

Lokalisation und Funktion der  
Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) aus  
*Plasmodium berghei* (Vincke und Lips, 1948)  
während der Leberphase

---

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
Fachbereich Biologie  
der Universität Hamburg

Vorgelegt von  
Jannika Katharina Brandt geb. Wierk

Hamburg, im Mai 2015

Tag der Disputation: 31.07.2015

Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:

Prof. Dr. Egbert Tannich (Leiter der Molekularen Parasitologie am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin Hamburg)

PD Dr. Hartwig Lüthen (Abteilung der Molekularen Pflanzenphysiologie der Universität Hamburg)

Aus dieser Dissertation hervorgegangene Publikationen:

WIERK JK, LANGBEHN A, KAMPER M, RICHTER S, BURDA PC, HEUSSLER VT, DESCHERMEIER C, 2013. *Plasmodium berghei* MAPK1 displays differential and dynamic subcellular localizations during liver stage development. PLoS One. 8(3):e59755. doi: 10.1371/journal.pone.0059755.

Poster (Malaria-Meeting, Aachen 2013):

Jannika Katharina Wierk, Maria Kamper, Heidrun von Thien, Anna Bachmann, Egbert Tannich, Volker Theo Heussler, Christina Deschermeier. Live-cell imaging of mitogen-activated protein kinase localization in *Plasmodium berghei* liver stage parasites.

## ZUSAMMENFASSUNG

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind Serin-/Threonin-spezifische Proteinkinasen, die in eukaryotischen Zellen an zahlreichen Prozessen wie Embryogenese, Zelldifferenzierung, Zellproliferation, dem Überleben der Zelle, aber auch dem Zelltod beteiligt sind. Im Malaria-Erreger *Plasmodium* sind zwei Vertreter der MAPK (MAPK1, MAPK2) identifiziert worden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die entsprechenden Gene (*pbmapk1*, *pbmapk2*) während der gesamten Entwicklung von *Plasmodium berghei* in der Leber transkribiert werden. Durch eine Fusion des endogenen *pbmapk1*-Lokus mit *gfp* konnte die Expression des Proteins sowohl in der Blut- als auch in der Leberphase nachgewiesen werden. Die im *live imaging* beobachtete Lokalisation der endogenen PbMAPK1 als GFP-Fusionsprotein bestätigt hierbei das in vorangegangenen Arbeiten beschriebene dynamische Lokalisationsmuster der überexprimierten PbMAPK1 als GFP-Fusionsprotein. Zu Beginn der Karyokinese lokalisiert die PbMAPK1 in den Kernen des frühen Leberschizonten und bildet später im Zytomerstadium, zu Beginn der Zytokinese, distinkte Strukturen in der Nähe der Parasitenkerne und der invaginierenden Parasitenmembran aus. In Bezug auf die Kernlokalisierung der PbMAPK1 konnten funktionale Kernlokalisierungssignale (NLS, *nuclear localization signal*) in der C-terminalen Domäne identifiziert werden. Die distinkten Strukturen der PbMAPK1 während des Zytomer-Stadiums in der Leberphase könnten für eine Beteiligung am Zytokinese-Prozess sprechen. Die mit der PbMAPK1 vergleichbaren Lokalisationsmuster der im Rahmen dieser Arbeit visualisierten Komponenten des Zytokinese-Apparates des Parasiten (Centrosomen und das Phosphatidylinositol PI3P) unterstützen diese These. Interessanterweise zeigten *pbmapk1*-defiziente Parasiten gegenüber dem Wildtyp keine Veränderungen während der Entwicklung in der Leber hinsichtlich Infektiösität, Viabilität und Morphologie. Um einen Unterschied in Bezug auf die mRNA-Expression des Gens *pbmapk2* identifizieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Methode der quantitativen *real-time* PCR für die Analyse von relativen Expressionslevel in *Plasmodium*- Leberstadien etabliert. Die Ergebnisse zeigten eine verstärkte Transkription der *pbmapk2* in *pbmapk1*-defizienten-Parasiten während des Karyokinese-Prozesses. Dies könnte ein Hinweis auf eine funktionelle Kompensation der fehlenden PbMAPK1 durch die PbMAPK2 sein. Allerdings konnten keine Veränderungen in Bezug auf die Lokalisation der überexprimierten PbMAPK2 als GFP-Fusionsprotein in *pbmapk1*-defizienten Parasiten während des Leberstadiums beobachtet werden. Die

PbMAPK2 zeigte als überexprimiertes GFP-Fusionsprotein im *live imaging* eine dauerhafte Assoziation mit den Kernen des Parasiten während der gesamten Leberphase.

## SUMMARY

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are serine/threonine-specific protein kinases and are involved in numerous processes including embryogenesis, differentiation, proliferation, cell survival and apoptosis in eukaryotic cells. In *Plasmodium*, the causative agent of malaria, two MAPKs were identified (MAPK1 and MAPK2). This work shows that both corresponding genes are transcribed throughout liver stage development of *Plasmodium berghei*. GFP-tagging of the endogenous PbMAPK1 revealed protein expression in blood and liver stages. The observed subcellular localization of the endogenous protein by live imaging verified the localization pattern observed when PbMAPK1 was overexpressed as a GFP fusion protein in previous studies. At the beginning of karyokinesis, PbMAPK1 localizes to the parasite nuclei of early liver stage schizonts. This work shows that the nuclear localization is mediated by functional nuclear localization signals (NLSs) in the C-terminal domain. In contrast, during the cytomere stage, the starting point of cytokinesis, the PbMAPK1 forms distinct structures in proximity to the parasite nuclei and the invaginating parasite plasma membrane. The visualization of components of the cytokinesis machinery (centrosomes and phosphatidylinositol PI3P) showed a localization pattern resembling that of PbMAPK1, supporting the hypothesis that PbMAPK1 is involved in parasite cytokinesis. However, *pbmapk1*-knockout parasites showed no differences to wild-type parasites in terms of infectivity, viability and morphology during liver stage development. To reveal whether this lack of phenotype might be due to upregulation of *pbmapk2* mRNA levels, quantitative real time PCR was established for *Plasmodium berghei* liver stages for the first time. Indeed, the results showed an upregulation in *pbmapk2* mRNA expression in *pbmapk1*-knockout parasites, hinting at functional compensation by PbMAPK2. Despite this, no change in the localization of GFP-tagged PbMAPK2 could be detected in *pbmapk1*-knockout parasites; the PbMAPK2 showed a permanent association to the parasite nuclei throughout the liver stage.

## INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG .....	1
SUMMARY .....	3
INHALTSVERZEICHNIS .....	4
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	7
TABELLENVERZEICHNIS .....	9
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	10
1. EINLEITUNG .....	14
1.1 Malaria .....	14
1.1.1 Verbreitung und Erreger der Malaria .....	14
1.1.2 Der Lebenszyklus des Erregers <i>Plasmodium</i> .....	15
1.1.3 Exoerythrozytäres Stadium – die Leberphase .....	17
1.1.4 Erythrozytäres Stadium – die Blutphase .....	18
1.1.5 Die Bedeutung der Leberphase für die Forschung .....	19
1.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen ( <i>mitogen-activated protein kinases</i> , MAPK) .....	20
1.2.1 MAPK – Signaltransduktionswege und ihre Funktionen bei <i>Mammalia</i> .....	20
1.2.2 MAPK bei <i>Plasmodium</i> .....	23
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit .....	28
2 MATERIAL UND METHODEN .....	29
2.1 Material .....	29
2.1.1 Geräte .....	29
2.1.2 Verbrauchsmaterial .....	30
2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien .....	32
2.1.4 Reagenzansätze .....	34
2.1.5 Marker .....	34
2.1.6 Enzyme .....	35
2.1.7 Plasmide und Vektoren .....	35
2.1.8 Oligonukleotide .....	38
2.1.9 Antikörper .....	41
2.1.10 Zellen und Organismen .....	41
2.1.11 Puffer und Medien .....	42
2.1.12 Programme und Datenbanken .....	44

2.2 Molekularbiologische und biochemische Methoden .....	45
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	45
2.2.2 cDNA-Synthese .....	46
2.2.3 Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR) .....	47
2.2.4 Agarosegel-Elektrophorese .....	49
2.2.5 Restriktionsverdau .....	49
2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten .....	50
2.2.7 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren....	51
2.2.8 Herstellung kompetenter Zellen.....	51
2.2.9 Transformation kompetenter Zellen.....	52
2.2.10 Plasmid-Präparationen .....	52
2.2.11 Sequenzierung von DNA .....	53
2.2.12 <i>P. berghei</i> Expressionsvektoren.....	53
2.2.12.1 Der Expressionsvektor pL0031.....	53
2.2.12.2 Die Expressionsvektoren pL0017-GFP-N und pL0017-GFP-N-hDHFR.....	54
2.2.12.3 Der Expressionsvektor pL0017.1.1.....	56
2.2.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	57
2.2.14 Western Blot .....	58
2.3. <i>Plasmodium</i> - spezifische Methoden .....	59
2.3.1 Blutstadium .....	59
2.3.1.1 Bestimmung der Parasitämie .....	59
2.3.1.2 Herstellung von <i>P.berghei</i> - Blutstabilaten.....	59
2.3.1.3 Saponinextraktion .....	60
2.3.1.4 Isolierung von gDNA.....	60
2.3.1.5 Herstellung von transgenen <i>P. berghei</i> Parasiten .....	61
2.3.1.6 Selektion transgener Parasiten .....	63
2.3.1.7 <i>Live imaging</i> von <i>P. berghei</i> Blutstadien.....	64
2.3.2 Mückenstadium.....	64
2.3.2.1 Zucht von <i>Anopheles stephensi</i> .....	64
2.3.2.2 Infektion von <i>Anopheles stephensi</i> - Stechmücken mit <i>Plasmodium berghei</i> .....	65
2.3.2.3 <i>Bite-Back</i> .....	65
2.3.3 Leberstadium.....	66
2.3.3.1 Kultivierung von HepG2- Zellen .....	66
2.3.3.2 Aussäen von HepG2-Zellen .....	67

2.3.3.3	Präparation von Sporozoit	67
2.3.3.4	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA)	68
2.3.3.5	Bestimmung der Infektiosität und Viabilität von transgenen Parasiten	69
2.3.3.6	Live imaging	69
2.3.3.7	RNA-Isolation	70
3	ERGEBNISSE	71
3.1	Expression und Lokalisation der MAPK aus <i>Plasmodium berghei</i>	71
3.1.1	Expression der Gene <i>mapk1</i> und <i>mapk2</i> in <i>P. berghei</i> - Leberstadien	71
3.1.2	Expression der endogenen PbMAPK1 als GFP-Fusionsprotein	72
3.1.3	Funktionalität der nuclear localization signals (NLS) im C-terminalen Bereich der PbMAPK1	75
3.1.4	Lokalisation der PbMAPK2 in der Leberphase	77
3.2	Visualisierung des Zytokinese-Apparates in der späten Leberphase	79
3.3	Auswirkungen der Deletion der <i>pbmapk1</i> auf den Parasiten während der Entwicklung in der Leberphase	82
3.3.1	Die Deletion der <i>pbmapk1</i> zeigt keinen Phänotyp in der Leberphase	82
3.3.2	Vergleich der relativen Expression des Gens <i>pbmapk2</i> im Wildtyp und in der <i>pbmapk1</i> -Deletionsmutante	84
3.3.3	Vergleich der Lokalisation der PbMAPK2 im Wildtyp und in der <i>pbmapk1</i> -Deletionsmutante	89
4	DISKUSSION	93
4.1	Expression und Lokalisation der MAPK aus <i>Plasmodium berghei</i>	93
4.2	Auswirkungen der Deletion der <i>pbmapk1</i> auf den Parasiten während der Entwicklung in der Leberphase	97
4.3	Mögliche Funktionen der MAPK aus <i>Plasmodium berghei</i> während der Entwicklung in der Leberphase	100
	LITERATURVERZEICHNIS	105
	ANHANG	116
	DANKSAGUNG	118
	ERKLÄRUNG	119

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i>	15
Abb. 1.2	Eintritt der Sporozoiten in die Leber	16
Abb. 1.3	Entwicklung in der Leberzelle	18
Abb. 1.4	Schematische Darstellung einer MAPK-Signalkaskade	21
Abb. 1.5	Schematischer Vergleich der MAPK- Familien ERK, JNK und p38	22
Abb. 1.6	Schematische Darstellung der MAPK aus <i>Plasmodium berghei</i>	24
Abb. 1.7	PbMAPK1 weist eine differentielle und dynamische subzelluläre Lokalisation während der Entwicklung in der Leberphase auf	26
Abb. 1.8	Schematische Darstellung des Lokalisationsmusters des Fusionsproteins PbMAPK1-GFP im Leberstadium von <i>P. berghei</i>	27
Abb. 2.1	Verwendete Marker	34
Abb. 2.2	Plasmide und Vektoren	36
Abb. 2.3	Schematische Darstellung des pL0031-Vektors	54
Abb. 2.4	Schematische Darstellung der pL0017-GFP-N- basierenden Vektoren	55
Abb. 2.5	Schematische Darstellung des pL0017.1.1-Vektors	56
Abb. 2.6	Schizonten-Isolation mittels Dichte-Gradienten-Zentrifugation	62
Abb. 3.1	Expression der Gene <i>pbmapk1</i> und <i>pbmapk2</i> zu verschiedenen Zeitpunkten in der Leberphase	71
Abb. 3.2	Fusion des endogenen <i>pbmapk1</i> - Locus an <i>gfp</i>	72
Abb. 3.3	Nachweis der Expression der endogenen PbMAPK1 als GFP-Fusionsprotein	74
Abb. 3.4	Funktionalität der NLS- <i>cluster</i> im C-terminalen Bereich der PbMAPK1	76
Abb. 3.5	Schematische Darstellung der Integration des Konstruktes pL0017-GFP-N-PbMAPK2	77
Abb. 3.6	Lokalisation der PbMAPK2 während der Leberphase	78
Abb. 3.7	Herstellung der <sub>LSA4</sub> Centrin3-GFP- bzw. <sub>LSA4</sub> 2xFYVE-GFP-Parasiten	80
Abb. 3.8	Lokalisation von Centrin3-GFP und 2xFYVE-GFP in der späten Leberphase (Zytomer)	81
Abb. 3.9	Die Deletion der <i>pbmapk1</i> zeigt keinen Phänotyp während der Leberphase	83
Abb. 3.10	Ermittlung der Primer-Effizienzen mittels gDNA- Titration	86

Abb. 3.11	Die für die qPCR- Analyse verwendeten Parasiten zeigen eine korrekte Entwicklung in der Leberphase	87
Abb. 3.12	Relative Expressionslevel des Gens <i>pbmapk2</i> im Wildtyp bzw. im PbMAPK1-KO	88
Abb. 3.13	Vergleich der Mittelwerte der relativen Expressionslevel des Gens <i>pbmapk2</i> im Wildtyp und im PbMAPK1-KO	89
Abb. 3.14	Schematische Darstellung der Integration des Konstruktes pL0017-hDHFR-GFP-N-PbMAPK2	90
Abb. 3.15	Lokalisation der PbMAPK2 im PbMAPK1-Wildtyp	91
Abb. 3.16	Lokalisation der PbMAPK2 im PbMAPK1-KO	92
Abb. 4.1	Schematische Darstellung der MAPK1 aus <i>Plasmodium berghei</i> und <i>Plasmodium falciparum</i>	96
Abb. 4.2	Vergleich der Zytokinese in <i>Mammalia</i> mit dem Ablauf des Zytokinese-Prozesses während des Zytomer-Stadiums in der Leberphase von <i>Plasmodium berghei</i>	104

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tab. 2.1	Geräte	29
Tab. 2.2	Verbrauchsmaterial	30
Tab. 2.3	Chemikalien und Biochemikalien	32
Tab. 2.4	Reagenzansätze	34
Tab. 2.5	Enzyme	35
Tab. 2.6	Plasmide und Vektoren	35
Tab. 2.7	Oligonukleotide	38
Tab. 2.8	Primäre Antikörper	41
Tab. 2.9	Sekundäre Antikörper	41
Tab. 2.10	Zellen und Organismen	41
Tab. 2.11	Puffer und Medien	42
Tab. 2.12	Programme und Datenbanken	44
Tab. 2.13	Reaktionsansatz und PCR-Programm	45
Tab. 2.14	Primermischungsverhältnisse	47
Tab. 2.15	qPCR-Ansatz	48
Tab. 2.16	qPCR-Programm	48
Tab. 2.17	Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel	57
Tab. Anhang	qPCR-Rohdaten	116

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
<i>A. stephensi</i>	<i>Anopheles stephensi</i>
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
c-/d-ssurra	c-/d- Abschnitt <i>small subunit</i> <i>ribosomal rna</i>
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
CSP	<i>circum sporozoite protein</i>
C-terminal	am Carboxy-Ende
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
dhfr/ts	Dihydrofolat Reduktase/ Thymidilat Synthetase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'- triphosphat
Dpi	<i>days post infection</i>

DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1 $\alpha$	Elongationsfaktor 1 alpha
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular regulated kinases</i>
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
Exp1	Export Protein1
FCS	<i>Foetal calf serum</i>
g	Gramm, Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunden, humane
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HepG2	Humane Hepatomazelllinie
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
hpi	<i>hours post infection</i>
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
i.v.	intravenös
JNK	<i>Jun NH2-terminal kinases</i>
k	Kilo
kana	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LSA4	<i>liver stage specific antigen 4</i>
$\mu$	mikro
m	milli, Meter
M	molar
mA	milli-Ampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
MSP1	<i>merozoite surface protein 1</i>
n	nano
NES	<i>nuclear export signal</i>
NIMA	<i>never in mitosis, Aspergillus</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
Nt	Nukleotide
N-terminal	am Amino-Ende
OD	Optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
Pb	<i>Plasmodium berghei</i>
PbMAPK	<i>Plasmodium berghei</i> mitogen- aktivierte Proteinkinase
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfMAPK	<i>Plasmodium falciparum</i> mitogen- aktivierte Proteinkinase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer, dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PFA	Para-Formaldehyd
PV	parasitophore Vakuole
PVM	parasitophore Vakuolenmembran
Py	<i>Plasmodium yoelii</i>
Pyr	Pyrimethamin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunden
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Sodium(Natrium)dodecylsulfat
SH2/3	<i>Src-homology 2/3</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tg, <i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrose-Faktor alpha
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
U	Unit (Einheit der biologischen Aktivität)
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
WHO	<i>World Health Organization</i>
z.B.	zum Beispiel

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Malaria

### 1.1.1 Verbreitung und Erreger der Malaria

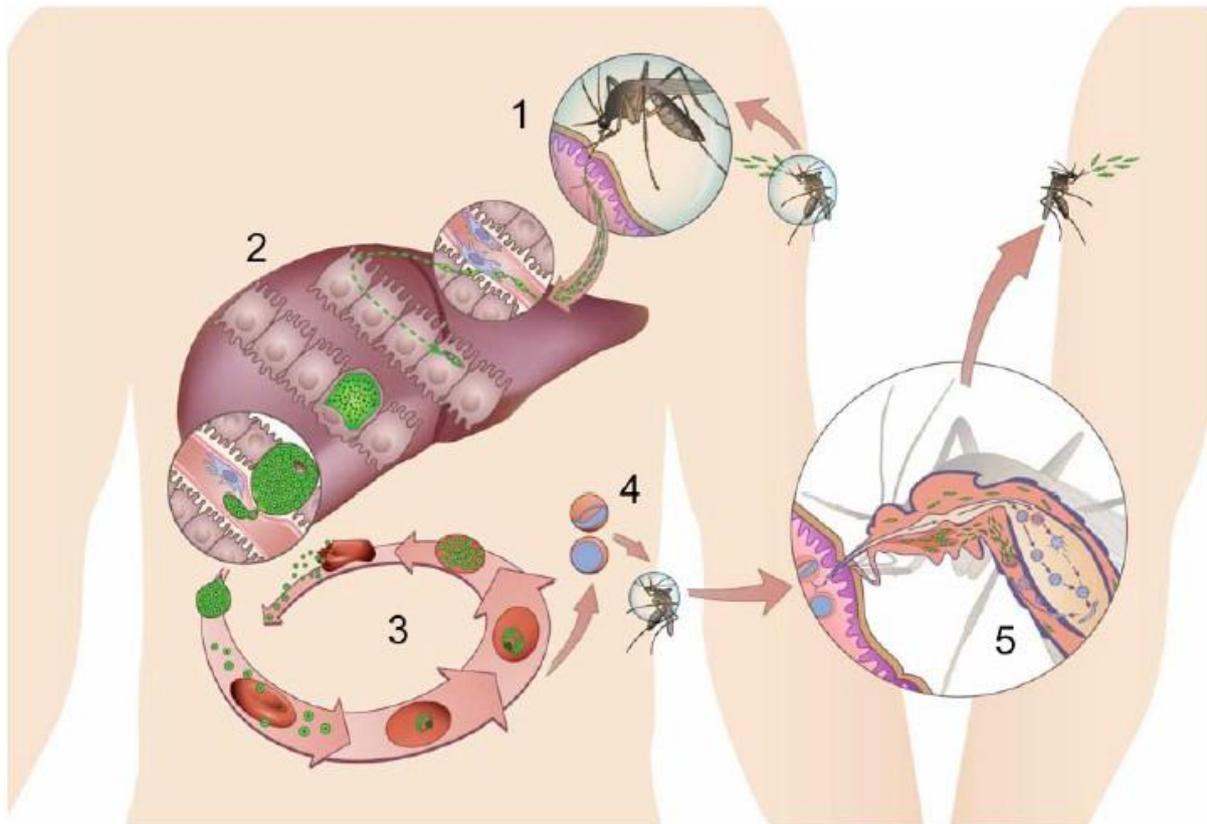
Die Malaria (aus dem italienischen *mala aria* bzw. *mal'aria* – schlechte Luft) gehört neben der Tuberkulose und AIDS zu den drei bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit. Obwohl durch entsprechende Bekämpfungsmaßnahmen die Infektionszahlen und Todesfälle durch Malaria in den letzten 10 Jahren um ca. 30% zurück gegangen sind, ist die Zahl der Neuinfektionen nach wie vor sehr hoch und liegt derzeit bei rund 200 Millionen pro Jahr. Von der Malaria sind vor allem Kinder unter 5 Jahren betroffen. Zweidrittel der jährlich 600.000 Malariatodesfälle finden sich bei Kindern, davon 90% aus Afrika, südlich der Sahara (WHO, *world health organisation*). Bisher wurde noch kein geeigneter Impfstoff zur Marktreife entwickelt, jedoch befinden sich mehrere vielversprechende Kandidaten in klinischen Studien (Kappe et al., 2010). Die umfangreichsten klinischen Studien liegen für den Impfstoff „RTS,S“ der Firma *Glaxo Smith Kline* vor, der nach ca. 30 Jahren Entwicklungsgeschichte offenbar kurz vor der Markteinführung steht. Er erreicht jedoch nur einen eher moderaten Schutz von ca. 46% (The RTS,S clinical Trials Partnership, 2014).

Die Malaria gehört zu den *vector borne diseases*. Der Erreger, ein Protozoon der Gattung *Plasmodium* wird über den Stich einer weiblichen Stechmücke der Gattung *Anopheles* übertragen. Die Gattung *Plasmodium* umfasst eine große Zahl unterschiedlicher Arten, von denen fünf eine Malaria beim Menschen verursachen können: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* und erst kürzlich beschrieben *Plasmodium knowlesi* (Ta Tang et al., 2010). Die gefährlichste Form der Malaria, die sogenannte „Malaria tropica“, ist verantwortlich für die meisten Todesfälle und wird durch den Erreger *Plasmodium falciparum* ausgelöst.

Da für die Entwicklung der Parasiten in der Überträgermücke je nach Art entsprechend hohe Temperaturen nötig sind, befinden sich die Endemiegebiete der Malaria vor allem in tropischen und subtropischen Ländern. Hierzu zählen sowohl Länder in Süd- und Mittelamerika, als auch in Teilen der Karibik, im südpazifischen Raum sowie in Asien (Indien, Südostasien, mittlerer Osten), Ost-Europa und vor allem in Afrika südlich der Sahara. Laut WHO lebt beinahe die Hälfte der Weltbevölkerung in Malaria-Risiko Gebieten.

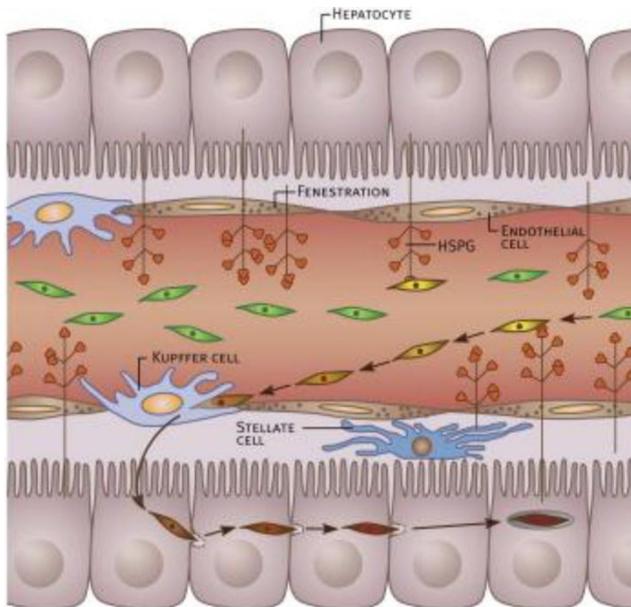
### 1.1.2 Der Lebenszyklus des Erregers *Plasmodium*

Protozoen der Gattung *Plasmodium* durchlaufen einen komplexen Lebenszyklus mit zahlreichen Entwicklungsstadien und wechseln dabei zwischen dem Vektor, der weiblichen *Anopheles*-Mücke als Endwirt, und dem Menschen oder anderen Vertebraten als Zwischenwirt (siehe Abb.1.1).



**Abb. 1.1:** Der Lebenszyklus von *Plasmodium*. (1) Bei einem Stich einer weiblichen, infizierten Anopheles-Mücke (Endwirt) werden die Sporozoiten aus den Speicheldrüsen in die Haut des Vertebraten (Zwischenwirt) injiziert und gelangen in die Blutbahn. (2) In den Leber-Sinusoiden adhärieren sie an Endothelzellen und gelangen über die Kupfferzellen in das Lebergewebe. Hierbei durchqueren sie zunächst einige Hepatozyten, bis sie schließlich unter Ausbildung einer parasitophoren Vakuole eine finale Leberzelle infizieren. Innerhalb dieser parasitophoren Vakuole beginnt die Replikation des Parasiten zu einem vielkernigen Schizontenstadium, aus dem Tausende von einkernigen Merozoiten hervorgehen. Zum Ende der Leberphase werden diese Merozoiten in das Wirtszellzytoplasma freigesetzt und unter Ausbildung von Merosomen in die Lebersinusoiden abgeschürt. (3) Innerhalb der Merosomen gelangen die Merozoiten in den Blutstrom und befallen nach Freisetzung Erythrozyten. Erneut beginnt eine Replikationsphase, an deren Ende über ein vielkerniges Schizontenstadium neue Merozoiten hervorgehen, welche durch Platzen der Erythrozyten freigesetzt werden und erneut Erythrozyten infizieren können. (4) Einige Parasiten entwickeln sich hierbei zu männlichen und weiblichen Gametozysten, welche bei der Blutmahlzeit einer Mücke aufgenommen werden können und die geschlechtliche Vermehrung im Vektor ermöglichen. (5) Im Darm der Mücke entwickeln sich die Gametozysten zu Gameten, die durch Verschmelzung eine bewegliche Zygote (Ookinete) hervorbringen, die sich im Mitteldarmepithel zur Oozyste entwickelt. Aus einer Oozyste entstehen Tausende Sporozoiten, welche über die Hämolymphe der Mücke die Speicheldrüsen invadieren. Bei der nächsten Blutmahlzeit der infizierten Mücke werden die Sporozoiten mit dem Speichelsekret auf einen neuen Vertebratenwirt übertragen. *Quelle: Sturm und Heussler (2007)*

Die Infektion des Menschen und anderer Vertebraten beginnt mit dem Stich einer weiblichen, mit *Plasmodien* infizierten, *Anopheles*-Mücke. Diese injiziert zu Beginn der Blut-Mahlzeit eine geringe Menge Speichel. Dieser enthält neben Vasodilatoren und anti-Koagulantien auch den Erreger in Form sogenannter Sporozoiten. Die Sporozoiten gelangen dabei hauptsächlich in die Dermis und werden nicht direkt in die Blutgefäße injiziert (Amino et al., 2006). In der Dermis können Sporozoiten von Dendritischen Zellen phagozytiert und im nächstgelegenen Lymphknoten naiven T-Zellen präsentiert werden. Ungefähr ein Drittel der injizierten Sporozoiten wandert in das Lymphsystem, während die restlichen Parasiten in die Blutzirkulation des Wirtes gelangen (Amino et al., 2006). Über die Blutbahn erreichen die Sporozoiten die Leber-Sinusoide, in denen sie über das CSP (*circumsporozoite protein*) an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) (Frevert et al., 1993) binden, welche auf der Oberfläche von Endothel- und Sternzellen an den Innenwänden der Leber-Sinusoide lokalisiert sind (siehe Abb.1.2). Diese HSPG scheinen stärker sulfatiert zu sein als solche aus anderen Geweben (Lyon et al., 1994), sodass vermutet wird, dass hierdurch eine selektive Erkennung des Zielortes Leber ermöglicht wird. Die Endothelzellen in den Leber-Sinusoiden sind stark fenestriert, jedoch sind die Zwischenräume zu klein, um als Eintrittspforte für die Sporozoiten zu dienen (Wisse et al., 1985). Haben die Sporozoiten an die HSPG gebunden, dringen sie über Kupfferzellen in das Lebergewebe ein, indem sie den Disse'schen Raum (ein mit



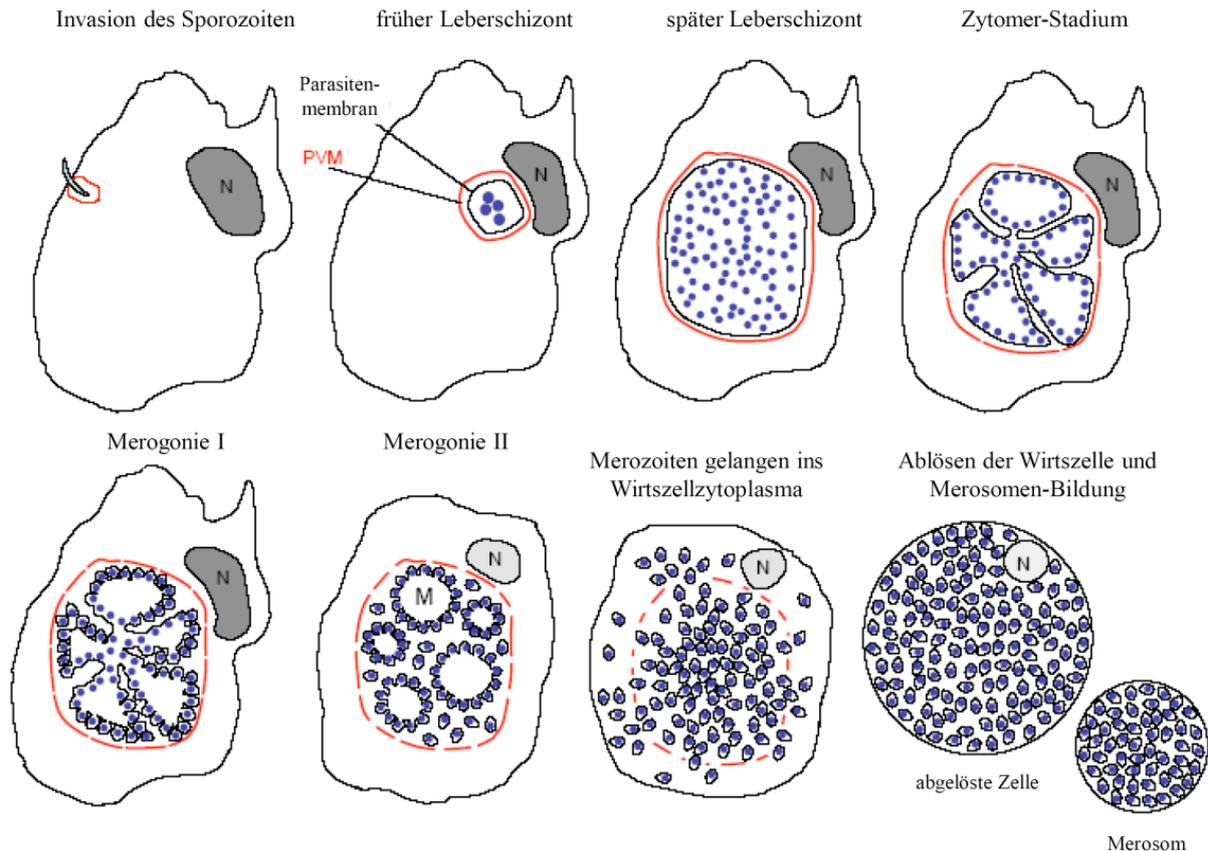
**Abb. 1.2: Eintritt der Sporozoiten in die Leber.** Die Sporozoiten (grün) gelangen in die Leber-Sinusoide und können dort an Heparansulfat-Proteoglycane (HSPGs) auf den Oberflächen von Endothel- und Sternzellen binden. Diese Sporozoiten (gelb) gleiten entlang der Endothelzellen und transmigrieren die Gefäßwände durch Kupfferzellen. Innerhalb des Lebergewebes durchqueren die Sporozoiten einige Leberzellen, bevor sie sich in einer finalen Wirtszelle niederlassen. Prudêncio und Mota, 2007

Blutplasma gefüllter Spalt zwischen dem Endothel und den Hepatozyten) durchqueren (siehe Abb.1.2) (Frevert et al., 2006; Tavares et al., 2013). Im Lebergewebe angekommen, durchwandern die Sporozoiten zunächst mehrere Leberzellen, was zur Verletzung der Zellmembranen jedoch nicht zur Apoptose führt (Leirião et al., 2005). Die finale Wirtszelle wird durch eine Art Endozytose invadiert, wobei sich eine Hülle aus Wirtszellmembran, die parasitophore Vakuole (PV; parasitophore Vakuolenmembran: PVM), um den Parasiten formt (Mota et al., 2001).

### **1.1.3 Exoerythrozytäres Stadium – die Leberphase**

Nach der Infektion der Leberzelle, beginnt die weitere Entwicklung des Parasiten. Dies geschieht in der unmittelbaren Nähe des Wirtszellkerns innerhalb der PV mit einer der rasantesten Kernteilungen aller Eukaryoten (Bano et al., 2007). Die Entwicklung in der Leber, das exoerythrozytäre Stadium des Parasiten, lässt sich in mehrere Stadien unterteilen (siehe Abb. 1.3). Während der rasanten Kernteilungsphase, der Karyokinese ohne jegliche Form von Zytokinese, entwickelt sich der Parasit vom frühen Leberschizonten zum multi-nukleären Syncytium mit mehreren tausend Kernen (der späte Leberschizont) (Gerald et al., 2011). Gleichzeitig werden die Organellen des Parasiten in einem komplexen Vorgang vermehrt (Stanway et al., 2011). Anschließend geht der Leberschizont in das sogenannte Zytomer-Stadium über, bei dem der zweite Schritt, die Zytokinese, durch Invagination der Parasitenmembran eingeleitet wird. Während dieses Vorgangs werden die Parasitenkerne zunächst in ringförmigen Strukturen angeordnet. Die Parasitenmembran umschließt jeden einzelnen Kern mit den dazugehörigen Organellen und schnürt sich ab, wodurch die Merozoiten gebildet werden (Merogonie I und II). Auf diese Weise entstehen aus einem Sporozoiten mehrere tausend Merozoiten (Prudêncio et al., 2006). Nachfolgend bildet sich die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) zurück und die neu gebildeten Merozoiten werden in das Wirtszellzytoplasma entlassen (Sturm et al., 2006; Graewe et al., 2011). Gleichzeitig löst sich die infizierte Leberzelle aus dem Zellverband und es beginnt die Abschnürung von sogenannten Merosomen in die Lebersinusoide (Sturm et al., 2006). Merosomen sind Merozoiten-haltige Vesikel, deren Membran aus Wirtszellmembran besteht. Sie ermöglicht den Merozoiten einen sicheren Transport vorbei an Dendritischen Zellen und Kupffer-Zellen zurück in die Blutzirkulation, ohne vom Immunsystem erkannt zu werden (Sturm et al., 2006; Graewe et al., 2011). Generell scheint die Wirtszelle während der gesamten Leberphase vom Parasiten kontrolliert und manipuliert zu werden. Die Infektion führt nicht zur Apoptose der Leberzelle und es kommt nicht zur Aktivierung und Rekrutierung von entsprechenden Immunzellen (van de Sand et al., 2005).

Eine weitere Besonderheit findet sich bei Infektionen mit den Erregern *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax*. Sie sind in der Lage dormante Stadien, sogenannte Hypnozoiten, auszubilden. Diese können auch noch nach mehreren symptomfreien Jahren aus der Leber freigesetzt werden und somit nach längerer Latenzzeit eine Malaria hervorrufen.



**Abb. 1.3: Entwicklung in der Leberzelle.** Der Sporozoit invadiert in einem endozytotischen Prozess die Leberzelle und formt hierbei die parasitophore Vakuole (PV) unter Verwendung der Wirtszellmembran (parasitophore Vakuolenmembran: PVM). In der unmittelbaren Nähe des Wirtszellkerns durchläuft der Parasit die Schizogonie vom frühen zum späten Leberschizonten, wobei mehrere Tausend Kerne hervorgehen. Am Ende der rasanten Kernteilungsphase folgt die Anordnung der Kerne in ringförmigen Strukturen sowie die Invagination der Parasitenmembran (Zytomer-Stadium). Die Parasitenmembran umhüllt hierbei jeden einzelnen Kern, wodurch die Merozoiten gebildet werden (Merogonie I und II). Anschließend wird die PVM abgebaut und die Merozoiten in das Wirtszellzytoplasma entlassen. Die Leberzelle löst sich aus dem Zellverband ab und es folgt eine Abschnürung von mit Merozoiten gefüllten Vesikeln, den Merosomen, welche in die Blutzirkulation gelangen und somit den Übergang in die erythrozytäre Phase bilden. *Verändert nach Sturm et al., 2009.*

### 1.1.4 Erythrozytäres Stadium – die Blutphase

Innerhalb der Blutzirkulation gelangen die Merosomen in das Lungenkapillarsystem. Dort werden die Merozoiten freigesetzt und sind jetzt in der Lage Erythrozyten zu invadieren (Baer et al., 2007) (Abb.1.1). Dieser Vorgang beschreibt den Beginn der erythrozytären Phase, in der durch eine erneute asexuelle Schizogonie aus einem Merozoiten, über den vielkernigen Schizonten, bis zu 36 neue Merozoiten entstehen. Am Ende eines jeden Vermehrungszyklusses bersten die Erythrozyten und entlassen neue Merozoiten, welche wiederum erneut Erythrozyten invadieren. Erreicht diese exponentielle, zyklische Vermehrungsphase einen kritischen Wert mit einer signifikanten Parasitämie, entwickelt der

Patient Fieber, das klassische Malaria-Symptom. Es entsteht durch platzen der Erythrozyten, gefolgt von einem massivem Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor alpha). Neben der Bildung neuer Merozoiten kann jedoch auch die Bildung von Gametozyten, den sexuellen Parasitenstadien, eingeleitet werden (Abb.1.1). Hierbei entwickeln sich Merozoiten zu weiblichen Makro- bzw. zu männlichen Mikrogametozyten, welche bei einem erneuten Stich einer weiblichen *Anopheles*-Mücke aufgenommen werden und somit die Brücke zwischen dem menschlichen Wirt und dem Vektor (Mücke) bilden. Der Übergang vom Menschen zur Mücke geht für den Parasiten mit einem drastischen Temperaturabfall einher, was mit weiteren Faktoren die Differenzierung des Mikrogametozyten in acht einkernige, begeißelte Mikrogameten initiiert (Exflagellation). Bei der Gamogonie (sexuelle Vermehrung) von *Plasmodium* verschmelzen Makro- und Mikrogamet im Mitteldarm der Stechmücke zu einer beweglichen Zygote, aus der ein länglicher Ookinet hervorgeht. Dieser entwickelt sich in den Epithelschichten des Mitteldarms zur Oozyste. Hier findet anschließend eine erneute asexuelle Vermehrung (Sporogonie) statt, aus der bis zu 1.000 Sporozoiten hervorgehen. Die Entwicklung der Sporozoiten dauert je nach Plasmodienart zwischen 8 und 16 Tage. Die reifen Sporozoiten wandern über die Hämolymphe zu ihrem Zielort, den Speicheldrüsen, und können dann bei einer weiteren Blutmahlzeit von der infizierten Mücke auf einen neuen Wirt übertragen werden.

### **1.1.5 Die Bedeutung der Leberphase für die Forschung**

Bis heute ist, im Gegensatz zur Leberphase, die Blutphase von *Plasmodium* relativ gut charakterisiert. Die meisten Prophylaxe- und Therapieansätze gegen die Malaria zielen daher auf die asexuelle Blutphase des Parasiten. Es wäre jedoch von immensem Vorteil die Entwicklung des Parasiten bereits in der Leberphase zu unterbinden, um das Eintreten in die Blutphase und die damit verbundenen klinischen Symptome der Malaria zu verhindern. Dies würde zudem die Übertragung des Parasiten vom Menschen auf die Mücke unmöglich machen. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit radiativ- oder genetisch-attenuierten Sporozoiten, welche nicht mehr in der Lage waren in die Leber zu gelangen bzw. die Leberphase abzuschließen, einen Schutz vor nachfolgenden Infektionen vermittelt (Frevert & Nardin, 2005; Hoffman et al., 2002; Silvie et al., 2002; Nagel et al., 2013; Spring et al., 2013; Keitany et al., 2014; van Schaijk et al., 2014). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit viablen Sporozoiten unter Prophylaxe mit Chloroquine oder Mefloquine zu einer Immunität führen kann. (Behet et al., 2014; Bijker et

al., 2014). Hierbei dienen die Malariamedikamente Chloroquine und Mefloquine ausschließlich zur Eliminierung der Blutstadien des Parasiten.

