stanway, R.R., Horstmann, S., Llinas, M., Heussler, V.T. (2010). **Identification and Characterization of a Liver Stage-specific Promoter Region of the Malaria Parasite Plasmodium.** PLoS One 5(10):e13653
- Hellmann, J.K., Münter, S., Kudryashev, M., Schulz, S., Heiss, K., Müller, A.K., Matuschewski, K., Spatz, J.P., Schwarz, U.S., Frischknecht, F. (2011). **Environmental constraints guide migration of malaria parasites during transmission.** PLoS Pathog 7(6): e1002080
- Hiller, N.L., Bhattacharjee, S., von Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estraño, C., Haldar, K. (2004). **A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection.** Science 306(5703): 1934-1937
- Hodder, A.N., Drew, D.R., Epa, V.C., Delorenzi, M., Bourgon, R., Miller, S.K., Moritz, R.L., Frecklington, D.F., Simpson, R.J., Speed, T.P., Pike, R.N., Crabb, B.S. (2003). **Enzymic, phylogenetic, and structural characterization of the unusual papain-like protease domain of Plasmodium falciparum SERA5.** J Biol Chem 278(48):48169-48177
- Hodder, A.N., Malby, R.L., Clarke, O.B., Fairlie, W.D., Colman, P.M., Crabb, B.S., Smith, B.J. (2009). **Structural insights into the protease-like antigen Plasmodium falciparum SERA5 and its noncanonical active-site serine.** J Mol Biol 329(1): 154-165
- Hogg, T., Nagarajan, K., Herzberg, S., Chen, L., Shen, X., Jiang, H., Wecke, M., Blohmke, C., Hilgenfeld, R. & Schmidt, C.L. (2006). **Structural and Functional Characterization of Falcipain-2, a Hemoglobinase from the Malarial Parasite Plasmodium falciparum.** J Biol Chem 281(35): 25425-25437
- Howell, S.A., Hackett, F., Jongco, A.M., Withers-Martinez, C., Kim, K., Carruthers, V.B. & Blackman, M.J. (2005). **Distinct mechanisms govern proteolytic shedding of a key invasion protein in apicomplexan pathogens.** Mol Microbiol 57(1): 1342-1356
- Hsing, L.C., Rudensky, A.Y. (2005). **The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation.** Immunol Rev 207: 229-241
- Huang, R., Que, X., Hirata, K., Brinen, L.S., Lee, J.H., Hesell, E., Engel, J., Sajid, M., Reed, S. (2009). **The cathepsin L of Toxoplasma gondii (TgCPL) and its endogenous macromolecular inhibitor, toxostatin.** Mol Biochem Parasitol 164(1): 86-94

- Huh, C.G., Factor, V.M., Sanchez, A., Uchida, K., Conner, E.A., Thorgeirsson, S.S. (2004). **Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair.** Proc Natl Acad Sci U S A 101(13):4477-4482
- Hulden, L., Hulden, L. (2011). **Activation of the hypnozoite: a part of Plasmodium vivax life cycle and survival.** Malar J.10:90
- Ihsino, T., Chinzei, Y. and Yuda, M. (2005a). **A Plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection.** Cell Microbiol 7(2): 199-208
- Irene, D., Chung, T.Y., Chen, B.J., Liu, T.H., Li, F.Y., Tzen, J.T., Wang, C.I., Chyan, C.L. (2012). **Solution structure of a Phycystatin from Ananas comosus and its Molecular Interaction with papain.** PLoS One 7(11): e47865
- Ishino, T., Chinzei, Y., Yuda, M. (2005b). **Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte.** Mol Microbiol 58(5):1264-1275
- Janeway, C.A. et al. (2001). **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.** 5th edition. Garland Science, New York
- Janse, C.J., Ramesar, J. and Waters, A.P. (2006). **High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite Plasmodium berghei.** Nature protocols 1(1): 346-356
- Jaskolski, M. (2011). **A new piece in the 3D Jigsaw of malaria parasite.** Structure 19(7): 901-902
- Jordans, S., Jenko-Kokalj, S., Kühl, N.M., Tedelind, S., Sendt, W., Brömme, D., Turk, D., Brix, K. (2009). **Monitoring compartment-specific substrates cleavage by cathepsin B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions.** BMC Biochem 10:23
