

**Funktionelle Analyse des „Apikalen Membran  
Antigens 1“ (AMA1):**

Untersuchung zur Rolle der Phosphorylierung des  
Vakzinkandidaten im Malariaerreger *Plasmodium falciparum*  
(Welch, 1897)

**Dissertation**

**zum Erlangen des Doktorgrades  
im Fachbereich Biologie  
der Universität Hamburg**

**von**

**Boris Prinz**

**Hamburg, 2013**

---

---

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. T. GILBERGER  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Priv.-Doz. Dr. H. LÜTHEN  
Tag der Disputation: 31. Mai 2013

Hamburg, den 21. Mai 2013



Professor Dr. C. Lohr  
Vorsitzender des  
Fach-Promotionsausschusses Biologie

# Inhaltsverzeichnis

|          |                                                                 |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Zusammenfassung</b>                                          | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Einleitung</b>                                               | <b>3</b>  |
| 2.1      | Malaria . . . . .                                               | 3         |
| 2.1.1    | Geschichte und Klinik der Malaria . . . . .                     | 3         |
| 2.1.2    | Biologie des Parasiten . . . . .                                | 5         |
| 2.1.3    | Lebenszyklen . . . . .                                          | 6         |
| 2.1.4    | Medikament- und Vakzinentwicklung . . . . .                     | 9         |
| 2.2      | Wirtszell-Invasionsstrategien und Erythrozytenentwicklung . . . | 11        |
| 2.2.1    | Die Invasion von <i>P. falciparum</i> in den Erythrozyten . . . | 14        |
| 2.2.2    | Apikales Membran Antigen 1 (AMA1) . . . . .                     | 18        |
| 2.2.3    | Das Kinom von <i>P. falciparum</i> . . . . .                    | 20        |
| 2.2.4    | Die Phosphorylierung von AMA1 . . . . .                         | 23        |
| 2.3      | Zielsetzung . . . . .                                           | 25        |
| <b>3</b> | <b>Material und Methoden</b>                                    | <b>26</b> |
| 3.1      | Material . . . . .                                              | 26        |
| 3.1.1    | Chemikalien . . . . .                                           | 26        |
| 3.1.1.1  | Antibiotika . . . . .                                           | 30        |
| 3.1.1.2  | Kits und Fertigversuchansätze . . . . .                         | 30        |
| 3.1.1.3  | DNA- und Proteinstandards . . . . .                             | 31        |
| 3.1.1.4  | Enzyme . . . . .                                                | 31        |
| 3.1.1.5  | Antikörper . . . . .                                            | 32        |
| 3.1.2    | Geräte und Verbrauchsmaterialien . . . . .                      | 33        |

|         |                                                                                               |    |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.3   | Medien & Puffer . . . . .                                                                     | 35 |
| 3.1.3.1 | Medien & Puffer für <i>P. falciparum</i> Kulturen . .                                         | 35 |
| 3.1.3.2 | Medien & Puffer für biochemische Methoden . .                                                 | 37 |
| 3.1.3.3 | Medien & Puffer für mikrobiologische Methoden                                                 | 38 |
| 3.1.3.4 | Medien & Puffer für molekularbiologische Methoden . . . . .                                   | 39 |
| 3.1.4   | Organismen . . . . .                                                                          | 40 |
| 3.1.5   | Vektoren und Oligonukleotide . . . . .                                                        | 40 |
| 3.1.5.1 | Vektoren . . . . .                                                                            | 40 |
| 3.1.5.2 | Oligonukleotide . . . . .                                                                     | 41 |
| 3.2     | Methoden . . . . .                                                                            | 43 |
| 3.2.1   | Mikrobiologische Versuche . . . . .                                                           | 43 |
| 3.2.1.1 | Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> . . .                                         | 43 |
| 3.2.1.2 | Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> . . . . .                                        | 43 |
| 3.2.1.3 | Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> . . . .                                         | 44 |
| 3.2.1.4 | Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)- RIL . . . . .               | 44 |
| 3.2.2   | Zellbiologische Methoden . . . . .                                                            | 44 |
| 3.2.2.1 | Kultivierung von <i>P. falciparum</i> . . . . .                                               | 44 |
| 3.2.2.2 | Herstellung von Ausstrichen und Giemsa-Färbung von <i>P. falciparum</i> Blutstadien . . . . . | 45 |
| 3.2.2.3 | Herstellung und Auftauen von Kryostabilaten .                                                 | 45 |
| 3.2.2.4 | Synchronisierung von <i>P. falciparum</i> mit Sorbitol                                        | 46 |
| 3.2.2.5 | Transfektion von <i>P. falciparum</i> mittels Elektroporation . . . . .                       | 46 |
| 3.2.2.6 | Isolation von Parasiten durch begrenzte Saponin-Lyse . . . . .                                | 47 |
| 3.2.2.7 | Herstellung von Parasitenlysats . . . . .                                                     | 47 |
| 3.2.2.8 | Erythrozyten-Invasion Komplemetationsassay .                                                  | 48 |
| 3.2.3   | Mikroskopie . . . . .                                                                         | 49 |
| 3.2.4   | Molekularbiologische Methoden . . . . .                                                       | 49 |
| 3.2.4.1 | Sterilisierung von Geräten und Lösungen . . . .                                               | 49 |
| 3.2.4.2 | Polymerase-Kettenreaktion . . . . .                                                           | 50 |

|          |                                                                                                  |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.4.3  | Kolonien-PCR zur Untersuchung von Bakterienstämmen auf die Aufnahme von Plasmid-DNA .            | 51        |
| 3.2.4.4  | Oligonukleotid-basierte Mutagenese . . . . .                                                     | 51        |
| 3.2.4.5  | Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA . .                                                       | 52        |
| 3.2.4.6  | Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung und Visualisierung von DNA-Fragmenten . . . . .        | 52        |
| 3.2.4.7  | DNA-Sequenzierung . . . . .                                                                      | 53        |
| 3.2.4.8  | Restriktionsverdau . . . . .                                                                     | 53        |
| 3.2.4.9  | Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .                                                            | 53        |
| 3.2.4.10 | Plasmid-Isolation (Mini- und Midi-Präparation)                                                   | 54        |
| 3.2.4.11 | Präparation von genomischer <i>P. falciparum</i> DNA                                             | 54        |
| 3.2.4.12 | Konzentrationsbestimmung von DNA . . . . .                                                       | 54        |
| 3.2.5    | Proteinbiochemische Methoden . . . . .                                                           | 55        |
| 3.2.5.1  | Affinitätschromatografische Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen . . . . .                      | 55        |
| 3.2.5.2  | Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .                        | 56        |
| 3.2.5.3  | Coomassie-Färbung von SDS-Gelen . . . . .                                                        | 57        |
| 3.2.5.4  | Westernblot . . . . .                                                                            | 57        |
| 3.2.5.5  | Phosphatase-Assay . . . . .                                                                      | 58        |
| 3.2.5.6  | <i>In vitro</i> Phosphorylierungsassay . . . . .                                                 | 58        |
| 3.2.5.7  | Thrombinverdau von GST-Fusionsproteinen . .                                                      | 59        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b>                                                                                | <b>60</b> |
| 4.1      | Die Funktion von S588, S590 und S601 in der zytoplasmatischen Domäne von AMA1 . . . . .          | 60        |
| 4.1.1    | Funktionelle Untersuchung der <i>in vitro</i> Phosphorylierung von S588, S590 und S601 . . . . . | 61        |
| 4.1.2    | Expression und Aufreinigung von AMA1-CPD Mutanten als GST Fusionsproteine . . . . .              | 61        |
| 4.1.3    | Evaluation eines alternativen AMA1-spezifischen Phosphorylierungsassays . . . . .                | 62        |
| 4.1.4    | <i>In vitro</i> Phosphorylierung von S588, S590 und S601 . . .                                   | 63        |
| 4.1.5    | S590 wird abhängig von Kalzium jedoch unabhängig von S610 phosphoryliert . . . . .               | 64        |

|          |                                                                                       |            |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1.6    | Phänotypisierung der Mutanten S588A, S590A und S601A<br><i>in vivo</i> . . . . .      | 65         |
| 4.2      | Untersuchung von T612 und T613 . . . . .                                              | 67         |
| 4.2.1    | Phänotypisierung der Mutanten T612A und T613A <i>in vivo</i>                          | 67         |
| 4.2.2    | Die Phosphorylierung von T613 . . . . .                                               | 68         |
| 4.2.3    | T613 Phosphorylierung in Abhängigkeit der S610 Phosphorylierung . . . . .             | 69         |
| 4.3      | T613-Phosphorylierung und die Glykogen Synthase Kinase 3 . .                          | 70         |
| 4.3.1    | Expression und Lokalisation von GSK3 in <i>P. falciparum</i><br>Blutstadien . . . . . | 71         |
| 4.3.2    | <i>In vitro</i> Phosphorylierung von AMA1 durch GSK3 . . .                            | 71         |
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b>                                                                     | <b>76</b>  |
| 5.1      | Bedeutung der AMA1-Phosphorylierung für die Invasion . . . .                          | 78         |
| 5.2      | Zwei-Stufen-Regulation der AMA1-Funktion durch „phospho-priming“                      | 79         |
| 5.3      | Die Rolle von GSK3 bei der T613-Phosphorylierung . . . . .                            | 80         |
| 5.4      | Invasion und Inhibition der GSK3 . . . . .                                            | 84         |
| <b>6</b> | <b>Anhang</b>                                                                         | <b>87</b>  |
|          | <b>Abbildungsverzeichnis</b>                                                          | <b>91</b>  |
|          | <b>Tabellenverzeichnis</b>                                                            | <b>93</b>  |
|          | <b>Literaturverzeichnis</b>                                                           | <b>94</b>  |
|          | <b>Abkürzungsverzeichnis</b>                                                          | <b>119</b> |

# 1 Zusammenfassung

Malaria ist mit über 300 Million Neuinfektionen und etwa 1 Million krankheitsbedingter Todesfälle eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten der Gegenwart. Auslöser sind Parasiten der Gattung *Plasmodium*, welche in der Lage sind Erythrozyten zu invadieren und zu modifizieren. Die Invasion ist ein präzise koordinierter Prozess, der auf der genauen Abfolge von Proteinsekretion und spezifischer Protein-Protein Interaktionen beruht. Rezeptor-Phosphorylierung scheint dabei ein wichtiger Regulationsmechanismus zu sein. Dies wurde unter Anderem für den Vakzinkandidaten „apikale membran antigen 1“ (AMA1) gezeigt. Das Typ-I-Transmembranprotein bindet mit seiner extrazellulären Domäne an einen Rezeptor-Komplex in der Erythrozytenmembran, was die Voraussetzung für die Invasion der Wirtszelle durch den Parasiten ist. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne (CPD) von AMA1 an Serin 610 durch die Proteinkinase A (PKA) essentiell für die Funktion des Proteins ist. Mehrere unabhängige Untersuchungen konnten in der CPD von AMA1 neben S610 noch 5 weitere putative Phosphorylierungsstellen nachweisen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung dieser zusätzlichen Phosphorylierungsstellen in Hinsicht auf deren physiologische Funktion und die Identifizierung der verantwortlichen Kinase(n). Durch die Herstellung von Substitutionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die Serine S588, S601 und S590 *in vivo* keinen Einfluss auf die Funktion von AMA1 während der Erythrozyteninvasion haben. Dies steht im Gegensatz zu den Mutationen der Threonine T612 und T613, die zu einer 40 %igen bzw. 70 %igen Invasionsinhibition führten. Es konnte gezeigt werden, dass die quantitative Phosphorylierung von T613 erst nach der initialen Phosphorylierung von S610 durch die cAMP-abhängige Proteinkinase

A nachweisbar ist. Als potenzielle Kinase für die T613-Phosphorylierung wurde die „Glykogen Synthase Kinase 3“ (GSK3) genauer charakterisiert, da der Bereich um T613 einer GSK3 Substrat-Erkennungsstelle ähnelt. Die GSK3 kann vor-phosphoryliertes Substrat weiter phosphorylieren, wird im intraerythrozytären Zyklus exprimiert und ist für diesen essentiell. Es konnte gezeigt werden, dass die rekombinante GSK3 AMA1 T613-abhängig phosphoryliert und dass das Enzym in Schizonten zytosolisch exprimiert wird. Die Aktivierung von AMA1 scheint somit ein Zwei-Stufen-Prozess zu sein, in dem nicht nur die PKA sondern auch die GSK3 eine entscheidende Rolle spielt.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Malaria**

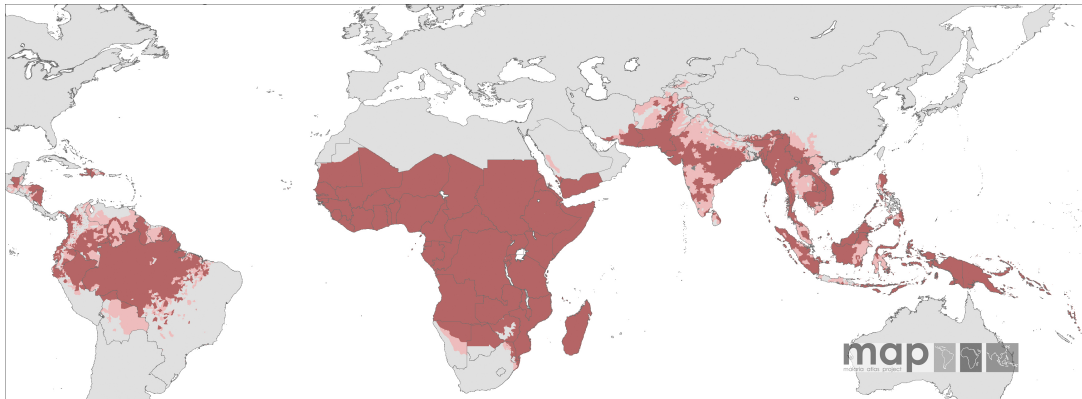
Im Jahr 2009 wurde die Zahl der Malariainfektionen weltweit auf bis zu 316 Millionen geschätzt (Cibulskis et al., 2011). 2011 lebten ungefähr 3,3 Mrd Menschen in Malaria-Risikogebieten. Diese Gebiete erstrecken sich über den gesamten tropischen und subtropischen Sektor mit Schwerpunkt auf das subsahararische Afrika. Hier werden jedes Jahr 80 % der Neuinfektionen und 90 % der Malaria-bedingten Todesfälle verzeichnet (WHO, 2012). Laut WHO (2012) zählt eine Malariainfektion noch heute weltweit zu den vier häufigsten Todesursachen von Kindern unter 5 Jahren und ist damit neben AIDS und Tuberkulose eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten unserer Zeit.

Neben den klimatischen Bedingungen in diesen Gebieten sind mangelnde Infrastruktur und die wirtschaftlich bedingte Armut weitere wichtige Faktoren für die Ausbreitung von Malaria. Studien belegen, dass die durch Malaria bedingte Mortalitätsrate in den Regionen Afrikas, in denen das Pro-Kopf-Einkommen unter 1,25 US\$ pro Tag liegt, höher ist als in einkommensstärkeren Gebieten (WHO, 2012).

#### **2.1.1 Geschichte und Klinik der Malaria**

Die ersten Berichte über Malariainfektionen gehen bis in das Jahr 2700 v. Ch. zurück, zu Zeiten des „gelben“ Kaisers Huang Ti. Damals wurde bereits eine Verbindung zwischen Drei-, respektive Viertagesfieber und einer Vergrößerung der Milz erkannt (Sherman, 1998). Auch der ägyptische Pharaο Tutankhamun (ca. 1300 v.C.) litt an einer Malariainfektion (Timmann & Meyer, 2010).

Europa und die Mittelmeerregion waren von der Antike bis in die 50er Jahre



**Abb. 1: Weltweites Vorkommen von *P. falciparum*.** Die dunkelroten Gebiete auf der Karte stellen Regionen dar, in denen die Anzahl der Neuinfektionen pro Jahr  $\geq 1$  von 10000 Einwohnern ist. In den hellroten Gebieten liegt die jährliche Neuinfektion  $\leq 1$  von 10000. Die grauen gebiete sind Malariafrei (Guerra et al., 2008).

aufgrund der weiträumigen Moor- und Marschlandschaften noch Malaria Endemiegebiete. Diese dienten den Malaria-übertragenden Mücken als Brutgebiet. Im Zuge der Industrialisierung und der Erschließung von Wohnraum wurden diese immer weiter ausgetrocknet, was zu einem Rückgang der Malaria führte (Knottnerus, 2002).

1897 fand der britische Mediziner Ronald K. B. Ross heraus, dass Stechmücken den Erreger in den Menschen übertragen (Poser, 1999). Die Hauptüberträger der Parasiten sind weibliche Mücken der Gattungen *Anopheles*. Aber auch *Aedes* und *Culex* können als Wirt fungieren (Loiseau et al., 2012; Barillas-Mury & Kumar, 2005; Farajollahi et al., 2011).

Der französische Militärarzt C.L. Laveran beschrieb im Jahr 1880 als erster den Malariaerreger, nachdem er Blutproben von erkrankten algerischen Soldaten unter dem Mikroskop untersucht hat. Dafür wurde er 1907 mit dem Medizinnobelpreis ausgezeichnet (Poser, 1999).

Der Erreger ist ein einzellige Parasit der Gattung *Plasmodium*. Die Gattung umfasst über 200 verschiedene Arten, wobei nahezu alle Vertebraten als Wirtsorganismen dienen einschließlich Affen (Deane, 1992), Vögel (Lachish et al., 2011), Reptilien (Fricke et al., 2010), Nagetiere (Franke-Fayard et al., 2010) und Menschen (Garcia, 2010). Es gibt 5 humanpathogene *Plasmodium*-Arten: *P. falciparum* (Erreger der falciparum Malaria), *P. ovale*, *P. vivax* (die Erreger der Malaria tertiana) *P. malariae* (Erreger der Malaria quartana) und *P.*

*knowlesi* (Erreger der knowlesi Malaria). Letzterer wurde erst vor Kurzem als humanpathogen beschrieben (Cox-Singh et al., 2008; Sabbatani et al., 2010; Schottelius et al., 2010; William et al., 2011). Das klinische Bild ist je nach Erregerart unterschiedlich.

Malaria quartana („Vier-Tage-Fieber“) wird durch eine Infektion mit *Plasmodium malariae* hervorgerufen. *P. vivax* und *P. ovale* verursachen die Malaria tertiana („Drei-Tage-Fieber“), wobei diese beiden Erregerspezies auch persistierende Ruhestadien, so genannte Hypnozoiten, ausbilden können, die in Hepatozyten Wochen bis Jahre verbleiben können. Durch einen bislang unbekannten Stimulus reifen diese Hypnozoiten zu Leberschizonten heran und lösen so einen Malariarückfall aus (Krotoski, 1989; Cogswell, 1992). Die Inkubationszeit beträgt im Schnitt zwischen 12 und 14 Tagen kann jedoch auch mehrere Wochen dauern, je nach Zustand des Immunsystems des Patienten (White, 2003).

*P. falciparum*, der überwiegend in Afrika vorkommt, stellt den tödlichsten Vertreter der Gattung dar (Abb.1) (WHO, 2012). Die erhöhte Mortalität begründet sich durch die Modifikation der Wirtszelle. In die Zelloberfläche infizierter Erythrozyten werden Parasitenproteine eingelagert, die zu der Anheftung an das Kapillarendothel und zur so genannten „Rosettenbildung“ infizierter und nicht infizierter roter Blutzellen führen können (Haldar & Mohandas, 2007). Dies und eine starke Immunreaktion führen bei der falciparum Malaria oder Malaria tropica häufig zu Komplikationen, die mit Gewebhypoxien und Organschädigungen einhergehen (Clark & Cowden, 1999). Treten unter anderem neurologische Ausfallerscheinungen auf, die bis hin zum Koma reichen können, spricht man von zerebraler Malaria (WHO, 2012).

### 2.1.2 Biologie des Parasiten

Die Gattung *Plasmodium* (gr. plasmatos = „kleines Gebilde“) gehört in die Klasse der *Haematozoa*, welche zusammen mit *Gregarinea* und *Coccidea* den Unterstamm der *Apicomplexa* bilden (Haldar et al., 2006). Diese Organismen sind eukaroytische, einzellige Parasiten. Die Gruppe der *Apicomplexa* umfasst eine Anzahl von human- und veterinärmedizinisch relevanten Parasiten wie *Eimeria* spp (Shirley et al., 2005), *Neospora* spp, *Babesia* spp und *Theileria* spp. *Toxoplasma gondii* ist ein weiterer humanpathogener Parasit der *Apikomplexa*, dessen Endwirt Katzen sind. Als Zwischenwirt können fast alle Säugetiere die-

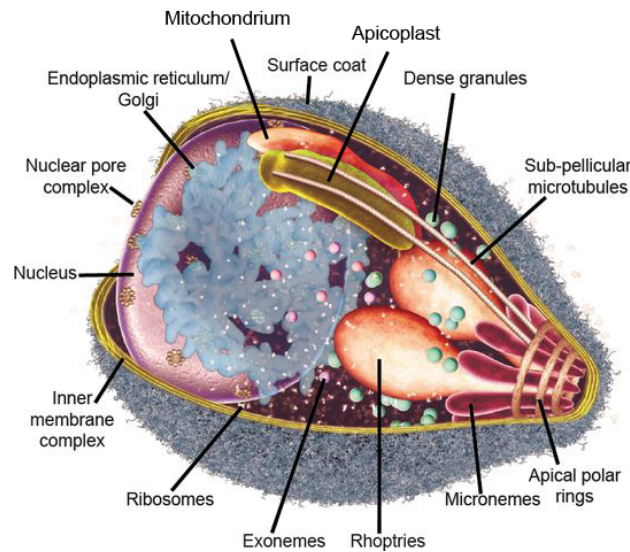
nen, wozu auch der Mensch gehört. Besondere Bedeutung kommt jedoch der Maus als Beutetier der Katze zu. *T. gondii* hat eminente Bedeutung als Erreger der Toxoplasmose beim Menschen und ist im Gegensatz zu vielen anderen Parasiten auch in Industrieländern weit verbreitet. Bei immunkompetenten Individuen ist die Infektion selbstlimitierend, jedoch kann eine chronische Infektion in lokalen Entzündungen im Gehirn resultieren, welche durch in das Nervengewebe invadierende Parasiten hervorgerufen werden (Lucius & Loos-Frank, 2008).

Die *Apikomplexa* sind polar aufgebaut und weisen in ihrem apikalen Bereich spezielle sekretorischen Organellen auf. Diese werden als Mikronemen, Exonemen, Rhoptrien und elektronendichten Granulae (Abb. 2) bezeichnet und sind an der Invasion der Wirtszelle und der anschließenden Ausbildung der parasitophoren Vakuole (PV) (siehe unten) beteiligt (Singh et al., 2007; Cowman et al., 2012). Ein weitere Besonderheit ist ein Chloroplasten-ähnliches Organell, der sogenannte Apikoplast. Der Apikoplast ist von 4 Membranen umgeben und seine Entstehung evolutiv durch sekundäre Endosymbiose zu erklären (Waller & McFadden, 2005; Foth & McFadden, 2003; McFadden, 2011). Das Apikoplasten-Genom umfasst ca. 35 kb und codiert für etwa 30 Proteine (McFadden, 2011). Mit Hilfe einer N-terminalen Apikoplasten-Zielsequenz werden über 400 im Zellkern kodierte Proteine in den Apikoplasten transportiert, die hier eine Vielzahl von Organell-spezifischen Stoffwechselwegen (z.B. Isoprenoid-Synthese, Fettsäure-Biosynthese) ermöglichen (Ralph et al., 2004).

Eine weitere strukturelle Besonderheit ist ein Membransystem, das direkt unterhalb der Plasmamembran liegt und als „innere Membran-Komplex“ (IMC) bezeichnet wird (Abb.2). Der IMC ist eine synapomorphe Struktur die namensgebend für die phylogenetische Übergruppe der *Alveolata* ist, zu der auch die *Apikomplexa* gehören (Cavalier-Smith, 1993). Zu dieser Gruppe zählen auch die *Ciliata* und die *Dinoflagellata*.

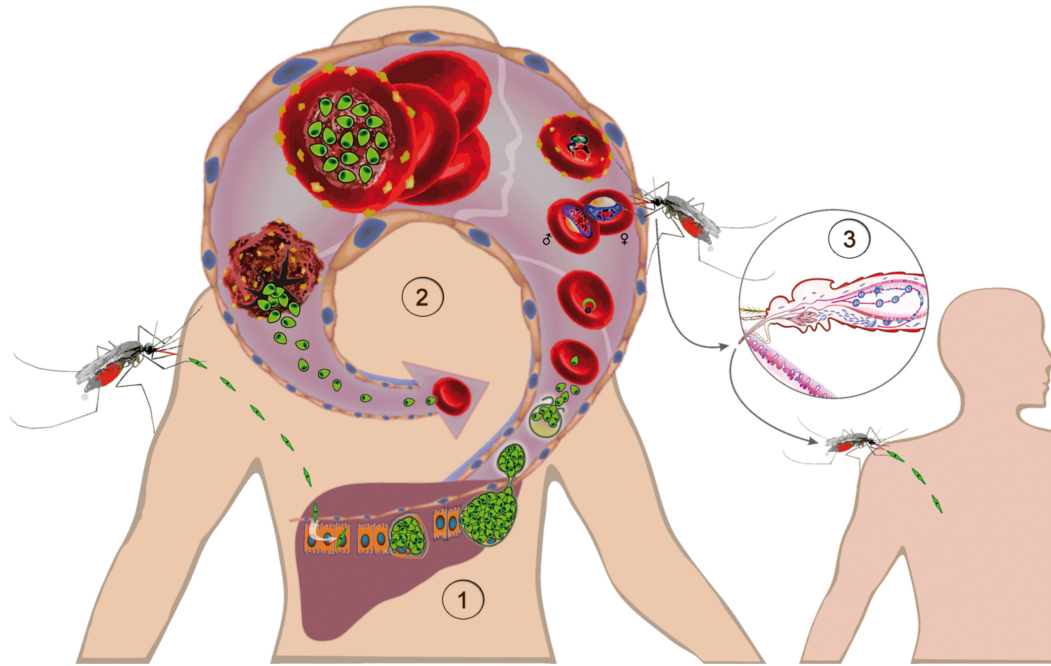
### 2.1.3 Lebenszyklen

*Plasmodium* durchläuft während seiner Entwicklung 3 Phasen: Die „Schizogonie“, die die ungeschlechtliche Vermehrungsphase darstellt, die „Gamogonie“, bei der sich die Geschlechtszellen (Gameten) ausbilden und die „Sporogonie“, bei der sich durch ungeschlechtliche Vermehrung Sporozoiten bilden. Dabei finden die Schizogonie und die erste Phase der Gamogonie in Wirbeltieren und



**Abb. 2: Schematische Darstellung eines Merozoiten.** (Cowman et al., 2012) Der Merozoit ist die haploide, invasive Form. Im vorderen Bereich befindet sich der apikale Komplex. Zu ihm gehören die Mikronemen und Rhoptrien. Weitere sekretorische Organellen sind die elektronendichten Granulae (dense granules) und die Exonemen. Unterhalb der Plasmamembran liegt der innere Membran-Komplex. Jeder Merozoit besitzt einen Apicoplasten und ein Mitochondrium. Im distalen Bereich liegt der Zellkern (Nucleus), neben dem das endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat sitzt.

der Übergang von der Gamogonie zur Sporogonie in den Arthropoden statt (Abb.3) (zusammengefasst in Hiepe et al. (2006)). Durch den Stich einer weiblichen Anopheles-Mücke gelangen durch den Speichel Sporozoiten zunächst in die Haut des menschlichen Wirts. Von hier aus migrieren die Sporozoiten in Blutgefäße und erreichen dabei über die Sinusoide die Leber. Über die Aufnahme durch Kupfferzellen gelangen die Sporozoiten aus dem Blutkreislauf in die Leber, transmigrieren mehrere Hepatozyten und invadieren letztendlich einen Hepatozyten (Frevert et al., 2008; Mota et al., 2001; Mota & Rodriguez, 2002, 2004). In diesem liegt der Parasit in einer parasitophoren Vakuole (PV) vor und beginnt mit der Schizogonie. Im Leberschizonten bilden sich je nach Spezies 30.000 - 50.000 Tochtermerozoiten. Der Übergang von der Leberphase zur erythrozytären Phase verläuft über das Merosom. Diese vesikelähnliche Ausstülpung vom Hepatozyten gelangt in den Blutkreislauf und setzt die Merozoiten frei, welche dann Erythrozyten invadieren können (Heussler et al., 2006; Sturm et al., 2006; Baer et al., 2007; Cowman et al., 2012). Die intraerythrozytäre Vermehrung von *P. falciparum* dauert in etwa 48 Stunden. In den ersten 24 Stunden liegt



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *P. falciparum*.** Die Abbildung zeigt die Vermehrungszyklen des Parasiten. 1) Leberphase von *P. falciparum*. Der Parasit bildet einen Leberschizonten im infizierten Hepatozyten. Nach Abschluss der Schizogonie bildet sich ein Merosom, welches in den Blutkreislauf gelangt. Merozoiten werden vom Merosom freigesetzt, welche 2) dann Erythrozyten invadieren. Der weitaus überwiegende Teil durchläuft den asexuellen Vermehrungszyklus, wodurch neue Merozoiten gebildet und freigesetzt werden. Einige wenige differenzieren sich zu Gameten, welche in der Mücke 3) die sexuellen Vermehrung ermöglichen. (K. Jürries, BNI, 2009)

der Parasit im sogenannten Ringstadium vor. Seinen Namen erhielt der Parasit durch sein ringförmiges Erscheinungsbild in Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen. In diesem Stadium werden die ersten Veränderungen der Wirtszelle durchgeführt. Zwischen 24 und 36 Stunden nach der Invasion ist der Parasit im Trophozoitenstadium. Ab Stunde 36 bis zum Aufplatzen der Wirtszelle nach etwa 48 Stunden befindet sich der Parasit im Schizontenstadium. Er durchläuft mehrere Replikationsrunden, wobei sich 16-32 Tochtermerozoiten ausbilden, welche beim Platzen des Schizonten in den Blutkreislauf abgegeben werden und neue Erythrozyten befallen können (Maier et al., 2009; Gerald et al., 2011).

Während der intraerythrozytären Entwicklung der Parasiten im menschlichen Wirt entstehen aus einem infizierten Erythrozyten nicht nur Schizonten, sondern auch Gameten. Bei dieser Gametogenese entwickeln sich männliche Mikrogameten und weibliche Makrogameten. Beide werden bei der Blutmahlzeit von der

weiblichen Mücke aufgenommen und gelangen in ihren Mitteldarm. Dort verschmelzen weibliche und männliche Gameten zu einer diploiden Zygote, die sich weiter zu einem motilen Ookinet entwickelt (Beier, 1998). Dieser nistet sich in die Basallamina unterhalb des Mitteldarmepithels ein und entwickelt sich weiter zur Oozyste. In den nächsten Tagen durchläuft die Oozyste 10 bis 11 Runden der DNA-Replikation und wird zu einem Synzytium mit mehreren tausend Nuclei. Von der Oberfläche des entstandenen Sporoblasten migrieren anschließend tausende haploide Sporozoiten in die Speicheldrüsen der Mücke, von wo aus sie bei der nächsten Blutmahlzeit auf den menschlichen Wirt übertragen werden (Abb.3) (Gerald et al., 2011).

### 2.1.4 Medikament- und Vakzinentwicklung

Für die Behandlung von Malaria stehen eine limitierte Anzahl Chemotherapeutika zur Verfügung, die sich in wenige Wirkstoffklassen einteilen lassen. Chinin, eines der ältesten Arzneimittel gegen Malaria gehört zu der Gruppe der Chino-line. Es wurde im 17. Jahrhundert aus Peru nach Europa importiert und wurde aus der Rinde Chinarindenbaum (*Cinchona pubescens*) gewonnen (Rocco, 2004). Das synthetische Chininderivat „Chloroquin“ war lange Zeit das Standardmedikament in der Malariabehandlung. Es gehört zur Gruppe der 4-Aminochinoline und bildet stabile Komplexe mit dem Abbauprodukt von Hämoglobin, dem Ferriprotoporphyrin IX. Das inhibiert die Polymerisation zu unschädlichem  $\beta$ -Hematin und die Ablagerung im Malariapigment (Orjih et al., 2012). Bereits in den 60er Jahren traten Chloroquinresistente *P. falciparum* Stämme auf. Als molekularer Marker wurde ein Aminosäureaustausch (K76T) im Chloroquin-Resistenz-Transporter (CRT)-Protein identifiziert (Sidhu et al., 2002). Man geht davon aus, dass diese Mutationen zu einem verstärkten Export von Chloroquin aus der Vakuole führt (Martin & Kirk, 2004). Chloroquin wird heute nur noch gegen *P. ovale*, *P. malariae* und *P. vivax* in Kombination mit anderen Präparaten eingesetzt (Fidock et al., 2000). Ein weiteres Derivat von Chinin, Primaquin, gehört zur Medikamentenklasse der 8-Aminochinoline. Primaquin wird trotz des ungeklärten Wirkungsmechanismus zu Behandlung von *P. ovale* und *P. vivax* eingesetzt, da es zur Zeit der einzige Wirkstoff gegen alle Leberphasenparasiten, wozu auch die Hypnozoiten gehören, ist (Fisk et al., 1989; WHO, 2012).

Antifolate wie Sulfadoxin und Pyrimethamin werden als Kombinationspräparat (z.B. Fansidar®) werden in Kombination mit verschiedenen Antibiotika eingesetzt. Antifolate hemmen die Synthese von Tetrahydrofolat, einem Cofaktor für den Transport von C1-Molekülen und essentiell für die Synthese von Purinbasen (dTMP) und Proteinen (Methionin). Im Unterschied zum Menschen können Plasmodien aufgenommene Folsäure nicht verwerten und sind auf deren *de novo* Synthese angewiesen. Spezifische Inhibitoren der Dihydrofolatreduktase (DHFR) wie beispielsweise Pyrimethamin hemmen die Umwandlung von Dihydrofolat in Tetrahydrofolat. In diesem Falle sind die Resistenzen gegen Pyrimethamin mit Punktmutationen im *dhfr*-Gen verbunden und fast ebenso weit verbreitet wie die Chloroquin Resistenz (WHO, 2012).

Artemisinin, gewonnen aus dem „Einjährigen Beifuß“ (*Artemisia annua*) und seine Derivate (Dihydroartemisinin, Artemether und Artesunat) werden heute weltweit verwendet und zeichnen sich durch schnelle, antiparasitäre Wirkung aus. Artemisinin-derivate wirken auf alle Blutstadien des Malariaerregers, einschließlich der Gametozyten, sind aber nicht hypnozoideal (Price et al., 1996; Yeung et al., 2009; Amaratunga et al., 2012). Eine Artemisinin-basierte Kombinationstherapie (ACT) ist heute die von der WHO empfohlene Standardbehandlung (McIntosh & Olliaro, 2000a,b; WHO, 2012). Erste Resistenzen gegen Artemisinin und seine Derivate wurden bereits 2009 beschrieben (Yeung et al., 2009; Amaratunga et al., 2012)

Antibiotika, die zur Malariatherapie eingesetzt werden, sind unter anderem Doxycyclin und Clindamycin. Diese werden meist in Kombination mit Chininpräparaten bei „unkomplizierter Malaria“ verabreicht. Medizinisch relevante Resistenzen wurden bisher weder für Doxycyclin, noch für Clindamycin beschrieben (Capdevila & Icart, 2010; Obonyo & Juma, 2012).

Die neue, experimentelle Substanzklasse der Spiroindolone, zeigte mit 20 Stoffen eine gute Wirkung gegen *P. falciparum* und *P. vivax* bei einem Inhibitor-Screen mit über 12.000 potentiellen Inhibitoren aus der Datenbank der Firma Novartis gefunden. Der aussichtsreiche Kandidat trägt die Bezeichnung NIDT609 und wirkt über einen noch nicht geklärten Mechanismus auf die Proteinbiosynthese des Parasiten. Erste Versuche bei der Behandlung von mit *P. berghei* infizierten Mäusen, bestätigten die anti-parasitäre Wirkung des Wirkstoff.

Das Fehlen weiterer medikamentöser Alternativen ist jedoch ausgesprochen pro-

blematisch und verdeutlicht die Notwendigkeit der verstärkten Wirkstoff- und Vakzinentwicklung. Der am weitesten fortgeschrittene experimentelle Impfstoff heißt RTS,S und wird von GlaxoSmithKline™(GSK™) und der „malaria vaccine initiative„ (MVI-Path) entwickelt. RTS,S ist ein Fusionsprotein, das sich aus dem “circum sporozoite protein“ (CSP) und einem Oberflächenantigen des Hepatitis A Virus zusammensetzt (Casares et al., 2010). RTS,S befindet sich zur Zeit in der 3. klinischen Testphase wobei die letzten Auswertung belegen, dass dieser Impfstoff einen nicht ausreichenden Schutz vermittelt (Olotu et al., 2011).