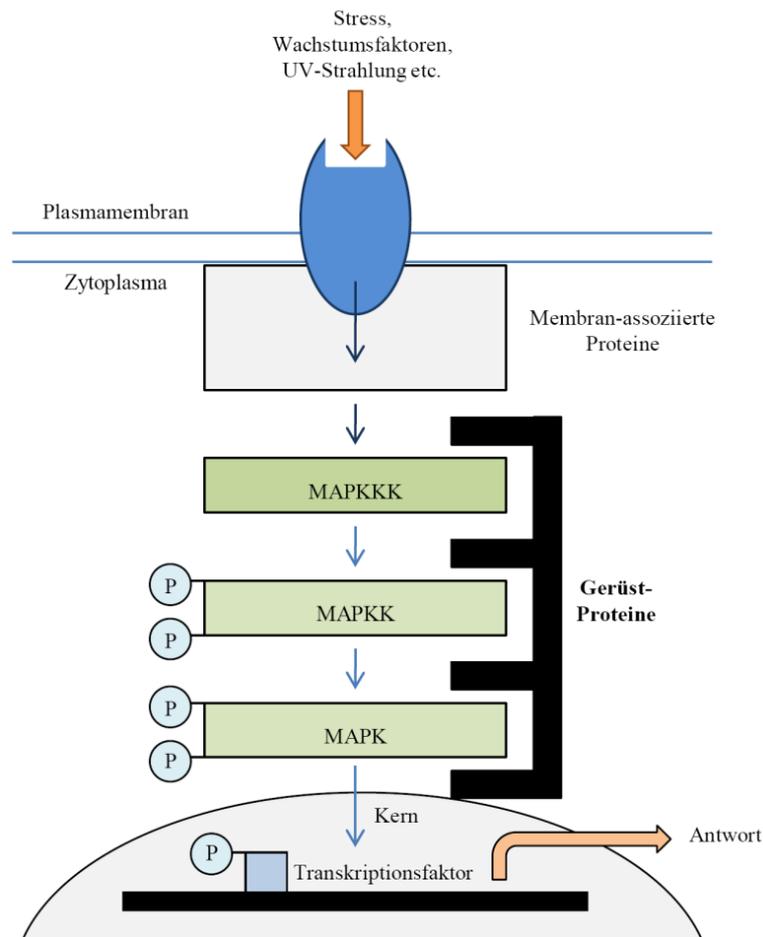
Die Erforschung der prä-erythrozytären Stadien von humanpathogenen Erregern, wie beispielsweise *Plasmodium falciparum*, ist bis heute schwierig, da die Produktion von Sporozoiten eine hohe Sicherheitsstufe erfordert. Darüber hinaus ist die Untersuchung der Leberphase nur in wenig effizienten *in vitro* Leberzellkulturen oder in humanisierten Mäusen möglich (Vaughan et al., 2012), was einen hohen technischen Aufwand erfordert. Aus diesem Grund wird zur Untersuchung der Leberphase in der Regel auf Tiermodelle, unter der Verwendung von Nagetier-pathogenen Erregern wie *Plasmodium berghei* und *Plasmodium yoelii*, zurückgegriffen.

## **1.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK)**

### **1.2.1 MAPK – Signaltransduktionswege und ihre Funktionen bei *Mammalia***

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) gehören zu den Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinasen und sind von den Invertebraten bis hin zu den *Mammalia* stark konserviert (Tanoue et al., 2000). Sie agieren in Signaltransduktionskaskaden, welche durch verschiedenste Signale (z.B. Stress, Wachstumsfaktoren und UV-Strahlung) aktiviert werden können und über einen membranständigen Rezeptor in ein intrazelluläres Signal umgewandelt werden. Dabei sind die MAPK in der Regel Teil eines 3-Stufen-Systems (Abb.1.4), bei dem MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK), MAPK-Kinasen (MAPKK) und letztlich die MAPK (Namensgeber des jeweiligen Signaltransduktionsweges) in einer Kaskade phosphoryliert und aktiviert werden (Widmann et al., 1999; Raman & Cobb, 2003). Das hierfür notwendige und charakteristische Aktivierungsmotiv Threonin-X-Tyrosin (TXY-Motiv) der MAPK befindet sich in ihrer Kinase-Domäne (Pearson et al., 2001). Im aktivierten Zustand sind die MAPK in der Lage ihre Substrate, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, durch Phosphorylierung zu aktivieren. Diese wiederum können dann in den Kern translozieren und die Transkription bestimmter Gene regulieren, was somit in einer biologischen Antwort auf das jeweilige Signal resultiert (Abb.1.4). Auf diesem Wege sind MAPK an zahlreichen Prozessen wie Embryogenese, Zelldifferenzierung, Zellproliferation, dem Überleben der Zelle aber auch

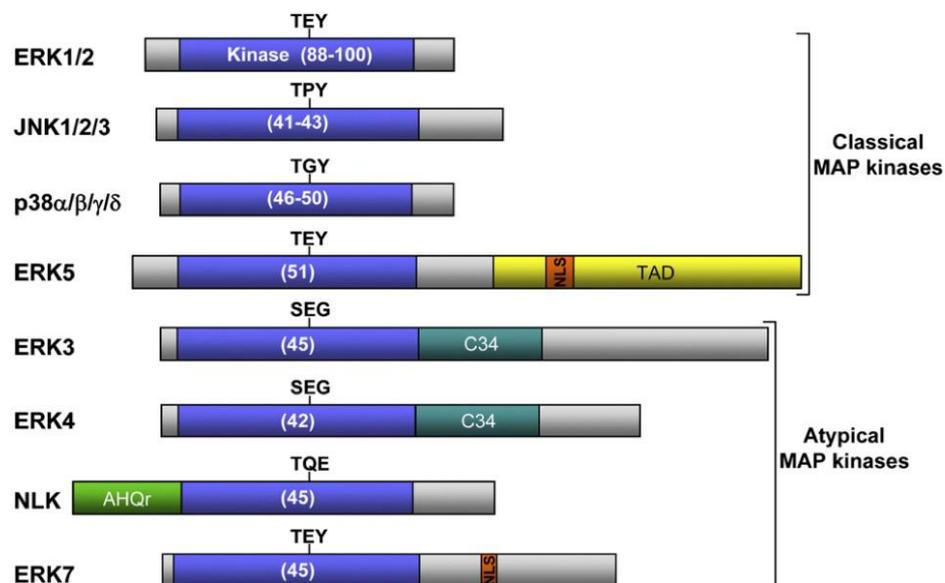
dem Zelltod (Apoptose) beteiligt (Chang & Karin 2001). Aufgrund dieser wichtigen Funktionen in der Zelle sind Proteinkinasen wichtige Zielstrukturen in der Chemotherapie (Cohen, 2001; von Ahsen & Bomer, 2005).



**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung einer MAPK-Signalkaskade. Die Aktivierung der MAPK-Kaskade erfolgt durch die Umwandlung und Weiterleitung von Signalen über einen membranständigen Rezeptor und Membran-assoziierte Proteine. Die aktivierte MAPKKK phosphoryliert die MAPKK, welche daraufhin die MAPK am TXY-Motiv phosphoryliert. Gerüst-Proteine sind dabei an der Zusammenführung der Proteinkinasen beteiligt. Die aktivierte MAPK transloziert in den Kern und phosphoryliert Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription von Genen regulieren und somit eine Antwort auf das jeweilige Signal generieren.

Es sind verschiedene MAPK-Signaltransduktionswege bekannt, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Aktivierungsmuster und Funktionen in die folgenden drei Hauptgruppen eingeteilt werden (Krishna & Narang, 2008): 1) Jun NH<sub>2</sub>-terminale Kinasen (JNK 1/2/3), 2) p38-Kinasen (p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ / $\delta$ ) und 3) ERK (*extracellular regulated kinases* 1 und 2). Die Mitglieder der JNK-Familie werden auch als Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK) bezeichnet und weisen ein Threonin-Prolin-Tyrosin-Motiv (TPY) auf. Der Signalweg wird hauptsächlich durch Zytokine aktiviert und resultiert in der Phosphorylierung der N-

terminalen Aminosäurereste von c-Jun, wodurch sich auch der Name der Familie ableitet. Die p38-MAP-Kinasen besitzen dagegen ein Aktivierungsmotiv aus Threonin, Glycin und Tyrosin (TGY) und werden durch Stress-Signale induziert. Sie stehen beispielweise in Verbindung mit der Osmoregulation und dem Eintritt in den Zell-Zyklus. Die ERK-Familie zeichnet sich durch ein Threonin-Glutaminsäure-Tyrosin-Motiv (TEY) aus. Dieser Signalweg wird sowohl durch Hormone (assoziiert mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren) und Wachstumsfaktoren, aber auch durch Stress, Zytokine und Raf-Kinasen aktiviert. Darüber hinaus lassen sich die MAPK generell in klassische und atypische MAPK einteilen (Abb.1.5). Im Gegensatz zu den klassischen MAPK besitzen die atypischen Mitglieder zusätzlich zur Kinase-Domäne eine C-terminale Extension. Diese vermittelt z.B. bei der atypischen MAPK ERK7 eine Selbst-Aktivierung durch Autophosphorylierung, wodurch ERK7 nicht als ein Bestandteil einer klassischen MAPK-Kaskade angesehen werden kann (Abe et al., 2001). Die MAP-Kinase ERK7 ist an der Regulation der Zellproliferation und der Kontrolle des *nuclear receptor signaling* beteiligt (Abe et al., 1999).



**Abb. 1.5:** Schematischer Vergleich der MAPK-Familien ERK, JNK und p38. Die MAPK besitzen eine Kinase-Domäne (blau) mit flankierenden N- und C-terminalen Extensionen unterschiedlicher Länge. Die Aktivierungsmotive sind für jede Kinase angegeben. TAD: *transactivation domain*; NLS: *nuclear localization signal*; C34: *conserved region in ERK3/4*; AHQr: *alanine (A), histidine (H) and glutamine (Q) rich domain*. Coulombe & Meloche, 2007

### 1.2.2 MAPK bei *Plasmodium*

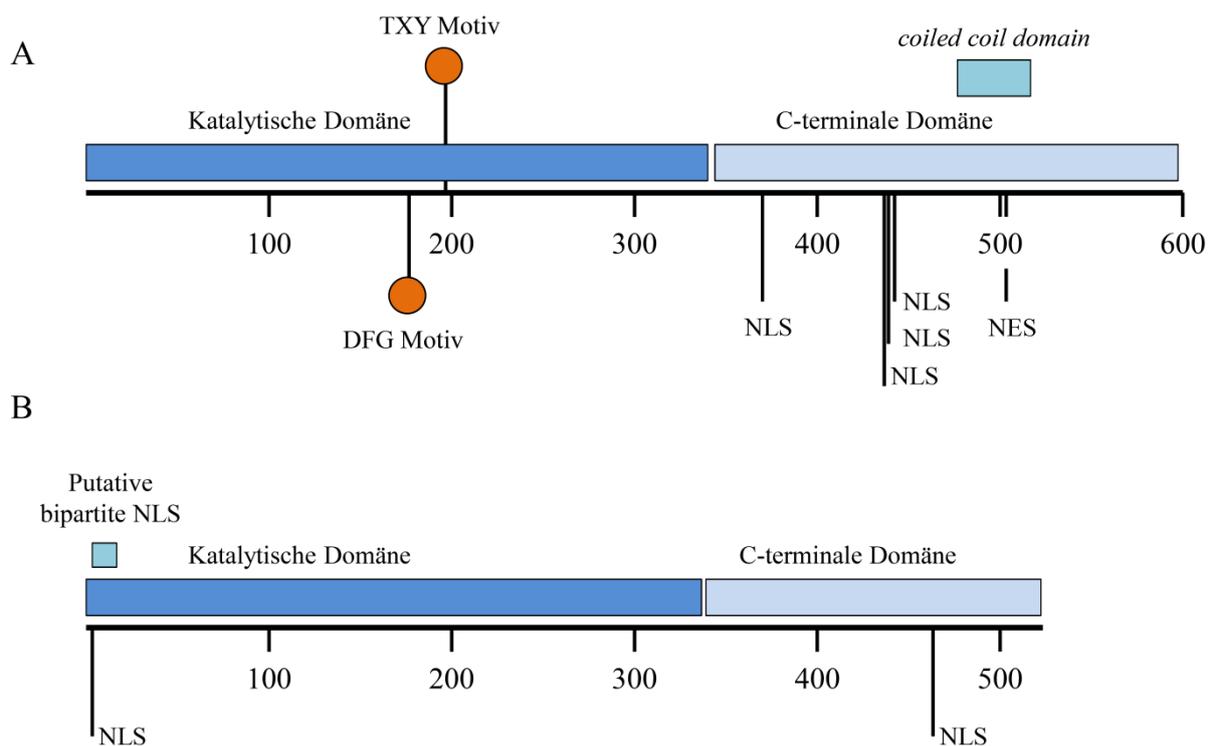
Der komplexe Lebenszyklus von *Plasmodium*, mit Wechsel zwischen extra- und intrazellulären Stadien, sowie zwischen dem Menschen als Wirt und der Mücke als Vektor, erfordert die Fähigkeit auf Veränderungen der Umwelt angemessen reagieren zu können. Beim Übergang vom Menschen auf die Mücke wird beispielsweise über das Zusammenspiel von Temperaturabfall, pH-Erhöhung sowie von Mücken-spezifischen Faktoren wie der Xanthurensäure die Exflagellation männlicher Gametozyten ausgelöst (Nijhout & Carter, 1978; Sinden, 1983; Billker et al., 1998). In *P. falciparum* sind bis zu 100 putative Proteinkinasen bekannt, welche an der Signaltransduktion solcher und anderer Veränderungen zur Regulation von Wachstum, Proliferation und Differenzierung beitragen können (Doerig et al., 2008).

Bisher wurden zwei Vertreter der MAPK bei *P. falciparum* und *P. berghei* identifiziert, MAPK1 und MAPK2 (Graeser et al., 1997; Dorin et al., 1999; Doerig et al., 1996; Lin et al., 1996). Bisher konnten jedoch keine typischen *upstream*-Kinasen, wie MAPKK und MAPKKK, sowie keine Substrate der PfMAPK und PbMAPK (wie z.B. Transkriptionsfaktoren) identifiziert werden. Daher wird vermutet, dass typische 3-Stufen MAPK-Kaskaden in *Plasmodium* nicht vorhanden sind (Lin et al., 1996; Dorin et al., 2005). Allerdings konnten für die beiden MAPK in *P. falciparum* die Aktivatoren Pfnek1 und Pfnek3 (Dorin et al., 2001; Lye et al., 2006) identifiziert werden. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten wurde Letztere der NIMA-Familie (*never in mitosis*, *Aspergillus*-Familie) zugeordnet und stellt somit eine atypische MAPKK dar (Low et al., 2007).

Bisher ist über die Funktionen der MAPK aus *Plasmodium* wenig bekannt. Die MAPK2 aus *P. berghei* und *P. falciparum* sind essentiell für die Entwicklung von Gametozyten sowie für die Exflagellation von Mikrogametozyten (Dorin et al., 1999; Khan et al., 2005; Rangarajan et al., 2005; Tewari et al., 2005). Darüber hinaus zeigte die Deletion der PfMAPK2, dass diese ebenso essentiell für die asexuelle Schizogonie und die Reifung der Gametozyten ist (Dorin-Semlat et al., 2007). Obwohl die MAPK1 aus *P. berghei* und *P. falciparum* sowohl in asexuellen Blutstadien als auch in Gametozyten exprimiert wird, ist die Funktion innerhalb des Parasiten weitgehend unbekannt (Doerig et al., 1996; Graeser et al., 1997; Lin et al., 1996). Da die Deletion der *mapk1* in der Blutphase keinen Phänotyp zeigte (Dorin-Semlat et al., 2007; Tewari et al., 2010), jedoch zu einer erhöhten Proteinexpression der MAPK2 führte,

könnte dies möglicherweise für eine funktionelle Kompensation der fehlenden MAPK1 durch die MAPK2 sprechen (Dorin-Semblat et al., 2007).

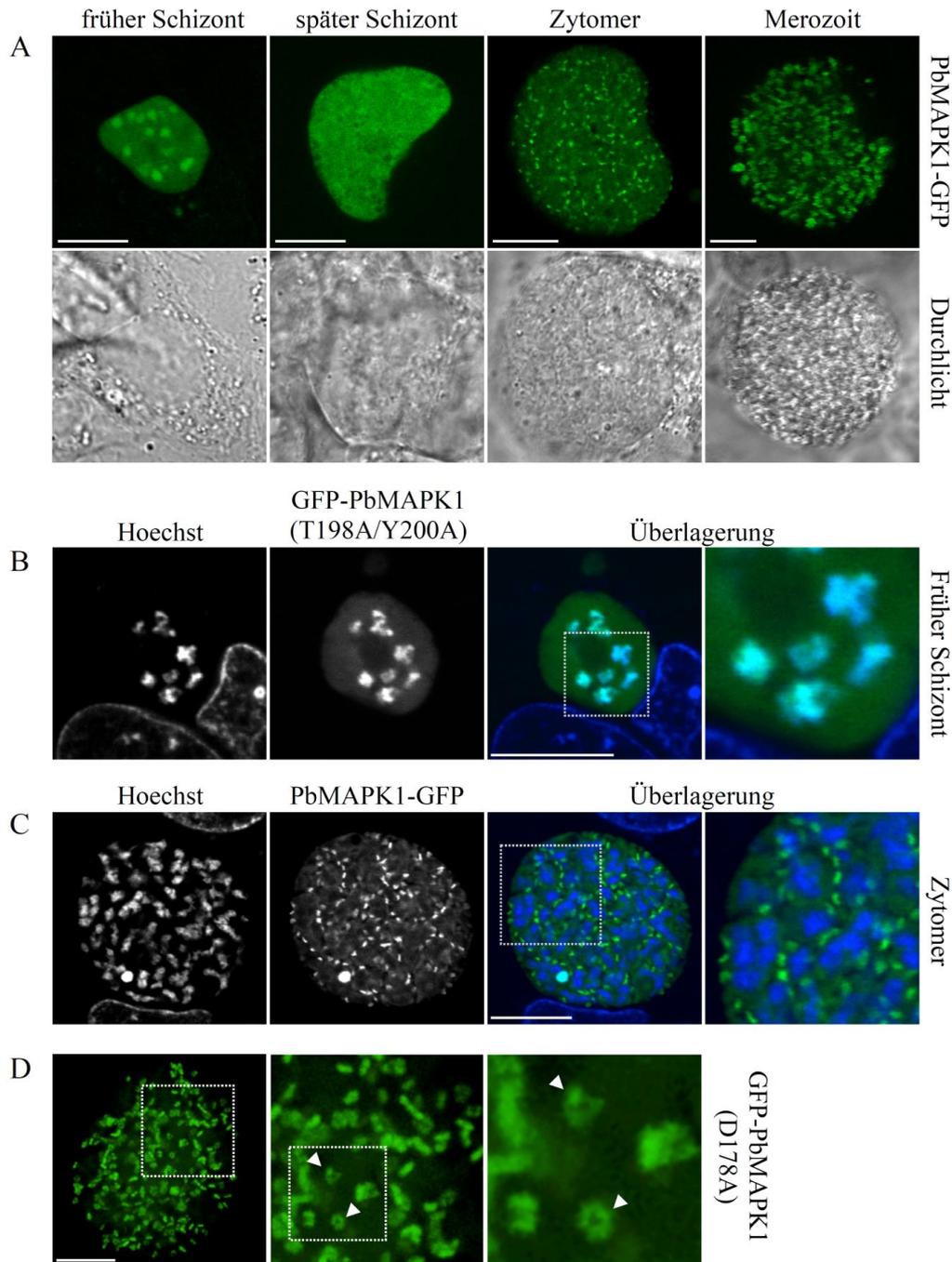
Strukturell weist die MAPK1 aus *P. berghei* (PbMAPK1) das charakteristische TXY-Aktivierungsmotiv auf (Cargnello & Roux, 2011). Zusätzlich findet sich in der PbMAPK1 ein DFG-Motiv, welches dafür bekannt ist, die Bindung und Orientierung von ATP zu regulieren (Hanks & Hunter, 1995). Neben der Kinase-Domäne ist bei beiden Kinasen eine C-terminale Verlängerung vorhanden, wodurch eine Ähnlichkeit zu den atypischen Mitgliedern der ERK-Familie (ERK7 und 8) besteht (siehe Abb 1.6). Im C-terminalen Bereich der PbMAPK1 befinden sich eine putative *coiled-coil*-Domäne sowie ein putatives NES (*nuclear export signal*). Darüber hinaus sind in beiden MAPK mehrere putative NLS (*nuclear localization signal*) vorhanden (siehe Abb.1.6).



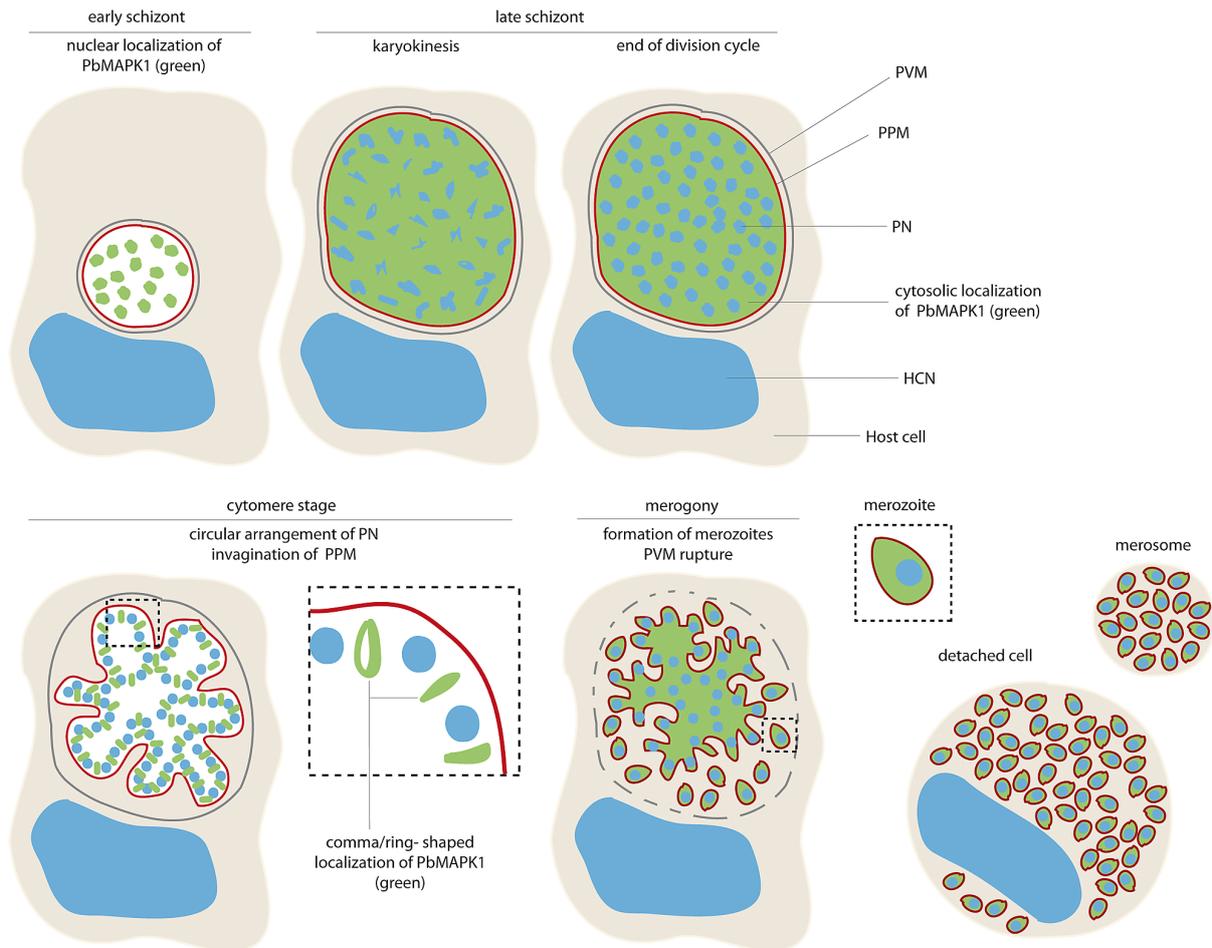
**Abb. 1.6:** Schematische Darstellung der MAPK aus *Plasmodium berghei*. (A) PbMAPK1: 599 Aminosäuren (ca. 70 kDa). Innerhalb der Kinase-Domäne befinden sich die charakteristischen Motive TXY und DFG. In der C-terminalen Domäne sind eine putative *coiled-coil* Domäne, mehrere putative NLS sowie ein putatives NES vorhanden. (B) PbMAPK2: 523 Aminosäuren (ca. 60 kDa). Es befindet sich ein putatives NLS in der C-terminalen Domäne sowie mehrere putative NLS in der katalytischen Domäne. Beide MAPK setzen sich aus einer N-terminalen (Kinase-Domäne, *catalytic domain*) und einer C-terminalen Domäne zusammen.

In vorangegangenen Arbeiten wurden die strukturellen Eigenschaften sowie die Lokalisation der PbMAPK1 im Parasiten bereits näher untersucht. Die Überexpression des PbMAPK1-GFP-Fusionsproteins in *Plasmodium berghei* hat gezeigt, dass in frühen Stadien, zu Beginn der Kernteilungsphase, eine Kernlokalisierung auftritt, welche während des rasanten Kernteilungsprozesses wieder verschwindet (Wierk et al., 2013). Nach Abschluss der Karyokinese und zu Beginn des Zytomer-Stadiums lokalisiert die PbMAPK1 in Form von distinkten, ringförmigen Strukturen nahe der invaginierenden Parasitenmembran (Wierk et al., 2013) (siehe Abb.1.7 und 1.8). Die C-terminalen Domänen der atypischen MAPK aus *Mammalia* sind in der Lage sowohl die Lokalisation (Abe et al., 1999), die Aktivierung (Abe et al., 2001) als auch die transkriptionelle Aktivität (Kasler et al., 2000) zu regulieren. In Bezug auf die Lokalisation konnte für die PbMAPK1 bereits gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne notwendig und hinreichend für eine Kernlokalisierung ist, wohingegen für die Ausbildung der distinkten Strukturen im Zytomer-Stadium sowohl die C-terminale als auch die Kinase-Domäne notwendig sind (Wierk et al., 2013). Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Lokalisationsmuster unabhängig vom Aktivierungszustand des TXY- und DFG-Motivs innerhalb der Kinase-Domäne ist (siehe Abb. 1.7) und nicht von der putativen *coiled-coil*-Domäne im C-terminalen Bereich vermittelt wird (Wierk et al., 2013).

Aufgrund der Tatsache, dass die PbMAPK1 in Form einer Kernlokalisierung zu Beginn der Karyokinese sowie in Form von distinkten Strukturen zu Beginn der Invagination der Parasitenmembran auftritt, kann eine wichtige Rolle der PbMAPK1 während der Zytokinese vermutet werden (siehe Abb. 1.8).



**Abb. 1.7:** PbMAPK1 weist eine differentielle und dynamische subzelluläre Lokalisation während der Entwicklung in der Leberphase auf. (A) HepG2-Zellen wurden mit *P. berghei*-Parasiten infiziert, welche die PbMAPK1 als GFP-Fusionsprotein exprimieren. *Live cell imaging* erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten während der Entwicklung (früher Schizont (30hpi), später Schizont (48hpi), Zytomer (54hpi) und Merozoiten (60hpi)). (B), (C) Ko-Färbung mit dem Kernfarbstoff Hoechst 33342 (*live cell imaging*). (B) Früher Schizont (Pb<sub>con</sub>GFP-PbMAPK1(T198A/Y200A): TXY-Mutante) und (C) Zytomer (Pb<sub>LS</sub>PbMAPK1-GFP). (D) *Spinning disc microscopy* (*live cell imaging*). HepG2-Zellen wurden mit *P. berghei*-Parasiten infiziert, welche die PbMAPK1 als GFP-Fusionsprotein exprimieren (Pb<sub>con</sub>GFP-PbMAPK1(D178A): DFG-Mutante), und im Zytomer-Stadium (54hpi) mittels *spinning disc microscopy* analysiert. Pfeile zeigen eine ringförmige Struktur der PbMAPK1. hpi: *hours post infection*. Maßstab: 10µm. *Verändert nach Wierk et al., 2013.*



**Abb. 1.8:** Schematische Darstellung des Lokalisationsmusters des Fusionsproteins PbMAPK1-GFP im Leberstadium von *P. berghei*. Während die PbMAPK1 im frühen Schizonten eine Kernlokalisierung aufweist, ist eine distinkte komma-/ringförmige Struktur in der Nähe der invaginierenden Parasitenmembran im Zytomerstadium zu beobachten. PVM: parasitophore Vakuolenmembran; PPM: Parasiten-Plasmamembran; PN: Parasiten-Nukleus; HCN: *host cell nucleus* (Wirtszellkern). Wierk *et al.*, 2013

### **1.3 Zielsetzung dieser Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollten beide MAPK aus *Plasmodium berghei* (PbMAPK1 und PbMAPK2) während der Entwicklung in der Leberphase näher untersucht werden.

Die Expression der Gene *pbmapk1* und *pbmapk2* wurde mittels reverser Transkriptase PCR (RT-PCR) analysiert. Um die Expression der PbMAPK1 auf Proteinebene bestätigen zu können, wurde der endogene Lokus des Gens *pbmapk1* am 3'-Ende mit *gfp* (GFP: *green fluorescent protein*) fusioniert, was in einer Expression der endogenen PbMAPK1 unter dem endogenen Promotor als GFP-Fusionsprotein resultierte. Die Lokalisation der endogenen PbMAPK1 sollte mittels *live imaging* untersucht werden. Unter Einbeziehung von weiteren Strukturen sollte das Lokalisationsmuster der PbMAPK1 in der späten Leberphase genauer charakterisiert werden, um Rückschlüsse auf mögliche Funktionen ziehen zu können.

Des Weiteren wurden die Auswirkungen der Deletion der *pbmapk1* in der Leberphase untersucht. Hierbei sollten zunächst die Auswirkungen auf den Parasiten in Bezug auf die Infektiosität, Viabilität und Morphologie analysiert werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss der Deletion der *pbmapk1* auf die Expression der endogenen *pbmapk2*- mRNA sowie auf die Lokalisation der PbMAPK2 mittels *live imaging* untersucht werden. In Bezug auf die Expression des Gens *pbmapk2* auf mRNA-Ebene sollte die Methode der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) für Leberstadien von *Plasmodium berghei* etabliert werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tab. 2.1: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Acrylamidgelkammer	Hoefer Mighty Small II, Modell 45-101-i	Amersham Biosciences; PEQLAB, Erlangen,
Agarosegelkammer	PerfectBlue™	PEQLAB; Erlangen, D
Analysenwaage	KERN 410	Kern & Sohn GmbH, Barlingen-Frommen, D
Binokular	Stemi DV4	Zeiss; Hamburg, D
Blotting Tank	Modell EB10	Labtec Int. Burkhardtsdorf, D
Brutschrank (Bakterien)	B6200	Heraeus; Hannover, D
Elektroporationsgerät	Nucleofector II manual	Amaxa biosystems; Köln, D
Entwickler	Curix 60	AGFA Mortsels, B
Entwicklerkassette	IEC 60406	Rego X-Ray Augsburg, D
Fluoreszenzbinokular	SMZ 800	Nikon; Düsseldorf, D
Fluoreszenzmikroskop	Leitz DM RB Axiovert 200	Leica; Bentheim, D Zeiss; Hamburg, D
Inkubator (Mücken)	Climacell-707	MMM-Group; Graefelfing, D
Konfokales Mikroskop	FluoView™ 1000	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D
Laborroller	RM5 Assistent	Hecht GmbH; Sondheim v.d. Rhön, D
Lichtmikroskop	Axiostar plus Axiovert 25 (invers)	Zeiss; Hamburg, D Heraeus; Hannover, D
Magnetrührer	IKAMAG® RCT RET basic	IKA Labortechnik; Hamburg, D
Mikrowelle	R-208	Sharp Electronics; Hamburg, D
pH-Meter	pH Level 1	InoLab; Weilheim, D
Photometer	NanoDrop™ 2000 SPECTROstar Nano	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA BMG Labtech; Ortenberg, D
Pinzette	neoLab-Dumont Pinzette Inox Nr.5	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH; Heidelberg, D
Pipetten	Pipetman® P	Gilson; Den Haag, NL
Pipettierhilfe	Pipetus®-akku	Hirschmann; Eberstadt, D
Pistill	Cordless Pellet Pestle	Kimble; Vineland, NJ, USA

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Power Supply	EPS 3500 EV 231	Amersham Biosciences; Freiburg, D Consort; Steinheim, D
Rotorgene	Corbett RG-6000	LFT Labortechnik GmbH; Wasserburg, D
Schüttler	InnovaTM 4400	New Brunswick; Nürtingen, D
Sterilbank	MSC- Advantage	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts, USA
Thermoblock	Thermomixer comfort	Eppendorf; Hamburg, D
Thermocycler	T3000	Biometra®; Göttingen, D
UV-Strahler	UVStratalinker® 1800	Stratagene; Amsterdam, NL
UV-Transilluminator	UV-Flächenstrahler	Konrad Bender; Wiesloch, D
Vortexer	VF2	IKA Labortechnik; Hamburg, D
Waage	TP-3002	Denver Instrument; Göttingen, D
Wasserbad	FBH 604	Fisherbrand®; Schwerte, D
Zählkammer	Neubauer	Marienfeld, Lauda- Königshofen, D
Zellkulturschrank	B5060EK-CO2	Heraeus; Hannover, D
Zentrifuge	Zentrifuge 5415 D Kühlzentrifuge 5427R Kühlzentrifuge 4K10 Kühlzentrifuge J2-H5 Zentrifuge 5810R Zentrifuge 5415C	Eppendorf; Hamburg, D Eppendorf; Hamburg, D Sigma; Steinheim, D Beckmann; Krefeld, D Eppendorf; Hamburg, D Eppendorf; Hamburg, D

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tab. 2.2: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Blottingpapier	Rotilabo® 1,5 mm Rotilabo® 1,0 mm	Roth; Karlsruhe, D
Deckgläschen	Rund, 13 mm Durchmesser	Menzel&Glaser; Braunschweig, D
Einwegkanülen	Sterican 23 G; 27 G	Braun; Melsungen, D
Einwegspritzen	1 ml	Braun; Melsungen, D

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Entwicklerfilm	Medical X-Ray Medical X-Ray	AGFA; Mortsel, BL CEA; Hamburg, D
Falcon-Röhrchen	15 ml / 50 ml	Sarstedt; Nürnberg- Rommelsdorf, D
Flüssigfutter für die Mückenzucht	Liquifry No. 1	Interpet; Dorking, UK
Futter für die Mückenzucht	Futter-Tabletten für Welse und andere Bodenfische	Astra Aquaria; Hameln, D
Glaspetrischalen (Glass Bottom Dish)	Willco-Dish®	WillCo Wells BV; Amsterdam, NL
Insulinspritzen	BD-Micro-Fine 0,5 ml	BD Medical; Franclin Lakes, USA
Kunststoff- Pipettenspitzen	5 ml / 10 ml / 25 ml	Sarstedt; Nürnberg- Rommelsdorf, D
Mounting Medium	Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation; Hamburg, D
Nylonmembran	Hybond™ - N	Amersham; Buckinghamshire, UK
Objektträger	SuperFrost® orange Polysine slides	Roth; Karlsruhe, D Mentel GmbH; Braunschweig, D
Parafilm	Parafilm „M“®	American Can Company; Greenwich, GB
Pasteurpipetten	Pasteurpipetten	Brand; Wertheim, D
Petrischalen	9 mm Durchmesser	Sarstedt; Nürnberg- Rommelsdorf, D
Pipettenspitzen	10 µl; 100 µl; 200 µl; 1ml	Sarstedt; Nürnberg- Rommelsdorf, D
Pipettenspitzen, gestopft	10 µl; 100 µl; 200 µl; 1ml	Greiner Bio-one; Solingen, D
Reaktionsgefäße	1,5 ml / 2 ml Cups 1,5 ml Nerbe-Cups PCR Softtubes 0,2 ml 0,1ml 4-Tube/4-Cap Strips	Eppendorf; Hamburg, D Nerbe plus; Winsen/Luhe, D Biozym; Oldendorf, D Biozym; Oldendorf, D
Reaktionsgefäß für Stickstoff-Stabilate	Cryo Tube™ Vialis	Nunc; Roskilde, DK
Whatman-Nitrozellulose	Transfer Membran ProtanR	Whatman GmbH; Dassel, D
Zellkulturflaschen	250 ml (75cm <sup>2</sup> ), 550ml (175cm <sup>2</sup> )	Sarstedt; Nürnberg- Rommelsdorf, D
Zellkulturplatten	24-Well	Greiner; Solingen-Wald, D

**2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien**

Tab.2.3: Chemikalien und Biochemikalien

<b>(Bio-)Chemikalie</b>	<b>Hersteller/Vertriebsfirma</b>
Acrylamid-Lösung (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1)	Roth; Karlsruhe, D
Agarose	Bio&Sell; Nürnberg, D
Alsever's solution	Sigma; Steinheim, D
Amphotericin	PAA Laboratories GmbH; Pasching, A
Ampicillin	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
APS (Ammoniumpersulfat)	Biomol; Hamburg, D
Ampuwa (Wasser f. Injektionszwecke)	Fresenius Kabi; Bad Homburg v.d. Höhe, D
β- Mercaptoethanol	Roth; Karlsruhe, D
Benzylalkohol	Roth; Karlsruhe, D
Bromphenolblau-Natriumsalz	Merck; Darmstadt, D
BSA (Rinderserumalbumin)	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/M, D
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
CaNa <sub>2</sub> - EDTA	Roth; Karlsruhe, D
Chloroform	Roth; Karlsruhe, D
DAPI	Sigam-Aldrich; Taufkirchen, D
dATP	Roth; Karlsruhe, D
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth; Karlsruhe, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma; Steinheim, D
dNTP-Mix (10 mM jeweils)	Roth; Karlsruhe, D
Domitor®	Pfizer GmbH; Karlsruhe, D
DTT (Dithiothreitol)	Biomol, Hambug, D
EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure)	Gerbu biotechnik GmbH; Gaiberg, D
ER-Tracker Red (Bodipy TR Glibenclamide)	Invitrogen; Karlsruhe, D
Essigsäure (100%)	Roth; Karlsruhe, D
Ethanol (100%)	Roth; Karlsruhe, D
Ethidiumbromid (1%)	Biomol; Hamburg, D
Foetal Bovine / Calf Serum (FBS / FCS)	PAA Laboratories GmbH; Pasching, A
Fruktose	Roth; Karlsruhe, D
Gentamicin-ratiopharm® 80 SF	Ratiopharm GmbH; Ulm, D
Giemsa	Roth; Karlsruhe, D
Glukose	Roth; Karlsruhe, D
Glycerin	Roth; Karlsruhe, D
Glycin	Biomol; Hamburg, D
Heparin - Natrium - 25000	Ratiopharm; Ulm, D
Hoechst 33342	Molecular Probes; Leiden, NL

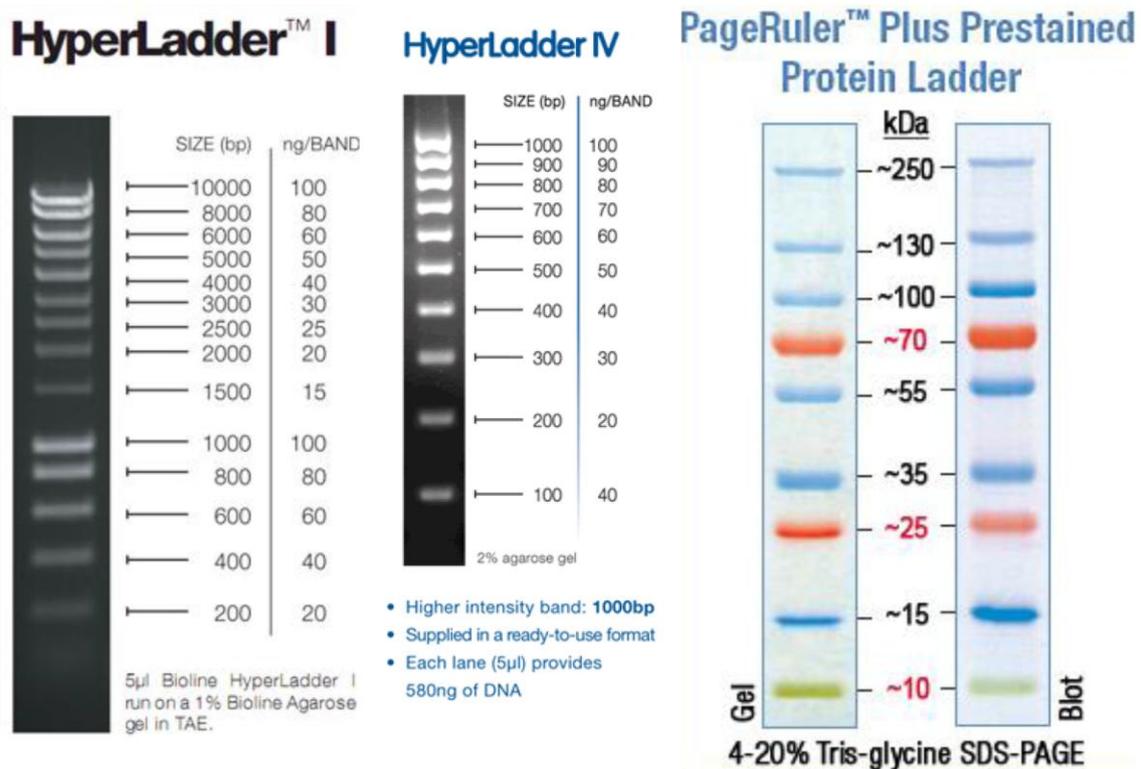
<b>(Bio-)Chemikalie</b>	<b>Hersteller/Vertriebsfirma</b>
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid)	Biomol; Hamburg, D
Isopropanol	Roth; Karlsruhe, D
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
Kaliumchlorid	Roth; Karlsruhe, D
Ketavet®	Pfizer GmbH; Karlsruhe, D
LB-Agar (Lennox)	Roth; Karlsruhe, D
LB-Medium (Lennox)	Roth; Karlsruhe, D
L- Glutamin (100x)	PAA Laboratories GmbH; Pasching, A
Magermilchpulver	Roth; Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid	Roth; Karlsruhe, D
MEM with Earle's Salts ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH; Pasching, A Invitrogen; Karlsruhe, D
Methanol	Roth; Karlsruhe, D
MOPS/NaOH	Sigma; Steinheim, D
Natriumacetat	Roth; Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Roth; Karlsruhe, D
Na <sub>2</sub> -EDTA	Biomol; Hamburg, D
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma; Steinheim, D
Natriumhydroxid	Merck; Darmstadt, D
Natronlauge	Roth; Karlsruhe, D
Nycodenz	AXIS-SHIELD Poc AS; Oslo, N
PABA	Vitamin Research Products; Carson City, NV, USA
Paraformaldehyd	Fluka; Steinheim, D
Penicillin / Streptomycin- Mix (100x)	PAA; Pasching, A
Pyrimethamin	Sigma; Steinheim, D
Random Primers	Invitrogen; Karlsruhe, D
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH; Pasching, A Invitrogen; Karlsruhe, D
Salzsäure	Roth; Karlsruhe, D
Saponin	Sigma; Steinheim, D
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth; Karlsruhe, D
TEMED (Tetramethylaminomethan)	Biomol; Hamburg, D
Tris	Biomol; Hamburg, D
Tris-Base	Roth; Karlsruhe, D
Tris-HCl	Biomol; Hamburg, D
Tween-20	Sigma; Steinheim, D
WR-99210	Sigma; Steinheim, D

### 2.1.4 Reagenzansätze

Tab. 2.4: Reagenzansätze

Kits	Hersteller/Vertriebsfirma
Human T Cell Nucleofector TM Kit	Lonza; Basel, CH
my-Budget PCR-Aufreinigungskit	Bio-Budget Technologies GmbH; Krefeld, D
NucleoBond® PC 100	Macherey-Nagel; Düren, D
NucleoSpin® BloodQuick Pure	Macherey-Nagel; Düren, D
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel; Düren, D
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel; Düren, D
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel; Düren, D
Superscript III	Invitrogen; Karlsruhe, D
SuperSignal West-Pico/ Femto chemiluminescent substrate	Pierce; Bonn, D

### 2.1.5 Marker



**Abb. 2.1: Verwendete Marker.** Für Agarose-Gele wurden die DNA-Marker HyperLadder™ I oder IV (Bioline; Luckenwalde, D) verwendet (links und mitte). Für SDS-Polyacrylamid-Gele mit anschließendem Westernblot wurde der Protein Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas (St. Leon-Roth, D) verwendet (rechts). Es wurden jeweils pro Geltasche 5µl unverdünnt eingesetzt.