- Kaiser, K., Camargo, N., Coppens, I., Morrisey, J.M., Vaidva, A.B., Kappe, S.H. (2004). **A member of a conserved Plasmodium protein family with membrane-attack complex/perforin (MACPF)-like domains localizes to the micronemes of sporozoites.** Mol Biochem Parasitol 133(1): 15-26
- Kappe, S., Bruderer, T., Gantt, S., Fujioka, H., Nussenzweig, V., Menard, R. (1999). **Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites.** J Cell Biol 147(5): 937-944
- Kerr, I.D., Wu, P., Marion-Trukamaki, R., Mackey, Z.B., Brinen, L.S. (2009). **Crystal Structures of TbCatB and rhodesain, potential chemotherapeutic targets and major cysteine proteases of Trypanosoma brucei.** PLoS Negl Trop Dis 4(6):e701
- Klemba, M., Gluzman, I., Goldberg, D.E. (2004). **A Plasmodium falciparum dipeptidyl aminopeptidase I participates in vacuolar hemoglobin degradation.** J Biol Chem 279(41): 43000-43007
- Knapp, B., Nau, U., Hundt, E., Küpper, H.A. (1991). **A new blood stage antigen of Plasmodium falciparum highly homologous to the serine-stretch protein SERP.** Mol Biochem Parasitol 44(1): 1-13
- Kosec, G., Alvarez, V., Cazzulo, J.J. (2006). **Cysteine proteinase of Trypanosoma cruzi: from digestive enzymes to programmed cell death mediators.** Biocell 30(3): 479-490
- Koussis, K., Withers-Martinez, C., Yeoh, X., Child, M, Hackett, F., Knuepfer, E., Juliano, L., Woehlbier, U., Bujard, H., Blackman, M.J. (2009). **A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion.** EMBO 28(6): 725-735
- LaCrue, A.N., Sivaguru, M., Walter, M.F., Fidock, D.A., James, A.A., Beerntsen, B.T. (2006). **A ubiquitous Plasmodium protein displays a unique surface labeling pattern in sporozoites.** Mol Biochem Parasitol 148: 199-209

- Laemmli, U.K. (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature 227:680-685
- Le Bonniec, S., Deregnaucourt, C., Tedeker, V., Banerjee, R., Grellier, P., Goldberg, D.E., Schrével, J. (1999). **Plasmeprin II, an acidic hemoglobinase from the Plasmodium falciparum food vacuole, is active at neutral pH on the host erythrocyte membrane skeleton.** J Biol Chem 274(20): 14218-14223
- Leirião, P., Albuquerque, S.S., Corso, S., van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W., Rodriguez, A., Giordano, S., Mota, M.M. (2005). **HGF/MET signaling protects Plasmodium-infected host cells from apoptosis.** Cell Microbiol 7(4): 603-609
- Lecaillon, F., Kaleta, J., Brömme, D. (2002). **Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design.** Chem Rev 102(12):4459-4488
- Lehmann, C. (2008). **Interaktion eines Cysteinprotease-inhibitors von Plasmodium berghei mit Wirtszellproteasen während der Hepatozyteninfektion.** Diplomarbeit
- Lehmann, C. (2012) **Regulation der Merozoitenfreisetzung und des Wirtszelltodes durch Parasitenproteasen und Proteaseinhibitoren in der späten Leberphase von Plasmodium berghei.** Dissertation
- Lévesque, F., Seeberger, P.H. (2012). **Continuous-flow synthesis of the anti-malaria drug artemisinin.** Angew Chem Int Ed Engl 51(7): 1706-1709
- Li, H., Huang, J., Chen, L., Liu, X., Chen, T., Zhu, J., Lu, W., Shen, X., Li, J., Hilgenfeld, R. & Jiang, H. (2009). **Identification of Novel Falcipain-2 Inhibitors as Potential Antimalarial Agents through Structure-Based virtual Screening.** J Med Chem 52: 4936-4940
- Ljunggren, A., Redzynia, I., Alvarez-Fernandez, M., Abrahamson, M., Mort, J.S., Krupa, J.C., Jaskolski, M., Bujac, G. (2007). **Crystal structure of the parasite protease inhibitor chagsin in complex with a host target cysteine protease.** J Mol Biol 371(1): 137-153
- Machon, U., Buchhold, C., Stempka, M., Schirmeister, T., Gelhaus, C., Leippe, M., Gut, J., Rosenthal, P.J., Kisker, C., Leyh, M. & Schmuck, C. (2009): **On-Bead Screening of a Combinatorial Fumaric Acid Derived Peptide Library Yields Antiplasmodial Cysteine Protease Inhibitors with Unusual Peptide Sequences.** J Med Chem 52: 5662-5672
- Marti, M., Good, R.T., Rug, M., Knuepfer, E. & Cowman, A.F. (2004). **Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte.** Science 306(5703): 1930-1933