Ein weiterer Impfstoff, dessen Entwicklung ähnlich weit fortgeschritten ist, ist ein sogenannter „Lebend-Impfstoffen“, der von der Firma Sanaria™hergestellt und vertrieben wird. Die Vakzinierung wird durch  $\gamma$ -bestrahlten Sporozoiten erreicht (Nussenzweig et al., 1967; Hoffman et al., 2002). Durch die Bestrahlung von parasitierten Mücken werden die Sporozoiten „abgeschwächt“ (attenuiert), so dass sie noch metabolisch aktiv sind und im besten Falle eine adäquate Immunantwort auslösen, aber keine Krankheitssymptome mehr hervorrufen können (Hoffman et al., 2002; Borrmann & Matuschewski, 2011).

## 2.2 Wirtszell-Invasionsstrategien und Erythrozytenentwicklung

Intrazelluläre Pathogene haben verschiedene Strategien entwickelt um Wirtszellen zu invadieren. Die Invasion von *Apikomplexa* stellt eine Besonderheit dar, da die Parasiten die für die Invasion notwendige Proteinausstattung inklusive des Motorkomplexes, der die Kraft für die Invasion vermittelt, selber exprimieren. Der überwiegende Teil der intrazellulären Pathogene adaptieren hingegen die Aufnahmemechanismen der Wirtszelle für ihre Invasion.

So besitzt der HI-Virus nur eine minimale genetische Ausstattung und nutzt nach der Replikation in einer Wirtszelle deren Plasmamembran für die Invasion der nächsten Wirtszelle. Der Virus kodiert neben einigen regulatorischen und akzessorischen Molekülen selbst nur für die retroviralen Gene *gag*, *pol* und *env*. Mit seinem Hüllen-Glykoprotein gp120 bindet der HI-Virus die Wirtszellen über den Hauptrezeptor CD4, was die Voraussetzung der Bindung des Ko-Rezeptors ist. In frühen Infektionsphasen wird CCR5 als Ko-Rezeptor genutzt, wodurch

der Virus Makrophagen und Monozytenvorläufer infizieren kann. In späteren Infektionsphasen entstehen mutierte Varianten, die den CXCR4 Rezeptor von T-Zellen binden. Diese Bindung geht über das virale Protein „Env“, das mit gp41 verbunden ist. Über die Ko-Rezeptoren wird es in der Wirtszellmembran verankert. Die Bindung von Haupt- und Ko-Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung der beiden Proteine, wodurch die Virusmembran und die Wirtszellmembran in Kontakt kommen und miteinander fusionieren. Das Viruskapsid, bestehend aus der viralen RNA, der reversen Transkriptase und der Integrase, wird dadurch in das Zytoplasma der Wirtszelle geschleust. Das RNA-Genom des HI-Virus wird durch die viruseigene Reversen Transkriptase in DNA umgewandelt, die anschließend in das Wirtszellgenom eingebaut wird (Klasse, 2012). Die Invasion des HI-Virus benötigt somit nur wenige viruseigene Proteine und nutzt die Bindung an T-Zell-Oberflächenproteine um in die Wirtszelle einzudringen.

Für die Invasion von *Mycobacterium tuberculosis* werden keine speziellen Proteine des Bakteriums benötigt. Der Erreger der Tuberkulose vermehrt sich hauptsächlich in Makrophagen. Diese gehören zu den Phagozyten (Fresszellen) und sind Leukozyten (weiße Blutkörperchen), die als Teil des Immunsystems wirtsfremde Mikroorganismen beseitigen (Tiruvilumala & Reichman, 2002). *M. tuberculosis* nutzt diesen, eigentlich als Abwehrreaktion entwickelten Mechanismus aus und lässt sich von den Makrophagen „fressen“. Die Erkennung von Bakterien wird durch „Toll like Rezeptoren“ (TLR), Fc-Rezeptoren, Mannose-Rezeptoren und Complement Rezeptoren vermittelt, die „Pathogen Associated Molecular Patterns“ (PAMPs) erkennen (Ernst, 1998; Cambi et al., 2005; Tricker & Cheng, 2008). PAMPs sind ausschließlich auf oder in Pathogenen zu finden. Durch die TLR ist das Immunsystem in der Lage zwischen wirtseigenen und wirtsfremden Oberflächenstrukturen zu unterscheiden. Die besondere Leistung des Bakteriums liegt darin, nach der Aufnahme im Phagosom zu überleben. Phagozytierte Partikel werden für gewöhnlich durch Ansäuerung des Kompartiments mit Hilfe von V-ATPasen zersetzt. *M. tuberculosis* verhindert diese „Phagolysosom“-Entwicklung durch die Hemmung der „Phosphatidylinositol-3-Kinase“ (PI3 Kinase) über das Membranprotein „Lipoarabinomannan“ (LAM). Die PI3-Kinase reichert Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) an der Membran des Phagosoms an, was als Bindungsstelle dient für Proteine, die an der

Reifung des Phagolysosom beteiligt sind. Somit verhindert *M. tuberculosis* die lysosomale Entwicklung des Kompartiments und kann in Makrophagen persistieren (Pieters, 2008).

Auch die Invasion des Bakteriums *Yersinia pseudotuberculosis* ist im Gegensatz zu *P. falciparum* passiv, basiert jedoch auf der Bindung zwischen Pathogenspezifischen Liganden und wirtsspezifischen Rezeptoren. *Yersinia pseudotuberculosis* migriert nach der Infektion durch das Darmepithel und invadiert Lymphzellen. Anders als bei der Aufnahme von *M. tuberculosis* durch Phagozyten, sind die Endothelzellen nicht auf die Aufnahme von Krankheitserregern spezialisiert. Daher exprimiert *Yersinia* das für die Invasion spezielle Membranprotein „Invasin“, das an  $\beta 1$ -Integrin der Wirtszelle bindet.  $\beta 1$ -Integrin vermittelt die Bindung an die extrazelluläre Matrix (ECM) (Isberg & Barnes, 2001), was das Bakterium ausnutzt, um in die Wirtszelle zu invadieren. Invasin hat eine 100fach höhere Affinität zu  $\beta 1$ -Integrin als Fibronectin (der natürliche Integrin-Ligand) und induziert so die Bildung von „Integrin-Clustern“ (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2006). Signalkaskaden aktivieren daraufhin die Kinasen FAK (Focal adhesion kinases), Src, PI3-Kinase und Rac. Dadurch kommt es zu einer Veränderung der Zellmembran und der Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts, wobei der Rac-Arp2/3-Komplex eine essentielle Rolle spielt. Immer mehr Invasine binden an  $\beta 1$ -Integrin, wodurch das Bakterium von der Wirtszelle wie durch einen Reißverschluss weiter von der Wirtszelle umschlossen wird, bis *Yersinia pseudotuberculosis* aufgenommen ist (Cossart & Sansonetti, 2004). Diese Strategie wird „Zipper-Mechanismus“ genannt.

Eine wesentlich „aktivere“ Invasionsstrategie nutzen die Bakterien *Shigella* und *Salmonella*. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Pathogenen manipulieren diese Bakterien die Wirtszelle durch mehrere hoch spezifische Invasionsproteine und induzieren ihre passive Aufnahme durch Macropinozytose. Sie nutzen dazu ein „type II secretory system“ (TTSS). Dieser Protein-Komplex stellt den Kontakt zur Wirtszelle her und erlaubt das Einschleusen bakterieller Effektorproteine, die direkt mit dem Wirtszellzytoskelett interagieren. Zwei der Komponenten des TTSS, die Proteine SipB/C bei *Salmonella* und IpaB/C bei *Shigella* bilden eine Pore oder „Translocon“ in der Plasmamembran der Wirts-

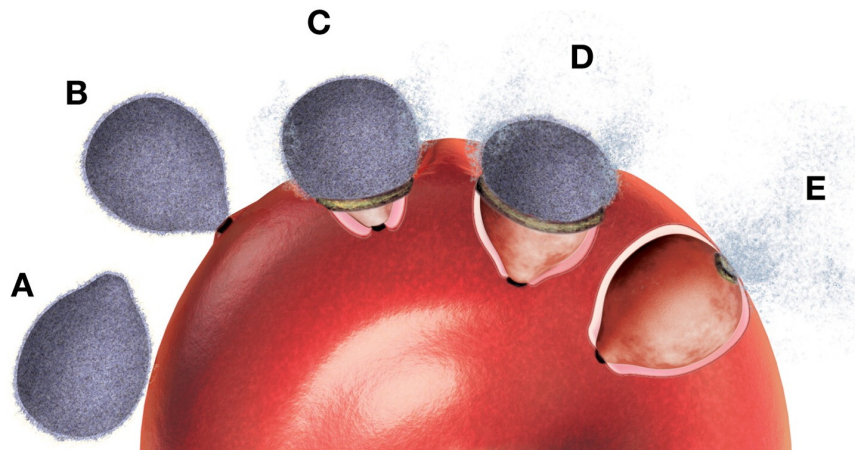
zelle, wodurch sich ein Kontinuum zwischen dem Zytoplasma der beiden Zellen bildet (Galan, 2001; Sansonetti, 2001). Das *Shigella* Protein VirA wird so vom Bakterium in das Wirtszellzytosol injiziert und induziert die Depolymerisierung von Mikrotubuli an der Eintrittsstelle. Dies führt zu einer Aktivierung der Rac1 und der Bildung des Rac1-IRSp53-WAVE2 Komplexes, der nach Rekrutierung von Arp2/3 die Polymerisierung von Aktin vermittelt (Yoshida et al., 2002). Bei *Salmonella* ist das eingeschleuste Protein SopE, welches den Cdc42/Rac1 Komplex aktiviert und verantwortlich für die Bildung von filamentösem Aktin ist (Hardt et al., 1998). In beiden Fällen wird durch massiven Umbau des Aktinzytoskeletts die Ausbildung einer makropinozytotische Tasche induziert, durch die die Bakterien in die Wirtszelle aufgenommen werden (Cossart & Sansonetti, 2004).

Alle diese Invasionsstrategien basieren jedoch auf der Aufnahmemaschinerie der Wirtszelle, was mit einer veränderten Genexpression einhergeht. *P. falciparum* invadiert Erythrozyten. Diese besitzen weder einen Zellkern noch Organellen. Der Erythrozyt vermittelt im Gegensatz zu Endothel- und Epithelzellen keine Endozytose. Die Aufnahme von Glucose für die Energiegewinnung durch Glykolyse mit anschließender Milchsäuregärung zum Beispiel, erfolgt über spezifische Glucosetransporter wie beispielsweise „GLUT1“ (Montel-Hagen et al., 2009). *P. falciparum* exprimiert nicht nur alle Proteine, die für die Invasion benötigt werden, sondern koordiniert den gesamten Invasionsvorgang.

### 2.2.1 Die Invasion von *P. falciparum* in den Erythrozyten

Das humorale Immunsystem stellt eine Gefahr für den *Plasmodium*-Parasiten dar, der jedoch eine Anzahl von Immunevasionsstrategien entwickelt hat (Langhorne et al., 2008). Eine Strategie ist die zeitliche Minimierung der extrazellulären Phase. Die Invasion des Erythrozyten ist in der Tat ein äußerst schneller Prozess, der in wenige als 30s abgeschlossen ist (Treeck et al., 2009). An der Invasion sind über 400 Proteine beteiligt (Hu et al., 2010), wobei nur für einige wenige funktionelle Daten vorliegen.

Die Invasion des Merozoiten beginnt mit der Erkennung und der Anheftung des Erythrozyten, gefolgt von der Reorientierung, wodurch der apikale Pol des Merozoiten in unmittelbaren Kontakt zur Membran der Wirtszelle gebracht wird (Abb.4). Die initiale Bindung eines Merozoiten an den Erythrozyten ist relativ



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Invasion des Merozoiten von *P. falciparum*.** Die Invasion beginnt mit der initialen Erkennung und Anheftung des Merozoiten an den Erythrozyten (A). Bei der Reorientierung bringt sich der Merozoit in eine Position, bei der der Apex auf die Wirtszellmembran ausgerichtet ist (B). Über die Bindung von Oberflächenprotein wird eine sog. „tight junction“ gebildet, welche den Merozoiten mit dem Erythrozyten verbindet (C). Mit seinem Motorkomplex zieht der Merozoit sich aktiv in die Wirtszelle, wobei die „tight junction“ nun „moving junction“ genannt wird (D). Am Ende der Invasion werden die posterioren Membranen geschlossen und der Parasit liegt in der parasitophoren Vakuole (E).

schwach und dadurch reversibel. Es wird angenommen, dass sie über Oberflächenproteine vermittelt wird, wie zum Beispiel das „Merozoiten-Oberflächen-Protein-1“ (MSP-1) (Holder, 1988; Sanders et al., 2006; Cowman & Crabb, 2006). Dieses wird durch einen GPI-Anker an die Membran des Merozoiten gebunden. Das Protein ist essentiell und das am häufigsten vorkommende Protein auf der Oberfläche der Merozoiten (Gerold et al., 1996; O'Donnell et al., 2000). Es besitzt eine „epidermal growth factor“ (EGF) Bindedomäne und es wird vermutet, dass es das Oberflächenprotein „Band 3“ auf dem Erythrozyten erkennt und bindet (Goel et al., 2003; Dluzewski et al., 2008). Es sind noch mindestens 7 weitere MSPs bekannt, deren Bindungspartner jedoch noch nicht beschrieben wurden (Kadekoppala & Holder, 2010).

Die Bindung von Parasitenproteinen an Oberflächenstrukturen von Erythrozyten wird durch verschiedene Domänen vermittelt. Neben den konservierten „epidermal growth factor“ (EGF) und 6-Cystein (6-Cys) Protein-Bindedomänen gibt es die Plasmodium-spezifischen „Duffy binding-like“ (DBL) und „erythrocyte binding-like“ (EBL) Domänen, welche diverse Funktionen bei der Erkennung der Erythrozyten, der Invasion und der Wirtszellmodifizierung haben (Savage

et al., 1972; Haynes et al., 1988; Adams et al., 1992; Ishino et al., 2005). Trotz der Bindung „rollt“ der Merozoit über die Oberfläche des Erythrozyten. Hierbei spielen vermutlich weitere MSP-Mitglieder eine Rolle, die die Bindung unter anderem durch „Epidermale Wachstumsfaktor-“ (EGF-) Domänen oder „Duffy ähnliche Bindedomänen“ (DBL) vermitteln (Gilson & Crabb, 2009; Harvey et al., 2012). Bei der Reorientierung dreht sich der Merozoit auf der Erythrozytenmembran, so dass der apikale Pol der Wirtszelle zugewandt ist. Wie bereits erwähnt befinden sich die sekretorischen Organellen in diesem Bereich (Abb.2), die eine Vielzahl, verhältnismäßig gut charakterisierter Proteine wie AMA1, EBA175 und Rh5 beinhalten. Die Sekretion erfolgt sequentiell, jedoch ist die Steuerung erst in Grundzügen verstanden: Carruthers & Sibley (1999), sowie Donahue et al. (2000) zeigten bei Fluo-4-markierten Tachyzoiten, dass die Ausschüttung von Proteinen aus den Mikronemen bei *T. gondii* durch einen Anstieg von intrazellulärem Kalzium stimuliert wird. Die gleiche Beobachtung konnte bei *P. falciparum* gemacht werden (Singh et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux im freien Merozoiten das Resultat der Kalium-armen Umgebung im Blutplasma ist (Singh et al., 2010). Durch die Sekretion der Mikronemen und Rhoptrien werden Adhäsine auf die Oberfläche des Parasiten transportiert, über die der Parasit physikalisch mit dem Erythrozyten verbunden wird. Nach der Reorientierung des Merozoiten bildet er eine irreversible Verbindung mit der Wirtszelle, die als „tight junction“ bezeichnet wird.

Proteine, die eine Funktion bei der Invasion haben, können in 2 Gruppen eingeteilt werden: Die *Adhäsine*, die die Bindung an Erythrozyten-Oberflächenproteinen vermitteln und die *Invasine*, die keine Erythrozytenstrukturen binden aber essentiell für die Invasion sind (Cowman et al., 2012). Die beiden bedeutendsten Proteinfamilien der Adhäsine sind die „Retikoluzyten-bindenden homologen“ (Rh) Proteine und die „Erythrozyten-bindenden Liganden“ (EBL). Bei *P. falciparum* gibt es 5 homologe Proteine, die zur Gruppe der EBL Proteine gehören. EBA140, EBA175, EBA181, EBL1 und MAEBL (Sim et al., 1990; Mayer et al., 2001; Camus & Hadley, 1985; Adams et al., 2001; Gilberger et al., 2003). Sie binden über Sialinsäure an Glykophorine in der Membran von Erythrozyten (Hadley et al., 1987; Orlandi et al., 1992; Sim et al., 1992). Rh-Proteine besitzen ebenso wie die EBL-Proteine große extrazelluläre Domänen, die für die

Rezeptor-Interaktion verantwortlich sind. Bis auf Rh1 sind diese jedoch vermutlich unabhängig von Sialinsäure auf der Erythrozytenoberfläche. Für Rh4 konnte der „Complement Rezeptor 1“ (CR1) des Erythrozyten als Bindungspartner identifiziert werden (Tham et al., 2010).

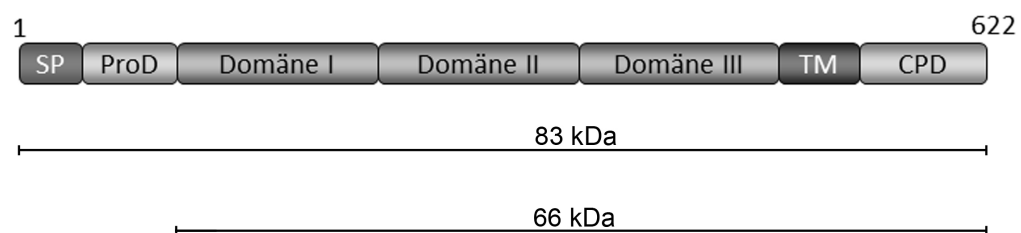
Zuccala et al. (2012) haben durch einen bioinformatischen Ansatz eine Rangliste mit 50 Invasin-Kandidaten erstellt. Dabei sind die RON Proteine unter den Top 5 und AMA1 an erster Position. Das „merozoite thrombospondin related anonymous protein“ (MTRAP) und „Plasmodium thrombospondin-related apical merozoite protein“ (PTRAMP) sind Transmembranproteine aus der TRAP-Familie. Sie stellen vermutlich ein Bindeglied zwischen Adhäsinen und Invasinen dar (Cowman et al., 2012). MTRAP ist essentiell für die Ausbildung der moving junction und bindet über eine „thrombospondin repeat-like“ (TRL) Domäne an bisher unbekannte Oberflächenstrukturen des Erythrozyten. Die Rezeptor-Liganden Interaktion wird mit dem Aktin-Myosin-Motor des Parasiten assoziiert.

Hierbei bilden die zytoplasmatischen Domänen von Adhäsinen, wie beispielsweise MTRAP mit Adapterproteinen wie „Aldolase“ einen Komplex, der die Bindung mit filamentösem Aktin (f-Aktin) vermittelt. Auch MyoA bindet f-Aktin und ist verantwortlich für die mechanische Kraft bei der Invasion. MyoA ist durch Adapterproteine wie „Myosin leichte Kette“ (MTIP), die „gliding associated proteins“ GAP45 und GAP50 in der IMC verankert. Die IMC selbst ist über die Alveoline fest mit dem Zytoskelett des Merozoiten assoziiert. Durch die vom Motorkomplex vermittelte Bewegung wird die tight junction zur „moving junction“, welche sich ringförmig zum distalen Pol des Merozoiten bewegt (Baum et al., 2006; Kono et al., 2012). Die irreversible Rezeptor-Adhesin-Bindung wird mit Hilfe von Proteasen aufgelöst, wodurch eine gerichtete Bewegung entstehen kann. Gut untersuchte Proteasen sind hierbei die „subtilisin-like sheddase 2“ PfSUB2 und die „rhomboïd-like protease 4“ PfROM4 (Baker et al., 2006; Olivieri et al., 2011). Die Kalziumabhängige Protease PfSUB2 ist eine über die Mikronemen sekretierte, membranassoziierte Protease (Harris et al., 2005). Sie spaltet Oberflächenproteine wie AMA1, MSP1 und PTRAMP während der Invasion auf der Merozoitenmembran. Eine weitere subtilisin-like Sheddase, PfSUB1, ist essentiell für das Aufplatzen der Schizonten und prozessiert darüber hinaus MSP1, MSP6 und MSP7 vor der Invasion. Durch die Inhibition von PfSUB1 akkumulie-

ren unprozessierte MSPs an der Merozoitenoberfläche, was zu einer Beeinträchtigung der Invasion führt (Koussis et al., 2009). Membranständige Rhomboid Proteasen trennen im Laufe der Invasion die sehr stabilen Verbindungen zwischen Merozoit und Erythrozyt, wie beispielsweise den EBA175/Glykophorin A Komplex (O'Donnell et al., 2006). Nach der Invasion liegt der Parasit in der Parasitophoren Vakuole vor. In dieser entwickelt er sich über das Trophozoitenstadium zum Schizonten, bevor er schließlich aufplatzt und neue Merozoiten in den Blutstrom entlässt.

### 2.2.2 Apikales Membran Antigen 1 (AMA1)

Das Mikronemenprotein AMA1 wurde erstmals bei *P. knowlesi* beschrieben (Deans et al., 1984). Es ist außer bei *Apicomplexa* bei keiner anderen phylogenetischen Gruppe konserviert. Es ist ein TypI Transmembranprotein, wird auf Chromosom 11 kodiert und besteht bei *P. falciparum* aus 622 Aminosäuren mit einem N-terminalen Signalpeptid. Die Expression von AMA1 erfolgt im späten Schizontenstadium. Noch während des sekretorischen Transportweges wird es prozessiert, wodurch das Signalpeptid und die 71-Aminosäuren große Prodomäne des Proteins entfernt werden. Die extrazelluläre Domäne unterteilt sich in 3 Subdomänen, die durch eine Transmembrandomäne von der 56-Aminosäuren großen, zytoplasmatischen Domäne getrennt werden (Narum & Thomas, 1994; Hodder et al., 1996). Die proteolytische Abspaltung der Prodomäne stellt sich



**Abb. 5: Schematische Darstellung vom Aufbau von PfAMA1** Das *ama1* Gen kodiert ein 622 Aminosäuren großes Protein von 83 kDa. AMA1 besitzt ein N-terminales Signalpeptid (SP), worauf seine Prodomäne (ProD) folgt, welche während des Transport zu den Mikronemen abgespalten wird. Das entstehende Protein hat eine Größe von 66 kDa. Es folgt die in 3 Domänen eingeteilte extrazelluläre Region, welche an die Transmembrandomäne (TM) bindet. Hinter der TM liegt die zytoplasmatische Domäne (CPD).

im Western Blot durch das Auftreten von 2 Banden dar. Die 83 kDa-Bande

repräsentiert das unprozessierte, die 66 kDa-Bande das N-terminal prozessierte AMA1 (Narum & Thomas, 1994). Während der Invasion wird, die extrazelluläre Domäne durch SUB2 weiter prozessiert (siehe oben). Im Gegensatz zu den Rh- oder EBL-Proteinen bindet die extrazelluläre Domäne von AMA1 mit dem parasiteneigenen Rezeptor RON2 (Cao et al., 2009; Lamarque et al., 2011), der vorher in die Membran der Wirtszelle inseriert wird (Besteiro et al., 2009; Riglar et al., 2011). RON2 liegt hierbei als Proteinkomplex vor und wird bei *P. falciparum* durch 4 weitere RON-Proteine ausgebildet: RON3, RON4, RON5 und RON6 (Collins et al., 2009; Proellocks et al., 2009; Richard et al., 2010; Ito et al., 2011; Lamarque et al., 2011; Tonkin et al., 2011). Die Bindung von RON2 wird über eine hydrophobe Tasche in der extrazellulären Domäne von AMA1 vermittelt (Tonkin et al., 2011). AMA1 gilt als einer der vielversprechendsten Impfstoffkandidaten für das Blutstadium und wird in klinischen Studien in der Phase 2 getestet (Kocken et al., 2002; Schwartz et al., 2012). Diese beruhen auf der Tatsache, dass Antikörper die extrazelluläre Domäne von AMA1 binden und somit die Invasion des Parasiten vollständig inhibieren können (Polley et al., 2004; Collins et al., 2009; Treeck et al., 2009). Diese Inhibierung kann auch durch ein, über „Phage-Display“ identifiziertes Peptid (ein 20 Aminosäuren großes Oligopeptid mit dem Namen R1) erreicht werden (Harris et al., 2005). Die evolutive Antwort des Parasiten auf diesen, durch das menschliche Immunsystem aufgebauten Eliminierungsdruck, ist Polymorphismus. So konnten Chesne-Seck et al. (2005) 64 Polymorphe Aminosäuren in der Sequenz von AMA1 beschreiben. Über 80 % der Polymorphismen sind in der extrazellulären Domäne zu finden und konzentrieren sich in der Region, die für die Ausbildung der hydrophoben Tasche und der RON2-Bindung verantwortlich ist (Bai et al., 2005). Eine hoch-polymorphe Aminosäure sitzt an der Position 197, welches bei dem *P. falciparum* 3D7-Isolat ein Glutamin ist. Dieser Rest ist das Epitop des inhibitorischen, monoklonalen Antikörpers „1F9“ (Harris et al., 2005). Besetzt 1F9 diese Position, verhindert es die Bindung von RON2 in der hydrophoben Tasche von AMA1 (Tonkin et al., 2011). In der CPD von AMA1 sind nur drei polymorphe Aminosäuren zu finden. Diese Polymorphismen sind daher ein evolutiver Mechanismus gegen die Immunantwort des Menschen auf den Parasiten.

Verdeutlicht werden kann dieses mit dem R1 Peptid. Die Selektion dieses Peptids beruht auf der AMA1 Sequenz des 3D7 Isolats (Harris et al., 2005). Dort

bindet es wie RON2 in der hydrophoben Tasche von AMA1. R1 besitzt eine hohe Affinität zu AMA1 der 3D7- und D10-Isolate, jedoch ein sehr viel schwächere zu W2mef- und HB3-AMA1 (Harris et al., 2005, 2009). Die Bindung von 3D7-AMA1 zu R1 wird über die polymorphen Reste 175, 224 und 225 von AMA1 vermittelt. Insbesondere die Aminosäure 225 ist hier von besonderer Bedeutung. Bei 3D7 und D10 sitzt an dieser Position ein Isoleucin, bei W2mef und HB3 ein Asparagin. Die beiden anderen Aminosäuren, Tyrosin 175 und Arginin 224 sind bei 3D7 und W2mef identisch, wobei ebenfalls das Tyrosin 175 bei der R1-Erkennung eine Rolle spielt (Vulliez-Le Normand et al., 2012). Die RON2 Bindung an AMA1 wird durch das R1 Peptide konzentrationsabhängig inhibiert, wobei die Affinität zu 3D7-AMA1 mit  $K_D \sim 80$  nM wesentlich höher ist als zu W2mef-AMA1 mit  $K_D \sim 17$   $\mu$ M (Harris et al., 2009).

AMA1 wird bei *P. falciparum* ebenfalls in Sporozoiten exprimiert. Auch hier konnten AMA1-bindende Antikörper die Wirtszellinvasion drastisch inhibieren (Silvie et al., 2004).

Während die Funktion der extrazellulären Domäne bereits intensiv untersucht wurde, war die Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne lange Zeit unbekannt. So konnte 2009 gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Domäne von AMA1 zwar nicht für die korrekte Lokalisation des Proteins notwendig ist, aber dennoch eine wichtige Funktion für die Invasion hat (Treeck et al., 2009). Genauere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Phosphorylierung der CPD an einem Serin an der Position 610 durch die Proteinkinase A (PKA) von entscheidender Bedeutung für die Funktion von AMA1 ist (Leykauf et al., 2010).

### 2.2.3 Das Kinom von *P. falciparum*

Die Gruppe der Kinasen umfasst Enzyme, die die Übertragung von Phosphatgruppen auf die Hydroxylgruppen der Seitenketten von Aminosäuren katalysieren. Diese post-translationale Modifikation hat eine Vielzahl von zellbiologischen Auswirkungen und dient unter anderem zur i) Aktivierung oder zur Deaktivierung von Enzymen, ii) zur Kontrolle von Protein-Protein-Interaktionen und iii) als Erkennungssequenz für Proteine oder Kinasen, die den negativ geladenen Phosphatrest erkennen und binden (Johnson & Lewis, 2001). Das Genom von *P. falciparum* kodiert für 89 Kinasen (Miranda-Saavedra et al., 2012), was im Vergleich zum Menschen (518) oder zur Hefe ( $\sim 130$ ) (Manning et al., 2002)

verhältnismäßig wenig ist. Von diesen 89 Kinasen werden 65 zu den eukaryontische Proteinkinasen (ePK) gezählt, 19 zu den FIKK-Kinasen (benannt nach einer konservierten Aminosäuresequenz) und 5 zu den atypischen Proteinkinasen (aPK) (Hanks & Hunter, 1995). Die aPKs sind Kinasen, die keine oder nur geringe Ähnlichkeit mit ePKs haben, denen jedoch eine Kinaseaktivität experimentell nachgewiesen werden konnte. Zu ihnen gehören Kinasen der RIO und PIKK Familie jedoch scheinen die aPKs von *Apicomplexa* keine Orthologe bei anderen *Alveolata* oder *Metazoa* zu haben (Miranda-Saavedra et al., 2012). ePKs können aufgrund der Struktur ihrer katalytischen Domäne in 9 Gruppen eingeteilt werden (Hanks & Hunter, 1995; Ward et al., 2004), wobei die Gruppen der Tyrosin-Kinasen und MAP-Kaskaden-Kinasen bei *P. falciparum* nicht identifiziert worden sind (Ward et al., 2004; Anamika et al., 2005; Miranda-Saavedra et al., 2012).

Die meisten Kinasen gehören zur Gruppe der „zyklin-abhängigen, Mitogen-aktivierten, Glykogen-Synthase- und CDK-ähnlichen Kinasen“ (**CMGC-Gruppe**). Von den 22 Mitgliedern dieser Gruppe scheinen 16 Kinasen essentiell für *P. falciparum* zu sein. Dies wurde experimentell durch gezielten „Knock out“ der Gene untersucht, wobei Kinasen, die nicht deletierbar waren, jedoch zugänglich für die Fusion mit einem C-terminalen Epitop, als essentiell eingestuft wurden (Solyakov et al., 2011). Unter ihnen befinden sich die Glykogen-Synthase Kinase 3 (PfGSK3 [PFC0525c]) und die Casein Kinase 2 (CK2 [PF11\_0096]).

Die humane GSK3 reguliert eine Vielzahl intrazellulärer Prozesse durch die Modifikation von Transkriptionsfaktoren (Grimes & Joep, 2001; Hur & Zhou, 2010). Dabei kontrolliert die Kinase deren Expression, die DNA-Bindeaktivität und die subzelluläre Lokalisation. Darüber hinaus reguliert GSK3 die Aktivität verschiedener Mikrotubuli-assoziiierter Proteine (MAP), was Auswirkungen auf die Organisation der mitotischen Spindel und die Zellmigration von Axonen hat (Beals et al., 1997; Neal & Clipstone, 2001; Woodgett, 2001; Grimes & Joep, 2001; Zhou & Snider, 2005; Fuentealba et al., 2007; Hur & Zhou, 2010).

Plasmodium kodiert für 2 GSK3-verwandte Proteine Mal13P1.84, das nur bei *Hemosporidiae* konserviert ist und PFC0525c (PfGSK3), welches Orthologe bei *Alveolata* und *Metazoa* besitzt. Die Funktion für GSK3 bei Apikomplexa konnte bisher noch nicht geklärt werden, jedoch ist die Kinase für den asexuellen Zyklus von *P. falciparum* essentiell (Ward et al., 2004; Solyakov et al., 2011). Wie

bereits erwähnt kodiert *P. falciparum* nicht für Tyrosinkinasen, jedoch konnten Phosphotyrosine in Untersuchungen zum Phosphoproteom des Parasiten gefunden werden (Treeck et al., 2011). GSK3 ist ein Beispiel dafür, da das Tyrosin 229 bei PfGSK3 phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierungsstelle ist in der humanen GSK3 $\alpha/\beta$  (Tyr276/Tyr216) konserviert. Durch Autophosphorylierung der GSK3, wird die Aktivität beeinflusst (Cole et al., 2004).

Die Phosphorylierung des Serins an Position 9 der humanen GSK3 durch PKB und PKA inhibiert die Aktivität der Kinase (Fang et al., 2000; Dajani et al., 2001). Sowohl die humane, als auch die plasmodiale GSK3 erkennt und bindet ihr Substrat über eine phosphorylierte Aminosäure (Dajani et al., 2001; Droucheau et al., 2004). Wird S9 phosphoryliert, wirkt es als Pseudosubstrat und inhibiert die weitere Substraterkennung. Bei *P. falciparum* ist S9 nicht konserviert, jedoch besitzt die Parasitenkinase einen vergrößerten N-terminus, der bei GSK3 einzigartig ist (Droucheau et al., 2004).

Die „Calmodulin-abhängigen Kinasen“ (**CaMK-Gruppe**) bilden die 2. größte Gruppe der ePKs. Die Mitglieder dieser Gruppe sind in ihrer Aktivität Kalzium- oder Calmodulin-abhängig. Für *Plasmodium* sind 7 CDPKs beschrieben, von denen 4 essentiell sind. CDPK1 (PFB0815w) wird über die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  während der Invasion aktiviert und phosphoryliert mindestens zwei Bestandteile des Aktin-Myosin Motors (Green et al., 2008; Holder et al., 2012). Für CDPK5 (PF13\_0211) konnte eine wichtige Rolle beim Aufplatzen des Schizonten und der Freisetzung der Tochtermerozoiten nachgewiesen werden (Dvorin et al., 2010). Durch den „Knock down“ des Proteins über eine „destabilisation Domain“ (DD), war es möglich die Degradation des Proteins zu induzieren, wodurch gezeigt werden konnte, dass CDPK5-defiziente Parasiten in der späten Schizontenphase bleiben und die Freisetzung der Tochtermerozoiten inhibiert wird (Dvorin et al., 2010). CDPK4 (PF07\_0072) scheint notwendig für die Gametozytenentwicklung und für die Transmission der Parasiten in die Mücke zu sein (Billker et al., 2004). Interessant sind die CDPKs von *Plasmodium*, da sie pflanzlichen Ursprungs (Billker et al., 2009) und nicht im Kinom des Menschen konserviert sind (Murphy et al., 2010).

Die Gruppe der „zyklische Nukleotid- und Kalzium/Phospholipid-abhängigen Kinasen“ (**AGC-Gruppe**) zählt 6 Mitglieder (Miranda-Saavedra et al., 2012). Die bekanntesten Vertreter sind die Proteinkinase A (PKA [PFI1685w]), die

Proteinkinase B (PKB [PFL2250c]) und die Proteinkinase G (PKG [PF14\_0346]) (Ward et al., 2004; Miranda-Saavedra et al., 2012). Die Expression dieser Kinasen ist im späten Schizontenstadium hoch reguliert, was auf eine potenzielle Bedeutung für invasionsrelevante Prozesse hinweist.

Die Gruppe der „Casein Kinasen 1“ (**CK1-Gruppe**) hat nur ein Mitglied, die Casein Kinase 1 (CK1 [PF11\_0377]). CK1 ist essentiell (Miranda-Saavedra et al., 2012) und scheint während der Schizogenie des Parasiten eine entscheidende Rolle zu spielen (Tewari et al., 2010).

Die Kinasen der **STE-Gruppe** sind meist in MAPK Signalkaskaden involviert. Bei *Apicomplexa* gibt es nur sehr wenige Kinasen, die in diese Gruppe fallen und bei *P. falciparum* konnte bisher nur die Proteinkinase 8 (PFB0150c) der STE-Gruppe zugeschrieben werden (Miranda-Saavedra et al., 2012).

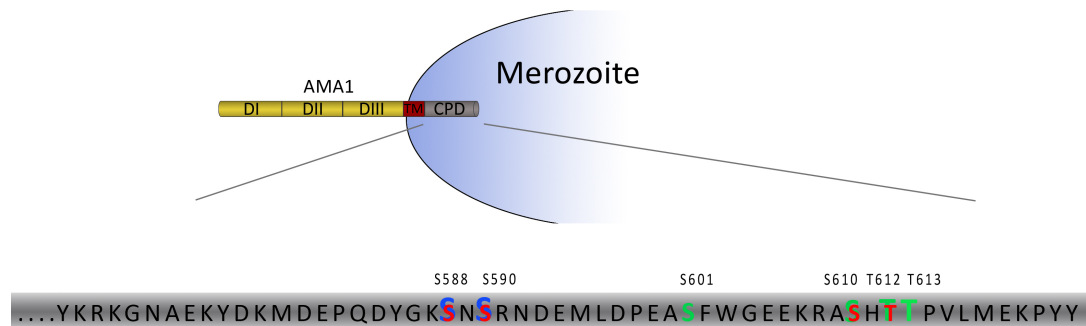
In der **TLK-Gruppe** sind 6 Mitglieder zu finden. PfTLK1 (PFB0520w), PfTLK3 (PF13\_0258) und PfPK4 (PFF1370w) besitzen alle eine SAM-(„sterile alpha-motif“) Domäne und sind trotz ihres Namens Serin/Threonin Kinasen (Abdi et al., 2010; Miranda-Saavedra et al., 2012). Durch Medikamenten-Screenings konnte PfTLK3 als essentielle Kinase für die asexuelle Proliferation beschrieben werden (Abdi et al., 2010). Später konnte ebenfalls für PfTKL1 und PfPK4 eine essentielle Funktion für die intraerythrozytäre Phase beschrieben werden (Solyakov et al., 2011).