### 2.1.6 Enzyme

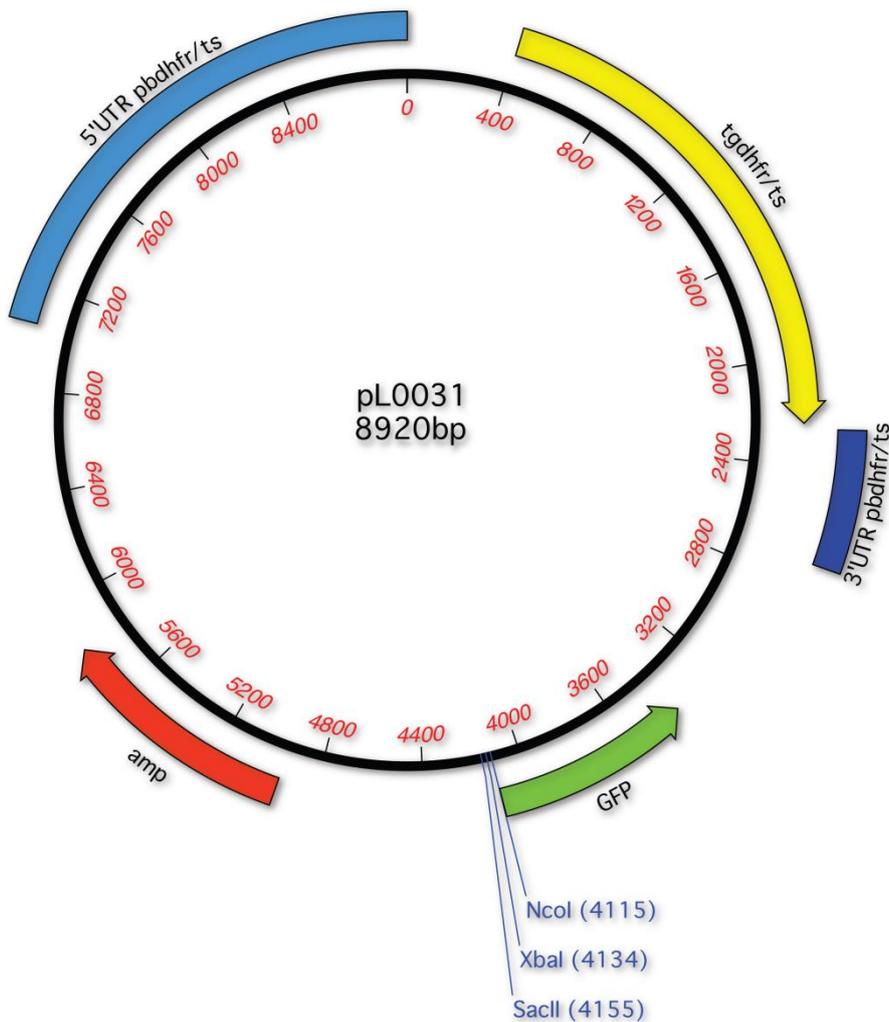
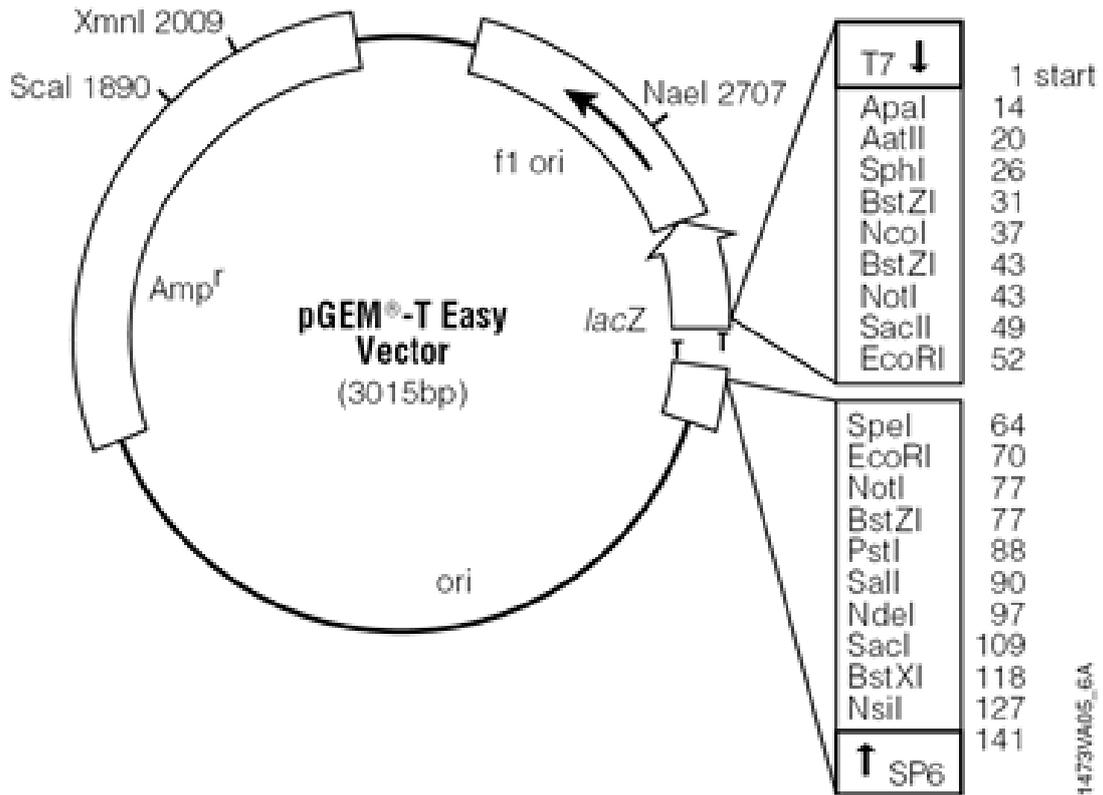
Tab. 2.5: Enzyme

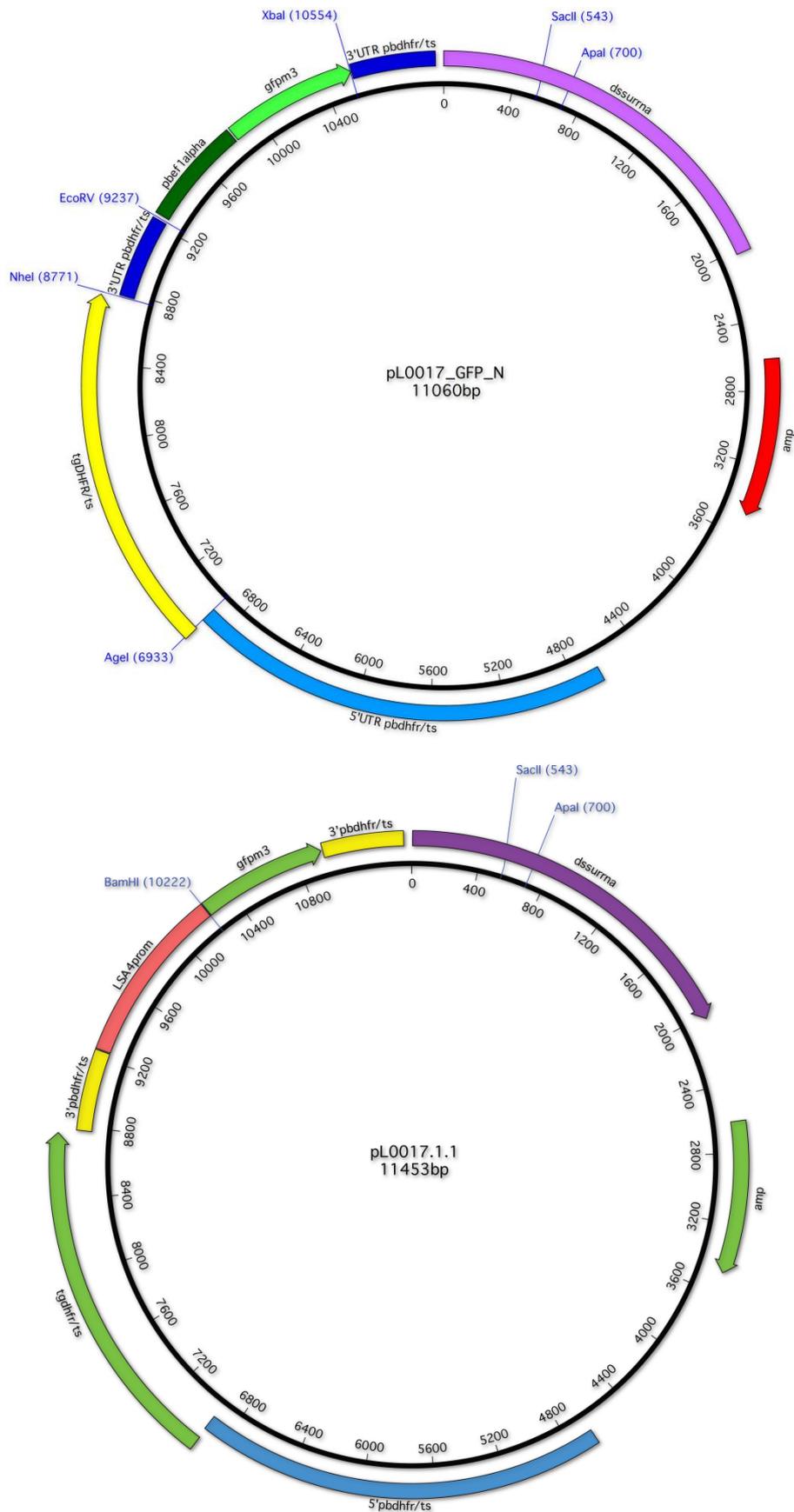
Enzym	Hersteller
Accutase	PAA Laboratories GmbH; Pasching, A
Alkaline Phosphatase, (CIP, <i>calif intestine phosphatase</i> )	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D
Go Taq Polymerase	Promega; Mannheim, D
HotStarTaq Mastermix (1000U)	Qiagen; Venlo, N
Phusion HighFidelity DNA-Polymerase	Finnzymes / NEB; Frankfurt/Main, D
Restriktionsenzyme	New England Biolabs; Frankfurt, D
RNaseA	Sigma; Steinheim, D
RNase OUT	Invitrogen; Karlsruhe, D
T4 DNA-Ligase	New England BioLabs® GmbH; Frankfurt/Main, D

### 2.1.7 Plasmide und Vektoren

Tab. 2.6: Plasmide und Vektoren

Plasmid/ Vektor	Größe	Beschreibung
pGEM®-T Easy (Plasmid)	3015 bp	Ampr , T7-Promotor, lac operator, 3'-T-Überhänge; Promega; Mannheim, D
pL0017-GFP-N	11060 bp	Ampr , GFP, <i>tgdhfr/ts</i> , <i>eef1<math>\alpha</math></i> -Promotor, <i>c-/d-ssu-rrna</i> -Lokus; BNITM, Hamburg, D
pL0017.1.1	11453 bp	Ampr, LSA4-Promotor, GFP, <i>tgdhfr/ts</i> , <i>c-/d-ssu-rrna</i> - Lokus; BNITM, Hamburg, D
pL0031 (MRA-800)	8920 bp	Ampr, GFP, <i>tgdhfr/ts</i> ; MR4/ American Type Culture Collection; Wesel, D





**Abb. 2.2: Plasmide und Vektoren.** Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Vektoren pGem, pL0031, pL0017-GFP-N und pL0017.1.1 (siehe Tabelle 2.7) mit Angabe von Restriktionsschnittstellen.

**2.1.8 Oligonukleotide**

Tab. 2.7: Oligonukleotide

Nr./ Name	Beschreibung	Sequenz 5' → 3'
#616 pL0017-GFPm3-as	Sequenzierung / Integrations-PCR	GCATCACCTTCACCCTCTCC
#1105 PbMAPK1_KD_F_BamHI	Klonierung PbMAPK1 in pL0017mCh	AT <u>GGATCC</u> ATGGAGAGAGA AAAACAGAAGAAAATC
#1106 PbMAPK1_KD_R_BamHI	Sequenzierung	AT <u>GGATCC</u> AATATGTTTGCA AATTGGTTCCTC
#1108 PbMAPK1_CD_R_NheI	Integrations-PCR	AT <u>GCTAGC</u> GATACATACATA TTTATTTTCGAG
#1114 PbMAPK1-seq-1s	Sequenzierung	CTAATTCCCCAAATACACCA AATGC
#1340 M13fwd	Sequenzierung in pGem	GTAAAACGACGGCCAGT
#1341 M13rev	Sequenzierung in pGem	CAGGAAACAGCTATGAC
#1344 Pb-tubulin-for	RT-PCR / Integrations-PCR	TGGAGCAGGAAATAACTGGG
#1345 Pb-tubulin-rev	RT-PCR / Integrations-PCR	ACCTGACATAGCGGCTGAAA
#1501 sg-seqGFP-CT-fo	Sequenzierung	CATGGTCCTTCTTGAGTTTGT AACA
#1503 sg-MAPK1-E-rev (BamHI)	Integrations-PCR	AT <u>GGATCC</u> ATATTTTTTCTTT TGTTTATAAAAATAATG
#1856 HsHgs_F_SpeI	Klonierung 2xFYVE in pl0017.1.1-GFP-N	ATA <u>CTAGT</u> CAAGGACAGGGT TCAGAGAGCGATGCCATGTT TGCTGCC
#1857 HsHgs_R_XbaI_Sa	Klonierung 2xFYVE in pl0017.1.1-GFP-N	ATGTCGACT <u>TCTAG</u> ACTACGC TTTCCTGTTCAGCTGCTCGTA GC
#1858 HsHgs_F_XbaI	Klonierung 2xFYVE in pl0017.1.1-GFP-N	AT <u>TCTAG</u> AGAGAGCGATGCC ATGTTTGCTGCC
#1859 HsHgs_R_wo	Klonierung 2xFYVE in pl0017.1.1-GFP-N	TCCGCTTTCCTGTTTCAGCTGC TCGTAGC
#1958 MAPK1_C_R_XhoI	Sequenzierung	AT <u>CTCGAGT</u> CAATTAAATTG TAATAGTTTTTCAAGTAAATC TATAG
#2020 PbMAPK1_RT_1F	RT-PCR	TATTCACAGAGAGCATTGCC C

Nr./ Name	Beschreibung	Sequenz 5' → 3'
#2021 PbMAPK1_RT_1R	RT-PCR	TCCTTTTTCTTTGTTCCCTTG
#2022 PbMAPK2_RT_1F	RT-PCR / Sequenzierung	ATTATTCCCGCACAGAAAAC C
#2023 PbMAPK2_RT_1R	RT-PCR	AACCATCCAATCATCAAAAG G
#2039 PbMAPK2_Ct_F_Eco	Sequenzierung	ATGAATTCAATATGTTACAA AGCCATATTAATGATC
#2067 PbMAPK2_F_XbaI	Klonierung PbMAPK2 in pL0017-GFP-N	ATTCTAGAATGTTGAAAAAA AAAAAGAATACTCTGG
#2068 PbMAPK2_R_XbaI	Klonierung PbMAPK2 in pL0017-GFP-N	ATTCTAGATTAAGTCTAGG TTTCTCATTGTTATAG
#2091 PbMAPK2_seq_1as	Sequenzierung	ATACATACCCATACGACCCTC TTC
#2092 PbMAPK2_seq_1s	Sequenzierung	TAGGAAGAGGGTCGTATGGG TATG
#2106 PbCent3_R_BamHI	Klonierung PbCentrin3 in pL0017.1.1 / Sequenzierung	ATGGATCCATAAAGACTAGT TTGTTTCATTATAC
#2119 MAPK1ko_int_5_F	Integrations-PCR	ATTAACAGTTAGAAGAGGAT TGCC
#2125 PbCent3_F_BamHI	Klonierung PbCentrin3 in pL0017.1.1 / Sequenzierung	ATGGATCCATGATTACCAGA AAAAGCGATATCG
#2148 PbMAPK1_RT_1R	Sequenzierung	TCCTTTTTCTTTGTTCCCTTG
#2174 pref1a-ApaI-f	Sequenzierung	GCGGGCCCAGCTTAATTCTT TTCGAGCTCTTT
#2179 MAPK1-F2_SacII	Klonierung C-terminales Fragment der PbMAPK1 in pL0031	ATCCGCGGACAGAAGTCAAT GAAAATAAAATACCAG
#2180 MAPK1-R-NcoI	Klonierung C-terminales Fragment der PbMAPK1 in pL0031	AATCCATGGAATATTTTTTCT TTTGTTTATAAAAATAATG
#2183 MAPK1_s1_F_XbaI	Klonierung der trunkierten CTD der PbMAPK1 ( $\Delta 1$ )	ATTCTAGAATTCACAGAGAG CATTGCCAG
#2184 MAPK1_s2_F_XbaI	Klonierung der trunkierten CTD der PbMAPK1 ( $\Delta 2$ )	ATTCTAGATCTAATTCCCCA AATACACCAAATGC
#2185 PbMAPK1_CD_R_Xb	Klonierung der trunkierten CTD der PbMAPK1 ( $\Delta 1 +$ $\Delta 2$ )	ATTCTAGAGATACATACATA TTTATTTTCGAG

Nr./ Name	Beschreibung	Sequenz 5' → 3'
#2190 hDHFR-F-AgeI	Sequenzierung	AT <u>ACCGGT</u> AATGGTTGGTTC GCTAAACTGC
#2191 hDHFR-R-NheI	Sequenzierung	AT <u>GCTAGC</u> ATTAATCATTCTT CTCATATACTTCAAATTTGTA
#2192 PbMAPK1-F	qPCR-Primer	GCGCGAAGTATATCAACAGA AG
#2193 PbMAPK1-R	qPCR-Primer	ATAATGCACCCAAGCGACC
#2194 PbMAPK2-F	qPCR-Primer	TTATTCCC GCACAGAAAACC
#2195 PbMAPK2-R	qPCR-Primer	CCTGGTCAATTGTGATTCGTT
#2196 Pb18SrRNA-F	qPCR-Primer	GGATGTATTCGCTTTATTTAA TGCTT
#2197 Pb18SrRNA-R	qPCR-Primer	CACGCGTGCAGCCTAGTAT
#2198 PbMAPK1-T	qPCR-Sonde	ROX- ACAGATTATGTAGCAACACG TTGGTATAGAGC-BHQ2
#2199 PbMAPK2-T	qPCR-Sonde	FAM- CCCATCTATTTTCAGATGATGG A-BHQ1
#2200 Pb18SrRNA-T	qPCR-Sonde	JOE- AGGCAACAACAGGTCTGTGA- BHQ1

**2.1.9 Antikörper**

Tab. 2.8: primäre Antikörper

Antikörper	IFA	Westernblot	Spezies	Hersteller
$\alpha$ -Exp1	1:1000 1:500		Huhn Maus	AG Heussler, BNI, Hamburg, D AG Heussler, BNI, Hamburg, D
$\alpha$ -GFP	1:1000 1:1000	1:1000 1:2000	Kaninchen Maus	Molecular Probes/Invitrogen; Karlsruhe, D Roche Diagnostics; Rotkreuz, Risch, CH

Tab. 2.9: sekundäre Antikörper

Antikörper	IFA	Westernblot	Spezies	Hersteller
$\alpha$ -Huhn Cy2	1:400		Ziege	Dianova; Hamburg, D
$\alpha$ -Kaninchen Alexa Fluor 488	1:1000		Ziege	Molecular Probes/Invitrogen; Karlsruhe, D
$\alpha$ -Kaninchen HRP		1:10.000	Ziege	Cell Signaling; Cambridge, UK
$\alpha$ -Maus Alexa Fluor 488	1:5000		Ziege	Molecular Probes/Invitrogen; Karlsruhe, D
$\alpha$ -Maus HRP		1:5000	Ziege	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA

**2.1.10 Zellen und Organismen**

Tab. 2.10: Zellen und Organismen

Name	Bezeichnung und Hersteller
<i>E. coli</i> XL1-blue	Tetracyclin-Resistenz Stratagene; Amsterdam, NL
<i>Mus musculus</i>	NMRI BNI; Hamburg, D Charles River Laboratory; Sulzfeld, D
<i>Homo sapiens sapiens</i> , HepG2	European Collection Of Cell Cultures; Salisbury, GB
<i>Plasmodium berghei</i> , ANKA	BNITM; Hamburg, D
<i>Anopheles stephensi</i>	BNITM; Hamburg, D

**2.1.11 Puffer und Medien**

Tab. 2.11: Puffer und Medien

<b>Puffer / Medium</b>	<b>Zusammensetzung / Hersteller</b>
5x Colorless GoTaq® Flexi Puffer	Promega GmbH; Mannheim, D
5x Green GoTaq® Flexi Puffer	Promega GmbH; Mannheim, D
Anästhetikum für Mäuse	7% Ketavet, 13,5% Domitor in 1x PBS
Cryolösung	10% Glycerin in Alsever's Solution Sigma A3551, steril ansetzen
6x DNA Ladepuffer	30% Glycerin 0,25% Bromphenolblau in dH <sub>2</sub> O
2x Lämmli-Puffer	125 mM Tris-HCl 2% SDS 20% Glycerin 20 mM DTT 0,001% Bromphenolblau; pH 6,8
Laufpuffer für SDS-PAGE (10x)	0,25M Tris 0,5M Glycin 1% SDS
LB-Medium	20g LB-Medium mit d H <sub>2</sub> O auf 1L auffüllen
LB-Selektionsplatte mit Ampicillin	35g/L LB-Agar in dH <sub>2</sub> O ( Autoklavieren) 100 µg/ml Ampicillin
LB-Selektionsmedium für XL1-blue	LB-Medium (Autoklavieren) 100 µg/ml Ampicillin
Lösung 1 (Plasmid-Präparation)	50mM Glucose, 25mM Tris-HCl (pH7,5), 10mM EDTA
Lösung 2 (Plasmid-Präparation)	0,2M NaOH, 1% SDS
Lösung 3 (Plasmid-Präparation)	3M Kaliumacetat, 2M Essigsäure
Kultivierungsmedium für HepG2-Zelllinie	Earl's MEM 10% FCS 2 mM L-Glutamin (100x) 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin-Mix (100x)
Nycodenz (Stocklösung)	69 g Nycodenz, 250 ml Puffermedium (Autoklavieren)
PBS-Stocklösung (10x)	5,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 75 mM NaCl
Puffermedium (für Nycodenz)	5 mM Tris/HCl 3 mM KCl 0,3 mM CaNa <sub>2</sub> /EDTA; pH 7,5

<b>Puffer / Medium</b>	<b>Zusammensetzung / Hersteller</b>
Pyrimethamin-Stocklösung (100x)	7mg/ml Pyrimethamin in DMSO
RPMI1640 Komplettmedium für Blut-Übernachtskulturen	100 ml RPMI 1640 Medium 25 ml FBS 150 µl Gentamicin (80 mg)
Sammelgelpuffer (4x)	1,5 M Tris-HCl, 0,4% (w/v) SDS; pH 8,8
Saponin-Lösung (10x)	1,5% (w/v) Saponin in PBS pH 7,4
TAE-Puffer	5 mM Natriumacetat x 3 H <sub>2</sub> O 40 mM Tris 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA ; pH 7,9
Tfb1-Puffer	30 mM Essigsäure 50 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15% Glycerin
Tfb2-Puffer	10 mM MOPS/NaOH 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 15% Glycerin; pH 7,0
TAE-Puffer (10x)	0,4M Tris, 0,2M Natriumacetat, 0,01M Na <sub>2</sub> -EDTA; pH 8,0
TBS (10x)	100 mM Tris-HCl, 1,5 M NaCl; pH 7,4
TBS Tween	1xTBS, 0,5% Tween-20
TE-Puffer	10mM Tris-HCl, 1mM EDTA: einstellen auf pH 8,0
TE-RNaseA- Puffer	TE-Puffer, 20µg/ml RNaseA
Transferpuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 1,3 mM SDS 20% (v/v) Methanol; pH 8,3
Trenngelpuffer (4x)	91 g Tris Base, 2 g SDS auf 500 ml mit dH <sub>2</sub> O auffüllen; pH 8,8

**2.1.12 Programme und Datenbanken**

Tab. 2.12: Programme und Datenbanken

<b>Datenbank</b>	<b>Internetadresse</b>	<b>Beschreibung</b>
GeneDB	www.genedb.org	<i>Plasmodium</i> -Datenbank
NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov	Literatur-Datenbank, Blast
Motif Search	www.motif.genome.jp	Motiv-Datenbank
PlasmoDB	www.plasmodb.org	<i>Plasmodium</i> -Datenbank
<b>Programme</b>	<b>Beschreibung</b>	
Adobe Photoshop Elements 6.0	Bearbeitung konfokaler Bilder	
MacVector™ Version 10.0.2	Sequenz-, Primer-Analysen (Accelrys, Cambridge, GB)	
Microsoft® Excel 2007	Erstellung von Diagrammen; Statistische Berechnungen	
Microsoft® PowerPoint 2007	Erstellung von Abbildungen	
Microsoft® Word 2007	Anfertigung der Arbeit	
Olympus FluoView™ Version 1.7b	Konfokalbildaufnahmen und Bildbearbeitung	
Primer 3 <a href="http://primer3.ut.ee/">http://primer3.ut.ee/</a>	Erstellung von Oligonukleotid-Primern	

## 2.2 Molekularbiologische und biochemische Methoden

### 2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht die Amplifikation eines gewünschten DNA-Fragments *in vitro*. Die Amplifikation erfolgt anhand doppelsträngiger DNA, z.B. gDNA (genomische DNA), cDNA (*copyDNA*) oder Plasmid-DNA, welche als *template* (Muster) dient und die zu amplifizierende Sequenz beinhaltet. Des Weiteren werden synthetische Oligonukleotide, Desoxynukleosidtriphosphate und eine hitzestabile DNA-Polymerase benötigt. Eine PCR ist eine Abfolge von sich wiederholenden Einzel-Schritten: Denaturierung des doppelsträngigen *templates*, Hybridisierung (*annealing*) der Oligonukleotide und Elongation des Amplifikats. Die Dauer der Elongation richtet sich nach der Länge des zu erwartenden Produkts. Dabei geht man von 0,5-1 Minute pro kb (kilobasen) Länge aus. Die Elongationstemperatur dagegen wird anhand des GC-Gehalts gewählt. Aufgrund des sehr hohen AT-Reichtums im *Plasmodium berghei*- Genom wurde eine Elongationstemperatur von 60°C gewählt. Die Oligonukleotide wurden so konstruiert, dass bei dem Amplifikat flankierende Restriktionsschnittstellen entstehen, welche eine Klonierung in den jeweiligen Vektor ermöglichen. Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide (bezogen von der Firma MWG Operon) befindet sich in Abschnitt 2.1.8. (Tab. 2.7). Die Tabelle Tab. 2.13 erläutert die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das verwendete PCR-Programm.

Tab. 2.13: Reaktionsansatz und PCR-Programm

Reaktionsansatz	Menge (Gesamt 50µl)
Template (50-200ng/µl)	1µl
Puffer (5x)	10µl
forward-Primer (10pmol/µl)	2,5µl
reverse-Primer (10pmol/µl)	2,5µl
dNTPs (10mM)	1µl
Polymerase (2U/µl)	1µl
ddH <sub>2</sub> O	32µl

PCR-Programm		
Denaturierung	95°C/ 2'	1x
Denaturierung	95°C/ 20''	29x
Hybridisierung (Annealing)	50-52°C/ 30''	
Synthese (Elongation)	60°C/ 1,5-3'	
Abschlusssynthese	60°C/ 10'	1x
Stopp	4°C	Ende

Anschließend wurde ein Teil des PCR-Produktes auf einem 1-1,5%igen Agarosegel mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt, um den Erfolg der PCR zu überprüfen (siehe Abschnitt 2.2.4 Agarosegel-Elektrophorese). Bei erfolgreicher Amplifikation wurde das PCR-Produkt mit Hilfe des Kits NucleoSpin®Extract II oder mit dem my-budget PCR-Aufreinigungskit aufgereinigt und in 30-50µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.2.2 cDNA-Synthese

Für eine reverse Transkriptase- PCR (RT-PCR) oder eine quantitative *real-time* PCR (qPCR) muss gewonnene RNA (siehe 2.2.3.7) in cDNA (*copy* DNA) umgeschrieben werden. Hierfür wurde das Superscript® III verwendet.

#### cDNA-Synthese-Ansatz (20µl Volumen):

- 8,1µl RNA
- + 4µl 5x Synthesepuffer
- + 2µl 0,1M DTT
- + 2µl 10mM dNTP's
- + 2µl 100ng/µl Random Primer
- + 0,5µl RNase Out
- + 1µl Superscript III
- + 0,4µl MgCl<sub>2</sub>

Der cDNA-Synthese-Ansatz wurde zunächst für 10min bei 25°C, dann für 50min bei 42°C und abschließend für 15min bei 70°C inkubiert und bei -20°C gelagert. Die erhaltene cDNA konnte nun als Template für eine konventionelle PCR (siehe 2.2.1) oder eine quantitative *real-time* PCR (siehe 2.2.3) eingesetzt werden.

### **2.2.3 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)**

Um quantitative Rückschlüsse auf die mRNA-Expression (relative Expression) ziehen zu können, wurde die gewonnene cDNA in einer qPCR eingesetzt. Zunächst mussten jedoch die optimalen Bedingungen in Bezug auf Mischungsverhältnisse und PCR-Programm gefunden werden. Die Konzentration der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Primer und Sonden sind in Tabelle 2.14 zu entnehmen. Der qPCR-Ansatz und das optimale qPCR-Programm sind in den Tabellen 2.15 und 2.16 dargestellt.

Tab. 2.14: Primermischungsverhältnisse

qPCR- Primermischungsverhältnis			
Primer/Sonde	Konzentration (nM)	Mischungsverhältnis	Primermix
PbMAPK1-F (#2192)	300	1:1:1	Primermix MAPK1
PbMAPK1-R (#2193)	900		
PbMAPK1-T (#2198)	50		
PbMAPK2-F (#2194)	300	1:1:1	Primermix MAPK2
PbMAPK2-R (#2195)	300		
PbMAPK2-T (#2199)	200		
Pb18SrRNA-F (#2196)	300	1:1:1	Primermix 18SrRNA
Pb18SrRNA-R (#2197)	300		
Pb18SrRNA-T (#2200)	200		

Tab. 2.15: qPCR-Ansatz

qPCR-Ansatz	
HotStarTaq Mastermix 2x	10µl
MgCl <sub>2</sub>	2µl
Primermix Pb18SrRNA	0,75µl
Primermix PbMAPK1	0,75µl
Primermix PbMAPK2	0,75µl
H <sub>2</sub> O	3,75µl
cDNA	2µl
Gesamtvolumen	20µl

Tab. 2.16: qPCR-Programm

qPCR-Programm		
95°C	15min	1x
95°C	15sek	50x
62-58°C (9 x 0,5°C <i>Touchdown</i> )	30sek	
72°C	30sek	
40°C	30sek	1x

Nach Ablauf des PCR-Programmes im Rotorgene wurden die gewonnenen Daten ausgewertet. Hierfür wurden die ermittelten Ct-Werte für jeden Zeitpunkt gemittelt (Dreifachansatz) in die folgende Formel eingesetzt, um die relative Expression berechnen zu können.

$$\Delta Ct = \frac{(E_{Norm})^{Ct_{Norm}}}{(E_{MAPK2})^{Ct_{MAPK2}}}$$

Die ermittelten und auf den *Normalizer* normalisierten  $\Delta Ct$ -Werte geben Aufschluss über die relative Expression des zu untersuchenden Gens. Um eine leichte gDNA-Kontamination rechnerisch zu eliminieren, wurden die  $\Delta Ct$ -Werte der –RT-Proben von den  $\Delta Ct$ -Werten der +RT-Proben abgezogen. Hierbei wurden sowohl die +RT als auch die –RT-Werte auf die +RT-Werte des *Normalizers* bezogen.

### **2.2.4 Agarosegel-Elektrophorese**

Diese Methode dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten (z.B. PCR-Produkte) anhand ihrer Größe. Die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Fragmente ist hierbei abhängig von ihrer Größe. Kleine DNA-Fragmente wandern schneller als größere, da sich die Wanderungsgeschwindigkeit indirekt proportional zum Logarithmus des Molgewichts verhält. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurde ein 1 bis 1,5%iges TAE-Agarosegel verwendet. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (0,1µg/ml) in die noch flüssige Agarose-Lösung ist es möglich die aufgetrennten DNA-Fragmente bei UV-Bestrahlung sichtbar zu machen, da das Ethidiumbromid in die DNA-Helix interkaliert. Als Größenstandard wurden 5µl des HyperLadder I oder IV verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 5x Green GoTaq-Buffer versetzt und die Elektrophorese erfolgte bei 80-100V.

Diese Methode diente zum Einen der Analyse der PCR-Produkte, zum Anderen konnte die elektrophoretische Auftrennung genutzt werden, um einzelne Fragmente auszuschneiden und mit Hilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II extrahieren und aufreinigen zu können.

### **2.2.5 Restriktionsverdau**

Der Restriktionsverdau beschreibt eine Hydrolysierung von Phosphodiesterbindungen an Restriktionsschnittstellen eines Doppelstranges mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, wodurch entweder glatte Enden (blunt ends) oder Überhänge (sticky ends) entstehen. Restriktionsschnittstellen sind meist palindromische Erkennungssequenzen von vier, sechs oder acht Basenpaaren. Der Restriktionsverdau ermöglicht einerseits eine Ligation von DNA-Fragmenten über gleiche oder kompatible Enden in Vektoren, andererseits dient diese Methode jedoch auch zur Überprüfung eines Ligationsproduktes (siehe 2.2.6) und zur Kontrolle einer Plasmid-Präparation (siehe 2.2.10).

Für den Verdau eines PCR-Produktes wurden 2µl 10xNEB-Puffer, 2µl 10xBSA (1mg/ml) und 10U des/der jeweiligen Restriktionsenzym(s)/e mit dem PCR-Produkt auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt. Für den Verdau eines Vektors wurden 2-3µg Vektor mit 2µl 10xNEB-Puffer, 2µl 10xBSA (1mg/ml) und 10U des/der jeweiligen Restriktionsenzym(s)/e versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 20µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurde bei der den Herstellerangaben entsprechenden Temperatur sowie der entsprechenden Inkubationszeit inkubiert.

### **2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten**

#### Ligation in den Vektor pGEM®-T Easy:

Die Ligation in pGEM®-T Easy erfolgte über 3'-T-Überhänge des Vektors. Da unter Verwendung der Phusion-Polymerase erzeugte PCR-Produkte *blunt ends* aufweisen, wurde zunächst dem jeweiligen Insert durch eine Taq-Polymerase am 3'-Ende Desoxyadenosine hinzugefügt (*A-tailing*).

#### Ansatz für *A-tailing*:

- 5µl des PCR-Produkts
- + 2µl Colorless GoTaq® Flexi Puffer (5x)
- + 2µl 1mM dATP
- + 1µl GoTaq®-Polymerase (5U/µl)

Die Inkubationszeit von 30 Minuten erfolgte bei 70°C. Anschließend konnte das *A-tailing*-Produkt in den Vektor pGEM®-T Easy über Nacht bei 4°C ligiert werden.

#### Ligationsansatz:

- 5µl 2x Ligase-Puffer
- + 1µl pGEM®-T Easy (50ng/µl)
- + 1µl T4- Ligase (400U/µl)
- + 3µl *A-tailing*-Ansatz (s.o.)

#### Ligation in andere Vektoren:

Bei einer Ligation von Inserts in die Ziel-Vektoren erfolgte zunächst ein Restriktionsverdau von Vektor und Insert (2.2.5). Im Falle einer Restriktion mit nur einer Restriktionsendonuklease erfolgte anschließend eine Behandlung des geschnittenen Vektors mit alkalischer Phosphatase (*calf intestine phosphatase*, CIP), um eine Re-Ligation des Vektors zu unterbinden, indem spezifisch Phosphatgruppen von den 5'-Enden der DNA-Moleküle abgespalten werden. Hierfür wurde der Restriktionsansatz mit Hilfe des my-Budget PCR-Aufreinigungskits aufgereinigt und in 30µl ddH<sub>2</sub>O eluiert. Anschließend wurden 26µl des Eluats mit 3µl NEB3-Puffer (10x) und 1µl CIP (10U) versetzt und für 30 Minuten bei

37°C inkubiert. Die geschnittenen sowie aufgereinigten Vektoren und Inserts wurden elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.2.4), aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Kits NucleoSpin® Extract II aufgereinigt. Mit Hilfe eines analytischen Gels wurde die Menge an isolierter DNA anhand der Bandenstärke im Vergleich zum Größenstandard ermittelt. Für eine Ligation wurde die für einen dreifachen molaren Überschuss notwendige Insert-Menge gemäß der nachfolgenden Formel berechnet:

Formel:

$$\text{ng Insert} = (\text{ng Vektor} * \text{Anzahl bp Insert} / \text{Anzahl bp Vektor}) * 3$$

Ligationsansatz:

- 1µl T4-Ligase (400U/µl)
- + 1µl Ligase-Puffer (10x)
- + x µl Insert
- + x µl Vektor (50-100ng)
- + x µl ddH<sub>2</sub>O auf insgesamt 10µl Reaktionsvolumen

Die Ligation erfolgte über Nacht (üN) bei 4°C.

### **2.2.7 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration einer DNA- oder RNA-Probe wurde mit Hilfe des NanoDrop™ bzw. mit Hilfe des SPECTROstar Nano bestimmt. Hierbei wurden 1- 2µl der Probe aufgetragen und die Extinktion bei 260nm (Absorptionsbereich von Nukleinsäuren) und 280nm (Absorptionsbereich von Proteinen) gemessen. Das Verhältnis 260nm/280nm ermöglicht Rückschlüsse auf den Reinheitsgrad der jeweiligen Probe und sollte bei 1,8 bis 2,0 liegen (OD<sub>260nm</sub>/ OD<sub>280nm</sub>).

### **2.2.8 Herstellung kompetenter Zellen**

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurde zunächst eine Übernachtskultur der Bakterien in 5ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angesetzt. Am folgenden Tag wurden mit 1ml der Übernachtskultur 100ml des entsprechenden Mediums angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Bakterienkultur bei

800 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30ml eiskaltem Tfb1-Puffer resuspendiert, für 1-2 Stunden auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich vorsichtig gemischt.

Die Suspension wurde erneut bei 4°C bei 800 x g für 15 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 5ml eiskaltem Tfb2-Puffer aufgenommen. Im Anschluss wurden die kompetenten Bakterien in 50µl Aliquots sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Bedarf bei -70°C gelagert.

### **2.2.9 Transformation kompetenter Zellen**

Kompetente Zellen wurden zunächst schonend auf Eis aufgetaut und anschließend entweder mit 5µl eines jeweiligen Ligationsansatzes (siehe 2.2.6) oder mit 1-2µl Plasmid-DNA (siehe 2.2.10) versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Mit Hilfe einer Hitzeschock-Behandlung für 30 Sekunden bei 42°C wurden die kompetenten Zellen mit dem jeweiligen Plasmid transformiert. Nach einer zweiminütigen Abkühlung auf Eis wurde 1ml vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben und der Transformations-Ansatz für eine Stunde bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden 200µl des Ansatzes auf den entsprechenden LB-Selektionsplatten ausgestrichen. Der Rest des Ansatzes wurde für 5min bei 6000 rpm (*rounds per minute*) abzentrifugiert und ein Großteil des Überstandes abgenommen. Das Pellet wurde im verbleibenden Medium resuspendiert und ebenfalls auf eine entsprechende LB- Selektionsplatte ausgestrichen. Die LB-Selektionsplatten wurden üN bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte mit Hilfe des dem LB-Agar zugesetzten Antibiotikums Ampicillin. Am nächsten Tag wurden einzelne Klone gepickt und in LB-Amp-Medium üN (über Nacht) bei 37°C im Schüttler kultiviert.