- Matarrese, P., Ascione, B., Ciarlo, L., Vona, R., Leonetti, C., Scarsella, M., Mileo, A.M., Catricalà, C., Paggi, M.G., Malorni, W. (2010). **Cathepsin B inhibition interferes with metastatic potential of human melanoma: an in vitro and in vivo study.** Mol Cancer 9:207
- Matthiesen, J., Bär, A., Bartels, A., Marien, D., Ofori, S., Biller, L., Tannich, E., Lotter, H., Bruchhaus, I. (2013). **Overexpression of specific cysteine peptidases restores the pathogenic phenotype of a non-pathogenic Enamoeba histolytica clone.** To be published
- Matuschewski, K. and Schuler, H. (2008). **Actin/myosin-based gliding motility in apicomplexan parasites.** Subcell Biochem (47): 110-120
- Mazier, D. et al. (1985). **Complete development of hepatic stages of Plasmodium falciparum in vitro.** Science 227(4685): 440-442
- McCoubrie, J.E., Miller, S.K., Sargeant, T., Good, R.T., Hodder, A.N., Speed, R.P., de Koning-Ward, T.F., Crabb, B.S. (2007). **Evidence for a common role for the serine-type Plasmodium falciparum serine repeat antigen proteases: implications for vaccine and drug design.** Infect Immun 75(12): 5565-5574
- McCutchan, T.F., Kissinger, J.C., Touray, M.G., Rogers, M.J., Li, J., Sullivan, M., Braga, E.M., Krettli, A.U., Miller, L.H. (1996). **Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarial parasites: biological and phylogenetic implications.** Proc Natl Acad Sci U S A 93(21): 11889-11894

- McKerrow, J.H., Sun, E., Rosenthal, P.J., Bouvier, J. (1993). **The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa**. *Annu Rev Microbiol* 47: 821-853
- Mehlhorn, H. & Piekarski, G. (2002). **Grundriss der Parasitenkunde** (6. Auflage). Heidelberg, Spektrum akad. Verlag
- Miller, L.H., Good, M.F., Milon, G. (1994). **Malaria pathogenesis**. *Science* 264: 1878-1883
- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., Doumbo, O.K. (2002). **The pathogenic basis of malaria**. *Nature* 415: 673-679
- Miller, S.K., Good, R.T., Drews, D.R., Delornezi, M., Sanders, P.R., Hodder, A.N., Speed, T.P., Cowman, A.F., de Koning-Ward, T.F., Crabb, B.S. (2002). **A subset of *Plasmodium falciparum* SERA genes are expressed and appear to play an important role in the erythrocytic cycle**. *J Biol Chem* 277(49): 47524-47532
- Mirković, B., Renko, M., Turk, S., Sosić, I., Jevnikar, Z., Obermajer, N., Turk, D., Gobec, S., Kos, J. (2011). **Novel mechanism of cathepsin B inhibition by antibiotic nitroxoline and related compounds**. *ChemMedChem* 6(8): 1351-1356
- Monteiro, A.C.S., Abrahamson, M., Lima, A.P.C.A., Vannier-Santos, M.A., Scharfstein, J. (2001). **Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi***. *J Cell Sci*; 114(21):3933-3942
- Morrison, J.F. (1969) **Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors**. *Biochemica et Biophysica Acta – Enzymology* 185, Kapitel 7
- Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., Rodríguez, A. (2001). **Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection**. *Science* 291(5501):141-144
- Mueller, A.K., Camargo, N., Kaiser, K., Andorfer, C., Frevert, U., Matuschewski, K., Kappe, S.H. (2005a) **Plasmodium liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite-host interface**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8):3022-3027
- Mueller, A.K., Labaied, M., Kappe, S.H., Matuschewski, K. (2005b). **Genetically modified Plasmodium parasites as a protective experimental malaria vaccine**. *Nature* 433: 164-167
- Mukherjee, S., Ukil, A., Das, P.K. (2007). **Immunomodulatory Peptide from Cystatin, a Natural Cysteine Protease Inhibitor, against Leishmaniasis as a Model Macrophage Disease**. *Antimicrob Agents Chemother* 51(5): 1700-1707
- Muller, W.A. (2011). **Mechanisms of leukocyte transendothelial migration**. *Annu Rev Pathol* 6: 323-344