Das Genom von *P. falciparum* kodiert ebenfalls nur für einen Vertreter der „orphan protein kinase“-Gruppe **OPK-Gruppe**: die „Falciparum Exported Serine/Threonine Kinase“ (FEST) (MAL7P1.91). Sie wird in das Zytoplasma des Erythrozyten transportiert und ist anschließend mit den „knobs“ in der Plasmamembran assoziiert. Ihre Funktion oder ihre Substrate konnten bisher noch nicht bestimmt werden (Kun et al., 1997).

### 2.2.4 Die Phosphorylierung von AMA1

Die PKA abhängige Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne (CPD) von AMA1 wurde unter 2.2.2 vorgestellt. Die Phosphorylierung des Serins an Position 610 ist entscheidend für die Invasion des Parasiten. Bei der 2D Gelelektrophorese von radioaktiv markierten Parasitenproteinen konnte gezeigt werden, dass das 66 kDa-Fragment von nativem AMA1 in fünf Varianten mit unterschiedlicher Ladung vorkommt, von denen drei phosphoryliert waren. Eine Mu-

tation von S610 zu Alanin reduzierte die Anzahl der AMA1 Varianten auf zwei, von denen keine eine Phosphorylierung aufwies. In radioaktiven *In vitro* Phosphorylierungsansätzen wurde die rekombinant aufgereinigte CPD von AMA1 durch Parasitenlysate phosphoryliert. Die Zugabe von cAMP verstärkte diese Phosphorylierung um das 17fache, was auf die Phosphorylierung durch PKA zurück zu führen war und die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  konnte die Stärke der Phosphorylierung verdreifachen (Leykauf et al., 2010). Diese Ergebnisse wiesen auf die Phosphorylierung von AMA1 durch weitere Kinasen hin, die jedoch abhängig von der S610 Phosphorylierung zu sein schienen. Dies wurde später durch zwei



**Abb. 6: Phosphorylierungsstellen in der CPD von AMA1.** Die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von AMA1 wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen durch massenspektrometrische Analysen untersucht. Insgesamt 6 phosphorylierte Aminosäuren (4 Serine und 2 Threonine) konnten dabei identifiziert werden. Ihre Position im Protein steht über der betreffenden Aminosäure. In Blau: beschrieben durch Solyakov et al. (2011); In Rot: beschrieben durch Treeck et al. (2011); In Grün: beschrieben durch Gilson&Crabb (nicht veröffentlicht).

unabhängige massenspektrometrische Untersuchungen bestätigt (Treeck et al., 2011; Solyakov et al., 2011). Treeck et al. (2011) konnten in ihren Untersuchungen 8463 Phosphorylierungsstellen in über 1600 Proteinen identifizieren. Dabei stellen Serine mit 87,5 % den Großteil der Phosphoakzeptorstellen und Threonine mit 12,2 % den kleineren Teil dar. In zwei weiteren Studien fanden Solyakov et al. (2011) 1171 Phosphorylierungsstellen und Lasonder et al. in einer unveröffentlichten Studie 2541 Phosphorylierungsstellen (Lasonder et al., 2012). Wie in Abb.6 schematisch dargestellt, wurden in all diesen Studien (zusammen mit einer unveröffentlichten Untersuchung von Gilson&Crabb) auch Phospho-Peptide identifiziert, die der zytoplasmatischen Domäne von AMA1 entsprechen.

### 2.3 Zielsetzung

Die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von AMA1 ist entscheidend für die effiziente Invasion von Erythrozyten. In dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Phosphorylierungsstellen eine physiologische Relevanz haben und welche Kinasen für die Modifikation verantwortlich sind.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Material

### 3.1.1 Chemikalien

| Chemikalie                                      | Hersteller (Standort)         |
|-------------------------------------------------|-------------------------------|
| Aceton                                          | Merck (Darmstadt)             |
| Acrylamid,<br>Bisacrylamidlösung 40%            | Roth (Karlsruhe)              |
| Adenosin 5-triphosphat<br>Dinatriumsalz (ATP)   | Sigma-Aldrich (Steinheim)     |
| gamma-32P Adenosin<br>5-triphosphat (gamma-ATP) | Hartmann Analytic (Göttingen) |
| Agar-Agar                                       | Becton Dickinson (Heidelberg) |
| Agarose Eurogentec                              | Seraign (Belgien)             |
| Albuma <sup>TM</sup> II                         | Invitrogen (Karlsruhe)        |
| AlbuMin bovine Fraction V,<br>(BSA)             | Biomol (Hamburg)              |
| Ammoniumpersulfat (APS)                         | Merck (Darmstadt)             |

---

### 3 Material und Methoden

---

| Chemikalie                             | Hersteller (Standort)         |
|----------------------------------------|-------------------------------|
| Bacto™Hefeextrakt                      | Becton Dickinson (Heidelberg) |
| Bacto™Pepton                           | Becton Dickinson (Heidelberg) |
| Bromphenolblau                         | Merck (Darmstadt)             |
| Coomassie Brilliant,<br>Blue G-250     | Merck (Darmstadt)             |
| Calciumchlorid                         | Sigma-Aldrich (Steinheim)     |
| Casein                                 | Merck (Darmstadt)             |
| Dako Fluorescence<br>Mounting Medium   | Dako (Hamburg)                |
| Desoxynukleotide (dNTPs)               | Fermentas, (St. Leon-Rot)     |
| 4',6-Diamidino-2-Phenylindol<br>(DAPI) | Roche (Mannheim)              |
| Digitonin                              | Sigma-Aldrich (Steinheim)     |
| Dikaliumhydrogenphosphat               | Roth (Karlsruhe)              |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                | Sigma-Aldrich (Steinheim)     |
| Dinatriumhydrogenphosphat              | Roth (Karlsruhe)              |
| 1,4,-Dithiothreitol (DTT)              | Roche (Mannheim)              |
| Entwicklerlösung G150                  | AGFA (Leverkusen)             |
| Essigsäure, 100%                       | Merck (Darmstadt)             |
| Ethanol                                | Merck (Darmstadt)             |
| Ethidiumbromid (EtBr)                  | Sigma-Aldrich (Steinheim)     |
| EDTA                                   | Biomol (Hamburg)              |

---

### 3 Material und Methoden

---

| Chemikalie                                                     | Hersteller (Standort)        |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------|
| EGTA                                                           | Merck (Darmstadt)            |
| Fixierlösung G334                                              | AGFA (Leverkusen)            |
| Formaldehyd (FA), 10%                                          | Polyscience (Warrington, UK) |
| Formamid                                                       | Merck (Darmstadt)            |
| Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung                          | Merck (Darmstadt)            |
| D-Glukose                                                      | Merck (Darmstadt)            |
| Glutardialdehyd (GDA), 25%                                     | Roth (Karlsruhe)             |
| Glyzerin                                                       | Merck (Darmstadt)            |
| Glycin                                                         | Biomol (Hamburg)             |
| H89 Dihydrochloridhydrat                                       | Sigma-Aldrich (Steinheim)    |
| HEPES<br>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure | Roche (Mannheim)             |
| Hypoxanthin                                                    | Biomol (Hamburg)             |
| IGEPAL CA-630 (Nonidet P-40)                                   | Sigma-Aldrich (Steinheim)    |
| Isopropanol                                                    | Merck (Darmstadt)            |
| Kaliumchlorid                                                  | Merck (Darmstadt)            |
| Kaliumdihydrogenphosphat                                       | Roth (Karlsruhe)             |
| Magnesiumchlorid                                               | Merck (Darmstadt)            |
| Manganchlorid                                                  | Merck (Darmstadt)            |
| $\beta$ -Mercaptoethanol                                       | Merck (Darmstadt)            |

---

### 3 Material und Methoden

---

| Chemikalie                                       | Hersteller (Standort)     |
|--------------------------------------------------|---------------------------|
| Methanol                                         | Merck (Darmstadt)         |
| Milchpulver                                      | Roth (Karlsruhe)          |
| 3-(n-Morpholino)-<br>Propansulfonsäure (MOPS)    | Merck (Darmstadt)         |
| N, N, N, N-TetramethyldiaMin<br>(TEMED)          | Merck (Darmstadt)         |
| Natriumacetat                                    | Merck (Darmstadt)         |
| Natriumchlorid                                   | Gerbu (Gaiberg)           |
| Natriumhydrogencarbonat                          | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Natriumdidodecylsulfat (SDS)                     | Serva (Heidelberg)        |
| Natriumdihydrogenphosphat                        | Roth (Karlsruhe)          |
| Natriumhydroxid                                  | Merck (Darmstadt)         |
| Ponceau S                                        | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Phenol Chloroform Isoamylalko-<br>hol (25:24:1)  | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| RPMI (Roswell Park Memorial<br>Institute)-Medium | Invitrogen (Karlsruhe)    |
| Salzsäure                                        | Merck (Darmstadt)         |
| Saponin                                          | Serva (Heidelberg)        |
| SB-216763                                        | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Sorbitol                                         | Sigma-Aldrich (Steinheim) |
| Sucrose                                          | Sigma-Aldrich (Steinheim) |

| <b>Chemikalie</b>                            | <b>Hersteller (Standort)</b>                 |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| TRIS (Tris (hydroxymethyl)-<br>aMinomethane) | Roth (Karlsruhe)                             |
| Triton X-100                                 | Biomol (Hamburg)                             |
| WR99210                                      | Jacobus Pharmaceuticals (Mary-<br>land, USA) |
| Xylencyanol                                  | Sigma-Aldrich (Steinheim)                    |

#### **3.1.1.1 Antibiotika**

| <b>Antibiotikum</b> | <b>Hersteller (Standort)</b> |
|---------------------|------------------------------|
| Ampicillin (amp)    | Roche (Mannheim)             |
| Blasticidin S (BSD) | Invitrogen (Karlsruhe)       |
| Gentamycin          | Ratiopharm (Ulm)             |

#### **3.1.1.2 Kits und Fertigversuchansätze**

| <b>Kit</b>                     | <b>Hersteller (Standort)</b>           |
|--------------------------------|----------------------------------------|
| NucleoSpin®Plasmid Kit         | Macherey-Nagel (Düren)                 |
| NucleoSpin®Extract II Kit      | Macherey-Nagel (Düren)                 |
| Plasmid Midi Kit               | Qiagen (Hilden)                        |
| QIAamp®DNA Mini Kit            | Qiagen (Hilden)                        |
| Western Blot ECL-Detection Kit | Thermo Fisher Scientific<br>(Schwerte) |
| Western Blot ECL-Detection Kit | GE Healthcare<br>(Buckinghamshire, UK) |

| <b>Kit</b>           | <b>Hersteller (Standort)</b> |
|----------------------|------------------------------|
| Novagen Thrombin Kit | Merck (Darmstadt)            |

#### **3.1.1.3 DNA- und Proteinstandards**

| <b>Marker</b>                       | <b>Hersteller (Standort)</b> |
|-------------------------------------|------------------------------|
| GeneRuler™1000 bp ladder            | Fermentas (St. Leon-Rot)     |
| PageRuler™prestained protein ladder | Fermentas (St. Leon-Rot)     |
| PageRuler™unstained protein ladder  | Fermentas (St. Leon-Rot)     |

#### **3.1.1.4 Enzyme**

| <b>Enzym</b>                                  | <b>Hersteller (Standort)</b>   |
|-----------------------------------------------|--------------------------------|
| Firepol™DNA Polymerase (5U/μl)                | Solis Biodyne (Taipei, Taiwan) |
| Phusion™High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μl) | NEB (Ipswich, USA)             |
| T4 DNA-Ligase (3U/μl)                         | NEB (Ipswich, USA)             |
| AvrII (4 U/μl) (C^CTAGG)                      | NEB (Ipswich, USA)             |
| DpnI [20 U/μl]                                | NEB (Ipswich, USA)             |
| Fast digest™KpnI (GGTAC^C)                    | Fermentas (St. Leon-Rot)       |
| KpnI [10 U/μl]                                | NEB (Ipswich, USA)             |
| Fast digest™NotI (GC^GGCCGC)                  | Fermentas (St. Leon-Rot)       |

---

### 3 Material und Methoden

---

| Enzym                      | Hersteller (Standort)    |
|----------------------------|--------------------------|
| Fast digest™XhoI (C~TCGAG) | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| Lamda Protein Phosphatase  | NEB (Ipswich, USA)       |

#### 3.1.1.5 Antikörper

##### Primäre Antikörper

| Antigen    | Organismus | Anwendung | Verdünnung | Quelle                      |
|------------|------------|-----------|------------|-----------------------------|
| GFP        | Maus       | WB        | 1:1000     | Dianova                     |
| TY1        | Maus       | WB        | 1:2000     | Diagenode                   |
| PfBiP      | Kaninchen  | WB        | 1:10000    | (Kumar et al., 1991)        |
| PfAMA1 1F9 | Maus       | WB        | 1:2000     | (Coley et al., 2001)        |
| PfAMA1     | Kaninchen  | WB        | 1:2000     | (Howell et al., 2003)       |
| GST        | Kaninchen  | WB        | 1:2000     | GenScript (New Jersey, USA) |

##### Sekundäre Antikörper

### 3 Material und Methoden

| Antigen   | Organismus | Konjugat           | Verdünnung | Quelle                      |
|-----------|------------|--------------------|------------|-----------------------------|
| Maus      | Ziege      | HRP                | 1:3000     | Dianova<br>(Hamburg)        |
| Kaninchen | Esel       | HRP                | 1:2500     | Dianova<br>(Hamburg)        |
| Maus      | Ziege      | Alexa Fluor<br>488 | 1:2000     | Molecular<br>Probes<br>(NL) |
| Maus      | Ziege      | Alexa Fluor<br>594 | 1:2000     | Molecular<br>Probes<br>(NL) |

#### 3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

| Gerät, Modell/Material                      | Hersteller (Standort)                |
|---------------------------------------------|--------------------------------------|
| Autoklav V120                               | Systec (Wettenberg)                  |
| Brutschrank                                 | Binder (Tuttlingen)                  |
| Eismaschine AF-10                           | Scotsman (Vernon Hills, USA)         |
| Elektroporator x-Cell                       | Biorad (München)                     |
| Entwickler Curix 60                         | AGFA (Mortsel, Belgien)              |
| LSRII Durchflusszytometer™                  | BD Biosciences (Franklin Lakes, USA) |
| Feinwaage SBA 32                            | Scaltec (Göttingen)                  |
| Gel-Dokumentations-System                   | Biorad (München)                     |
| Gelelektrophorese, Blot- & SDS-PAGE Zubehör | Biorad (München)                     |

---

### 3 Material und Methoden

---

| Gerät, Modell/Material             | Hersteller (Standort)                   |
|------------------------------------|-----------------------------------------|
| Laborwaage MC1 Laboratory LC 2200P | Sartorius (Göttingen)                   |
| Magnetrührer 19 R3001              | Heidolph (Schwabach)                    |
| Mikrowelle Micromaxx MM41568       | Medion (Mülheim)                        |
| Milli-Q Reinstwasseranlage         | Millipore (Bedford, USA)                |
| Netzspannungsgerät                 | Consort (Deisenhofen)                   |
| PCR Mastercycler epgradient        | Eppendorf (Hamburg)                     |
| pH 211 Microprocessor pH Meter     | Hanna Instruments (Kehl)                |
| Biophotometer plus                 | Eppendorf (Hamburg)                     |
| Protan Nitrozellulosemembran       | Schleicher & Schuell (Dassel)           |
| Schüttelinkubator GFL 1083         | Eppendorf (Hamburg)                     |
| Sterilfilter 0,2 µm                | Sarstedt (Nümbrecht)                    |
| Sterilbank Sterigard III Advance   | Baker (Sanford, USA)                    |
| Thermomixer 5436                   | Eppendorf (Hamburg)                     |
| UV-Tisch PHEROlum289               | Biotec Fischer (Reiskirchen)            |
| Vario Macs Separation Columns      | Miltenyi Biotec (Auburn, USA)           |
| Vortex Genie 2                     | Scientific Industries (Bohemia NY, USA) |
| Wasserbad                          | GFL (Burgwedel)                         |
| <hr/> <b>Mikroskope</b> <hr/>      |                                         |

---

### 3 Material und Methoden

---

| Gerät, Modell/Material                   | Hersteller (Standort)                  |
|------------------------------------------|----------------------------------------|
| Durchlicht-Mikroskop<br>Standard 20      | Zeiss (Jena)                           |
| Fluoreszenz-Mikroskop Axio<br>Imager. M1 | Zeiss (Jena )                          |
| <hr/> <b>Zentrifugen</b>                 |                                        |
| Eppendorf 5415 D                         | Eppendorf (Hamburg)                    |
| J2-MI Ultrazentrifuge                    | Beckman (München)                      |
| Megafuge 1,0R, Rotor 2705                | Heraeus (Hanau)                        |
| Sorvall Superspeed GSA-Rotor             | Du Pont Instruments (Bad Hom-<br>burg) |

#### 3.1.3 Medien & Puffer

##### 3.1.3.1 Medien & Puffer für *P. falciparum* Kulturen

|                                                                                          |                                                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| RPMI-Komplett Medium für <i>P. falciparum</i> Kulturen                                   | 15,87 g RPMI1640, 0,218 g Glukose,<br>10 g AlbumaxII, 27,2 mg Hypoxanthin,<br>0,5 ml Gentamycin (40 mg/ml), pH 7,4;<br>ad 1 l dH <sub>2</sub> O |
| Kryo-stabilisierungslösung zur<br>herstellung von <i>P. falciparum</i><br>Kryostabilaten | 4,2 % D-Sorbitol, 0,9 % NaCl, 28 %<br>Glycerol in dH <sub>2</sub> O, steril filtiert                                                            |
| Auftaulösung für Kryo-Stabilate                                                          | 35 g NaCl; ad 1 l dH <sub>2</sub> O                                                                                                             |

---

### 3 Material und Methoden

---

|                                                       |                                                                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>P. falciparum</i> Synchronisationslösung           | 200 g D-Sorbitol; ad 1l dH <sub>2</sub> O                                                                                                                                                                      |
| Elektroporationspuffer                                | 120 mM KCl, 150 µM CaCl <sub>2</sub> , 2 mM EGTA, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 25 mM HEPES, pH 7,6 in dH <sub>2</sub> O, steril filtriert |
| WR99210-Stocklösung                                   | 7,89 mg (20mM) in 1 ml DMSO                                                                                                                                                                                    |
| Lösung zum fixieren von <i>P. falciparum</i> Kulturen | 2 ml 10 % Formaldehyd, 1,5 µl 25 % Glutaraldehyd, 500 µl 10xPBS; ad 5,0 ml dH <sub>2</sub> O                                                                                                                   |
| Permeabilisierungslösung für IFA-Präparate            | 0,1 % (v/v) Triton in 1xPBS                                                                                                                                                                                    |
| Puffer zur selektiven Lyse von Erythrozyten           | 0,03 % (w/v) Saponin in 1x PBS                                                                                                                                                                                 |
| Lösung zum blockieren unspezifischer AK-Bindungen     | 1,5 g BSA, ad 50 ml 1xPBS                                                                                                                                                                                      |
| Blutkonserve                                          | humanes Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0+ (Blutbank Eppendorf, Hamburg)                                                                                                                                 |

#### 3.1.3.2 Medien & Puffer für biochemische Methoden

##### Proteinauftrennung

|                                        |                                                                                                              |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Elektrophoresepuffer                   | 1 g SDS, 14,41 g Glycin, 3,02 g Tris,<br>add 1 l dH <sub>2</sub> O                                           |
| Trenngelpuffer                         | 4,5 g Tris, pH 8,8; ad 100 ml dH <sub>2</sub> O                                                              |
| Sammelgelpuffer                        | 1,5 g Tris, pH 6,8; ad 100 ml dH <sub>2</sub> O                                                              |
| Ammoniumpersulfat                      | 10 % (w/v) in dH <sub>2</sub> O                                                                              |
| SDS-Probenpuffer                       | 2 g SDS, 6,05 g Tris, pH 6,8, 10 % (v/v)<br>Glycerin, 0,02 % BPB, 15,4 g DTT; ad<br>100 ml dH <sub>2</sub> O |
| Coomassie-Färbelösung 0,025 %<br>(w/v) | 0,25 % CoomassieBrillant Blue R250,<br>10 % Essigsäure, 40 % Methanol                                        |

##### Proteintransfer - Westernblot

|                |                                         |
|----------------|-----------------------------------------|
| Transferpuffer | 20 % Methanol, ad 1 l dH <sub>2</sub> O |
| Blockierlösung | 3 % (w/v) Milchpulver in 1xPBS          |

##### Proteinexpression und Aufreinigung von Gluthation-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen

|                     |                                                                                                                               |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Resuspensionspuffer | 50 mM Tris pH 7,4, 2 mM EDTA, 1 %<br>Triton-X100, 1 mM DTT ad 1 l dH <sub>2</sub> O<br>plus Proteaseinhibitor (1 Tabl./10 ml) |
| Elutionspuffer      | 0,5 & 1 mM Glutathion in Tris-HCl pH<br>8,0                                                                                   |

#### Phosphatase- und Kinaseassays

|                                 |                                                                                                                                                             |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lysepuffer für Phosphataseassay | 50 mM Tris-HCl pH 7,2, 250 mM NaCl, 0,1 % NP-40, 10 % Glycerol in dH <sub>2</sub> O                                                                         |
| Lysepuffer für Kinaseassay      | 250 mM Tris pH 7,3, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, plus Proteaseinhibitorcocktail (1 Tablette auf 10 ml), 1 µl Phosphatase-inhibitor auf 100 µl Puffer |
| 5x Phosphorylierungspuffer      | 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM MgCl <sub>2</sub>                                                                                                            |

#### 3.1.3.3 Medien & Puffer für mikrobiologische Methoden

##### Medien und Lösungen für *Escherichia coli* Kulturen

|                            |                                                                                                           |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Antibiotika                | Ampicillin (Amp) 100 mg/ml in 70 % Ethanol                                                                |
| LB-Medium                  | 10 g NaCl, 5 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, ad 1 l dH <sub>2</sub> O                                         |
| LB-Platten                 | 7,5 g Agar; ad 1 l LB-Medium                                                                              |
| LB-Medium und Platten +Amp | autoklaviertes LB-Flüssigmedium versetzt bei etwa 50 °C mit Amp (100 mg/ml), (Endkonzentration 100 µg/ml) |

##### Lösungen zur Herstellung kompetenter *Escherichia coli*

---

### 3 Material und Methoden

---

|                |                                                                                                                               |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LösungI (TFB1) | 4,08 g NaAc, 9,89 g MnCl <sub>2</sub> , 5,84 g NaCl, 1,47 g CaCl <sub>2</sub> , 15 % (v/v) Glycerin, ad 1 l dH <sub>2</sub> O |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                 |                                                                                                   |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LösungII (TFB2) | 2,1 g MOPS, 11,03 g CaCl <sub>2</sub> , 0,58 g NaCl, 15 % (v/v) Glycerin, ad 1l dH <sub>2</sub> O |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|

#### 3.1.3.4 Medien & Puffer für molekularbiologische Methoden

##### Lösungen und Puffer zur DNA-Fällung

|         |                                     |
|---------|-------------------------------------|
| Ethanol | 100 % und 70 % in dH <sub>2</sub> O |
|---------|-------------------------------------|

|               |                                 |
|---------------|---------------------------------|
| Natriumacetat | 3M in dH <sub>2</sub> O, pH 5,2 |
|---------------|---------------------------------|

##### Lösungen und Puffer zur Auftrennung von DNA

|            |                                   |
|------------|-----------------------------------|
| Agarosegel | 1 % (w/v) Agarose in 1xTAE-Puffer |
|------------|-----------------------------------|

|                |               |
|----------------|---------------|
| Ethidiumbromid | 10 mg/ml EtBr |
|----------------|---------------|

|                     |                                                                            |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 6x DNA Probenpuffer | 40 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Xylencyanol, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------|

|                            |                                            |
|----------------------------|--------------------------------------------|
| 50x TRIS-Acetat-EDTA (TAE) | 2 M TRIS, 1 M Eisessig, 0,5 M EDTA, pH 8,5 |
|----------------------------|--------------------------------------------|

### 3.1.4 Organismen

|                                    |                                                                                                                                                         |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>E. coli</i> XL-Gold             | Tetr $\Delta$ (mcrA)183 $\Delta$ (mcrCB-hsdSMRmrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte (F proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr) |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)- RIL     | B F-ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal endA Hte (argU ileY leuW Camr)                                                                                     |
| <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7   | MR4, Menasses/ USA, Ursprung: Afrika                                                                                                                    |
| <i>Plasmodium falciparum</i> W2mef | Indochina III/CDC-Stamm                                                                                                                                 |

### 3.1.5 Vektoren und Oligonukleotide

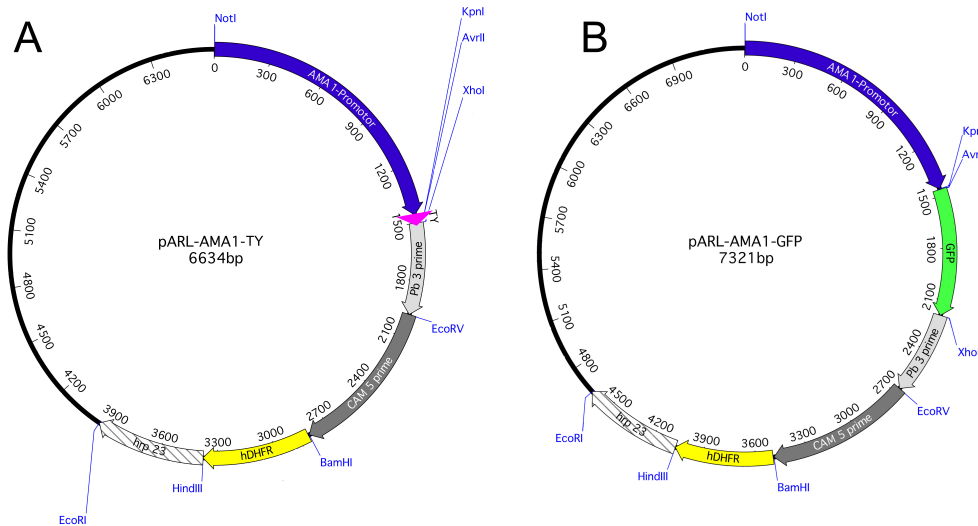
#### 3.1.5.1 Vektoren

**pARL1a(-)** (Treeck et al., 2009)

pARL1-TY1 ist ein Derivat von pARL -1a- (Crabb et al., 2004). Dieser Vektor ermöglicht die Expression von Gene mit einem C-terminalen TY1 Epitop Mathias et al. (1991); Yu et al. (1998) unter der Kontrolle des AMA1 Promotors in *P. falciparum*. Er ist ein Shuttle-Vektor der einerseits die Amplifikation und Selektion in *E. coli* ermöglicht (durch das  $\beta$ -Lactamase Gen) und andererseits durch seine humane Dihydrofolatreduktase- (*dhfr*) Gen eine Selektion in *P. falciparum* mit dem Antifolat WR99210 gewährleistet (Abb.7). Er ist ein Derivat des pARL1a(-) Shuttle-Plasmids (Crabb et al., 2004) und besitzt das Gen für die humane Dihydrofolatreduktase (hDFHR), was die Selektionierung transgener Parasiten durch das Antifolat WR99210 erlaubt. Für eine episomale Expression von TY1-Fusionsproteinen im späten Schizontenstadium wurde der *ama1*-Promotor verwendet (Treeck et al., 2009).

**pGEX 4T-1**

Für die Amplifikation von GST-Fusionsproteinen wurde der Vektor pGex 4T1

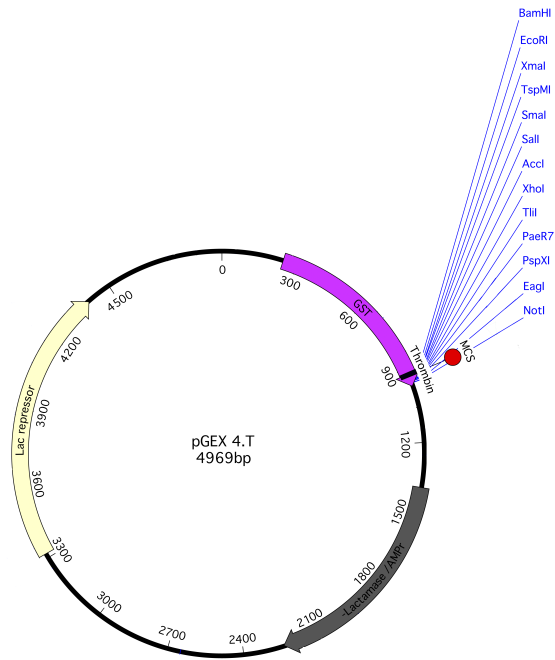


**Abb. 7: pARL1(a)-Vektorkarten:** Das Derivat des pARL1(a) Vektors besitzt **A.** ein TY1-Epitop (rosa Pfeil) oder **B.** ein „green fluorescent Protein“ (GFP)-Epitop (grüner Pfeil), welcher über die Restriktionsschnittstellen *AvrII/XhoI* eingefügt wurde. Die hDHFR ist als gelber Pfeil im Vektor dargestellt und der ama1-Promotor als blauer Pfeil. Über die Restriktionsschnittstellen *KpnI/AvrII* wird die Ziel-DNA für die Fusionsproteine inseriert.

benutzt (Abb.8). Dieser besitzt eine GST Domäne, welche N-terMinal zur 'Multiple Cloning Site' (MCS) liegt. Mit dieser Domäne können exprimierte Fusionsproteine mittels affinitätschromatografischer Verfahren aufgereinigt werden. Durch ein ebenfalls vorhandenes  $\beta$ -Laktamasegen können auch hier *E. coli* Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben mit Hilfe von Ampicillin selektioniert werden. Des weiteren besitzt der Vektor einen sog. Hybridpromotor(*tac*-Promotor), welcher aus den Promotoren des *lac*(Laktose)-Operons und des *trp*(Tryptophan)-Operons besteht. Durch das Laktose Analogon Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird der vom *lacI*-Gen kodierte Lac-Repressor synthetisiert was eine induzierbare Expression des GST-Fusionsproteins erlaubt.

#### 3.1.5.2 Oligonukleotide

Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Oligonukleotide wurden bei der dem Unternehmen Sigma-Aldrich, Steinheim synthetisiert und in lypophilisierter Form geliefert. Zunächst wurde eine Stocklösung von 100  $\mu$ M mit dH<sub>2</sub>O hergestellt. Die im Anschluss eingesetzte Arbeitskonzentration betrug 10  $\mu$ M. Tabelle 2 zeigt eine Zusammenstellung der Oligonukleotide, welche in dieser Arbeit für



**Abb. 8: pGex4T1 Vektorkarte:** Der pGex4T1 Vektor besitzt eine GST-Domäne (rosa Pfeil), welche N-TerMinal zu der multiple cloning site (MCS, roter Punkt) liegt. Das Gen für die Ampicillinresistenz ist als grauer Pfeil im Vektor dargestellt und das Gen für den lac-Repressor als beiger Pfeil. Über die Restriktionsschnittstellen *BamHI/XhoII* wird die DNA für die Fusionsproteine inseriert.

Konstrukte mit 3D7 Hintergrund für die *in vitro* Phosphorylierungsversuche verwendet wurden und Tabelle 4 eine Auflistung der Konstrukte mit W2mef Hintergrund für *in vivo* Reinvasionsassays. Bei Mutationen, welche zu weit innerhalb der kodierenden Sequenz lagen wurde eine „Overlab“-PCR gemacht. Die dafür verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle mit OL gekennzeichnet und die Antisense-Oligonukleotide sind die jeweiligen reversen Komplementärsequenzen.

Die Klonierungen in den pARL1a-TY1 Shuttle-Vektor wurden über die Schnittstellen *KpnI/AvrII* (5'/3') vermittelt. Bei der Klonierung von 3' Replacement Konstrukten wurden die homologe Region des Zielgens über die Schnittstellen *NotI/AvrII* (5'/3') in den Vektor eingefügt. Diese Konstrukte besitzen somit keine Promotorregion und werden erst vom Parasiten exprimiert, wenn sie in das Genom eingebaut wurden. Klonierungen in den pGEX 4T1 werden über die Schnittstellen *BamHI/XhoI* (5'/3') vermittelt.

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Mikrobiologische Versuche

##### 3.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

(Hanahan, 1983)

Kompetente *E. coli* Bakterien werden in der Biologie genutzt, um Plasmid-DNA schnell und in großer Menge zu amplifizieren. Um die Aufnahme von Fremd-DNA in *E. coli* zu ermöglichen, muss jedoch zunächst ihre Zellmembran sowie die Zellwand destabilisiert werden. Um dieses zu erreichen werden 4 ml einer *E. coli* „über-Nacht(üN)-Kultur“ in 200 ml LB-Medium aufgenommen und bei 37° C im Schüttelinkubator kultiviert bis die Lösung eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,5 bis 0,7 hat. Im Anschluss wird die Kultur bei 4° C für 20 Min und 2400g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die sedimentierten Bakterien werden in 60 ml eiskalter TFB I-Lösung resuspendiert und für 10 Min auf Eis inkubiert. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4° C und 2400g für 20 Min bei dem der Überstand erneut verworfen wird. Die sedimentierten Bakterien werden anschließend in eiskalter 8 ml TFB II-Lösung resuspendiert und bis zu ihrer Verwendung in 100 µl Aliquots bei -80° C gelagert

##### 3.2.1.2 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

(Sambrook et al., 1989)

*E. coli* Bakterien wurden auf LB-Agarplatten oder in LB-Flüssigmedium kultiviert. Um in einer Kultur auf Zellen zu selektionieren, welche ein Plasmid mit einem Ampicillinresistenzgen aufgenommen haben, wird das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben. Einzelkolonien werden über Ausstriche einer Bakteriensuspension auf LB<sub>amp</sub>-Agarplatten und anschließender üN-Inkubation bei 37° C gewonnen. Einzelne Bakterienkolonien werden anschließend in frisches LB<sub>amp</sub> überführt und erneut üN im Thermoschüttler bei 37°C inkubiert. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienkulturen, können 600 µl einer üN-Kultur mit 400 µl 50% igem Glycerol bei -80° C gelagert werden.

#### 3.2.1.3 Transformation von kompetenten *E. coli*

(Dower et al., 1988; Taketo, 1988)

Transformation bezeichnet das Einschleusen von Fremd-DNA in prokaryotische Zellen. Dafür wird ein 100 µl Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien auf Eis aufgetaut, mit einer entsprechenden Menge Plasmid-DNA vermengt und für 20 Min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wird dann für 45 sek auf 42° C erhitzt und anschließend für 2 Min auf Eis abgekühlt. Dieser Prozess wird als Hitzeschock bezeichnet. Die Bakterienkultur wird daraufhin bei 37° C in 500 µl Ampicillin-freiem LB-Medium für 30 Min schüttelnd inkubiert, anschließend auf einer LB<sub>amp</sub>-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

#### 3.2.1.4 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* BL21 (DE3)- RIL

Durch Verwendung von Gluthation-Sepharose kann man GST-Fusionsproteine affinitätschromatografisch aufreinigen. Für die Überexpression von GST-Fusionsproteinen werden *E. coli* BL21 (DE3)- RIL Bakterien verwendet. Diese besitzen ein zusätzliches Plasmid, welches ein Chloramphenicol (Cam)-Resistenzgen trägt und die Aminosäuren argU (AGA, AGG), ileY (AUA) und leuW (CUA) kodiert. Der pGEX 4T1-Expressionsvektor mit dem Gen für das Zielprotein wird in die BL21 (DE3)- RIL transformiert (3.2.1.3). Eine durch Sequenzierung positive getestete Einzelkolonie wird über Nacht in 10 ml LB<sub>amp</sub> bei 37° C schüttelnd kultiviert. Mit dieser Kultur werden am Folgetag 500 ml LB<sub>amp</sub> angeimpft und bis die Kultur eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,5 bis 0,7 erreicht hat. Anschließend wird die Proteinexpression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert worauf eine weitere Inkubation bei 37° C von 2-3 Std folgt. Dann werden die Kulturen bei 5000g für 30 Min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die sedimentierten Bakterien in Resuspensionspuffer aufgenommen.

### 3.2.2 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.2.1 Kultivierung von *P. falciparum*

(Trager & Jensen, 1976)

Die Kultivierung von *P. falciparum* Blutstadium-Parasiten erfolgt in RPMI-Komplettmedium in humanen Erythrozyten der Blutgruppe 0+. In 90x14 mm Petrischalen werden die Parasiten in einer sauerstoffarmen Atmosphäre (5 %

CO<sub>2</sub>, 1 % O<sub>2</sub> und 94 % N<sub>2</sub>) im Inkubator bei 37° C gelagert. Jede Petrischale enthält etwa 10 ml Medium mit 4-5 % Hämatokrit (Bezeichnung für den Anteil der zellulären Bestandteile am Volumen des Bluts). Ab einer Parasitämie (Anteil parasitierten Blutzellen zu Gesamtblutzellen, gemessen in Prozent) von etwa 8 % wird die Kultur im Normalfall verdünnt. Etwa alle 48 Std wiederholt sich der intraerythrozytäre Entwicklungszyklus der Parasiten wodurch es zu einer Versechs- bis Verachtfachung der Parasitämie kommt. Wird die Kultur nicht verdünnt, muss alle zwei Tage das Medium gewechselt werden.