### **2.2.10 Plasmid-Präparationen**

Die Plasmid-Präparation erfolgte im kleinen sowie im großen Maßstab mit Hilfe des Kits NucleoSpin® Plasmid (Miniprep) bzw. des Kits NucleoBond® PC100 (Midiprep). Die Durchführung ist in den Anleitungen der Hersteller beschrieben. Für eine große Anzahl von Klonen wurde die Plasmid-Minipräparation (3ml-Kulturen) ohne Verwendung eines Kits nach der folgenden Methode durchgeführt.

Plasmid-Minipräparation nach Good & Nazar (1997):

Die üN-Kulturen (siehe 2.2.9) wurden für zwei Minuten bei 13.000 rpm (RT) abzentrifugiert und die Pellets jeweils in 100µl „Lösung 1“ resuspendiert. Anschließend wurden für die Lyse der Zellen jeweils 200µl der „Lösung 2“ hinzugegeben, das Reaktionsgefäß invertiert und für 3min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150µl der „Lösung 3“ gestoppt und für 5min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 13.000rpm für 10min bei 4°C, wurden die Überstände (ÜS) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1ml Ethanol (unvergällt, 96%) vermischt, um die DNA zu fällen. Nach einer Inkubationszeit von 5min bei RT wurde erneut bei 13.000rpm für 10min (RT) abzentrifugiert und das Pellet (enthält die DNA) zusätzlich mit 500µl Ethanol (unvergällt, 70%) gewaschen. Das saubere Pellet wurde anschließend getrocknet und in 50µl TE-RNase A Puffer resuspendiert und für 30min bei 37°C inkubiert. Die isolierten Plasmide wurden mittels Restriktion (siehe 2.2.5) und Agarosegel-Elektrophorese (2.2.4) sowie durch Sequenzierung (2.2.11) auf ihre Richtigkeit überprüft.

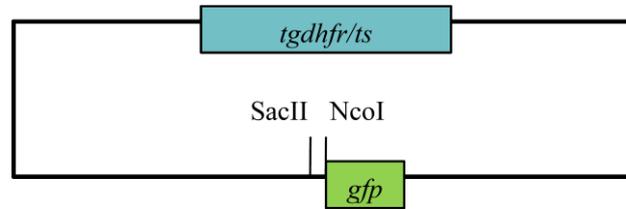
### **2.2.11 Sequenzierung von DNA**

DNA-Proben (500-800ng DNA) wurden bei der Firma SEQLAB GmbH (Göttingen, D) zur Sequenzierung in Auftrag gegeben. Die hierfür verwendeten Sequenzierungsprimer sind in Tabelle 2.7 aufgelistet.

### **2.2.12 *P. berghei* Expressionsvektoren**

#### **2.2.12.1 Der Expressionsvektor pL0031**

Der Vektor pL0031 (MRA-800; zur Verfügung gestellt über MR4 von AP Waters) ist ein Insertions-Plasmid, welcher die Kopplung des gewünschten Gens an *gfp* (*green fluorescent protein*) im endogenen Locus über eine *single crossover* ermöglicht. Die Integration des gewünschten Inserts in den Vektor erfolgte über SacII und NcoI. Zusätzlich enthält der Vektor eine *tgdhfr/ts-* (*toxoplasma gondii dihydrofolat reductase/ thymidilat synthetase*) Resistenzkassette für eine Selektion der erfolgreich transfizierten Parasiten mit Pyrimethamin.



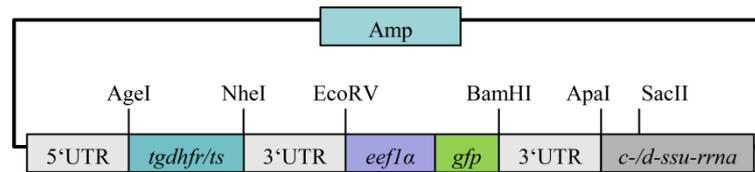
**Abb. 2.3:** Schematische Darstellung des pL0031-Vektors. Amp: Ampicillin-Resistenzkassette; *gfp*: *green fluorescent protein* (GFP); *tgdhfr/ts*: *toxoplasma gondii dihydrofolat reductase/thymidilat-Synthetase*.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Vektor zur *gfp*- Fusionierung des endogenen *pbmapk1*- Lokus verwendet. Hierfür wurde das 3'-Ende der *pbmapk1* (1257bp) mit den Primern #2179 und #2180 (siehe Tab. 2.7 Oligonukleotide) amplifiziert und konnte über einen Restriktionsverdau mit SacII und NcoI in den Vektor integriert werden. Durch eine XbaI- Schnittstelle innerhalb der *pbmapk1*- Sequenz wurde das Konstrukt linearisiert und über einen *single crossover* in den endogenen Lokus von *P. berghei* ANKA integriert. Die Sequenzierung des fertigen Konstruktes erfolgte mit Hilfe der Primer #616, #2148 und #1106. Die erfolgreiche Integration wurde mit Hilfe der Primer #616, #1108, #1503 und #2119 überprüft.

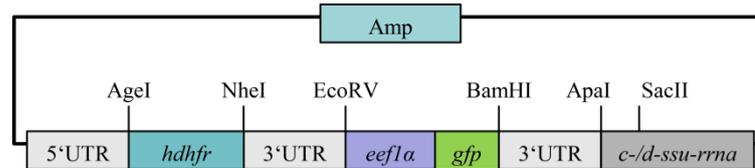
### 2.2.12.2 Die Expressionsvektoren pL0017-GFP-N und pL0017-GFP-N-hDHFR

Der Expressionsvektor pL0017-GFP-N basiert auf dem Vektor pL0017 (MRA-786; MR4, AP Waters) und wurde in der AG Heussler (BNITM, Hamburg) angefertigt. Er beinhaltet eine Ampicillin- Resistenzkassette (Amp) zur Selektion in *E. coli* Bakterien, sowie die *tgdhfr/ts*- Resistenzkassette, welche von der 5'- und 3'UTR (*untranslated region*) der *P. berghei dihydrofolat reductase (pbdhfr)* flankiert vorliegt. Der *orf* steht unter der Kontrolle des konstitutiven *eef1 $\alpha$* - (*eukaryotic elongation factor 1 alpha*) Promotors und ermöglicht eine Fusion an *gfp* am 5'-Ende. Die Integration des Vektors erfolgt über einen *single crossover* in den *c-/d-ssu-rrna*- (*c-/d*-Abschnitt der *small subunit of ribosomal rna*) Lokus von *P. berghei* ANKA (siehe Abb. 2.4A).

A



B



**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung der pL0017-GFP-N- basierenden Vektoren. A: pL0017-GFP-N B: pL0017-GFP-N-hDHFR. Amp: Ampicillin-Resistenzkassette; *gfp*: *gren fluorescent protein* (GFP); *tdhfr/ts*: *toxoplasma gondii dihydrofolat reductase/ thymidilat-Synthetase*; *hdhfr*: *humane dihydrofolate reductase*; *eef1a*: *eukaryotic elongation factor 1 alpha- promoter*; *c-/d-ssu-rrna*: *c-/d- Abschnitt der small subunit ribosomal rna*; 3'- und 5' UTR: 3' und 5' *untranslated region*.

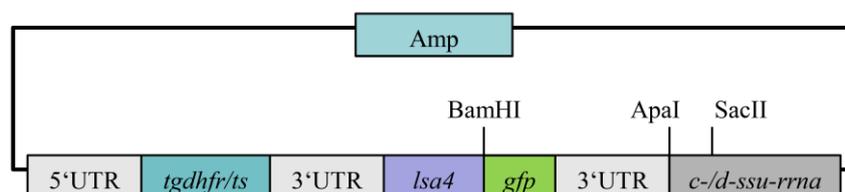
Zur Herstellung des Expressionsvektors pL0017-GFP-N-hDHFR wurde mit Hilfe der Primer #2190 und #2191 (das Template wurde freundlicherweise von Dr. Christine Lehmann zur Verfügung gestellt) die *hdhfr*- Resistenzkassette (hDHFR: humane Dihydrofolat- Reduktase) amplifiziert. Über einen Restriktionsverdau mit AgeI und NheI, wurde die *tdhfr/ts*- Resistenzkassette im Vektor pL0017-GFP-N mit der *hdhfr*-Resistenzkassette ausgetauscht (siehe Abb. 2.4B).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der pL0017-GFP-N-Vektor für die Expression von trunkierten Varianten der C-terminalen Domäne der PbMAPK1 verwendet. Zur Herstellung des PbMAPK1-CTD- $\Delta$ 1-Konstruktes wurden die letzten 734bp des 3'-Endes der *pbmapk1* mit Hilfe der Primer #2183 und #2185 amplifiziert. Zur Herstellung der PbMAPK1-CTD- $\Delta$ 2-Konstruktes wurden die letzten 515bp des 3'-Endes der *pbmapk1* mit Hilfe der Primer #2184 und #2185 amplifiziert. Als Template diente *P. berghei* ANKA Wildtyp-gDNA. Die Integration in den Expressionsvektor erfolgte bei beiden Konstrukten über XbaI. Die Sequenzierung beider Konstrukte erfolgte mit Hilfe des Primers #1501 und zusätzlich beim PbMAPK1-CTD-  $\Delta$ 1-Konstrukt mit #1114.

Die Expressionsvektoren pL0017-GFP-N und pL0017-GFP-N-hDHFR wurden für eine Expression der PbMAPK2 verwendet. Hierfür wurde die *pbmapk2* mit Hilfe der Primer #2067 und #2068 anhand von Wildtyp gDNA amplifiziert und über XbaI in beide Expressionsvektoren eingebracht. Die Sequenzierung erfolgte mit den Primern #1501, #2022, #2039, #2091 und #2092.

### 2.2.12.3 Der Expressionsvektor pL0017.1.1

Der Expressionsvektor pL0017.1.1 basiert ebenfalls auf dem pL0017- Vektor (MRA786; MR4, AP Waters) und wurde in der AG Heussler (BNITM, Hamburg) hergestellt. Der Unterschied zum pL0017-GFP-N- Vektor besteht darin, dass der *orf* unter der Kontrolle des Leberphase- spezifischen *lsa4*- (*liverstage antigen 4*) Promotors steht und die *gfp*-Fusion 3'-Ende erfolgt (siehe Abb. 2.5). Der *lsa4*-Promotor ermöglicht die Expression des gewünschten Proteins erst ab dem Stadium des frühen Leberschizonten und verhindert somit eine störende Expression in vorausgehenden Entwicklungsstadien (Helm et al., 2010).



**Abb. 2.5:** Schematische Darstellung des pL0017.1.1-Vektors. Amp: Ampicillin-Resistenzkassette; *gfp*: *green fluorescent protein* (GFP); *tgdhfr/ts*: *toxoplasma gondii dihydrofolat reductase/ thymidilat-Synthetase*; *lsa4*: *liverstage antigen 4*- promoter; *c-/d-ssu-rrna*: *c-/d- Abschnitt der small subunit ribosomal rna*; 3'- und 5' UTR: 3' und 5' *untranslated region*.

Dieser Expressionsvektor wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Expression von PbCentrin3 und der Tandem-Domäne 2x-FYVE verwendet. Zur Herstellung von pL0017.1.1-Centrin3 wurde *pbcentrin3* anhand von cDNA (das Gen *pbcentrin3* enthält Introns) mit Hilfe der Primer #2125 und #2106 amplifiziert (auch zur Sequenzierung verwendet) und über BamHI in den Vektor eingebracht. Die Herstellung der Tandem-Domäne *2x-fyve* dagegen erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurde das erste Fragment der Tandem-Domäne (*fyve<sub>1</sub>*) mit Hilfe der Primer #1858 und #1859 anhand von HepG2-cDNA amplifiziert. Die Klonierung

erfolgte zunächst über pGEM und wurde mit den Primern #1340 und #1341 sequenziert. Der korrekte Klon pGem-FYVE<sub>1</sub> diente als Template für das zweite Fragment (*fyve*<sub>2</sub>). Mit Hilfe der Primer #1856 und #1857 wurde FYVE<sub>2</sub> amplifiziert und in den Klon pGem-FYVE<sub>1</sub> über SpeI und Sall eingebracht. Die Sequenzierung des Klons pGem-2x FYVE erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Primer #1340 und #1341. Über XbaI wurde *2xfyve* in den Vektor pL0017.1.1 eingebracht (pL0017.1.1-2x FYVE) und mit #1501 auf die korrekte Orientierung überprüft.

### **2.2.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Um bestimmte Proteine von Blutphase-Parasiten nachweisen zu können, wurde Parasitensediment (siehe 2.3.1.3) mit Laemmli-Puffer und DTT versetzt, für 5min bei 95°C gekocht und mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Hierfür wurden 10µl der Probe in eine Tasche eines 12%igen Polyacrylamidgels aufgetragen. Für einen anschließenden Westernblot wurde als Größenstandard *prestained PageRuler™ Protein Ladder* (10-170kDa) verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 25mA pro Gel für ca. eine Stunde. Die Zusammensetzung für je zwei Trenn- bzw. Sammelgele ist der Tab. 2.17 zu entnehmen.

Tab. 2.17: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel

Zusammensetzung	Trenngel	Sammelgel
Trenngel-/ Sammelgelpuffer	2,5ml	1,25ml
30% Acrylamid/ Bisacrylamid- Lösung (37,5:1)	4,66ml	650µl
ddH <sub>2</sub> O	2,8ml	3,05ml
10% APS	50µl	25µl
TEMED	5µl	5µl

### **2.2.14 Western Blot**

Nach erfolgter SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.2.13) konnte ein Westernblot durchgeführt werden. Hierbei wurden die aufgetrennten Proteine im SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Hierfür wurden zunächst die Nitrocellulosemembran, drei *Whatman*-Papiere und zwei Schwämme pro Blot in Transferpuffer getränkt. Der Aufbau des Blottes erfolgte in folgender Reihenfolge, ausgehend von der Anode zur Kathode: Ein Schwamm, zwei *Whatman*-Papiere, Nitrocellulosemembran, SDS-Polyacrylamidgel, ein *Whatman*-Papier, ein Schwamm. Der Blot wurde in einer Halterung in die Blotting-Kammer eingesetzt, welche mit Transferpuffer aufgefüllt wurde, und der Proteintransfer fand für eine Stunde bei 400mA statt. Anschließend wurde die Membran entnommen und für eine Stunde auf einem Laborroller mit 5% Milchpulver in TBS inkubiert (RT), um freie Bindungsstellen zu blocken. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in 3ml 2,5% Milchpulver in TBS-T ün bei 4°C. Am Folgetag wurde die Membran zunächst dreimal für jeweils 5min mit TBS-T gewaschen und anschließend für 1 Stunde bei RT mit dem Zweitantikörper (3ml 2,5% Milchpulver in TBS-T) auf einem Laborroller inkubiert. Die verwendeten Antikörper sind den Tabellen 2.8 und 2.9 zu entnehmen. Um die ungebundenen Zweitantikörper zu entfernen, wurde erneut dreimal für 10min mit TBS-T gewaschen und anschließend der Flüssigkeitsfilm auf der Membran mit Hilfe eines Filterpapiers entfernt. Nachfolgend wurde die Membran für 3min mit den Reagenzien der Chemilumineszenz-Kits Super Signal<sup>®</sup>West Piko inkubiert, zwischen zwei durchsichtige Folien gelegt und mit Klebeband in einer Entwicklerkassette fixiert. Aufgrund der Zweitantikörper, welche an Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt sind, konnte durch Zugabe der ECL-Reagenzien eine Enzymreaktion und somit eine Biolumineszenz ausgelöst werden. Durch Auflegen eines Entwicklerfilms konnten so die zu detektierenden Proteine sichtbar gemacht werden. Anschließend wurde der Film entwickelt.

### **2.3. Plasmodium- spezifische Methoden**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit dem Nagetier-pathogenen Malariaparasiten *P. berghei* ANKA (Vincke und Lips, 1948) durchgeführt. Die Kultivierung dieses Modellorganismus erfolgte sowohl im Säugetierwirt (Maus) als auch im Vektor (Mücke). Dies war essentiell, um infektiöse Sporozitenstadien zu erhalten, womit die Durchführung der *in vitro* Experimente erfolgen konnte, da eine Dauerkultur von *Plasmodium* Leberstadien nicht möglich ist.

Die Arbeiten mit dem Säugetierwirt wurden nach dem Prinzip der „drei R“ (*replacement, reduction and refinement*) geplant und in Übereinstimmung mit den aufgestellten und überprüften Richtlinien der Hamburger Ethik-Kommission (Nr. FI 28/06) durchgeführt.

#### **2.3.1 Blutstadium**

##### **2.3.1.1 Bestimmung der Parasitämie**

Um die Parasitämie im Blut einer infizierten Maus bestimmen zu können, wurde ein kleiner Tropfen Blut aus der Schwanzvene entnommen und auf einem Objektträger ausgestrichen. Der Blutausrich wurde für zwei Minuten in 100%igem Methanol fixiert und anschließend für ca. 15min in einer Giemsa-Färbelösung gefärbt. Mit Leitungswasser wurde dann der gefärbte Blutausrich abgespült und anschließend luftgetrocknet. Unter dem Mikroskop wurden bei 100-facher Vergrößerung Bereiche ausgewählt, in denen die Erythrozyten gleichmäßig verteilt vorlagen. Um eine möglichst genaue Aussage über die Parasitämie (prozentualer Anteil infizierter Erythrozyten) der Maus treffen zu können, wurden mehrere Großquadrate ausgezählt, in jedem der prozentuale Anteil infizierter Erythrozyten bestimmt und die so erhaltenen Werte gemittelt.

##### **2.3.1.2 Herstellung von *P.berghei*- Blutstabilaten**

Zur Herstellung von *P.berghei*- Blutstabilaten wurde die jeweilige Maus mit einer Parasitämie ab 2% durch CO<sub>2</sub> getötet und über eine Herzpunktion bis zu 1ml Blut entnommen. Das entnommene Blut wurde unmittelbar in einem 2ml-Reaktionsgefäß mit ca. 50µl Heparin gemischt, um eine Gerinnung zu unterbinden. Jeweils 100µl Blut wurden mit 200µl

Cryolösung gemischt und in einem Cryo-Röhrchen im Stickstofftank tiefgefroren. Dies dient der längerfristigen Lagerung von Blutphase-Parasiten (Wildtyp- oder transgene Parasiten). Bei Bedarf kann das Blutstabilat aufgetaut und vollständig einer naiven Maus intraperitoneal gespritzt werden.

### **2.3.1.3 Saponinextraktion**

Zur Aufreinigung von *P. berghei* Parasiten innerhalb des Blutstadiums wurde eine Saponinextraktion durchgeführt. Aufgrund der lytischen Wirkung des Saponins auf Membranen können durch eine kurze Inkubationszeit die Erythrozyten lysiert werden, sodass die Parasiten frei werden, ohne zerstört zu werden. Hierfür wurde das Blut einer infizierten Maus sedimentiert (4.000 x g, 4°C, 3min) und das Blutserum entfernt. Die infizierten Erythrozyten wurden nach kurzem Waschen mit 1ml PBS pH 7,4 mit 1ml einer 0,15%igen Saponinlösung versetzt. Nach einer kurzen Inkubationszeit auf Eis (1min) wurde das Lysat abzentrifugiert (3min, 4.000 x g, 4°C). Dieser Vorgang wurde, falls nötig, so oft wiederholt, bis ein reines Parasitensediment als ein hellbraunes Pellet vorlag. Dieses wurde abschließend mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Eine Möglichkeit zur weiteren Verwendung bestand darin, die so erhaltenen erythrozytären Parasiten durch Zugabe von Laemmli Puffer und einer Inkubationszeit von 5min bei 95°C zu lysieren. Die dadurch frei werdenden Parasiten-Proteine konnten auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden (siehe 2.2.13). Das Parasitensediment konnte jedoch auch für die Isolation von genomischer DNA (gDNA) eingesetzt werden (siehe 2.3.1.4).

### **2.3.1.4 Isolierung von gDNA**

Die Isolierung von genomischer DNA (gDNA) aus *P. berghei* erfolgte aus Parasitensedimenten der erythrozytären Stadien (siehe 2.3.1.3). Das Sediment wurde hierfür in 200µl PBS pH 7,4 resuspendiert und die gDNA mit Hilfe des NucleoSpin®Blood QuickPure-Kits nach Angaben des Herstellers isoliert. Die isolierte gDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.3.1.5 Herstellung von transgenen *P. berghei* Parasiten

Für die Herstellung von transgenen *P. berghei* Parasiten (nach Janse, Ramesar und Waters, 2006) wurden 30µg der einzusetzenden Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in einem 40µl-Ansatz linearisiert (Restriktionsverdau, siehe 2.2.5). Bei einem Verdau mit ApaI und SacII erfolgte die Inkubation zunächst für 30min bei 25°C und anschließend für 2 Stunden bei 37°C. Anschließend erfolgte eine Auftrennung über ein Agarose-Gel, um den gewünschten linearisierten Vektor-*backbone* ausschneiden zu können (siehe 2.2.4). Mit Hilfe des Kits NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II wurde der linearisierte Vektor extrahiert und in 20µl ddH<sub>2</sub>O eluiert. Die Konzentration wurde mittels Nanodrop bestimmt (siehe 2.2.7).

Für die Transfektion wurde eine mit *P. berghei* ANKA (Wildtyp)- infizierte Maus mit einer Parasitämie zwischen 1% und 3% mit CO<sub>2</sub> getötet. Über eine Herzpunktion wurde das Blut entnommen (bis zu 1ml), welches unmittelbar mit 5ml RPMI1640 Komplettmedium und 300µl Heparin versetzt wurde. Die Suspension wurde anschließend für 8min bei 450 x g und RT abzentrifugiert und das Pellet in 50ml frischem Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde tropfenweise auf die Oberfläche von weiteren 50ml Medium innerhalb einer Zellkulturflasche (175cm<sup>2</sup> ohne Belüftung) gegeben. Nach einer Begasung für ca. 90 Sekunden mit 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub> bei 1,5-2 bar, wurde die Zellsuspension für 10min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend ün im Brutschrank bei 37°C geschwenkt. Die Kultivierung dient der Anreicherung reifer Schizonten, welche aus den Ringformen und den jungen Trophozoiten hervorgehen. Das Vorhandensein von reifen Schizonten wurde am Folgetag mit einem Blutausschicht überprüft. Bei einer hohen Schizontenanzahl wurde die Kultur auf drei bis vier 50ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und jeweils mit 10ml Nycodenz-PBS-Lösung unterschichtet. Durch einen nachfolgenden Zentrifugationsschritt bei 450 x g für 20min (RT; ohne Bremse und Beschleunigung auf niedrigster Stufe) lassen sich die Zellen in der Blutkultur anhand ihrer Dichte auftrennen (Dichte-Gradienten-Zentrifugation). Aufgrund der im Vergleich zum Nycodenz geringeren Dichte der reifen Schizonten, bilden diese einen bräunlichen Ring oberhalb der Nycodenz-Lösung, wohingegen die restlichen Zellen der Kultur pelletieren (siehe Abb. 2.6). Die Schizonten können mit Hilfe einer Pasteur-Pipette entnommen und anschließend mit 40ml Medium gewaschen (erneute Zentrifugation bei 450 x g; mit Bremse und Beschleunigung auf höchster Stufe) und das Pellet in 1ml Medium vorsichtig resuspendiert werden. Für jeden Transfektions-Ansatz wurden 5-10µg der entsprechenden linearisierten Plasmid-DNA mit

100µl Nucleofector™ 88A6 Lösung (Amaxa biosystems, Human T Cell Nucleofector™ Kit *solution*) gemischt. Zeitgleich wurde je Ansatz 100-200µl der Schizonten-Suspension für 5 Sekunden bei 13.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet anschließend mit der vorbereiteten DNA-Suspension resuspendiert. Dieses Gemisch wurde dann in eine Elektroporationsküvette überführt und mit Hilfe des Amaxa Nucleofector Gerätes die Elektroporation durchgeführt (Programm U33). Unmittelbar im Anschluss wurden 100µl Medium in die Küvette gegeben und das Reaktionsgemisch vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die transfizierten Schizonten wurden intravenös in die Schwanzvene einer Maus injiziert, wobei sehr genau darauf geachtet werden musste, dass sich keinerlei Luftblasen in der Spritze befinden.



**Abb. 2.6: Schizonten-Isolation mittels Dichte-Gradienten-Zentrifugation.** Die Blutsuspension der üN-Kultur wurde mit einer Nycodenz-PBS-Lösung unterschichtet (links). Nach der Zentrifugation befindet sich auf der Nycodenz-PBS-Lösung eine dünne bräunliche Schicht, welche die gewünschten reifen Schizonten enthält (rechts). *Verändert nach Janse, Ramesar & Waters 2006.*

Durch die Elektroporation gelangt das linearisierte Konstrukt in die Parasiten, wo es über einen homologen Bereich im Vektor per *single crossover* in das Genom von *P. berghei* integriert werden kann. Durch Selektion der transfizierten Parasiten mit Pyrimethamin bzw. WR werden die nicht-transfizierten Parasiten eliminiert (siehe 2.3.1.6).

### 2.3.1.6 Selektion transgener Parasiten

#### Selektion mit Pyrimethamin

Die Selektion von transfizierten *P. berghei*- Parasiten erfolgt mit dem Malaria-Medikament Pyrimethamin. Einen Tag nach Vorinfektion einer Maus mit einem solchen Stabilat wird dieses Medikament dem Trinkwasser der Maus zugesetzt. Hierfür wird Pyrimethamin in DMSO (Stocklösung 7mg/ml) aufgelöst, 1:100 mit Leitungswasser gemischt und auf einen pH-Wert zwischen 4 und 5 eingestellt. Das Medikament Pyrimethamin greift in den für den Parasiten essentiellen Folsäure-Stoffwechsel ein, indem es die plasmodiale Dihydrofolat-Reduktase hemmt. Transgene Parasiten, welche den Selektionsmarker *tgdhfr/ts* (kodiert für die Dihydrofolat-Reduktase/Thymidilat-Synthetase aus *Toxoplasma gondii*) tragen, können somit bei Pyrimethamingabe positiv selektioniert werden, wohingegen die Wildtyp-Parasiten abgetötet werden. Die Expression des Resistenzgens *tgdhfr/ts* wird von der 5'- und 3'-nicht-translatierten Region (UTR, *untranslated region*) aus *P. berghei* reguliert.

#### Selektion mit WR99210 (WR)

Im Falle einer geplanten Transfektion eines transgenen Parasiten, in dem die Pyrimethamin-Resistenzkassette *tgdhfr/ts* bereits vorhanden ist, musste auf eine Selektion mit WR99210 zurückgegriffen werden. Hierfür wurde die Resistenzkassette *tgdhfr/ts* im Konstrukt mit der Resistenzkassette *hdhfr* (humane Dihydrofolat-Reduktase) ausgetauscht. Transgene Parasiten, welche den Selektionsmarker *hdhfr* tragen, können mit Hilfe des Medikaments WR99210 positiv selektioniert werden. Hierfür wurden 2,4mg WR99210 in 300µl Ethanol (99%) und 30µl Benzylalkohol gelöst und mit Wasser auf 1ml aufgefüllt. Diese Suspension konnte für eine Woche bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert werden. Einen Tag nach Infektion einer Maus mit den doppelt-transgenen Parasiten wurden täglich 50µl der WR-Lösung subcutan in die Nackenfalte injiziert. Dies wurde an vier aufeinander folgenden Tagen durchgeführt, sodass das Depot unter der Haut für bis zu insgesamt sieben Tagen ab Infektion wirken konnte. Wurde die Maus innerhalb dieser Woche nicht positiv, konnte davon ausgegangen werden, dass die Transfektion nicht erfolgreich war.

### **2.3.1.7 Live imaging von *P. berghei* Blutstadien**

Für ein *live imaging* von *P. berghei* Blutstadien wurde ein Aliquot des zu untersuchenden infizierten Blutes mit Hoechst 33342 (1:20.000) für ca. 10min angefärbt und auf einem Objektträger mit Deckgläschen am Fluoreszenzmikroskop bei 100facher Vergrößerung betrachtet. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden die Ränder des Deckgläschens mit Nagellack versiegelt.

## **2.3.2 Mückenstadium**

### **2.3.2.1 Zucht von *Anopheles stephensi***

Die Zucht der in dieser Arbeit verwendeten *A. stephensi* Mücken erfolgte in einer klimatisierten Kammer bei 27°C und einer Luftfeuchte von 80% in einem mit Zeitschaltuhr geregelten 12-Stunden Tag-und-Nacht-Rhythmus. Die adulten Mücken erhielten alle zwei Wochen eine Blutmahlzeit aus humanem Spenderblut (1:1 mit FCS gemischt). Die Blut-FCS-Suspension wurde in einen speziellen Metallzylinder gefüllt und durch einen zirkulierenden Wasserkreislauf mit Hilfe eines Wasserbades auf 37°C erwärmt. Der Metallzylinder wurde mit Parafilm abgedichtet, durch den die weiblichen Mücken ihre Blutmahlzeit aufnehmen konnten. Diese eiweißreiche Mahlzeit führte zwei Tage später zur Eiablage in einer Schale mit Wasser und einem Filterpapier. Die Eier wurden in eine Metallschale mit physiologischer NaCl-Lösung (0,9%) und einem Tropfen Liquifry (flüssiges Fischfutter) gegeben. Nach ca. 2 Tagen schlüpfen die Larven, welche sich für die folgenden 10 Tage in Schalen mit Leitungswasser bis zum Puppenstadium weiter entwickelten. In diesem Zeitraum wurde alle zwei Tage das Wasser gewechselt und in jede Schale eine Futtertablette gegeben. Die Puppenstadien wurden abgeschöpft und in einer kleinen Schale mit Leitungswasser in Zuchtkäfige gestellt, in denen nach 2 Tagen die adulten Mücken schlüpfen. Die Ernährung der Mücken erfolgte mit einer 10%igen Glukoselösung mit 0,02% PABA.

### 2.3.2.2 Infektion von *Anopheles stephensi*- Stechmücken mit *Plasmodium berghei*

Um *Anopheles stephensi*- Stechmücken mit *P. berghei* erfolgreich infizieren zu können, wurden Mäuse mit einer möglichst hohen Parasitämie von mindestens 7-8% benötigt. Hierfür wurde eine Vorinfektion einer NMRI-Maus durchgeführt, wobei ein Blutstabilat (2.3.1.2) intraperitoneal gespritzt wurde. Nach ca. 5 bis 6 Tagen sollte die Parasitämie der Maus bei mindestens 2-3% liegen, sodass ein Bluttransfer in eine weitere Maus stattfinden konnte. Hierfür wurde die Vorinfektions-Maus mit CO<sub>2</sub> getötet, mittels Herzpunktion Blut entnommen und davon je nach Parasitämie 50-150µl in eine weitere Maus intraperitoneal gespritzt (bei 10-12% ca. 50µl, bei 2-3% bis zu 150µl). Zwei bis drei Tage später wurde die Parasitämie der Transfer-Maus bestimmt (2.3.1.1) und überprüft, ob eine effiziente Exflagellation männlicher Gametozyten beobachtet werden konnte. Hierfür wurde ein kleiner Blutstropfen auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Ränder des Deckgläschens wurden mit Nagellack abgedichtet, damit das Blut nicht austrocknen konnte. Nach 10-minütiger Inkubation bei 21°C wurde das Blut unter einem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung betrachtet. Die Inkubation bei 21°C diente der Simulation der Bedingungen ähnlich denen in der Mücke. Durch die Temperatur-Veränderung setzt normalerweise die Exflagellation der männlichen Gameten ein. Wenn eine deutliche Exflagellation in der Blutprobe zu beobachten war und die Parasitämie bei mindestens 7-8% lag, konnte die Infektion der Stechmücken durchgeführt werden. Hierfür wurden der Maus je nach Größe und Gewicht 90-120µl eines Anästhetikums (6% Domitor, 14% Ketavet und 80% PBS) intraperitoneal gespritzt. Nach wenigen Minuten konnte diese für ca. 30-45min auf einen Käfig mit ca. 100 naiven weiblichen *Anopheles stephensi*- Mücken (Alter 3-10 Tage) gelegt werden (21°C). Die Parasiten wurden so über die Blutmahlzeit der Mücken aufgenommen. Anschließend wurde die Maus mit CO<sub>2</sub> getötet. Die infizierten Mücken konnten nach einem Zeitraum von 16-19dpi (*days post infection*) für zwei bis drei Wochen für die Isolation der Sporozoiten aus den Speicheldrüsen verwendet werden.

### 2.3.2.3 Bite-Back

In regelmäßigen Abständen musste bei den häufig verwendeten Parasiten (Wildtyp) ein sogenannter *bite-back* durchgeführt werden. Hierbei wurden infizierte Mücken, welche ausreichend Sporozoiten in den Speicheldrüsen besaßen, verwendet, um Mäuse zu infizieren. Dies diente der Herstellung von Blutstadien, welche den kompletten Lebenszyklus im

natürlichen Wirt (der Maus und der Mücke) durchlaufen haben. Würde man ausschließlich in der Blutphase kultivieren, könnte dies zu einem Verlust der Fähigkeit des Parasiten kommen, das Mücken- und Leberstadium erfolgreich abzuschließen. Hierfür wurde eine naive Maus wie in 2.3.2.2 anästhetisiert und auf einen Käfig mit infizierten Mücken gelegt. Durch die Blutmahlzeit der Mücken an der naiven Maus gelangen die Sporozoiten aus den Speicheldrüsen in den Wirt. Nach ca. 10 bis 15min wurde die Maus zurück in den Käfig gelegt und das Ende der Narkose-Wirkung abgewartet. Nach ausreichender Beobachtung wurde die Maus für ca. 7 Tage gehalten, bis eine Parasitämie von mind. 2-3% zu verzeichnen war (siehe 2.3.1.1). Bei ausreichender Parasitämie wurden Blutstabilate angefertigt (siehe 2.3.1.2), welche als S<sub>0</sub>-Stabilate bezeichnet wurden. Die fortlaufenden Stabilate wurden S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> usw. genannt. Sobald S<sub>4</sub> bzw. S<sub>5</sub> erreicht war, wurde ein erneuter *bite back* durchgeführt.

### **2.3.3 Leberstadium**

#### **2.3.3.1 Kultivierung von HepG2- Zellen**

HepG2-Zellen sind adhärent wachsende, humane Hepatomazellen. Die Kultur erfolgte in 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen in 20ml MEM-Komplettmedium. Dies erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank. Die Zellen wurden stets nach drei bis vier Tagen passagiert. Hierfür wurde zunächst das Medium aus der Zellkulturflasche abgenommen und die Flasche zweimal mit 10ml sterilem 1xPBS vorsichtig gewaschen, um Medium-Rückstände zu entfernen. Die Ablösung der Zellen erfolgte mit einer ca. 5-minütigen Inkubation mit 2ml Accutase im Brutschrank. Accutase weist eine proteolytische sowie kollagenolytische Aktivität auf und löst adhärente Zellen deutlich schonender im Vergleich zur herkömmlichen Variante mit Trypsin/EDTA ab. Die abgelösten Zellen wurden mit frischem, vorgewärmtem MEM-Komplettmedium auf 10ml aufgefüllt, um die Reaktion zu stoppen. Von dieser Zellsuspension wurden ca. 2ml in einer neuen Zellkulturflasche mit 20ml MEM-Komplettmedium gemischt und kultiviert.

### 2.3.3.2 Aussäen von HepG2-Zellen

Für eine Infektion mit *P. berghei* Sporozoiten (siehe 2.3.3.3) wurden HepG2-Zellen auf eine Konzentration von 4 bis  $7 \times 10^4$  Zellen/ml in MEM-Komplettmedium eingestellt. In jede Vertiefung einer 24-Well-Platte wurde ein rundes Deckgläschen gelegt, auf welches 1ml der verdünnten Zellsuspension gegeben wurde (für indirekte Immunfluoreszenzanalysen, IFA: siehe 2.3.3.4). Für andere Experimente, wie z.B. RNA-Isolation (siehe 2.3.3.7) wurde auf ein Deckgläschen verzichtet. Für *Live-imaging*-Analysen (siehe 2.3.3.6) wurden pro Glasboden-Kulturschale (*glass-bottom dish*)  $1 \times 10^5$  Zellen in 2ml MEM-Komplettmedium ausgesät.

### 2.3.3.3 Präparation von Sporozoiten aus *A. stephensi* zur Infektion von HepG2- Zellen

Ungefähr 16-19 Tage nach der Blutmahlzeit (2.3.2.2) wandern die Sporozoiten in die beiden dreilappigen Speicheldrüsen der Mücke aus. Für die Präparation der Speicheldrüsen wurden mit *P. berghei* infizierte *A. stephensi* mit Chloroform betäubt, kurz in 70%igem Ethanol geschwenkt und anschließend in 1x PBS gelegt. Unter einem Binokular bei 20-facher Vergrößerung wurden die Speicheldrüsen durch Abziehen des Kopfes der Mücke freigelegt. Die isolierten Speicheldrüsen wurden in einem 1,5ml Reaktionsgefäß in 200µl MEM-Komplettmedium gesammelt. Das Medium enthielt zusätzlich das Antimykotikum Amphotericin (MEM+AT, 25µg/µl), um das Kontaminationsrisiko zu mindern. Die gesammelten Speicheldrüsen wurden kurz abzentrifugiert und anschließend mit Hilfe eines Pistills im Reaktionsgefäß zerkleinert, sodass die Sporozoiten frei im Medium vorlagen. Die Menge an isolierten Sporozoiten wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt, um eine definierte Anzahl an Sporozoiten zur Infektion von HepG2-Zellen verwenden zu können. Für die Infektion von HepG2-Zellen wurden mindestens 10.000 Sporozoiten in 200µl MEM+AT pro Well einer 24-Well Platte und mindestens 30.000 Sporozoiten in 400µl MEM+AT pro *glass bottom dish* eingesetzt. Das Medium der zu infizierenden HepG2-Zellen wurde abgenommen und die Sporozoiten-Suspension auf die Zellen gegeben. Das Medium wurde dann erstmalig nach 5-6 Stunden Inkubation im Brutschrank (37°C und 5% CO<sub>2</sub>) sowie jeweils zweimal täglich mit MEM+AT gewechselt.

#### 2.3.3.4 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA)

Um eine IFA von *P. berghei*- Leberstadien anfertigen zu können, wurden HepG2-Zellen in 24-Well Platten mit Deckgläschen ausgesät (siehe 2.3.3.2) und mit *P. berghei* infiziert (siehe 2.3.3.3). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (hpi, *hours post infection*) konnten die infizierten HepG2-Zellen auf den Deckgläschen fixiert werden. Hierfür wurde das Medium in den entsprechenden Wells abgenommen und die Deckgläschen dreimal mit je 1ml 1xPBS gewaschen. Die Fixierung der infizierten Zellen fand mit einer 20-minütigen Inkubation mit 4% PFA/PBS statt. Die fixierten Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen, anschließend in 1ml Methanol (-20°C) permeabilisiert und bei -20°C gelagert.

Um eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse durchführen zu können, wurden die in Methanol gelagerten Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen, um die Methanol-Rückstände zu entfernen. Um freie Bindungsstellen abzublocken, wurden die Deckgläschen für mindestens eine Stunde in 10% FCS/PBS bei RT inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit den entsprechenden Erstantikörpern in 10% FCS/PBS in dunkler, feuchter Atmosphäre für 2 Stunden bei RT oder üN bei 4°C. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit den jeweiligen Zweitantikörpern und dem Kernfarbstoff DAPI in 10% FCS/PBS für eine Stunde in dunkler, feuchter Atmosphäre bei RT inkubiert. Die Zweitantikörper sind an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, um die gebundenen Strukturen unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen zu können. Die verwendeten Antikörper sind den Tab. 2.8 und Tab. 2.9 zu entnehmen. Anschließend erfolgten ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS und ein kurzes Eintauchen der Deckgläschen in ddH<sub>2</sub>O. Die überschüssige Flüssigkeit wurde mit Hilfe eines Papiertuchs abgetupft und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten in einen Tropfen des Eindeckmediums DAKO auf einem Objektträger (Superfrost®) aufgebracht. Das Eindeckmedium härtete über Nacht im Kühlschrank aus, sodass die gefärbten Deckgläschen unter dem Mikroskop bei 60- bzw. 100-facher Vergrößerung analysiert und fotografiert werden konnten (Olympus FluoView™ 1.7b). Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe des Programmes Adobe Photoshop Elements 6.0.

### 2.3.3.5 Bestimmung der Infektiösität und Viabilität von transgenen Parasiten

Veränderungen des Genoms, beispielsweise durch die Deletion eines Gens, können Auswirkungen auf die Infektiösität und Viabilität des Parasiten haben. Um mögliche Einflüsse untersuchen zu können, wurde die Anzahl der Parasiten bestimmt, welche zum Einen in der Lage waren ein Leberstadium zu etablieren und zum Anderen erfolgreich die Leberphase abschließen konnten. Hierfür wurde eine definierte Anzahl an Sporozoiten auf Leberzellen gegeben und ein Teil der infizierten Zellen 24hpi fixiert und gefärbt, um die Parasiten auszählen zu können. Die Anzahl der gezählten Leberphase-Parasiten wurde auf die Anzahl der eingesetzten Sporozoiten bezogen, um so prozentual die Infektionsrate zu bestimmen. Der zweite Teil der infizierten Leberzellen wurde bis zum Zeitpunkt 65hpi weiter kultiviert. Am Ende der Leberphase (ca. 65hpi) lösen sich die reifen Leberphase-Parasiten aus dem Zellverband in den Zellkulturüberstand ab (*detached cells*) und beginnen mit der Abschnürung der Merosomen. Die Überstände wurden mit Hoechst 33342 gefärbt, um die *detached cells* von den Merosomen unterscheiden zu können. Unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop wurde die Anzahl der *detached cells* bestimmt. Die Anzahlen der eingesetzten Sporozoiten und der Leberphase-Parasiten zu den Zeitpunkten 24 und 65hpi geben Aufschluss über die Viabilität der transgenen Parasiten im Vergleich zum Wildtyp.