- Münter, S., Sabass, B., Selhuber-Unkel, C., Kudryashev, M., Hegge, S., Engel, U., Spatz, J.P., Matuschewski, K., Schwarz, U.S., Frischknecht, F. (2009). **Plasmodium sporozoite motility is modulated by the turnover of discrete adhesion sites**. *Cell Host Microbe* 6(6): 551-562
- Murata, M., Miyashita, S., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K., Hatayama, K., Towatari, T., Nikawa, T. & Katunuma, N. (1991). **Novel epoxysuccinyl peptides. Selective inhibitors of cathepsin B, in vitro**. *FEBS Lett* 280, 307-310
- Musil, D., et al. (1991). **The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity**. *EMBO* 10(9): 2321-2330
- Myung, J.M., Marshall, P., Sinnis, P. (2004). **The Plasmodium circumsporozoite protein is involved in mosquito salivary gland invasion by sporozoites**. *Mol Biochem Parasitol* 133(1): 53-59
- Na et al. (2010). **Biochemical properties of a novel cysteine protease of Plasmodium vivax, Vivapain-4**. *PLoS Negl Trop Dis* 4(10): e849

- Nagel, A., Prado, M., Heitmann, A., Tartz, S., Jacobs, T., Deschermeier, C., Helm, S., Stanway, S. & Heussler, V.T. (2013). **A new approach to generate a safe double-attenuated Plasmodium liver stage vaccine.** To be published
- O'Brien, T.C., Mackey, Z.B., Fetter, R.D., Choe, Y., O'Donoghue, A.J., Zhou, M., Craik, C.S., Caffrey, C.R., McKerrow, J.H. (2008). **A parasite cysteine protease is key to host protein degradation and iron acquisition.** J Bio. Chem 28934-28943
- Ochieng, J. & Chaudhuri (2010). **Cystatin Superfamily.** J Health Care Poor Underserved 21(1): 51-70
- O'Donnell et al. (2006). **Intramembrane proteolysis mediates shedding of a key adhesion during erythrocyte invasion by the malaria parasite.** J Cell Biol 174(7): 1023-1033
- Orengo, J.M., Wong, K.A., Ocana-Morgner, C., Rodriguez, A. (2008). **A Plasmodium yoelii soluble factor inhibits the phenotypic maturation of dendritic cells.** Malar J 7:254
- Pamer, E., Cresswell, P. (1998). **Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing.** Annu Rev Immunol 16: 323-358
- Pandey, K.C., Singh, N., Arastu-Kapur, S., Bogyo, M., Rosenthal, P.J. (2006) **Falstatin, a Cysteine Protease Inhibitor of Plasmodium falciparum, Facilitates Erythrocyte Invasion.** PLoS Pathog 2(11):e117
- Peppard, J.V. and Knap, A.K. (1999). **Effect of the selective and non-selective cysteine protease inhibitors of the intracellular processing of interleukin 6 by HEPG2 cells.** In Vitro Cell Dev Biol Anim 35(8):459-464
- Perlaza, B.L., Zapata, C., Valencia, A.Z., Hurtado, S., Quintero, G., Sauzet, J.P., Brahimi, K., Blanc, C., Arévalo-Herrera, M., Druilhe, P., Herrera, S. (2003). **Immunogenicity and protective efficacy of Plasmodium falciparum liver-stage Ag-3 in Aotus lemurinus griseimembra monkeys.** Eur J Immunol 35(5): 1321-1327
- Pradel, G. & Frevet, U. (2001). **Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion.** Hepatology 33(5): 1154-1165
- Prudêncio, M., Rodriguez, A., Mota, M.M. (2006). **The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage.** Nat Rev Microbiol 4(11):849-856
- Rada, A.M., Moreno, C., Blair, S. (2008). **Successful in vitro culture of Plasmodium falciparum gametocytes.** Biomedica 28(4): 607-615
- Raghavendra, K., Barik, T.K., Reddy, B.P., Sharma, P., Dash, A.P. (2011). **Malaria vector control: from past to future.** Para res 108:757-779
- Rathore, D., McCutchan, T.F., Garboczi, D.N., Toida, T., Hernaiz, M.J., LeBrun, L.A., Lang, S.C., Linhardt, R.J. (2001). **Direct measurement of the interactions of glycosaminoglycans and a heparin decasaccharide with the malaria circumsporozoite protein.** Biochemistry 40(38): 11518-11524
- Rathore, D., Sacci, J.B., de la Vega, P., McCutchan, T.F. (2002). **Binding and invasion of liver cells by Plasmodium falciparum sporozoites. Essential involvement of the amino-terminus of circumsporozoite protein.** J Biol Chem 277(9): 7092-7098