#### 3.2.2.2 Herstellung von Ausstrichen und Giemsa-Färbung von *P. falciparum* Blutstadien

(Giemsa, 1904)

Zur Ermittlung der Parasitämie der Parasitenkultur werden Blutausstriche hergestellt, welche anschließend mit einer Giemsa-Lösung gefärbt werden. Dazu wird 1 µl der Blutkultur auf einen sauberen Objektträger getropft und mit einem zweiten Objektträger in einem Zug ausgestrichen. Nachdem der Ausstrich an der Luft trocknen konnte, wird er für 10 bis 20 sek in 100 %igem Methanol fixiert und anschließend in einer 10 %igen Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblau) für Mindestens 15 Min bei Raumtemperatur gefärbt. Der daraufhin unter fließendem Wasser gewaschene und sorgfältig getrocknete Blutausstrich kann am Durchlichtmikroskop mit Hilfe des 100x-Öl Objektives untersucht und die Parasitämie bestimmt werden.

#### 3.2.2.3 Herstellung und Auftauen von Kryostabilaten

*Herstellung von Kryostabilaten:*

Parasitenkulturen können bei -80° C und in Flüssigstickstoff dauerhaft gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut werden. Zur Herstellung von einem solchen Kryostabilat wird eine Kultur mit einem hohen Anteil an Ringstadien (> 5 % ) sedimentiert, in 800 µl Kryo-Lösung aufgenommen und in einem Kryovial bei -80° C oder in Flüssigstickstoff bei - 196° C eingefroren.

*Auftauen von Kryostabilaten:*

Kryostabilate werden bei 37° C aufgetaut, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1500g für 5 Min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und

die sedimentierten Zellen in 1 ml Auftaulösung resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wird der Überstand erneut verworfen und die Zellen 2x mit RPMI-Komplettmedium gewaschen bevor sie in 10 ml Medium +5 % Hämatokrit aufgenommen und in einer Petrischale kultiviert werden.

#### 3.2.2.4 Synchronisierung von *P. falciparum* mit Sorbitol

*P. falciparum* durchlaufen in ihrer intraerythrozytären Entwicklung drei Stadien. Das Ringstadium, das Trophozoitenstadium und das Schizontenstadium. Da die Entwicklung der Parasiten in Kultur asynchron verläuft, findet man nach kurzer Zeit alle drei Stadien im Blutaussstrich. Für einige Versuche ist es notwendig einen hohen Anteil eines bestimmten Stadiums zu haben. Dafür kann die Parasitenkultur synchronisiert werden. Dazu werden die Parasiten zentrifugiert und das Parasitenpellet (mit einem möglichst hohen Anteil an Ringstadien) in dem 5-6 fachen Volumen einer 5 % igen D-Sorbitol-Lösung für 10 Min bei 37° C inkubiert. Anschließend werden die Parasiten zentrifugiert, der Überstand verworfen und erneut in Kultur genommen. Bei der Sorbitol-Lyse werden Trophozoiten- und Schizontenstadien durch osmotischen Druck zerstört wodurch nur die Ringstadien in der Kultur überleben. Dies sorgt dafür, dass man eine Kultur erhält in der die Parasiten in ihrer Entwicklung maximal 16 Std (Dauer des Ringstadiums) voneinander entfernt sind. Ist ein engeres Zeitfenster erwünscht muss mehrmals synchronisiert werden (z.B. 12 h nach der ersten Synchronisation, um ein Zeitfenster von ca. 4 h zu erhalten).

#### 3.2.2.5 Transfektion von *P. falciparum* mittels Elektroporation

(Fidock & Wellems, 1997; Wu et al., 1995; Crabb & Cowman, 1996)

Transfektion bezeichnet das Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Im Falle von *P. falciparum* muss die Plasmid-DNA mittels Elektroporation 4 Membranen überwinden. (i) Die Erythrozytenmembran, (ii) die Membran der parasitophoren Vakuole, (iii) die Parasitenmembran und (iiii) die Kernmembran. Für die Transfektion werden 3D7 Parasiten im Ringstadium verwendet welche eine Parasitämie von etwa 10 % aufweisen. 250 µl parasitierte Erythrozyten werden mit 100 µg Plasmid-DNA transfiziert. Die entsprechende Menge DNA wird dazu mit 1/10 Volumen 6,5 M Natriumacetat und dem 3fachen Volumen 100 %igem Ethanol gefällt und für 10 Min bei 13.000g zentrifugiert. Der

Überstand wird verworfen und das DNA-Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend wird es an der Luft getrocknet und in 20 µl TE-Puffer resuspendiert. Zu der gelöste DNA wird 380 µl Cytomix Transfektionslösung gegeben und der gesamte Ansatz mit den parasitierten Erythrozyten resuspendiert. Die Transfektion erfolgt in einer Elektroporationsküvette (Spaltdicke: 2 mm) bei 310 V und 950 µF, wobei die optimale Pulszeit zwischen 8-12 ms liegt. Anschließend werden die Parasiten sofort in 10 ml 37° C warmes RPMI-Komplettmedium überführt, wobei des Hämatokrit wieder auf 5 % eingestellt wird. Die Parasiten werden dann für 5 Std unter Kulturbedingungen gehalten (vergl: 3.2.2.1), wonach ein Mediumwechsel durchgeführt wird und bei dem mittels 3 nM WR99210 ein Selektionsdruck für die Aufnahme des Plasmids hergestellt wird. Für die folgenden 10 Tage wird das Medium täglich gewechselt, anschließend alle 2 Tage. Bei einer erfolgreichen Transfektion sollten nach 20 bis 35 Tagen die ersten transgenen Parasiten im Blutaussstrich nachweisbar sein.

#### **3.2.2.6 Isolation von Parasiten durch begrenzte Saponin-Lyse**

(Umlas & Fallon, 1971)

Die Isolierung von Parasitenmaterial vom Erythrozyten wird mit der begrenzten Saponin-Lyse erreicht. Saponin destabilisiert die Plasmamembran des Erythrozyten, indem es mit der Bindung von Phospholipiden an Cholesterin konkurriert. Da Cholesterin in der Parasitenmembran nicht vorhanden ist, bleibt diese intakt. Eine Kultur parasitierter Erythrozyten wird für 5 Min bei 1500g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Erythrozytenpellet mit 1x PBS gewaschen. Dieses wird dann mit 1 ml 0,03 %igem Saponin in 1x PBS für 10 Min auf Eis inkubiert. Die Suspension wird für 1 Min bei 13000g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wird das Parasitenpellet mehrmals mit eiskaltem 1x PBS gewaschen, bis der Überstand klar ist. Das PBS-freie Parasitenpellet kann bei -80° C eingefroren werden oder für Western Blot Analysen in 6x SDS-Probenpuffer aufgenommen werden.

#### **3.2.2.7 Herstellung von Parasitenlysate**

Parasitenlysate kann zur Phosphorylierung von Proteinen genutzt werden, da es alle zum Zeitpunkt der Ernte exprimierten Parasitenkinasen enthält. Zur Herstellung von Parasitenlysate wird eine Parasitenkultur mit einem hohen Anteil

an Schizontenstadien benötigt. Dazu wird die Kultur im Vorfeld 2x im Ringstadium mit Sorbitol synchronisiert (vergl. 3.2.2.4), damit die unterschiedlichen Entwicklungsstadien nicht weiter als 8 Std voneinander entfernt sind. Wenn die Kultur ein möglichst spätes Entwicklungsstadium erreicht hat, werden die Schizonten über eine magnetische Säule (Vario MACS Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) von den uninfizierten Erythrozyten sowie noch späten Trophozoitenstadien getrennt und aufgereinigt. Das Eisen im Hämozoin, welches als Abbauprodukt von Hämoglobin in Schizonten stark angereichert wird, vermittelt die Bindung an die magnetische Säule. Die Säule wird anschließend vom Magneten entfernt und die angereicherten Schizonten in 1x PBS aufgenommen. Anschließend wird mittels Saponin-Lyse (vergl. 3.2.2.6) ein Parasitenpellet hergestellt. Dieses Pellet wird im 10fachen Volumen Lysepuffer (für Phosphatase- oder Kinaseassay) resuspendiert. Mit einer 1 ml Injektionsspritze wird die Suspension auf Eis 10x durch eine 0,4 x 20 mm Kanüle gezogen um mögliche Zell-Konglomerate zu zerstören und anschließend 3x mit Flüssigstickstoff eingefroren und wieder aufgetaut um die Zellen aufzubrechen. Anschließend wird die Suspension 3 Std rollend bei 4° C inkubiert bevor sie 10 Min bei 16.000g zentrifugiert und der Überstand als Parasitenlysat bei -80° C gelagert wird.

#### 3.2.2.8 Erythrozyten-Invasion Kompletationsassay

Die Auswirkungen von Mutationen, chemischen Substanzen oder Antikörpern auf die Funktion von AMA1 für die Invasion kann mit einem Kompletationsassay ermittelt werden. Die Bindung von PfAMA1 aus dem *P. falciparum* Isolat 3D7 an den RON-Komplex wird mit dem synthetischen Peptid R1 gehemmt und somit die Invasion in den Erythrozyten inhibiert (Harris et al., 2005). Bei dem von Treeck et al. (2009) entwickelten Assay kann der inhibitorische Effekt von R1 auf den das endogene AMA1 durch die Überexpression von AMA1 des W2mef Isolats komplementiert werden, da dieses von R1 nicht beeinflusst wird. Dadurch können Auswirkungen von Mutationen bei W2mef-AMA1 bei der Invasion untersucht werden. Dazu wird eine synchrone Trophozoitenkultur mit einer festen Parasitämie im Bereich von 0,5 % bis 1 % mit 100 µg/ml R1 Peptid inkubiert. 48 Std später wird die Parasitämie gemessen und mit einer Kontrollgruppe von unbehandelten Parasiten der selben Ausgangskultur verglichen. Infizierte Erythrozyten werden durch eine Syto<sup>TM</sup>16 Färbung, welche die

DNA der Parasiten bindet markiert. Die Parasitämiemessung erfolgt mit einem Durchflusszytometer (FACS). Die Versuche werden in 150 µl Kulturansätzen in einer 96-Loch Titerplatte durchgeführt. Alle Versuche werden in 3 unabhängigen Experimenten, jeweils in dreifach-Ansätzen durchgeführt.

### 3.2.3 Mikroskopie

#### *Lichtmikroskopie*

Giensa-gefärbte Ausstriche werden mit dem Lichtmikroskop untersucht. Auf den Ausstrich wird ein Tropfen Immersionsöl gegeben und das Präparat anschließend mit dem 100x-Öl Objektiv untersucht.

#### *Fluoreszenzmikroskopie*

Parasiten welche mit einem GFP(green fluorescent protein)-Fusionsprotein transfigiert wurden, konnten bei erfolgreicher Expression des Proteins mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Da die GFP-Fluoreszenzmarkierung von Lebendpräparaten möglich, können hier auch dynamische Prozesse beobachtet und untersucht werden. GFP wird mit energiereichem Licht der Wellenlängen 395/470 nm angeregt und emittiert wiederum grünes Licht einer Wellenlänge von 509/540 nm (Chalfie, 1995). Einer Parasitenkultur wird zunächst etwa 50-100 µl Parasitenmaterial entnommen und dieses mit 1 µg/ml DAPI versetzt. Dieser Ansatz wird für 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1x PBS gewaschen. Zur mikroskopischen Analyse wird die Parasitensuspension auf einen Objektträger getropft und in Deckgläschen aufgelegt. Mit Immersionsöl wurden die Parasitenpräparate am Fluoreszenzmikroskop untersucht.

### 3.2.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.4.1 Sterilisierung von Geräten und Lösungen

Glasflaschen, Pipettenspitzen sowie Lösungen und Medien werden für 20 Min bei 1,5 bar Dampfdruck und 121 °C autoklaviert. Hitzeinstabile Lösungen werden mit Sterilfiltern der Porengröße 0,2 µm steril filtriert.

### 3.2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion

(Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der *in vitro* Amplifizierung definierter DNA-Fragmente mit Hilfe von Oligonukleotiden. Diese werden synthetisch hergestellt und binden komplementär an die flankierenden Regionen in der Ausgangs-DNA. Der DNA-Abschnitt zwischen den Oligonukleotiden wird durch die hitzestabile DNA-Polymerase beginnend am freien 3' OH-Ende synthetisiert. „Colony screen-PCRs“ wurden mit der Firefly™-Polymerase durchgeführt und Klonierungen mit der Phusion™-High-Fidelity DNA-Polymerase da diese durch ihr „proof-reading“-Funktion eine geringe Fehlerrate von  $4,4 \times 10^{-7}$  aufweist. Die PCR besteht aus einer Abfolge von 3 Zyklen. Im Denaturierungsschritt wird die DNA in ihre Einzelstränge geteilt damit die Oligonukleotide im Annealingschritt bei 42-60° C an der komplementären Position mit der DNA hybridisieren können. Die Synthese des neuen DNA-Strangs durch die Polymerase erfolgt in der Elongationsphase bei 68-72° C. Diese Schritte wiederholen sich 28-30x wobei sich die Anzahl der DNA-Stränge bei jedem Zyklus verdoppelt. Ein Standard-PCR Ansatz für Klonierungen mit der Phusion™-Polymerase sieht wie folgt aus:

50-400 ng DNA

10 µl 5x High-Fidelity Phusion™Polymerase-Puffer

5 µl dNTPs (2mM)

2,5 µl vorwärts-Oligonukleotid (10 µM)

2,5 µl rückwärts-Oligonukleotid (10 µM)

0,2 µl Phusion™High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/µl)

mit dH<sub>2</sub>O ad 50 µl

|                        |                           |             |
|------------------------|---------------------------|-------------|
| Initiale Denaturierung | 95° C für 2 Min           | } 30 Zyklen |
| Denaturierung          | 95° C für 15 sek          |             |
| Annealing              | 48,5° C für 30 sek        |             |
| Elongation             | 68° C für 0,5 - 1 Min/kbp |             |
| Finale Elongation      | 68° C für 7 Min           |             |
| PCR-Ende               | 4° C für ∞                |             |

#### 3.2.4.3 Kolonien-PCR zur Untersuchung von Bakterienstämmen auf die Aufnahme von Plasmid-DNA

Um Bakterienkolonien nach einer Transformation auf die Aufnahme von Plasmid-DNA zu untersuchen, wird eine PCR mit Oligonukleotiden durchgeführt, die spezifisch für das transformierte DNA-Fragment sind. Auf einer LB<sub>amp</sub>-Platte gewachsenen Bakterienkolonien dienen bei dieser PCR als Template und werden mit einer kleinen Pipettenspitze direkt in den PCR-Ansatz gegeben, nachdem die Kolonie mit einem Ausstrich auf eine sogenannte „Masterplatte“ überführt wurde. Für diese PCR-Methode wird die FireFly<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase benutzt. Der Standard-PCR-Ansatz für eine Kolonie-PCR sieht wie folgt aus:

1 µl 10x FireFly<sup>TM</sup>Polymerase-Puffer  
1 µl dNTPs (2mM)  
0,5 µl vorwärts-Oligonukleotid (10 µM)  
0,5 µl rückwärts-Oligonukleotid (10 µM)  
0,1 µl FireFly<sup>TM</sup>DNA-Polymerase (2 U/µl)  
mit dH<sub>2</sub>O ad 10 µl

#### 3.2.4.4 Oligonukleotid-basierte Mutagenese

Mit Hilfe von Oligonukleotiden können durch eine PCR Mutationen an beliebige Positionen in DNA-Fragmente kloniert werden. Die sogenannte „Overlapping-PCR“ ist eine der am häufigsten genutzten Methoden dafür. Bei dieser wird das DNA-Endprodukt aus zwei separat hergestellten DNA-Fragmenten (Fragment A und B) synthetisiert welche an der Stelle, wo die Mutation auftreten soll zueinander komplementär sind. Dafür werden 4 Oligonukleotide benötigt. Die beiden flankierenden, welche sich am 5' Ende und am 3' Ende de DNA-Zielfragments befinden, und ein komplementäres inneres Oligonukleotid-Paar welches zu der Position in der Ziel-DNA komplementär ist, an welcher die Mutation eingefügt werden soll. Dieses innere Oligonukleotid-Paar sollte etwa 20-30 Basenpaare lang sein und besitzt bereits die Mutation welche bei jedem Syntheseschritt an

den neu entstehenden Folgestrang weitergegeben wird. Mit dem flankierenden vorwärts-Oligonukleotid und dem inneren rückwärts-Oligonukleotid wird das erste DNA-Fragment A hergestellt. Das zweite DNA-Fragment B wird dementsprechend aus dem flankierenden rückwärts-Oligonukleotid und dem inneren vorwärts-Oligonukleotid synthetisiert. Beide DNA-Fragmente besitzen dadurch einen 20-30 Basenpaare langen, komplementären Bereich. Nachdem die beiden DNA-Fragmente aufgereinigt wurden, wird eine 3. PCR durchgeführt, bei der die beiden DNA-Fragmente (A und B) sich durch ihren komplementären Bereich gegenseitig als Oligonukleotid dienen. Am jeweiligen 3' OH-Ende wird der eine DNA-Strang durch die Polymerase aufgefüllt, wobei der andere DNA-Strang als Matrize dient. In 7 PCR-Zyklen werden dadurch die DNA-Endprodukte hergestellt, welche die Mutation besitzen. Anschließend wird eine Standard-PCR durchgeführt, bei der das Endprodukt mit Hilfe der beiden flankierenden Oligonukleotide in großer Menge amplifiziert wird. Dieses kann aufgereinigt und für eine Klonierung verwendet werden.

#### **3.2.4.5 Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA**

Für die Aufreinigung von DNA aus einer PCR, von DNA aus Restriktionsverdauen oder DNA aus Agarosegelen wurde das Nucleospin®Extract II Kit von Macherey& Nagel verwendet. Durch eine hohe Salzkonzentration wird die DNA reversibel an eine Silica-Membran gebunden, kann so gewaschen, sowie Salzen, Proteinen und Verunreinigungen befreit werden, bevor es in einem Elutionsschritt wieder in TE-Puffer aufgenommen werden kann. Die Aufreinigung wurde entsprechend des Protokolls im Benutzerhandbuch durchgeführt.

#### **3.2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung und Visualisierung von DNA-Fragmenten**

(Garoff & Ansorge, 1981)

Bei der Agarose-Gelelektrophorese migriert DNA entlang eines elektrischen Feldes durch eine Agarosegel-Matrix. Die Migrationsgeschwindigkeit der DNA wird zum einen durch die Agarose-Konzentration, Konformation, die angelegte Feldstärke und der Pufferzusammensetzung bestimmt sowie zum anderen durch die Größe der DNA-Fragmente. Aufgrund des Zucker-Phosphat-Rückgrats besitzt DNA eine negative Ladung, welche sie in einem elektrischen Feld in Richtung

Anode bewegt. Die DNA-Proben werden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und als Größenmaß dient ein DNA-Größenmarker. In einem 1 %igen Agarosegel werden die DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt. Dabei Migrieren kleinere DNA-Fragmente schneller als größere. Dazu wird 2 g Agarose in 200 ml 1x TAE-Puffer gelöst und aufgekocht. Wenn die Lösung eine Temperatur von etwa 60° C erreicht hat wird 10 µl Ethidiumbromid zugegeben und die Agaroselösung zum aushärten in eine Agarosegelkammer gegeben. Nach der Auftrennung kann die DNA durch Ethidiumbromid, welches mit der DNA interkaliert unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

### 3.2.4.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen werden von Seqlab in Göttingen durchgeführt. Dazu werden 600-700 ng Plasmid-DNA und 20 pmol Primer in einem Gesamtansatz von 7 µl über den Postweg zu Seqlab geschickt. Am Folgetag können die Sequenzen von der Firmeneigenen Internetseite heruntergeladen werden.

### 3.2.4.8 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind eine Klasse von bakteriellen Enzymen, welche in der Lage sind Phosphodiesterbindungen im Zucker-Phosphat-Rückgrat von DNA zu hydrolysieren. Spezielle Restriktionsenzyme können unterschiedliche DNA-Erkennungssequenzen detektieren, an sie binden und so den DNA-Strang an dieser Stelle trennen. Die Erkennungssequenzen sind meist 4 bis 8 Basen lang und bestehen häufig aus einer palindromen Sequenz. Die Restriktionsenzyme können glatte Enden („blunt ends“) oder einzelsträngige, kohäsive Überhänge („sticky ends“) erzeugen. Bei den Klonierungen in dieser Arbeit wurden ausschließlich Restriktionsenzyme verwendet, welche „sticky ends“ erzeugen, da man verschiedene DNA-Fragmente die mit dem selben Enzym geschnitten wurden, zielgerichtet zusammenfügen kann.

### 3.2.4.9 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen können die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5' Phosphat- und 3' Hydroxylgruppen von DNA-Fragmenten mit kompatiblen Enden katalysieren. Zu einem Ligationsansatz gehören Ligase-Puffer, Ligaseen-

zym in der Konzentration 0,15 U/ $\mu$ l Vektor und Insert (mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut) im molaren Verhältnis 1:3. Der Ansatz wird für 45 Min bei RT inkubiert und kann anschließend in kompetente Bakterien transformiert werden.

#### 3.2.4.10 Plasmid-Isolation (Mini- und Midi-Präparation)

Um Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen zu isolieren wurde für Mini-Präparationen das NucleoSpin®Plasmid Kit von Macherey-Nagel verwendet und für Midi-Präparationen das Plasmid Midi Kit von Qiagen. Die Verwendung verlief nach Herstellerangaben. Beide Präparationen verlaufen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, wonach die Plasmid-DNA an eine Silica-Membran gebunden. Das Bakterienpellet einer 2 ml (Mini) oder 100 ml (Midi) ü/N-Kultur wird in RNase A-haltigem Puffer aufgenommen und die Zellen durch die Zugabe von Lyse-Puffer aufgeschlossen. Neutralisationspuffer wird zugegeben und durch Zentrifugation die Zellreste von der DNA-Lösung getrennt. Diese wird dann an eine Silicamatrix gebunden, gewaschen und in 50  $\mu$ l (Mini-Präparation) oder 200  $\mu$ l (Midi-Präparation) dH<sub>2</sub>O eluiert.

#### 3.2.4.11 Präparation von genomischer *P. falciparum* DNA

Für die Isolierung von gDNA aus Parasiten wurde das QIAamp®DNA Mini Kit von Qiagen verwendet. Hierbei kann Parasiten-DNA direkt aus Blut aufgereinigt werden. Die Blutprobe wird dazu in einem Proteinase K-haltigen Puffer aufgenommen und die Zellen des weiteren nach dem Prinzip der alkalischen Lyse zerstört. Die Lösung wird auf eine Silica-Matrix gegeben, dann welcher die DNA bindet und gewaschen werden kann. Anschließend wird die DNA von der Säule in 200  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O eluiert. Die Durchführung verlief anhand des Herstellerprotokolls.

#### 3.2.4.12 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der Konzentration von aufgereinigter DNA wurde mit einem Biophotometer durchgeführt. Dieses nutzt die Licht-absorbierenden Eigenschaften von den Basen der DNA aus. Eine OD<sub>260nm</sub> von 1 entspricht einer Konzentration von 50  $\mu$ l/ml doppelsträngiger DNA. Das Absorptionsmaximum aroma-

tischer Aminosäuren in Proteinen liegt bei 280 nm. Mit diesen beiden Werten kann die Reinheit der DNA ermittelt werden.

### 3.2.5 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.5.1 Affinitätschromatografische Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

(Smith & Johnson, 1988)

GST-Fusionsproteine wurden über den pGex-4T1 Vektor exprimiert und besitzen eine N-Terminale Glutathion-S-Transferase Domäne. Glutathion-S-Transferase ist ein Enzym, welches im Körper Glutathion an Xenobiotika bindet, wodurch diese Verbindung von der Niere ausgeschieden werden kann. Eine GST-Domäne hat eine sehr hohe Bindeaffinität zu Glutathion, welches, an Sepharose-Granulat gebunden, zur Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen genutzt werden kann. GST-Fusionsproteine werden wie in Kapitel 3.2.1.4 beschrieben exprimiert und das im Anschluss entstehende Bakterienpellet in 20 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Lösung wird in einen 50 ml Glasbecher gegeben, welcher auf Eis gekühlt wird. Die Lösung wird sonifiziert (4x 1 Min) wodurch die Bakterienzellen aufgeschlossen werden. In einem folgenden Zentrifugationsschritt werden die Zelltrümmer bei 10.000g und 4° C für 30 Min sedimentiert und der Überstand, welcher unter anderem das GST-Fusionsprotein beinhaltet, in ein neues 50 ml Falconröhrchen überführt. 50 µl High-Affinity Resin werden 3x mit Resuspensionspuffer gewaschen und anschließend für 3 Std bei 4-8° C rollend mit der GST-Proteinlösung inkubiert. Nachdem die GST-domäne an das Granulat gebunden hat, wird es 7x mit eiskaltem Resuspensionspuffer gewaschen wobei es bei 1500g für 1 Min zentrifugiert wird. Anschließend wird das GST-Fusionsprotein von dem Granulat eluiert. Dazu wird es 2x mit 0,5 mM Glutathion für 15 Min bei 4-8° C gerollt, bei 2000g für 3 Min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend folgt ein Elutionsschritt mit 1 mM Glutathion. Bei der Elution konkurriert das lösliche Glutathion mit dem Glutathiongranulat um die Bindung am GST-Epitop. Dabei wird das GST-Fusionsprotein in Lösung gebracht und bei -20° C gelagert. Ein Teil der GST-Fusionsproteine bleiben am Granulat gebunden und wird mit 100 µl Resuspensionspuffer bei 4° C gelagert. Mit einem 10 %igem SDS-Gel

kann der Erfolg der Aufreinigung überprüft werden.

#### 3.2.5.2 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Proteine können in einem SDS-Gel anhand ihrer Größe aufgetrennt und visualisiert werden. Aminosäuren verhalten sich amphoter, was bedeutet, dass sie je nach Milieu unterschiedliche Reaktionen zeigen. So besitzen die Proteine in einem Milieu mit einem pH-Wert, der höher ist als der isoelektrische Punkt eine negative Ladung und in einem Milieu mit einem niedrigeren pH-Wert eine positive Ladung. Bei der SDS-PAGE wird dieses Verhalten ausgenutzt und die Proteine entlang eines elektrischen Feldes anhand ihrer Größe aufgetrennt. Das SDS dient als Denaturierungsmittel für Proteine, indem es die nicht-kovalenten Bindungen unterbricht und so deren Quartär- und Tertiärstruktur zerstört. Ebenso werden Protein-Protein-Interaktionen unterbrochen. Bei der SDS-PAGE werden zwei Gel- und Puffersysteme eingesetzt. Zunächst müssen die Proteine durch ein „weitmaschiges“ Sammelgel in einem glycinreichen Puffer mit dem pH 6,8. Glycin liegt in diesem sauren pH-Wert als Zwitterion vor und zeigt daher ein langsames Migrationsverhalten im elektrischen Feld. Chlorid-Ionen, welche als weitere Ladungsträger dienen, passieren das Sammelgel aufgrund ihrer geringeren Größe und negativen Ladung schneller. Die Proteine wandern somit in einem Feldstärke-Gradienten zwischen Chloridionen und Glycin wodurch sie an der Grenzfläche von Sammelgel und Trenngel in einer dünnen Zone konzentriert vorliegen. Das Trenngel besteht aus einem Tris -Glycin Puffer und hat einen pH Wert von 8,8. Dadurch bekommt das Glycin eine negative Gesamtladung und überholt die Proteinfront was zu einer Auftrennung nach dem Molekulargewicht führt. Die Gele können je nach Anwendung mit unterschiedliche Mengen an Acrylamid hergestellt werden, was zu einer höheren Auflösung bei der Auftrennung der Proteine führt. In dieser Arbeit wurden 4 %ige Sammelgele und 12 %ige und 15 %ige Trenngele verwendet.

##### Sammelgel (4 %)

1 ml Sammelgelpuffer

2,4 ml dH<sub>2</sub>O  
534 µl 40 % Acrylamid  
5 µl TEMED  
40 µl 10 % SDS  
20 µl 10 % APS

#### Trenngel (12 % / 15 %)

1,5 ml Trenngelpuffer  
2 ml/1 ml dH<sub>2</sub>O  
2,5 ml/1,5 ml 40 % Acrylamid  
5 µl TEMED  
60 µl 10 % SDS  
25 µl 10 % APS

#### **3.2.5.3 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen**

(Weber & Osborn, 1969)

Mit einer Coomassiefärbung können Proteinbanden in einem SDS-Gel sichtbar gemacht werden. Der Triphenylmethanfarbstoff im Coomassie bindet an die basischen Seitenketten der Proteine. Nach einer Inkubation des SDS-Gels in der Coomassie-Lösung für 30 Min kann das Gel mit dH<sub>2</sub>O entfärbt werden, wobei Färbung der Proteine sehr stabil ist und somit gut erkennbar.

#### **3.2.5.4 Westernblot**

(Kyhse-Andersen, 1984)

Um Proteine, welche über ein SDS-PAGE separiert wurden mit Hilfe einer Antikörperfärbung sichtbar zu machen, müssen diese vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert werden. Diese Methode nennt sich Western Blotting. In dieser Arbeit wurde das Prinzip des „Wet-Blotting“ genutzt. Dabei werden alle Proteine im Gel über ein elektrisches Feld mit 80mA für 1 Std auf die Nitrozellulosemembran übertragen und binden an dieser über hydrophobe Wechselwirkungen. Anschließend wird die Membran in 5 %iger Milch für 1 Std inkubiert, damit ungesättigte Bindestellen an der Membran blockiert werden.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper (3.1.1.5) erfolgt in 5 %iger Milch über Nacht bei 8° C. Dieser wird danach 3x in 1x PBS für 15 Min ausgewaschen bevor der Sekundäreantikörper in 5 %iger Milch für 45 Min bei Raumtemperatur inkubiert wird. Dieser ist an die Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden und wird ebenso 3x in 1x PBS für 15 Min ausgewaschen. Die Antikörperbindung kann mit einem ECL-Kit nachgewiesen werden, wobei das in der Lösung enthaltene LuMinol durch die HRP in ihre Derivate gespalten wird. Diese entwickeln eine Chemilumineszenz die mit einem aufgelegten Röntgenfilm nachgewiesen werden kann.

#### 3.2.5.5 Phosphatase-Assay

Bei einem Phosphatase-Assay kann der Phosphorylierungssatatus eines Proteins *in vitro* nachgewiesen werden. Dabei wird das veränderte Laufverhalten des Proteins bei einem SDS-PAGE durch das Vorhandensein oder die Entfernung einer Phosphatgruppe ausgenutzt. Synchronisierte Parasiten werden mit einer hohen Parasitämie (8-10 %) geerntet und durch Saponinlyse von den Erythrozyten getrennt. Anschließend muss das Protein aus dem Parasiten gelöst werden. Dazu wird das Parasitenpellet im 10x Volumen Lysepuffer für Phosphataseassays resuspendiert 10x mit einer 1 ml Injektionsspritze 10x durch eine 0,4 x 20 mm Kanüle gezogen und 3x in Flüssigstickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Die Suspension wird 3 Std bei 4° C rollend inkubiert und anschließend bei 12.000g für 10 Min zentrifugiert. Zu dem Überstand wird die entsprechenden Menge 10x PMP Puffer und 10x MnCl<sub>2</sub> gegeben und der gesamt Ansatz geteilt. Zur einen Hälfte wird 1 µl Lambda Phosphatase (4000 Units) gegeben und die andere Hälfte wird zur Kontrolle ohne Phosphatase angesetzt. Beide Ansätze werden für 15 Min bei 30° C inkubiert und anschließend in reduzierendem 5xSDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels Westernblot ausgewertet.

#### 3.2.5.6 *In vitro* Phosphorylierungsassay

In dieser Arbeit wurde die Phosphorylierung von Proteinen auf zwei Arten nachgewiesen. Zum einen durch ein verändertes Laufverhalten von phosphorylierten zu unphosphorylierten Proteinen in SDS-Gelen und zum anderen durch die radioaktive Markierung der phosphorylierten Proteine mit  $\gamma$ -<sup>[32]</sup>P markiertem ATP. Bei beiden Assays werden etwa 10 µg aufgereinigtes, an Sepharose

gebundenes GST-Fusionsprotein eingesetzt. Zur Sepharose wird 5x Phosphorylierungspuffer (3.1.3.2), 10  $\mu\text{M}$  ATP und 1  $\mu\text{l}$ /100  $\mu\text{l}$  Phosphataseinhibitor gegeben. Zur Phosphorylierung wurde (wenn nicht anders angegeben) entweder 3  $\mu\text{g}$ /100  $\mu\text{l}$  gesamt-Parasitenlysate, 1 U l Maus-PKA oder 0,5 U humane GSK3 gegeben. Je nach Versuch wurde dem Ansatz 10/100  $\mu\text{M}$  cAMP, 1  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  und/oder 2  $\mu\text{M}$  EGTA zugegeben. Aufgefüllt wurden die Ansätze mit  $\text{dH}_2\text{O}$ . Radiokative Phosphorylierungsassays wurden mit der Zugabe von 1  $\mu\text{Ci}$  radioaktivem  $^{32}\text{P}$  markierten ATP gestartet. Die Phosphorylierungsassays werden für 40 Min bei 30° C inkubiert. Nicht-radioaktive Assays wurden anschließend in 5x SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch Western Blots ausgewertet. Ansätze, in denen Parasitenlysate verwendet wurde, können durch Lysatbestandteilen verunreinigt sein, welche in der Auswertung von radioaktiven Phosphorylierungsassays ein unspezifisches Signal zeigen können. Bei radioaktiven Phosphorylierungsassays wird daher die Sepharose 3x mit eiskaltem  $\text{dH}_2\text{O}$  gewaschen, wobei sie nach jedem Waschschrift bei 2000g für 2 Min zentrifugiert wird. Wenn das Protein nicht mehr durch einen Thrombinverdau vom GST gelöst werden soll, kann der Ansatz in 5x SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein 15 %iges SDS-Gel geladen werden. Die Proteine werden bei 150V und 95 mA für 50 Min aufgetrennt und Coomassie-gefärbt. Durch das auflegen eines Röntgenfilms oder einer Fuji Phospho-Imager Detektionsplatte kann der Phosphorylierungsstatus einer Probe analysiert werden.

#### 3.2.5.7 Thrombinverdau von GST-Fusionsproteinen

Der pGEX 4T1 Vektor besitzt das Gen für eine Faktor Xa Schnittstelle, über die ein aufgereinigtes GST-Fusionsprotein durch die Trypsin-ähnliche Serin-Protease Thrombin von der GST Domäne abgeschnitten werden kann. Diese Methode wurde anhand der Herstellervorgaben durchgeführt. Dazu werden die Sepharose-gebundenen GST-Fusionsproteine mit der entsprechenden Menge 10x Thrombin-Puffer und 0.04 Units biotinyliertes Thrombin inkubiert. Der Ansatz wird für 2 bis 3 Std bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 3 Min bei 2000g zentrifugiert. Der Überstand wird in 5x SDS-Probenpuffer aufgenommen und kann auf ein SDS-Gel geladen und analysiert werden.

Zunächst sollte geklärt werden, ob neben S610 auch noch andere Serine phosphoryliert werden, ob diese gegebenenfalls funktionell sind und ob eine Phospho-

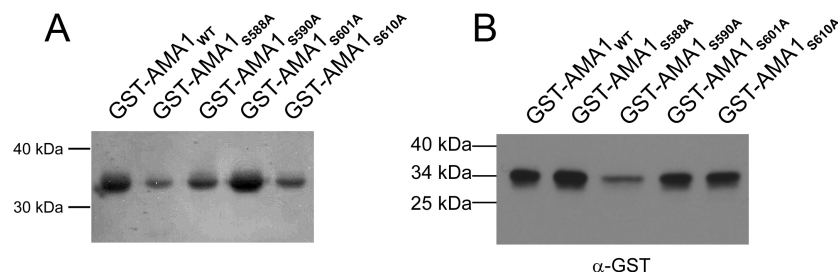
rylierung auch unabhängig von S610 stattfindet. Dazu wurden die Serine 588, 590 und 601 auf ihren Phosphorylierungsstatus hin und auf ihre Bedeutung für die Invasionsfähigkeit des Parasiten untersucht.

### 4.1.1 Funktionelle Untersuchung der *in vitro* Phosphorylierung von S588, S590 und S601

In proteomweiten, massenspektrometrischen Untersuchungen mit anschließender Analyse der Phosphorylierungsmotive wurde die Phosphorylierung der Reste S588, S590, S601, S610, T612 und T613 nachgewiesen (s. Einleitung). Um die Auswirkungen der Mutationen von S588, S590 und S601 auf den Phosphorylierungsstatus der CPD zu untersuchen, wurde die entsprechenden rekombinanten CPDs mit Parasitenlysate inkubiert.