### 2.3.3.6 Live imaging

Um mit *P. berghei*-infizierte HepG2-Zellen lebend beobachten zu können, wurden die Zellen auf einer Kulturschale mit Glasboden (*glass bottom dish*) ausgesät und infiziert (siehe 2.3.3.3). Mit dem Farbstoff Hoechst 33342, welcher in die DNA interkaliert, konnten die Zellkerne der HepG2-Zellen und die der Parasiten sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde das Medium aus der Kulturschale entnommen, der Farbstoff 1:20.000 in 1ml frischem MEM+AT verdünnt, auf die Zellen gegeben und für 5-10min bei 37°C inkubiert. Mit dem ER-Tracker™ Red (BODIPY® TR Glibenclamide) konnte das Endoplasmatische Reticulum von Parasit und Wirtszelle sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde das Medium abgenommen und die Kulturschale mit Serum-freiem Medium gewaschen. Der ER-Tracker wurde 1:1000 in Serum-freiem Medium verdünnt, auf die Zellen gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt und wieder frisches vorgewärmtes Medium auf die Zellen gegeben. Die Beobachtung der infizierten HepG2-Zellen erfolgte am konfokalen Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung. Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe der

Software FluoView™ Version 1.7b. Anschließend wurden die Bilder mit dem Programm Adobe Photoshop Elements 6.0 bearbeitet.

### 2.3.3.7 RNA-Isolation

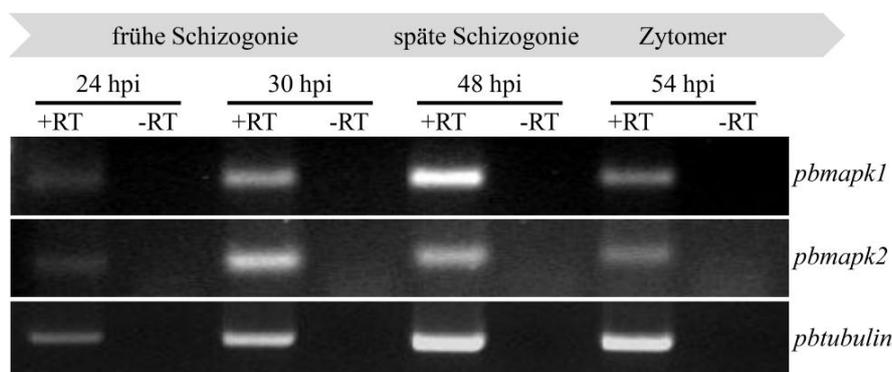
Um die relative Expression von bestimmten plasmodialen Genen zu bestimmten Zeitpunkten in der Leberphase bestimmen zu können, ist es notwendig die gesamt-RNA der infizierten Leberzellkultur zum jeweiligen Zeitpunkt zu isolieren. Hierfür wurden HepG2-Zellen in 24-Well Platten ohne *cover* mit mindestens 20.000-30.000 Sporozoiten pro Well infiziert (siehe 2.3.3.3). Die Infektion für ein *Set* erfolgte aus einem Sporozoiten-Pool, wobei vier Zeitpunkte (24, 30, 48 und 54hpi) im Dreifachansatz (12 *Wells*) eingeplant wurden. Zusätzlich wurden aus dem gleichen Sporozoiten-Pool je Zeitpunkt ein *Well* mit *cover* (4 wells) infiziert, um mit Hilfe einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse die korrekte Entwicklung der Parasiten überprüfen zu können (siehe 2.3.3.4). Für die Lyse zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die infizierten Zellen zunächst dreimal mit 1xPBS gewaschen und anschließend in 350µl/*Well* RA1-Puffer (NucleoSpin® RNA) aufgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die nachfolgende RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® RNA- Kits. Die RNA wurde in 40µl Elutionspuffer eluiert und die Konzentration und Reinheit mit Hilfe des SPECTROstar Nano gemessen.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Expression und Lokalisation der MAPK aus *Plasmodium berghei*

#### 3.1.1 Expression der Gene *mapk1* und *mapk2* in *P. berghei*- Leberstadien

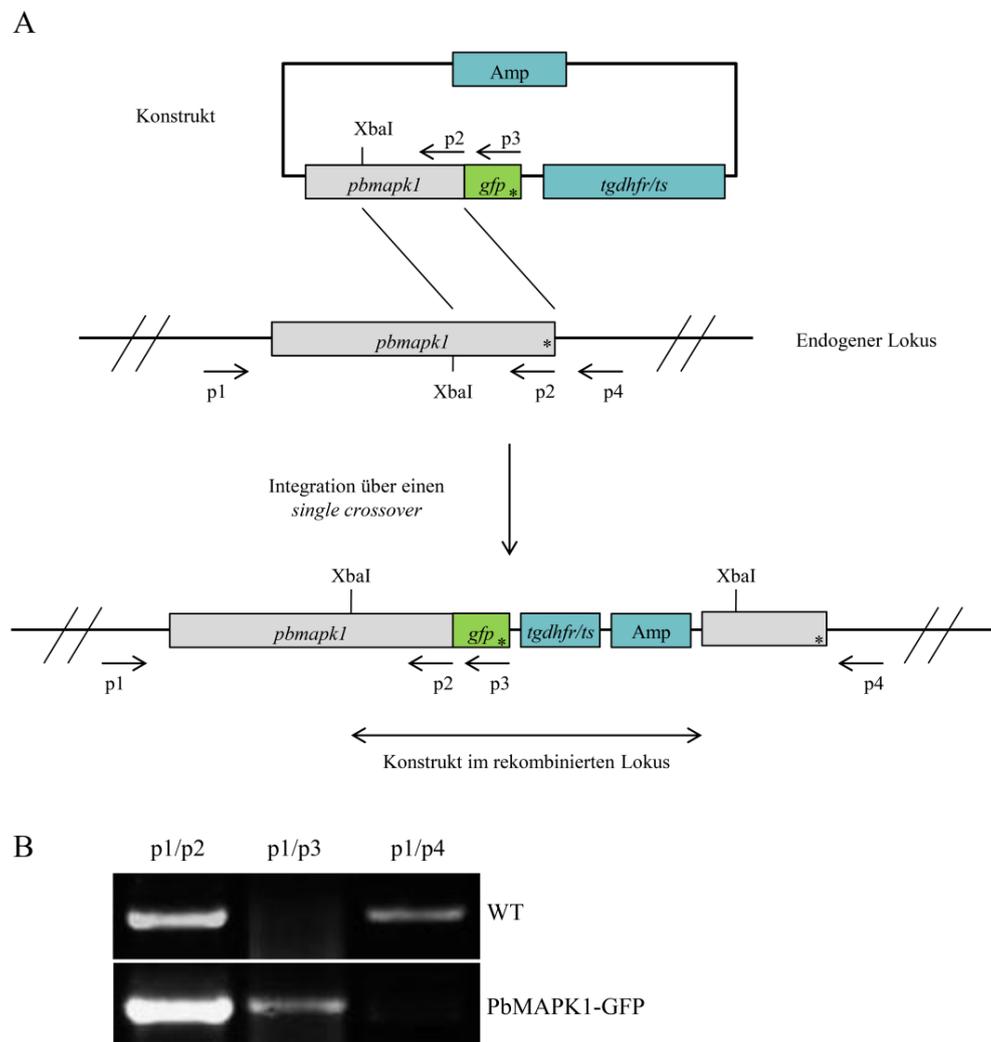
Es konnte bereits gezeigt werden, dass die MAPK2 aus *P. berghei* und *P. falciparum* essentiell für die asexuelle Schizogonie, die Entwicklung von Gametozyten sowie für die Exflagellation von Mikrogametozyten ist (Dorin et al., 1999; Khan et al., 2005; Rangarajan et al., 2005; Tewari et al., 2005; Dorin-Semblat et al., 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die MAPK1 aus *P. berghei* und *P. falciparum* sowohl in asexuellen Blutstadien als auch in Gametozyten exprimiert werden, jedoch ist die Rolle der MAPK1 im Gegensatz zur MAPK2 weitgehend unbekannt (Doerig et al., 1996; Graeser et al., 1997; Lin et al., 1996). Um nun die PbMAPK1 und PbMAPK2 während der Leberphase genauer untersuchen zu können, wurde zunächst mit Hilfe von Reverser Transkriptase - PCR (RT-PCR) die Expression der *mapk1*- und *mapk2*- Gene in *P. berghei* Leberstadien analysiert. Hierfür wurden Wildtyp *P. berghei* Sporozoitien hergestellt (siehe 2.3.2.2) und für eine Infektion von HepG2 Zellen verwendet (siehe 2.3.3.3). Zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (24, 30, 48 und 54hpi) wurden die infizierten Zellen lysiert und die RNA isoliert (siehe 2.3.3.7). Anschließend wurde die RNA in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.2) und als Template für eine PCR eingesetzt (siehe 2.2.1). Als Referenz zur Expression der Gene *pbmapk1* und *pbmapk2* diente das *housekeeping gene pbtubulin*. Die Resultate zeigen eine deutliche Expression der Gene *pbmapk1* und *pbmapk2* zu jedem gemessenen Zeitpunkt während der Leberphase (siehe Abb. 3.1).



**Abb. 3.1:** Expression der Gene *pbmapk1* und *pbmapk2* zu verschiedenen Zeitpunkten in der Leberphase. Dargestellt sind die Ergebnisse der RT-PCR zu den Zeitpunkten 24, 30, 48 und 54hpi (hpi, hours post infection). Zusätzlich zu *pbmapk1* und *pbmapk2* wurde *pbtubulin* als Kontrolle (*house keeping gene*) mitgeführt. (+RT: mit reverser Transkriptase; -RT: ohne reverse Transkriptase). Veröffentlicht in Wierk et al., 2013.

### 3.1.2 Expression der endogenen PbMAPK1 als GFP-Fusionsprotein

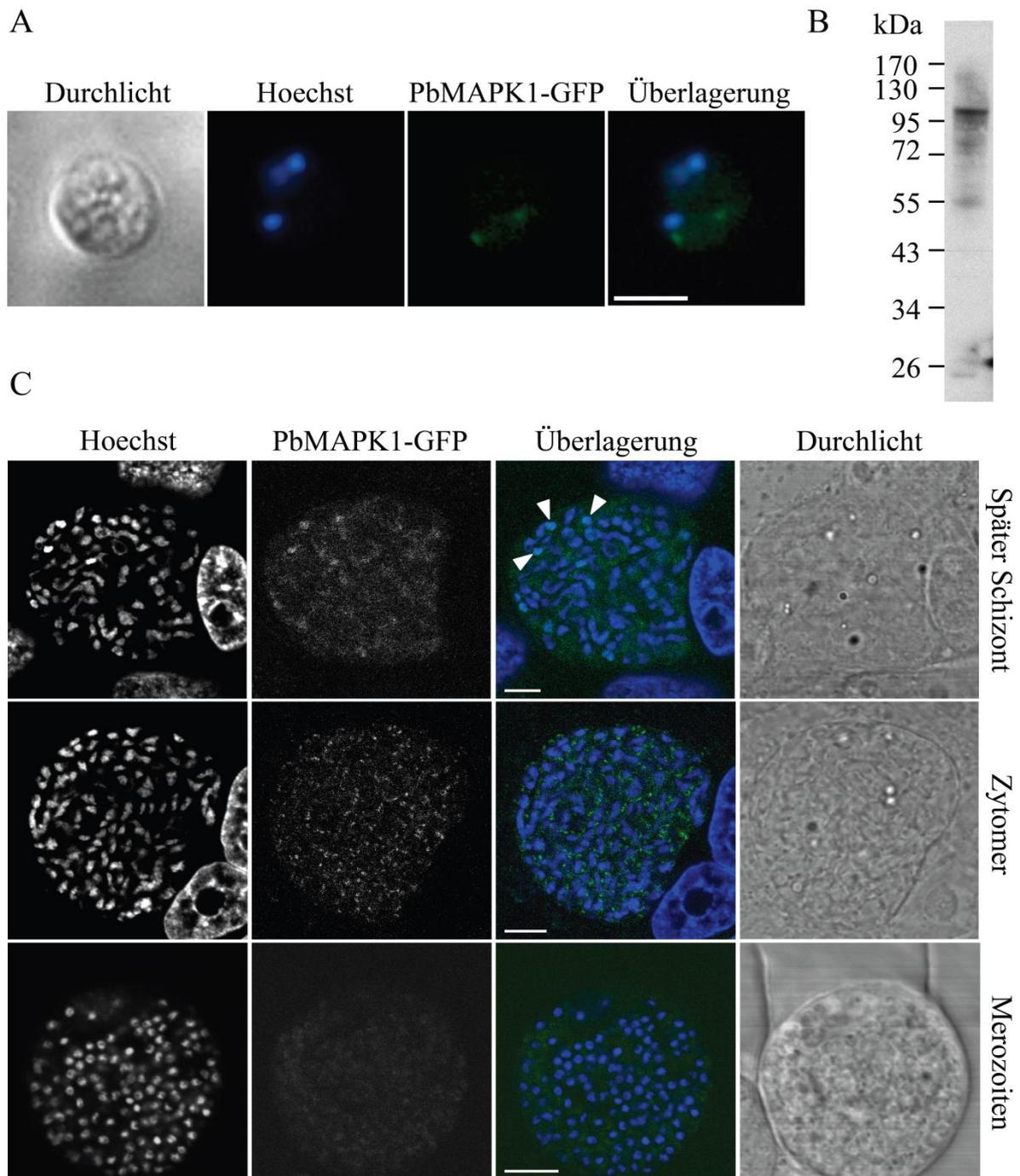
Um die Expression und Lokalisation der PbMAPK1 auf Proteinebene zu untersuchen, wurde der endogene Locus der *pbmapk1* am 3'-Ende mit dem *gfp*-Gen (*green fluorescent protein*) fusioniert, sodass die endogene PbMAPK1 als C-terminales GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert wird (siehe Abb. 3.2A). Hierfür wurde das Konstrukt so gewählt (siehe 2.2.12.1), dass das 3'-Ende (ca. 1257bp) der *pbmapk1* ohne Stop-Codon mit *gfp* gekoppelt vorliegt. Durch eine XbaI-Schnittstelle innerhalb der *pbmapk1*-Sequenz wurde das Konstrukt linearisiert. Zusätzlich ist im Konstrukt die Resistenzkassette *tgdhfr/ts* vorhanden, damit eine Selektion mit Pyrimethamin erfolgen konnte (siehe 2.3.1.6).



**Abb. 3.2:** Fusion des endogenen *pbmapk1*-Lokus an *gfp*. (A) Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie (siehe 2.2.12.1). Amp: Ampicillin-Resistenzkassette; *gfp*: *green fluorescent protein*; *tgdhfr/ts*: *Toxoplasma gondii* Dihydrofolat Reduktase/ Thymidilat-Synthetase; \*: Stop-Codon. (B) Integrations-PCR. p1: Primer #2119; p2: Primer #1503; p3: Primer #616; p4: Primer #1108. Veröffentlicht in Wierk et al., 2013.

Durch eine Transfektion von *P. berghei* ANKA (siehe 2.3.1.5) wurde dieses Konstrukt mittels *single crossover* in das Parasitengenom stabil integriert und die so erhaltenen Parasiten mit Pyrimethamin positiv selektiert. Um überprüfen zu können, ob die Integration erfolgreich war, wurde das Blut einer mit diesen Parasiten (pL0031<sub>-end</sub>PbMAPK1-GFP) infizierten Maus entnommen, die Parasiten unter Verwendung von Saponin extrahiert (siehe 2.3.1.3) und die gDNA isoliert (siehe 2.3.1.4). Anhand der gewonnenen gDNA wurde die erfolgreiche Integration mittels Integrations-PCR bestätigt (siehe Abb. 3.2B).

Des Weiteren wurden die Plasmodien aus dem infizierten Blut isoliert (siehe 2.3.1.3), um die darin enthaltenen Parasitenproteine für eine Westernblot-Analyse (siehe 2.2.13 und 2.2.14) verwenden zu können. Durch einen anti-GFP-Antikörper konnte bestätigt werden, dass die Volllänge der endogenen PbMAPK1-GFP exprimiert wird (siehe Abb. 3.3B). Zusätzlich wurde die Lokalisation der endogenen PbMAPK1 mittels *live imaging* untersucht (siehe 2.3.1.7 und 2.3.3.6). Während der gesamten erythrozytären Phase zeigte sich eine punktuelle Lokalisation der PbMAPK1 innerhalb des Parasitenzytosols (siehe Abb. 3.3A). Im Gegensatz dazu zeigten sich im Verlauf der Leberphase sowohl Unterschiede im Expressionsniveau als auch in der Lokalisation der PbMAPK1. Aufgrund der sehr schwachen Expression in den frühen Schizonten konnte der Nachweis der PbMAPK1 nur mit Hilfe einer Immunfluoreszenzanalyse (IFA) erfolgen (siehe 2.3.3.4). Allerdings konnte anhand des schwachen Signals keine genaue Aussage über die Lokalisation getroffen werden (Daten nicht gezeigt). In späteren Leberstadien hingegen wurde, wenn auch schwach, eindeutig die Präsenz der PbMAPK1 im *live imaging* nachgewiesen (siehe Abb. 3.3.C). Die PbMAPK1 ist in späten Leberschizonten gleichmäßig im Parasitenzytosol verteilt und weist teilweise eine Kern-Lokalisation auf. Im Zytomerstadium hingegen zeigt sich eine distinkte Lokalisation der PbMAPK1 nahe der Parasitenkerne und der invaginierenden Parasitenmembran. Zum Abschluss der Leberphase und der Bildung von Merosomen fand sich erneut eine zytoplasmische Verteilung. Somit lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die PbMAPK1 während der Parasiten-Entwicklung in der Leber exprimiert wird und ein zeitliches und räumliches Expressionsmuster aufweist, wie es in vorangegangenen Arbeiten mit Überexpressions-Konstrukten bereits beobachtet wurde (siehe Abb. 1.7 und 1.8).

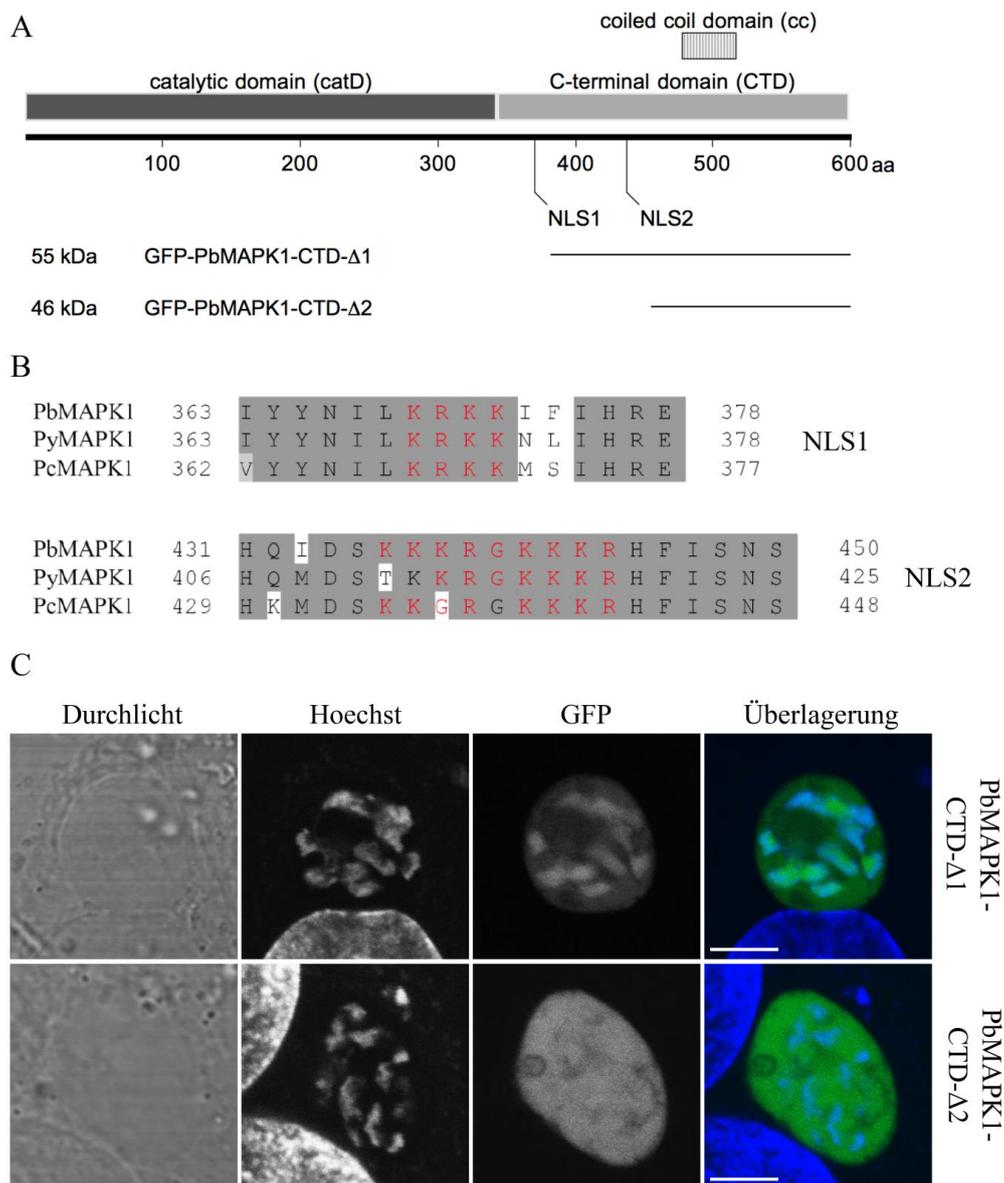


**Abb. 3.3:** Nachweis der Expression der endogenen PbMAPK1 als GFP-Fusionprotein. (A) *Live imaging* von Blutstadien des Parasiten pL0031<sub>-end</sub>PbMAPK1-GFP. Kernfarbstoff: Hoechst 33342. (B) Westernblot mit Blutstadien des Parasiten pL0031<sub>-end</sub>PbMAPK1-GFP. Erst-Antikörper:  $\alpha$ -GFP (Maus); Zweit-Antikörper:  $\alpha$ -Maus-HRP (Ziege); Verwendeter Größenstandard: *prestained Protein Ladder*. kDa: kilo Dalton (C) *Live imaging* von verschiedenen Leberstadien (später Leberschizont, Zytomer- und Merozoiten-Stadium) des Parasiten pL0031<sub>-end</sub>PbMAPK1-GFP. Kernfarbstoff: Hoechst 33342. Pfeile weisen auf eine Ko-Lokalisation von Hoechst und GFP. Maßstab: 10 $\mu$ m. Veröffentlicht in Wierk *et al.*, 2013.

### **3.1.3 Funktionalität der nuclear localization signals (NLS) im C-terminalen Bereich der PbMAPK1**

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die überexprimierte PbMAPK1 in frühen Stadien der Leberphase eine Kernlokalisierung aufweist und im Zytomerstadium distinkte Strukturen in der Nähe der Parasitenkerne und der invaginierenden Parasitenmembran ausbildet (Wierk et al., 2013). Für die Ausbildung der Lokalisation in der späten Leberphase konnte bisher kein verantwortliches Motiv innerhalb der PbMAPK1 gefunden werden. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Ausbildung der distinkten Struktur unabhängig von der Kinase-Aktivität ist sowie nicht durch eine putative *coiled-coil*- Domäne im C-terminalen Bereich vermittelt wird (Wierk et al., 2013). Allerdings konnte bezüglich der Kernlokalisierung bereits die C-terminale Domäne als notwendig und hinreichend identifiziert werden. In der C-terminalen Domäne der PbMAPK1 befinden sich putative NLS-Strukturen (siehe Abb. 1.6). Proteinsequenzanalysen haben ergeben, dass diese NLS-Strukturen in Nagetier-pathogenen *Plasmodium*-Arten wie *P. yoelii* und *P. chabaudi* konserviert sind (siehe Abb. 3.4.B). Um diese Strukturen als verantwortliches Motiv in Bezug auf die Kernlokalisierung in den frühen Leberstadien zu identifizieren, wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten eine Reihe von trunkierten Varianten und Deletionsmutanten der C-terminalen Domäne der PbMAPK1 hergestellt. Da NLS-Strukturen zwischen *Mammalia* und *Apicomplexa* zumindest teilweise konserviert sind (Frankel & Knoll, 2009), wurden diese Konstrukte zunächst in HepG2-Zellen exprimiert. Dabei zeigte sich, dass die NLS-Strukturen im C-terminalen Bereich der PbMAPK1 funktional sind (Wierk et al., 2013). Anhand der gewonnenen Daten wurden zwei trunkierte Varianten der C-terminalen Domäne der PbMAPK1 ausgewählt, um die Funktionalität der NLS auch innerhalb des Parasiten zu überprüfen. Hierfür wurden zwei Mutanten hergestellt, welche jeweils eine trunkierte Variante des C-Terminus der PbMAPK1 überexprimieren (siehe 2.2.12.2). Bei der ersten Mutante (PbMAPK1-CTD- $\Delta$ 1) fehlt nur das vordere NLS-Motiv (NLS1), wohingegen bei der zweiten Mutante (PbMAPK1-CTD- $\Delta$ 2) beide Motive fehlen (siehe Abb. 3.4A). Durch eine Transfektion von *P. berghei* ANKA (siehe 2.3.1.5) wurden entsprechende Konstrukte mittels *single crossover* in das Parasitengenom integriert. Die Resistenzkassette *tgdhfr/ts* ermöglichte anschließend eine Selektion mit Pyrimethamin (siehe 2.3.1.6). Diese transgenen Parasiten wurden für eine Infektion von HepG2 Zellen eingesetzt (siehe 2.3.3.3). Die Lokalisationen der GFP-Fusionsproteine wurden im *live imaging* unter dem konfokalen Mikroskop beobachtet (siehe 2.3.3.6). Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Kernlokalisierung bei solchen Parasiten, die PbMAPK1-CTD- $\Delta$ 1 exprimieren,

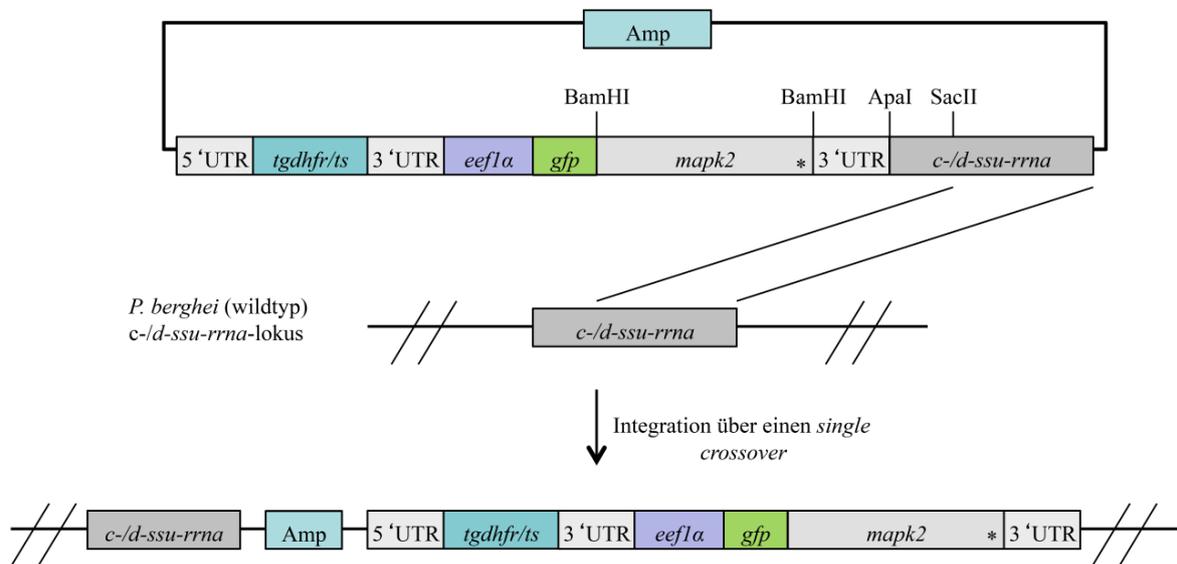
während Parasiten, welche PbMAPK1-CTD- $\Delta$ 2 exprimieren, eine zytosolische Lokalisation aufweisen (siehe Abb. 3.4C). Dies unterstreicht erneut die Funktionalität der beiden NLS-Motive im C-terminalen Bereich der PbMAPK1.



**Abb. 3.4: Funktionalität der NLS-cluster im C-terminalen Bereich der PbMAPK1.** (A) Schematische Darstellung der PbMAPK1 mit der katalytischen und der C-terminalen Domäne. Innerhalb der C-terminalen Domäne befinden sich zwei NLS-cluster. Dargestellt sind ebenfalls schematisch die trunktierten Varianten der beiden Konstrukte PbMAPK1-CTD- $\Delta$ 1 und PbMAPK1-CTD- $\Delta$ 2 (Herstellung siehe 2.2.12.2). aa: Aminosäuren; kDa: kilo Dalton. (B) Alignment der putativen NLS-cluster (rot) der MAPK1 aus *P. berghei* (Pb) *P. yoelii* (Py) und *P. chabaudi* (Pc). (C) Live imaging der transgenen Parasiten PbMAPK1-CTD- $\Delta$ 1 und PbMAPK1-CTD- $\Delta$ 2 zum Zeitpunkt 30hpi (früher Leberschizont; hpi, hours post infection). Kernfarbstoff: Hoechst 33342. Maßstab: 10 $\mu$ m. Veröffentlicht in Wierk et al., 2013.

### 3.1.4 Lokalisation der PbMAPK2 in der Leberphase

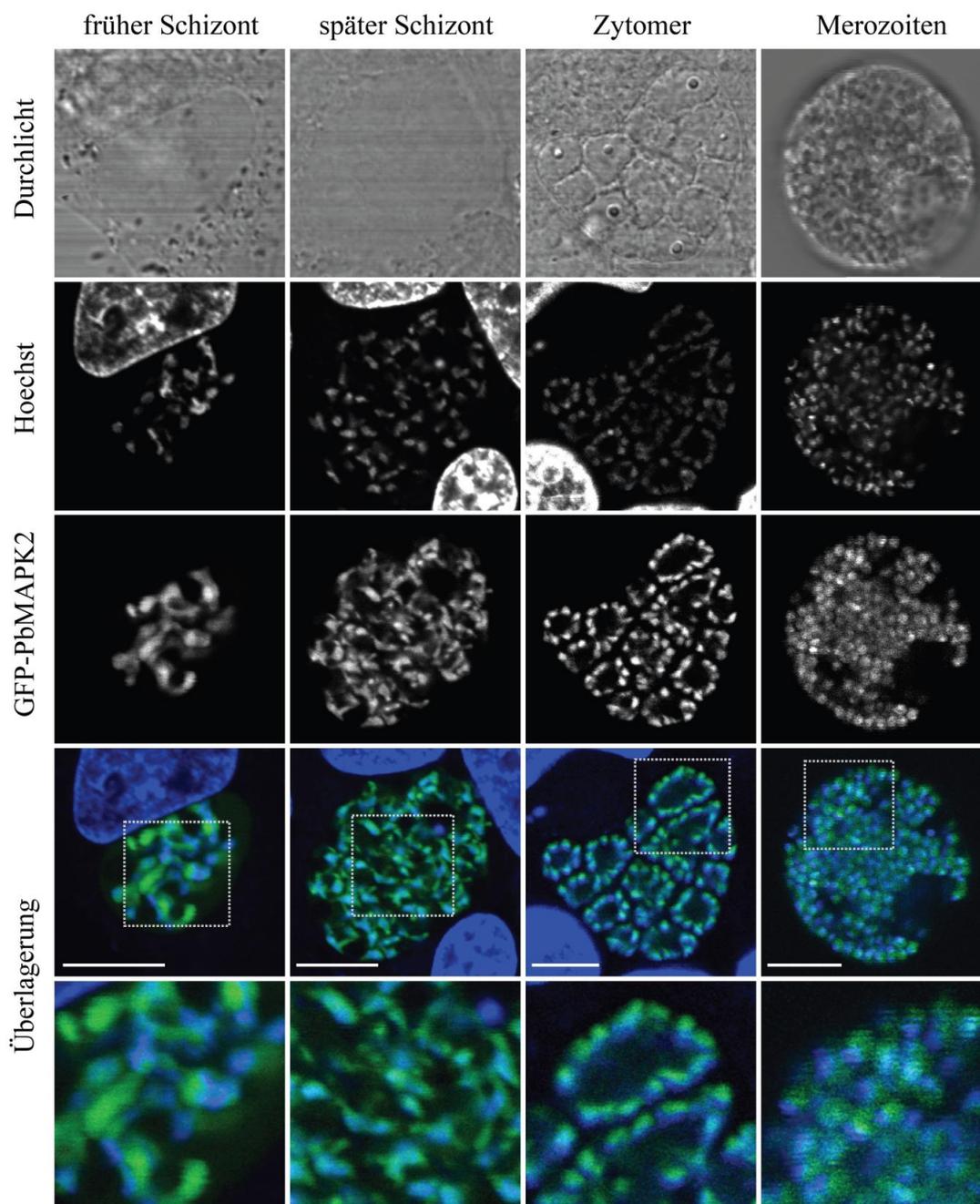
Wie bereits in 3.1.1 gezeigt, sind die Gene *pbmapk2* und *pbmapk1* zu allen gemessenen Zeitpunkten in der Leberphase exprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Lokalisation der PbMAPK2 während der Entwicklung in der Leberphase genauer betrachtet werden. Hierfür wurden transgene Parasiten hergestellt (siehe 2.3.1.5), welche die Volllänge der PbMAPK2 als GFP-Fusionsprotein (N-terminal gekoppelt; GFP-N-PbMAPK2) unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors *eef1a* (*eukaryotic elongation factor 1 α*) überexprimieren (siehe 2.2.12.2). Die Integration in das Genom des Parasiten erfolgte über einen *single crossover* (siehe Abb. 3.5).



**Abb. 3.5:** Schematische Darstellung der Integration des Konstruktes pL0017-GFP-N-PbMAPK2. Das Konstrukt pL0017-GFP-N-PbMAPK2 (siehe 2.2.12.2) wurde mit ApaI und SacII linearisiert. Die Transfektion von *P. berghei* ANKA (Wildtyp) mit dem linearisierten Konstrukt erfolgte über einen *single crossover* in den *c-/d-ssu-rrna*-Lokus. Die Expression der N-terminal mit GFP-gekoppelten PbMAPK2 steht unter der Kontrolle des konstitutiven *eef1a*-Promotors. Die transgenen Parasiten können mit Pyrimethamin aufgrund der Resistenzkassette *tgdhfr/ts* positiv selektioniert werden. 3'- und 5'UTR: 3'- und 5' *untranslated region* der *pbdhfr* (*P. berghei dihydrofolat reductase*); *gfp*: *green fluorescent protein*; Amp: Ampicillin-Resistenzkassette; *tgdhfr/ts*: *toxoplasma gondii dihydrofolat reductase/ thymidilat synthetase*; *c-/d-ssu-rrna*: *c-/d-* Abschnitt der *small subunit ribosomal rna*; *eef1a*: *eukaryotic elongation factor α*; \*: Stop-Codon.

Die so erhaltenen transgenen Parasiten konnten aufgrund der *tgdhfr/ts*- Resistenzkassette mit Pyrimethamin positiv selektioniert werden (siehe 2.3.1.6). Für ein *live imaging* wurden die Parasiten zur Infektion von HepG2- Zellen eingesetzt und die verschiedenen Lebestadien, einschließlich früher und später Schizonten, sowie Zytomer- und Merozoiten-Stadien,

analysiert (siehe 2.3.3.6). Die Ergebnisse des *live imaging* sind in Abb. 3.6 dargestellt. Die PbMAPK2 weist im Zytomer- und Merozoitenstadium eine deutliche, konzentrierte Kernassoziation auf, die vorher während der Kernteilungsphase vom frühen bis hin zum späten Schizonten weniger ausgeprägt scheint und sich diffuser und damit weniger konzentriert darstellt.



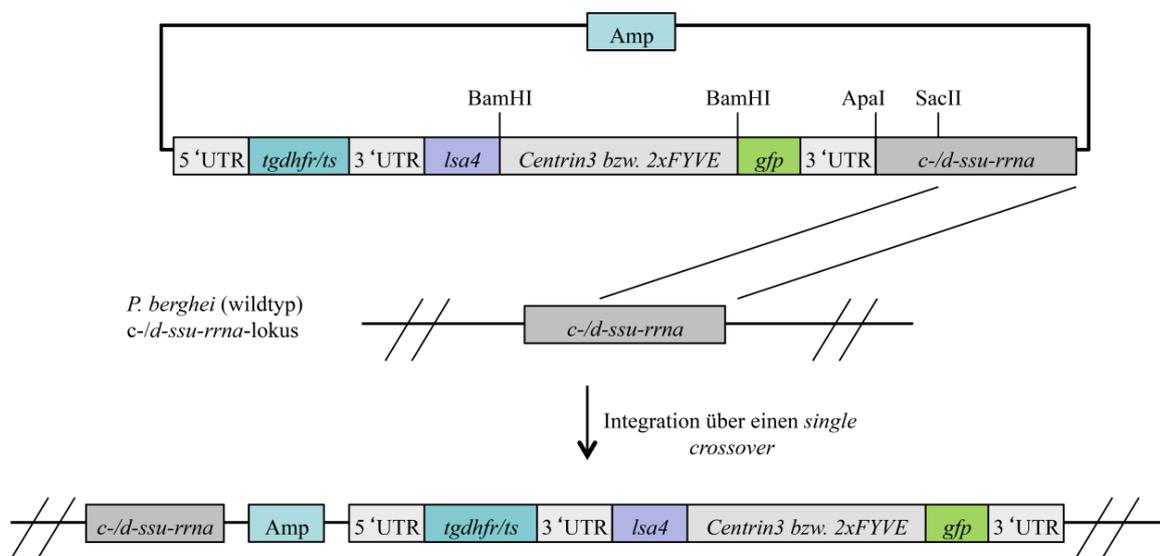
**Abb. 3.6:** Lokalisation der PbMAPK2 während der Leberphase. *Live imaging* von transgenen GFP-N-PbMAPK2- Parasiten (siehe 2.2.12.2) während der Entwicklung in der Leberphase. Dargestellt sind repräsentative Beispiele vom frühen und späten Schizonten, sowie vom Zytomer- und Merozoiten- Stadium. Die infizierten Zellen wurden mit dem Kernfarbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Kästchen zeigen einen Teilausschnitt. Maßstab: 10µm. Veröffentlicht in Wierk et al., 2013.

### 3.2 Visualisierung des Zytokinese-Apparates in der späten Leberphase

Die PbMAPK1 scheint aufgrund ihres Lokalisationsmusters eine Rolle im Zytokinese-Prozess des Parasiten zu spielen. In den frühen Stadien, zu Beginn der Karyokinese, weist die PbMAPK1 eine Kernlokalisierung auf, während sie in späten Stadien (Zytomer), zu Beginn der Invagination der Parasitenmembran (Zytokinese), distinkte Strukturen ausbildet (siehe Abb. 1.7 und 1.8). Unter Einbeziehung von Strukturen des Zytokinese-Apparates sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, die Funktion der PbMAPK1 im Zusammenhang mit dem Zytokinese-Prozess näher zu untersuchen. Dabei wurde das Augenmerk auf die Lokalisation in der späten Leberphase gelegt, um die Strukturen bzw. die Organellen, an denen die PbMAPK1 in ringförmigen, distinkten Strukturen assoziiert zu sein scheint, identifizieren zu können. Als Kandidaten für ein ähnliches Lokalisationsmuster in der späten Leberphase wurden PbCentrin3 und die FYVE-Domäne ausgewählt (benannt nach vier Cystein-reichen Proteinen **F**ab 1, **Y**OTB, **V**ac 1, **E**EA1 (FYVE) in denen die Zinkfinger-Domäne entdeckt wurde). Es wurde bereits gezeigt, dass Centrin3 aus *P. falciparum* an die Centrosomen des Parasiten bindet (Mahajan et al., 2008). Centrosomen werden auch als *microtubule organizing center* (MTOC) bezeichnet und haben eine zentrale Rolle im Zellzyklus von *Apicomplexa* (Francia & Striepen, 2014). Die FYVE-Domäne hingegen bindet das Phosphatidylinositol PI3P (Phosphatidylinositol 3-Phosphat) (Gillooly et al., 2000; Gaullier et al., 2000). Das PI3P lokalisiert am sogenannten *midbody*, dem langgezogenen Bereich zwischen zwei entstehenden Tochterzellen während der Zytokinese (Sagona et al., 2010). Es wurde gezeigt, dass die klassischen MAPK ERK1/2 in HeLa- Zellen am *midbody* assoziieren und essentiell für die Abszission der Zellmembran sind (Kasahara et al., 2007).

Das Lokalisationsmuster der PbMAPK1 in der späten Leberphase lässt sich jedoch auch mit verschiedensten Fixierungsmethoden nicht konservieren (Daten nicht gezeigt), sodass eine Ko-Lokalisationsstudie mit Hilfe des Einsatzes von Antikörpern mittels IFA nicht möglich war. Daher sollten Ko-Lokalisationsstudien unter Verwendung von GFP-Fusionsproteinen mittels *live imaging* vorgenommen werden. Die Herstellung von doppelfluoreszenten Parasiten, welche die PbMAPK1 und zusätzlich PbCentrin3 bzw. 2xFYVE (Tandem) exprimieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, war jedoch nicht erfolgreich. Es wurden alternativ Parasiten untersucht, welche entweder das PbCentrin3 oder die 2xFYVE-Domäne als GFP-Fusionsprotein exprimieren. Hierfür wurden, basierend auf dem pL0017.1.1-Vektor, zwei Konstrukte hergestellt, welche entweder eine Expression von PbCentrin3 oder von 2xFYVE (Tandem) als GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des

*lsa4*-Promotors ermöglichen (siehe 2.2.12.3). Die Aktivität des *lsa4*-Promotors (*lsa4*: *liver stage antigen 4*) und somit die Expression des gewünschten Proteins beginnt erst in frühen Leberstadien (bei ca. 30hpi) (Helm et al., 2010). Dieser Promotor wird eingesetzt, um mögliche negative Auswirkungen eines überexprimierten Proteins in vorausgehenden Entwicklungsschritten des Parasiten zu verhindern. Die Integration erfolgte über einen *single crossover* in den *c-/d-ssu-rrna*-Lokus des *P. berghei* ANKA (Wildtyp) Parasiten. Die *tgdhfr/ts*-Resistenzkassette ermöglichte eine Selektion mit Pyrimethamin (siehe Abb. 3.7).