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P., Barrett, A.J. (2004). **Evolutionary families of peptidase inhibitors.** Biochem J 378(Pt. 3):705-716
- Rawlings, N.D., Morton, F.R. & Barrett, A.J. (2006). **MEROPS: the peptidase database.** Nucleic Acids Res 34, D270-272
- Redzynia, I., Ljunggren, A., Abrahamson, M., Mort, J.S., Krupa, J.C., Jaskolski, M., Bujacz, G. (2008). **Displacement of the occluding loop by the parasite protein, chagasin, results in efficient inhibition of human cathepsin B.** J Biol Chem 283(33):22815-22825

- Reich, M., Wieczorzak, E., Jankowska, E., Palesch, D., Boehm, B.O., Burster, T. (2009). **Specific cathepsin B inhibitor is cell-permeable and activates presentation of TTC in primary human dendritic cells.** *Immunol Lett* 123(2): 155-159
- Rennenberg, A. (2009). **Charakterisierung eines Cysteinproteaseninhibitors des Malariaerregers *Plasmodium berghei*.** Dissertation
- Rennenberg, A., Lehmann, C., Heitmann, A., Witt, T., Hansen, G., Nagarajan, K., Deschermeier, C., Turk, V., Hilgenfeld, R., Heussler, V.T. (2010). **Exoerythrocytic Plasmodium parasites secrete a cysteine protease inhibitor involved in sporozoite invasion and capable of blocking cell death of host hepatocytes.** *PLoS Pathog* 6(3):e1000825
- Riekenberg, S., Witjes, B., Saric, M., Bruchhaus, I. & Scholze, H. (2005). **Identification of EhICP1, a Chagasin-like cysteine protease inhibitor of *Entamoeba histolytica*.** *FEBS Lett* 579, 1573-1578
- Rosenthal, P.J., McKerrow, J.H., Aikaqa, M., Nagasawa, H., Leech, J.H. (1988). **A malarial cysteine protease is necessary for hemoglobin degradation by *Plasmodium falciparum*.** *J Clin Invest* 82:1560-1566
- Rosenthal, P.J. & Meshnick, S.R. (1996). **Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites.** *Mol Biochem Parasitol* 83(2): 131-139
- Rosenthal, P.J. (2011) **Falcipains and other cysteine proteases of malaria parasites.** *Adv. Exp Med Biol* 712: 30-48
- Sajid, M., McKerrow, J.H. (2002), **Cysteine proteases of parasitic organisms.** *Mol Biochem Parasitol* 120(1): 1-21
- Salas, F., Fichmann, J., Lee, G.K., Scott, M.D., Rosenthal, P.J. (1995). **Functional expression of falcipain, a *Plasmodium falciparum* cysteine proteinase, supports its role as a malarial hemoglobinase.** *Infect Immun* 63(6):2120-2125
- Salmon, B.L., Oksman, A., Goldberg, D.E. (2001). **Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(1): 271-276
- Salmon, D., do Aido-Machado, R., Diehl, A., Leidert, M., Schmetzer, O., Lima, A.P.C.A., Scharfstein, J., Oschkinat, H., Pires, J.R. (2006). **Solution structure and backbone dynamics of the *Trypanosoma cruzi* cysteine protease inhibitor chagasin.** *J Mol Biol* 357(5):1511-1521
- Sanderson, S.J., Westrop, G.D., Scharfstein, J., Mottram, J.C., Coombs, G.H. (2003). **Functional conservation of a natural cysteine peptidase inhibitor in protozoan and bacterial pathogens.** *FEBS Lett* 542:12-16
- Santos, C.C. et al. (2005). **Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells.** *J Cell Sci* 118901-915
- Santos, C.C., Scharfstein, J., Lima, A.P.C.A. (2006). **Role of chagasin-like inhibitors as endogenous regulators of cysteine proteases in parasitic protozoa.** *Parasitol Res* 99(4):323-324
- Santos, C.C., Coombs, G.H., Lima, A.P., Mottram, J.C. (2007). **Role of the *Trypanosoma brucei* natural cysteine peptidase inhibitor ICP in differentiation and virulence.** *Mol Microbiol* 66(4): 991-1002
- Saric, M. Vahrman, A., Bruchhaus, I., Bakker-Grunwald, T. & Scholze, H. (2006). **The second cysteine protease inhibitor, EhICP2, has a different localization in trophozoites of *Entamoeba histolytica* than EhICP1.** *Parasitol Res* 100, 171-174
- Sayer, J.M. & Louis, J.M. (2009). **Interactions of different inhibitors with active-site Aspartyl residues of HIV-1-Protease and possible relevance to Pepsin.** *Proteins* 75(3):556-568