### 4.1.2 Expression und Aufreinigung von AMA1-CPD Mutanten als GST Fusionsproteine

Zunächst wurden S588, S590 oder S601 in der CPD von AMA1 mit Alanin substituiert, um diese Mutanten als GST-Fusionsprotein in *E. coli* zu exprimieren und wie unter 3.2.5.1 beschrieben aufzureinigen. Alle chimären Proteine hatten

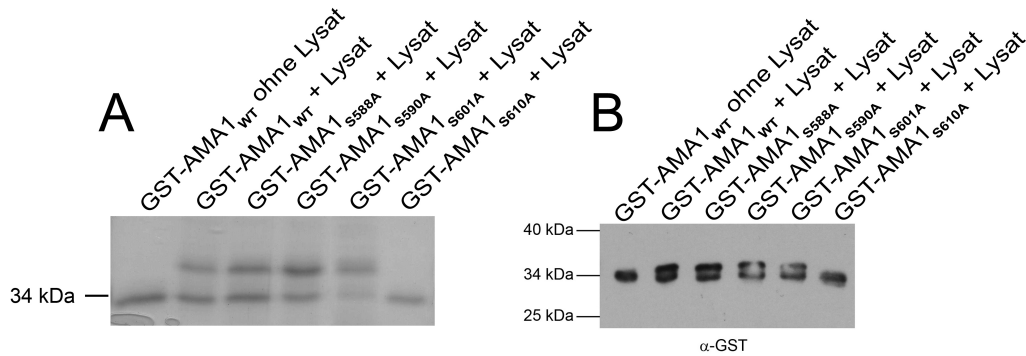


**Abb. 10: Expression von AMA1 GST-Fusionsproteinen.** **A:** Coomassie gefärbtes SDS-Page der aufgereinigten Proteine GST-AMA1<sub>WT</sub>, GST-AMA1<sub>S610A</sub>, GST-AMA1<sub>S588A</sub>, GST-AMA1<sub>S590A</sub> und GST-AMA1<sub>S601A</sub>. **B:** Western Blot der GST-Fusionsproteine mit Hilfe eines anti-GST Antikörpers. Die 33 kDa Protein-Bande im Coomassie und im Western Blot entspricht dem theoretischen MW von 32,9 kDa

erwartungsgemäß ein Molekulargewicht von 33 kDa und konnten in Western Blot-Analysen mittels GST-spezifischer Antikörper dargestellt werden (Abb.10).

### 4.1.3 Evaluation eines alternativen AMA1-spezifischen Phosphorylierungsassays

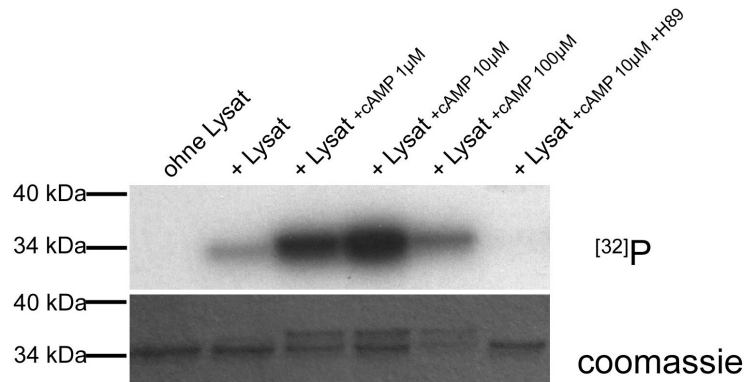
In einem initialen AMA1-Phosphataseassay konnten Treeck et al. (2009) zeigen, dass die De-phosphorylierung von AMA1 mittels Phosphatase ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE verursacht. Dieser Mobilitätsshift kann somit umgekehrt als Indikator für die Phosphorylierung von AMA1 verwendet werden (Abb.11). Nach der Inkubation mit Parasitenlysat sind in jedem Ansatz



**Abb. 11: *In vitro* Phosphorylierung führt zu einem veränderten Laufverhalten im SDS-Page.** Die aufgereinigten GST-Fusionsproteine (GST-AMA1<sub>WT</sub>, GST-AMA1<sub>S610A</sub>, GST-AMA1<sub>S588A</sub>, GST-AMA1<sub>S590A</sub> und GST-AMA1<sub>S601A</sub>) wurden für 60 min mit Parasitenlysat und 1  $\mu$ M cAMP inkubiert. Als Kontrolle wurde zusätzlich GST-AMA1<sub>WT</sub> im Ansatz ohne Lysat inkubiert. Sowohl im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE (A) als auch im Western blot (B) (mit Hilfe des anti-GST Antikörpers (1:3000)) ist das veränderte Laufverhalten darstellbar.

Protein-Doppelbanden zu erkennen, welche beide Phosphorylierungsformen der CPD repräsentieren. GST-AMA1<sub>S610A</sub> (Leykauf et al., 2010), sowie unbehandeltes GST-AMA1<sub>WT</sub> dienen dabei als Negativkontrolle.

Als Erweiterung des ursprünglichen Assays, wurden die Ergebnisse zusätzlich in einem radioaktiven Phosphorylierungsassay in Anwesenheit von [<sup>32</sup>P]-markiertem ATP überprüft (vergl.3.2.5.6). Wie Abb.12 zeigt, korreliert der Mobilitätsshift der CPD von AMA1 direkt mit dem Einbau von [<sup>32</sup>P]-markierten Phosphatgruppen. In Abb.12 wird außerdem deutlich, dass die Phosphorylierung von rekombinantem AMA1 zum einen von der cAMP-Konzentration abhängig und zum anderen durch den PKA-spezifischen Inhibitor H89 hemmbar ist. Dieses Ergebnis unterstreicht wiederum die herausragende Stellung der PKA bei der AMA1-Phosphorylierung (Leykauf et al., 2010).

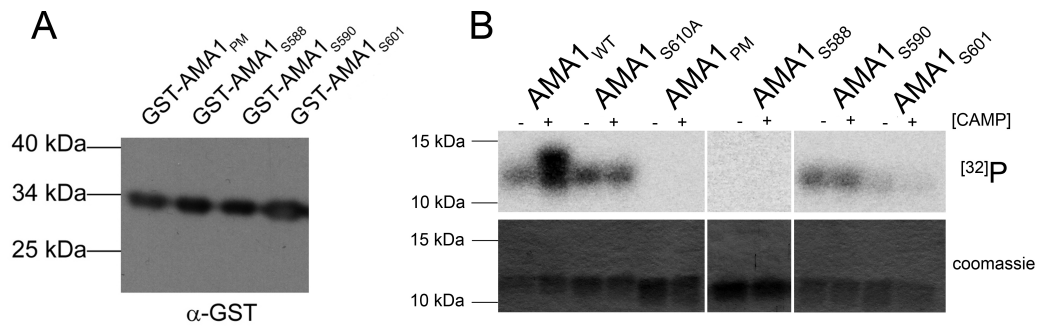


**Abb. 12: Radiaktiver Phosphorylierungsassay der CPD von AMA1<sub>WT</sub>GST.** Rekombinante Fusionsproteine wurden mit Parasitenlysat in Gegenwart von [<sup>32</sup>P]-markiertem ATP, sowie mit 1 μM, 10 μM und 100 μM cAMP inkubiert. Zusätzlich wurde die Reaktion in Anwesenheit von 50 μM H89, einem PKA spezifischen Inhibitor, durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde AMA1<sub>Full</sub>-GST ohne Lysat inkubiert. Rekombinante Proteine wurden mit Hilfe eines SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie sichtbar gemacht. Die kovalente Bindung von [<sup>32</sup>P]-markierten Phosphatgruppen wurde durch die Verwendung des Phosphoimager FLA7000 (Fuji) dargestellt.

#### 4.1.4 *In vitro* Phosphorylierung von S588, S590 und S601

Für weitergehende Untersuchungen der Phosphorylierung von S588, S590 und S601 wurden AMA1-Mutanten hergestellt, bei denen alle putativen Phosphorylierungsstellen der CPD gegen Alanin ausgetauscht wurden, mit Ausnahme der zu untersuchenden Serine. Die entsprechenden Mutanten wurden wiederum als GST-AMA1<sub>S588</sub>, GST-AMA1<sub>S590</sub> und GST-AMA1<sub>S601</sub> bezeichnet (Anhang: Abb.26). Nach der erfolgreichen Aufreinigung der GST-Fusionsproteine (Abb.13 A) wurde untersucht, ob die einzelnen Aminosäuren durch Parasitenlysat phosphoryliert werden.

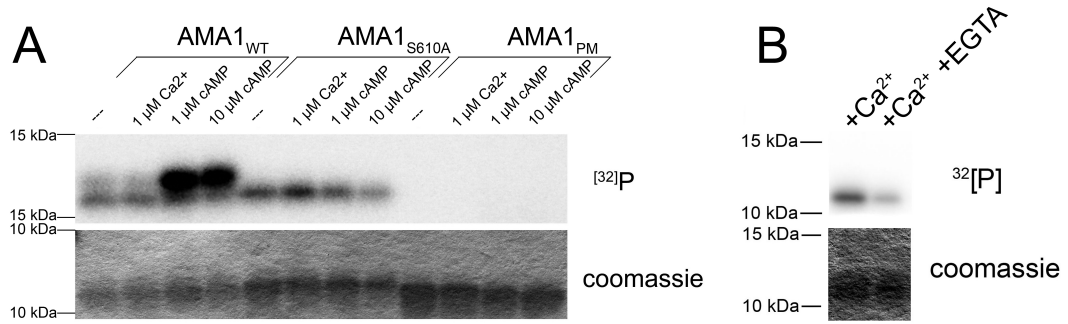
GST-AMA1<sub>PM</sub>, also die Mutante, bei denen allen Phosphorylierungsstellen mit Alanin substituiert wurden, diente als Negative- oder Spezifitätskontrolle, GST-AMA1<sub>WT</sub> als Positiv-Kontrolle (Abb.13 B). Die GST-Domänen der GST-Fusionsproteine wurden durch einen Thrombin-Verdau entfernt (Vergl.3.2.5.6), um einen Einfluss des Epitops bei der kovalenten Bindung von radioaktiven Phosphatgruppen auszuschließen. Wie in Abb.13 B gezeigt wird weder AMA1<sub>S588</sub> noch AMA1<sub>PM</sub> phosphoryliert. Dagegen werden sowohl AMA1<sub>S590</sub> als auch AMA1<sub>S601</sub> cAMP unabhängig phosphoryliert.



**Abb. 13: Expression und Phosphorylierung von AMA1 GST-Fusionsproteinen.**  
**A:** Western Blot mit Hilfe eines anti-GST Antikörpers der aufgereinigten Proteine GST-AMA1<sub>PM</sub>, GST-AMA1<sub>S588</sub>, GST-AMA1<sub>S590</sub> und GST-AMA1<sub>S601</sub>. Die 33 kDa Protein-Bande im Western Blot entspricht dem theoretischen MW von 32,9 kDa. **B:** Radiotiver Phosphorylierungsassay von AMA1<sub>S588</sub>, AMA1<sub>S590</sub> und AMA1<sub>S601</sub>. AMA1<sub>PM</sub> und AMA1<sub>WT</sub> stellen positive und negative Kontrollen da. Rekombinante Proteine wurden mit Parasitenlysate und [<sup>32</sup>P]-markiertem ATP, sowie in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von 10 µM cAMP inkubiert. Anschließend wurde die GST Domäne durch einen Thrombin-Verdau abgespalten. Rekombinante Proteine wurden mit Hilfe eines SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie sichtbar gemacht. Die kovalente Bindung von [<sup>32</sup>P]-markierten Phosphatgruppen wurde durch die Verwendung des Phosphorimager FLA7000 (Fuji) dargestellt.

#### 4.1.5 S590 wird abhängig von Kalzium jedoch unabhängig von S610 phosphoryliert

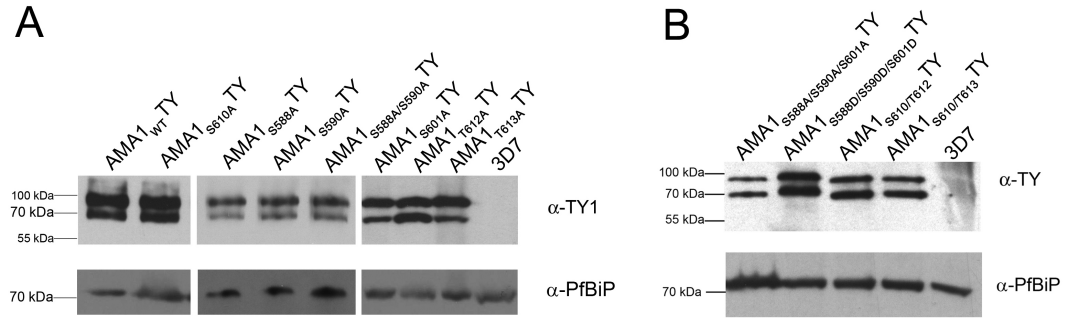
Im Gegensatz zu den von Leykauf et al. (2010) dargestellten Ergebnissen konnte eine S590 Phosphorylierung unabhängig von der S610-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Das und die cAMP-unabhängige *in vitro*-Phosphorylierung von AMA1<sub>S590</sub> weisen auf die Beteiligung einer weiteren Kinase hin. Für weitere Untersuchungen wurde zunächst die eigentliche Negativkontrolle GST-AMA1<sub>S610A</sub> in einem radioaktiven Phosphorylierungsassay untersucht (Abb.14 A). Es konnte gezeigt werden, dass AMA1<sub>S610A</sub> genau wie AMA1<sub>S590</sub> von Parasitenlysate cAMP-unabhängig phosphoryliert wird. Leykauf et al. (2010) konnten zeigen, dass die Zugabe von 1 µM Ca<sup>2+</sup> zu Parasitenlysate die Phosphorylierung von AMA1<sub>WT</sub> stimuliert. Phosphorylierungsversuche mit AMA1<sub>S590</sub> in Anwesenheit von entweder Ca<sup>2+</sup> oder dem Chelat-Bildner EGTA zeigten, dass die Phosphorylierung von AMA1<sub>S590</sub> Ca<sup>2+</sup>-abhängig ist und diese durch die Anwesenheit von EGTA (2 µM) inhibiert werden kann (Abb.14 B).



**Abb. 14: Radiotiver Phosphorylierungsassay von AMA1<sub>S610A</sub> und AMA1<sub>S590</sub>.**  
**A:** AMA1<sub>PM</sub> und AMA1<sub>WT</sub> stellen positive und negative Kontrollen da. Rekombinante Proteine wurden mit Parasitenlysat und [<sup>32</sup>P]-markiertem ATP, sowie in Anwesenheit (---) oder Abwesenheit von 1 μM Ca<sup>2+</sup>, 1 μM cAMP oder 10 μM cAMP inkubiert. **B:** Rekombinantes AMA1<sub>S590</sub> wurde mit Parasitenlysat und [<sup>32</sup>P]-markiertem ATP inkubiert und mit 1 μM Ca<sup>2+</sup> stimuliert. Zur Inhibierung wurde 2 μM des Ca<sup>2+</sup>-spezifische Chelat-Bildner EGTA eingesetzt. Anschließend wurde die GST Domäne durch einen Thrombin-Verdau abgespalten. Rekombinante Proteine wurden mit Hilfe eines SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie sichtbar gemacht. Die kovalente Bindung von [<sup>32</sup>P]-markierten Phosphatgruppen wurde durch die Verwendung des Phosphoimager FLA7000 (Fuji) dargestellt.

#### 4.1.6 Phänotypisierung der Mutanten S588A, S590A und S601A *in vivo*

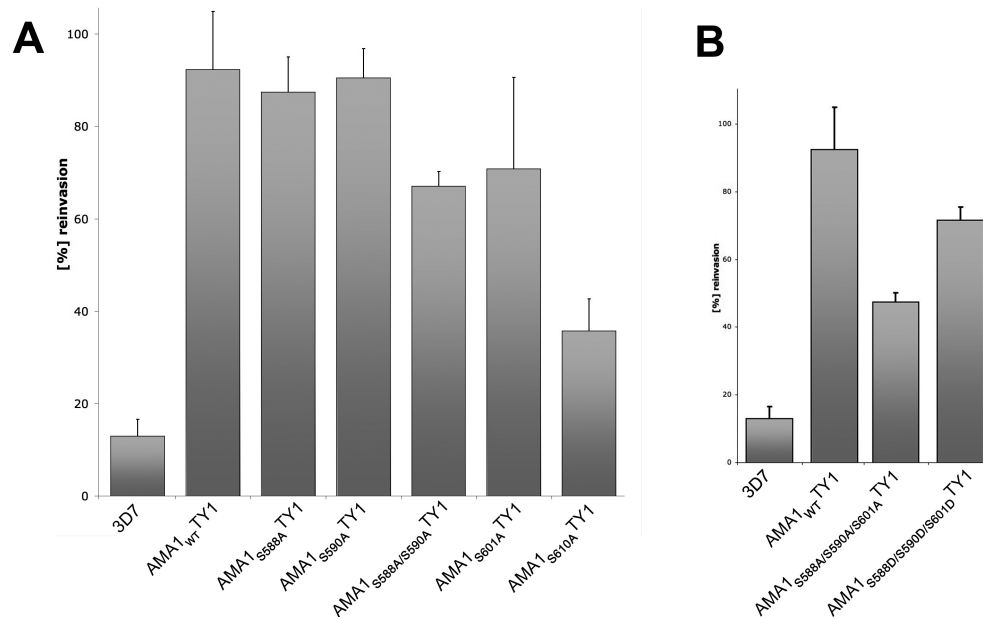
Die Auswirkung der Mutationen S588A, S590A und S601A auf die Invasionsfähigkeit des Merozoiten sollte *in vivo* untersucht werden. AMA1 ist für *P. falciparum* essentiell. Zur funktionellen Analyse dieses Proteins wurde deshalb ein Komplementationsassay entwickelt (Treeck et al., 2009), welcher auf der Inhibition des endogenen AMA1 Proteins und auf einer episomalen Überexpression einer AMA1 Variante beruht (3.2.2.8). Dazu wurden die entsprechenden Serine in der CPD von AMA1 mittels PCR-Mutagenese (3.2.4.4) mit Alanin (A) und gegen negative geladene Asparaginsäure (D) ausgetauscht (Abb.27). Alle Mutanten basieren auf der W2mef-Sequenz, wodurch die funktionelle Analyse von AMA1 in 3D7 ermöglicht wird (siehe oben). Die Konstrukte wurden in den pARL1*ama1*-TY1 Vektor kloniert (Treeck et al., 2009) und in 3D7 Parasiten transfiziert (3.2.2.5). Dieser Vektor ermöglicht die Expression Epitop-fusionierter Gene unter der Kontrolle des *ama1* Promotors im späten Schizontenstadium. Die Expression aller Mutanten wurde im Western Blot mit Hilfe von anti-TY1 Antikörpern nachgewiesen. AMA1 stellt sich im Western Blot in zwei Varianten dar: Als 85 kDa Protein (AMA1: 83 kDa + TY1: 2 kDa) und als



**Abb. 15: Expression von AMA1-TY1 Varianten in *P. falciparum*.** Proteine wurden im Western Blot mit Hilfe von einem anti-TY1 Antikörper (1:2000) und einem sekundären, HRP-gekoppelten anti-Maus IgG Antikörper (1:2500) dargestellt. 3D7 Wildtyp-Parasiten wurden als Kontrolle eingesetzt. Die obere Bande (etwa 85 kDa) entspricht dem nicht prozessierten, die untere Bande (etwa 68 kDa) dem prozessierten AMA1 +TY1. Anti-PfBiP wurde als Ladekontrolle verwendet.

68 kDa prozessiertes Protein (AMA1: 66 kDa + TY1: 2 kDa) (Abb.15). Durch N-terminale Prozessierung wird die etwa 15 kDa große Prodomäne abgespalten (Howell et al., 2001; Narum & Thomas, 1994). PfBiP (HSP70), ein luminales Protein des ERs mit einer Größe von etwa 75 kDa wurde als Ladekontrolle verwendet.

Zur funktionellen Untersuchung dieser Mutanten wurden Invasions-Inhibitions assays in Anwesenheit des R1 Peptids (Vergl.3.2.2.8) durchgeführt. Dieses ermöglicht eine direkte Quantifizierung der Komplementationfähigkeit der einzelnen AMA1-Mutanten. Im Gegensatz zu der bereits veröffentlichten S610A Mutation, die zu einer über 80 %-verringerten Invasionsfähigkeit der Merozoiten führt (Leykauf et al., 2010), zeigten die Mutanten AMA1<sub>S588A</sub>TY1 und AMA1<sub>S590A</sub>TY1 keine signifikant (und AMA1<sub>S601A</sub>TY1 nur eine um 20 %) verringerte Invasion. Die Doppelmutante AMA1<sub>S588A/S590A</sub>TY1 und die Tripelmutante AMA1<sub>S588A/S590A/S601A</sub>TY1 wiesen jedoch eine um 20 %-, beziehungsweise um 40 %-verringerte Invasionsfähigkeit auf. Der Austausch der Serine mit Aspartaten (AMA1<sub>S588D/S590D/S601D</sub>TY1) führte zu einer fast vollständigen Rekonstitution der Komplementationfähigkeit von AMA1 (Abb.16).



**Abb. 16: Invasions-Komplemetationsassay der Mutanten von S588, S590 und S601.** In **A** für AMA1<sub>S588A</sub>-TY1, AMA1<sub>S590A</sub>-TY1, AMA1<sub>S601A</sub>-TY1, AMA1<sub>S610A</sub>-TY1, sowie für die Doppelmutante AMA1<sub>S588A/S590A</sub>-TY1. Für die Inhibierung von 3D7-AMA1 wurden 100mg/ml R1 Peptid eingesetzt. Parentale 3D7 dienen als R1 Inhibitionskontrolle und AMA1<sub>Full</sub>-TY1 als Komplementationskontrolle. **B** zeigt die Komplementationsassays der Konstrukte AMA1<sub>S588A/S590A/S601A</sub>-TY1 und AMA1<sub>S588D/S590D/S601D</sub>-TY1. Die Versuche wurden jeweils in Triplets in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dargestellt ist der Durchschnittswert mit der Standardabweichung.

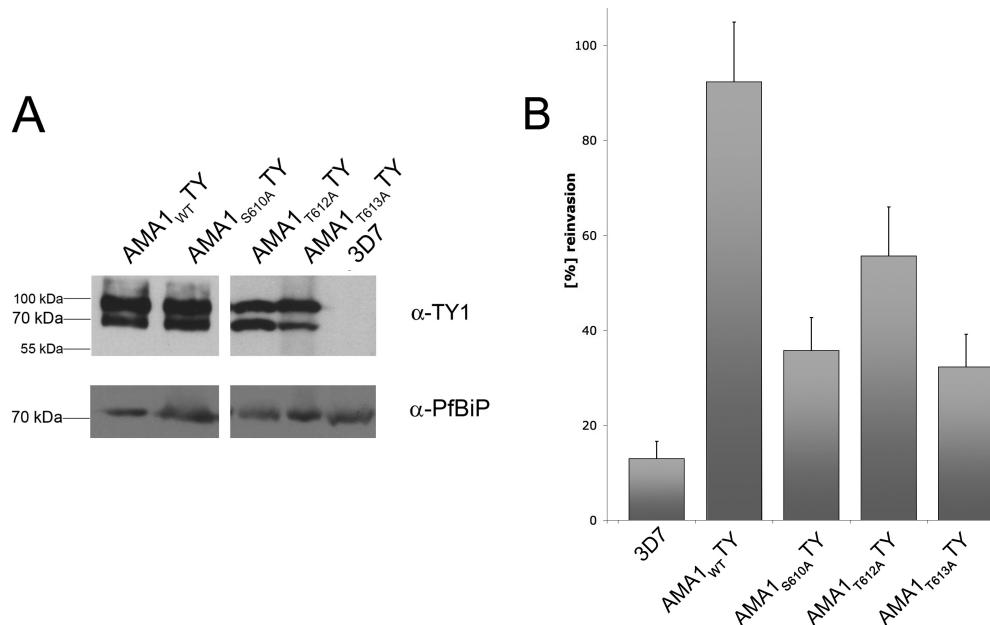
## 4.2 Untersuchung von T612 und T613

Auch die beiden Threonine in der CPD von AMA1 an den Positionen 612 und 613 wurden in massenspektrometrischen Untersuchungen als Phosphoakzeptorstellen ermittelt (Treeck et al. (2011); Gilson&Crabb nicht veröffentlicht).

### 4.2.1 Phänotypisierung der Mutanten T612A und T613A *in vivo*

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Threonine T612 und T613 für die Invasionsfähigkeit des Parasiten von Bedeutung sind. Die entsprechenden Mutationskonstrukte AMA1<sub>T612</sub> und AMA1<sub>T613</sub> wurden in den Transfektionsvektor pARL-TY1 kloniert und in 3D7 Parasiten transfiziert. Die Expression der Transgene wurde mittels Western Blot-Analysen verifiziert (Abb.17A) und ihre Komplemetationseffizienz in Invasionsassays untersucht. Beide Substitutionen

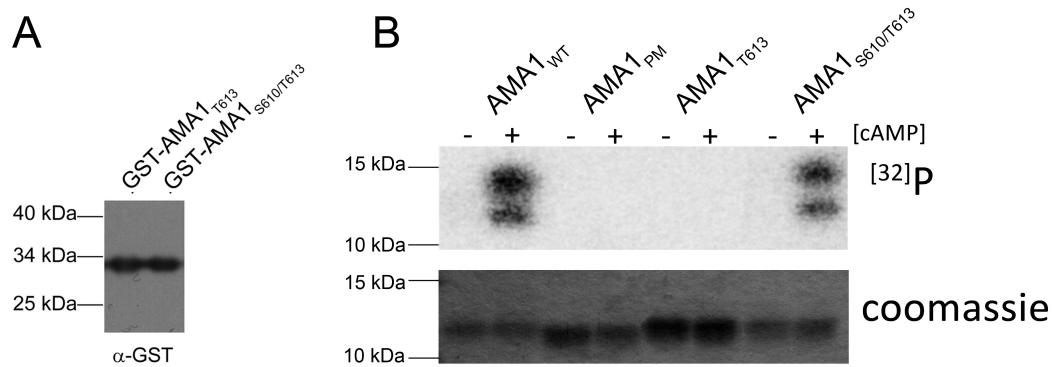
(T612A und T613A) zeigten im Vergleich zu AMA1<sub>WT</sub>TY1 eine 40 %ige respektive ein 70 %ige Reduktion in ihrer Komplementationsfähigkeit und haben somit eine funktionell signifikante Auswirkungen auf die Invasionsfähigkeit der Parasiten (Abb.17B).



**Abb. 17: „Loss of Function“ Mutanten AMA1<sub>T612A</sub> und AMA1<sub>T613A</sub>.** **A.** Expression von AMA1 T612 und T613 Varianten in *P. falciparum*. 3D7 Wildtyp-Parasiten wurden als Kontrolle eingesetzt. Die obere Bande (etwa 85 kDa) entspricht dem nicht prozessierten, die untere Bande (etwa 68 kDa) dem prozessierten AMA1 + TY1 Epitop. Anti-PfBiP wurde als Ladekontrolle verwendet **B.** Komplementationsassay für AMA1<sub>T612A</sub> TY1 und AMA1<sub>T613A</sub> TY1. Für die Inhibierung von 3D7-AMA1 wurde 100mg/ml R1 Peptid eingesetzt. Parentale 3D7 sowie AMA1<sub>S610A</sub> TY1 dienen als R1 Inhibitionskontrolle und AMA1<sub>Full</sub>-TY1 als Komplementationskontrolle. Die Versuche wurden jeweils in Triplets und in 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dargestellt ist der Durchschnittswert mit der Standardabweichung.

### 4.2.2 Die Phosphorylierung von T613

Die Mutation von T613 zu Alanin führt zu einer starken Beeinträchtigung der Invasionsfähigkeit des Parasiten, was phänotypisch vergleichbar mit S610A ist. Aufgrund der Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen liegt es nahe, dass T613 ebenso wie S610 phosphoryliert wird. Um dies genauer zu untersuchen wurden die rekombinanten GST Fusionsproteine GST-AMA1<sub>T613</sub> und GST-AMA1<sub>S610/T613</sub> hergestellt. Die rekombinanten AMA1 Varianten wurden in einem radioaktiven Phosphorylierungsassay eingesetzt. AMA1<sub>S610/T613</sub> konnte



**Abb. 18: Expression und Phosphorylierung von GST-AMA1<sub>T613</sub>-Fusionsproteinen.** **A:** Western Blot der aufgereinigten Proteine GST-AMA1<sub>T613</sub> und GST-AMA1<sub>S610/T613</sub> mit Hilfe eines anti-GST Antikörpers. Die 33 kDa Protein-Bande im Coomassie und im Western Blot entspricht dem theoretischen MW von 32,9 kDa. **B:** Die rekombinanten AMA1<sub>T613</sub> und AMA1<sub>S610/T613</sub> wurden mit Parasitenlysatz und [<sup>32</sup>P]-markiertem ATP und in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von cAMP inkubiert. Anschließend wurde die GST Domäne durch einen Thrombin-Verdau abgespalten. Rekombinante Proteine wurden mit Hilfe eines SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie sichtbar gemacht. Die kovalente Bindung von [<sup>32</sup>P]-markierten Phosphatgruppen wurde durch die Verwendung des Phosphorimager FLA7000 (Fuji) dargestellt.

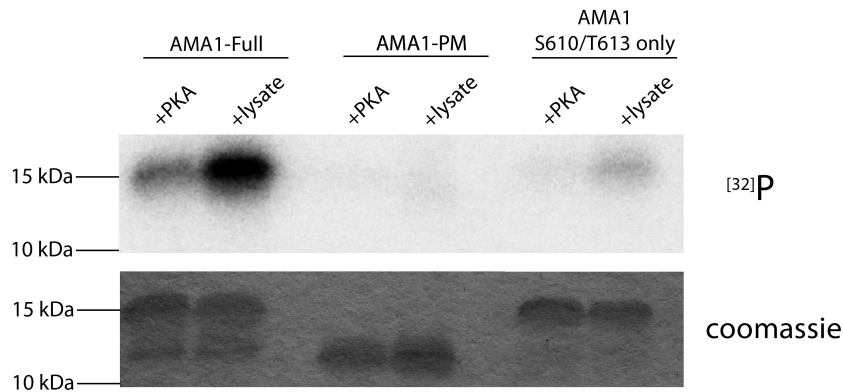
durch Parasitenlysatz phosphoryliert werden, wohingegen AMA1<sub>T613</sub> keine Phosphorylierung durch Parasitenlysatz zeigte (Abb.18, B).

### 4.2.3 T613 Phosphorylierung in Abhängigkeit der S610 Phosphorylierung

Die Aminosäure-Substitutionen S610A und T613A führen beide zu einem Funktionsverlust von AMA1, wobei GST-AMA1<sub>S610</sub> *in vitro* phosphoryliert wird, GST-AMA1<sub>T613</sub> jedoch nicht. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass T613 erst nach der initialen Serin 610-Phosphorylierung als Phosphoakzeptor zur Verfügung steht. Um dieses putative S610/PKA-abhängige „phospho-priming“ zu untersuchen, wurde GST-AMA1<sub>S610/T613</sub> mit rekombinanter Maus PKA *in vitro* vorphosphoryliert. Nachdem ein weiterer Inkubationsschritt mit PKA keine weitere Phosphorylierung mehr zeigte, konnte davon ausgegangen werden, dass S610 vollständig phosphoryliert vorlag.

Das PKA-vorphosphorylierte GST-AMA1<sub>S610/T613</sub> wurde dann mit Parasitenlysatz inkubiert und die dadurch bewirkte Phosphorylierung von GST-AMA1<sub>S610/T613</sub>, die nun S610/PKA-unabhängig sein sollte, im radioaktiven Assay dargestellt.

PKA-phosphoryliertes GST-AMA1<sub>S610/T613</sub> wird durch Parasitenlysat weiter phos-



**Abb. 19: Die S610 Phosphorylierung ist ein „Priming“-Schritt für die T613 Phosphorylierung.** Aufgereinigte AMA1-GST-Fusionsproteine wurden mit PKA inkubiert. Anschließend wurden die Proteine entweder mit Parasitenlysat oder PKA und  $[^{32}\text{P}]$ -markierten ATP inkubiert. AMA1<sub>WT</sub> und AMA1<sub>PM</sub> dienten als Positiv- und Negativkontrolle. Anschließend wurde die GST Domäne durch einen Thrombin-Verdau abgespalten. Rekombinante Proteine wurden mit Hilfe eines SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie sichtbar gemacht. Die kovalente Bindung von  $[^{32}\text{P}]$ -markierten Phosphatgruppen wurde durch die Verwendung des Phosphorimager FLA7000 (Fuji) dargestellt.

phoryliert, was darauf hindeutet, dass die Phosphorylierung von S610 die Voraussetzung für eine T613-Phosphorylierung ist.

### 4.3 T613-Phosphorylierung und die Glykogen Synthase Kinase 3

Die Sequenz der CPD von AMA1 wurde auf Erkennungssequenzen putativer Kinasen hin untersucht. NetphosK ([http:// www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/)) ist ein Programm, das die Wahrscheinlichkeit von Phosphorylierungsstellen in einer Aminosäuresequenz ermittelt, sowie putative Kinasen vorhersagt. Für T613 in der AMA Sequenz werden zwei Kinasen mit einem Wahrscheinlichkeits-score von 0,5 und 0,54 angegeben: p38MAPK und die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3). Als verantwortliche Kinase für eine mögliche T612 Phosphorylierung wird die Protein Kinase C (PKC) genannt (Abb.20), welche jedoch bisher nicht im Plasmodien-Kinom nachgewiesen werden konnte (Ward et al., 2004). Die p38 „Mitogen-Activated Protein Kinase“ (p38MAPK) ist an Signalwegen beteiligt, welche die Weiterleitung von apoptotischen Signalen in malignen Zellen vermitteln. Ein Homolog dieser Kinase ist im Genom von *P. falciparum* bisher nicht



**Abb. 20: NetPhos-Vorhersage putativer Phosphorylierungsstellen und verantwortlicher Enzyme.** Die Aminosäuresequenz der CPD von AMA1 wurde durch die Internetplattform „NetPhosK“ ([http:// www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/)) auf putative Phosphorylierungsstellen und dafür verantwortlichen Kinasen untersucht.

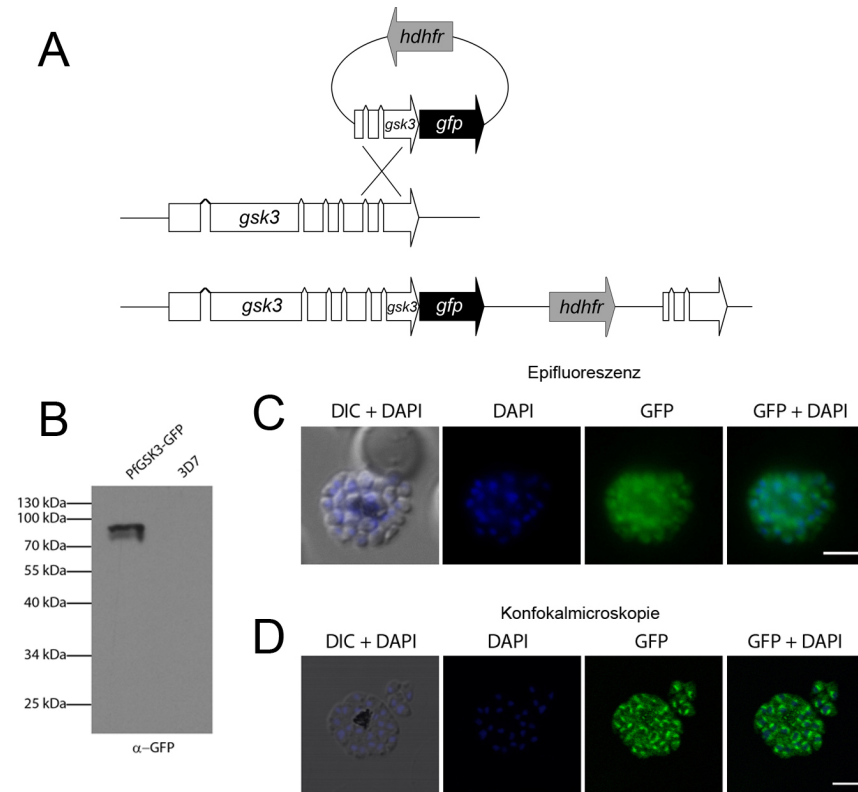
identifiziert wurden (Dorin-Semblat et al., 2007; Ward et al., 2004), so dass sich GSK3 als viel versprechender Kandidat für die T613 Phosphorylierung darstellt.