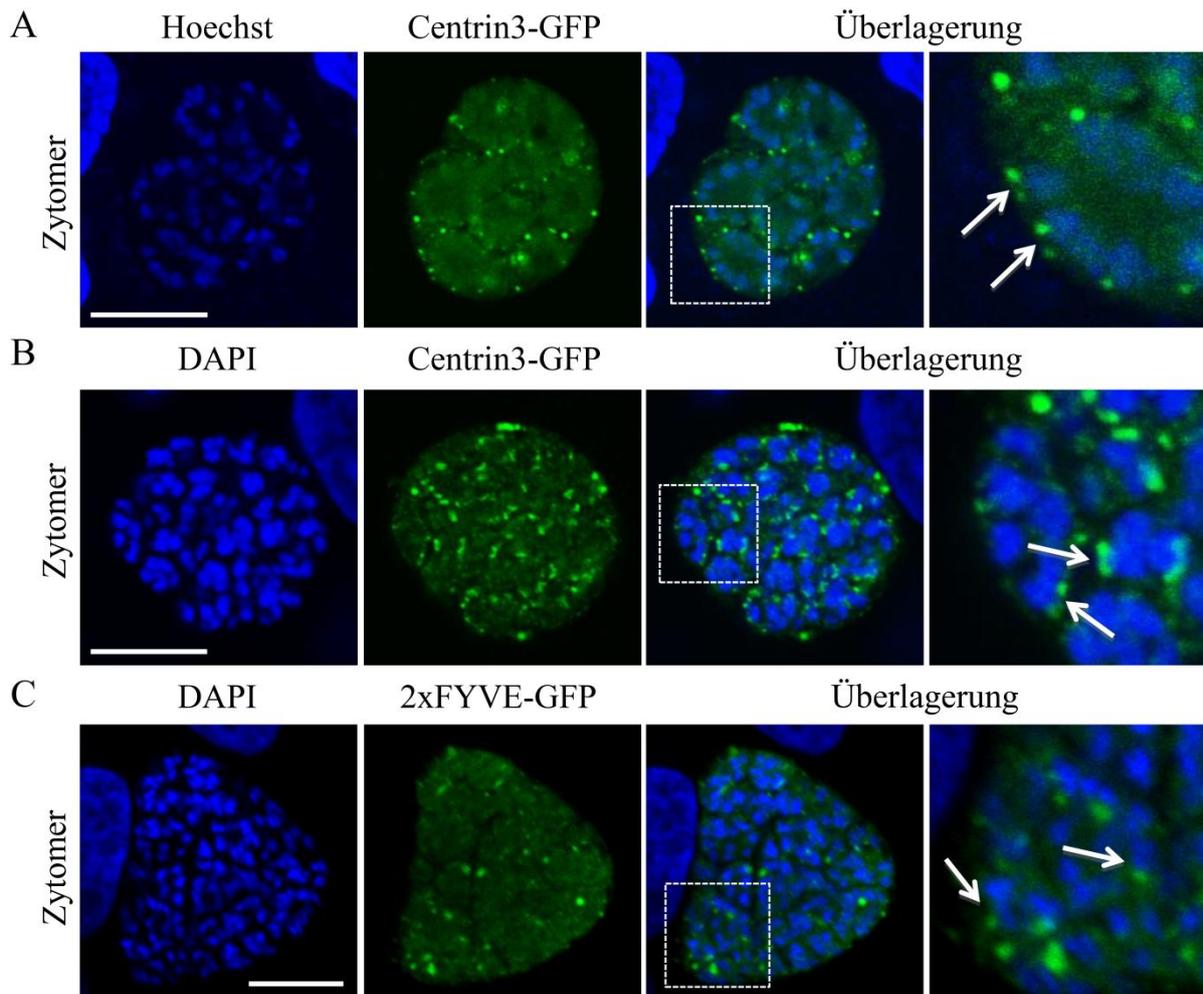


**Abb. 3.7:** Herstellung der  $_{LSA4}$ Centrin3-GFP- bzw.  $_{LSA4}$ 2xFYVE-GFP- Parasiten. Die Konstrukte pL0017.1.1-Centrin3 bzw. pL0017.1.1-2xFYVE (siehe 2.2.12.3) wurden mit den Restriktionsendonukleasen ApaI und SacII linearisiert und über einen *single crossover* in den *c-/d-ssu-rrna*-Lokus von *P. berghei* ANKA integriert. Die Konstrukte beinhalten die Pyrimethamin-Resistenzkassette *tgdhfr/ts*. Die Expression von Centrin3-GFP bzw. 2xFYVE-GFP steht unter der Kontrolle des Leberphase-spezifischen *lsa4*-Promotors. 3'- und 5'UTR: 3'- und 5' *untranslated region* der *pbdhfr*; *gfp*: *green fluorescent protein*; Amp: Ampicillin-Resistenzkassette; *tgdhfr/ts*: *toxoplasma gondii dihydrofolat reductase/ thymidilat synthetase*; *c-/d-ssu-rrna*: *c-/d-* Abschnitt der *small subunit ribosomal rna*; *lsa4*: *liver stage antigen 4*.

Die so erhaltenen  $_{LSA4}$ Centrin3-GFP- bzw.  $_{LSA4}$ 2xFYVE-GFP- Parasiten konnten nun für eine Infektion von HepG2-Zellen eingesetzt werden, um die Lokalisationen der GFP-Fusionsproteine im Zytomer-Stadium mittels *live imaging* (siehe 2.3.3.6) und IFA (siehe 2.3.3.4) zu analysieren. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.8 dargestellt.

Die GFP-Fusionsproteine Centrin3-GFP und 2xFYVE-GFP zeigen während des Zytomerstadiums distinkte punktförmige Strukturen nahe den Parasitenkernen. Es scheint, als

wäre die Anzahl an Centrin3-GFP-Strukturen größer als die Anzahl an Parasitenkernen (siehe Abb. 3.8B). Die Pfeile in den Teilausschnitten zeigen zwei Centrin3-GFP-Strukturen pro Parasitenkern (Abb. 3.8A,B). Die Anzahl der 2xFYVE-GFP-Strukturen hingegen entspricht in etwa der Anzahl an Parasitenkernen (siehe Abb. 3.8C). Die Pfeile im Teilausschnitt zeigen eine 2xFYVE-GFP-Struktur pro Parasitenkern.



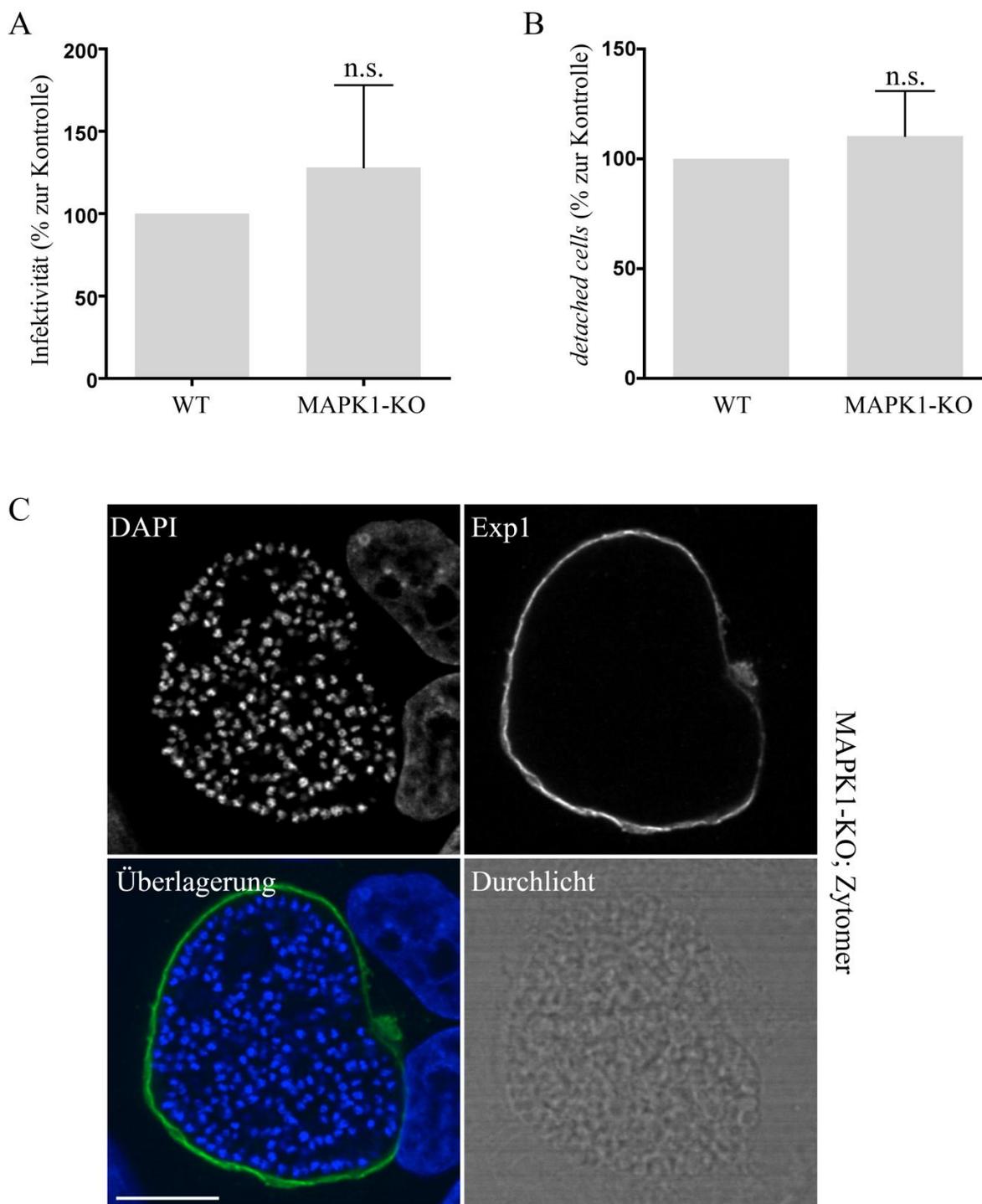
**Abb. 3.8:** Lokalisation von Centrin3-GFP und 2xFYVE-GFP in der späten Leberphase (Zytomer). (A) *Live imaging* von  $LSA_4$ Centrin3-GFP- Parasiten im Zytomer-Stadium. Kernfärbung mit Hoechst 33342. (B) IFA von  $LSA_4$ Centrin3-GFP- Parasiten im Zytomer-Stadium. Kernfärbung mit DAPI. (C) IFA von  $LSA_4$ 2xFYVE-GFP- Parasiten im Zytomer-Stadium. Kernfärbung mit DAPI. Kästchen zeigen einen Teilausschnitt. Die Pfeile in den Teilausschnitten verdeutlichen die Lokalisationen bei einer stärkeren Vergrößerung. Maßstab: 10 $\mu$ m.

### **3.3 Auswirkungen der Deletion der *pbmapk1* auf den Parasiten während der Entwicklung in der Leberphase**

#### **3.3.1 Die Deletion der *pbmapk1* zeigt keinen Phänotyp in der Leberphase**

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die MAPK2 bei *P. berghei* und *P. falciparum* essentiell ist für die Exflagellation der männlichen Gametozyten und für die Entwicklung der asexuellen Blutstadien (Dorin et al., 1999; Khan et al., 2005; Rangarajan et al., 2005; Tewari et al., 2005; Dorin-Semblat et al., 2007). Der MAPK1 konnte in der Blutphase jedoch keine Funktion zugeordnet werden, da die Deletion nicht zur Ausbildung eines veränderten Phänotyps führte (Dorin-Semblat et al., 2007). Um zu untersuchen, ob die PbMAPK1 eine Rolle während der Leberphase spielt, wurden HepG2-Zellen mit *pbmapk1*-defizienten Parasiten (PbMAPK1-KO) infiziert. Die PbMAPK1-KO-Mutanten waren freundlicherweise von Rita Tewari zur Verfügung gestellt worden. Es wurde eine definierte Anzahl Sporozoitien auf die Leberzellen gegeben und nach 24 Stunden fixiert und gefärbt (siehe 2.3.3.4), um den relativen Anteil der sich entwickelnden Leberstadien mikroskopisch zu bestimmen. In Bezug auf die Ausgangsmenge konnte ein prozentualer Anteil der Parasiten ermittelt werden, welche in der Lage waren erfolgreich eine Leberphase zu etablieren. Im Vergleich zum Wildtyp kann auf diese Weise ein möglicher Unterschied der Infektionsrate festgestellt werden (siehe 2.3.3.5). Des Weiteren wurde 65 Stunden nach Infektion der Überstand der infizierten Zellen abgenommen, gefärbt und die Anzahl von abgelösten Zellen (*detached cells*) ausgezählt, um die Viabilität der PbMAPK1-KO-Parasiten im Vergleich zum Wildtyp zu ermitteln (siehe 2.3.3.5). Darüber hinaus wurde die Morphologie der PbMAPK1-KO-Parasiten mit Hilfe einer IFA (siehe 2.3.3.4) mit der Morphologie des Wildtyps verglichen.

Die Ergebnisse der Analyse des PbMAPK1-KO im Vergleich zum Wildtyp sind in Abb. 3.9 dargestellt. Es konnten jedoch keinerlei signifikante Unterschiede in Bezug auf die Infektiosität, Viabilität und Morphologie festgestellt werden.



**Abb. 3.9:** Die Deletion der *pbmapk1* zeigt keinen Phänotyp während der Leberphase. (A) Infektivität (in %) der PbMAPK1-KO- Parasiten im Vergleich zum Wildtyp. (B) Anzahl der *detached cells* (abgelöste Zellen, in %) der PbMAPK1-KO- Parasiten im Vergleich zum Wildtyp. (C) Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel eines Zytomers von PbMAPK1-KO-Parasiten (IFA) zum Zeitpunkt 54hpi (hpi, *hours post infection*). Erst-Antikörper:  $\alpha$ -Exp1 (Huhn); Zweit-Antikörper:  $\alpha$ -Huhn Cy2 (Ziege); Kernfarbstoff: DAPI; Exp1: *exported protein 1* (parasitophore Vakuolenmembran); n.s.: nicht signifikant; WT: Wildtyp; Maßstab: 10 $\mu$ m. Veröffentlicht in Wierk et al., 2013.

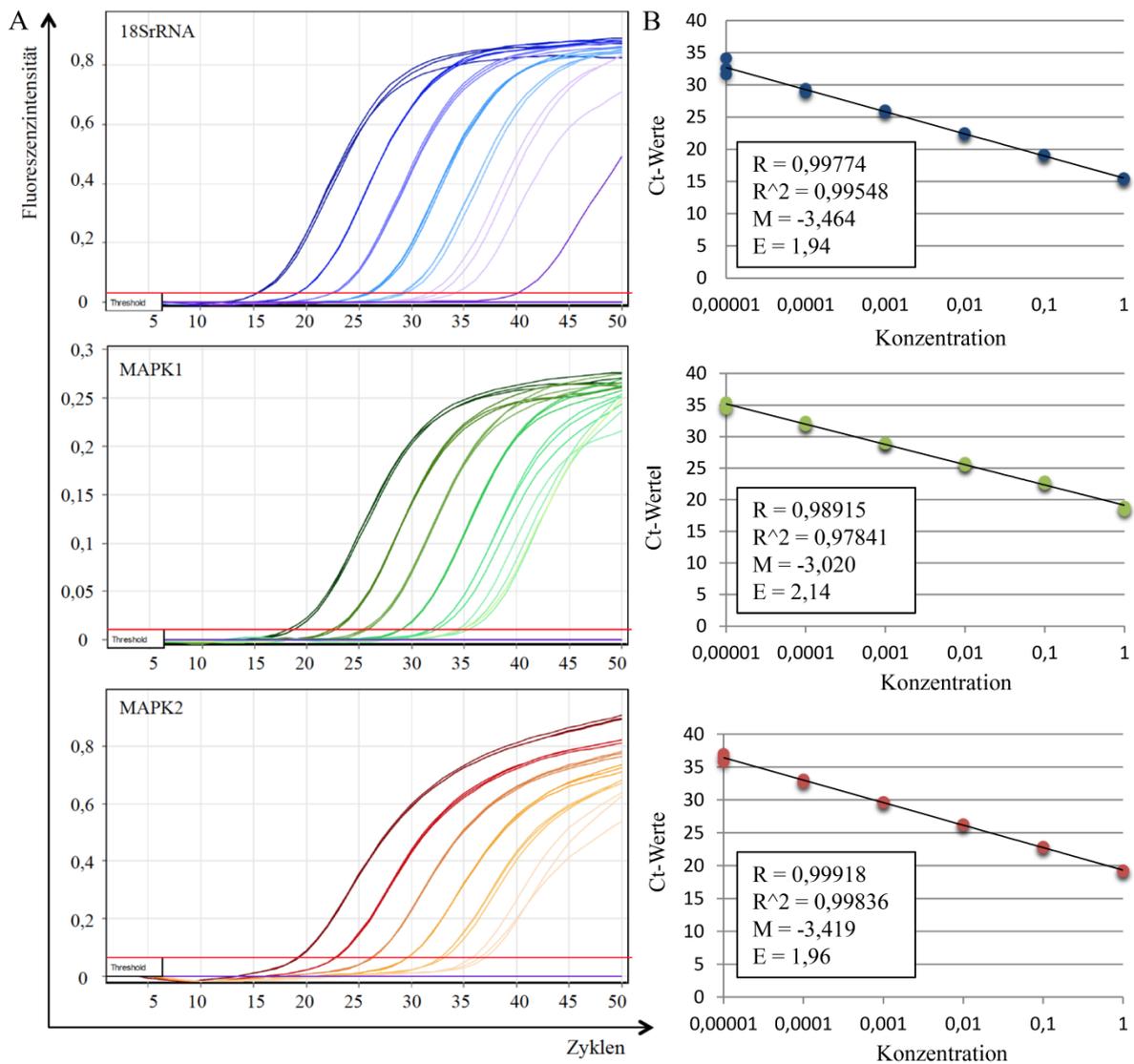
### **3.3.2 Vergleich der relativen Expression des Gens *pbmapk2* im Wildtyp und in der *pbmapk1*-Deletionsmutante**

Aufgrund der Tatsache, dass die PbMAPK1-KO- Parasiten sowohl in der Blut- als auch in der Leberphase (siehe 3.3.1) keinen erkennbar veränderten Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Parasiten zeigen, es jedoch in der Blutphase bei der Deletion des *pfmapk1*- Gens zu einer verstärkten Proteinexpression der PfMAPK2 kommt (Dorin-Semlat et al., 2007), wäre dies auch für die Leberphase denkbar. Eine mögliche funktionelle Kompensation der fehlenden PbMAPK1 durch die PbMAPK2 in der Leberphase sollte anhand der relativen Expression durch eine mögliche Hochregulation der *pbmapk2* festgestellt werden. Hierfür wurde die Methode der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) für Leberstadien von *Plasmodium berghei* etabliert. Bisher wurde die Methode der quantitativen *real-time* PCR ausschließlich zur Ermittlung der Parasitenmenge in der Leber (Bruña-Romero et a., 2001; Witney et al., 2001) und nicht zum Vergleich relativer Expressionslevel innerhalb des Parasiten verwendet. Aufgrund der sehr geringen Zahl an Leberzellen, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* von Plasmodien infiziert werden ist dies besonders schwierig, da eine immense Anzahl an Sporozoiten zur Infektion notwendig ist.

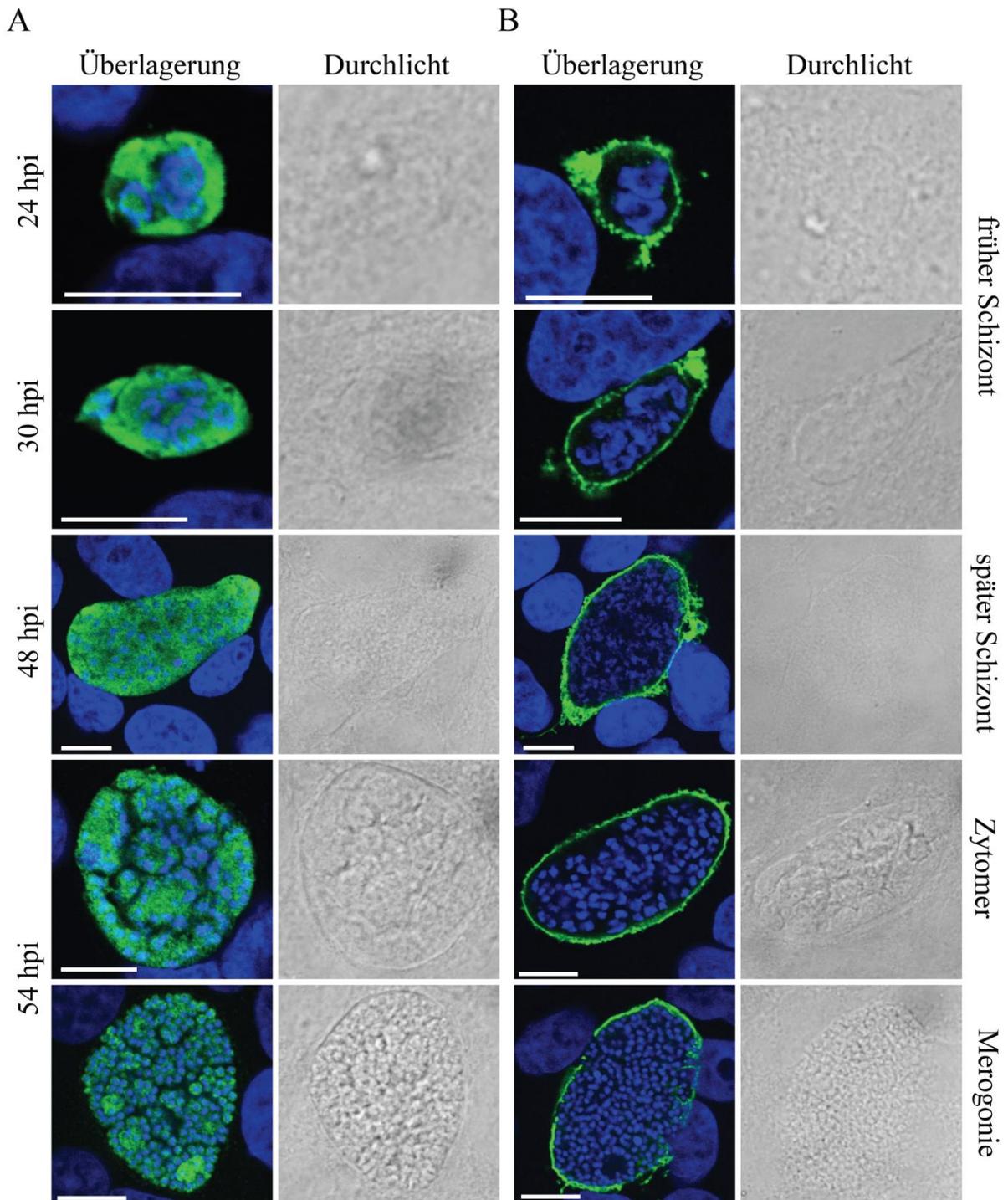
Es wurden Primerpaare mit entsprechenden *Taq-man* Sonden für den Nachweis von *pbmapk1*, *pbmapk2* und *pb18srrna* generiert. Hierbei diente die *pb18srrna* als Maßstab für die Menge an Parasitenmaterial (*normalizer*). Um das Experiment durchführen zu können, mussten zunächst die optimalen Bedingungen in Bezug auf die Konzentration der Primer und Sonden sowie in Bezug auf das PCR-Programm gefunden werden (siehe Tab. 2.15 und 2.16 in Material und Methoden 2.2.3). Nachfolgend wurden die Primer-Effizienzen für die drei Primerpaare bestimmt, welche notwendig für die Bewertung der gewählten Primerpaare sowie essentiell für die Berechnungen der relativen Expressionslevel sind (siehe Formel in 2.2.3). Die Primereffizienzen wurden anhand einer gDNA- Titration (*P. berghei* ANKA Wildtyp) ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Die Effizienzen der Primerpaare (siehe Abb. 3.10B) lassen sich mit Hilfe der Steigung  $m$  berechnen (Formel:  $E$  (Effizienz) =  $10^{(-1/m)}$ ) und haben einen Wert von 1,94 (18SrRNA), 2,14 (MAPK1) und 1,96 (MAPK2). Ein Wert von 2 würde eine Verdopplung des Amplifikats mit jedem Zyklus bedeuten. Der Korrelationskoeffizient ( $R$ ) gibt den linearen Zusammenhang zwischen den gemessenen Ct-Werten und den verschiedenen Konzentrationen des Templates an. Da dieser Wert ( $R$ ) theoretisch zwischen -1 und +1 liegen kann, wird zusätzlich der Determinationskoeffizient ( $R^2$ ) ermittelt, welcher zwischen 0 und +1 liegt. Je näher der Determinationskoeffizient dem

Wert 1 ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein linearer Zusammenhang und somit eine hohe Effizienz des Systems besteht ( $R^2 = 1 \triangleq 100\%$ ). Eine System-Effizienz von 100% wird zwar in der Praxis selten erreicht, dennoch liegen die erreichten Werte nahe bei 1. Die errechneten Determinationskoeffizienten für 18SrRNA ( $R^2=0,99548$ ), MAPK1 ( $R^2=0,97841$ ) und MAPK2 ( $R^2=0,99836$ ) spiegeln sich auch in den gleichmäßigen Abständen der Kurven der einzelnen Verdünnungen in Abbildung 3.10A wieder. Die Funktionalität der Primerpaare und Sonden bleibt bei hohen und niedrigen Template-Konzentrationen nahezu konstant (siehe Abb. 3.10A). Für eine quantitative Ermittlung der relativen Expressionslevel des Gens *pbmapk2* ist dieses System somit geeignet. Dabei dient die Detektion der Expression des Gens *pbmapk1* als positiv- bzw. negativ- Kontrolle im Wildtyp bzw. im PbMAPK1-KO und wird bei den Berechnungen zur relativen Expression des Gens *pbmapk2* nicht einbezogen.

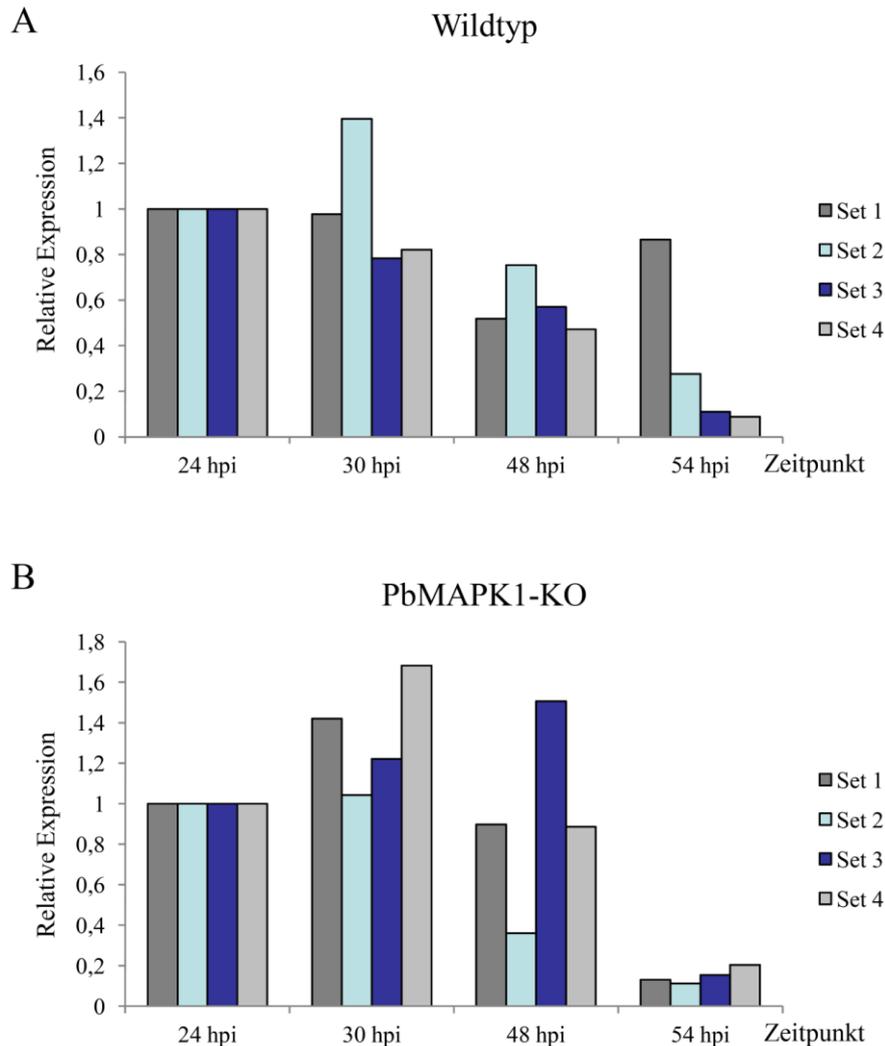
Um nun die relative Expression des Gens *pbmapk2* in Wildtyp- und PbMAPK1-KO-Parasiten zu vergleichen, wurden HepG2 Zellen mit GFPcon-Wildtyp *P. berghei* ANKA (exprimieren konstitutiv (con) GFP, welches im Zytosol des Parasiten verteilt vorliegt) bzw. mit PbMAPK1-KO infiziert. Es wurden GFPcon-Wildtyp-Parasiten gewählt, da die konstitutive GFP-Expression bei den experimentellen Arbeiten sehr hilfreich ist und durch die Expression des GFP keine Beeinträchtigung des Parasiten besteht (Franke-Fayard et al., 2004). Zu den Zeitpunkten 24, 30, 48 und 54hpi wurden die infizierten Zellen lysiert und die Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.3.3.7). Die gewonnene RNA wurde in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.2) und für eine qPCR (siehe 2.2.3) eingesetzt. Parallel musste die korrekte Entwicklung der im Rahmen der qPCR- analysierten Parasiten mittels IFA sicher gestellt werden (siehe 2.3.3.4), da etwaige Fehl-Entwicklungen möglicherweise einen Einfluss auf die mRNA-Expression der Parasiten haben können und somit das Ergebnis der qPCR verfälschen würden. Sowohl die Wildtyp- als auch PbMAPK1-KO- Parasiten zeigen in der IFA eine korrekte Entwicklung und sind beispielhaft für die Zeitpunkte 24hpi, 30hpi, 48hpi und 54hpi in Abbildung 3.11 dargestellt.



**Abb. 3.10: Ermittlung der Primer-Effizienzen mittels gDNA-Titration.** Die Titration der gDNA von *P. berghei* ANKA (Wildtyp) erfolgte mit einer Ausgangsmenge von 50ng und wurde in jedem Schritt 1:10 verdünnt. (A) Darstellung der qPCR-Ergebnisse der Verdünnungsreihe für die Pb18SrRNA (oben), PbMAPK1 (mitte) und PbMAPK2 (unten). (B) Darstellung der ermittelten Ct-Werte für jede Verdünnung (Dreifachansatz) für Pb18SrRNA (oben), PbMAPK1 (mitte) und PbMAPK2 (unten). Der Wert m gibt die Steigung der jeweiligen Trendlinie an. Mit Hilfe der Formel  $E=10^{(-1/m)}$  lassen sich die jeweiligen Primereffizienzen (E) ermitteln. R: Korrelationskoeffizient; R<sup>2</sup>: Determinationskoeffizient; Ct: cycle of treshold.



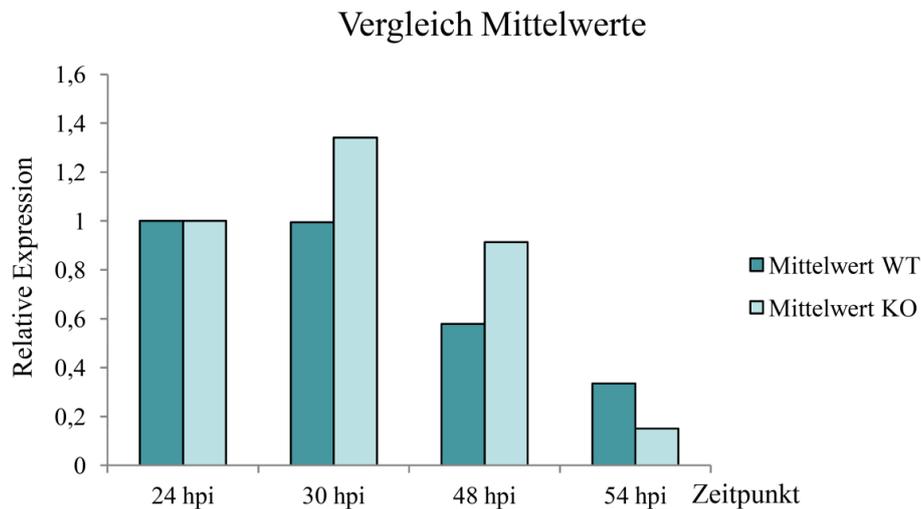
**Abb. 3.11:** Die für die qPCR-Analyse verwendeten Parasiten zeigen eine korrekte Entwicklung in der Leberphase. Dargestellt sind repräsentative Beispiele für die korrekte Entwicklung in der Leberphase der Wildtyp- (GFPcon-Wildtyp) (A) und PbMAPK1-KO- (B) Parasiten zu den Zeitpunkten 24, 30, 48 und 54hpi (hpi, *hours post infection*). Die Wildtyp-Parasiten exprimieren konstitutiv GFP, welches im Parasitenzytosol verteilt vorliegt. Die fixierten Cover wurden mit den Erst-Antikörpern (A)  $\alpha$ -GFP (Maus) (Parasitenzytosol) bzw. (B)  $\alpha$ -Exp1 (Maus) (*exported protein 1* in der parasitophoren Vakuolenmembran) und den Zweit-Antikörpern  $\alpha$ -Maus Alexa Fluor 488 gefärbt. Kernfarbstoff: DAPI; Maßstab: 10 $\mu$ m.



**Abb. 3.12: Relative Expressionslevel des Gens *pbmapk2* im Wildtyp bzw. im PbMAPK1-KO.** Dargestellt sind die relativen Expressionslevel des Gens *pbmapk2* im Wildtyp (GFPcon-Wildtyp-Parasiten) (A) und im PbMAPK1-KO (B) für die Zeitpunkte 24, 30, 48 und 54hpi. Die Werte für 30, 48 und 54hpi wurden jeweils auf den Ausgangswert von 24hpi bezogen. Die Auswertung erfolgte für jeweils 4 Sets. hpi: *hours post infection*.

Die Ergebnisse der qPCR wurden wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben ausgewertet (siehe Rohdaten im Anhang). Anschließend wurden die Werte der Sets für 30, 48 und 54hpi auf den jeweiligen Ausgangswert (24hpi) bezogen, um die Darstellung des Verlaufs der relativen Expression des Gens *pbmapk2* zu vereinfachen. Hierbei wurde das relative Expressionslevel vom Zeitpunkt 24hpi auf 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Die Auswertung der Ergebnisse für den Wildtyp zeigt ein Expressionsniveau, welches im Mittel zu den Zeitpunkten 24hpi und 30hpi gleich ausgeprägt war und zu den Zeitpunkten 48hpi und 54hpi absank (siehe Abb. 3.12A). Beim PbMAPK1-KO hingegen zeigte sich bei 30hpi im Vergleich zu 24hpi ein Anstieg der relativen Expression, welche ebenfalls zu den Zeitpunkten

48hpi und 54hpi wieder absank (siehe Abb. 3.12B). Im direkten Vergleich der Mittelwerte der vier Zeitpunkte zwischen Wildtyp und PbMAPK1-KO wird dieser Unterschied zum Zeitpunkt 30hpi mit einem Anstieg von etwa 35% und zum Zeitpunkt 48hpi mit einem Anstieg von etwa 55% deutlich (siehe Abb. 3.13) ist jedoch aufgrund der geringen Anzahl an Daten und der großen Schwankung der Einzelwerte nicht statistisch auswertbar.

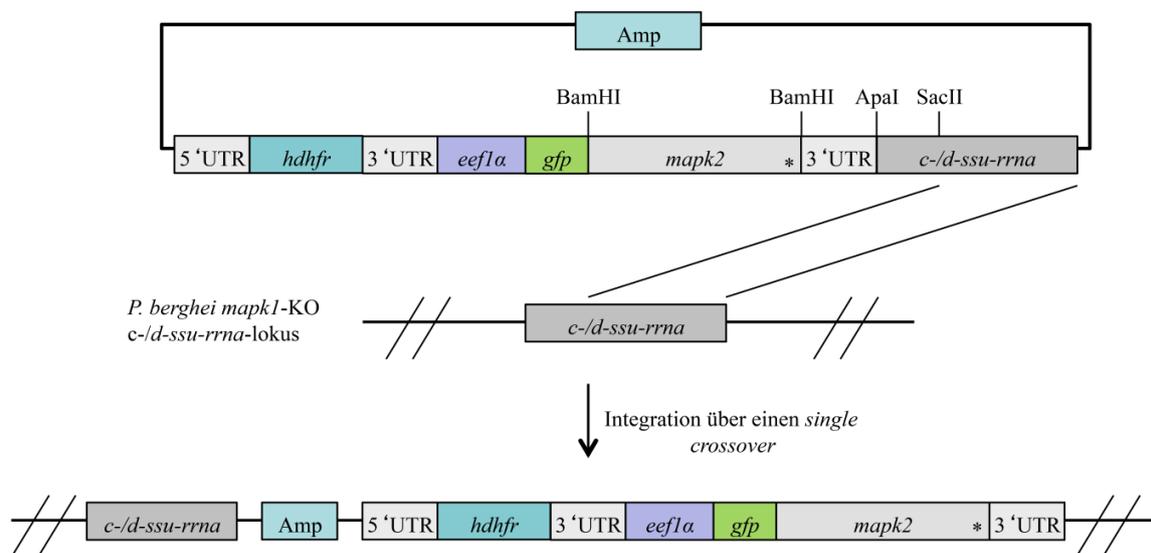


**Abb. 3.13:** Vergleich der Mittelwerte der relativen Expressionslevel des Gens *pbmapk2* im Wildtyp und im PbMAPK1-KO. Dargestellt sind die gemittelten relativen Expressionslevel des Gens *pbmapk2* im Wildtyp (GFPcon-Wildtyp-Parasiten) und im PbMAPK1-KO. Die Werte für 30, 48 und 54hpi wurden hierbei zuvor auf den Ausgangswert (24hpi) bezogen. hpi: *hours post infection*.

### 3.3.3 Vergleich der Lokalisation der PbMAPK2 im Wildtyp und in der *pbmapk1*-Deletionsmutante

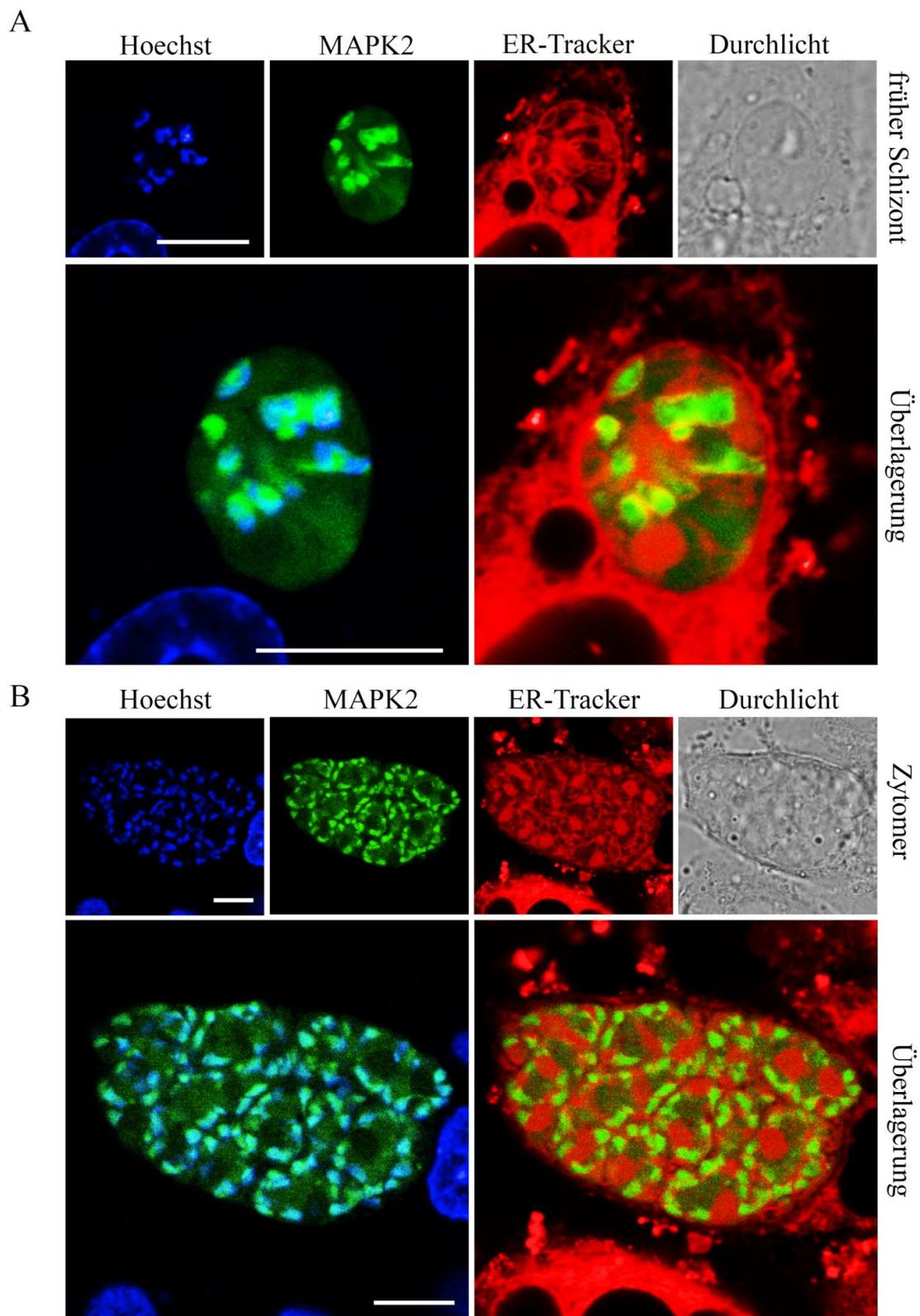
Um eine mögliche funktionelle Kompensation der fehlenden PbMAPK1 durch die PbMAPK2 auf Proteinebene zu untersuchen, wurde die PbMAPK2 in PbMAPK1-KO- Parasiten exprimiert. Dies sollte Aufschluss über eine mögliche Lokalisationsänderung der PbMAPK2 durch das Fehlen der PbMAPK1 geben. Da die PbMAPK1-KO-Parasiten bereits eine *tdhfr/ts*-Resistenzkassette besitzen, musste ein Konstrukt hergestellt werden, welches die *hdhfr*-Resistenzkassette aufweist, um mit einem anderen Antibiotikum (WR99210) selektionieren zu können (siehe 2.3.1.6). Hierfür wurde die *tdhfr/ts*- Resistenzkassette im pL0017-GFP-N-Vektor mit der *hdhfr*-Resistenzkassette ausgetauscht und die Volllänge der *pbmapk2* in den Vektor integriert (siehe 2.2.12.2). Das so erhaltene Konstrukt pL0017-GFP-N-hDHFR-PbMAPK2 wurde mittels *single crossover* in den *c-/d-ssu-rrna*-Lokus der

PbMAPK1-KO-Parasiten integriert (siehe Abb. 3.14) und die transgenen Parasiten mit WR99210 selektioniert.