- Schneider, B., Jariwala, A.R., Periago, M.V., Gazzinelli, M.F., Bose, S.N., Hotez, P.J., Diemert, D.J., Bethony, J.M. (2011). **A history of hookworm vaccine development.** Hum Vaccin 7(11): 1234-1244
- Shenai, B.R., Sijwalj, P.S., Singh, A., Rosenthal, P.J. (2000). **Characterization of native and recombinant falcipain-2, a principal trophozoite cysteine protease and essential hemoglobinase of Plasmodium falciparum.** J Biol Chem 275:29000-29010
- Shenai, B.R., Lee, B.J., Alvarez-Hernandez, A., Chong, P.Y., Emal, C.D., Neitz, J., Roush, W.R. & Rosenthal, P.J. (2003). **Structure-Activity Relationships for Inhibition of Cysteine Protease Activity and Development of Plasmodium falciparum by Peptidyl Vinyl Sulfones.** Antimicrob Agents Chemother 47(1): 154-160
- Sidjanski, S.P., Vanderberg, J.P., Sinnis, P. (1997). **Anopheles stephensi salivary glands bear receptors for region I of the circum sporozoite protein of Plasmodium falciparum.** Mol Biochem Parasitol 90(1): 33-41
- Sijwalj, P.S., Shenai, B.R., Gur, J., Singh, A., Rosenthal, P.J. (2001). **Expression and characterization of the Plasmodium falciparum haemoglobinase falcipain-3.** Biochem J 360:481-489
- Sijwalj, P.S., Koo, J., Singh, N., Rosenthal, P.J. (2006) **Gene disruptions demonstrate independent roles for the four falcipain cysteine proteases of Plasmodium falciparum.** Mol Biochem Parasitol 150(1):96-106
- Silmon de Monerri, N.C., Flynn, H.R., Campos, M.G., Hackett, F., Koussis, K., Withers-Martinet, C., Skehel, J.M., Blackman, M.J. (2011). **Global identification of multiple substrates for Plasmodium falciparum SUB1, an essential malarial processing protease.** Infect Immun 79(3): 1086-1097
- Simmons, D., Woollett, G., Bergin-Cartwright, M., Kay, D., Scaife, J. (1987). **A malaria protein exported into a new compartment within the host erythrocyte.** EMBO J 6(2):485-491
- Simpson, R.J. (2010) **Homogenization of mammalian tissue.** Cold Spring Harb Protoc 2010(7):pdb.prot5455
- Sinnis, P., Clavijo, P., Fenyó, D., Chait, B.T., Cerami, B.T., Nussenzweig, V. (1994). **Structural and functional properties of region II-plus of the malaria circumsporozoite protein.** J Exp Med 180(1): 297-306
- Sivaraman, J., Nägler, D.K., Zhang, R., Ménard, R., Cygler, M. (2000). **Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine.** J Mol Biol 295(4): 939-951
- Smith, B.O., Picken, N.C., Westrop, G.D., Bromek, K., Mottram, J.C., Coombs, G.H. (2006). **The structure of Leishmania Mexicana ICP provides evidence for convergent evolution of cysteine peptidase inhibitors.** J Biol Chem 281(9):5821-5828
- Soni, S., Dhawan, S., Rosen, K.M., Chafel, M., Chishti, A.H., Hanspal, M. (2005). **Characterization of events preceding the release of malaria parasites from the host red blood cell.** Blood Cells Mol Dis 35(2): 201-211
- Southern, J.A., Young, D.F., Heaney, F., Baumgartner, W.K. and Randall, R.E. (1991) **Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics.** J Gen Virol 72(Pt7):1551-1557
- Spielmann, T., Hawthorne, P.L., Dixon, M.W., Hannemann, M., Klotz, K., Kemp, D.J., Klonis, N., Tilley, L., Trenholme, K.R., Gardiner, D.L. (2006). **A cluster of ring stage-specific genes linked to a locus implicated in cytoadherence in Plasmodium falciparum codes for PEXEL-negative and PEXEL-positive proteins exported into the host cell.** Mol Biol Cell 17(8): 3613-3624
- Spielmann, T. & Gilberger, T.W. (2010). **Protein export in malaria parasites: do multiple export motifs add up to multiple export pathways?** Trends Parasitol 26(1): 6-10

- Stanway, R.R., Witt, T., Zobiak, B., Aepfelbacher, M., Heussler, V.T. (2009a). **GFP-targeting allows visualization of the apicoplast throughout the life cycle of live malaria parasites.** *Biol Cell* 101(7): 415-430