### 4.3.1 Expression und Lokalisation von GSK3 in *P. falciparum* Blutstadien

Die GSK3 liegt in humanen Zellen zytosolisch vor. Zur Lokalisation von PfGSK3 im Parasiten wurde das endogene Protein mit GFP fusioniert. Dies wurde durch homologe Rekombination im 3'-Bereich des *gsk3*-Gens erreicht. Das transfizierte Plasmid (pARL-3'-*gsk3*-GFP) enthält 854 Basenpaare des 3'-Endes des *gsk3*-Gens, sowie *gfp*. Dieser offene Leserahmen des Plasmids wird nicht durch einen Promotor reguliert und besitzt auch kein Start-Kodon (Abb.21 A). Die Integration des Plasmids und die Expression von PfGSK3-GFP wurden mit Hilfe von Western Blot-Analysen bestätigt (Abb.21 B). PfGSK3-GFP stellt sich, wie sein humanes Homolog, in Epifluoreszenz- (Abb.21 C) und Konfokalaufnahmen (Abb.21 D) zytosolisch dar.

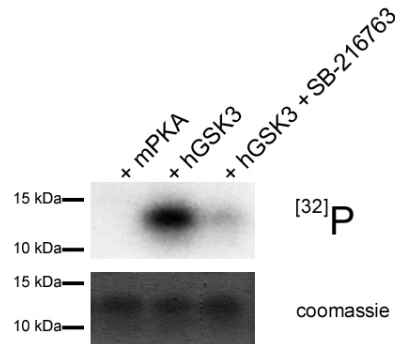
### 4.3.2 *In vitro* Phosphorylierung von AMA1 durch GSK3

Die GSK3-abhängige Phosphorylierung von AMA1 wurde zunächst mit rekombinanter, humaner GSK3 getestet. Die Inkubation von GSK3 mit der CPD von AMA1<sub>WT</sub> führt zu einer Phosphorylierung des Proteins, wobei AMA1<sub>PM</sub> als Negativkontrolle nicht phosphoryliert wird (Abb.22 A). Ebenso phosphoryliert die GSK3 AMA1<sub>T613</sub>, jedoch weder AMA1<sub>S588</sub> (Abb.22 B), noch AMA1<sub>T612</sub> (Abb.22 C), wobei ersteres auch nicht von Parasitenlysate phosphoryliert wurde (vergl.



**Abb. 21: Schematischen Darstellung des 3'-Replacement von *gsk3*, Integration, Expression und Lokalisation.** **A:** Das *P. falciparum gsk3*-Gen (PF3D7\_0312400) umfasst 2324 Basenpaare mit sechs Introns. Etwa 850 Basenpaare des 3'-Endes des *gsk3*-Gens wurden mit der kodierenden Sequenz von GFP fusioniert (schwarzer Pfeil) und in den pARL1(a)-Vektor kloniert. Durch die humane Dihydrofolatreduktase (hDHFR grauer Pfeil) kann die Kultur auf die Parasiten selektiert werden, welche das Plasmid aufgenommen haben. **B:** Die Expression des GFP-Fusionsproteins wurde im Western Blot mit einem anti-GFP Antikörper nachgewiesen. Die Bande bei etwa 85 kDa entspricht der errechneten Größe des GFP-Fusionsproteins (ca.80 kDa). Zelluläre Lokalisation von GSK3-GFP in **C:** Epifluoreszenz und **D:** konfokaler Fluoreszenz. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Balken: 2  $\mu$ m

Abb.13 B). Auch die CPDs von MTRAP, Eba-175 und Rh1<sup>1</sup> konnten nicht durch GSK3 phosphoryliert werden, jedoch Eba-175 und Rh1 durch Parasitenlysate. Da hGSK3 durch den hGSK3-spezifischen Inhibitor SB-216763 (Coghlan et al., 2000) gehemmt wird, wurde dieser in nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt.

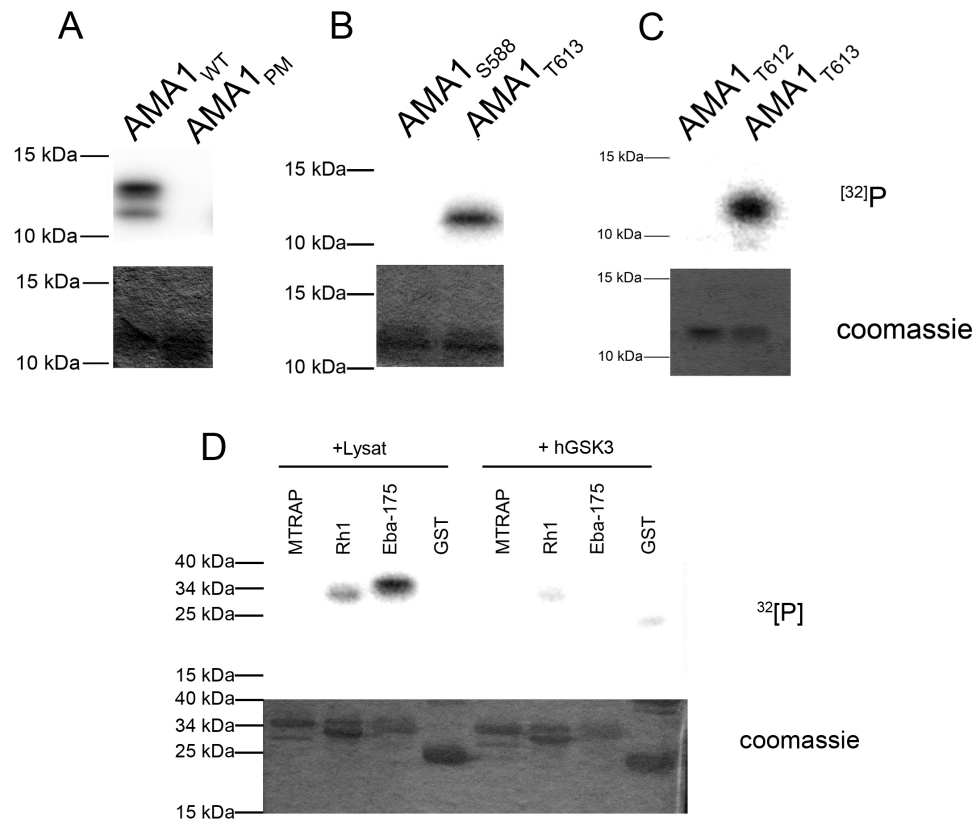


**Abb. 23: Inhibition der hGSK3-Phosphorylierung von AMA1<sub>S610/T613</sub>.** SB-216763 inhibiert die Phosphorylierung von PKA-vorphosphoryliertem AMA1<sub>S610/T613</sub>. PKA vorphosphoryliertes AMA1<sub>S610/T613</sub> wurde mit 1 U mPKA oder 0,5 U hGSK3 und in An- oder Abwesenheit von 100 nM SB-216763 mit [<sup>32</sup>]P-markiertem ATP inkubiert. Anschließend wurden die GST-Domänen durch einen Thrombin-Verdau entfernt. Rekombinante Proteine wurden mit Hilfe eines SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie sichtbar gemacht. Die kovalente Bindung von [<sup>32</sup>]P-markierten Phosphatgruppen wurde durch die Verwendung des Phosphorimager FLA7000 (Fuji) dargestellt.

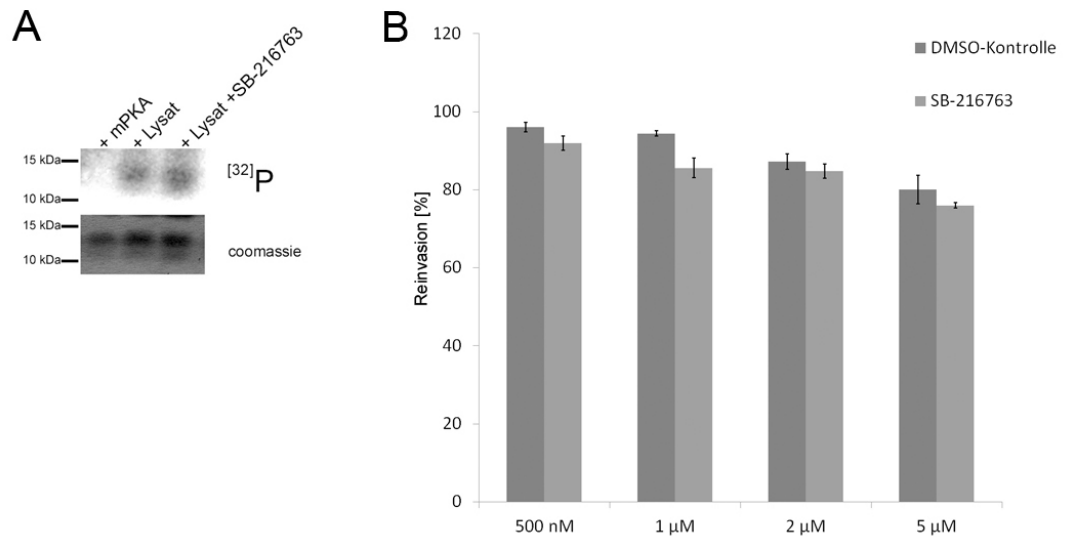
Wie die Abb.23 zeigt, wird PKA-vorphosphoryliertes AMA<sub>S610/T613</sub> durch GSK3, jedoch nicht durch eine erneute PKA-Inkubation phosphoryliert. Die GSK3-Phosphorylierung kann wiederum durch den Inhibitor SB-216763 gehemmt werden. Die inhibitorische Wirkung von 100 nM SB-216763 kann jedoch nicht bei der Verwendung von Parasitenlysate erzielt werden. In diesem Versuch wurde PKA-vorphosphoryliertes AMA<sub>S610/T613</sub> auch in Anwesenheit des Inhibitors phosphoryliert (Abb.24 B). Ebenso zeigte der Inhibitor keine Auswirkungen auf eine *in vivo*-Parasitenkultur (Abb.24 A).

---

1 zur Verfügung gestellt von K. Engelberg



**Abb. 22: hGSK3 Phosphorylierung von AMA1.** Phosphorylierung mit hGSK3 in Anwesenheit von <sup>32</sup>P markiertem ATP von **A:** AMA1<sub>WT</sub> und AMA1<sub>PM</sub>, **B:** AMA1<sub>S588</sub> und AMA1<sub>T613</sub>, sowie **C:** AMA1<sub>T612</sub> und AMA1<sub>T613</sub>. AMA1<sub>PM</sub> diene als Negativkontrolle. Anschließend wurden die GST-Domänen durch einen Thrombin-Verdau entfernt. **D:** Die rekombinant an GST fusionierten CPDs von MTRAP, Eba-175 und Rh1 wurden entweder mit Parasitenlysat, oder mit hGSK3 in Anwesenheit von <sup>32</sup>P markiertem ATP inkubiert. GST diene als Negativkontrolle. Rekombinante Proteine wurden mit Hilfe eines SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie sichtbar gemacht. Die kovalente Bindung von <sup>32</sup>P-markierten Phosphatgruppen wurde durch die Verwendung des Phosphoimager FLA7000 (Fuji) dargestellt.



**Abb. 24: Auswirkungen von SB-216763 auf die *in vitro*-Phosphorylierung und auf *P. falciparum* *in vivo*.** **A.** PKA-vorphosphoryliertes AMA1<sub>S610/T613</sub> wurde mit 1 U mPKA oder Parasitenlysat und in An- oder Abwesenheit von 100 nM SB-216763 mit [<sup>32</sup>P]-markiertem ATP inkubiert. Anschließend wurden die GST-Domänen durch einen Thrombin-Verdau entfernt. Rekombinante Proteine wurden mit Hilfe eines SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie sichtbar gemacht. Die kovalente Bindung von [<sup>32</sup>P]-markierten Phosphatgruppen wurde durch die Verwendung des Phosphoimager FLA7000 (Fuji) dargestellt. **B.** Proliferationsassay von *P. falciparum*. Synchronisierte Trophozoitenkulturen wurden für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen SB-216763 inkubiert. DMSO wurde als Kontrolle verwendet. Angegeben wurde die Reinvasion prozentual zur unbehandelten Kontrolle. Die Parasitämie wurde per FACS bestimmt und die Versuche in Triplets durchgeführt.

## 5 Diskussion

Durch die einzigartige und präzise aufeinander abgestimmte Invasionsmaschine ist *P. falciparum* in der Lage, Erythrozyten in 30 Sekunden zu invadieren (Treeck et al., 2009; Gilson & Crabb, 2009). Zwei wichtige Proteingruppen, die diesen Prozess ermöglichen sind die Adhäsine und die Invasine. Das bedeutendste Invasin ist AMA1 (Zuccala et al., 2012). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von AMA1 beginnt mit der cAMP-abhängigen Phosphorylierung von S610 durch die PKA. Welches Signal die cAMP Synthese durch Adenylat Zyklasen (AC) und somit die Phosphorylierung von AMA1 aktiviert, ist noch nicht eindeutig geklärt (Cowman et al., 2012). ACs werden über die Phospholipase C und den „second Messenger“ Kalzium aktiviert (siehe unten). Die grundlegenden Mechanismen und insbesondere die Rolle von Kalzium bei der Sekretion der apikalen Organellen wurde vor allem bei *T. gondii* intensiv erforscht (Moreno et al., 2011; Lourido et al., 2012). So zeigten Lovett & Sibley (2003) dass *T. gondii*-Tachyzoiten während des „glidings“ ein hohes Level an zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  aufweisen, das wieder sinkt, wenn der Parasit sich an die Wirtszelle heftet. Ein künstlich induzierter Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels führte zur Translokation des Mikronemenproteins „MIC2“ an die Oberfläche von Tachyzoiten (Carruthers & Sibley, 1999). Es stellte sich heraus, dass dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg im Zusammenhang mit einem Anstieg von zytosolischem Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) steht, das durch die Phospholipase C (PLC) synthetisiert wird (Lovett et al., 2002).  $\text{IP}_3$  bindet an  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren am ER, dem Hauptspeicher für intrazelluläres Kalzium, wodurch dieses freigesetzt wird (Moreno et al., 2011). Die Präsenz von  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren bei *T. gondii* wird zwar vermutet, konnte jedoch bisher noch nicht experimentell nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die

PLC bei freien Tachyzoiten durch niedrige Kalium-Konzentrationen aktiviert werden kann (Moudy et al., 2001), was jedoch vor kurzem in Frage gestellt wurde (Pillai et al., 2013). Die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  als essentieller „second messenger“ für die Ausschüttung der apikalen Organellen und für die erfolgreiche Invasion ist hingegen unstrittig. So konnten Untersuchungen bei *P. falciparum* zeigen, dass  $\text{Ca}^{2+}$  wie bei *T. gondii* eine entscheidende Rolle bei der Ausschüttung der apikalen Organellen und bei der Invasion spielt (Singh et al., 2010; Holder et al., 2012). Auch beim Malariaparasiten spaltet die PLC Phosphatidylinositol-4,5-bis-Phosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu Diazylglyzerol und Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ). Durch den resultierenden,  $\text{IP}_3$ -vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER werden unter anderem die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteinkinase 1 (CDPK1) (Green et al., 2008) und die CDPK5 (Dvorin et al., 2010) aktiviert. CDPK1 phosphoryliert das „myosin tail domain interacting protein“ MTIP und das „glidosome associated protein“ GAP45 (Green et al., 2008). Beide sind wichtige Bestandteile des Motorkomplexes, des essentiell für die Invasion des Parasiten in die Wirtszelle ist (Baum et al., 2006). Durch den Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  wird das Mikronemenprotein EBA-175 auf die Oberfläche des Merozoiten sekretiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von EBA-175 an Glykophorin A (GPA) die Rückführung von  $\text{Ca}^{2+}$  in das ER Lumen reguliert. Dies stimuliert über einen noch unbekannten Signalweg die Ausschüttung der Rhoptrien (Singh et al., 2010).

Die wichtige Rolle der PKA-vermittelten Phosphorylierung der CPD von AMA1 für die Invasion wurde bereits in der Einleitung genauer beschrieben. Die Aktivierung der PKA durch cAMP steht mit dem zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in freien Merozoiten in Verbindung. Die PKA, eine Serin/Threonin-Kinase, besteht in der Regel aus zwei regulatorischen beta- und zwei katalytischen alpha-Untereinheiten, im Falle von *P. falciparum* jedoch scheinbar nur aus jeweils einer Untereinheit (Haste et al., 2012). Sie liegt in Abwesenheit von cAMP als Heteromer vor. Die PKAr hat eine hohe Affinität zu 3'-5'-zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Zwei cAMP Moleküle binden an eine Untereinheit, wodurch die PKAc dissoziiert und aktiv vorliegt. cAMP wird durch Adenylat-Zyklasen (ACs) aus ATP synthetisiert. Das Genom von *P. falciparum* kodiert für 2 ACs, PfAC $\alpha$  und PfAC $\beta$ . Die Expression der PfAC $\alpha$  ist im asexuellen Stadium sehr niedrig und es wird vermutet, dass sie eine Funktion in der Gametogenese

hat (Read & Mikkelsen, 1991). Die PfAC $\beta$  wiederum zeigt ein Expressionsmaximum im späten Schizontenstadium (Le Roch et al., 2003), weswegen sie mit hoher Wahrscheinlichkeit für die cAMP-Synthese bei der PKA-Aktivierung während der Invasion verantwortlich ist. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Lasonder et al. (2012) untersuchte das Phosphoproteom von *P. falciparum*. 425 Proteine weisen demnach ein PKA-Phosphorylierungsmotif auf (Lasonder et al., 2012), wobei neben AMA1 noch weitere Invasionsrelevante Proteine wie MTIP, GAP45 und die CDPK1 durch die PKA phosphoryliert werden. Diese Daten unterstreichen die herausragende Stellung von cAMP und PKA für die Invasion. Adenylat-Zyklasen spielen bei der PKA-Regulation eine besondere Rolle. *Mycobacterium tuberculosis* exprimiert beispielsweise 16 verschiedene Isoformen der Adenylat Zyklase, die zytosolisch, membranassoziiert oder als integrale Membranproteine vorliegen (McDonough & Rodriguez, 2012). 10 Effektorproteine steuern die differenzielle Aktivität von mehr als 100 Genen. Im Gegensatz dazu kodiert das Genom von *P. falciparum* nur für zwei AC-Isoformen und für PKA als scheinbar einziges Effektorprotein (Baker, 2011; McDonough & Rodriguez, 2012). Die Reduktion dieses Signalweges im Parasiten könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich noch weitere Regulations-Mechanismen entwickelt haben.

### 5.1 Bedeutung der AMA1-Phosphorylierung für die Invasion

Die Phosphorylierung von Serin 610 in der CPD von AMA1 ist von entscheidender Bedeutung für die Funktion des Proteins und die Invasion des Parasiten (Treeck et al., 2009; Leykauf et al., 2010). Nachfolgende Untersuchungen identifizierten weitere Phosphorylierungsstellen in der CPD (Treeck et al., 2011; Solyakov et al., 2011; Lasonder et al., 2012) und Ziel dieser Arbeit war es, diese funktionell zu untersuchen. Es wurden insgesamt 5 weitere Phosphorylierungsstellen untersucht: S588, S590, S601, T612 und T613 (Abb.6). Die einzelnen Mutationen der Serine S588, S590 und S601 bei AMA1 zeigten keine Auswirkung auf die Invasionsfähigkeit der Parasiten (Abb.16 A). Dies deutet auf eine funktionelle Redundanz hin. Interessanterweise zeigte die gleichzeitige Mutation aller drei Serine zu Alanin eine Auswirkung auf den Phänotyp (geringere Komplementationsfähigkeit), die jedoch durch die Substitution mit Asparaginsäure wieder auf Wildtyp-Niveau

angehoben werden konnte (Abb.16 B). So scheint die Phosphorylierung diese Aminosäuren eine eher untergeordnete, synergistische Funktion zu haben. Dies ist umso erstaunlicher, da das S588/S590 Fragment das mit Abstand am häufigsten detektierte Phosphopeptid ist (Solyakov et al., 2011; Lasonder et al., 2012). Möglicherweise besitzen diese Aminosäuren aber eine regulatorische Aufgabe bei der funktionellen Steuerung von AMA1 in Sporozoiten. Auch dort scheint AMA1 eine wichtige Rolle bei der Invasion zu spielen (Silvie et al., 2004). Denkbar wäre, dass die S588/S590-Phosphorylierung das Ligandenspektrum von AMA1 bei der Hepatozyten-Invasion modifiziert, indem sie zu einer Strukturveränderung der extrazellulären Domäne führt (Johnson & Lewis, 2001; Valbuena et al., 2006). Die Abhängigkeit der S590-*in vitro*-Phosphorylierung von Kalzium deutet auf die Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Proteinkinasen (CDPKs) hin (vergl.2.2.3). Ein möglicher Kandidat für die S590 Phosphorylierung ist die CDPK1. *In vitro* Experimente konnten bereits zeigen, dass die CDPK1 in der Lage ist die CPD von AMA1 zu phosphorylieren (Blackman&Gilberger, unveröffentlicht). Neben den Möglichkeiten einer synergistischen Funktion bei der Invasion von Erythrozyten, oder der möglichen Funktion bei der Invasion von Hepatozyten, könnte die Phosphorylierung dieser 3 Aminosäuren aber auch ohne physiologische Bedeutung sein. Dies scheint aber aufgrund der energetischen Anforderungen eher unwahrscheinlich, da die Synthese von ATP Energie benötigt. Der Einsatz von ATP für scheinbar funktionslose, metabolische Prozesse erscheint aus evolutiver Sicht schwer nachvollziehbar. Die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne eines anderen Adhesins, Rh2b, wurde vor Kurzem im Detail untersucht (Engelberg et al., *under revision*). Obwohl dieses Protein *in vivo* an nur einer Aminosäure phosphoryliert wird, zeigt die Mutation der Aminosäure keinerlei phänotypische Auswirkung. Dies steht im Gegensatz zu den Mutationen der Threonine T612 und T613 im AMA1, die zu einer 40 %igen bzw 70 %igen Invasions-Inhibition führen (Abb.17).

### 5.2 Zwei-Stufen-Regulation der AMA1-Funktion durch „phospho-priming“

Die funktionelle Inaktivierung von AMA1 durch die T613A-Mutation ist vergleichbar mit der S610A-Mutation und kann durch die fehlende Phosphatgrup-

pe erklärt werden. Interessanterweise ist die T613-Phosphorylierung *in vitro* erst nach einer initialen PKA-vermittelten S610-Phosphorylierung nachweisbar (Abb.19). Ein mögliches Modell, das die pS610-abhängige Phosphorylierung von T613 erklären könnte, ist das sogenannte „phospho priming“ (Koivomaegi et al., 2011; Ma & Poon, 2011; Belov & Mohammadi, 2012). Hierbei ist die phosphorylierte Aminosäure selbst Teil der Substrat-Erkennungssequenz der Kinase. So ist beispielsweise eine initiale Phosphorylierung der N-Acetyltransferase Eco1 bei Hefen durch die „cyclin-dependent kinase 1“ (Cdk1) essentiell für die geregelte Abfolge von zwei weiteren Phosphorylierungen. Nur nach Cdk1-Phospho-priming können die „cell division cycle 7 Kinase“ (Cdc7) und die „Meiosis and centromere regulatory kinase 1“ (Mck1) Eco1 weiter phosphorylieren. Diese Phosphorylierungs-Kaskade vermittelt die Degradation von Eco1 (Lyons et al., 2013). Auch die humane „Casein Kinase 1- $\alpha$ “ (CK1- $\alpha$ ), sowie die „Glykogen synthase Kinase 3“ (GSK3) erkennen phosphorylierte Aminosäuren in der Substrat-Erkennungssequenz (Flotow et al., 1990; Dajani et al., 2001; Droucheau et al., 2004).

### 5.3 Die Rolle von GSK3 bei der T613-Phosphorylierung

Vor dem Hintergrund der hier beschriebenen Ergebnisse scheint die Aminosäure T613 und ihre Phosphorylierung neben der cAMP-abhängigen, PKA-katalysierten S610-Phosphorylierung ein weiterer, entscheidender Kontrollpunkt für die Funktionsfähigkeit von AMA1 bei der Invasion zu sein. Die verantwortliche Kinase könnte damit einen interessanten Interventionspunkt darstellen, da die spezifische Inhibition dieses Parasiten-Enzyms zu einem drastischen Verlust der Invasionsfähigkeit der Parasiten führen würde. Die Umgebung von T613 in der CPD von AMA1 weist Erkennungssequenzen für eine Phosphorylierung durch die p38MAP-Kinase, oder durch die GSK3 auf (Abb.20). Da weder die p38MAP-Kinase, noch ein Homolog bei *P. falciparum* nachgewiesen werden konnte (Ward et al., 2004; Miranda-Saavedra et al., 2012), wurde eine mögliche Funktion der GSK3 für die T613-AMA1-Phosphorylierung genauer untersucht (4.3.2). *P. falciparum* besitzt 2 GSK3-Homologe. Das eine, MAL13P1.84 erscheint spezifisch für *Haemosporidia* (Miranda-Saavedra et al., 2012). PFC0525c

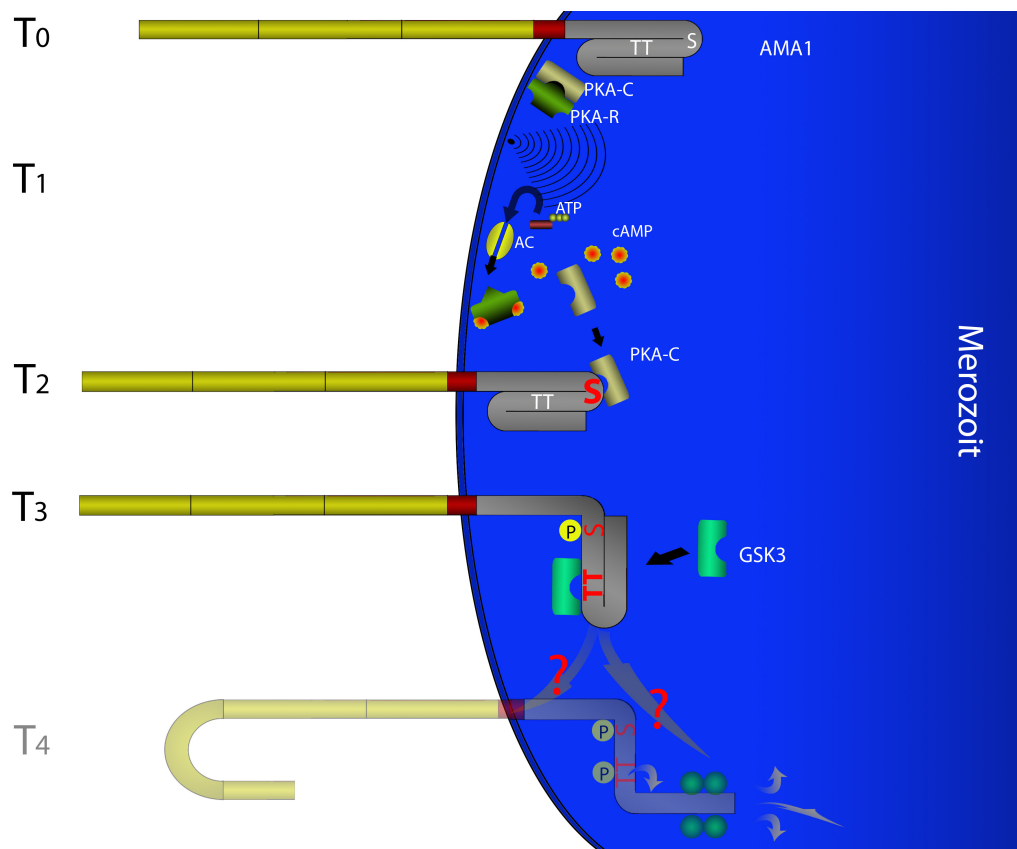
(PfGSK3) ist das plasmodiale GSK3 Homolog zur GSK3 bei *Metazoa* (Droucheau et al., 2004; Ward et al., 2004; Miranda-Saavedra et al., 2012). Im Gegensatz zu MAL13P1.84, das nicht im intraerythrozytären Stadium exprimiert wird, sind die Transkripte der PfGSK3 in der gesamten intraerythrozytären Phase nachweisbar, mit einem leichten Anstieg im späten Schizonten (Abb.21) (Le Roch et al., 2003). Solyakov et al. (2011) konnten darüber hinaus nachweisen, dass PfGSK3 für den asexuellen Zyklus des Parasiten essentiell ist. Die humane GSK3 liegt in zwei Isoformen (GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$ ) vor, die in ihrer Kinasedomäne zu 98 % identisch sind, jedoch in der N- und C-terminalen Domäne signifikante Unterschiede aufweisen (Shaw et al., 1998; Force & Woodgett, 2009). Die Funktionen der humanen GSK3 $\beta$  sind vielfältig. Sie reguliert unter anderem die Zellwanderung durch Phosphorylierung mehrerer Mikrotubuli-assoziiierter Proteine und sie phosphoryliert  $\beta$ -Catenin im Wnt-Signaltransduktionsweg (Wang et al., 2010; Kumar et al., 2009; Hur & Zhou, 2010). Wie bereits angesprochen ist eine phosphorylierte Aminosäure Bestandteil der Erkennungssequenz der humanen GSK3 (Dajani et al., 2001). Diese Besonderheit wird durch ihre Tertiärstruktur ermöglicht. Die Aminosäuren Arg96, Arg180, Lys205 und Val214 der hGSK3 $\beta$  bilden eine positiv geladene Tasche, die die Bindung mit einem negativ geladenen Phosphatrest einer phosphorylierten Aminosäure begünstigt (Dajani et al., 2001; Droucheau et al., 2004). Dieser Bereich ist bei der plasmodialen GSK3 vollständig konserviert (Arg119, Arg205, Ly230 und Val239). Jedoch konnte gezeigt werden, dass hGSK3 $\beta$  ebenso unphosphorylierte Substrate erkennt (Abb.22) (Frame et al., 2001; Dajani et al., 2001).

Droucheau et al. (2004) lokalisierten das plasmodiale Enzym mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern nahezu ausschließlich (bis auf einen schwachen zytosolischen Pool) in den „Mauer’s Clefts“, vesikuläre Strukturen im Zytosol des infizierten Erythrozyten. Diese Lokalisation steht im klaren Gegensatz zu der hier gezeigten, zellulären Verteilung, die ausschließlich zytosolisch ist (Abb.21). Gegen die veröffentlichte Lokalisation und für eine zytosolische Lokalisation spricht i) das Fehlen eines PEXEL Exportmotivs, was für eine Vielzahl von exportierten Proteinen eine notwendige, N-terminale Exportsequenz darstellt (Marti et al., 2005), ii) das Fehlen einer Transmembrandomäne, die im Zusammenhang mit dem Export einiger PEXEL-negative exportierter Proteine (PNEPs) steht (Spielmann & Gilberger, 2010) und iii) dass endogen-markiertes

PfGSK3 zytoplasmisch im Parasiten vorliegt und es keinerlei Anzeichen für den Export in das Zytoplasma der infizierten Wirtszelle gibt (Abb.21). Der hier gewählte experimentelle Ansatz, die Fusion von GFP an das 3'-Ende des *gsk3*-Gens, bietet den Vorteil, dass a) durch die Fusion mit GFP keine Fixierung der Zelle notwendig ist und damit Artefaktbildung minimiert wird und b) die GSK3-GFP Expression vom endogenen Promotor gesteuert wird und dadurch eine Fehllokalisation durch Überexpression verhindert wird. Das *gfp* als Reportergen hat keine negative Auswirkung auf den Export von Fusionsproteinen, wie eine Vielzahl von Studien belegen (Marti et al., 2005; Haase et al., 2009; Gruering et al., 2011, 2012). Ein weiterer Datensatz unterstreicht die zytoplasmische Lokalisation von PfGSK3: Die Kinase wurde als essentiell für den intraerythrozytären Parasiten beschrieben (Ward et al., 2004; Solyakov et al., 2011). Würde die GFP Lokalisation zu einer Fehllokalisation führen, kann davon ausgegangen werden, dass dieses Enzym nicht mehr seine Funktion erfüllen könnte. Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass PfGSK3, wie das humane Homolog (Takahashi et al., 1994; Bijur & Joep, 2001) im Zytoplasma ist. Die veröffentlichte „Mauer's Clefs“-Lokalisation kann z.B. durch eine Kreuzreaktivität des verwendeten, polyclonalen Antikörpers erklärt werden. Auch kann eine Fehl-Lokalisation durch die verwendete Fixierungsmethode nicht ausgeschlossen werden. Rekombinante, humane GSK3 zeigt eine Spezifität für T613 und phosphoryliert weder S588 noch T612 (Abb.22 B, C,). Eine vorherige Phosphorylierung von S610 scheint nicht notwendig zu sein (Abb.22 A), wobei natürlich der verwendete Assay nur sehr limitiert die physiologischen Gegebenheiten in der Zelle widerspiegeln kann. So wird z.B. die Substratspezifität der hGSK3 durch eine PKB-vermittelte Phosphorylierung von S9 moduliert. Die Phosphorylierung von S9 verhindert die Substratbindung dadurch, dass es als Pseudosubstrat in der oben beschriebene positive Tasche bindet (Fang et al., 2000; Frame et al., 2001). Obwohl S9 in der PfGSK3 nicht konserviert ist, besitzt das plasmodiale Homolog einen verlängerten N-terminalen Bereich, der an der Regulierung der Aktivität und der Substratbindung beteiligt sein könnte (Droucheau et al., 2004). Eine weitere Erklärung der hGSK3 Aktivität, die unabhängig von einem phosphorylierten Substrat war, könnte auch eine unphysiologische Konzentration der Kinase im Assay sein, was zu unspezifischen Phosphorylierung führen kann (Tan et al., 2010). Die Aufreinigung und Charakterisierung der PfGSK3 *in vivo* ist Gegen-

stand fortlaufender Untersuchungen.

Ein mögliches Zusammenspiel von PKA und GSK3 für die Aktivität von AMA1 während der Invasion ist in Abb.25 dargestellt. Am Ende der Schizogonie (**T0**) liegt AMA1 unphosphoryliert vor. Die katalytische Untereinheit der PKA (PKAc) ist mit der membrangebundenen regulatorischen (PKAr) assoziiert. Durch ein bisher unbekanntes Signal wird die Synthese von cAMP durch die Adenylat Zyklase- $\beta$  (AC $\beta$ ) stimuliert. AC $\beta$  kann entweder über gekoppelte, membranständige G-Proteine oder über  $\text{Ca}^{2+}$  und die Phospholipase C (PLC) aktiviert werden. cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit der PKA. Diese Bin-



**Abb. 25: Modell der AMA1 Phosphorylierung und der möglichen Auswirkungen.** Schematische Darstellung der möglichen zeitlichen und räumlichen Abfolge der AMA1 Phosphorylierung. **T0:** AMA1 liegt unphosphoryliert vor und die katalytische Untereinheit von PKA ist mit der regulatorischen verbunden. **T1:** Nach einem Signal wird die Synthese von cAMP durch die Adenylat-Zyklase $\beta$  (AC $\beta$ ) aktiviert, wodurch die katalytische Untereinheit von der regulatorischen dissoziiert. **T2:** PKA phosphoryliert Serin 610, was dazu führt, dass **T3:** T613 durch die GSK3 phosphoryliert werden kann. **T4:** Durch die T613 Phosphorylierung ist AMA1 voll funktionsfähig. Als Folge können entweder Effektor- oder Adapterproteine binden und/oder eine weitere Konformationsänderung findet statt.

dung bewirkt eine Konformationsänderung, die für die Dissoziation von PKAr und PKAc und damit für die Aktivierung der PKAc verantwortlich ist, die daraufhin AMA1 am Serin 610 phosphoryliert (**T2**). Die S610 Phosphorylierung scheint eine wichtige Voraussetzung für die T613 Phosphorylierung zu sein und könnte mit einer Strukturveränderung der CPD zusammenhängen, durch die erst die GSK3 Bindungsstelle offen gelegt wird (**T3**). Nur durch die Phosphorylierung von S610 und T613 (+T612) ist AMA1 funktionsfähig (**T4**). Diese Aktivierung könnte zum Beispiel durch eine Strukturänderung der extrazellulären Domäne und eine damit verbundene Regulation der AMA1-RON-Interaktion erzielt werden. Eine Doppelposphorylierung könnte aber auch für die Interaktion der CPD mit anderen Effektorproteinen notwendig sein. Interessanterweise gibt es zwei Populationen von AMA1 an der Oberfläche von freien Merozoiten. Eine ist am apikalen Pol lokalisiert, die andere auf der gesamten Oberfläche des Merozoiten. FRAP-Analysen zeigten, dass die periphere AMA1-Population frei beweglich ist, die apikale Population jedoch als Komplex in der Membran feststeckt (Treeck et al., 2009). Ob dies das Resultat eines unterschiedlichen Phosphorylierungsmusters der CPD sein könnte, müssen Folgeuntersuchungen zeigen.