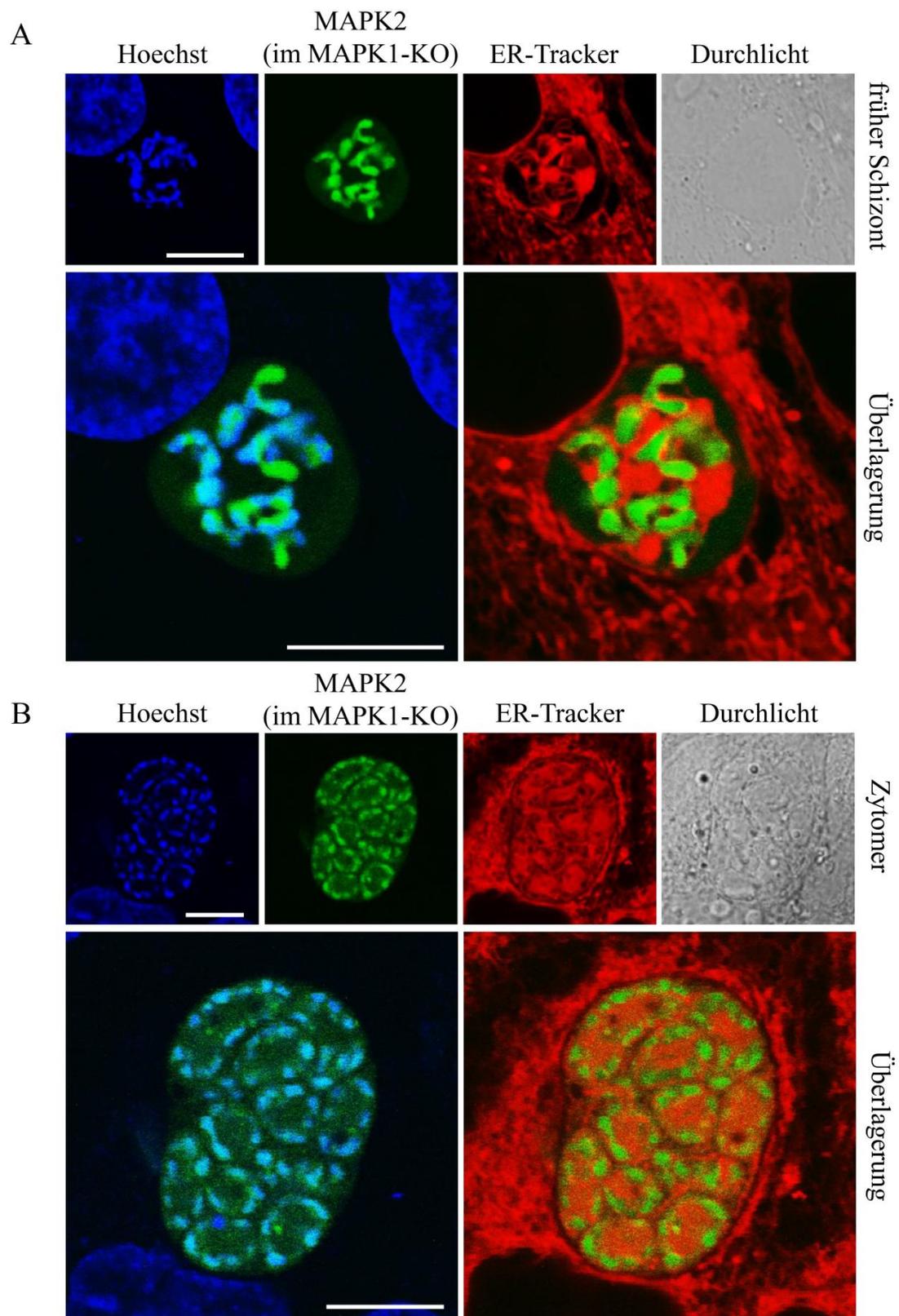


**Abb. 3.14: Schematische Darstellung der Integration des Konstruktes pL0017-hDHFR-GFP-N-PbMAPK2.** Das Konstrukt pL0017-hDHFR-GFP-N-MAPK2 (siehe 2.2.12.2) wurde mit ApaI und SacII linearisiert. Die Transfektion von *P. berghei* ANKA *pbmapk1*-KO-Parasiten mit dem linearisierten Konstrukt erfolgte über einen *single crossover* in den *c-/d-ssu-rrna*-Lokus. Die Expression der N-terminal mit GFP-gekoppelten PbMAPK2 steht unter der Kontrolle des konstitutiven *eef1a*-Promotors. Die transfizierten Parasiten können mit WR aufgrund der Resistenzkassette *hdhfr* positiv selektioniert werden. 3'- und 5'UTR: 3'- und 5' *untranslated region* der *pbdhfr* (*P. berghei dihydrofolat reductase*); *gfp*: *green fluorescent protein*; Amp: Ampicillin-Resistenzkassette; *hdhfr*: *human dihydrofolat reductase*; *c-/d-ssu-rrna*: *c-/d-* Abschnitt der *small subunit ribosomal rna*; *eef1a*: *eukaryotic elongation factor  $\alpha$* ; \*: Stop-Codon.

Die transgenen Parasiten, welche die PbMAPK2 als N-terminales GFP-Fusionsprotein im PbMAPK1-KO bzw. im Wildtyp (siehe 3.1.4) exprimieren, wurden im *live imaging* unter Verwendung des ER-Tracker™ Red (BODIPY® TR Glibenclamide) analysiert (siehe 2.3.3.6). Der ER-Tracker erlaubt die Visualisierung des endoplasmatischen Reticulums sowohl des Parasiten als auch der Wirtszelle und dient der indirekten Darstellung der Kernhüllen des Parasiten. Die Ergebnisse des *live imaging* sind anhand von repräsentativen Beispielen in den Abbildungen 3.15 und 3.16 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass es keinen Unterschied gibt im Lokalisationsmuster der PbMAPK2 im Vergleich zwischen PbMAPK2-exprimierenden Wildtyp- und PbMAPK1-KO-Parasiten. Die PbMAPK2 zeigt in beiden Fällen eine Assoziation mit den Parasitenkernen und ist nicht außerhalb der Kernhülle lokalisiert. Darüber hinaus zeigt die PbMAPK2 keine mit der PbMAPK1 vergleichbare Lokalisation.



**Abb. 3.15: Lokalisation der PbMAPK2 im PbMAPK1-Wildtyp.** *Live imaging* von GFP-N-PbMAPK2-Parasiten im PbMAPK1-Wildtyp unter Verwendung des ER-Tracker™ Red (BODIPY® TR Glibenclamide). (A) Früher Leberschizont, (B) Zytomerstadium. Dargestellt sind zusätzlich die Überlagerungen von der PbMAPK2 mit den Parasitenkernen bzw. mit dem ER-Tracker in einer stärkeren Vergrößerung. Kernfärbung mit Hoechst 33342. Maßstab: 10µm.



**Abb. 3.16:** Lokalisation der PbMAPK2 im PbMAPK1-KO. *Live imaging* von GFP-N-PbMAPK2- Parasiten im PbMAPK1-KO unter Verwendung des ER-Tracker™ Red (BODIPY® TR Glibenclamid). (A) Früher Leberschizont, (B) Zytoomerstadium. Dargestellt sind zusätzlich die Überlagerungen von der PbMAPK2 mit den Parasitenkernen bzw. mit dem ER-Tracker in einer stärkeren Vergrößerung. Kernfärbung mit Hoechst 33342. Maßstab: 10µm.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Expression und Lokalisation der MAPK aus *Plasmodium berghei*

Die Schizogonie in *Plasmodium* ist in Bezug auf die Kern- und Organellteilung mit anschließender Verteilung sowie Invagination der Parasitenmembran zur Bildung der einzelnen Merozoiten morphologisch bereits gut beschrieben (Rankin et al., 2010; Gerald et al., 2011; Stanway et al., 2011). Allerdings sind die daran beteiligten intrazellulären Signalvorgänge nach wie vor größtenteils unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass Proteinkinasen hierbei eine wichtige Rolle spielen (Gerald et al., 2011; Tewari et al., 2010). MAPK sind Serin/Threonin-spezifische Proteinkinasen und sind von den Invertebraten bis hin zu den *Mammalia* stark konserviert (Tanoue et al., 2000). Während die MAPK aus *Mammalia* mit ihren *upstream* Kinasen, Substraten und *scaffold* Proteinen bereits gut charakterisiert wurden (Cargnello & Roux, 2011; Zhang & Dong, 2007), sind die MAPK in anderen eukaryotischen Organismen weitgehend unbekannt. In *P. falciparum* und *P. berghei* wurden zwei Vertreter der MAPK identifiziert, MAPK1 und MAPK2 (Graeser et al., 1997; Dorin et al., 1999; Doerig et al., 1996; Lin et al., 1996), welche aufgrund von phylogenetischen Analysen in die Familie der MAPK eingruppiert wurden (Ward et al., 2004). Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die MAPK aus *P. falciparum* und *P. berghei* sowohl in asexuellen Blutstadien als auch in Gametozyten exprimiert werden (Dorin et al., 1999; Khan et al., 2005; Rangarajan et al., 2005; Tewari et al., 2005; Dorin-Semblat et al., 2007; Doerig et al., 1996; Graeser et al., 1997; Lin et al., 1996). Darüber hinaus wurde die Transkription der *mapk1* auch in Leberstadien von *Plasmodium yoelii* nachgewiesen (Nivez et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Transkription der beiden MAPK- Gene aus *Plasmodium berghei* in der Leberphase mittels RT-PCR untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass beide *mapk* zu allen untersuchten Zeitpunkten (24, 30, 48 und 54hpi) der Entwicklung in der Leber transkribiert werden (siehe Abb. 3.1). Darüber hinaus wurde der endogene Lokus der *pbmapk1* am 3'-Ende mit *gfp* fusioniert, um die Expression der PbMAPK1 als C-terminales GFP-Fusionsprotein unter dem endogenen Promotor während der Leberphase untersuchen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass die Volllänge der endogenen PbMAPK1 als GFP-Fusionsprotein in den Blutstadien exprimiert wird (siehe Abb. 3.3B). Die endogene PbMAPK1 zeigte hierbei im *live imaging* ein distinktes Lokalisationsmuster in den erythrozytären Stadien (siehe Abb. 3.3A), welches bereits für die überexprimierte PbMAPK1 als GFP-Fusionsprotein in der Blutphase gezeigt wurde (Wierk et al., 2013). Die Ergebnisse

des *live imaging* in der Leberphase konnten ebenfalls bestätigen, dass die PbMAPK1 während der Leberphase exprimiert wird. Darüber hinaus konnte das aus vorangegangenen Arbeiten bekannte Lokalisationsmuster der überexprimierten PbMAPK1 als GFP-Fusionsprotein in der Leberphase verifiziert werden (Wierk et al., 2013). Die PbMAPK1 lokalisiert während der frühen Leberschizogonie in den Kernen des Parasiten (30hpi) und bildet im Zytomer-Stadium (54hpi) distinkte Strukturen in der Nähe der Parasitenkerne und der invaginierenden Parasitenmembran aus (Wierk et al., 2013).

In Bezug auf das Lokalisationsmuster der PbMAPK1 in der Leberphase konnte bereits gezeigt werden, dass dieses unabhängig ist sowohl vom Aktivierungszustand des TXY- und des DFG-Motivs, als auch von einer putativen *coiled-coil*- Domäne (Wierk et al., 2013). Ebenso unabhängig vom Aktivierungszustand des TXY-Motivs ist die Lokalisation der MAPK ERK7 aus *Mammalia* (Abe et al., 1999). Darüber hinaus wurden bereits mehrere von der Kinase-Aktivität unabhängige Funktionen für eine Reihe verschiedener Proteinkinasen beschrieben (Rauch et al., 2011). Beispielsweise können die Kinasen der ERK-Familie die Zytoskelett-Organisation, die Zellzyklus-Regulation und die Genexpression unabhängig von ihrer Kinase-Aktivität als *Scaffold*-Proteine, durch allosterische Modifikationen anderer Proteine oder durch direkte Bindung an die DNA beeinflussen (Rodríguez & Crespo 2011).

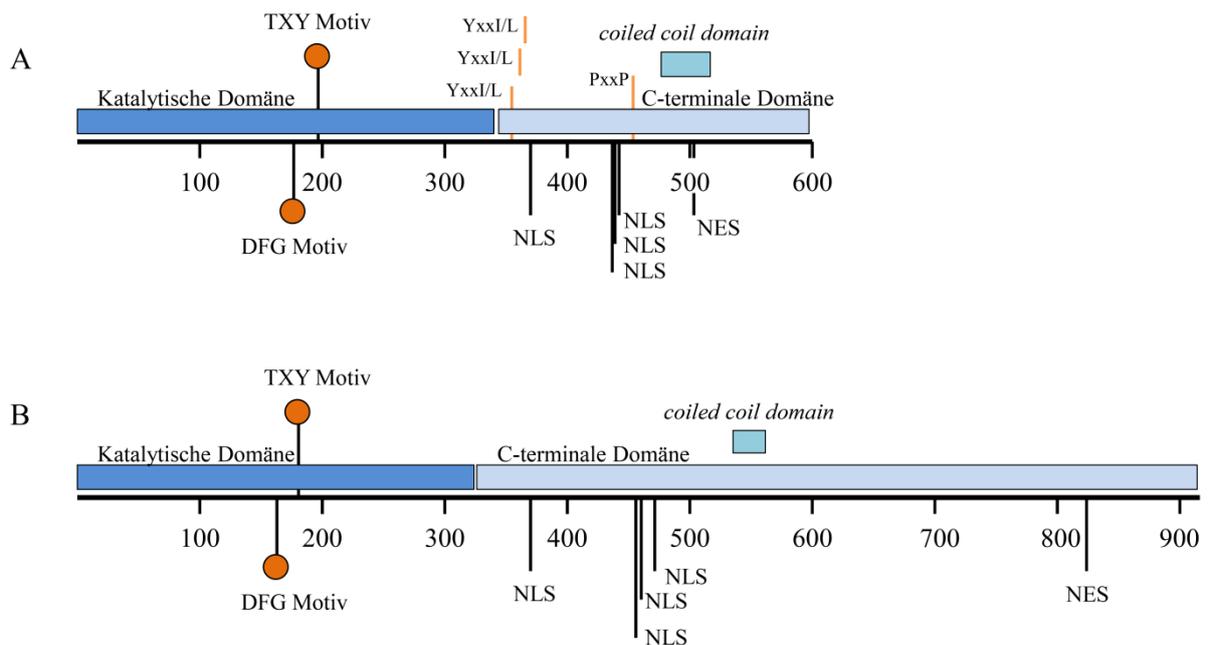
Zur Ausbildung der Kernlokalisierung in den frühen Leberschizonten wurde die C-terminale Domäne der PbMAPK1 als notwendig und hinreichend beschrieben (Wierk et al., 2013). In der C-terminalen Domäne der PbMAPK1 sind NLS-Strukturen vorhanden (siehe Abb. 4.1A), welche bereits anhand verschiedener Deletionsmutanten in HepG2-Zellen als funktional beschrieben wurden (Wierk et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit führte das Fehlen beider NLS-Struktur-Bereiche in der C-terminalen Domäne der PbMAPK1 im Parasiten nicht mehr zu einer Kernlokalisierung, wodurch die Funktionalität der NLS-Strukturen im Parasiten bestätigt wurde (siehe Abb. 3.4). Zwar wurde innerhalb des Parasiten nur die NLS-Struktur im hinteren Bereich der C-terminalen Domäne (NLS2) als funktional bestätigt, jedoch können anhand der Daten innerhalb des HepG2-Zellsystems beide NLS-Strukturen in der C-terminalen Domäne der PbMAPK1 als funktional betrachtet werden (Wierk et al., 2013). Die klassischen Vertreter der MAPK aus *Mammalia* (ERK1/2) lokalisieren ebenfalls im Zellkern, weisen jedoch keine NLS auf. Aus diesem Grund muss die Translokation in den Zellkern über Protein-Protein-Interaktionen stattfinden, bei denen der Interaktionspartner nukleäre Import- und Export-Signale aufweist (Ranganathan et al., 2006; Yazicioglu et al., 2007). Beispielsweise konnte bereits gezeigt werden, dass die Ser/Thr/Tyr-Kinase hBVR (*human*

*biliverdin reductase*) MAPK der ERK-Familie in den Kern transportiert (Lerner-Marmarosh et al., 2008). Die atypischen Mitglieder der ERK-Familie (ERK3, 5, 7 und 8) hingegen besitzen eine C-terminale Extension, in der z.B. bei ERK7 und ERK8 NLS vorhanden sind (Coulombe & Meloche, 2007). Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass die C-terminale Domäne von ERK7 eine Translokation in den Zellkern vermittelt (Abe et al., 1999; Abe et al., 2001). Ähnlich wurde dies für die MAPK ERK 5 beschrieben (Buschbeck & Ullrich, 2004), welche zusätzlich im C-terminalen Bereich eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne sowie eine MEF2 (Transkriptionsfaktor)- Interaktionsdomäne besitzt (Kasler et al., 2000).

In Bezug auf die Lokalisation der PbMAPK2 konnte in der vorliegenden Arbeit eine dauerhafte Kernassoziation (siehe Abb. 3.6) bzw. eine Lokalisation innerhalb der Kernhülle mit Hilfe des ER-Trackers gezeigt werden (siehe Abb. 3.15). Eine dauerhafte Kernlokalisierung wurde ebenfalls für die MAPK ERK3 beschrieben (Cheng et al., 1996), allerdings sind im Gegensatz zur PbMAPK2 keine NLS vorhanden, welche diese Translokation vermitteln könnten. Die überexprimierte PbMAPK2 wurde N-terminal mit GFP fusioniert. Eine C-terminale Fusion zeigte eine cytosolische Verteilung der PbMAPK2 (Daten nicht gezeigt). Strukturell wurden zwei Bereiche identifiziert, in denen NLS-Strukturen vorhergesagt wurden, dabei befindet sich eine am N-terminus und eine im C-terminalen Bereich (siehe Abb. 1.6). Die Tatsache, dass die PbMAPK2 nur N-terminal an GFP fusioniert werden konnte, lässt darauf schließen, dass die C-terminale NLS-Struktur wahrscheinlich funktionell von Bedeutung ist und bei C-terminaler GFP-Fusion möglicherweise sterisch blockiert wird.

Aufgrund der Tatsache, dass ein dynamischer Wechsel im Lokalisationsmuster der PbMAPK1 auftritt, muss ein Kernexport stattfinden, der möglicherweise mit einer Modifikation der PbMAPK1 einhergeht. Es wurde bereits gezeigt, dass eine proteolytische Prozessierung der PbMAPK1 wahrscheinlich nicht stattfindet (Wierk et al., 2013). Strukturelle Analysen haben jedoch ergeben, dass sich in *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium berghei* in der C-terminalen Domäne jeweils eine putative NES-Struktur (*nuclear export signal*) befindet (siehe Abb. 4.1). Die Kernlokalisierung der PbMAPK1 in den frühen Leberschizonten sowie der anschließende Wechsel der Lokalisation spricht für eine Interaktion mit weiteren Proteinen, welche die Erkennung des NLS und NES und somit den Kerntransport und Export vermitteln könnten. Proteine, die sowohl NLS als auch NES aufweisen, durchlaufen dynamische Zyklen von nukleärem Im- und Export, wobei mehrere vorhandene Signale die Komplexität der Interaktion mit Transportproteinen erhöhen (Weis

2003; Terry et al., 2007). Darüber hinaus könnte eine (auto-) Phosphorylierung der PbMAPK1 stattfinden, wodurch beispielsweise die putative NES-Struktur zugänglich wird und/oder die NLS-Strukturen „stillgelegt“ werden. Ein ähnliches Szenario wurde bei der MAPK ERK5 beobachtet, wobei die Aktivierung durch die *upstream* Kinase eine Konformationsänderung hervorruft. Hierdurch wird das NES „stillgelegt“ und das bipartite NLS zugänglich gemacht, sodass ein Kerntransport stattfinden kann (Kondoh et al., 2006; Nardozi et al., 2010).



**Abb. 4.1:** Schematische Darstellung der MAPK1 aus *Plasmodium berghei* und *Plasmodium falciparum*. Die MAPK1 besitzt sowohl in (A) *P. berghei* (PbMAPK1; 599AS; 70kDa) als auch in (B) *P. falciparum* (PfMAPK1; 914AS; 107kDa) eine Kinase-Domäne und eine C-terminale Verlängerung. Innerhalb der Kinase-Domäne befinden sich jeweils ein charakteristisches TXY-Motiv und ein DFG-Motiv. In der C-terminalen Domäne befinden sich jeweils mehrere putative NLS (*nuclear localization signal*) und eine putative NES- (*nuclear export signal*) Struktur. Zusätzlich befindet sich bei beiden im C-Terminus eine putative *coiled-coil* Domäne. In der PbMAPK1 (A) befinden sich putative SH2/SH3-Bindedomänen (YxxI/L und PxxP).

Während für die Ausbildung der Kernlokalisation die C-terminale Domäne als notwendig und hinreichend beschrieben wurde, ist die katalytische Domäne allein nicht in der Lage eine der beiden Lokalisationsmuster zu vermitteln. Für die Ausbildung der distinkten Lokalisation in den späten Stadien ist sowohl die C-terminale als auch die katalytische Domäne notwendig (Wierk et al., 2013). Eine mögliche Erklärung wäre das Vorhandensein von putativen SH2 (YxxI/L)-/SH3 (PxxP)-Bindungsdomänen innerhalb der C-terminalen Domäne (siehe Abb.

4.1A). SH3-Bindungsdomänen werden als Prolin-reiche Motive beschrieben, welche in der Lage sind mit SH3-Domänen zu interagieren (Yu et al., 1994). In der MAPK ERK7, die der PbMAPK1 sehr ähnelt, sind in der C-terminalen Domäne zwei SH3-Bindungsdomänen vorhanden (Coulombe & Meloche, 2007). Ebenso weist die atypische MAPK ERK8 zwei SH3-Bindungsdomänen im C-Terminus auf (Abe et al., 2002). Es konnte bereits gezeigt werden, dass über diese SH3-Bindungsdomäne eine Interaktion zwischen ERK8 und c-Src stattfindet und in einer Aktivierung der ERK8 resultiert (Abe et al., 2002). Es sind bereits mehrere Proteine in *Plasmodium* bekannt, welche SH2-/SH3-Bindungsdomänen aufweisen, jedoch wurden bisher keine möglichen Interaktionspartner mit SH2-/SH3-Domänen identifiziert (Chandra et al., 2004). SH3-Domänen besitzen typischerweise hoch-konservierte Falt-Strukturen aus zwei übereinander gelagerten 3-Strang- $\beta$ -Faltblättern (Musacchio et al., 1992). Die Bindung der SH3-Domäne an die Prolin-reichen SH3-Bindungsdomänen erfolgt über die hydrophoben Reste des einen 3-Strang- $\beta$ -Faltblattes (Cesareni et al., 2002). Es wäre möglich, dass strukturell ähnliche Motive wie die der SH3-Domäne in *Plasmodium* vorhanden sind, die mit SH2-/SH3-Bindungsdomänen interagieren können. Unter diesen Umständen wäre es denkbar, dass die Ausbildung der distinkten Strukturen der PbMAPK1 im Zytomerstadium über die in der C-terminalen Domäne vorhandenen SH2-/SH3-Bindungsdomänen vermittelt wird.

## **4.2 Auswirkungen der Deletion der *pbmapk1* auf den Parasiten während der Entwicklung in der Leberphase**

Bisher ist über die Funktion der MAPK aus *Plasmodium* wenig bekannt. Eine spezifische Funktion der MAPK1 konnte bisher nicht identifiziert werden, obwohl die MAPK1 in *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium berghei* sowohl in asexuellen Blutstadien als auch in Gametozyten exprimiert wird (Doerig et al., 1996; Graeser et al., 1997; Lin et al., 1996). Darüber hinaus resultierte die Deletion der *mapk1* nicht in der Ausbildung eines auffälligen Phänotyps mit Einschränkung der Parasitenentwicklung während der Blutphase oder in der Stechmücke, wie für *Plasmodium falciparum* (Dorin-Semblat et al., 2007) und *Plasmodium berghei* (Tewari et al., 2010) gezeigt wurde. Im Gegensatz dazu ergaben Untersuchungen von PfMAPK2-defizienten Parasiten, dass dieses Enzym sowohl bei der asexuellen Schizogonie als auch bei der Reifung der Gametozyten eine essentielle Rolle spielt (Dorin-Semblat et al., 2007). Darüber hinaus ist die MAPK2 aus *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium berghei*

essentiell für die Entwicklung der Gametozyten sowie für die Exflagellation von Mikrogametozyten im Darm der Stechmücken (Dorin et al., 1999; Khan et al., 2005; Rangarajan et al., 2005; Tewari et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der Deletion der *pbmapk1* auf den Parasiten während der Leberphase analysiert, um die Bedeutung des Enzyms während der exoerythrozytären Entwicklung zu ermitteln. Im Hinblick auf die Infektiosität, Viabilität oder Morphologie der Leberphase-Parasiten konnte jedoch kein Unterschied im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (siehe Abb. 3.9). Die Deletion der *pfmapk1* führte innerhalb der Blutphase zwar nicht zu einer Ausbildung eines erkennbar veränderten Phänotyps, jedoch zu einer erhöhten Protein-Expression der PfMAPK2, was möglicherweise für eine funktionelle Kompensation der fehlenden PfMAPK1 sprechen könnte (Dorin-Semblat et al., 2007). Aufgrund dieser Beobachtung wäre es denkbar, dass das Fehlen eines erkennbar veränderten Phänotyps in Blut- und Mücken-Stadien (Tewari et al., 2010) sowie in der Leberphase bei Deletion der *pbmapk1* in einer funktionellen Kompensation durch die endogene PbMAPK2 begründet ist.

Um eine mögliche Änderung der mRNA-Expression der *pbmapk2* identifizieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Methode der quantitativen *real-time* PCR zur Analyse von relativen Expressionslevel innerhalb des Parasiten während der Leberphase etabliert. Bisher wurde diese Methode ausschließlich zur quantitativen Bestimmung der Parasitenmenge unter Verwendung eines stark exprimierten *house-keeping genes* innerhalb der Leber verwendet (Bruña-Romero et al., 2001; Witney et al., 2001). Die Detektion der mRNA der beiden *mapk* ist aufgrund ihrer sehr niedrigen Expressionslevel im Vergleich zur Expression eines *house keeping genes* äußerst schwierig. Darüber hinaus ist die Menge an etablierten Leberphase-Parasiten in der *in vitro* Leberzellkultur im Verhältnis zur eingesetzten Sporozoiten-Menge erfahrungsgemäß sehr gering, weswegen mit immensen Sporozoiten-Anzahlen infiziert werden musste. Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmalig gelungen die relativen Expressionslevel der *pbmapk2* sowohl im Wildtyp als auch im PbMAPK1-KO in mehreren unabhängigen Versuchsansätzen zu erfassen. Die Ergebnisse zeigen in der Tat eine Erhöhung der Expression der *pbmapk2* in PbMAPK1-KO-Parasiten im Vergleich zur Expression in den Wildtyp-Parasiten (siehe Abb. 3.12). Zu den Zeitpunkten 30hpi (früher Leberschizont; Beginn der Karyokinese) und 48hpi (später Leberschizont; kurz vor Abschluss der Karyokinese) ist die relative Expression der *pbmapk2*- mRNA im PbMAPK1-KO um ca. 35% bzw. 55% erhöht (siehe Abb. 3.13). Allerdings ist hierbei die Schwankung der

Einzelwerte für den Zeitpunkt 48hpi sehr groß. Eine erhöhte Expression der *pbmapk2*- mRNA im Bereich 30hpi könnte ein Indiz sein für eine mögliche funktionelle Kompensation der fehlenden PbMAPK1 im Zytomerstadium (54hpi; Beginn der Zytokinese). Es konnte bereits in *P. falciparum* gezeigt werden, dass im Zuge der Proteinbiosynthese die Transkription und Translation nicht zeitnah stattfinden. Zwischen der Expression des Gens und dem Auftreten des entsprechenden Proteins findet sich eine Latenzzeit von mindestens 11 Stunden (Foth et al., 2011). Somit könnte die gesteigerte Expression der *pbmapk2* zwischen 30 und 48hpi zu einer stärkeren Präsenz des Proteins PbMAPK2 zum Zeitpunkt 54hpi führen und somit die Funktion der fehlenden PbMAPK1 kompensieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion des Gens *py235-ebp1* (kodiert für das PyEBP-1: *P. yoelii erythrocyte binding protein-1*) aus *Plasmodium yoelii* nicht zu einem veränderten Phänotyp führt, da andere Mitglieder aus der *py235*-Familie in der Lage sind die Funktion zu übernehmen (Ogun et al., 2011). Die Hoch-Regulation der *pbmapk2*- mRNA-Expression um 35% bzw. 55% zu den Zeitpunkten 30hpi bzw. 48hpi zeigt zwar keinen besonders deutlichen Effekt, ist jedoch vergleichbar mit den Änderungen der relativen Expressionen der Mitglieder der Py235-EBP-Familie im *py235-ebp-1*-KO (Ogun et al., 2011). Darüber hinaus ist das Expressionslevel der *pbmapk1* generell deutlich geringer als das der *pbmapk2* (siehe Rohdaten im Anhang), sodass für die funktionelle Kompensation der fehlenden PbMAPK1 eine geringe Steigerung der *pbmapk2*-Expression ausreichen würde. Um jedoch diese geringen Variationen in der Hoch-Regulation der *pbmapk2*-mRNA-Expression im PbMAPK1-KO darzustellen, müssen für eine valide statistische Erfassung größere Datensätze erhoben werden.

Eine weitere Möglichkeit eine mögliche funktionelle Kompensation der fehlenden PbMAPK1 durch die PbMAPK2 nachzuweisen, bestand in der Analyse des Lokalisationsmusters der PbMAPK2 in PbMAPK1-KO-Parasiten im *live imaging*. Hierfür wurden transgene Parasiten hergestellt, welche die Volllänge der PbMAPK2 als N-terminales GFP-Fusionsprotein überexprimieren. Unter Verwendung des ER-Tracker Red (Bodipy TR Glibeclamide) sollten durch Färbung des endoplasmatischen Reticulums indirekt die Kernhüllen der Parasitenkerne sichtbar gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der ER-Tracker zur Visualisierung des endoplasmatischen Reticulums der Parasiten während der Leberphase verwendet. Die Ergebnisse zeigten jedoch ein vergleichbares Lokalisationsmuster der PbMAPK2 sowohl im Wildtyp als auch im PbMAPK1-KO (siehe Abb. 3.15 und 3.16). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der Annahme einer möglichen funktionellen Kompensation der fehlenden PbMAPK1 durch die PbMAPK2. Es wäre jedoch möglich, dass die N-terminale Fusion an GFP zu einer Störung von Protein-Protein-Interaktionen geführt

hat, die für einen Lokalisationswechsel der PbMAPK2 notwendig sind. Darüber hinaus wäre es denkbar, dass die endogene PbMAPK2 einen Lokalisationswechsel vollzieht, dies aber in der überexprimierten, N-terminal mit GFP fusionierten PbMAPK2 nicht sichtbar wird. Um dies zu klären, wären weitergehende Untersuchungen der endogenen PbMAPK2 nötig. Da in vorangegangenen Arbeiten eine C-terminale Fusion der PbMAPK2 an GFP nicht möglich war, bleibt nur die Möglichkeit einer N-terminalen Fusion. Des Weiteren könnte statt GFP ein deutlich kleineres Markermolekül verwendet werden, um eine mögliche sterische Hinderung möglicher Protein-Protein-Interaktionen der PbMAPK2 zu vermeiden. Jedoch ist dabei zu beachten, dass eine Analyse nur im *live imaging* erfolgen kann, da eine Fixierung des Lokalisationsmusters der PbMAPK1 nicht möglich ist. Des Weiteren wäre es wichtig eine konditionale Deletion der *pbmapk2* vorzunehmen (Combe et al., 2009; Lacroix et al., 2011). Aufgrund der Tatsache, dass die MAPK2 essentiell für die Entwicklung von asexuellen Blutstadien und Gametozyten sowie für die Exflagellation von Mikrogametozyten ist (Dorin et al., 1999; Khan et al., 2005; Rangarajan et al., 2005; Tewari et al., 2005; Dorin-Semblat et al., 2007), darf die Deletion der *pbmapk2* erst nach dem Übergang von der Blut- in die Mückenphase stattfinden. Eine konditionale Mutagenese der *pbmapk2* zu Beginn der Leberphase würde die Identifizierung einer möglichen Funktion der PbMAPK2 während des Leberstadiums zulassen. Eine solche Mutagenese der *pbmapk2* im PbMAPK1-KO würde Aufschluss über eine mögliche funktionelle Kompensation der fehlenden PbMAPK1 durch die PbMAPK2 geben. Es wurde bereits bei MAPK-Isoformen in *Mammalia* beobachtet, dass eine, zumindest partielle, Kompensation von MAPK untereinander stattfinden kann (Hui et al., 2007).

### **4.3 Mögliche Funktionen der MAPK aus *Plasmodium berghei* während der Entwicklung in der Leberphase**

Das dynamische, subzelluläre Lokalisationsmuster der PbMAPK1 zu den verschiedenen Phasen der Entwicklung des Parasiten in der Leber könnte auf verschiedene Funktionen der PbMAPK1 hindeuten. Zu Beginn der Karyokinese lokalisiert die PbMAPK1 in den Parasitenkernen und könnte somit an der Initiation der rasanten Kernteilungsphase und deren Aufrechterhaltung beteiligt sein, indem die Expression bestimmter Gene aktiviert wird. Die PbMAPK2 hingegen lokalisiert während der gesamten Leberphase innerhalb der Kernhüllen des Parasiten, auch während des Kernteilungsprozesses. In *Mammalia* wurde für die MAPK

ERK3 ebenfalls eine dauerhafte Kernlokalisierung beschrieben (Cheng et al., 1996). Außerdem wird ihr eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und für die Progression des Zellzyklus zugeschrieben (Cargnello & Roux, 2011). Eine detaillierte Analyse von MAPK2-defizienten Parasiten mit einer fehlerhaften männlichen Gametozyten-Entwicklung zeigte zwar eine normale DNA-Synthese, jedoch einen Fehler in der nachfolgenden Karyokinese mit anschließender Zytokinese (Dorin-Semblat et al., 2007; Rangarajan et al., 2005; Tewari et al., 2005; Guttery et al., 2012). Somit könnte die PbMAPK2 im Karyokinese-Prozess, wie in der Schizogonie in der Leber und der männlichen Gametogenese, involviert sein. Unterstützt wird diese These durch die bereits *in vitro* gezeigte Phosphorylierung und Aktivierung der PfMAPK2 durch die PfNEK-1 (NEK, NIMA-like kinase), ein mit der NIMA (*never in mitosis Aspergillus*)-Familie verwandtes Enzym, dessen Mitglieder eine Rolle in der Zellzyklus-Kontrolle spielen (Dorin et al., 2001).

Die Kernteilung in *Plasmodium* gehört zu den rasantesten innerhalb der Eukaryoten (Bano et al., 2007), sodass der Parasit bereits frühzeitig zu Beginn der Karyokinese die notwendigen Proteine bereit stellen muss. Es ist bekannt, dass MAPK eine wichtige Rolle bei der Proliferation und dem Zellzyklus spielen (Chang & Karin, 2001; Widmann et al., 1999). In eukaryotischen Organismen translozieren MAPK in den Kern, um durch Phosphorylierung von Substraten wie Transkriptionsfaktoren die Genexpression zu regulieren oder um Enzyme zu aktivieren, welche eine Rolle in der Chromatin-Reorganisation spielen (Turjanski et al., 2007). Ähnlich wie in den MAPK aus *P. berghei* und *P. falciparum* sind auch in der MAPK2 aus *Toxoplasma gondii* (Homolog zur MAPK1 aus *Plasmodium*) putative NLS-Strukturen vorhanden, welche möglicherweise eine Kernlokalisierung vermitteln (Huang et al., 2011; Lacey et al., 2007). Dies könnte auf eine konservierte Funktion innerhalb der Familie der *Apicomplexa* hindeuten. Bis heute sind jedoch keine Substrate der plasmodialen MAPK bekannt. Mögliche Kandidaten könnten Transkriptionsfaktoren wie Myb (Gissot et al., 2005), HMG (Kun & Anders, 1995) oder Mitglieder der ApiAP2-Familie sein, welche in der Entwicklung von *Plasmodium* involviert sind (Painter et al., 2011; Tuteja et al., 2011).