- Stanway, R.R., Graewe, S., Rennenberg, A., Helm, S., Heussler, V.T. (2009b). **Highly efficient subcloning of rodent malaria parasites by injection of single merosomes or detached cells.** *Nature protocols* 4(10): 1433-1439
- Stanway, R.R., Mueller, N., Zobiak, B., Graewe, S., Froehlke, U., Zessin, P.J., Aepfelbacher, M., Heussler, V.T. (2011). **Organelles segregation into Plasmodium liver stage merozoites.** *Cell Microbiol* 13(11):1768-1782
- Staudt, N.D., Aicher, W.K., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Carmona, A.K., Bogyo, M., Klein, G. (2010). **Cathepsin X is secreted by human osteoblasts, digests CXCL-12 and impairs adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells to osteoblasts.** *Haematologica* 95(9): 1452-1460
- Steward, M.J. & Vanderberg, J.P. (1991). Malaria sporozoites release circumsporozoite protein from their apical end and translocate it along their surface. *J Protozool* 3(8):411-421
- Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L. (2003). **Biochemie.** Spektrum akademischer Verlag GmbH, 5. Auflage
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.M., Menard, R., Heussler, V.T. (2006). **Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids.** *Science* 313(5791):1287-1290
- Sturm, A. & Heussler V.T. (2007). **Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic Plasmodium parasites.** *Med Microbiol Immunol* 196(3): 127-133
- Sturm, A., Graewe, S., Franke-Fayard, B., Retzlaff, S., Bolte, S., Roppenser, B., Aepfelbacher, M., Janse, C., Heussler, V.T. (2009). **Alteration of the parasite plasma membrane and the parasitophorous vacuole membrane during exo-erythrocytic development of malaria parasites.** *Protist* 160(1):51-63
- Sultan, A.A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K.J., Crisanti, A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R.S., Ménard, R. (1997). **TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites.** *Cell* 90(3): 511-522
- Tewari, R., Spaccapelo, R., Bistoni, F., Holder, A.A., Crisanti, A. (2002). **Function of region I and II adhesive motifs of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein in sporozoite motility and infectivity.** *J Biol Chem* 277(49): 47613-47618
- Tewari, R., Rathore, D., Crisanti, A. (2005). **Motility and infectivity of Plasmodium berghei sporozoites expressing avian Plasmodium gallinaceum circumsporozoite protein.** *Cell Microbiol* 7(5): 699-707
- Trager, W., Jensen, J.B. (2005). **Human malaria parasites in continuous culture.** *J Parasitol* 91(3):484-486
- Turk, B., Stoka, V. (2007). **Protease signaling in cell death: caspase versus cysteine cathepsins.** *FEBS Lett* 581(15): 2761-2767
- Turk, B. & Turk, V. (2009). **Lysosomes as “suicide bags” in cell death: myth or reality?.** *J Biol Chem* 284(33): 21783-21787
- Turk, D., Janjic, V., Stern, I., Podobnik, M., Lamba, D., Dahl, S.W., Lauritzen, C., Pedersen, J., Turk, V., Turk, B. (2001). **Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases.** *EMBO J* 20:6570-6582
- Turk, V.; Bode, W. (1991). **The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases.** *FEBS Lett* 285(2): 213-219

- Udomsangpetch, R., Wählin, B., Carison, J., Berzins, K., Toril, M., Alkawa, M., Perimann, P., Wahlgreen, M. (1989). **Plasmodium falciparum-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes** J Exp Med 169(5): 1835-1840
- Van de Sand, C., Horstmann, S., Schmidt, A., Sturm, A., Bolte, S., Krueger, A., Lütgehetmann, M., Pollok, J.M., Libert, C., Heussler, V.T. (2005). **The liver stage of Plasmodium berghei inhibits host cell apoptosis**. Mol Microbiol 58(3): 731-742
- Vaughan, A.M., Kappe, S.H., Ploss, A., Mikolajczak, S.A. (2012). **Development of humanized mouse models to study human malaria parasite infection**. Future Microbiol 7(5): 657-665
- Voet, D., Voet, J.G. (1995). **Biochemistry, 2th edition**. John Wiley & Sons, Inc.