## **5.4 Invasion und Inhibition der GSK3**

Die spezifische Phosphorylierung von T613 in der CPD von AMA1 durch hGSK3 und die Anwesenheit einer GSK3-Substrat-Erkennungssequenz sind Indizien dafür, dass diese Kinase an der AMA1-Phosphorylierung und ihrer Regulation beteiligt ist. Eine spezifischen Inhibierung von GSK3 sollte damit drastischen Auswirkungen auf die Proliferation des Parasiten haben. Deswegen wurde das Ärylindolemaleimid „SB-216763“ *in vitro* und *in vivo* als spezifischer GSK3 Inhibitor getestet. Dieser Inhibitor hemmt spezifisch die humane GSK3 durch seine hohe Affinität zur ATP-Bindungstasche (Inhibitionskonstante: 9,1 nM) und der mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) von 34,3 nM (Coghlan et al., 2000). SB-216763 zeigte jedoch keine inhibierende Wirkung auf die AMA1 Phosphorylierung unter Verwendung von Parasitenlysat (Abb.24 A), obwohl er schon in wesentlich geringeren Konzentration die hGSK3 vermittelte Phosphorylierung inhibiert (Abb.23). Interessanterweise ist der Inhibitor auch in der

*in vivo* Parasitenkultur selbst in hohen Konzentrationen unwirksam (Abb.24 B). Ausgehend davon, dass es sich bei PfGSK3 um eine essentielle Kinase für das intraerythrozytäre Wachstum der Parasiten handelt, kann vermutet werden, dass strukturelle Unterschiede beispielsweise in der ATP-Bindedomäne die Gründe für die Unwirksamkeit des Inhibitors sind. Vor Kurzem wurde eine *Plasmodium*-spezifische GSK3 Inhibitor-Klasse (3,6-Diamino-4-(2-Halophenyl)-2-Benzoylthieno[2,3-b]Pyridin-5-Carbonitril) beschrieben (Fugel et al., 2013). Dabei wurde die Wirkung von 10480 chemischen Stoffen auf die rekombinante PfGSK3 in einem *in vitro* Kinaseassay untersucht. 18 von diesen Stoffen zeigten eine über 50 %ige Inhibition der PfGSK3-Aktivität bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M. Diese wurden erneut auf ihre Spezifität für die plasmodiale GSK3 im Vergleich zur Kinase vom Schwein (*Sus scrofa*) getestet. Fünf von diesen zeigten eine verwandte Struktur, ein 3-Amino-4-arylthieno[2,3-b]pyridin Motiv. Die in diesem Ansatz beschriebene, *Plasmodium*-spezifische Inhibitor-Klasse könnte ein vielversprechendes Instrument, um die Bedeutung der PfGSK3 für die AMA1-Phosphorylierung und damit auch für die Invasion genauer zu untersuchen (Fugel et al., 2013).

Der Bereich um T613 in der CPD von AMA1 entspricht nicht der klassische GSK3-Phosphorylierungsstelle. Dort liegt die vor-phosphorylierte Aminosäure in der +4 Position in Richtung C-Terminus zu der Phosphoakzeptorstelle (Dajani et al., 2001; Droucheau et al., 2004). Bei AMA1 liegt das Serin 610 jedoch drei Aminosäuren N-terminal von Threonin 613. Möglicherweise kann aber die negative Seitenkette der Glutaminsäure E618 dies kompensieren. Diese Aminosäure ist in fast allen Plasmodium-Spezies, sowie bei *T. gondii* und *Babesia bovis* konserviert. Treeck et al. (2009) zeigten, dass eine Deletion der letzten 5 Aminosäuren von AMA1, zu denen ebenfalls E618 gehört zu einer drastischen Reduktion der Invasionfähigkeit führt. Ob T612 phosphoryliert vorliegt und somit einen Einfluss auf die Phosphorylierung von T613 durch die GSK3 hat, ist nicht bekannt, jedoch Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

### Fazit

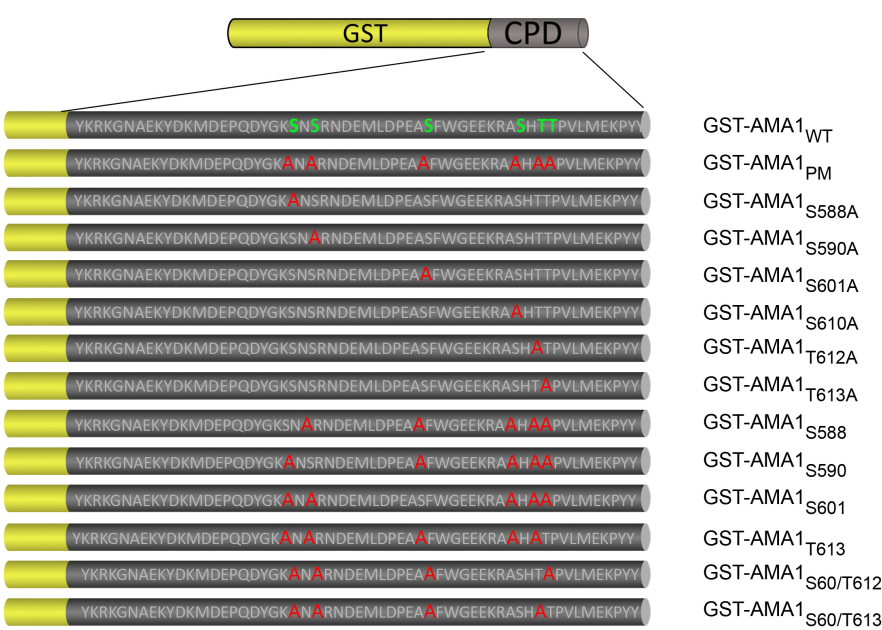
Phosphorylierung ist eine posttranslationale Modifikation, die in nahezu allen biologischen Systemen essentiell ist. Die Funktionen der Phosphorylierung sind vielfältig und kleinste Fehlschaltungen in den Abläufen können weitreichende

Auswirkungen haben. Auch bei der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten gegen Malaria rücken Proteinkinasen immer weiter in den Vordergrund (Doerig et al., 2010; Gamo et al., 2010; Zhang et al., 2012).

Diese Arbeit beschreibt erstmals T613 als funktionelle Phosphorylierungsstelle in der zytoplasmatischen Domäne von AMA1, welche für die erfolgreiche Invasion von *P. falciparum* essentiell ist.

Diese Phosphorylierung scheint abhängig von einer initialen PKA-Phosphorylierung zu sein. Eine Vielzahl von Indizien sprechen für die Involvierung von PfGSK3 als verantwortliche Kinase für die T613 Phosphorylierung, wodurch erstmals ein Ziel dieser anscheinend essentiellen Kinase identifiziert worden wäre.

# 6 Anhang



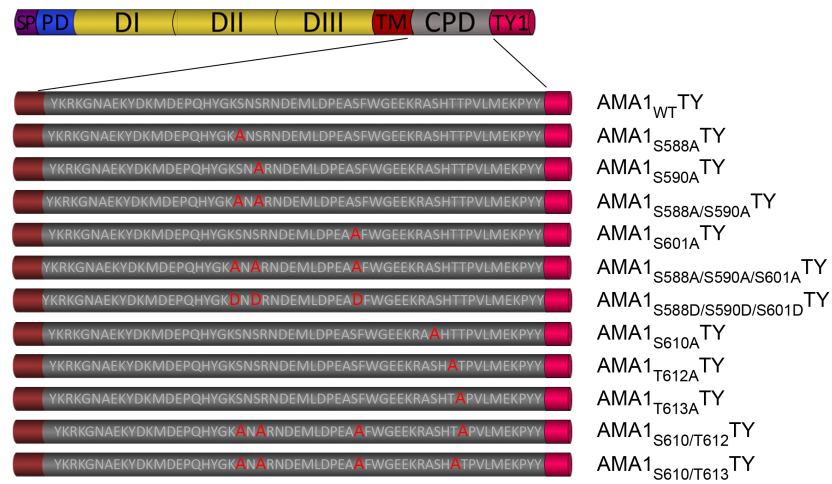
**Abb. 26: Schematische Darstellung der GST-Fusionsproteine** für die in vitro Phosphorylierungsassays. Die CPD von *P. falciparum* 3D7-AMA1 mit einer GST-Domäne versehen, in E-Coli exprimiert und anschließend aufgereinigt. Mit den Oligonukleotiden aus Tab.2 wurden die verschiedenen Mutationskonstrukte erstellt.

| Konstrukt                      | Oligo 5' zu 3'                                                             |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| AMA1-CPD WT sense              | CGCGGGATCCATATAAAAGAAAAGGAAATGCTGAAAAATATG                                 |
| AMA1 WT antisense              | CGCGCTCGAGATAGTATGGTTTTTCCATCAGAACTGGTGTG<br>TGTATGTGATGCTC                |
| AMA1 STT610/612/613A antisense | CGCGCTCGAGTTAATAGTATGGTTTTTCCATCAGAACTGG<br>TGCTGCATGTGCTGCTCTTTTTTCTTCCCC |
| AMA1 ST610/T613A antisense     | CGCGCTCGAGATAGTATGGTTTTTCCATCAGAACTGGTGC<br>TGTATGTGCTGC                   |
| AMA1 T612A antisense           | CGCGCTCGAGATAGTATGGTTTTTCCATCAGAACTGGTGT<br>TGCATGTGATGCTC                 |
| AMA1 T613A antisense           | CGCGCTCGAGATAGTATGGTTTTTCCATCAGAACTGGTGC<br>TGTATGTGATGCTC                 |
| AMA1 SSS588/590/601A OL        | GATTATGGGAAAGCAAATGCAAGAAATGATGAAATGTTAG<br>ATCCTGAGGCAGCTTTTTGGGGGGAAG    |
| AMA1 SS588/601A OL             | GATTATGGGAAAGCAAATTCAGAAATGATGAAATGTTAG<br>ATCCTGAGGCAGCTTTTTGGGGGGAAG     |
| AMA1 SS590/601A OL             | GATTATGGGAAATCAAATGCAAGAAATGATGAAATGTTAG<br>ATCCTGAGGCAGCTTTTTGGGGGGAAG    |
| AMA1 S588A OL                  | CCACAAGATTATGGGAAAGCAAATTCAGAAATGATGAAA<br>TGTTAGATCC                      |
| AMA1 S590A OL                  | CCACAAGATTATGGGAAATCAAATGCAAGAAATGATGAAA<br>TGTTAGATCC                     |
| AMA1 SS588/590A OL             | CCACAAGATTATGGGAAAGCAAATGCAAGAAATGATGAAA<br>TGTTAGATCC                     |
| AMA1 S601A OL                  | GATGAAATGTTAGATCCTGAGGCAGCTTTTTGGGGGGAA<br>GAAAAAAGAGC                     |

**Tab. 2: Aufstellung der Oligonukleotide für *in vitro* 3D7-Konstrukte** welche in dieser Arbeit verwendet wurden. Die antisense Oligonukleotide für die OL-PCR waren die jeweiligen reversen komplementär Sequenzen. Oligonukleotide am 3' Ende des Konstrukts wurden mit einer *XhoI* Restriktionsschnittstelle (Rot markiert) versehen und das Oligonukleotid am 5' Ende mit einer *BamHI* Schnittstelle (Blau markiert).

| Konstrukt                      | Oligo 5' zu 3'                                                                 |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| AMA1 WT sense                  | CGCGGGTACCATGAGAAAATTATACTGCGTATTATTATTGA<br>GCGCC                             |
| AMA1 WT antisense              | CGCGCCTAGGATAGTATGGTTTTTCCATCAGAACTGGTGT<br>TGTATGTGATGCTC                     |
| AMA1 STT610/612/613A antisense | CGCGCCTAGGTTAATAGTATGGTTTTTCCATCAGAACTGG<br>TGCTGCATGTGCTGCTCTTTTTTCTTCCCC     |
| AMA1 ST610/T613A antisense     | CGCGCCTAGGATAGTATGGTTTTTCCATCAGAACTGGTGC<br>TGTATGTGCTGC                       |
| AMA1 T612A antisense           | CGCGCCTAGGATAGTATGGTTTTTCCATCAGAACTGGTGT<br>TGCATGTGATGCTC                     |
| AMA1 T613A antisense           | CGCGCCTAGGATAGTATGGTTTTTCCATCAGAACTGGTGC<br>TGTATGTGATGCTC                     |
| AMA1 T612D antisense           | CGCGCCTAGGATAGTATGGTTTTTCCATCAGAACTGGTGT<br>ATCATGTGATGCTC                     |
| AMA1 T613D antisense           | CGCGCCTAGGATAGTATGGTTTTTCCATCAGAACTGGATC<br>TGTATGTGATGCTC                     |
| AMA1 SSS588/590/601A OL        | GATTATGGGAAAGCAAATGCAAGAAATGATGAAATGTTAG<br>ATCCTGAGGCAGCTTTTTTGGGGGGAAG       |
| AMA1 SS588/601A OL             | CATTATGGGAAAGCAAATCAAGAAATGATGAAATGTTAG<br>ATCCTGAGGCAGCTTTTTTGGGGGGAAG        |
| AMA1 SS590/601A OL             | CATTATGGGAAATCAAATGCAAGAAATGATGAAATGTTAG<br>ATCCTGAGGCAGCTTTTTTGGGGGGAAG       |
| AMA1-S588A OL                  | CCACAACATTATGGGAAAGCAAATCAAGAAATGATGAAA<br>TGTTAGATCC                          |
| AMA1-S590A OL                  | CCACAACATTATGGGAAATCAAATGCAAGAAATGATGAAA<br>TGTTAGATCC                         |
| AMA1-SS588/590A OL             | CCACAACATTATGGGAAAGCAAATGCAAGAAATGATGAAA<br>TGTTAGATCC                         |
| AMA1-S601A OL                  | GATGAAATGTTAGATCCTGAGGCAGCTTTTTTGGGGGGAAG<br>AAAAAAGAGC                        |
| AMA1 SSS588/590/601D OL        | CCACAACATTATGGGAAAGATAATGATAGAAATGATGAAAT<br>GTTAGATCCTGAGGCAGATTTTTTGGGGGGAAG |

**Tab. 4: Aufstellung der Oligonukleotide für *in vivo* W2mef-Konstrukte** welche in dieser Arbeit verwendet wurden. Die antisene Oligonukleotide für die OL-PCR waren die jeweiligen reversen komplementär Sequenzen. Oligonukleotide am 3' Ende des Konstrukts wurden mit einer *AvrII* Restriktionsschnittstelle (Rot markiert) versehen und das Oligonukleotid am 5' Ende mit einer *KpnI* Schnittstelle (Blau markiert).



**Abb. 27: Schematische Darstellung der zytoplasmatischen Domäne der AMA1 Mutanten.** Die Konstrukte für die Aminosäuren S588, S590, S601, T612 und T613 wurden als Einzelmutationen hergestellt und in Kombination miteinander. Alle Mutanten basieren auf der kodierenden Sequenz vom W2mef Isolat und besitzen ein C-Terminales TY1 Epitop (hellrot). Der Wildtyp „AMA1-Full“ dient als Positivkontrolle und „AMA1-S610A“ als Negativkontrolle.

# Abbildungsverzeichnis

|    |                                                                                                      |    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1  | Weltweites Vorkommen von <i>P. falciparum</i> . . . . .                                              | 4  |
| 2  | Schematische Darstellung eines Merozoiten . . . . .                                                  | 7  |
| 3  | Schematische Darstellung des Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i> .                                 | 8  |
| 4  | Schematische Darstellung der Invasion des Merozoiten von <i>P. fal-</i><br><i>ciparum</i> . . . . .  | 15 |
| 5  | Schematische Darstellung vom Aufbau von PfAMA1 . . . . .                                             | 18 |
| 6  | Phosphorylierungsstellen in der CPD von AMA1 . . . . .                                               | 24 |
| 7  | pARL1(a)-Vektorkarten . . . . .                                                                      | 41 |
| 8  | pGex4T1 Vektorkarte . . . . .                                                                        | 42 |
| 9  | Homologievergleich der zytoplasmatischen Domäne von AMA1 .                                           | 60 |
| 10 | Expression von AMA1 GST-Fusionsproteinen . . . . .                                                   | 61 |
| 11 | <i>In vitro</i> Phosphorylierung führt zu einem veränderten Laufver-<br>halten im SDS-Page . . . . . | 62 |
| 12 | Radiaktiver Phosphorylierungsassay der CPD von AMA1 <sub>WT</sub> GST                                | 63 |
| 13 | Expression und Phosphorylierung von AMA1 GST-Fusionsproteinen                                        | 64 |
| 14 | Radiaktiver Phosphorylierungsassay von AMA1 <sub>S610A</sub> und AMA1 <sub>S590</sub>                | 65 |
| 15 | Expression von AMA1-TY1 Varianten in <i>P. falciparum</i> . . . . .                                  | 66 |
| 16 | Invasions-Komplementationsassay der Mutanten von S588, S590<br>und S601 . . . . .                    | 67 |
| 17 | „Loss of Function“ Mutanten AMA1 <sub>T612A</sub> und AMA1 <sub>T613A</sub> . . .                    | 68 |
| 18 | Expression und Phosphorylierung von GST-AMA1 <sub>T613</sub> -Fusionsproteinen                       | 69 |
| 19 | Die S610 Phosphorylierung ist ein „Priming“-Schritt für die T613<br>Phosphorylierung . . . . .       | 70 |

|    |                                                                                                                   |    |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 20 | NetPhos-Vorhersage putativer Phosphorylierungsstellen und verantwortlicher Enzyme . . . . .                       | 71 |
| 21 | Schematischen Darstellung des 3' Replacement von <i>gsk3</i> , Integration, Expression und Lokalisation . . . . . | 72 |
| 23 | Inhibition der hGSK3-Phosphorylierung von AMA1 <sub>S610/T613</sub> . .                                           | 73 |
| 22 | hGSK3 Phosphorylierung von AMA1 . . . . .                                                                         | 74 |
| 24 | Auswirkungen von SB-216763 . . . . .                                                                              | 75 |
| 25 | Modell der AMA1 Phosphorylierung und der möglichen Auswirkungen . . . . .                                         | 83 |
| 26 | Schematische Darstellung der GST-Fusionsproteine . . . . .                                                        | 87 |
| 27 | Schematische Darstellung der zytoplasmatischen Domäne der AMA1 Mutanten . . . . .                                 | 90 |

# Tabellenverzeichnis

|   |                                                                        |    |
|---|------------------------------------------------------------------------|----|
| 2 | Aufstellung der Oligonukleotide für <i>in vitro</i> 3D7-Konstrukte . . | 88 |
| 4 | Aufstellung der Oligonukleotide für <i>in vivo</i> W2mef-Konstrukte .  | 89 |

# Literaturverzeichnis

- Abdi, A., Eschenlauer, S., Reininger, L., & Doerig, C. (2010). Sam domain-dependent activity of pftkl3, an essential tyrosine kinase-like kinase of the human malaria parasite plasmodium falciparum. Cell Mol Life Sci, 67(19), 3355–3369.
- Adams, J. H., Blair, P. L., Kaneko, O., & Peterson, D. S. (2001). An expanding ebl family of plasmodium falciparum. Trends Parasitol, 17(6), 297–299.
- Adams, J. H., Fang, X., Kaslow, D. C., & Miller, L. H. (1992). Identification of a cryptic intron in the plasmodium vivax duffy binding protein gene. Mol Biochem Parasitol, 56(1), 181–183.
- Amaratunga, C., Sreng, S., Suon, S., Phelps, E. S., Stepniewska, K., Lim, P., Zhou, C., Mao, S., Anderson, J. M., Lindegardh, N., Jiang, H., Song, J., Su, X.-z., White, N. J., Dondorp, A. M., Anderson, T. J. C., Fay, M. P., Mu, J., Duong, S., & Fairhurst, R. M. (2012). Artemisinin-resistant plasmodium falciparum in pursat province, western cambodia: a parasite clearance rate study. Lancet Infect Dis, 12(11), 851–858.
- Anamika, Srinivasan, N., & Krupa, A. (2005). A genomic perspective of protein kinases in plasmodium falciparum. Proteins, 58(1), 180–189.
- Baer, K., Klotz, C., Kappe, S. H. I., Schnieder, T., & Frevert, U. (2007). Release of hepatic plasmodium yoelii merozoites into the pulmonary microvasculature. PLoS Pathog, 3(11), e171.
- Bai, T., Becker, M., Gupta, A., Strike, P., Murphy, V. J., Anders, R. F., & Batchelor, A. H. (2005). Structure of ama1 from plasmodium falciparum

- reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. Proc Natl Acad Sci U S A, 102(36), 12736–12741.
- Baker, D. A. (2011). Cyclic nucleotide signalling in malaria parasites. Cell Microbiol, 13(3), 331–339.
- Baker, R. P., Wijetilaka, R., & Urban, S. (2006). Two plasmodium rhomboid proteases preferentially cleave different adhesins implicated in all invasive stages of malaria. PLoS Pathog, 2(10), e113.
- Barillas-Mury, C. & Kumar, S. (2005). Plasmodium-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. Cell Microbiol, 7(11), 1539–1545.
- Baum, J., Richard, D., Healer, J., Rug, M., Krnajska, Z., Gilberger, T.-W., Green, J. L., Holder, A. A., & Cowman, A. F. (2006). A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. J Biol Chem, 281(8), 5197–5208.
- Beals, C. R., Sheridan, C. M., Turck, C. W., Gardner, P., & Crabtree, G. R. (1997). Nuclear export of nf-atc enhanced by glycogen synthase kinase-3. Science, 275(5308), 1930–1934.
- Beier, J. C. (1998). Malaria parasite development in mosquitoes. Annu Rev Entomol, 43, 519–543.
- Belov, A. A. & Mohammadi, M. (2012). Grb2, a double-edged sword of receptor tyrosine kinase signaling. Sci Signal, 5(249), pe49.
- Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J.-F., & Lebrun, M. (2009). Export of a toxoplasma gondii rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. PLoS Pathog, 5(2), e1000309.
- Bijur, G. N. & Joep, R. S. (2001). Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. J Biol Chem, 276(40), 37436–37442.
- Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B., & Brinkmann, V. (2004). Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. Cell, 117(4), 503–514.

- Billker, O., Lourido, S., & Sibley, L. D. (2009). Calcium-dependent signaling and kinases in apicomplexan parasites. Cell Host Microbe, 5(6), 612–622.
- Borrmann, S. & Matuschewski, K. (2011). Targeting plasmodium liver stages: better late than never. Trends Mol Med, 17(9), 527–536.
- Cambi, A., Koopman, M., & Figdor, C. G. (2005). How c-type lectins detect pathogens. Cell Microbiol, 7(4), 481–488.
- Camus, D. & Hadley, T. J. (1985). A plasmodium falciparum antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. Science, 230(4725), 553–556.
- Cao, J., Kaneko, O., Thongkukiatkul, A., Tachibana, M., Otsuki, H., Gao, Q., Tsuboi, T., & Torii, M. (2009). Rhoptry neck protein ron2 forms a complex with microneme protein ama1 in plasmodium falciparum merozoites. Parasitol Int, 58(1), 29–35.
- Capdevila, J. A. & Icart, R. (2010). [malaria prophylaxis in the traveler]. Rev Clin Esp, 210(2), 77–83.
- Carruthers, V. B. & Sibley, L. D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in toxoplasma gondii. Mol Microbiol, 31(2), 421–428.
- Casares, S., Brumeanu, T.-D., & Richie, T. L. (2010). The rts,s malaria vaccine. Vaccine, 28(31), 4880–4894.
- Cavalier-Smith, T. (1993). Kingdom protozoa and its 18 phyla. Microbiol Rev, 57(4), 953–994.
- Chalfie, M. (1995). Green fluorescent protein. Photochem Photobiol, 62(4), 651–656.
- Chesne-Seck, M.-L., Pizarro, J. C., Vulliez-Le Normand, B., Collins, C. R., Blackman, M. J., Faber, B. W., Remarque, E. J., Kocken, C. H. M., Thomas, A. W., & Bentley, G. A. (2005). Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites. Mol Biochem Parasitol, 144(1), 55–67.

- Cibulskis, R. E., Aregawi, M., Williams, R., Otten, M., & Dye, C. (2011). World-wide incidence of malaria in 2009: estimates, time trends, and a critique of methods. PLoS Med, 8(12), e1001142.
- Clark, I. A. & Cowden, W. B. (1999). Why is the pathology of falciparum worse than that of vivax malaria? Parasitol Today, 15(11), 458–461.
- Coghlan, M. P., Culbert, A. A., Cross, D. A., Corcoran, S. L., Yates, J. W., Pearce, N. J., Rausch, O. L., Murphy, G. J., Carter, P. S., Roxbee Cox, L., Mills, D., Brown, M. J., Haigh, D., Ward, R. W., Smith, D. G., Murray, K. J., Reith, A. D., & Holder, J. C. (2000). Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. Chem Biol, 7(10), 793–803.
- Cogswell, F. B. (1992). The hypnozoite and relapse in primate malaria. Clin Microbiol Rev, 5(1), 26–35.
- Cole, A., Frame, S., & Cohen, P. (2004). Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (gsk3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. Biochem J, 377(Pt 1), 249–255.
- Coley, A. M., Campanale, N. V., Casey, J. L., Hodder, A. N., Crewther, P. E., Anders, R. F., Tilley, L. M., & Foley, M. (2001). Rapid and precise epitope mapping of monoclonal antibodies against plasmodium falciparum ama1 by combined phage display of fragments and random peptides. Protein Eng, 14(9), 691–698.
- Collins, C. R., Withers-Martinez, C., Hackett, F., & Blackman, M. J. (2009). An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. PLoS Pathog, 5(1), e1000273.
- Cossart, P. & Sansonetti, P. J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. Science, 304(5668), 242–248.
- Cowman, A. F., Berry, D., & Baum, J. (2012). The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. J Cell Biol, 198(6), 961–971.

- Cowman, A. F. & Crabb, B. S. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell, 124(4), 755–766.
- 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.
- Crabb, B. S. & Cowman, A. F. (1996). Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in *plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(14), 7289–7294.
- Crabb, B. S., Rug, M., Gilberger, T.-W., Thompson, J. K., Triglia, T., Maier, A. G., & Cowman, A. F. (2004). Transfection of the human malaria parasite *plasmodium falciparum*. Methods Mol Biol, 270, 263–276.
- Dajani, R., Fraser, E., Roe, S. M., Young, N., Good, V., Dale, T. C., & Pearl, L. H. (2001). Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. Cell, 105(6), 721–732.
- Deane, L. M. (1992). Simian malaria in brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 87 Suppl 3, 1–20.
- Deans, J. A., Thomas, A. W., Alderson, T., & Cohen, S. (1984). Biosynthesis of a putative protective *plasmodium knowlesi* merozoite antigen. Mol Biochem Parasitol, 11, 189–204.
- Dluzewski, A. R., Ling, I. T., Hopkins, J. M., Grainger, M., Margos, G., Mitchell, G. H., Holder, A. A., & Bannister, L. H. (2008). Formation of the food vacuole in *plasmodium falciparum*: a potential role for the 19 kda fragment of merozoite surface protein 1 (msp1(19)). PLoS One, 3(8), e3085.
- Doerig, C., Abdi, A., Bland, N., Eschenlauer, S., Dorin-Semlat, D., Fennell, C., Halbert, J., Holland, Z., Nivez, M.-P., Semlat, J.-P., Sicard, A., & Reininger, L. (2010). Malaria: targeting parasite and host cell kinomes. Biochim Biophys Acta, 1804(3), 604–612.

- Donahue, C. G., Carruthers, V. B., Gilk, S. D., & Ward, G. E. (2000). The toxoplasma homolog of plasmodium apical membrane antigen-1 (ama-1) is a microneme protein secreted in response to elevated intracellular calcium levels. Mol Biochem Parasitol, 111(1), 15–30.
- Dorin-Semblat, D., Quashie, N., Halbert, J., Sicard, A., Doerig, C., Peat, E., Ranford-Cartwright, L., & Doerig, C. (2007). Functional characterization of both map kinases of the human malaria parasite plasmodium falciparum by reverse genetics. Mol Microbiol, 65(5), 1170–1180.
- Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of e. coli by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res, 16(13), 6127–6145.
- Droucheau, E., Primot, A., Thomas, V., Mattei, D., Knockaert, M., Richardson, C., Sallicandro, P., Alano, P., Jafarshad, A., Baratte, B., Kunick, C., Parzy, D., Pearl, L., Doerig, C., & Meijer, L. (2004). Plasmodium falciparum glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors. Biochim Biophys Acta, 1697(1-2), 181–196.
- Dvorin, J. D., Martyn, D. C., Patel, S. D., Grimley, J. S., Collins, C. R., Hopp, C. S., Bright, A. T., Westenberger, S., Winzeler, E., Blackman, M. J., Baker, D. A., Wandless, T. J., & Duraisingh, M. T. (2010). A plant-like kinase in plasmodium falciparum regulates parasite egress from erythrocytes. Science, 328(5980), 910–912.
- Ernst, J. D. (1998). Macrophage receptors for mycobacterium tuberculosis. Infect Immun, 66(4), 1277–1281.
- Fang, X., Yu, S. X., Lu, Y., Bast, Jr, R., Woodgett, J. R., & Mills, G. B. (2000). Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase a. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(22), 11960–11965.
- Farajollahi, A., Fonseca, D. M., Kramer, L. D., & Marm Kilpatrick, A. (2011). "bird biting" mosquitoes and human disease: a review of the role of culex pipiens complex mosquitoes in epidemiology. Infect Genet Evol, 11(7), 1577–1585.
- Fidock, D. A., Nomura, T., Cooper, R. A., Su, X., Talley, A. K., & Wellems, T. E. (2000). Allelic modifications of the cg2 and cg1 genes do not alter the

- chloroquine response of drug-resistant plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasitol, 110(1), 1–10.
- Fidock, D. A. & Wellems, T. E. (1997). Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to wr99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. Proc Natl Acad Sci U S A, 94(20), 10931–10936.
- Fisk, T. L., Millet, P., Collins, W. E., & Nguyen-Dinh, P. (1989). In vitro activity of antimalarial compounds on the exoerythrocytic stages of plasmodium cynomolgi and p. knowlesi. Am J Trop Med Hyg, 40(3), 235–239.
- Flotow, H., Graves, P. R., Wang, A. Q., Fiol, C. J., Roeske, R. W., & Roach, P. J. (1990). Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase i action. J Biol Chem, 265(24), 14264–14269.
- Force, T. & Woodgett, J. R. (2009). Unique and overlapping functions of gsk-3 isoforms in cell differentiation and proliferation and cardiovascular development. J Biol Chem, 284(15), 9643–9647.
- Foth, B. J. & McFadden, G. I. (2003). The apicoplast: a plastid in plasmodium falciparum and other apicomplexan parasites. Int Rev Cytol, 224, 57–110.
- Frame, S., Cohen, P., & Biondi, R. M. (2001). A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of gsk3 and its inactivation by phosphorylation. Mol Cell, 7(6), 1321–1327.
- Franke-Fayard, B., Fonager, J., Braks, A., Khan, S. M., & Janse, C. J. (2010). Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria? PLoS Pathog, 6(9), e1001032.
- Frevert, U., Usynin, I., Baer, K., & Klotz, C. (2008). Plasmodium sporozoite passage across the sinusoidal cell layer. Subcell Biochem, 47, 182–197.
- Fricke, J. M., Vardo-Zalik, A. M., & Schall, J. J. (2010). Geographic genetic differentiation of a malaria parasite, plasmodium mexicanum, and its lizard host, sceloporus occidentalis. J Parasitol, 96(2), 308–313.

- Fuentealba, L. C., Eivers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., Kuroda, H., Pera, E. M., & De Robertis, E. M. (2007). Integrating patterning signals: Wnt/gsk3 regulates the duration of the bmp/smad1 signal. Cell, 131(5), 980–993.
- Fugel, W., Oberholzer, A. E., Gschloessl, B., Dzikowski, R., Pressburger, N., Preu, L., Pearl, L. H., Baratte, B., Ratin, M., Okun, I., Doerig, C., Kruggel, S., Lemcke, T., Meijer, L., & Kunick, C. (2013). 3,6-diamino-4-(2-halophenyl)-2-benzoylthieno[2,3-b]pyridine-5-carbonitriles are selective inhibitors of plasmodium falciparum glycogen synthase kinase-3. J Med Chem, 56(1), 264–275.
- Galan, J. E. and, J. E. (2001). Salmonella interactions with host cells: type iii secretion at work. Annu Rev Cell Dev Biol, 17, 53–86.
- Gamo, F.-J., Sanz, L. M., Vidal, J., de Cozar, C., Alvarez, E., Lavandera, J.-L., Vanderwall, D. E., Green, D. V. S., Kumar, V., Hasan, S., Brown, J. R., Peis-hoff, C. E., Cardon, L. R., & Garcia-Bustos, J. F. (2010). Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. Nature, 465(7296), 305–310.
- Garcia, L. S. (2010). Malaria. Clin Lab Med, 30(1), 93–129.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., & Eisen, J. A. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite plasmodium falciparum. Nature, 419(6906), 498–511.
- Garoff, H. & Ansorge, W. (1981). Improvements of dna sequencing gels. Anal Biochem, 115(2), 450–457.
- Gerald, N., Mahajan, B., & Kumar, S. (2011). Mitosis in the human malaria parasite plasmodium falciparum. Eukaryot Cell, 10(4), 474–482.
- Gerold, P., Schofield, L., Blackman, M. J., Holder, A. A., & Schwarz, R. T. (1996). Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasitol, 75(2), 131–143.
- Giemsa, G. (1904). Eine vereinfachung und vervollkommnung meiner methylenazur-methylenblau-eosin-faerbemethode zur erzielung der

- romanowsky-nochtschen chromatinfaerbung. Centralbl f Bakt etc, 37, 308–311.
- Gilberger, T.-W., Thompson, J. K., Triglia, T., Good, R. T., Duraisingh, M. T., & Cowman, A. F. (2003). A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from plasmodium falciparum defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. J Biol Chem, 278(16), 14480–14486.
- Gilson, P. R. & Crabb, B. S. (2009). Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by plasmodium falciparum merozoites. Int J Parasitol, 39(1), 91–96.
- Goel, V. K., Li, X., Chen, H., Liu, S.-C., Chishti, A. H., & Oh, S. S. (2003). Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the plasmodium falciparum invasion of erythrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, 100(9), 5164–5169.
- Green, J. L., Rees-Channer, R. R., Howell, S. A., Martin, S. R., Knuepfer, E., Taylor, H. M., Grainger, M., & Holder, A. A. (2008). The motor complex of plasmodium falciparum: phosphorylation by a calcium-dependent protein kinase. J Biol Chem, 283(45), 30980–30989.
- Grimes, C. A. & Jope, R. S. (2001). Creb dna binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. J Neurochem, 78(6), 1219–1232.
- Gruering, 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.
- Gruering, C., Heiber, A., Kruse, F., Ungefehr, J., Gilberger, T.-W., & Spielmann, T. (2011). Development and host cell modifications of plasmodium falciparum blood stages in four dimensions. Nat Commun, 2, 165.
- Guerra, C. A., Gikandi, P. W., Tatem, A. J., Noor, A. M., Smith, D. L., Hay, S. I., & Snow, R. W. (2008). The limits and intensity of plasmodium falciparum transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. PLoS Med, 5(2), e38.

- Haase, S., Herrmann, S., GrÃ¼ring, C., Heiber, A., Jansen, P. W., Langer, C., Treeck, M., Cabrera, A., Bruns, C., Struck, N. S., Kono, M., Engelberg, K., Ruch, U., Stunnenberg, H. G., Gilberger, T.-W., & Spielmann, T. (2009). Sequence requirements for the export of the plasmodium falciparum maurer's clefts protein rex2. Mol Microbiol, 71(4), 1003–1017.
- Hadley, T. J., Klotz, F. W., Pasvol, G., Haynes, J. D., McGinniss, M. H., Okubo, Y., & Miller, L. H. (1987). Falciparum malaria parasites invade erythrocytes that lack glycophorin a and b (mkmk). strain differences indicate receptor heterogeneity and two pathways for invasion. J Clin Invest, 80(4), 1190–1193.
- Haldar, K., Kamoun, S., Hiller, N. L., Bhattacharje, S., & van Ooij, C. (2006). Common infection strategies of pathogenic eukaryotes. Nat Rev Microbiol, 4(12), 922–931.
- Haldar, K. & Mohandas, N. (2007). Erythrocyte remodeling by malaria parasites. Curr Opin Hematol, 14(3), 203–209.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. J Mol Biol, 166(4), 557–580.
- Hanks, S. K. & Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. the eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. FASEB J, 9(8), 576–596.
- Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., & GalÃ¡n, J. E. (1998). S. typhimurium encodes an activator of rho gtpases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. Cell, 93(5), 815–826.
- Harris, K. S., Casey, J. L., Coley, A. M., Karas, J. A., Sabo, J. K., Tan, Y. Y., Dolezal, O., Norton, R. S., Hughes, A. B., Scanlon, D., & Foley, M. (2009). Rapid optimization of a peptide inhibitor of malaria parasite invasion by comprehensive n-methyl scanning. J Biol Chem, 284(14), 9361–9371.
- Harris, K. S., Casey, J. L., Coley, A. M., Masciantonio, R., Sabo, J. K., Keizer, D. W., Lee, E. F., McMahon, A., Norton, R. S., Anders, R. F., & Foley, M. (2005). Binding hot spot for invasion inhibitory molecules on plasmodium falciparum apical membrane antigen 1. Infect Immun, 73(10), 6981–6989.

- Harris, P. K., Yeoh, S., Dluzewski, A. R., O'Donnell, R. A., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Bannister, L. H., Mitchell, G. H., & Blackman, M. J. (2005). Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. PLoS Pathog, 1(3), 241–251.
- Harvey, K. L., Gilson, P. R., & Crabb, B. S. (2012). A model for the progression of receptor-ligand interactions during erythrocyte invasion by plasmodium falciparum. Int J Parasitol, 42(6), 567–573.
- Haste, N. M., Talabani, H., Doo, A., Merckx, A., Langsley, G., & Taylor, S. S. (2012). Exploring the plasmodium falciparum cyclic-adenosine monophosphate (camp)-dependent protein kinase (pfpka) as a therapeutic target. Microbes Infect, 14(10), 838–850.
- Haynes, J. D., Dalton, J. P., Klotz, F. W., McGinniss, M. H., Hadley, T. J., Hudson, D. E., & Miller, L. H. (1988). Receptor-like specificity of a plasmodium knowlesi malarial protein that binds to duffy antigen ligands on erythrocytes. J Exp Med, 167(6), 1873–1881.
- Heussler, V., Sturm, A., & Langsley, G. (2006). Regulation of host cell survival by intracellular plasmodium and theileria parasites. Parasitology, 132 Suppl, S49–S60.
- Hiepe, T., Lucius, R., & Gottstein, B. (2006). Allgemeine Parasitologie. Parley.
- Hodder, A. N., Crewther, P. E., Matthew, M. L., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., & Anders, R. F. (1996). The disulfide bond structure of plasmodium apical membrane antigen-1. J Biol Chem, 271(46), 29446–29452.
- Hoffman, S. L., Goh, L. M. L., Luke, T. C., Schneider, I., Le, T. P., Doolan, D. L., Sacci, J., de la Vega, P., Dowler, M., Paul, C., Gordon, D. M., Stoute, J. A., Church, L. W. P., Sedegah, M., Heppner, D. G., Ballou, W. R., & Richie, T. L. (2002). Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated plasmodium falciparum sporozoites. J Infect Dis, 185(8), 1155–1164.
- Holder, A. A. (1988). The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. Prog Allergy, 41, 72–97.

- Holder, A. A., Mohd Ridzuan, M. A., & Green, J. L. (2012). Calcium dependent protein kinase 1 and calcium fluxes in the malaria parasite. Microbes Infect, 14(10), 825–830.
- Howell, S. A., Well, I., Fleck, S. L., Kettleborough, C., Collins, C. R., & Blackman, M. J. (2003). A single malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. J Biol Chem, 278(26), 23890–23898.
- Howell, S. A., Withers-Martinez, C., Kocken, C. H., Thomas, A. W., & Blackman, M. J. (2001). Proteolytic processing and primary structure of plasmodium falciparum apical membrane antigen-1. J Biol Chem, 276(33), 31311–31320.
- Hu, G., Cabrera, A., Kono, M., Mok, S., Chahal, B. K., Haase, S., Engelberg, K., Cheemadan, S., Spielmann, T., Preiser, P. R., Gilberger, T.-W., & Bozdech, Z. (2010). Transcriptional profiling of growth perturbations of the human malaria parasite plasmodium falciparum. Nat Biotechnol, 28(1), 91–98.
- Hur, E.-M. & Zhou, F.-Q. (2010). Gsk3 signalling in neural development. Nat Rev Neurosci, 11(8), 539–551.
- Isberg, R. R. & Barnes, P. (2001). Subversion of integrins by enteropathogenic yersinia. J Cell Sci, 114(Pt 1), 21–28.
- Ishino, T., Chinzei, Y., & Yuda, M. (2005). Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte. Mol Microbiol, 58(5), 1264–1275.
- Ito, D., Han, E.-T., Takeo, S., Thongkukiatkul, A., Otsuki, H., Torii, M., & Tsuboi, T. (2011). Plasmodial ortholog of toxoplasma gondii rhoptry neck protein 3 is localized to the rhoptry body. Parasitol Int, 60(2), 132–138.
- Johnson, L. N. & Lewis, R. J. (2001). Structural basis for control by phosphorylation. Chem Rev, 101(8), 2209–2242.
- Kadekoppala, M. & Holder, A. A. (2010). Merozoite surface proteins of the malaria parasite: the msp1 complex and the msp7 family. Int J Parasitol, 40(10), 1155–1161.

- Klasse, P. J. (2012). The molecular basis of hiv entry. Cell Microbiol, 14(8), 1183–1192.
- Knottnerus, O. (2002). Malaria Around the North Sea: A Survey. In: Climatic Development and History of the North Atlantic Realm: Hanse Conference Report. E. Springer-Verlag, Berlin.
- Kocken, C. H. M., Withers-Martinez, C., Dubbeld, M. A., van der Wel, A., Hackett, F., Valderrama, A., Blackman, M. J., & Thomas, A. W. (2002). High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. Infect Immun, 70(8), 4471–4476.
- Koivomaegi, M., Valk, E., Venta, R., Iofik, A., Lepiku, M., Balog, E. R. M., Rubin, S. M., Morgan, D. O., & Loog, M. (2011). Cascades of multisite phosphorylation control sic1 destruction at the onset of s phase. Nature, 480(7375), 128–131.
- Kono, M., Herrmann, S., Loughran, N. B., Cabrera, A., Engelberg, K., Lehmann, C., Sinha, D., Prinz, B., Ruch, U., Heussler, V., Spielmann, T., Parkinson, J., & Gilberger, T. W. (2012). Evolution and architecture of the inner membrane complex in asexual and sexual stages of the malaria parasite. Mol Biol Evol, 29(9), 2113–2132.
- Koussis, K., Withers-Martinez, C., Yeoh, S., 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 J, 28(6), 725–735.
- Krotoski, W. A. (1989). The hypnozoite and malarial relapse. Prog Clin Parasitol, 1, 1–19.
- Kumar, N., Koski, G., Harada, M., Aikawa, M., & Zheng, H. (1991). Induction and localization of plasmodium falciparum stress proteins related to the heat shock protein 70 family. Mol Biochem Parasitol, 48(1), 47–58.
- Kumar, P., Lyle, K. S., Gierke, S., Matov, A., Danuser, G., & Wittmann, T. (2009). Gsk3beta phosphorylation modulates clasp-microtubule association and lamella microtubule attachment. J Cell Biol, 184(6), 895–908.

- Kun, J. F., Hibbs, A. R., Saul, A., McColl, D. J., Coppel, R. L., & Anders, R. F. (1997). A putative plasmodium falciparum exported serine/threonine protein kinase. Mol Biochem Parasitol, 85(1), 41–51.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J Biochem Biophys Methods, 10(3-4), 203–209.
- Lachish, S., Knowles, S. C. L., Alves, R., Wood, M. J., & Sheldon, B. C. (2011). Infection dynamics of endemic malaria in a wild bird population: parasite species-dependent drivers of spatial and temporal variation in transmission rates. J Anim Ecol, 80(6), 1207–1216.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. Nature, 227(5259), 680–685.
- Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J.-F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B. W., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Boulanger, M. J., Bentley, G. A., & Lebrun, M. (2011). The ron2-ama1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. PLoS Pathog, 7(2), e1001276.
- Langhorne, J., Ndungu, F. M., Sponaas, A.-M., & Marsh, K. (2008). Immunity to malaria: more questions than answers. Nat Immunol, 9(7), 725–732.
- Lasonder, E., Green, J. L., Camarda, G., Talabani, H., Holder, A. A., Langsley, G., & Alano, P. (2012). The plasmodium falciparum schizont phosphoproteome reveals extensive phosphatidylinositol and camp-protein kinase a signaling. J Proteome Res, 11(11), 5323–5337.
- Lasonder, E., Treeck, M., Alam, M., & Tobin, A. B. (2012). Insights into the plasmodium falciparum schizont phospho-proteome. Microbes Infect, 14(10), 811–819.
- Le Roch, K. G., Zhou, Y., Blair, P. L., Grainger, M., Moch, J. K., Haynes, J. D., De La Vega, P., Holder, A. A., Batalov, S., Carucci, D. J., & Winzeler, E. A. (2003). Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. Science, 301(5639), 1503–1508.

- Leykauf, K., Treeck, M., Gilson, P. R., Nebl, T., Braulke, T., Cowman, A. F., Gilberger, T. W., & Crabb, B. S. (2010). Protein kinase a dependent phosphorylation of apical membrane antigen 1 plays an important role in erythrocyte invasion by the malaria parasite. PLoS Pathog, 6(6), e1000941.
- Loiseau, C., Harrigan, R. J., Cornel, A. J., Guers, S. L., Dodge, M., Marzec, T., Carlson, J. S., Seppi, B., & Sehgal, R. N. M. (2012). First evidence and predictions of plasmodium transmission in alaskan bird populations. PLoS One, 7(9), e44729.
- Lourido, S., Tang, K., & Sibley, L. D. (2012). Distinct signalling pathways control toxoplasma egress and host-cell invasion. EMBO J, 31(24), 4524–4534.
- Lovett, J. L., Marchesini, N., Moreno, S. N. J., & Sibley, L. D. (2002). Toxoplasma gondii microneme secretion involves intracellular  $Ca^{2+}$  release from inositol 1,4,5-triphosphate (ip(3))/ryanodine-sensitive stores. J Biol Chem, 277(29), 25870–25876.
- Lovett, J. L. & Sibley, L. D. (2003). Intracellular calcium stores in toxoplasma gondii govern invasion of host cells. J Cell Sci, 116(Pt 14), 3009–3016.
- Lucius, R. & Loos-Frank, B. (2008). Biologie von Parasiten. Springer Verlag.
- Lyons, N. A., Fonslow, B. R., Diedrich, J. K., Yates, 3rd, J. R., & Morgan, D. O. (2013). Sequential primed kinases create a damage-responsive phosphodegron on ecd1. Nat Struct Mol Biol, 20(2), 194–201.
- Ma, H. T. & Poon, R. Y. C. (2011). How protein kinases co-ordinate mitosis in animal cells. Biochem J, 435(1), 17–31.
- Maier, A. G., Cooke, B. M., Cowman, A. F., & Tilley, L. (2009). Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. Nat Rev Microbiol, 7(5), 341–354.
- Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. Trends Biochem Sci, 27(10), 514–520.

- Marti, M., Baum, J., Rug, M., Tilley, L., & Cowman, A. F. (2005). Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte. J Cell Biol, 171(4), 587–592.
- Martin, R. E. & Kirk, K. (2004). The malaria parasite’s chloroquine resistance transporter is a member of the drug/metabolite transporter superfamily. Mol Biol Evol, 21(10), 1938–1949.
- Mathias, S. L., Scott, A. F., Kazazian, Jr, H., Boeke, J. D., & Gabriel, A. (1991). Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. Science, 254(5039), 1808–1810.
- Mayer, D. C., Kaneko, O., Hudson-Taylor, D. E., Reid, M. E., & Miller, L. H. (2001). Characterization of a plasmodium falciparum erythrocyte-binding protein paralogous to eba-175. Proc Natl Acad Sci U S A, 98(9), 5222–5227.
- McDonough, K. A. & Rodriguez, A. (2012). The myriad roles of cyclic amp in microbial pathogens: from signal to sword. Nat Rev Microbiol, 10(1), 27–38.
- McFadden, G. I. (2011). The apicoplast. Protoplasma, 248(4), 641–650.
- McIntosh, H. M. & Olliaro, P. (2000a). Artemisinin derivatives for treating severe malaria. Cochrane Database Syst Rev, (2), CD000527.
- McIntosh, H. M. & Olliaro, P. (2000b). Artemisinin derivatives for treating uncomplicated malaria. Cochrane Database Syst Rev, (2), CD000256.
- Miranda-Saavedra, D., Gabaldon, T., Barton, G. J., Langsley, G., & Doerig, C. (2012). The kinomes of apicomplexan parasites. Microbes Infect, 14(10), 796–810.
- Montel-Hagen, A., Sitbon, M., & Taylor, N. (2009). Erythroid glucose transporters. Curr Opin Hematol, 16(3), 165–172.
- Moreno, S. N. J., Ayong, L., & Pace, D. A. (2011). Calcium storage and function in apicomplexan parasites. Essays Biochem, 51, 97–110.
- 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.
- Mota, M. M. & Rodriguez, A. (2002). Invasion of mammalian host cells by plasmodium sporozoites. Bioessays, 24(2), 149–156.
- Mota, M. M. & Rodriguez, A. (2004). Migration through host cells: the first steps of plasmodium sporozoites in the mammalian host. Cell Microbiol, 6(12), 1113–1118.
- Moudy, R., Manning, T. J., & Beckers, C. J. (2001). The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of toxoplasma gondii. J Biol Chem, 276(44), 41492–41501.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of dna in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol, 155, 335–350.
- Murphy, R. C., Ojo, K. K., Larson, E. T., Castellanos-Gonzalez, A., Perera, B. G. K., Keyloun, K. R., Kim, J. E., Bhandari, J. G., Muller, N. R., Verlinde, C. L. M. J., White, Jr, A. C., Merritt, E. A., Van Voorhis, W. C., & Maly, D. J. (2010). Discovery of potent and selective inhibitors of calcium-dependent protein kinase 1 (cdpk1) from c. parvum and t. gondii. ACS Med Chem Lett, 1(7), 331–335.
- Narum, D. L. & Thomas, A. W. (1994). Differential localization of full-length and processed forms of pf83/ama-1 an apical membrane antigen of plasmodium falciparum merozoites. Mol Biochem Parasitol, 67(1), 59–68.
- Neal, J. W. & Clipstone, N. A. (2001). Glycogen synthase kinase-3 inhibits the dna binding activity of nfatc. J Biol Chem, 276(5), 3666–3673.
- Nussenzweig, R. S., Vanderberg, J., Most, H., & Orton, C. (1967). Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. Nature, 216(5111), 160–162.
- Obonyo, C. O. & Juma, E. A. (2012). Clindamycin plus quinine for treating uncomplicated falciparum malaria: a systematic review and meta-analysis. Malar J, 11, 2.

- O'Donnell, R. A., Hackett, F., Howell, S. A., Treeck, M., Struck, N., Krnajski, Z., Withers-Martinez, C., Gilberger, T. W., & Blackman, M. J. (2006). Intra-membrane proteolysis mediates shedding of a key adhesin during erythrocyte invasion by the malaria parasite. *J Cell Biol*, *174*(7), 1023–1033.
- O'Donnell, R. A., Saul, A., Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2000). Functional conservation of the malaria vaccine antigen msp-119 across distantly related plasmodium species. *Nat Med*, *6*(1), 91–95.
- Olivieri, A., Collins, C. R., Hackett, F., Withers-Martinez, C., Marshall, J., Flynn, H. R., Skehel, J. M., & Blackman, M. J. (2011). Juxtamembrane shedding of plasmodium falciparum ama1 is sequence independent and essential, and helps evade invasion-inhibitory antibodies. *PLoS Pathog*, *7*(12), e1002448.
- Olotu, A., Lusingu, J., Leach, A., Lievens, M., Vekemans, J., Msham, S., Lang, T., Gould, J., Dubois, M.-C., Jongert, E., Vansadia, P., Carter, T., Njuguna, P., Awuondo, K. O., Malabeja, A., Abdul, O., Gesase, S., Mturi, N., & Drakeley, C. J. (2011). Efficacy of rts,s/as01e malaria vaccine and exploratory analysis on anti-circumsporozoite antibody titres and protection in children aged 5-17 months in kenya and tanzania: a randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*, *11*(2), 102–109.
- Orjih, A. U., Mathew, T. C., & Cherian, P. T. (2012). Erythrocyte membranes convert monomeric ferriprotoporphyrin ix to beta-hematin in acidic environment at malarial fever temperature. *Exp Biol Med (Maywood)*, *237*(8), 884–893.
- Orlandi, P. A., Klotz, F. W., & Haynes, J. D. (1992). A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of plasmodium falciparum recognizes the terminal neu5ac(alpha 2-3)gal- sequences of glycophorin a. *J Cell Biol*, *116*(4), 901–909.
- Pieters, J. (2008). Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbe*, *3*(6), 399–407.
- Pillai, A. D., Addo, R., Sharma, P., Nguitragool, W., Srinivasan, P., & Desai,

- S. A. (2013). Malaria parasites tolerate a broad range of ionic environments and do not require host cation remodelling. *Mol Microbiol*, 88(1), 20–34.
- Pizarro-Cerdá, J. & Cossart, P. (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124(4), 715–727.
- Polley, S. D., Mwangi, T., Kocken, C. H. M., Thomas, A. W., Dutta, S., Lanar, D. E., Remarque, E., Ross, A., Williams, T. N., Mwambingu, G., Lowe, B., Conway, D. J., & Marsh, K. (2004). Human antibodies to recombinant protein constructs of plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (ama1) and their associations with protection from malaria. *Vaccine*, 23(5), 718–728.
- Poser, C. (1999). *An Illustrated History of Malaria*. The Parthenon Publishing Group.
- Price, R. N., Nosten, F., Luxemburger, C., ter Kuile, F. O., Paiphun, L., Chongs-uphajaisiddhi, T., & White, N. J. (1996). Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet*, 347(9016), 1654–1658.
- Proellocks, N. I., Kats, L. M., Sheffield, D. A., Hanssen, E., Black, C. G., Waller, K. L., & Coppel, R. L. (2009). Characterisation of pfron6, a plasmodium falciparum rhoptry neck protein with a novel cysteine-rich domain. *Int J Parasitol*, 39(6), 683–692.
- Ralph, S. A., van Dooren, G. G., Waller, R. F., Crawford, M. J., Fraunholz, M. J., Foth, B. J., Tonkin, C. J., Roos, D. S., & McFadden, G. I. (2004). Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the plasmodium falciparum apicoplast. *Nat Rev Microbiol*, 2(3), 203–216.
- Read, L. K. & Mikkelsen, R. B. (1991). Comparison of adenylate cyclase and camp-dependent protein kinase in gametocytogenic and nongametocytogenic clones of plasmodium falciparum. *J Parasitol*, 77(3), 346–352.
- Richard, D., MacRaild, C. A., Riglar, D. T., Chan, J.-A., Foley, M., Baum, J., Ralph, S. A., Norton, R. S., & Cowman, A. F. (2010). Interaction between plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. *J Biol Chem*, 285(19), 14815–14822.

- Riglar, D. T., Richard, D., Wilson, D. W., Boyle, M. J., Dekiwadia, C., Turnbull, L., Angrisano, F., Marapana, D. S., Rogers, K. L., Whitchurch, C. B., Beeson, J. G., Cowman, A. F., Ralph, S. A., & Baum, J. (2011). Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. Cell Host Microbe, 9(1), 9–20.
- Rocco, F. (2004). The miraculous fever-tree: Malaria, medicine and the cure that changed the world;. Travel Med Infect Dis, 2, 109–110.
- Sabbatani, S., Fiorino, S., & Manfredi, R. (2010). The emerging of the fifth malaria parasite (plasmodium knowlesi): a public health concern? Braz J Infect Dis, 14(3), 299–309.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of dna with a thermostable dna polymerase. Science, 239(4839), 487–491.
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanders, P. R., Kats, L. M., Drew, D. R., O'Donnell, R. A., O'Neill, M., Maier, A. G., Coppel, R. L., & Crabb, B. S. (2006). A set of glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane proteins of plasmodium falciparum is refractory to genetic deletion. Infect Immun, 74(7), 4330–4338.
- Sansonetti, P. (2001). Phagocytosis of bacterial pathogens: implications in the host response. Semin Immunol, 13(6), 381–390.
- Savage, Jr, C., Inagami, T., & Cohen, S. (1972). The primary structure of epidermal growth factor. J Biol Chem, 247(23), 7612–7621.
- Schottelius, J., Gilberger, T., Ehrhardt, S., & Burchard, G. (2010). [plasmodium knowlesi: cause of naturally acquired malaria in humans]. Dtsch Med Wochenschr, 135(7), 297–300.
- Schwartz, L., Brown, G. V., Genton, B., & Moorthy, V. S. (2012). A review of malaria vaccine clinical projects based on the who rainbow table. Malar J, 11, 11.

- Shaw, P. C., Davies, A. F., Lau, K. F., Garcia-Barcelo, M., Wayne, M. M., Lovestone, S., Miller, C. C., & Anderton, B. H. (1998). Isolation and chromosomal mapping of human glycogen synthase kinase-3 alpha and -3 beta encoding genes. Genome, 41(5), 720–727.
- Sherman, I. W. (1998). Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection. ASM Press, Washington.
- Shirley, M. W., Smith, A. L., & Tomley, F. M. (2005). The biology of avian eimeria with an emphasis on their control by vaccination. Adv Parasitol, 60, 285–330.
- Sidhu, A. B. S., Verdier-Pinard, D., & Fidock, D. A. (2002). Chloroquine resistance in plasmodium falciparum malaria parasites conferred by pfert mutations. Science, 298(5591), 210–213.
- Silvie, O., Franetich, J.-F., Charrin, S., Mueller, M. S., Siau, A., Bodescot, M., Rubinstein, E., Hannoun, L., Charoenvit, Y., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Van Gemert, G.-J., Sauerwein, R. W., Blackman, M. J., Anders, R. F., Pluschke, G., & Mazier, D. (2004). A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by plasmodium falciparum sporozoites. J Biol Chem, 279(10), 9490–9496.
- Sim, B. K., Orlandi, P. A., Haynes, J. D., Klotz, F. W., Carter, J. M., Camus, D., Zegans, M. E., & Chulay, J. D. (1990). Primary structure of the 175k plasmodium falciparum erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion. J Cell Biol, 111(5 Pt 1), 1877–1884.
- Sim, B. K., Toyoshima, T., Haynes, J. D., & Aikawa, M. (1992). Localization of the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen in micronemes of plasmodium falciparum merozoites. Mol Biochem Parasitol, 51(1), 157–159.
- Singh, S., Alam, M. M., Pal-Bhowmick, I., Brzostowski, J. A., & Chitnis, C. E. (2010). Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. PLoS Pathog, 6(2), e1000746.

- Singh, S., Plassmeyer, M., Gaur, D., & Miller, L. H. (2007). Mononeme: a new secretory organelle in plasmodium falciparum merozoites identified by localization of rhomboid-1 protease. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(50), 20043–20048.
- Smith, D. B. & Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in escherichia coli as fusions with glutathione s-transferase. Gene, 67(1), 31–40.
- Solyakov, L., Halbert, J., Alam, M. M., Semblat, J.-P., Dorin-Semblat, D., Reiningner, L., Bottrill, A. R., Mistry, S., Abdi, A., Fennell, C., Holland, Z., Demarta, C., Bouza, Y., Sicard, A., Graciotti, M., Tobin, A. B., & Doerig, C. (2011). Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite plasmodium falciparum. Nat Commun, 2, 565.
- 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.
- 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.
- Takahashi, M., Tomizawa, K., Kato, R., Sato, K., Uchida, T., Fujita, S. C., & Imahori, K. (1994). Localization and developmental changes of tau protein kinase i/glycogen synthase kinase-3 beta in rat brain. J Neurochem, 63(1), 245–255.
- Taketo, A. (1988). Dna transfection of escherichia coli by electroporation. Biochim Biophys Acta, 949(3), 318–324.
- Tan, C. S. H., Jorgensen, C., & Linding, R. (2010). Roles of junk phosphorylation in modulating biomolecular association of phosphorylated proteins? Cell Cycle, 9(7), 1276–1280.
- Tewari, R., Straschil, U., Bateman, A., BÄ¶hmer, U., Cherevach, I., Gong, P., Pain, A., & Billker, O. (2010). The systematic functional analysis of plasm-

- dium protein kinases identifies essential regulators of mosquito transmission. Cell Host Microbe, 8(4), 377–387.
- Tham, W.-H., Wilson, D. W., Lopaticki, S., Schmidt, C. Q., Tetteh-Quarcoo, P. B., Barlow, P. N., Richard, D., Corbin, J. E., Beeson, J. G., & Cowman, A. F. (2010). Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for plasmodium falciparum pfrh4 invasion ligand. Proc Natl Acad Sci U S A, 107(40), 17327–17332.
- Timmann, C. & Meyer, C. G. (2010). Malaria, mummies, mutations: Tutankhamun’s archaeological autopsy. Trop Med Int Health, 15(11), 1278–1280.
- Tiruvilumala, P. & Reichman, L. B. (2002). Tuberculosis. Annu Rev Public Health, 23, 403–426.
- Tonkin, M. L., Roques, M., Lamarque, M. H., PugnÃ“re, M., Douguet, D., Crawford, J., Lebrun, M., & Boulanger, M. J. (2011). Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of ama1 with a ron2 peptide. Science, 333(6041), 463–467.
- Trager, W. & Jensen, J. B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. Science, 193(4254), 673–675.
- Treeck, M., Sanders, J. L., Elias, J. E., & Boothroyd, J. C. (2011). The phosphoproteomes of plasmodium falciparum and toxoplasma gondii reveal unusual adaptations within and beyond the parasites’ boundaries. Cell Host Microbe, 10(4), 410–419.
- Treeck, M., Tamborrini, M., Daubenberger, C. A., Gilberger, T. W., & Voss, T. S. (2009). Caught in action: mechanistic insights into antibody-mediated inhibition of plasmodium merozoite invasion. Trends Parasitol, 25(11), 494–497.
- Treeck, M., Zacherl, S., Herrmann, S., Cabrera, A., Kono, M., Struck, N. S., Engelberg, K., Haase, S., Frischknecht, F., Miura, K., Spielmann, T., & Gilberger, T. W. (2009). Functional analysis of the leading malaria vaccine candidate ama-1 reveals an essential role for the cytoplasmic domain in the invasion process. PLoS Pathog, 5(3), e1000322.

- Tricker, E. & Cheng, G. (2008). With a little help from my friends: modulation of phagocytosis through tlr activation. Cell Res, 18(7), 711–712.
- Umlas, J. & Fallon, J. N. (1971). New thick-film technique for malaria diagnosis. use of saponin stromatolytic solution for lysis. Am J Trop Med Hyg, 20(4), 527–529.
- Valbuena, J., Rodríguez, L., Vera, R., Puentes, A., Curtidor, H., Cort  s, J., Rosas, J., & Patarroyo, M. E. (2006). Synthetic peptides from plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (ama-1) specifically interacting with human hepatocytes. Biochimie, 88(10), 1447–1455.
- Vulliez-Le Normand, B., Tonkin, M. L., Lamarque, M. H., Langer, S., Hoos, S., Roques, M., Saul, F. A., Faber, B. W., Bentley, G. A., Boulanger, M. J., & Lebrun, M. (2012). Structural and functional insights into the malaria parasite moving junction complex. PLoS Pathog, 8(6), e1002755.
- Waller, R. F. & McFadden, G. I. (2005). The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. Curr Issues Mol Biol, 7(1), 57–79.
- Wang, Y., Weiss, L. M., & Orlofsky, A. (2010). Coordinate control of host centrosome position, organelle distribution, and migratory response by toxoplasma gondii via host mtorc2. J Biol Chem, 285(20), 15611–15618.
- Ward, P., Equinet, L., Packer, J., & Doerig, C. (2004). Protein kinases of the human malaria parasite plasmodium falciparum: the kinome of a divergent eukaryote. BMC Genomics, 5, 79.
- Weber, K. & Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem, 244(16), 4406–4412.
- White, N. J. (2003). The management of severe falciparum malaria. Am J Respir Crit Care Med, 167(5), 673–674.
- WHO (2012). World malaria report. WHO Malaria Report, 5, 1–195.
- William, T., Menon, J., Rajahram, G., Chan, L., Ma, G., Donaldson, S., Khoo, S., Frederick, C., Jelip, J., Anstey, N. M., & Yeo, T. W. (2011). Severe

- plasmodium knowlesi malaria in a tertiary care hospital, sabah, malaysia. Emerg Infect Dis, 17(7), 1248–1255.
- Woodgett, J. R. (2001). Judging a protein by more than its name: Gsk-3. Sci STKE, 2001(100), re12.
- Wu, Y., Sifri, C. D., Lei, H. H., Su, X. Z., & Wellems, T. E. (1995). Transfection of plasmodium falciparum within human red blood cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 92(4), 973–977.
- Yeung, S., Socheat, D., Moorthy, V. S., & Mills, A. J. (2009). Artemisinin resistance on the thai-cambodian border. Lancet, 374(9699), 1418–1419.
- Yoshida, S., Katayama, E., Kuwae, A., Mimuro, H., Suzuki, T., & Sasakawa, C. (2002). Shigella deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes rac1 activity and efficient bacterial internalization. EMBO J, 21(12), 2923–2935.
- Yu, L., Gaskell, S. J., & Brookman, J. L. (1998). Epitope mapping of monoclonal antibodies by mass spectrometry: identification of protein antigens in complex biological systems. J Am Soc Mass Spectrom, 9(3), 208–215.
- Zhang, V. M., Chavchich, M., & Waters, N. C. (2012). Targeting protein kinases in the malaria parasite: update of an antimalarial drug target. Curr Top Med Chem, 12(5), 456–472.
- Zhou, F.-Q. & Snider, W. D. (2005). Cell biology. gsk-3beta and microtubule assembly in axons. Science, 308(5719), 211–214.
- Zuccala, E. S., Gout, A. M., Dekiwadia, C., Marapana, D. S., Angrisano, F., Turnbull, L., Riglar, D. T., Rogers, K. L., Whitchurch, C. B., Ralph, S. A., Speed, T. P., & Baum, J. (2012). Subcompartmentalisation of proteins in the rhoptries correlates with ordered events of erythrocyte invasion by the blood stage malaria parasite. PLoS One, 7(9), e46160.

# Abkürzungsverzeichnis

|                   |                                                                                   |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| A                 | Alanin; Ampere                                                                    |
| Abb.              | Abbildung                                                                         |
| AC                | Adenylyl Zykklase                                                                 |
| AK                | Antikörper                                                                        |
| AMA1              | Apikales Membran Antigen 1                                                        |
| Amp               | Ampizillin                                                                        |
| APS               | Ammonium persulfat                                                                |
| AS                | Aminosäure                                                                        |
| ATP               | Adenosintriphosphat                                                               |
| BiP               | luminale Bindeprotein                                                             |
| bp                | Basenpaare                                                                        |
| BSA               | Albumin bovine Fraction V (engl. bovine serum albumin)                            |
| Ca <sup>2+</sup>  | Kalzium                                                                           |
| CaCl <sub>2</sub> | Kalziumchlorid                                                                    |
| cAMP              | zyklisches Adenosinmonophosphat                                                   |
| CDPK              | Ca <sup>2+</sup> abhängige Proteinkinase (engl. calcium dependent protein kinase) |
| CK1               | Casein Kinase 1                                                                   |
| CK2               | Casein Kinase 2                                                                   |
| CO <sub>2</sub>   | Kohlendioxid                                                                      |
| CPD               | zytoplasmatische Domäne (engl. cytoplasmic domain)                                |
| CSP               | circumsporozoite Protein                                                          |
| D                 | Asparaginsäure                                                                    |
| DAPI              | 4',6-diamidino-2-phenylindole                                                     |
| DARC              | Duffy Antigen Receptor für Chemokine                                              |

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                   |                                                       |
|-------------------|-------------------------------------------------------|
| DBL               | Duffy binding like (Domäne)                           |
| DHFR              | Dihydrofolatreduktase                                 |
| dH <sub>2</sub> O | destilliertes Wasser                                  |
| DMSO              | Dimethylsulfoxid                                      |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure                                |
| dNTP              | Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat                    |
| DTT               | 4,4'-(2,2,2-Trichloroethan-1,1-diyl)bis(Chlorobenzen) |
| E                 | Glutaminsäure                                         |
| E.coli            | <i>Escherichia coli</i>                               |
| EBA               | Erythrocyte binding antigen                           |
| EBL               | Erythrocyte binding ligand                            |
| ECL               | Enhanced chemiluminescence                            |
| EDTA              | Ethylen Diamin Tetraacid Säure                        |
| EGF               | Epidermal growth factor                               |
| engl              | Englisch                                              |
| ER                | Endoplasmatisches Retikulum                           |
| EtBr              | Ethidium Bromid                                       |
| EtOH              | Ethanol                                               |
| GAP45             | Glidosome associated protein 45                       |
| gDNA              | genomische DNA                                        |
| GFP               | Grün Fluoreszierendes Protein                         |
| GSK3              | Glykogen Synthase Kinase 3                            |
| GST               | Glutathion-S-Transferase                              |
| HA                | Hämagglutinin                                         |
| HIV               | Humanes Immundefizienzvirus                           |
| HRP               | Meerrettich Peroxidase                                |
| IC <sub>50</sub>  | mittlere inhibitorische Konzentration                 |
| IFA               | Immunfluoreszenzassay                                 |
| IMC               | inner membrane complex                                |
| IPTG              | Isopropyl $\beta$ -D-1-Thiogalactopyranosid           |
| kb                | Kilobasen                                             |
| kDa               | Kilodalton                                            |
| L                 | Liter                                                 |
| LB                | engl. lysogeny broth                                  |
| m                 | milli                                                 |
| M                 | Mol (Mol/L)                                           |
| min               | Minuten                                               |

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                      |                                                               |
|----------------------|---------------------------------------------------------------|
| ml                   | Milliliter                                                    |
| mM                   | Millimol                                                      |
| Mio.                 | Millionen                                                     |
| MSP1                 | merozoite surface protein1                                    |
| n                    | Nano                                                          |
| ng                   | Nanogramm                                                     |
| nm                   | Nanometer                                                     |
| nM                   | Nanomol                                                       |
| Na                   | Natrium                                                       |
| NaAc                 | Natriumacetat                                                 |
| NaCl <sub>2</sub>    | Natriumchlorid                                                |
| OD                   | optische Dichte                                               |
| Pb                   | <i>Plasmodium bergii</i>                                      |
| Pc                   | <i>Plasmodium chabaudi</i>                                    |
| Pf                   | <i>Plasmodium falciparum</i>                                  |
| <i>P. falciparum</i> | <i>Plasmodium falciparum</i>                                  |
| Pk                   | <i>Plasmodium knowlesi</i>                                    |
| Pr                   | <i>Plasmodium reichenowi</i>                                  |
| Pv                   | <i>Plasmodium vivax</i>                                       |
| PBS                  | phosphate buffered saline                                     |
| PCR                  | Polymerase Kettenreaktion                                     |
| PD                   | Prodomäne                                                     |
| PKA                  | Proteinkinase A                                               |
| PKB                  | Proteinkinase B                                               |
| PKC                  | Proteinkinase C                                               |
| PKG                  | Proteinkinase G                                               |
| PLC                  | Phospholipase C                                               |
| PM                   | Plasmamembran                                                 |
| PPM                  | Parasiten Plasmamembran                                       |
| PTRAMP               | Plasmodium thrombospondin-related apical merozoite<br>protein |
| PV                   | Parasitophore Vakuole                                         |
| PVM                  | PV Membran                                                    |
| RAP1                 | Rhoptry associated protein1                                   |
| Rh                   | Retikuloocyte binding homologue                               |
| RON                  | Rhoptry neck protein                                          |
| rpm                  | rotations per minute                                          |

---

## Abkürzungsverzeichnis

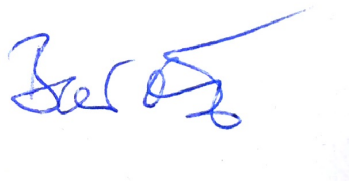
---

|          |                                                          |
|----------|----------------------------------------------------------|
| RPMI     | Roswell Park Memorial Institute (Medium)                 |
| RT       | Raum Temperatur                                          |
| S        | Serin                                                    |
| Sek      | Sekunden                                                 |
| SDS-PAGE | sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis |
| Std      | Stunden                                                  |
| SUB      | Subilisin-like Protease                                  |
| T        | Threonin                                                 |
| TE       | Tris-EDTA                                                |
| TAE      | Triacetat                                                |
| TEMED    | Tetramethylethylenediamin                                |
| TM       | Transmembran                                             |
| TRAP     | Thrombospondin-related anonymous protein                 |
| Tris     | Trishydroxymethylaminomethan                             |
| TSR      | Thrombospondin repeat                                    |
| U        | Unit                                                     |
| UV       | Ultraviolett                                             |
| V        | Volt                                                     |
| Vol      | Volumen                                                  |
| WHO      | Welt Gesundheitsorganisation                             |
| μ        | Mikro                                                    |
| μl       | Mikroliter                                               |
| μg       | Mikrogramm                                               |
| μF       | Mikrofarad                                               |
| μm       | Mikrometer                                               |

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe und alle Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Hamburg, 2013

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Boris Prinz', is written over a faint, rectangular grid pattern.

**Boris Prinz**

# Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Dr. Tim Gilberger dafür bedanken, dass er mich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir die Möglichkeit gegeben hat in dem äußerst spannenden Gebiet der Malaria-Forschung zu arbeiten.

Ein weiterer, großer Dank gilt Dr. Hartwig Lüthen, für die Übernahme der Zweitkorrektur und der freundlichen Hilfe bei allen organisatorischen Fragen.

Ebenso möchte ich mich bei Tobias Spielmann bedanken, für die nette Zusammenarbeit und für die immer freundliche Hilfe.

Ein besonders(!) großer Dank gilt Maya Kono, für das umfangreiche Korrekturlesen dieser Arbeit.

Vielen Dank auch an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der AG Gilberger und der AG Spielmann, durch die die Zeit während der Arbeit und besonders auch nach der Arbeit immer sehr lustig war.

Außerdem möchte ich mich bei allen anderen bedanken, aus dem BNI, meinen Hamburgern, Bonnern, Leverkusenern und Berlinern, die ich leider nicht alle persönlich nennen kann, da das den Rahmen dieser Doktorarbeit eindeutig sprengen würde.

DANKE!

Mein größter Dank geht jedoch an meine Lotte. Ich liebe dich!