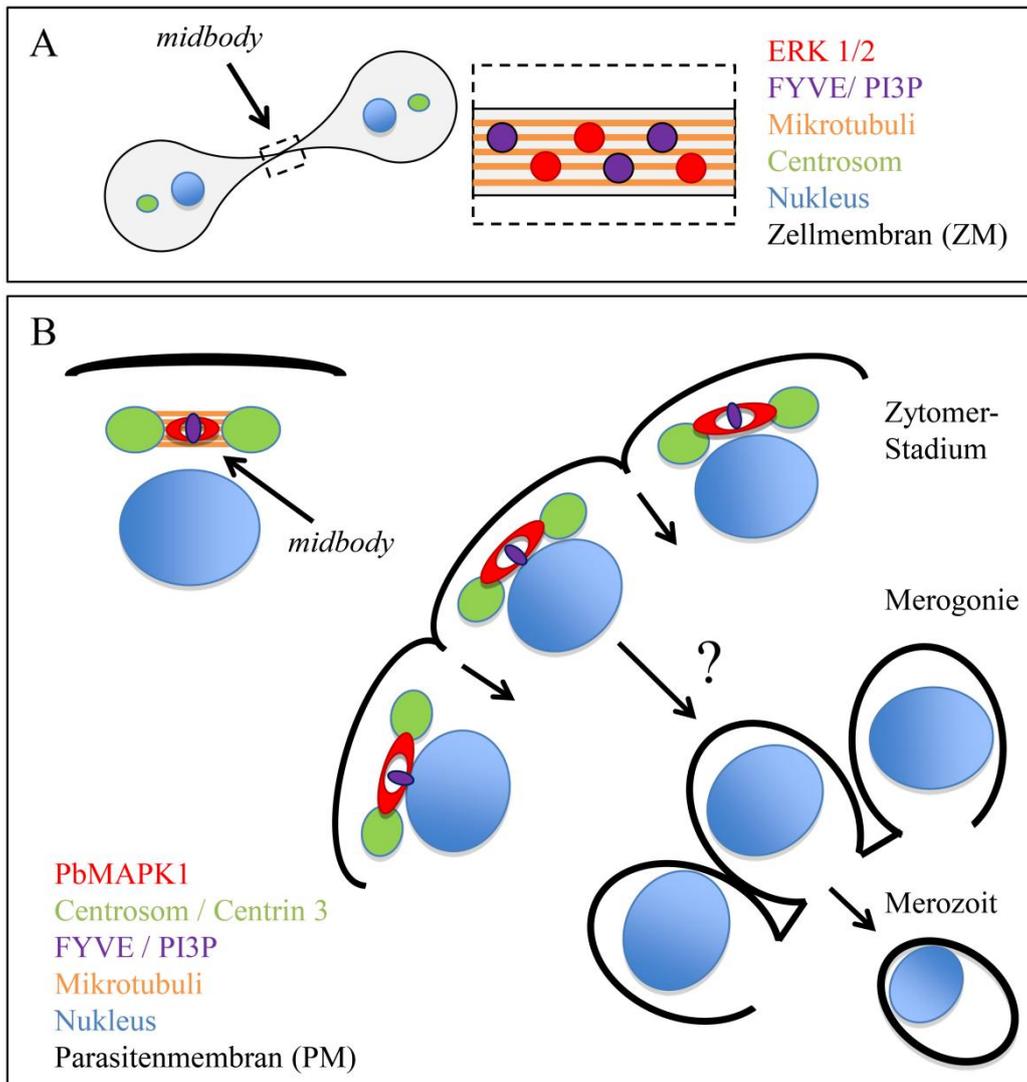
Darüber hinaus besitzt die PbMAPK1 offenbar eine weitere Funktion in späten Parasitenstadien während der Entwicklung in der Leber. Die im Zytomerstadium beobachtete distinkte Lokalisation zu Beginn der Invagination der Parasitenmembran mit Bildung der Merozoiten könnte auf eine Funktion der PbMAPK1 im Zytokinese-Prozess deuten. Aufgrund der Nähe der distinkten Lokalisationen zu den Parasitenkernen und der invaginierenden

Parasitenmembran wäre es möglich, dass die PbMAPK1 an der Invagination und Abszission der Parasitenmembran und Bildung der Merozoiten beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von weiteren Strukturen der Zusammenhang zwischen der PbMAPK1 und dem Zytokinese-Apparat untersucht. Hierfür wurde die Lokalisation des PbCentrin3 und der FYVE-Domäne analysiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Centrin3 aus *P. falciparum* an den Centrosomen des Parasiten in der Blutphase assoziiert (Mahajan et al., 2008). Die Centrosomen, auch als *microtubule organizing center* (MTOC) bezeichnet, haben eine zentrale Funktion im Zellzyklus von *Apicomplexa* (Francia & Striepen, 2014). Die FYVE-Domäne ist eine *zinc finger* Domäne, welche nach den vier Cystein-reichen Proteinen benannt wurde, in denen sie erstmals entdeckt wurde (**F**ab 1, **Y**O<sub>2</sub>T<sub>2</sub>B, **V**ac 1, **E**EA1) und bindet das Phosphatidylinositol PI3P (Phosphatidylinositol 3-Phosphat) (Gillooly et al., 2000; Gaullier et al., 2000). Die FYVE-Domäne dient somit als ein Marker für das PI3P, welches in *Mammalia* am sogenannten *midbody* lokalisiert (Gillooly et al., 2000; Montagnac & Chavrier, 2010; Sagona et al., 2010). Der *midbody* beschreibt in *Mammalia* den langgezogenen Bereich zwischen zwei entstehenden Tochterzellen während der Abszission im Zytokinese-Prozess (Steigemann & Gerlich, 2009). Dieser *midbody* besteht aus antiparallelen Mikrotubuli-Bündeln sowie einer Reihe von Struktur- und Signalproteinen einschließlich Proteinkinasen (Skop et al., 2004), wie MAPKK und MAPK ERK1/2 (Kasahara et al., 2007; Shapiro et al., 1998; Willard & Crouch, 2001; Zecevic et al., 1998), welche ebenfalls zu früheren Zeitpunkten der Zellteilung im Kern lokalisieren (Shapiro et al., 1998). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die klassischen MAPK ERK1/2 am *midbody* von HeLa- Zellen assoziieren und essentiell für die Abszission der Zellmembran im Zytokinese-Prozess sind (Kasahara et al., 2007). Auch bei MAPK in Pflanzen wurde eine Rolle im Zytokinese-Prozess beschrieben. Beispielsweise ist die MAPK1 in Tabakpflanzen notwendig für die Bildung des Phragmoplasten (vergleichbar mit einer *midbody*- Struktur) während der Zytokinese sowie wichtig für den geordneten Ablauf des Zellzyklus (Ma & Yu, 2010). Es wäre somit denkbar, dass die PbMAPK1 eine ähnliche Funktion übernimmt, indem sie die Invagination sowie die Abszission der Parasitenmembran zur Bildung von Merozoiten koordiniert. Um einen möglichen *midbody* im Parasiten zu lokalisieren, dient die FYVE-Domäne als Tandem-Konstrukt (2xFYVE) mit erhöhter Bindungsaffinität (Gillooly et al., 2000) zur Identifizierung des PI3P. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine distinkte Struktur in der Nähe der Parasitenkerne und der invaginierenden Membran während des Zytomerstadiums, womit eine Ähnlichkeit zum Lokalisationsmuster der PbMAPK1 besteht. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass das Verhältnis distinkter Strukturen der

PbMAPK1 und der Parasitenkerne bei etwa 1:1 liegt (Wierk et al., 2013). Die Anzahl der FYVE-Strukturen zeigt ein ähnliches Verhältnis zu den Parasitenkernen (siehe Abb. 3.8C). In einzelnen Bereichen fehlen jedoch diese Strukturen, was in der Asynchronität der Schizogonie begründet sein könnte (Reininger et al., 2011). Dies hat zur Folge, dass nicht alle Kerne innerhalb eines Schizonten gleichzeitig in den Zytokinese-Prozess eintreten. Es wäre möglich, dass die Strukturen, an denen die FYVE-Domäne das PI3P bindet, die *midbody*-Strukturen des Parasiten darstellen. Dabei wäre es anhand der in anderen Organismen beobachteten Lokalisationen der jeweiligen MAPK am *midbody* denkbar, dass auch innerhalb des Parasiten die PbMAPK1 sowie das PI3P an den *midbody*-ähnlichen Strukturen assoziiert (siehe zur Hypothese die schematische Abb. 4.2).

In Bezug auf die Ergebnisse des PbCentrin3 zeigt sich ein ähnliches Lokalisationsmuster. Das PbCentrin3 weist distinkte Strukturen in der Nähe der Parasitenkerne und der invaginierenden Parasitenmembran auf. Jedoch scheint ein Verhältnis von zwei PbCentrin3-Strukturen pro Parasitenkern vorzuliegen (siehe Abb. 3.8A,B). Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Protein PfArk1 in punktuellen Strukturen, sehr wahrscheinlich an Centrosomen, lokalisiert und paarweise die mitotische Spindel flankiert (Reininger et al., 2011). In Bezug auf die Hypothese, dass die PbMAPK1 zusammen mit dem PI3P an *midbody*-ähnlichen Strukturen lokalisiert, wäre es möglich, dass die paarigen PbCentrin3-Strukturen diesen Komplex flankieren und gemeinsam den Zytokinese-Apparat des Parasiten darstellen (siehe zur Hypothese die schematische Abb. 4.2). Ko-Lokalisationsstudien mit der PbMAPK1 könnten Aufschluss darüber geben, inwiefern die einzelnen beobachteten Strukturen räumlich in einem Zusammenhang stehen. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht doppelfluoreszente Parasiten herzustellen, welche einen der beiden verwendeten Marker als GFP-Fusionsprotein zusammen mit der PbMAPK1 als mCherry-Fusionsprotein überexprimieren. Die Transfektion von der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Centrin3- bzw. 2xFYVE-Parasiten mit einem Konstrukt zur Expression der PbMAPK1 als mCherry-Fusionsprotein im p230-Lokus war jedoch leider nicht erfolgreich. Eine weitere Möglichkeit wäre die Kreuzung der genannten Stämme während der sexuellen Entwicklung des Parasiten in der Mücke. Darüber hinaus könnten weitere mögliche beteiligte Proteine im *live imaging* analysiert werden.



**Abb. 4.2:** Vergleich der Zytokinese in *Mammalia* mit dem Ablauf des Zytokinese-Prozesses während des Zytomer-Stadiums in der Leberphase von *Plasmodium berghei*. (A) Schematische Abbildung der Zytokinese bei *Mammalia*. Der langgezogene Bereich zwischen den beiden entstehenden Tochterzellen stellt den *midbody* dar. In einem vergrößerten Ausschnitt sind die am *midbody* und den Mikrotubuli assoziierten MAPK ERK1/2 (Kasahara et al., 2007) und das Phosphatidylinositol PI3P (Gillooly et al., 2000; Sagona et al., 2010) schematisch vereinfacht dargestellt. Ebenfalls schematisch dargestellt sind die Centrosomen als Bestandteil der Teilungsspindel des Zytokinese-Apparates. (B) Ablauf des Zytokinese-Prozesses in späten Leberstadien von *Plasmodium berghei*, ausgehend vom Zytomerstadium bis hin zur Bildung der Merozoiten. Im Zytomerstadium beginnt die Invagination der Parasitenmembran, bei der sich im weiteren Verlauf die PM um jeden einzelnen Parasitenkern stülpt (Merogonie) und durch abschließende Abszission der PM zur Entstehung der Merozoiten führt. Hypothese: Pro Kern flankieren zwei PbCentrin3-Strukturen (Centrosomen) eine *midbody*-Struktur aus mehreren Mikrotubuli, an welcher die PbMAPK1 und das PI3P (gebunden von der FYVE-Domäne) assoziieren. Der räumliche Zusammenhang zwischen PbMAPK1, Centrosomen und PI3P während der Merogonie bis hin zur Bildung der Merozoiten ist hierbei unklar.

## LITERATURVERZEICHNIS

www.who.int

ABE MK, KUO WL, HERSHENSON MB, ROSNER MR, 1999. Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol.* 19(2):1301-12.

ABE MK, KAHLE KT, SAELZLER MP, ORTH K, DIXON JE, ROSNER MR, 2001. ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *J Biol Chem.* 276(24):21272-9.

ABE MK, SAELZLER MP, ESPINOSA R, KAHLE KT, HERSHENSON MB, LE BEAU MM AND ROSNER MR, 2002. ERK8, a New Member of the Mitogen-activated Protein Kinase Family. *J Biol Chem Vol. 277, No. 19, pp. 16733–16743.*

AMINO R, THIBERGE S, MARTIN B, CELLI S, SHORTE S, FRISCHKNECHT F, MÉNARD R, 2006. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat med.* 12, 220–224.

BAER K, KLOTZ C, KAPPE SH, SCHNIEDER T, FREVERT U, 2007. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog* 3: e171.

BANO N, ROMANO JD, JAYABALASINGHAM B, COPPENS I, 2007. Cellular interactions of *Plasmodium* liver stage with its host mammalian cell. *Int J Parasitol.* 37(12):1329-41.

BEHET MC, FOQUET L, VAN GEMERT GJ, BIJKER EM, MEULEMAN P, LEROUX-ROELS G, HERMSEN CC, SCHOLZEN A, SAUERWEIN RW, 2014. Sporozoite immunization of human volunteers under chemoprophylaxis induces functional antibodies against pre-erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 13:136. doi: 10.1186/1475-2875-13-136.

BIJKER EM, SCHATS R, OBJERO JM, BEHET MC, VAN GEMERT GJ, VAN DE VEGTE-BOLMER M, GRAUMANS W, VAN LIESHOUT L, BASTIAENS GJ, TEELLEN K, HERMSEN CC, SCHOLZEN A, VISSER LG, SAUERWEIN RW, 2014. Sporozoite immunization of human volunteers under mefloquine prophylaxis is safe, immunogenic and protective: a double-blind randomized controlled clinical trial. *PLoS One* 9(11):e112910. doi: 10.1371

BILLKER O, LINDO V, PANICO M, ETIENNE AE, PAXTON T, DELL A, ROGERS M, SINDEN RE, MORRIS HR, 1998. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* 392(6673):289-92.

- BRUÑA-ROMERO O, HAFALLA JC, GONZÁLEZ-ASEGUINOLAZA G, SANO G, TSUJI M, ZAVALA F, 2001. Detection of malaria liver-stages in mice infected through the bite of a single Anopheles mosquito using a highly sensitive real-time PCR. *Int J Parasitol.* 31(13):1499-502.
- BUSCHBECK M, ULLRICH A, 2004. The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J Biol Chem* Vol.280, 4:2659-667.
- CARGNELLO M, ROUX PP, 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 75(1):50-83. doi: 10.1128/MMBR.00031-10.
- CESARENI G, PANNI S, NARDELLI G, CASTAGNOLI L, 2002. Can we infer peptide recognition specificity mediated by SH3 domains? *FEBS Letters* 513, 38-44.
- CHANDRA BR, GOWTHAMAN R, AKHOURI RR, GUPTA D AND SHARMA A, 2004. Distribution of proline-rich (PxxP) motifs in distinct proteomes: functional and therapeutic implications for malaria and tuberculosis. *Protein Eng Des Sel.* 17(2):175-82.
- CHANG L & KARIN M, 2001. *Mammalian* MAP kinase signalling cascades. *Nature.* Vol. 410: 37-40.
- CHENG M, BOULTON TG, COBB MH, 1996. ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J Biol Chem* 271:8951–8958.
- COHEN P, 2001. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem* 268: 5001–5010.
- COMBE A, GIOVANNINI D, CARVALHO TG, SPATH S, BOISSON B, LOUSSERT C, THIBERGE S, LACROIX C, GUEIRARD P, MÈNARD R, 2009. Clonal conditional mutagenesis in malaria parasites. *Cell Host Microbe.* 5(4):386-96. doi: 10.1016/j.chom.2009.03.008.
- COULOMBE P, MELOCHE S, 2007. Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773 1376–1387.
- DOERIG CM, PARZY D, LANGSLEY G, HORROCKS P, CARTER R, DOERIG CD, 1996. A map kinase homologue from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Gene* 177: 1-6.
- DOERIG C, BILLKER O, HAYSTEAD T, SHARMA P, TOBIN AB, WATERS NC, 2008. Protein kinases of malaria parasites: an update. *Trends in Parasitology.* Vol.24 No.12: 570-577.

- DORIN D, ALANO P, BOCCACCIO I, CICÉRON L, DOERIG C, SULPICE R, PARZY D, DOERIG C, 1999. An atypical mitogen-activated protein kinase (MAPK) homologue expressed in gametocytes of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Identification of a MAPK signature. *J Biol Chem.* 274(42):29912-20.
- DORIN D, LE ROCH K, SALLICANDRO P, ALANO P, PARZY D, POULLET P, MEIJER L, DOERIG C, 2001. Pfnek-1, a NIMA-related kinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *European Journal of Biochemistry.* 268: 2600-2608.
- DORIN D, SEMBLAT J-P, POULLET P, ALANO P, GOLDRING JPD, WHITTLE C, PATTERSON S, CHAKRABARTI D AND DOERIG C, 2005. PfPK7, an atypical MEK-related protein kinase, reflects the absence of classical three-component MAPK pathways in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology* 55 (1), 184–196.
- DORIN-SEMBLAT D, QUASHIE N, HALBERT J, SICARD A, DOERIG C, PEAT E, RANFORCARTWRIGHT 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.
- FOTH BJ, ZHANG N, CHAAL BK, SZE SK, PREISER PR, BOZDECH Z, 2011. Quantitative time-course profiling of parasite and host cell proteins in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Proteomics.* 10(8):M110.006411. doi: 10.1074/mcp.M110.006411.
- FRANCIA ME, STRIEPEN B, 2014. Cell division in apicomplexan parasites. *Nat Rev Microbiol.* 12(2):125-36. Doi: 10.1038/nrmicro3184.
- FRANKE-FAYARD B, TRUEMAN H, RAMESAR J, MENDOZA J, VAN DER KEUR M, VAN DER LINDEN R, SINDEN RE, WATERS AP, JANSE CJ, 2004. A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol.* 137(1):23-33.
- FRANKEL MB, KNOLL LJ, 2009. The ins and outs of nuclear trafficking: unusual aspects in apicomplexan parasites. *DNA Cell Biol.* 28(6):277-84. doi: 10.1089/dna.2009.0853.
- FREVERT U, SINNIS P, CERAMI C, SHREFFLER W, TAKACS B, NUSSENZWEIG V, 1993. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J. Exp.Med.* 177, 1287–1298.
- FREVERT U, NARDIN E, 2005. Arrest in the liver - a genetically defined malaria vaccine? *The New England Journal of Medicine.* 352:1600-1602.
- FREVERT U, USYNIN I, BAER K, KLOTZ C. 2006. Nomadic or sessile: can Kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver? *Cell Microbiol* 8(10):1537-46.

- GAULLIER JM, RONNING E, GILLOOLY DJ, STENARK H, 2000. Interaction of the EEA1 FYVE finger with phosphatidylinositol 3-phosphate and early endosomes. Role of conserved residues. *J Biol Chem.* 275(32):24595-600.
- GERALD N, MAHAJAN B, KUMAR S, 2011. Mitosis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell* 10: 474-482.
- GILLOOLY DJ, MORROW IC, LINDSAY M, GOULD R, BRYANT NJ, GAULLIER JM, PARTON RG, STENMARK H, 2000. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* 19(17):4577-88.
- GISSOT M, BRIQUET S, REFOUR P, BOSCHET C, VAQUERO C, 2005. PfMyb1, a *Plasmodium falciparum* transcription factor, is required for intra-erythrocytic growth and controls key genes for cell cycle regulation. *J Mol Biol.* 346(1):29-42.
- GOOD L, NAZAR RN, 1997. Plasmid mini-preparations from culture streaks. *Biotechniques* 22(3):404-6.
- GRAESER R, KÜRY P, FRANKLIN RM, KAPPES B, 1997. Characterization of a mitogen-activated protein (MAP) kinase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 23(1):151-9.
- GRAEWE S, RANKIN KE, LEHMANN C, DESCHERMEIER C, HECHT L, FROEHLKE U, STANWAY RR, HEUSSLER V, 2011. Hostile takeover by *Plasmodium*: reorganization of parasite and host cell membranes during liver stage egress. *PLoS Pathog.* 7(9): e1002224. doi:10.1371/journal.ppat.1002224
- GUTTERY DS, FERGUSON DJ, POULIN B, XU Z, STRASCHIL U, KLOP O, SOLVAKOV L, SANDRINI SM, BRADY D, NIEDUSZYNSKI CA, JANSE CJ, HOLDER AA, TOBIN AB, TEWARI R, 2012. A putative homologue of CDC20/CDH1 in the malaria parasite is essential for male gamete development. *PLoS Pathog.* 8(2):e1002554. doi: 10.1371/journal.ppat.1002554.
- HANKS SK, HUNTER T, 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9(8):576-96.
- HELM S, LEHMANN C, NAGEL A, STANWAY RR, HORSTMANN S, LLINAS M, HEUSSLER VT, 2010. Identification and characterization of a liver stage-specific promoter region of the malaria parasite *Plasmodium*. *PLoS One.* 5(10):e13653. doi: 10.1371/journal.pone.0013653.
- HOFFMAN SL, GOH LM, LUKE TC, SCHNEIDER I, LE TP, DOOLAN DL, SACCI J, DE LA VEGA P, DOWLER M, PAUL C, GORDON DM, STOUTE JA, CHURCH LW, SEDEGAH M, HEPPNER DG, BALLOU WR, RICHIE TL, 2002. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis* 185(8):1155-64.

- HUANG H, MA YF, BAO Y, LEE H, LISANTI MP, TANOWITZ HB, WEISS LM, 2011. Molecular cloning and characterization of mitogen-activated protein kinase 2 in *Toxoplasma gondii*. *Cell Cycle*. 10(20):3519-26. doi: 10.4161/cc.10.20.17791.
- HUI L, BAKIRI L, MAIRHORFER A, SCHWEIFER N, HASLINGER C, KENNER L, KOMNENOVIC V, SCHEUCH H, BEUG H, WAGNER EF, 2007. p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nat Genet*. 39(6):741-9.
- JANSE CJ, RAMESAR J & WATERS AP, 2006. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc* 1, 346-56.
- KAPPE SH, VAUGHAN AM, BODDEY JA, COWMAN AF, 2010. That was then but this is now: malaria research in the time of an eradication agenda. *Science* 328(5980):862-6.
- KASAHARA K, NAKAYAMA Y, NAKAZATO Y, IKEDA K, KUGA T, YAMAGUCHI N, 2007. Src Signaling Regulates Completion of Abscission in Cytokinesis through ERK/MAPK Activation at the Midbody. *J Biol Chem* VOL. 282, NO. 8, pp. 5327–5339.
- KASLER HG, VICTORIA J, DURAMAD O, WINOTO A, 2000. ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* 20(22):8382-9.
- KEITANY GJ, SACK B, SMITHERS H, CHEN L, JANG IK, SEBASTIAN L, GUPTA M, SATHER DN, VIGNALI M, VAUGHAN AM, KAPPE SH, WANG R, 2014. Immunization of mice with live-attenuated late liver stage-arresting *Plasmodium yoelii* parasites generates protective antibody responses to preerythrocytic stages of malaria. *Infect Immun*. 82(12):5143-53.
- KHAN SM, FRANKE-FAYARD B, MAIR GR, LASONDER E, JANSE CJ, MANN M, WATERS AP, 2005. Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. *Cell* 121:675–687.
- KONDOH K, TERESAWA K, MORIMOTO H, NISHIDA E, 2006. Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Mol Cell Biol*. 26(5):1679-90.
- KRISHNA M, NARANG H, 2008. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci* 65(22):3525-44.
- KUN JF, ANDERS RF, 1995. A *Plasmodium falciparum* gene encoding a high mobility group protein box. *Mol Biochem Parasitol*. 71(2):249-53.

- LACEY MR, BRUMLIK MJ, YENNI RE, BUROW ME, CUIEL TJ, 2007. *Toxoplasma gondii* expresses two mitogen-activated protein kinase genes that represent distinct protozoan subfamilies. *J Mol Evol.* 64(1):4-14.
- LACROIX C, GIOVANNINI D, COMBE A, BARGIERI DY, SPÄTH S, PANCHAL D, TAWK L, THIBERGE S, CARVALHO TG, BARALE JC, BHANOT P, MÈNARD R, 2011. FLP/FRT-mediated conditional mutagenesis in pre-erythrocytic stages of *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc.* 6(9):1412-28. doi: 10.1038/nprot.2011.363.
- LEIRIÃO P, ALBUQUERQUE SS, CORSO S, VAN GEMERT GJ, SAUERWEIN RW, RODRIGUEZ A, GIORDANO S, MOTA MM, 2005. HGF/MET signalling protects *Plasmodium*-infected host cells from apoptosis. *Cellular Microbiology.* 7(4): 603-609.
- LERNER-MARMAROSH N, MIRALEM T, GIBBS PE, MAINES MD, 2008. Human biliverdin reductase is an ERK activator; hBVR is an ERK nuclear transporter and is required for MAPK signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(19):6870-5.
- LIN DT, GOLDMAN ND AND SYIN C, 1996. Stage-specific expression of a *Plasmodium falciparum* protein related to the eukaryotic mitogen-activated protein kinases. *Elsevier Science B.V:* 78: 67-77.
- LOW H, LYE YM, SIM TS, 2007. Pfnek3 functions as an atypical MAPKK in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Biophys Res Commun* 361(2):439-44.
- LYE YM, CHAN M AND SIM TS, 2006. Pfnek3: an atypical activator of a MAP kinase in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett.* 580(26):6083-92.
- LYON M, DEAKIN JA AND GALLAGHER JT, 1994. Liver heparan sulfate structure. A novel molecular design. *J Biol Chem.* 269(15):11208-15.
- MA Z & YU G, 2010. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) is required for cytokinesis and progression of cell cycle in tobacco BY-2 cells *J Plant Physiol.* 167(3):216-21.
- MAHAJAN B, SELVAPANDIVAN A, GERALD NJ, MAJAM V, ZHENG H, WICKRAMARACHCHI T, TIWARI J, FUJIOKA H, MOCH JK, KUMAR N, ARAVIND L, NAKHASI HL, KUMAR S, 2008. Centrins, cell cycle regulation proteins in human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 283(46):31871-83. doi: 10.1074/jbc.M800028200.
- MONTAGNAC G, CHAVRIER P, 2010. Abscission accomplished by PtdIns(3)P. *Nat Cell Biol.* 12(4):308-10. doi: 10.1038/ncb0410-308.

- MOTA MM, PRADEL G, VANDERBERG JP, HAFALLA JC, FREVERT U, NUSSENZWEIG RS, NUSSENZWEIG V, RODRIGUEZ A, 2001. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* 5;291(5501):141-4.
- MUSACCHIO A, NOBLE M, PAUPTIT R, WIERENGA R AND SARASTE M, 1992. Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain. *Nature* 359(6398), 851-855.
- NAGEL A, PRADO M, HEITMANN A, TARTZ S, JACOBS T, DESCHERMEIER C, HELM S, STANWAY R, HEUSSLER V, 2013. A new approach to generate a safe double-attenuated *Plasmodium* liver stage vaccine. *Int J Parasitol* 43(6):503-14.
- NARDOZZI JD, LOTT K, CINGOLANI G, 2010. Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Commun Signal*. 8:32. doi: 10.1186/1478-811X-8-32.
- NIJHOUT MM AND CARTER R, 1978. Gamete development in malaria parasites: bicarbonate-dependent stimulation by pH in vitro. *Parasitology*. 76(1):39-53.
- NIVEZ M, ACHBAROU A, BIENVENU JD, MAZIER D, DOERIG C, VAQUERO C, 2000. A study of selected *Plasmodium yoelii* messenger RNAs during hepatocyte infection. *Mol Biochem Parasitol*. 111(1):31-9.
- OGUN SA, TEWARI R, OTTO TD, HOWELL SA, KNUEPFER E, CUNNINGHAM DA, XU Z, PAIN A, HOLDER AA, 2011. Targeted disruption of py235ebp-1: invasion of erythrocytes by *Plasmodium yoelii* using an alternative Py235 erythrocyte binding protein. *PLoS Pathog*. 7(2):e1001288. doi: 10.1371/journal.ppat.1001288.
- PAINTER HJ, CAMPBELL TL, LLINÁS M, 2011. The Apicomplexan AP2 family: integral factors regulating *Plasmodium* development. *Mol Biochem Parasitol*. 176(1):1-7. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.11.014.
- PEARSON G, ROBINSON F, GIBSON T, XU B, KARANDIKAR M, BERMAN K AND COBB M, 2001. Mitogen-activated protein (MAP) Kinase pathways regulation and physiological functions. *Endocrine reviews*. 22(2): 153-183.
- PRUDÊNCIO M, MOTA MM, 2007. To migrate or to invade: those are the options. *Cell Host Microbe* 15;2(5):286-8.
- PRUDÊNCIO M, RODRIGUEZ A, MOTA MM, 2006. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol*. 4(11):849-56.
- RAMAN M, COBB MH, 2003. MAP kinase modules: many roads home. *Curr Biol*. 13(22):R886-8.

- RANGANATHAN A, YAZICIOGLU MN, COBB MH, 2006. The nuclear localization of ERK2 occurs by mechanisms both independent of and dependent on energy. *J Biol Chem* 281:15645–15652.
- RANGARAJAN R, BEI AK, JETHWANNEY D, MALDONADO P, DORIN D, SULTAN AA AND DOERIG C, 2005. A mitogenactivated protein kinase regulates male gametogenesis and transmission of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO Rep* 6: 464–469.
- RANKIN KE, GRAEWE S, HEUSSLER VT, STANWAY RR, 2010. Imaging liver-stage malaria parasites. *Cell Microbiol.* 12(5):569-79. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01454.
- RAUCH J, VOLINSKY N, ROMANO D, KOLCH W, 2011. The secret life of kinases: functions beyond catalysis. *Cell Commun Signal.* 9(1):23. doi: 10.1186/1478-811X-9-23.
- REININGER L, WILKES JM, BOURGADE H, MIRANDA-SAAVEDRA D, DOERIG C, 2011. An essential Aurora-related kinase transiently associates with spindle pole bodies during *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizogony. *Mol Microbiol.* 79(1):205-21. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07442.x.
- RODRÍGUEZ J, CRESPO P, 2011. Working without kinase activity: phosphotransfer-independent functions of extracellular signal-regulated kinases. *Sci Signal.* 4(196):re3. doi: 10.1126/scisignal.2002324.
- SAGONA AP, NEZIS IP, PEDERSEN NM, LIESTØL K, POULTON J, RUSTEN TE, SKOTHEIM RI, RAIBORG C, STENMARK H, 2010. PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat Cell Biol.* 12(4): 362-71. doi: 10.1038/ncb2036.
- SHAPIRO PS, VAISBERG E, HUNT AJ, TOLWINSKI NS, WHALEN AM, MCINTOSH JR, AHN NG, 1998. Activation of the MKK/ERK pathway during somatic cell mitosis: direct interactions of active ERK with kinetochores and regulation of the mitotic 3F3/2 phosphoantigen. *J cell Biol.* 142(6):1533-45.
- SILVIE O, SEMBLAT JP, FRANETICH JF, HANNOUN L, ELING W, MAZIER D, 2002. Effects of irradiation on *Plasmodium falciparum* sporozoite hepatic development: implications for the design of pre-erythrocytic malaria vaccines. *Parasite Immunology* 24:221-223.
- SINDEN RE, 1983. Sexual development of malarial parasites. *Adv Parasitol.* 22:153-216.
- SKOP AR, LIU H, YATES J 3rd, MEYER BJ, HEALD R, 2004. Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science.* 305(5680):61-6.

- SPRING M, MURPHY J, NIELSEN R, DOWLER M, BENNETT JW, ZARLING S, WILLIAMS J, DE LA VEGA P, WARE L, KOMISAR J, POLHEMUS M, RICHIE TL, EPSTEIN J, TAMMINGA C, CHUANG I, RICHIE N, O'NEIL M, HEPPNER DG, HEALER J, O'NEIL M, SMITHERS H, FINNEY OC, MIKOLAJCZAK SA, WANG R, COWMAN A, OCKENHOUSE C, KRZYCH U, KAPPE SH, 2013. First-in-human evaluation of genetically attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites administered by bite of Anopheles mosquitoes to adult volunteers. *Vaccine* 31(43):4975-83.
- STANWAY RR, MUELLER N, ZOBIAK B, GRAEWE S, FROEHLKE U, ZESSIN PJ, AEPFELBACHER M, HEUSSLER VT, 2011. Organell segregation into *Plasmodium* liver stage merozoites. *Cell Microbiol* 13: 1768-1782.
- STEIGEMANN P, GERLICH DW, 2009. Cytokinetic abscission: cellular dynamics at the midbody. *Trends Cell Biol.* 19(11):606-16. doi: 10.1016/j.tcb.2009.07.008.
- STURM A, AMINO R, VAN DE SAND C, REGEN T, RETZLAFF S, RENNENBERG A, KRUEGER A, POLLOK JM, MENARD R, HEUSSLER VT, 2006. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science.* 313(5791):1287-90.
- STURM A, HEUSSLER V, 2007. Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic *Plasmodium* parasites. *Med Microbiol Immunol.* 196(3):127-33.
- STURM A, GRAEWE S, FRANKE-FAYARD B, RETZLAFF S, BOLTE S, ROPPENSER B, AEPFELBACHER M, JANSE C, HEUSSLER V, 2009. Alteration of the parasite plasma membrane and the parasitophorous vacuole membrane during exo-erythrocytic development of malaria parasites. *Protist.* 160(1):51-63.
- TANOUE T, ADACHI M, MORIGUCHI T, NISHIDA E, 2000. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol.* 2(2):110-6.
- TA TANG TH, SALAS A, ALI-TAMMAM M, MARTINEZ MD, LANZA M, ARROYO E, RUBIO JM, 2010. First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia. *Malar J.* 9(1):219.
- TAVARES J, FORMAGLIO P, THIBERGE S, MORDELET E, VAN ROOIJEN N, MEDVINSKY A, MÉNARD R, AMINO R, 2013. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *J Exp Med.* 6;210(5):905-15
- TERRY LJ, SHOWS EB, WENTE SR, 2007. Crossing the nuclear envelope: Hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* 318: 1412–1416.
- TEWARI R, DORIN D, MOON R, DOERIG C AND BILLKER O, 2005. An atypical mitogen-activated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite. *Mol Microbiol* 58: 1253–1263.

- TEWARI R, STRASCHIL U, BATEMAN A, BÖHME U, CHEREVACH I, GONG P, PAIN A, BILLKER O, 2010. The systematic functional analysis of *Plasmodium* protein kinases identifies essential regulators of mosquito transmission. *Cell Host Microbe*. 8(4):377-87. doi: 10.1016/j.chom.2010.09.006.
- THE RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP, 2014. Efficacy and Safety of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine during 18 Months after Vaccination: A Phase 3 Randomized, Controlled Trial in Children and Young Infants at 11 African Sites. *PLoS Med*. 11(7): e1001685. doi:10.1371/journal.pmed.1001685
- TURJANSKI AG, VAQUÉ JP, GUTKIND JS, 2007. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*. 26(22):3240-53.
- TUTEJA R, ANSARI A, CHAUHAN VS, 2011. Emerging functions of transcription factors in malaria parasite. *J Biomed Biotechnol*. 2011:461979. doi: 10.1155/2011/461979.
- VAN DE SAND C, HORSTMANN S, SCHMIDT A, STURM A, BOLTE S, KRUEGER A, LÜTGEHETMANN M, POLLOK JM, LIBERT C, HEUSSLER VT, 2005. The liver stage of *Plasmodium berghei* inhibits host cell apoptosis. *Mol. Microbiol*. 58, 731–742.
- VAN SCHAIJK BC, PLOEMEN IH, ANNOURA T, VOS MW, FOQUET L, VAN GEMERT GJ, CHEVALLEY-MAUREL S, VAN DE VEGTE-BOLMER M, SAJID M, FRANETICH JF, LORTHOIS A, LEROUX-ROELS G, MEULEMAN P, HERMSEN CC, MAZIER D, HOFFMANN SL, JANSE CJ, KHAN SM, SAUERWEIN RW, 2014. A genetically attenuated malaria vaccine candidate based on *P. falciparum* b9/slarp gene-deficient sporozoites. *Elife* 3. doi: 10.7554/eLife.03582.
- VAUGHAN AM, MIKOLAJCZAK SA, WILSON EM, GROMPE M, KAUSHANSKY A, CAMARGO N, BIAL J, PLOSS A, KAPPE SH, 2012. Complete *Plasmodium falciparum* liver-stage development in liver-chimeric mice. *J Clin Invest*. 122(10):3618-28. doi: 10.1172/JCI62684.
- VINCKE IH, LIPS M, 1948. *Ann Soc Belg Med Trop (1920)*. 28(1):97-104.
- VON AHSEN O AND BOMER U, 2005. High-throughput screening for kinase inhibitors. *Chem biochem* 6: 481–490.
- 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.
- WEIS K, 2003. Regulating Access to the Genome. *Nucleocytoplasmic Transport throughout the Cell Cycle*. *Cell* 112: 441–451.
- WIDMANN C, GIBSON S, JARPE MB, JOHNSON GL, 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*. 79(1):143-80.

WIERK JK, LANGBEHN A, KAMPER M, RICHTER S, BURDA PC, HEUSSLER VT, DESCHERMEIER C, 2013. *Plasmodium berghei* MAPK1 displays differential and dynamic subcellular localizations during liver stage development. PLoS One. 8(3):e59755. doi: 10.1371/journal.pone.0059755.

WILLARD FS, CROUCH MF, 2001. MEK, ERK, and p90RSK are present on mitotic tubulin in Swiss 3T3 cells: a role for the MAP kinase pathway in regulating mitotic exit. Cell Signal. 13(9):653-64.

WISSE E, DE ZANGER RB, CHARELS K, VAN DER SMISSEN P & MCCUSKEY RS, 1985. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. Hepatology 5, 683–692.

WITNEY AA, DOOLAN DL, ANTHONY RM, WEISS WR, HOFFMAN SL, CARUCCI DJ, 2001. Determining liver stage parasite burden by real time quantitative PCR as a method for evaluating pre-erythrocytic malaria vaccine efficacy. Mol Biochem Parasitol. 118(2):233-45.

YAZICIOGLU MN, GOAD DL, RANGANATHAN A, WHITEHURST AW, GOLDSMITH EJ, COBB MH, 2007. Mutations in ERK2 binding sites affect nuclear entry. J Biol Chem 282:28759–28767.

YU H, CHEN JK, FENG S, DALGARNO DC, BRAUER AW, SCHREIBER SL, 1994. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. Cell. 76(5):933-45.

ZECEVIC M, CATLING AD, EBLEN ST, RENZI L, HITTLE JC, YEN TJ, GORBSKY GJ, WEBER MJ, 1998. Active MAP kinase in mitosis: localization at kinetochores and association with the motor protein CENP-E. J Cell Biol. 142(6):1547-58.

ZHANG Y, DONG C, 2007. Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. Cell Mol Life Sci. 64(21):2771-89.

## ANHANG

Tab. Anhang: qPCR-Rohdaten:

Wildtyp		Ct- Werte					
		18SrRNA		MAPK1		MAPK2	
		+RT	-RT	+RT	-RT	+RT	-RT
Set 1	24hpi	13,36	37,88	34,08	38,49	30,41	NEG
		13,41	35,51	33,82	39,13	29,73	35,14
		13,42	37,74	33,93	38,44	30,14	35,79
	30hpi	13,65	35,44	33,17	39,96	30,09	36,58
		13,72	35,61	33,66	NEG	30,48	37,36
		13,37	35,08	33,31	38,70	30,41	35,71
	48hpi	12,02	35,94	32,58	NEG	29,73	NEG
		12,05	38,00	32,78	NEG	29,60	NEG
		11,90	39,18	32,78	NEG	29,78	36,24
	54hpi	12,71	36,77	31,88	NEG	29,50	NEG
		12,46	34,65	32,65	NEG	29,41	NEG
		12,34	38,16	32,40	NEG	29,49	NEG
Set 2	24hpi	14,81	41,43	33,27	NEG	31,46	NEG
		14,86	38,97	32,63	NEG	30,99	NEG
		14,99	NEG	32,87	37,05	30,66	NEG
	30hpi	13,36	38,71	30,50	NEG	28,99	NEG
		13,31	36,15	30,91	NEG	29,09	NEG
		13,39	38,77	30,62	NEG	28,98	36,73
	48hpi	11,68	35,89	28,48	37,57	28,18	NEG
		11,60	36,16	28,62	38,87	28,10	37,31
		11,70	35,76	28,65	37,87	28,51	36,50
	54hpi	11,78	34,36	30,28	35,65	29,88	36,60
		11,74	34,34	30,28	36,60	29,74	34,50
		11,79	36,19	30,31	37,78	29,90	36,00
Set 3	24hpi	14,75	36,31	32,64	NEG	30,73	36,28
		14,86	36,42	32,85	NEG	31,08	35,76
		14,70	37,22	32,78	37,68	31,24	36,88
	30hpi	13,69	37,38	31,37	NEG	30,13	37,68
		13,85	NEG	32,15	NEG	30,34	NEG
		13,87	36,95	32,08	NEG	30,20	35,92
	48hpi	12,07	34,97	29,41	NEG	28,81	37,57
		11,85	35,47	29,30	38,92	28,92	36,20
		11,89	35,58	29,51	37,54	28,85	36,89
	54hpi	12,07	33,69	31,05	36,32	31,34	34,85
		12,09	33,74	31,39	38,63	31,20	34,94
		12,19	33,66	30,81	35,52	31,39	34,10
Set 4	24hpi	15,76	35,48	33,91	NEG	31,43	36,64
		15,27	37,29	33,86	38,06	30,90	37,58
		15,40	NEG	33,33	NEG	31,34	37,56
	30hpi	13,59	36,20	31,37	NEG	29,69	37,79
		13,46	36,31	32,10	NEG	29,64	NEG
		13,72	35,93	31,37	NEG	29,59	NEG
	48hpi	12,19	36,03	29,48	36,34	28,77	36,46
		12,01	35,68	29,95	NEG	29,22	NEG
		11,93	34,58	29,10	36,08	28,80	36,23
	54hpi	12,03	32,59	30,71	35,25	31,19	33,91
		11,65	32,28	30,50	34,73	30,56	32,97
		11,93	32,38	30,35	34,97	30,97	32,78

PbMAPK1-KO		Ct- Werte			
		18SrRNA		MAPK2	
		+RT	-RT	+RT	-RT
Set 1	24hpi	21,40	37,82	27,86	NEG
		21,36	NEG	27,56	35,48
		21,27	36,83	27,59	NEG
	30hpi	20,43	NEG	26,30	36,99
		20,78	38,57	26,50	NEG
		20,67	36,22	26,53	36,01
	48hpi	18,36	36,17	25,26	37,42
		18,47	34,91	24,98	36,14
		18,84	35,84	25,01	NEG
	54hpi	18,63	30,85	27,88	32,00
		18,39	30,95	28,22	32,04
		18,69	30,93	27,49	31,64
Set 2	24hpi	14,72	NEG	30,15	37,07
		14,52	37,49	29,97	37,63
		14,83	37,20	30,56	NEG
	30hpi	13,66	36,48	29,06	NEG
		13,70	36,71	29,02	37,81
		13,74	38,67	29,51	38,09
	48hpi	11,73	37,03	29,03	NEG
		11,72	37,02	28,93	37,01
		11,90	36,16	28,68	37,19
	54hpi	11,91	34,12	30,58	35,54
		11,93	33,39	30,71	36,57
		11,78	34,74	30,68	35,64
Set 3	24hpi	15,54	37,48	32,36	NEG
		15,57	36,89	31,68	37,77
		16,46	36,37	32,78	NEG
	30hpi	14,51	36,80	30,75	NEG
		14,33	36,29	30,75	37,70
		14,55	37,28	30,37	37,03
	48hpi	11,90	36,60	28,09	NEG
		12,01	36,12	27,87	36,99
		12,26	35,67	27,88	36,33
	54hpi	12,15	33,99	31,42	36,36
		12,15	34,12	31,06	35,15
		11,81	34,41	31,16	33,99
Set 4	24hpi	16,70	37,86	32,52	38,15
		16,35	38,16	32,87	38,20
		16,31	38,47	32,76	37,90
	30hpi	15,70	37,18	31,27	35,81
		15,76	37,09	31,19	35,76
		15,76	35,86	31,19	36,18
	48hpi	12,60	37,46	29,27	NEG
		12,72	NEG	29,56	NEG
		12,90	35,37	28,98	NEG
	54hpi	12,96	34,44	31,40	36,58
		12,93	36,33	31,48	36,98
		12,64	34,83	31,60	35,49

## **DANKSAGUNG**

Ich möchte mich zunächst bei Herrn Prof. Lüthen und Herrn Prof. Tannich für die bereitwillige Übernahme der Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Tannich bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe der Molekularen Parasitologie am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin anzufertigen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Christina Deschermeier, dass sie mir nach meiner Masterarbeit in der AG Heussler auch während meiner Doktorarbeit zur Seite stand.

Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Heussler und Dr. Rebecca Limenitakis an der Universität Bern bedanken, die mir stets bei Leberphase-spezifischen Fragen geholfen haben.

# ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe sowie dass die Arbeit von mir vorher nicht in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Jannika Brandt