- Wahlgreen, M., Carlson, J., Udomsangpetch, R., Perimann, P. (1989). **Why do Plasmodium falciparum-infected erythrocyte form spontaneous erythrocyte rosettes?** Parasitol Today 5(6): 183-185
- Wang, Q., Fujioka, H., Nussenzweig, V. (2005). **Exit of Plasmodium sporozoites from oocysts is an active process that involves the circumsporozoite protein**. PLoS Pathog 1(1):e9
- Wang, F., Krai, P., Deu, E., Bibb, B., Lauritzen, C., Pedersen, J., Bogyo, M., Klemba, M. (2011). **Biochemical characterization of Plasmodium falciparum dipeptidyl aminopeptidase 1**. Mol Biochem Parasitol 175(1): 10-20
- Weber, K., Osborn, M. (1969). **The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis**. J Biol Chem 244: 4406-4412
- WHO (2010). **Economic costs of malaria**, RBM - Info sheet
- WHO (2011). **World Malaria Report 2011**, fact sheet
- Wickham, M.E., Culvenor, J.G., Cowman, A.F. (2003). **Selective inhibition of a two-step egress of malaria parasites from the host erythrocyte**. J Biol Chem 278(39): 37658-37663
- Wieczerek, E., Rodziewicz-Motowidlo, S., Jankowska, E., Gieldoń, A., Ciarkowski, J. (2007) **An enormously active and selective azapeptide inhibitor of cathepsin B**. J Pept Sci 13(8):536-543
- Withers-Martinez, C., Jean, L., Blackman, M.J. (2004). **Subtilisin-like proteases of the malaria parasite**. Mol Microbiol 53(1): 55-63
- Witt, T. (2007). **Mutagenese des Proteaseinhibitors PbICP von Plasmodium berghei**. Diplomarbeit
- Wu, Y., Wang, X., Liu, X., Wang, Y. (2003). **Data-mining approaches reveal hidden families of proteases in the genome of malaria parasites**. Genome Res 13(49): 601-616
- Yamamoto, A., Tomoo, K., Hara, T., Murata, M., Kitamura, K., Ishida, T. (2000). **Substrate specificity of bovine cathepsin B and its inhibition by CA074, based on crystal structure refinement of the complex**. J Biochem 127(4):635-643
- Yang, T., Zeng, H., Zhang, J., Okamoto, C.T., Warren, D.W., Wood, R.L., Bachmann, M., Mircheff, A.K. (1999). **MHC class II molecules, cathepsins, and La/SSB proteins in lacrimal acinar cell endomembranes**. Am J Physiol Cell Physiol 277: C994-C1007
- Yeoh, S. et al. (2007). **Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes**. Cell 131(6): 1072-1083
- Zhou, X.W., Blackman, M.J., Howell, S.A., Carruthers, V.B. (2004). **Proteomic analysis of cleavage events reveals a dynamic two-step mechanism for proteolysis of a key parasite adhesive complex**. Mol Cell Proteomics 3(6): 565-576

Danksagung

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

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Volker Heussler für die Themenstellung, die vielen anregenden Diskussionen, die Möglichkeit der selbstständigen Arbeit und die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitgliedern der AG Heussler für die tolle Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen Arbeitslagen. Dieser Dank gilt ebenso den Kollegen aus den Nachbarlaboren, die mir auch immer hilfreich zur Seite standen. Ganz besonders möchte ich mich bei Laborfee Ulrike Froehlke und Monica Prado bedanken, es hat grandiosen Spaß mit euch in Labor 2 gemacht. Auch bei Dr. Christine Lehmann möchte ich mich für die gemeinsame Bearbeitung toller Projekte und produktive Diskussionen bedanken. Vielen Dank an Dr. Carolina Agop-Nersesian für das konstruktive Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein herzlicher Dank geht auch an Dr. Jenny Matthiesen, ohne dich hätte das gesamte Studium höchstens halb soviel Spaß gemacht.

Vielen Dank an die graduierten Schule SDI, durch die ich die Möglichkeit erhalten habe in die Welt der Kristallografie und Strukturbiologie Einblick zu bekommen. Besonderer Dank gilt hierbei Prof. Dr. Markus Perbandt, der unzählige Seminare für uns organisiert hat und den Studenten immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld, Dr. Guido Hansen und Britta Schwarzloh (Universität Lüneburg) danke ich für die produktive Zusammenarbeit in PbICP-Teilprojekten.

Weiterhin danke ich Dr. Edgar Deu Sandoval der Stanford Universität für die Bereitstellung der Inhibitoren JCP410 und ML4188S.

Zuletzt möchte ich von ganzem Herzen meiner Familie, meinen Freunden und ganz besonders meinem Freund danken. Ohne euch wäre diese Arbeit nie möglich gewesen!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift