

**Identifizierung neuer antiplasmodialer Wirkstoffe und
Validierung von *PfGSK3* als potentiellen
Medikamentenangriffspunkt gegen Malaria**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des
Doktors der Naturwissenschaften

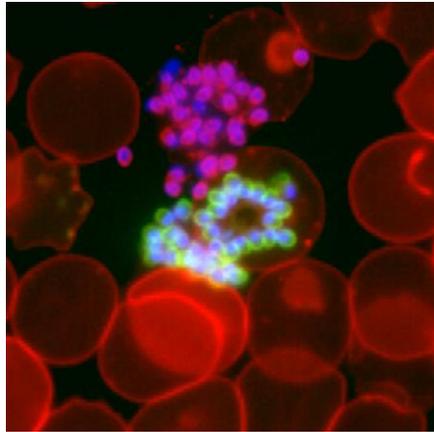
des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

angefertigt am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM) und dem
Zentrum für Strukturelle Systembiologie (CSSB) Hamburg

vorgelegt von

Arne Alder

Hamburg 2020



Meiner Familie

Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Tim-Wolf Gilberger

Dr. Tobias Spielmann

Tag der Disputation: 07.08.2020

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Arne Alder

Hamburg, 08.06.2020

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	13
1. Einleitung.....	15
1.1 Malaria.....	15
1.1.1 Geschichte und Überblick	15
1.1.2 Epidemiologie	16
1.1.3 Klinischer Verlauf der Malaria	19
1.1.4 Diagnostik	21
1.1.5 Medikamentöse Therapie und Resistenzentwicklung.....	22
1.1.6 Impfstoffentwicklung.....	28
1.1.7 weitere Präventionsstrategien	30
1.2 Biologie des Erregers <i>Plasmodium falciparum</i>	32
1.2.1 Systematik.....	32
1.2.2 Lebenszyklus	33
1.2.2.1 Überblick.....	33
1.2.2.2 Asexuelle Leberstadien.....	35
1.2.2.3 Invasion von Erythrozyten	36
1.2.2.4 Asexuelle Blutstadien	42
1.2.2.5 Gametozyten	46
1.2.2.6 Sexuelle Stadien in der Mücke	47
1.2.3 Protein-Phosphorylierung als physiologischer Regulator.....	50
1.2.4 Phosphorylierung von <i>PfAMA1</i>	51
1.2.5 Das Kinom	51
1.2.6 <i>PfGSK3</i> als potentieller Medikamentenangriffspunkt.....	56
1.2.7 Identifizierung neuer antiplasmodialer Wirkstoffe	61
1.2.8 Kinase-Inhibitoren als antiplasmodiale Wirkstoffe	63
1.3 Zielsetzung der Arbeit	66
2. Material & Methoden	67
2.1 Material	67
2.1.1 Chemikalien & Reagenzien	67
2.1.2 Reinstwasser	69
2.1.3 Kulturmedien	69
2.1.4 Puffer & Lösungen	70

2.1.5 Antibiotika.....	75
2.1.6 Antikörper & Seren	75
2.1.7 Enzyme & Peptide.....	76
2.1.8 PfgSK3-Inhibitoren	78
2.1.9 DNA-und Proteinstandards.....	78
2.1.10 Synthetische Gene und Oligonukleotide	78
2.1.11 Plasmide.....	80
2.1.12 Reaktionskits und Fertigversuchsansätze.....	83
2.1.13 Organismen & Zelllinien.....	83
2.1.14 Geräte	84
2.1.15 Verbrauchsmaterialien & Glaswaren.....	87
2.1.16 Software & Online-Hilfsprogramme	88
2.1.17 Datenbanken.....	89
2.2 Methoden	90
2.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	90
2.2.1.1 Sterilisation von Lösungen und Materialien.....	90
2.2.1.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	90
2.2.1.3 Kultivierung von <i>E. coli</i>	90
2.2.1.4 Herstellung und Auftauen von <i>E. coli</i> Cryostabilaten.....	91
2.2.1.5 Hitzeschocktransformation kompetenter <i>E. coli</i>	91
2.2.1.6 Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	91
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	92
2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	92
2.2.2.2 Mutagenese mittels Overlap-Extension PCR.....	93
2.2.3.3 Integrations- und Exzisions-PCR	94
2.2.2.4 Agarosegelelektrophorese	94
2.2.2.5 Restriktionsverdau.....	95
2.2.2.6 Dephosphorylierung restringierter Plasmid-DNA	95
2.2.2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA	96
2.2.2.8 Ligation von PCR-Produkt und Vektor	96
2.2.2.9 Ligationsunabhängige Klonierung	97
2.2.2.10 Kolonie Screen PCR.....	97
2.2.2.11 Plasmid isolation aus <i>E. coli</i> -Kulturen.....	98
2.2.2.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA	98
2.2.2.13 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA & Proteinen.....	99
2.2.2.14 DNA-Fällung mit Natriumacetat	99

2.2.2.15 Isolation genomischer DNA aus <i>Plasmodium falciparum</i>	99
2.2.2.16 RNA-Isolierung aus <i>Plasmodium falciparum</i>	99
2.2.2.17 Reverse Transkription.....	100
2.2.2.18 Quantitative <i>Real Time</i> PCR (qRT-PCR).....	101
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	102
2.2.3.1 Affinitätschromatographie mit Glutathion Sepharose.....	102
2.2.3.2 Verdau von GST-Fusionsproteinen mit 3C-Protease.....	102
2.2.3.3 Dialyse.....	102
2.2.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	103
2.2.3.5 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue	104
2.2.3.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen im Westernblot	104
2.2.3.7 Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA Analyse	105
2.2.3.8 KinaseGlo Plus Assay	105
2.2.4 Zellbiologische Methoden.....	107
2.2.4.1 Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i>	107
2.2.4.2 Giemsa-Färbung von Blutaussstrichen	107
2.2.4.3 Herstellung und Auftauen von <i>Plasmodium</i> -Cryostabilaten.....	107
2.2.4.4 Isolation von Parasiten durch begrenzte Saponin-Lyse	108
2.2.4.5 Isolation von <i>P. falciparum</i> Schizonten mit Percoll.....	108
2.2.4.6 Synchronisation von <i>P. falciparum</i> Kulturen mit Sorbitol	108
2.2.4.7 Synchronisation von <i>P. falciparum</i> Kulturen mittels Reinvasion	109
2.2.4.8 Transfektion von <i>P. falciparum</i> durch Elektroporation.....	109
2.2.4.9 Immunfluoreszenzassay (IFA) transgener Parasiten	109
2.2.4.10 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	111
2.2.4.11 Durchflusszytometrie	111
2.2.4.12 Proliferationsassay mit <i>Plasmodium falciparum</i>	112
2.2.4.13 Kultivierung von HEK293T-Zellen	113
2.2.4.14 Passagieren von HEK293T-Zellen	113
2.2.4.15 Bestimmung der Zellzahl in HEK293T-Kulturen.....	113
2.2.4.16 Herstellung und Auftauen von HEK293T-Zell-Cryostabilaten	114
2.2.4.17 HEK-Zell-Viabilitätsassay.....	114
2.2.5 Bioinformatische Methoden	115
2.2.5.1 Alignment von DNA- und Aminosäuresequenzen	115
2.2.5.2 Recodonisierung von DNA-Sequenzen.....	115
3. Ergebnisse	116
3.1 Charakterisierung von rekombinanter PfGSK3β.....	116

3.1.1 Expression und Aufreinigung von rPfGSK3β	116
3.1.2 Biophysikalische Charakterisierung von rPfGSK3β	117
3.1.3 In Vitro Kinase-Aktivitätsbestimmung: Etablierung von KinaseGlo Plus	118
3.1.4 Reaktionskinetik von rPfGSK3β.....	123
3.2 Charakterisierung von PfGSK3β mittels spezifischer Kinase-Inhibitoren	126
3.2.1 Identifizierung PfGSK3β-spezifischer Inhibitoren	126
3.2.2 Antiplasmodiale Aktivität PfGSK3β-inhibierender Verbindungen.....	132
3.2.3 Zusammengefasste Inhibitionswerte	138
3.3 Charakterisierung von PfGSK3β in P. falciparum	139
3.3.1 Targeted Gene Disruption von PfGSK3β.....	139
3.3.2 Knock-down von PfGSK3β durch DNA-Exzision mittels CreLoxP ^{int}	149
3.3.3 Knock-down von PfGSK3β durch mRNA-Destabilisierung mittels Ribozym	153
3.3.4 Knock sideways von PfGSK3β	156
3.4 Charakterisierung von PfGSK3α	159
3.4.1 Expression und Konservierung von GSK3α in Plasmodium falciparum	159
3.4.2 Expression und Aufreinigung rekombinanter PfGSK3α.....	159
3.4.3 Episomale Überexpression von PfGSK3α in P. falciparum zur Lokalisation	159
3.5 Charakterisierung weiterer potentiell antiplasmodialer Verbindungen	162
3.6 Identifizierung eines antimalarialen Naturstoffs aus Streptomyces sp. 4114	167
4. Diskussion.....	174
4.1 Kinase-Inhibitoren und ihre Anwendung	174
4.2 Glykogen-Synthase-Kinase 3 Inhibitoren als vielseitiges Therapeutikum.....	175
4.3 Charakterisierung der rekombinanten PfGSK3β	176
4.4 Identifizierung spezifischer PfGSK3β-Inhibitoren.....	180
4.5 Physiologische Untersuchung von PfGSK3β mithilfe von Reverse Genetics	184
4.6 PF3D7_1316000 als potentielle PfGSK3α.....	189
4.7 Identifizierung weiterer synthetischer antiplasmodialer Verbindungen	190
4.8 Verbindung PDE-I ₂ aus Streptomyces sp.	191
5. Anhang	196
Literaturverzeichnis	218
Publikationen	259
Danksagung	260

Zusammenfassung

Mit über 228 Mio. Infektionen im Jahr 2018, von denen ca. 405 000 tödlich verliefen, ist Malaria eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten der Welt. Verursacht wird die Erkrankung durch Protozoen der Gattung *Plasmodium*, deren asexuelle Vermehrung in den roten Blutzellen für sämtliche klinischen Symptome der Malaria verantwortlich ist. Durch die globale Verbreitung von Multi-Drug-resistenten Parasiten und die Abwesenheit eines effektiven Impfstoffes stellt Malaria nach wie vor eine ernste Bedrohung der globalen Gesundheit dar, weshalb dringend neue antiplasmodiale Wirkstoffe benötigt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Validierung neuer antiplasmodialer Verbindungen sowie die Charakterisierung der plasmodialen Glykogen Synthase Kinase 3 (*PfGSK3*) als potentiell antiplasmodiales Drug Target, wobei diese Kinase eine wichtige Rolle bei der Regulation der Erythrozyteninvasion spielt.

Die Invasion von Erythrozyten stellt einen essentiellen Schritt während des parasitären Replikationszyklus dar und wird durch ein Zusammenspiel von hunderten Proteinen vermittelt. Hierbei spielen vor allem Oberflächenproteine eine wichtige Rolle, die durch eine Rezeptor-Liganden-Interaktion eine Bindung an die Wirtszelle ermöglichen. Somit stellt die Wirtszellinvasion einen geeigneten Interventionspunkt für die experimentelle Medikamentenentwicklung dar. Da der Parasit während der Invasion von Erythrozyten für eine kurze Zeit zugänglich für Antikörper des humanen Immunsystems ist, weisen viele der Invasions-beteiligten Proteine einen ausgeprägten Sequenzpolymorphismus auf, der dem Parasiten in der menschlichen Population das Überleben sichert. Eine Möglichkeit, diesen Immunevasionsmechanismus des Parasiten experimentell zu umgehen, stellt sich dar, wenn nicht die Rezeptor-Liganden Interaktion als konzeptioneller Angriffspunkt definiert wird, sondern die ihr zugrunde liegenden Regulationsmechanismen wie zum Beispiel die Phosphorylierung und Dephosphorylierung. Ein Beispiel hierfür ist der essentielle Invasionsligand AMA-1 (Apikales Membran Antigen 1), der mithilfe einer Phosphorylierungskaskade in seiner Aktivität reguliert wird. Hierbei sind mindestens zwei Kinasen beteiligt, namentlich Protein Kinase A und die Glykogen Synthase Kinase 3. Somit stellen auch Kinasen vielversprechende Drug Targets für neue antiplasmodiale Verbindungen dar.

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Thieno[2,3-b]pyridin-Verbindungen als *PfGSK3*-spezifische Inhibitoren identifiziert werden, die eine IC_{50} zwischen 0,26 und 4,53 μM gegen rekombinante *PfGSK3* und 0,6 und 9,4 μM gegen *P. falciparum* Parasiten aufweisen. Diese spezifischen Inhibitoren wurden in Kombination mit *Reverse Genetics* Strategien genutzt, um *PfGSK3* genauer als antiplasmodiales Target zu validieren. Sowohl die Inhibitoren-basierten Ergebnisse als auch die genetischen Experimente unterstreichen die wichtige Rolle von *PfGSK3* bei der Invasion von Erythrozyten durch den Parasiten.

Als Weiterentwicklung der *Pf*GSK3-inhibierenden Thieno[2,3-*b*]pyridin-Verbindungen wurden zudem Thieno[2,3-*b*]pyridine-2-carboxamide als potentielle antiplasmodiale Verbindungen validiert. Die untersuchten Verbindungen zeichnen sich durch eine antiplasmodiale Aktivität im nanomolaren Konzentrationsbereich und eine über 100-fache Selektivität gegenüber humanen Zellen aus. Der Wirkmechanismus wird hierbei jedoch trotz strukturell starker Ähnlichkeit zu den Thieno[2,3-*b*]pyridin-Verbindungen nicht durch eine Hemmung der *Pf*GSK3 vermittelt.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuer Naturstoff, PDE-I₂ aus *Streptomyces sp.* als neuer antiplasmodialer Wirkstoff validiert. Dieser wurde mithilfe eines phänotypischen Screens der *Wright Actinomycete Collection* (WAC) identifiziert und durch mehrstufige Fraktionierungsansätze rein dargestellt. PDE-I₂ stellt das Produkt einer unvollständigen Duocarmycin-Synthese in *Streptomyces sp.* dar. PDE-I₂ zeichnet sich durch eine antiplasmodiale Aktivität im unteren nanomolaren Bereich (IC₅₀: 30,9 nM) und eine 1100-fache Selektivität gegenüber humanen Zellen aus. Die Aktivität von PDE-I₂ wird wie bei verwandten Verbindungen der Duocarmycin-Familie vermutlich durch Interaktion mit AT-reichen Regionen der genomischen DNA vermittelt.

Summary

With over 228 million infections in 2018, of which about 405,000 were fatal, malaria is one of the most important infectious diseases in the world. The disease is caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*, whose asexual reproduction within red blood cells is responsible for all clinical symptoms of malaria. Due to the global spread of multi-drug resistant parasites and the lack of an effective vaccine, malaria continues to pose a serious threat to global health, highlighting that new antiplasmodial agents are urgently needed.

The aim of the present work was to identify and validate new antiplasmodial compounds as well as to characterize the plasmodial glycogen synthase kinase 3 (*PfGSK3*) as a potential antiplasmodial drug target. This kinase plays an important role in the regulation of erythrocyte invasion.

The invasion of erythrocytes is an essential step during the parasitic replication cycle and is mediated by the interaction of hundreds of proteins. Parasite surface proteins play a particularly important role in this process, enabling binding to the host cell membrane through receptor-ligand interactions. Thus, host cell invasion represents a suitable intervention point for experimental drug development. Since the parasite is accessible to antibodies of the human immune system for a short period of time during the invasion of erythrocytes, many of the invading proteins exhibit a distinct sequence polymorphism that ensures the survival of the parasite in the human population. For drug development, instead of targeting the receptor-ligand interaction itself, one way to experimentally circumvent the immune evasion mechanism of the parasite is to target the underlying regulatory mechanisms such as phosphorylation and dephosphorylation. An example of this is the essential invasion ligand AMA-1 (Apical Membrane Antigen 1), whose activity is regulated by a phosphorylation cascade. At least two kinases are involved, namely protein kinase A and *PfGSK3*, making kinases promising targets for new antiplasmodial compounds.

In the present work new thieno[2,3-b]pyridine compounds were identified as *PfGSK3*-specific inhibitors. All new compounds had IC_{50} values between 0.26 and 4.53 μ M against recombinant *PfGSK3* and 0.6 and 9.4 μ M against *P. falciparum* parasites. These specific inhibitors were used in combination with reverse genetics strategies to further validate *PfGSK3* as an antiplasmodial target. Both the inhibitor-based results and the genetic experiments emphasise the important role of *PfGSK3* in the invasion of erythrocytes by the parasite.

As a further development of the *PfGSK3*-inhibiting thieno[2,3-b]pyridine compounds, thieno[2,3-b]pyridine-2-carboxamides were also validated as potential antiplasmodial agents. The investigated compounds are characterized by an antiplasmodial activity in the nanomolar concentration range and a more than 100-fold selectivity towards human cells. However, the

antiplasmodial effect is not mediated by an inhibition of *PfGSK3* despite the strong structural similarity to the thieno[2,3-b]pyridine compounds.

In addition, a new natural compound, PDE-I₂, from *Streptomyces spp.* was validated as a new antiplasmodial agent in the present study. This compound was identified using a phenotypic screen of the *Wright Actinomycete Collection* (WAC) and was purified by multi-step fractionation approaches. PDE-I₂ represents the product of an incomplete duocarmycin synthesis in *Streptomyces spp.* PDE-I₂ is characterized by an antiplasmodial activity in the lower nanomolar range (IC₅₀: 30.9 nM) and a 1100-fold selectivity towards human cells. The activity of PDE-I₂ is likely mediated by interactions with AT-rich regions of genomic DNA, as it was shown for related compounds of the duocarmycin family.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
∞	unendlich
°C	Grad Celsius
α	griechisch: alpha, anti
μ	mikro
A	Adenin, Alanin, Ampère
Abb	Abbildung
ACT	Artemisinin basierte Kombinationstherapie
ad	auffüllen bis
AE1	Anionen-Austauscher 1 (<i>Anion Exchanger 1</i>)
AL	Artemether-Lumefantrin
AMA1	Apikales Membran Antigen 1
AMP	Ampicillin, Adenosinmonophosphat
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen
An	<i>Anopheles</i>
AP2μ	<i>Adaptor Protein 2</i>
AP2-G	<i>Apetala 2 G</i>
APH	<i>Acylated Pleckstrin-Homology Domain-containing Protein</i>
aPK	Atypische Proteinkinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQ	Amodiaquin
ARK	Aurora-Kinase
ARO	<i>Armaddillo Repeats Only Protein</i>
AS	Artesunat
ATP	Adenosintriphosphat
ATP4	ATPase 4
A _x	Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von x nm
b	Basen
BCA	Bicinchoninsäure
BGC	<i>Biosynthetic Gene Cluster</i>
BIN2	<i>Brassinosteroid Insensitive 2</i>
BioID	<i>Biotin Identification</i>
BIP	Bindendes Immunglobulinprotein
BNITM	Bernhard Nocht-Institut für Tropenmedizin
Bodipy	N-(4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Pentanoyl) Sphingosine
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Albumin aus Rinderserum (<i>bovine serum albumin</i>)
BSD	Blasticidin S
bzw	beziehungsweise
c	centi
ca	circa
CamK	<i>Calcium/Calmodulin-dependent Kinases</i>

Abkürzungsverzeichnis

cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CDC20	<i>Cell Division Cycle Protein 20</i>
CdGAP	<i>Cell division cycle 42 GTPase Activating Protein</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent Kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDPK	Calcium-abhängige Proteinkinase
CDPK1	<i>Calcium Dependent Protein Kinase 1</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Chloramp	Chloramphenicol
CIP	<i>Calf Intestinal Phosphatase</i>
CK	Casein Kinase
CLK	<i>CDK-like Kinase</i>
ConA	Concanavalin A
COVID 19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
CPR	Cytochrom-P450-NADPH-Oxidoreduktase
CQ	Chloroquin
CR1	<i>Complement Receptor 1</i>
CRT	<i>Chloroquine Resistance Transporter</i>
CSP	<i>Circumsporozoite Protein</i>
CSSB	<i>Centre for Structural Systems Biology</i>
CTRL	Kontrolle
CYC	Cycloguanil
CYP2D6	Cytochrom P450 2D6
CyRPA	<i>Cysteine-Rich Protective Antigen</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBL	<i>Duffy Binding-like</i>
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DDU	<i>Drug Discovery Unit</i>
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DHA	Dihydroartemisinin
DHE	Dihydroethidium
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DHODH	<i>Dihydroorotate Dehydrogenase</i>
DHPS	Dihydropteroat-Synthase
DiCre	Dimerisierte Cre-Rekombinase
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOXP	1-Deoxy-D-xylose-5-phosphat
DSM1	<i>Malaria Parasite Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitor</i>

Abkürzungsverzeichnis

DTT	Dithiothreitol
DYRK	<i>Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBA	<i>Erythrocyte-binding Antigen</i>
EBL	<i>Erythrocyte-binding Ligands</i>
ECP1	<i>Egress Cysteine Protease 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor-like</i>
eIF2b	eukaryontischer Translations-Initiationsfaktor 2B
EM	Elektronenmikroskopie
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EMP1	<i>Erythrocyte Membrane Protein 1</i>
EPAC	<i>Exchange Protein Activated by cAMP</i>
ePK	eukaryontische Proteinkinase
Eps15	<i>Epidermal Growth Factor Receptor Substrate 15</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
et al.	und andere (et alii)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EXP	<i>Exported Protein</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
FACT	<i>Facilitates Chromatin Transcription</i>
FIKK	Phe-Ile-Lys-Lys
FKBP	<i>FK506-binding Protein</i>
FPKM	<i>Frame per Kilobase Million</i>
FRB	<i>FKBP-Rapamycin-binding Domain</i>
fwd	forward
g	Gramm
GAC	<i>Glideosom-Associated Connector</i>
GAP45	<i>Glideosom-associated Protein 45</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCS1	<i>Generative Cell Specific 1</i>
gDNA	genomische DNA
GDV1	<i>Gametocyte Development Protein 1</i>
GEST	<i>Gamete Egress & Sporozoite Traversal</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
ggf	gegebenenfalls
Glc	Glucosamin
glmS	Glutamin-Fructose-6-Phosphat Aminotransferase
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GS-1	Glykogen Synthase 1
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
Gyr	Gyrase, Glycin-Tyrosin-Arginin

Abkürzungsverzeichnis

h	Stunden
H3K9me3	Trimethylierung von Lys9 in Histon 3
HA	Hämagglutinin
hACBP	humanes Acyl-CoA-Bindenden-Proteins
Hda2	Histondeacetylase 2
hDHFR	humane Dihydrofolatreduktase
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HP1	Heterochromatin Protein 1
hpi	Stunden nach der Infektion (<i>hours post infection</i>)
HR	Homologie Region
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>), His-reiches Protein
HRV-3C	3C-Protease des Humanen Rhinovirus
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
ICAM-1	<i>Intracellular Adhesion Molecule 1</i>
IC _x	Inhibitorische Konzentration (bei der X% inhibiert werden)
IFA	Immunfluoreszenzassay
IMC	Innerer Membran Komplex (<i>inner membrane complex</i>)
<i>in vitro</i>	außerhalb eines Organismus
In vivo	Im Lebendigen Organismus
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IPTi	<i>Intermittent Preventive Treatment in Infants</i>
IPTp	<i>Intermittent Preventive Treatment in Pregnancy</i>
IRS	<i>Indoor Residual Spraying</i>
ITN	<i>Insecticide-treated Bed Nets</i>
k	kilo
KAHRP	<i>Knob-Associated-Histidine-Rich-Protein</i>
K _{cat}	Wechselzahl (umgesetzte Substratmoleküle pro Enzymmolekül pro Sekunde)
K _m	Michealis-Menten-Konstante
L	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LCCL	<i>Limulus Coagulation factor C-Like</i>
LIC	Ligationsunabhängige Klonierung (<i>ligation independent cloning</i>)
LSM	<i>Larval Source Management</i>
LysoPC	Lysophosphatidylcholine
m	Milli, Meter
M	Molar
MAEBL	<i>Membrane Antigen/Erythrocyte binding-like Protein</i>
MAOP	<i>Membrane-Attack Ookinete Protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MDR1	<i>Multidrug Resistance Protein 1</i>
MDV-1	<i>Male Development-1</i>
MEFQ	Mefloquin

Abkürzungsverzeichnis

MeOH	Methanol
MFS	<i>Malaria Freezing Solution</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
min	Minute
Mio	Million
MLC1	<i>Myosin Light Chain 1</i>
MMV	<i>Medicines for Malaria Venture</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPL	3-O-desacyl-4'-monophosphoryl-lipid A
M _r	relative Molekülmasse
MRP	<i>Multidrug Resistance Associated Protein</i>
MSP	<i>Merozoite Surface Protein</i>
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
MTS	<i>Malaria Thawing Solution</i>
n	nano
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NEK	<i>NIMA-related Kinase</i>
NIMA	<i>Never in Mitosis Gene A</i>
NLS	N-Laurylsarcosyl, <i>Nuclear Localization Signal</i>
nmd3	<i>Nonsense-mediated mRNA Decay Protein 3</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OD	Optische Dichte
OE	<i>Overlap-Extension</i>
OPK	<i>Other Protein Kinase</i>
ORF	Offener Leserahmen (<i>Open Reading Frame</i>)
ORI	<i>Origin of Replication</i>
ORP	<i>Oocyste Rupture Protein</i>
p	pico
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PABA	p-Aminobenzoessäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAldo	parasitäre Aldolase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS-Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDE	Phosphodiesterase
PDE-I	Phosphodiesterase-Inhibitor
PEG3	<i>Protein of Early Gametocyte 3</i>
PEXEL	<i>Plasmodium Export Element</i>
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PFA	Paraformaldehyd
PH	<i>Pleckstrin Homology</i>
pH	Potentia Hydrogenii
PheRS	Phenylalanin tRNA Synthetase

Abkürzungsverzeichnis

PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PI4K	Phosphatidylinositol-4-Kinase
PIKK	<i>Phosphatidylinositol 3' Kinase-related Kinases</i>
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
pLDH	parasitäre Lactat Dehydrogenase
PLP1	<i>Perforin-Like Protein 1</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNEP	<i>PEXEL Negative Exported Proteins</i>
PPLP2	<i>Plasmodium Perforin-Like Protein 2</i>
PPM	Parasitäre Plasmamembran
PPM2	<i>Protein Phosphatase Methyltransferase 2</i>
PPQ	Piperaquin
PROSC	<i>Plasmodium Reactive Oxidative Stress Complex</i>
PTEX	<i>Plasmodium Translocon of Exported Proteins</i>
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
PYR	Pyrimethamin
QN	Chinin (<i>Quinine</i>)
qRT-PCR	<i>quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
QS-21	<i>Quillaria Saponaria-21</i>
R	<i>rectus</i> (rechts, mit dem Uhrzeigersinn)
r	ribosomal
RALP	<i>Rhoptry-Associated-Leucin-Zipper</i>
RBC	<i>Red Blood Cell</i>
RBM	<i>Roll Back Malaria</i>
RDT	<i>Rapid Diagnostic Tests</i>
rev	<i>reverse</i>
Rh	<i>Reticulocyte-binding-like Protein Homologue</i>
RIO	<i>Right Open Reading Frame</i>
Ripr	<i>Rh5-interacting Protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-Kinase
ROM	Rhomboid Protease
RON	<i>Rhoptry Neck Protein</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rounds per Minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rSAM	Radikal S-Adenosyl-L-Methionin
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkription, <i>Real Time</i>
RTS,S	Repeat -Region und T -Zell-Epitop von CSP als Fusion mit dem HBV Surface Antigen
S	<i>sinister</i> (links, gegen den Uhrzeigersinn)
s.o.	Siehe oben

Abkürzungsverzeichnis

SAM	<i>Sterile Alpha Motif</i>
SAS-6	<i>Spindle Assembly Abnormal Protein</i>
Scr	von <i>Sarcoma</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDX	Sulfadoxin
sec	Sekunde
SERA	<i>Serine Repeat Antigen</i>
SGP	Sammelgelpuffer
SIAP-1	<i>Sporozoite Invasion-Associated Protein-1</i>
SLI	<i>Selection Linked Integration</i>
SMC	<i>Seasonal Malaria Chemoprevention</i>
SNARE	<i>N-ethylmaleimide-sensitive-Factor Attachment Receptor</i>
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
sog	so genannt
SP	Sulfadoxin-Pyrimethamin, Signalpeptid
sp, spp	<i>Species, Species Pluralis</i>
SPECT	<i>Sporozoite Protein Essential For Cell Traversal</i>
SPZ	Sporozoit
SR-B1	<i>Scavenger Receptor B1</i>
STE Kinasen	<i>Sterile Serin/Threonin Kinases</i>
SUB	<i>Subtilisin-like Proteases</i>
Tab	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAR	<i>Transformation-associated recombination</i>
TBF	<i>Transformation Buffer</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris-buffered Saline</i>)
TCAMS	<i>Tres Cantos Antimalarial Compound Set</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylenethyldiamin
TGP	Trenngelpuffer
TKL	<i>Tyrosine Kinase-like</i>
TRAP	<i>Thrombospondin-Related Anonymous Protein</i>
TRiC	<i>T-Complex Protein 1 Ring Complex</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethyl
Triton-X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether
tRNA	Transfer RNA
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
TXR	<i>Texas Red</i>
TyrK	Tyrosinkinase
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit), Uracil
UBP1	<i>Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase 1</i>
üN	über Nacht
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
uRBCs	<i>uninfected Red Blood Cells</i>

Abkürzungsverzeichnis

UV	ultraviolett
V	Volt
vgl	vergleiche
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Vol	Volumen
VPS45	<i>Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 45</i>
WAC	<i>Wright Actinomycete Collection</i>
WB	Westernblot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wnt	aus <i>Wingless</i> und <i>Int-1</i>
WR99210	1,6-Dihydro-6,6-dimethyl-1-[3-(2,4,5-trichlorophenoxy)propoxy]-1,3,5-triazine-2,4-diamine
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
y	<i>Yeast</i> (Hefe)

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Asparaginsäure	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glutaminsäure	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin			

DNA Basen

A	Adenin
T	Thymin
G	Guanin
C	Cytosin

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.1.1	Weltweite Verteilung von Malariafällen	17
Abb.1.2	Malariaprävalenz in Afrika zwischen 2000 und 2015	18
Abb.1.3	Entwicklung der weltweiten Malaria-Fallzahlen zwischen 2010 und 2018	18
Abb.1.4	<i>Lebenszyklus von Plasmodium falciparum</i>	34
Abb.1.5	Asexuelle Leberstadien	36
Abb.1.6	Schematische Darstellung des Merozoiten	37
Abb.1.7	Invasion von Erythrozyten	38
Abb.1.8	Das Glideosom	41
Abb.1.9	Asexuelle Blutstadien	44
Abb.1.10	Egress des Schizonten	45
Abb.1.11	Gametozyten	47
Abb.1.12	Asexuelle Vermehrung von <i>P. falciparum</i> in der Mücke	50
Abb.1.13	Proteinkinasen in <i>P. falciparum</i>	52
Abb.1.14	Strukturmodell der humanen GSK3 β	59
Abb.1.15	Expression der GSK3-Isoformen in <i>P. falciparum</i>	60
Abb.2.1	Plasmidkarten SLI-basierter Konstrukte	80
Abb.2.2	Plasmidkarte pOPIN J	81
Abb.2.3	Plasmidkarte CRT-DiCre-BSD	81
Abb.2.4	Plasmidkarte pARL AMA1	81
Abb.2.5	Plasmidkarte Zellkern-Mislocalizer	82
Abb.2.6	Plasmidkarte PPM-Mislocalizer	82
Abb.2.7	Plasmidkarte nmd3-GOI-mCherry	82
Abb.2.8	Plasmidkarte nmd3-SP-mScarlet	82
Abb.3.1	Aufreinigung von <i>rPfGSK3β</i> nach Expression in <i>E. coli</i> C41	116
Abb.3.2	Lineare Abhängigkeit zwischen Lumineszenz-Signal und ATP-Konzentration	119
Abb.3.3	Signal-Stabilität von Glow-Lumineszenz	120
Abb.3.4	Optimale Substratkonzentration für eine Kinasereaktion mit <i>rPfGSK3</i>	121
Abb.3.5	Optimale Kinasemenge für eine Kinasereaktion mit <i>rPfGSK3β</i>	122
Abb.3.6	Michaelis-Menten-Reaktionskinetik von <i>rPfGSK3β</i>	123
Abb.3.7	Autophosphorylierung von <i>rPfGSK3β</i>	124
Abb.3.8	Kinaseaktivität von <i>rPfGSK3β</i> -Phosphovarianten	126
Abb.3.9	Orientierung von 5v in der ATP-Bindetasche der modellierten <i>PfGSK3β</i>	127
Abb.3.10	Identifizierung <i>PfGSK3β</i> -inhibierender Verbindungen mittels KinaseGlo Plus	128
Abb.3.11	Analyse der <i>Plasmodium</i> -Spezifität von rGSK3 β -Inhibitoren	130
Abb.3.12	Stereoisomer-abhängige Aktivität der Verbindung KuMas065	131
Abb.3.13	Antiplasmodiale Aktivität von KuBra-, KuMas- und KuHL-Verbindungen	132
Abb.3.14	Ermittlung <i>Pf3D7</i> -spezifischer IC ₅₀ -Werte potentieller <i>PfGSK3β</i> -Inhibitoren	133
Abb.3.15	Stadien-spezifische Aktivität von <i>PfGSK3β</i> -Inhibitoren gegenüber <i>Pf3D7</i>	135
Abb.3.16	Inhibierung von Egress und Wirtszellinvasion durch <i>PfGSK3β</i> -Inhibitoren	136
Abb.3.17	Zytotoxizität von KuBra-, KuMas- und KuHL-Verbindungen	137
Abb.3.18	<i>Targeted Gene Disruption</i> Strategie mittels <i>Selection Linked Integration</i>	139
Abb.3.19	Wachstumsdefekt nach <i>Targeted Gene Disruption</i> von <i>pfgsk3β</i>	140
Abb.3.20	Lokalisation von <i>PfGSK3β</i> -TGD im Vergleich zu <i>PfGSK3β</i> -WT in <i>P. falciparum</i>	141

Abb.3.21	Expression der <i>PfGSK3β</i> -TGD-GFP-Fusion und Wachstumsdefekt	142
Abb.3.22	Stadien-spezifische Phänotypisierung von <i>PfGSK3β</i> -TGD-Parasiten.....	143
Abb.3.23	Charakterisierung des Wachstumsdefekts von <i>PfGSK3β</i> -TGD	144
Abb.3.24	Translokation von <i>PfAMA1</i> in <i>PfGSK3β</i> -TGD-Parasiten	145
Abb.3.25	Komplementierung von <i>PfGSK3β</i> -TGD mit WT- <i>PfGSK3</i>	147
Abb.3.26	qPCR-Analyse der Genexpression von <i>PfGSK3</i> -Isoformen in <i>PfGSK3β</i> -TGD	148
Abb.3.27	Endogenes Tagging von <i>PfGSK3β</i> für CreLox ^{Pint} -vermittelten Knock-down	150
Abb.3.28	Phänotypisierung von <i>PfGSK3β</i> -Lox ^{Pint} nach DiCre-vermitteltem Knock-down	152
Abb.3.29	Endogenes Tagging von <i>pfgskβ</i> mit GFP und glmS Ribozym mittels SLI	153
Abb.3.30	Phänotypisierung von <i>PfGSK3β</i> -glmS nach glmS-vermitteltem Knock-down.....	154
Abb.3.31	Endogenes Tagging von <i>pfgskβ</i> mit 2xFKBP-GFP-2xFKBP mittels SLI.....	156
Abb.3.32	Phänotypisierung von <i>PfGSK3β</i> mittels <i>Knock Sideways</i>	158
Abb.3.33	Fluoreszenzmikroskopie von <i>PfGSK3α</i> -mCherry mit nmd3-Promotor	160
Abb.3.34	Fluoreszenzmikroskopie von <i>PfGSK3α</i> -GFP mit AMA1-Promotor	161
Abb.3.35	Thieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carboxamide als KuMas-Derivate	162
Abb.3.36	Testung der KuSaSch-Verbindungen gegen <i>rPfGSK3β</i>	163
Abb.3.37	Antiplasmodiale Aktivität der KuSaSch-Verbindungen	163
Abb.3.38	Zytotoxizität von KuSaSch-Verbindungen gegenüber HEK293T-Zellen	164
Abb.3.39	<i>Plasmodium</i> -spezifische IC ₅₀ -Werte für ausgewählte KuSaSch-Verbindungen	165
Abb.3.40	Testung ausgewählter KuSaSch-Verbindungen gegen <i>rHsGSK3β</i>	166
Abb.3.41	Molekülstruktur von PDE-I ₂ und strukturell verwandter Duocarmycine.....	168
Abb.3.42	Biosynthetisches Gencluster zur Produktion des Naturstoffs PDE-I ₂	169
Abb.3.43	<i>Plasmodium</i> - und HEK293T-spezifische IC ₅₀ -Werte für PDE-I ₂ und Duocarmycin ...	170
Abb.3.44	Stadien-spezifische Inhibierung von <i>Pf3D7</i> durch PDE-I ₂	171
Abb.3.45	Zellkern- und gDNA-spezifische Defekte durch PDE-I ₂ und Duocarmycin	173
Abb.5.1	Identifizierung von <i>PfGSK3β</i> -Inhibitoren mit zweiter <i>rPfGSK3β</i> -Aufreinigung.....	209
Abb.5.2	Test von KuBra-, KuMas- und KuHL-Verbindungen gegen <i>Pf3D7</i> und <i>Pf7G8</i>	209
Abb.5.3	Chloroquin- und Pyrimethamin-Sensitivität von <i>Pf3D7</i> und <i>Pf7G8</i>	210
Abb.5.4	IC ₅₀ -Bestimmung für PDE-I ₂ und Duocarmycin mit <i>Pf3D7</i> und <i>Pf7G8</i>	210
Abb.5.5	Egress- und Invasions-spezifische IC ₅₀ -Werte für <i>PfGSK3β</i> -Inhibitoren.....	211
Abb.5.6	Phospho-Fingerprinting von <i>rPfGSK3β</i> mittels Massenspektrometrie	212
Abb.5.7	Aminosäuresequenzvergleich von <i>PfGSK3</i> und <i>HsGSK3</i> mit Konservierung.....	213
Abb.5.8	Quantifizierung der Anzahl Merozoiten pro Schizont in <i>Pf3D7</i>	214
Abb.5.9	Quantifizierung der Anzahl Merozoiten pro Schizont in <i>PfGSK3β</i> -TGD	215
Abb.5.10	Stadien-spezifische Inhibierung von <i>Pf3D7</i> durch Duocarmycin	217
Tab.2.1	Antikörper	75
Tab.2.2	Synthetische Oligonukleotide (Primer)	79
Tab.3.1	Zusammengefasste Inhibitionswerte potentieller <i>PfGSK3β</i> -Inhibitoren	138
Tab.5.1	Struktur potentieller <i>PfGSK3</i> -Inhibitoren mit Summenformel und Molmasse.....	196
Tab.5.2	cDNA von <i>PfGSK3β</i> bp 242-1320 (Wildtyp).....	216
Tab.5.3	cDNA von <i>PfGSK3β</i> bp 242-1320 (recodonisiert)	216

1. Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Geschichte und Überblick

Erste Berichte von wiederkehrenden Fieberleiden sind bereits in Darstellungen aus der Zeit um 2700 v. Chr. dokumentiert (Arrow et al., 2004; Cox, 2010). Ebenso findet die Erkrankung in Schriften des alten Orients sowie der alten Griechen Erwähnung (Panosian et al., 2004) und molekulare Untersuchungen zeigten, dass in Überresten ägyptischer Mumien aus der Zeit um 3200 v. Chr. DNA des Malariaerregers nachgewiesen werden kann (Miller et al., 1994). Obwohl der genaue Übertragungsweg der Malaria bis ins 19. Jahrhundert unbekannt war, wurde schon früh der räumliche Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Fiebererkrankung und Sumpfgeländen erkannt, die für Mücken ein optimales Brutgebiet darstellen. Aus Sümpfen aufsteigende „schlechte Luft“ (lat. *mala ear*) wurde zu jener Zeit als Ursache für das beobachtete Wechselfieber angesehen, die der Erkrankung ihren Namen verlieh.

Der Malariaerreger wurde im Jahr 1880 durch den französischen Militärarzt Alphonse Laveran in Blutproben erkrankter Soldaten entdeckt (Laveran, 1880; übersetzt und erneut veröffentlicht durch Kean in Peters & Pasvol, 2001). Für seine Entdeckung erhielt Laveran 1907 den Nobelpreis für Medizin (Poser & Bryun, 1999).

Der Übertragungsweg konnte im Jahr 1897 durch den britischen Mediziner Ronald Ross aufgeklärt werden. In seinen Untersuchungen konnte Ross zeigen, dass der von Alphonse Laveran entdeckte Erreger durch Stechmücken auf den Menschen übertragen wird. Für seine Entdeckung wurde er 1902 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet (Panosian et al., 2004).

Auch für den Hamburger Hafendarzt Bernhard Nocht war die Malaria ein Forschungsschwerpunkt. Im Jahr 1900 wurde er Direktor des Instituts für Schiffs- und Tropenkrankheiten (heutiges Bernhard-Nocht Institut für Tropenmedizin) in Hamburg. Zu jener Zeit wurde zur Untersuchung von Malariaparasiten im Blut eine Färbelösung nach Dimitri Romanowksy verwendet, die sich aus Eosin Y und Methylen Blau zusammensetzte. Die Substanz stellte sich jedoch als sehr instabil heraus, wodurch die gewünschte Färbung schlecht reproduzierbar war. Nocht bat daraufhin einen Kollegen, den Chemiker und Bakteriologen Gustav Giemsa an einer Optimierung der Färbemethode zu arbeiten. Giemsa gelang eine Stabilisierung der Färbelösung mithilfe von Methanol und Glycerol und er veröffentlichte im Jahre 1904 seine *Vervollkommnung der Methylen-Eosin-Färbemethode* (Giemsa, 1904), die bis heute unverändert zur Untersuchung von Malariaparasiten in Blutaussstrichen angewandt wird (Fleischer, 2004).

Spätere Untersuchungen zur systematischen Einordnung des Parasiten zeigten, dass es sich beim Erreger der Malaria um einen Protozoen der Gattung *Plasmodium* handelt (Garnham,

1966). Die Gattung setzt sich aus mehr als 200 verschiedenen Arten zusammen, die Vögel, Reptilien und Säugetiere infizieren können (Garnham & Kuttler, 1980; Deane, 1992; Hayakawa et al., 2008; Franke-Fayard et al., 2010; Fricke et al., 2010; Lachish et al., 2011). Innerhalb dieser 200 Arten gelten fünf Spezies (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*) als humanpathogen (Garcia, 2010). Der Parasit stellt einen obligaten Endoparasiten dar und wechselt während eines komplexen Lebenszyklus zwischen asexueller Replikation im Vertebraten sowie sexueller Vermehrung in der Mücke, die somit gleichzeitig als Vektor und Endwirt fungiert.

Die als Überträger der Malaria identifizierten Stechmücken können zum Großteil der Gattung *Anopheles* zugeordnet werden. Innerhalb der Gattung, die über 400 Arten umfasst, haben ca. 40 Arten Vektorkompetenz, wobei der Großteil der humanen Plasmodien-Infektionen in Afrika auf eine Übertragung durch *An. gambiae*, *An. coluzzii* und *An. funestus* zurückzuführen ist (Sinka et al., 2010a; Sinka et al., 2010b; Sinka et al., 2011; Takken & Lindsay, 2019). Darüber hinaus können auch Mücken der Gattung *Aedes* und *Culex* als mögliche Wirte für nicht humanpathogene Arten fungieren (Barillas-Mury & Kumar, 2005; Farajollahi et al., 2011; Loiseau et al., 2012; Santiago-Alacron et al., 2012).

1.1.2 Epidemiologie

Malaria ist mit 228 Millionen Fällen im Jahr 2018 vor HIV und Tuberkulose die häufigste Infektionskrankheit weltweit (WHO, 2019a). Die Erkrankung ist weltweit vor allem in tropischen und subtropischen Regionen verbreitet, wobei sich der Großteil der Infektionen auf den afrikanischen Kontinent konzentriert, wo im Jahr 2018 etwa 93% aller Infektionen zu verzeichnen waren (Abb.1.2). Auf dem afrikanischen Kontinent selbst sind vor allem Gebiete südlich der Sahara betroffen, wobei Nigeria, Demokratische Republik Kongo, Uganda, Elfenbeinküste, Mosambik und Niger mehr als die Hälfte aller weltweiten Malariafälle aufweisen. Zudem wird die Ausbreitung von Infektionen in den betroffenen Ländern durch vorherrschende Armut und mangelnde Infrastruktur zusätzlich begünstigt (Gallup & Sachs, 2001; Teklehaimanot & Mejia, 2008). Neben Afrika sind auch Regionen Süd- und Mittelamerikas sowie Südost-Asiens betroffen, wo jedoch deutlich geringere Fallzahlen zu verzeichnen sind. So machten die im Jahr 2018 in Südost-Asien auftretenden Fälle nur etwa 3,4% der weltweiten Malariainfektionen aus (WHO, 2019a).

Unter den fünf humanpathogenen *Plasmodium*-Spezies weist *Plasmodium falciparum* die mit Abstand höchste Prävalenz auf, sodass im Jahr 2018 über 99% aller Infektionen in Afrika auf *P. falciparum* zurückzuführen waren (WHO, 2019a). *P. vivax* hingegen tritt vor allem in Regionen Südost-Asiens (53% aller Fälle) sowie Südamerikas (75% aller Fälle) auf (Gething et al., 2012).

Die Unterschiede im geographischen Verbreitungsgebiet von *P. falciparum* und *P. vivax* sind vor allem darauf zurückzuführen, dass diese bezüglich ihrer Entwicklung verschiedene

Temperaturoptima aufweisen und *Plasmodium vivax* eine höhere Toleranz gegenüber Temperaturschwankungen zeigt (Dutta & Dutt, 1978; Mendis et al., 2001).

Infektionen mit den Erregern *P. malariae* und *P. ovale* können in allen Malaria-endemischen Region auftreten, entsprechende Fälle sind jedoch selten (Lysenko & Beljaev, 1969; Collins & Jeffery, 2005; Collins & Jeffery, 2007; Mueller et al., 2007; Roucher et al., 2014). In Regionen Afrikas können Infektionen mit *P. malariae* oder *P. ovale* zudem als Doppelinfektion mit *P. falciparum* auftreten (Trape et al., 1994; McKenzie & Bossert, 1999). Die Art *Plasmodium knowlesi* ist eine zoonotische Art und war zunächst nur in Affen bekannt. Spätere Untersuchungen konnten *P. knowlesi* jedoch auch im Menschen nachweisen (Cox-Singh et al., 2008; Pain et al., 2008; White, 2008; Sabbatani et al., 2010; Schottelius et al., 2010; William et al., 2011). Die Infektionen sind ebenfalls selten und traten bisher in Regionen Südost-Asiens auf (Singh & Daneshvar, 2013; Ahmed & Cox-Singh, 2015).

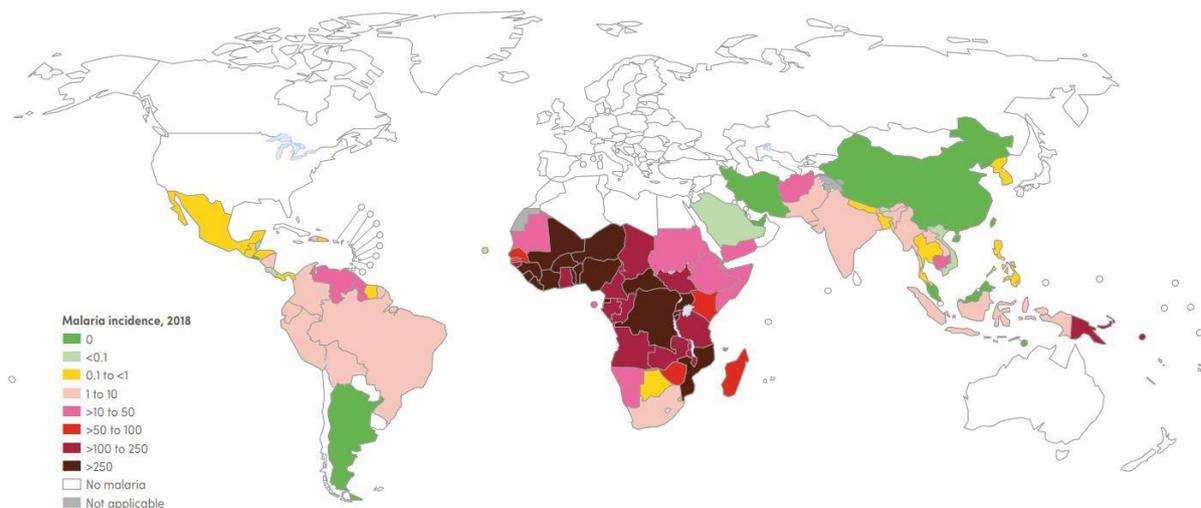


Abb.1.1: Weltweite Verteilung von Malariafällen. Dargestellt ist die Zahl der Malariafälle pro 1000 Einwohner eines Landes (siehe Farbcode) für das Jahr 2018 (WHO, World Malaria Report 2019).

Im Jahr 2018 konnten weltweit etwa 405.000 Todesfälle durch Malaria verzeichnet werden. Da *Plasmodium falciparum* die virulenteste der fünf humanpathogenen Spezies darstellt und zudem in Afrika mit über 99% die höchste Prävalenz aufweist, konzentrieren sich 94% aller tödlichen Malariainfektion auf die Regionen Afrikas. Zudem scheinen Kinder besonders anfällig zu sein, sodass im Jahr 2018 etwa 67% aller Malaria-bedingten Todesfälle Kinder unter 5 Jahren waren (WHO, 2019a).

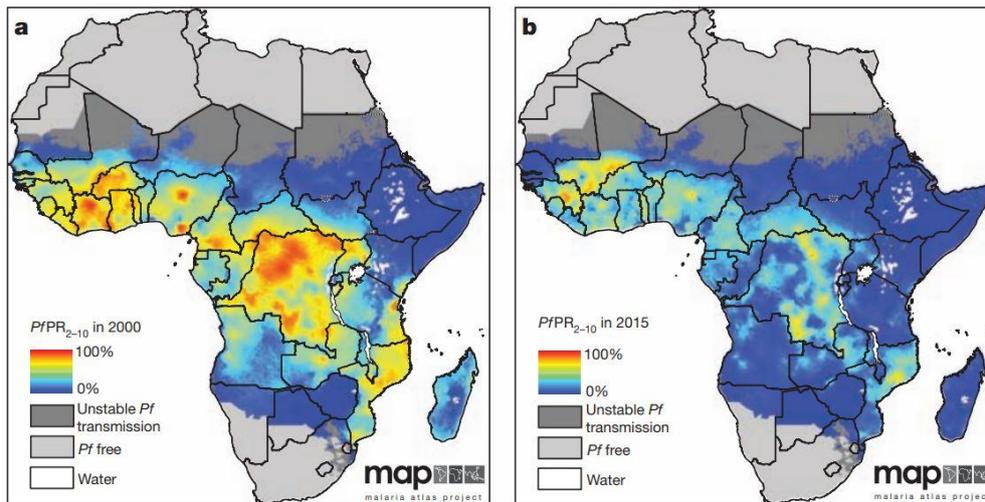


Abb.1.2: Malariaprävalenz in Afrika zwischen 2000 und 2015. Dargestellt ist die Prävalenz von Infektionen mit *P. falciparum* in Kindern zwischen 2 und 10 Jahren in Afrika für die Jahre 2000 und 2015 (Bhatt et al., 2015).

Bezüglich der weltweiten Fallzahlen konnte zwischen 2010 und 2014 ein stetiger Rückgang der weltweiten Malariainfektionen verzeichnet werden (Abb.1.3). Auch die Prävalenz von *Plasmodium falciparum* in afrikanischen Kindern im Alter von 2 bis 10 Jahren wies im Jahr 2015 eine deutliche Abnahme im Vergleich zum Jahr 2000 auf (Bhatt et al., 2015; Abb.1.2). Ebenso konnte die Zahl der jährlichen Todesfälle von weltweit 585.000 im Jahr 2010 auf weltweit 405.000 im Jahr 2018 reduziert werden (WHO, 2019a). Bezogen auf die jährlichen Infektionszahlen ist seit 2015 jedoch kein abnehmender Trend mehr zu beobachten, sodass es zwischen 2014 und 2018 wieder zu einer leichten Zunahme der jährlichen Malaria-Fälle kam (Abb.1.3). Die könnte zum einen auf sich ausbreitende Resistenzen des Erregers gegen die verfügbaren Wirkstoffe zurückzuführen sein (siehe 1.1.5). Zum anderen wäre es möglich, dass durch die wachsende Weltbevölkerung und verbesserte Diagnostik (siehe 1.1.4) insgesamt mehr Infektionen nachgewiesen werden.

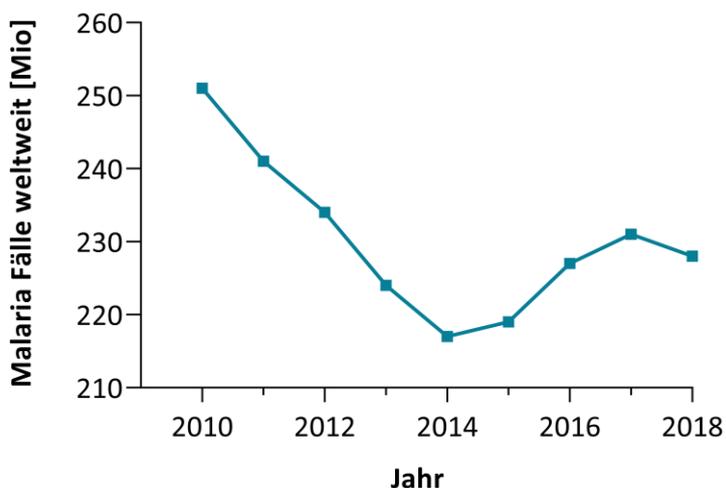


Abb.1.3: Entwicklung der weltweiten Malaria-Fallzahlen zwischen 2010 und 2018. Anzahl der Malaria-Fälle weltweit in Millionen in den Jahren 2010 bis 2018. Die Fallzahlen wurden dem World Malaria Report 2019 (WHO) entnommen.

1.1.3 Klinischer Verlauf der Malaria

Die klinischen Symptome einer Malariaerkrankung werden durch die Vermehrung der Parasiten in den roten Blutzellen verursacht. Die Inkubationszeit kann zwischen 9 und 40 Tagen betragen und hängt stark von der Erregerart sowie dem Immunstatus der infizierten Person ab (White & Cook, 1996). Generell geht die Erkrankung mit Grippe-ähnlichen Symptomen wie Schwindel, Kopf- und Gliederschmerzen, Fieber und Schüttelfrost einher (Warrell & Gilles, 2002).

Durch die Vermehrung der Parasiten in den roten Blutzellen kommt es am Ende eines Replikationszyklus zu einem Platzen der infizierten Erythrozyten. Hierbei werden Parasiten-Proteine, Toxine, Abbauprodukte wie Hämozoin und Zelltrümmer freigesetzt. Durch die Freisetzung von Zytokinen im Blut wird schließlich eine Entzündungsreaktionen mit charakteristischen Fieberschüben vermittelt (Sherry et al., 1995; Schofield et al., 2002; Oakly et al., 2011). Bedingt durch das Parasitieren des Erregers in den roten Blutzellen sowie die Klärung infizierter Blutzellen in der Milz, ist eine Anämie (Blutarmut) eine Komplikation der Malariaerkrankung (Lamikanra et al., 2007). Bedingt durch ablaufende Immunreaktionen kann es zudem zu einer Splenomegalie (Vergrößerung der Milz) während der Infektion kommen (Crane, 1986; Bedu-Addo & Bates, 2002).

Eine weitere Problematik bei der Infektion ist die Tatsache, dass die Lebensweise des Parasiten bestimmte Charakteristika ausweist, die eine Immunantwort erschweren. Zum einen sind Erythrozyten bedingt durch das Fehlen von MHC-Komplexen nicht in der Lage Fremdantigene auf der Oberfläche zu präsentieren, sodass der Parasit für das Immunsystem weitgehend unentdeckt bleibt (Bowen & Walker, 2005). Somit ist der Erreger nur während einer kurzen extraerythrozytären Phase, der Invasion von roten Blutzellen, für das Immunsystem zugänglich. Um auch hier eine Immunreaktion so weit wie möglich zu umgehen, erfolgt die Wirtszellinvasion durch den Parasiten in weniger als einer Minute (Dvoraket al., 1975; Aikawa et al., 1978; Treeck et al., 2009; Gilson & Crabb, 2009; Yahata et al., 2012).

Je nachdem welche Erregerart vorliegt, können unterschiedliche Formen der Malaria auftreten, die sich in Schwere, Verlauf und Krankheitsbild unterscheiden.

Da *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* ein synchrones Wachstum und einen Replikationszyklus mit einer Dauer von 48 Stunden aufweisen, kommt es bei einer Infektion mit dieser Erregerart zur sog. *Malaria tertiana* („Drei-Tage-Fieber“). Die *Malaria tertiana* zeichnet sich durch Fieberschübe in einem Dreitage-Rhythmus aus. Der erste Tag ist von Fieber begleitet, worauf ein fieberfreier Tag und schließlich ein weiterer Tag mit Fieber folgt. Infektionen mit *P. vivax* oder *P. ovale* führen meist zu milden Krankheitsverläufen, wobei für *P. vivax* auch kritische Verläufe beschrieben sind (Beg et al., 2002; Kochar et al., 2005; Genton et al., 2008; Tjitra et al., 2008; Kochar et al., 2009). Zudem besitzen *P. vivax* und *P. ovale* im Gegensatz zu den anderen humanpathogenen *Plasmodium*-Arten die Fähigkeit sog. Hypnozoiten in der Leber zu bilden. Hierbei handelt es sich um persistierende Dauerstadien, die über einen Zeitraum von bis zu mehreren Jahren in der Leber verbleiben können. Durch

einen bisher nicht aufgeklärten Mechanismus können diese Stadien reaktiviert werden, wodurch es zu einem Erkrankungsrückfall kommen kann (Krotoski, 1989; Cogswell, 1992). Aktuellere Untersuchungen zeigten, dass Hypnozoiten zwar weiterhin einen aktiven Metabolismus aufweisen, die meisten Stoffwechselprozesse jedoch deutlich reduziert ablaufen. Der Mechanismus der Reaktivierung von Hypnozoiten bleibt jedoch weiterhin ungeklärt (Adams & Mueller, 2017; Bertschi et al., 2018; Gural et al., 2018)

Plasmodium malariae weist ebenfalls ein synchrones Wachstum auf, jedoch beträgt die Dauer eines Replikationszyklus 72 Stunden, woraus die sog. *Malaria quartana* („Vier-Tage-Fieber“) resultiert. Die *Malaria quartana* zeichnet sich entsprechend durch Fieberschübe mit einer Vier-Tages-Rhythmik aus, wobei der erste Tag von Fieber begleitet ist, gefolgt von zwei fieberfreien Tagen, auf die wiederum ein weiterer Tag mit Fieber folgt. Infektionen mit *P. malariae* zeichnen sich zumeist durch milde Verläufe mit geringer Parasitämie aus (Cook & Zumla, 2008).

Der Erreger *Plasmodium knowlesi* weist mit einer Dauer von 24 Stunden den kürzesten Lebenszyklus unter den humanpathogenen Malariaerregern auf (Knowles & Gupta, 1932; Chin et al., 1965). Entsprechend kommt es während der Erkrankung zur einer kürzeren Fiebrerrhythmik im Vergleich zu anderen Formen der Malaria. Zunächst wurden Infektionen mit *P. knowlesi* als äußerst selten mit stets milden Verläufen angesehen. Nachfolgende Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass der Erreger in Südost-Asien weiter verbreitet ist, als zuvor angenommen und auch schwere Krankheitsverläufe möglich sind (Jongwutives et al., 2004; Zhu & Zheng, 2006; Cox-Singh et al., 2008; Daneshvar et al., 2009).

Plasmodium falciparum stellt den gefährlichsten der fünf humanpathogenen Malariaerregere dar und verursacht die sog. *Malaria tropica*. *P. falciparum* weist einen 48-Stündigen Replikationszyklus auf, jedoch verläuft das Wachstum asynchron. Die *Malaria tropica* zeichnet sich durch hohes Fieber ohne typische Fiebrerrhythmik aus. Die besondere Pathogenität des Erregers kann zudem auf spezielle Modifikationen der Blutzelle durch den Parasiten zurückgeführt werden. Im Normalfall können infizierte rote Blutzellen von der Milz erkannt und eliminiert werden. Um diesen Mechanismus zu umgehen, exportiert der Erreger spezielle Proteine auf die Oberfläche der Blutzelle, wodurch es zur Ausbildung sog. „Knobs“ kommt (Udeinya et al., 1981). Diese Strukturen können zum einen eine Bindung von infizierten Erythrozyten an uninfizierte Blutzellen (*Rosetting* Wahlgren et al., 1989) vermitteln und zum anderen eine Bindung der Zelle an die Innenseite der Blutgefäße (Cytoadhärenz oder Sequestrierung, Rowe et al., 2009; Turner et al., 2013). Somit bewegen sich infizierte Zellen nicht mehr mit dem Blutstrom, wodurch eine Passage der Milz umgangen werden kann (Saul, 1999). Ein Nebeneffekt der modifizierten, cytoadhärenten Erythrozyten ist jedoch ein Verschluss der kapillaren Blutgefäße. Diese Embolien führen zu mangelnder Blutversorgung, sodass es zu einem Organversagen kommen kann. Geschieht ein derartiger Gefäßverschluss im Gehirn, kann dies zu einer cerebralen Malaria führen, die mit Krämpfen und Koma einhergehen kann und besonders bei Kindern rasch zum Tod führt (Taylor & Molyneux, 2015).

Infektionen können jedoch auch weitgehend symptomlos verlaufen. Besonders in endemischen Gebieten Afrikas, wo entsprechende Infektionen häufig auftreten, können Menschen eine Teilimmunität aufbauen, sodass Infektionen milde oder symptomlose Verläufe nehmen. Bleiben Infektionen über einen längeren Zeitraum aus, kann diese Immunität jedoch wieder verloren gehen (Struik & Riley, 2004; Doolan et al., 2009; Tran et al., 2013; Mischlinger et al., 2020). Eine vollständige und dauerhafte Immunität im Menschen konnte bisher nicht beschrieben werden.

1.1.4 Diagnostik

Da sich viele Infektionskrankheiten zunächst mit unspezifischen grippeähnlichen Symptomen (s.o.) äußern, ist besonders in endemischen Gebieten Afrikas eine gesicherte Diagnose von großer Wichtigkeit, sodass eine spezifische Behandlung der Erkrankung erfolgen kann.

Infektionen mit *Plasmodium* lassen sich lichtmikroskopisch anhand von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen detektieren. Hierbei können auch die verschiedenen Spezies morphologisch anhand von Merkmalen wie Form, Größe und Pigmentierung voneinander unterschieden werden (Warhurst & Williams, 1996).

Zudem weisen die Erregerarten zum Teil weitere charakteristische Merkmale auf, die eine Differenzierung der verschiedenen *Plasmodium*-Arten erlaubt. Ein spezifisches Merkmal für die Arten *P. vivax* sowie *P. ovale* stellen die Schüffner's dots (*Schüffnersche Tüpfelung*) dar. Hierbei handelt es sich um eine Granulation des Cytoplasmas infizierter Erythrozyten, die sich in der Färbung als feine Punktierung äußert (Schüffner, 1899; Aikawa et al., 1975; Udagama et al., 1988). Die Art *P. ovale* weist teilweise eine intensivere Punktierung auf, weshalb entsprechende Strukturen hier auch als James's dots bezeichnet werden (James, 1929). Bei Infektionen mit *P. malariae* kann wiederum eine andere Form der Punktierung beobachtet werden, die als Ziemann's dots bezeichnet wird (Ziemann, 1915). Auch der Erreger *P. falciparum* weist in angefärbten Blutaussstrichen spezifische Strukturen auf. Hier sind die sog. Maurer's clefts, wobei es sich um membranöse Strukturen im Cytosol der Blutzelle handelt, als punktierte Färbung im Blutaussstrich zu beobachten (Maurer, 1900). Als eine weitere Besonderheit können bei Infektionen mit *Plasmodium falciparum* bedingt durch die beschriebene Cytoadhärenz (s.o.) ausschließlich Ringstadien im Blutaussstrich detektiert werden, da alle weiteren Stadien adhären an das Endothel der Blutgefäße vorliegen. Die Diagnose von *P. knowlesi* allein durch mikroskopische Untersuchungen erweist sich hingegen als problematisch, da der Erreger morphologisch nur schwer von *P. malariae* unterschieden werden kann (Lee et al., 2009).

Zwar gilt die lichtmikroskopische Untersuchung von Blutaussstrichen auch weiterhin als der Goldstandard bei der Malariadiagnose, jedoch fehlt es besonders in endemischen Regionen Afrikas an entsprechender Ausstattung, geschultem Personal sowie Elektrizität zur Mikroskopie, um eine verlässliche Diagnose stellen zu können (Amoah et al., 2016). Neben der

Mikroskopie werden daher vermehrt Antigen-basierte Schnelltests (*Rapid Diagnostic Tests*, RDTs) verwendet, die auf Detektion der Parasitenantigene HRP2/3 (*Histidine Rich Protein*), der parasitischen Lactat Dehydrogenase (pLDH) oder der parasitischen Aldolase (pAldo) basieren (Beadle et al., 1994; Premji et al., 1994; Dietze et al., 1995; Kilian et al., 1997; Kodisinghe et al., 1997; Amoah et al., 2016). Obwohl HRP2/3-basierte Tests laut WHO die höchste Sensitivität aufweisen (Amoah et al., 2016; WHO, 2018b), können diese jedoch auch zu falsch-positiven oder falsch-negativen Resultaten führen. Eine Schwierigkeit ist die Langlebigkeit des HRP-Antigens, weshalb dieses auch noch bis zu vier Wochen nach einer geklärten Infektion im Körper zirkulieren kann und somit zu falsch positiven Ergebnissen führt (Iqbal et al., 2004; Gerstl et al., 2010; Kumar et al., 2012). Ebenso können sich der *pfhrp2/3*-Genotyp sowie die Menge des zirkulierenden Antigens auf das Testergebnis auswirken und in einigen Fällen zu falsch negativen Resultaten führen (Lee et al., 2006; Adu-Gyasi et al., 2012; Wurtz et al., 2013; WHO, 2018b). Ein weiteres Problem bei der Diagnostik mittels HRP-basierten RDTs ist das vermehrte Auftreten von Parasiten, die *pfhrp2/3*-Deletionen aufweisen und im Test nicht mehr detektiert werden können (Gamboa et al., 2010; Amoah et al., 2016; Bharti et al., 2016; Beshir et al., 2017; Parr et al., 2017; Berhane et al., 2018; WHO, 2019a). Sollte die Prävalenz *pfhrp2/3*-negativer Parasiten einen Wert von 5% in der Region übersteigen, empfiehlt die WHO einen Wechsel zu einem anderen Schnelltest. Die Verfügbarkeit von nicht HRP-basierten Tests ist jedoch begrenzt. Zudem sind die meisten dieser alternativen Tests nicht WHO-zertifiziert und können nicht zwischen Infektionen mit *P. falciparum* und *P. vivax* unterscheiden (WHO, 2018b).

Zudem lassen sich Infektionen auch DNA-basiert mittels PCR nachweisen, wobei ebenfalls zwischen den verschiedenen Erregerarten unterschieden werden kann (Wataya et al., 1991; Snounou et al., 1993; Water, 1994; Farvas et al., 2003; Patsoula et al., 2003; Rougemont et al., 2004; Speers et al., 2004). Eine Entsprechende Ausstattung zur PCR-basierten Diagnose ist jedoch in viele Regionen Afrikas ebenfalls nicht verfügbar.

1.1.5 Medikamentöse Therapie und Resistenzentwicklung

Zur Behandlung der Malaria kommen verschiedene antiplasmodiale Wirkstoffe zum Einsatz, die sowohl synthetisch als auch natürlichen Ursprungs sein können.

Schon im 17. Jahrhundert wurden in Südamerika pflanzliche Extrakte aus der Rinde des Chinarindenbaums (*Chinchona spp.*) zur Behandlung von Fiebererkrankungen eingesetzt, da für diese eine schmerzstillende und fiebersenkende Wirkung beobachtet werden konnte. Nachdem die Rinde des Baumes nach Europa gebracht wurde, gelang es den französischen Chemikern Pierre Joseph Pelletier und Joseph Caventou 1820 erstmals einen Wirkstoff aus der Pflanze zu isolieren, den sie Chinin nannten (Achan et al., 2011). Bis ins frühe 20. Jahrhundert war Chinin das Mittel der Wahl zur Behandlung der Malaria. Die Synthese von Chinin gelang erstmals im Jahre 1944 durch den Chemiker Robert B. Woodward (Woodward & Doering, 1945). In den 1930er Jahren wurde jedoch bereits das effektivere und synthetisch herstellbare

Derivat Chloroquin verfügbar (Achan et al., 2011). In den folgenden Jahrzehnten konnten weitere Derivate wie Amodiaquin im Jahr 1948, Piperaquin in den 1960er Jahren, Mefloquin und Lumefantrin in den 1970er Jahren sowie Naphthoquin in den 1980er Jahren entwickelt werden (Berliner et al., 1948; Chen et al., 1982; Trenholme et al., 1975; Cui & Su, 2009).

Besonders das kostengünstige Chloroquin, welches einem 4-Aminochinolin-Derivat des Chinins entspricht, wurde verstärkt zur Behandlung von Malariaerkrankungen eingesetzt. Chloroquin vermittelt seine Wirkung in der Nahrungsvakuole des Parasiten. Hier entsteht beim Verdau von Hämoglobin durch den Parasiten das toxische Abbauprodukt Hämatin. Durch Polymerisation des Hämatins zu unlöslichen Hämozoinkristallen wirkt der Parasit der Toxizität jedoch entgegen. Der Wirkstoff Chloroquin kann diese Polymerisation wiederum effektiv hemmen, wodurch ein antiplasmodialer Effekt vermittelt wird (Chou et al., 1980; Slater & Cerami, 1992; Sullivan et al., 1996). Obwohl der Wirkmechanismus für einige der genannten Chloroquin-Derivate noch nicht vollständig verstanden ist, legen Untersuchungen ebenfalls eine Inhibierung der Hämozoinbildung im Parasiten nahe (Egan et al., 1994; Dorn et al., 1998; Hawley et al., 1998; Zhang et al., 1999; Sullivan, 2002; Egan & Ncokazi, 2005; Rush et al., 2009; Sandlin et al., 2011; Combrinck et al., 2013; Sullivan, 2017).

Chloroquin wurde weltweit eingesetzt und bereits in den 1950er Jahren konnten sowohl in Südamerika als auch in Südost-Asien unabhängig voneinander entsprechende Resistenzen in der Erregerpopulation nachgewiesen werden (Payne, 1987). Die Resistenz gegen Chloroquin basiert in erster Linie auf Mutationen im *Chloroquine-Resistance-Transporter* (CRT) des Parasiten (Fidock et al., 2000). Hierbei handelt es sich um einen Transporter in der Membran der Nahrungsvakuole, der bedingt durch die Mutation Chloroquin mit gesteigerter Aktivität aus der Vakuole heraus transportiert. Durch den gesteigerten Efflux von Chloroquin aus der Nahrungsvakuole wird somit eine verminderte Sensitivität gegenüber dem Wirkstoff vermittelt (Martin & Kirk, 2004; Sanchez et al., 2005; Sanchez et al., 2007; Martin et al., 2009; Juge et al., 2015; Pelleau et al., 2015). Darüber hinaus können Mutationen des CRT-Proteins ebenso zu Resistenzen gegenüber Chloroquin-Derivaten führen (Menard et al., 2006; Echeverry et al., 2007; Muangnoicharoen et al., 2009; Sisowath et al., 2009; Antony & Parija, 2016; Ross et al., 2018; Dhingra et al., 2019). Anhand des Chloroquin-resistenten südamerikanischen Isolats *Pf7G8* konnte zudem in aktuelleren Untersuchungen die Proteinstruktur von CRT aufgeklärt und bestätigt werden, dass der Transporter abhängig von pH-Wert und Membranpotential einen Chloroquin Efflux vermittelt (Kim et al., 2019). Zudem konnte auch das *Multidrug Resistance Protein 1* (MDR1) mit Resistenzen gegen Chloroquin und entsprechende Derivate in Verbindung gebracht werden (Duraisingh & Cowman, 2005). Verschiedene Punktmutation führen hier zu einer veränderten Sensitivität gegenüber Chloroquin, Chinin, Mefloquin, Lumefantrin und Amodiaquin (Reed et al., 2000; Pickard et al., 2003; Sidhu et al., 2005; Sisowath et al., 2005; Sá et al., 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass auch die Anzahl der *mdr1*-Genkopien im Zusammenhang mit Resistenzen gegenüber Chinin, Mefloquin und Lumefantrin steht (Foote et al., 1989; Sidhu et al., 2006; Antony & Parija, 2016). Letztlich konnte auch das *Multidrug Resistance Associated Protein* (MRP) mit

einer Resistenz gegen Chloroquin und Derivate assoziiert werden (Klokouzas et al., 2004). Untersuchungen lassen darauf schließen, dass auch MRP zusammen mit anderen Transportern den Efflux entsprechender Wirkstoffe vermitteln kann (Raj et al., 2009; Mu et al., 2003; Antony & Parija, 2016).

Die Verbreitung von Chloroquinresistenzen in der Erregerpopulation hatte zum Teil fatale Folgen für Endemiegebiete in Afrika, wo es vor allem bei Kindern zu einem starken Anstieg der Sterberaten in Folge von Malariaerkrankungen kam (Greenwood et al., 1987; Trape, 2001; Arav-Boger & Shapiro, 2005). Untersuchungen im Senegal zeigten, dass es hier über einen Zeitraum von 12 Jahren teilweise zu einer Verfünffachung des Sterberisikos bei Kindern unter 10 Jahren kam (Trape et al., 1998).

Einen strukturell ähnlichen Wirkstoff stellt auch die Verbindung Primaquin dar, die in den 1950er Jahren verfügbar wurde. Primaquin wird vor allem zur Behandlung von Infektionen mit *P. vivax* verwendet und zeigt hierbei auch eine Wirksamkeit gegen in der Leber persistierende Hypnozoiten, sodass der Wirkstoff auch Malariarückfällen vorbeugen kann. Zudem zeigt Primaquin zusätzlich eine Aktivität gegenüber Gametozyten, sodass der Wirkstoff auch die Verbreitung der Erreger hemmen kann (Baird & Hoffman, 2004). Der Wirkmechanismus von Primaquin war lange Zeit unklar, aktuellere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass der Wirkstoff in Leber und dem Knochenmark unter Beteiligung des Enzyms Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6) und dessen Redoxpartner Cytochrom-P450-NADPH-Oxidoreduktase (CPR) metabolisiert wird, wodurch es letztlich zu einer Akkumulation von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) kommt, welches tödlich auf den Parasiten wirkt. Folglich sind keine Targets im Parasiten in den Wirkmechanismus involviert, welches eine mögliche Erklärung für das Fehlen von entsprechenden Resistenzen in der Erregerpopulation darstellt (Camarda et al., 2019).

Eine weitere Substanzklasse stellen Antifolate wie Pyrimethamin, Sulfadoxin oder das Prodrug Proguanil dar, welches im Körper zur aktiven Verbindung Cycloguanil metabolisiert wird. Pyrimethamin und Cycloguanil hemmen die plasmodiale Dihydrofolatreduktase (DHFR), wodurch es zu einer Inhibierung der Folsäuresynthese im Parasiten kommt (Dieckmann & Jung, 1986a; Dieckmann & Jung, 1986b). Die Wirkung von Sulfadoxin beruht ebenfalls auf einer Inhibierung der Folsäuresynthese im Parasiten, wobei die Verbindung das für den Syntheseweg essentielle Enzym Dihydropteroat-Synthase (DHPS) bindet und so mit dessen natürlichem Substrat p-Aminobenzoesäure (PABA) konkurriert. Folglich kann Sulfadoxin die Integration des Aminobenzoesäure-Bausteins in das Folsäuremolekül verhindern (Hyde, 2005). Da insbesondere Folate wie Tetrahydrofolat essentielle Co-Faktoren für den Aminosäure- sowie Nukleinsäure-Metabolismus darstellen, können Antifolate effektiv die Parasitenproliferation hemmen (Sibley et al., 2001). Sowohl gegen Pyrimethamin und Cycloguanil als auch gegen Sulfadoxin konnten Resistenzen in der Erregerpopulation nachgewiesen werden, die durch eine Vielzahl von Punktmutationen in der DHFR oder der DHPS vermittelt werden (Dieckmann & Jung, 1986; Brooks et al., 1994; Basco et al., 1995; Plowe et al., 1997; Triglia et al., 1997; Wang et al., 1997; Triglia & Cowman, 1999; Sridaran et al., 2010; Alam et al., 2011).

In der Erregerpopulation konnten zudem multiresistente Isolate identifiziert werden, die Resistenzen gegen mehrere Wirkstoffe unterschiedlicher Substanzklassen aufweisen (Oduola et al., 1988; Guinet et al., 1996; Burkot et al., 1984). Entsprechende *P. falciparum* Stämme sind beispielsweise das brasilianische Isolat *Pf7G8* (resistent gegen Chloroquin, Pyrimethamin und Cycloguanil) sowie die südostasiatischen Isolate *PfDD2* (resistent gegen Chinin, Chloroquin, Pyrimethamin und Sulfadoxin) und *PfW2mef* (resistent gegen Chinin, Chloroquin, Pyrimethamin, Sulfadoxin und Mefloquin).

Der Wirkstoff Atovaquon ist neben dem Antifolat Proguanil Bestandteil des Kombinationspräparats Malarone und kann zur Behandlung von Kindern oder Erwachsenen sowie zur Malariaprophylaxe eingesetzt werden (Osei-Akotot et al., 2005; Laloo & Hill, 2008; Nixon et al., 2013). Atovaquon wirkt als kompetitiver Inhibitor von Ubiquinol bei der Bindung des Cytochrom-bc₁-Komplexes in der Mitochondrienmembran, wodurch der Elektronentransport und somit das Membranpotential der Mitochondrien gestört wird (Fry & Pudney, 1992; Srivastava et al., 1997; Biagini et al., 2006). Auch gegen Atovaquon konnten bereits Resistenzen beschrieben werden, die durch Punktmutationen im Cytochrom-bc₁-Komplex vermittelt werden (Korsinczky et al., 2000; Fivelman et al., 2002; Schwartz et al., 2003; Berry et al., 2006; Musset et al., 2006). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Resistenzvermittelnde Mutation in den Mückenstadien des Parasiten letal wirkt, sodass diese sich nicht weiterverbreiten kann. Zudem wird die Mutation mit dem Mitochondrium nur maternal vererbt, weshalb selbst ein Auskreuzen mit sensitiven Stämmen zu keiner Vererbung der Resistenz führt (Goodman et al., 2016). Somit gilt Atovaquon auch weiterhin als vielversprechender Wirkstoff zur Behandlung von Malaria.

Gegenwärtig beruht die Therapie von Malaria jedoch vor allem auf Behandlung mit dem Wirkstoff Artemisinin und entsprechenden Derivaten wie Artemether, Arteether oder Artesunat in Kombination mit anderen Wirkstoffen der bereits beschriebenen Substanzklassen (s.o.). Artemisinin kann aus der Pflanze *Artemisia annua* (Einjähriger Beifuß) gewonnen werden, deren Extrakte schon lange Zeit in der traditionellen chinesischen Medizin Anwendung finden. Die Verbindung entspricht strukturell einem Sesquiterpenlacton mit einer Endoperoxid-Brücke und wurde bereits 1971 von der chinesischen Wissenschaftlerin You You Tu isoliert (Tu et al., 1981; Tu, 2011), wofür diese im Jahr 2015 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde.

Artemisinin zeigt im Vergleich zu anderen antiplasmodialen Verbindungen eine sehr schnelle Wirksamkeit gegenüber intraerythrozytärer Blutsstadien und ist somit ein hoch effizientes Therapeutikum bei der Behandlung schwerer Malariaverläufe. Jedoch weisen Artemisinin und dessen Derivate *in vivo* eine sehr kurze Halbwertszeit (ca. eine Stunde) auf, weshalb diese meist mit weiteren Wirkstoffen wie Lumefantrin, Mefloquin, Amodiaquin, Piperaquin oder Sulfadoxin-Pyrimethamin kombiniert werden (White, 2008; Dondorp et al., 2009; White et al., 2014; Lu et al., 2019).

Der Wirkmechanismus von Artemisinin ist bisher jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Untersuchungen lassen jedoch darauf schließen, dass Fe^{2+} -Ionen, die beim Hämoglobinverdau im Parasiten entstehen, zu einer Aktivierung von Artemisinin führen, wobei es zu einer Freisetzung von Kohlenstoff-zentrierten Radikalen kommt. Diese Radikale können eine Vielzahl von Proteinen und Membrankomponenten angreifen, wodurch es im Parasiten zu einer massiven Zellschädigung und dem vermehrten Auftreten von inkorrekt gefalteten Proteinen kommen kann (Meunier & Robert, 2010; Combrinck et al., 2013; Wang et al., 2015; Ismail et al., 2016; Bridgford et al., 2018; Lu et al., 2019).

Im Jahr 2008 konnten in Südostasien erstmals Artemisinin-resistente Erreger identifiziert werden (Noedl et al., 2008). Im Jahr 2018 veröffentlichte Untersuchungen beschrieben schließlich über 30 Fälle von Artemisinin-Resistenzen, die unabhängig voneinander in Südostasien auftraten (Amato et al., 2018, Tse et al., 2019). Einige Zeit nach Auftreten von Resistenzen in Südostasien, konnten auch in Afrika resistente Parasiten identifiziert werden (Lu et al., 2017). Artemisinin-Resistenzen konnten in erster Linie mit Mutationen im Protein Kelch13 in Verbindung gebracht werden, wobei die Resistenz in den meisten Fällen bei Parasiten mit der Punktmutation C580Y beschrieben werden konnte. Neben C580Y scheinen jedoch auch andere Punktmutationen in Kelch13 eine verminderte Sensitivität gegenüber Artemisinin vermitteln zu können (Ariey et al., 2014; Ashley et al., 2014). Für die Vermittlung einer Artemisinin-Resistenz im Parasiten wurden verschiedene zelluläre Mechanismen diskutiert. Zum einen konnte gezeigt werden, dass Kelch13 als Adaptorprotein einer E3-Ligase die Ubiquitinierung der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) kontrolliert und somit deren Degradation im Proteasom reguliert. Mutationen in Kelch13 führen zu einer verminderten Ubiquitinierung von PI3K und somit zu einer erhöhten Konzentration der Kinase im Parasiten. Daraus folgt ebenso eine erhöhte Konzentration des PI3K-spezifischen Produkts Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI3P). Es wird vermutet, dass PI3P Prozesse wie Autophagie stimulieren kann, wodurch Artemisinin-induzierte toxische Aggregate aus dem Parasiten entfernt werden können (Mbengue et al., 2015; Nascimbeni et al., 2017; Bhattacharjee et al., 2018; Lu et al., 2019). Als weiterer Resistenzmechanismus wurde zudem die „*Unfolded Protein Response*“ (UPR) diskutiert, die entweder direkt im Zusammenhang mit Kelch13-Mutationen steht oder durch erhöhte PI3K-Level stimuliert wird (Suresh & Haldar, 2018). Die UPR stellt ebenfalls eine Reaktion auf zellulären Stress dar, an der die Chaperonkomplexe *Plasmodium Reactive Oxidative Stress Complex* (PROSC) und *T-Complex Protein 1 Ring Complex* (TriC) beteiligt sind (Mok et al., 2015). Die „*Unfolded Protein Response*“ ermöglicht ebenfalls eine Reparatur oder den Abtransport beschädigter Proteine und kann somit der Artemisinin-induzierten Zellschädigung entgegenwirken. Aktuelle Untersuchungen konnten schließlich einen weiteren Kelch13-abhängigen Resistenz-Mechanismus im Parasiten beschreiben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Kelch13 sowie weitere Proteine desselben Kompartiments essentiell für einen effizienten Transport von Hämoglobin aus dem Cytoplasma des Erythrozyten in die Nahrungsvakuole des Parasiten sind (Birnbaum et al., 2020). Wie frühere Studien bereits zeigten, können Abbauprodukte, die beim Verdau von Hämoglobin in der Nahrungsvakuole entstehen, eine Aktivierung von Artemisinin vermitteln

(Klonis et al., 2011; Klonis et al., 2013; Xie et al., 2016). Ist der Transport von Hämoglobin jedoch durch Mutationen in Kelch13 weniger effizient, führt dies folglich zu einem reduzierten Hämoglobin-Abbau und somit zu einer verminderten Aktivierung von Artemisinin. Somit scheint der Resistenzmechanismus auf einem entsprechenden Gleichgewicht zwischen Hämoglobin-Aufnahme und Artemisinin-Aktivierung zu beruhen (Birnbaum et al., 2020).

Zur Therapie von Infektionen mit *P. falciparum* in Afrika empfiehlt die WHO aktuell eine Artemisinin-basierte Kombinationstherapie (ACT) mit Artemether-Lumefantrin (AL), Artesunat-Amodiaquin (AS-AQ) oder Dihydroartemisinin-Piperaquin (DHA-PPQ) als *First Line* Behandlung. Die Kombination von Artemisinin mit einem weiteren Wirkstoff erfolgt zum einen, da Artemisinin *in vivo* eine sehr kurze Halbwertszeit aufweist (s.o.). Zum anderen stellt die Kombination mehrerer Wirkstoffe eine Strategie zur Verhinderung weiterer Resistenzen dar. Laut WHO lag die Effizienz aller drei genannten Wirkstoffkombinationen zwischen 2010 und 2018 bei über 98%. Ein Fehlschlagen der Artemisinin-basierten Kombinationstherapie konnte jedoch in einigen Fallberichten, unter anderem bei elf Europäern nach Rückkehr aus Afrika, beschrieben werden. Weitere Untersuchungen konnten jedoch keine Mutationen in Kelch13 oder weiteren molekularen Markern detektieren (van Hong et al., 2015; Lu et al., 2017; Rasmussen et al., 2017; Sondén et al., 2017; Sutherland et al., 2017; Russo et al., 2018;). Laut WHO stellen diese Berichte somit keinen überzeugenden Nachweis für eine ACT-Resistenz in Afrika dar (WHO, 2019a).

Des Weiteren bietet der Apikoplast als spezifisches Zellorganell der Apikomplexa eine Vielzahl von Zielstrukturen für potentiell antiplasmodiale Wirkstoffe, da sich hier ablaufende Stoffwechselprozesse deutlich vom Metabolismus des Wirtsorganismus unterscheiden (Ralph et al., 2001). Somit zeigen beispielsweise Antibiotika wie Ciprofloxacin, Rifampicin oder Doxycyclin durch Interaktion mit der Apikoplast-spezifischen Gyrase, RNA-Polymerase oder der Plastid-rRNA einen antiplasmodialen Effekt (Strath et al., 1993; Pukrittayakamee et al., 1994; Budimulja et al., 1997; Weissig et al., 1997). Auch die Isoprenoidsynthese stellt ein potentielles Ziel für Wirkstoffe wie Fosmidomycin dar, welches eine Inhibierung der 1-Deoxy-D-xylose-5-phosphat (DOXP)-Reduktoisomerase vermittelt (Jomaa et al., 1999). Studien mit *P. berghei* zeigten, dass Rifampicin und Ciprofloxacin in Kombination mit Amodiaquin eine potentielle Alternative zur Behandlung von Malaria darstellen (Badejo et al., 2014; Ubulom et al., 2015). Für Rifampicin konnten jedoch auch negative Effekte bei der Kombination mit anderen Wirkstoffen beschrieben werden. So kann Rifampicin beispielsweise bei Kombination mit Atovaquon die Konzentration von Atovaquon im Plasma um bis 52% verringern (Nixon et al., 2013; Lewis et al., 2020). Doxycyclin wird in Kombination mit Chinin zur Behandlung von Malaria empfohlen, wenn eine Artemisinin-basierte Kombinationstherapie nicht verfügbar oder unwirksam ist und wird zur Malaria-Prophylaxe bei Reisenden eingesetzt (Gaillard et al., 2018). Der Einsatz von Fosmidomycin in Kombination mit Piperaquin konnte in klinischen Studien als effizient und sicher bei der Behandlung von *P. falciparum* Infektionen beschrieben werden (Mombo-Ngoma et al., 2018).

Die zunehmende Entwicklung und globale Verbreitung von Resistenzen in der Erregerpopulation gegen eine Vielzahl der beschriebenen Wirkstoffe unterstreicht die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer antiplasmodialer Verbindungen. Zudem wurden laut WHO zwischen 2014 und 2016 in sub-Sahara Regionen Afrikas bei 70% der Kinder, bei denen eine Malaria vermutet und entsprechend behandelt wurde, kein diagnostischer Test zur Bestätigung der Infektion durchgeführt (WHO 2017). Derartige Behandlungen ohne gesicherte Diagnose führen zu einem übermäßigen Gebrauch der verfügbaren Wirkstoffe und können die Resistenzbildung in der Erregerpopulation weiter begünstigen. Somit ist neben der Entwicklung neuer Wirkstoffe auch die Gewährleistung einer adäquaten Diagnose und die korrekte Anwendung der verfügbaren Wirkstoffe von großer Wichtigkeit.

1.1.6 Impfstoffentwicklung

Die Entwicklung und Anwendung von Impfstoffen hatte bisher und wird auch in Zukunft neben der Entdeckung und Herstellung von Antibiotika einen erheblichen Einfluss auf die globale Gesundheit der Menschheit haben. Während ausgesprochen effektive Impfstoffe gegen virale (z.B. Pocken, Masern, Hepatitis B, Poliomyelitis) und bakterielle (z.B. Tetanus, Keuchhusten, Pneumokokken) Krankheitserreger zur Verfügung stehen, die zum Teil maßgeblich an der weltweiten Ausrottung von Erkrankungen beteiligt waren (z.B. Pocken), gibt es bislang keine wirksame Impfung gegen parasitäre Erkrankungen einschließlich Malaria (Greenwood, 2014; Olotu et al., 2016; Vetter et al., 2018). Dies ist vor allem auf die biologische Komplexität der Parasiten und deren co-evolutive Anpassung an das humane Immunsystem zurückzuführen. Eine Folge hiervon ist beispielsweise der ausgeprägte Sequenzpolymorphismus immunogener Proteine des Parasiten und deren transkriptionelle Variabilität, die die Entwicklung eines effektiven Impfstoffs ausgesprochen schwierig gestalten (Tanabe et al., 2013).

Der einzige potentielle Impfstoff, der bisher Phase III klinischer Studien erreicht hat, ist die Substanz RTS,S/AS01 („Mosquirix“). Hierbei handelt es sich um einen Impfstoff, dessen Grundlage das parasitäre Antigen *Circumsporozoite Protein* (CSP) bildet, welches auf der Oberfläche von Sporozoiten exprimiert wird, die nach Übertragung durch die Mücke im Menschen die Leber infizieren. RTS,S setzt sich aus einer *Repeat*-Region sowie einem T-Zell-Epitop von CSP als Fusion mit dem *Surface* Antigen des Hepatitis B Virus zusammen. Das RTS-Fusionsprotein wird rekombinant mit weiteren Surface-Antigenen coexprimiert (RTS,S) sodass RTS und S sich zu einem Virus-ähnlichen Partikel zusammensetzen auf dessen Oberfläche sich das RT-Antigen des Parasiten befindet. RTS,S wird zudem in Kombination mit dem Adjuvans AS01 verabreicht, welches sich aus den Substanzen QS-21 und 3-O-desacyl-4'-monophosphoryl-lipid A (MPL) zusammensetzt. Die Substanz QS-21 entspricht einem Extrakt aus *Quillaria Saponaria* (Seifenrindenbaum), wo hingegen MPL einem Lipopolysaccharid aus *Salmonella minnesota* entspricht. Beide Substanzen sollen bei Verabreichung des Impfstoffes die Immunantwort stimulieren (Garçon et al., 2003; Draper et al., 2018; Didierlaurent et al., 2017). Klinische Studien zeigten, dass RTS,S bei afrikanischen Kindern im Alter zwischen 5 und 17 Monaten ein Jahr nach der Impfung in 56% der Fälle einen Schutz vor einer klinischen

Malaria vermittelte (Bejon et al., 2008). In einer weiteren Studie, bei der Kinder zwischen 5 und 17 Monaten drei Dosen des Impfstoffs über einen Zeitraum von vier Jahren erhielten, konnte eine ähnliche Effizienz beobachtet werden. Hierbei konnte 18 Monate nach Erhalt der letzten Dosis in 46% der Fälle ein Schutz vor einer klinischen Malaria beobachtet werden. Zudem konnte gezeigt werden, der Schutz bei Säuglingen im Alter zwischen 6 und 12 Wochen mit 27% deutlich geringer war (The RTS,S Clinical Trials Partnership, 2014). Weitere Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass der Impfschutz nicht von Dauer ist, sodass nach sieben Jahren nur noch in 4,4% der Fälle ein Schutz vor einer klinischen Malaria beobachtet werden konnte (Olotu et al., 2014; Olotu et al., 2016). Neben den ernüchternden Resultaten der RTS,S-Studien wird jedoch eine Zahl vielversprechender weiterer Ansätze verfolgt:

1. Das potentielle PfSPZ-Vakzin. Hierfür werden Sporozoiten durch Bestrahlung attenuiert, sodass diese nicht mehr replizieren können, und anschließend zur Immunisierung injiziert. Erste Untersuchungen mit attenuierten Sporozoiten erfolgten bereits vor ca. 50 Jahren, wobei eine hohe Effizienz beim Schutz vor Malaria in Mäusen gezeigt werden konnte (Nussenzweig et al., 1967; Nussenzweig et al., 1969). In weiteren Untersuchungen konnte auch beim Menschen ein vielversprechender Impfschutz mit einer Effizienz von bis zu über 90% bei Inokulation von attenuierten Sporozoiten durch Mücken (Clyde et al., 1973; Rieckmann et al., 1974; Hoffman et al., 2002) oder bei intravenöser Injektion (Seder et al., 2013; Ishizuka et al., 2016) beobachtet werden. Des Weiteren konnte ein vielversprechender Schutz durch Infektion mit nicht attenuierten Sporozoiten durch Mücken bei gleichzeitiger Chemoprophylaxe mittels Chloroquin oder Mefloquin beobachtet werden (Roestenberg et al., 2009; Roestenberg et al., 2011; Bijker et al., 2013; Bijker et al., 2014a; Bijker et al., 2014b). Dieser Effekt konnte ebenfalls bei intravenöser Injektion in Kombination mit Chemoprophylaxe gezeigt werden und resultierte bei optimaler Sporozoiten-Dosis in einem Impfschutz in 100% der Fälle (Gómez-Pérez et al., 2015; Mordmüller et al., 2015; Bastiaens et al., 2016; Mordmüller et al., 2017).

2. Blutstadien-spezifische Impfstoffkandidaten. Darüber hinaus werden ebenso essentielle Proteine der intraerythrozytären Stadien des Parasiten als Antigene für die Impfstoffentwicklung in Betracht gezogen (Teo et al., 2016). Einen entscheidenden Schritt während der asexuellen Replikation in roten Blutzellen stellt die Wirtszellinvasion dar, weshalb essentielle Invasionsliganden potentielle Targets für eine Immunisierung darstellen (Beeson et al., 2016).

2.1 Der Rh5-CyRPA-Ripr-Komplex. Einen vielversprechenden Vakzin-Kandidaten stellt das *Reticulocyte Binding Homologue 5* (Rh5) dar, welches als Komplex mit den Proteinen Ripr (*Rh5-interacting Protein*) und CyRPA (*Cysteine-Rich Protective Antigen*) auf der Oberfläche von Merozoiten eine essentielle Rolle bei der Wirtszellinvasion spielt (Crosnier et al., 2011; Volz et al., 2016; Wong et al., 2019). Erste klinische Untersuchungen zeigten, dass eine Vakzinierung mit Rh5 im Menschen die Bildung neutralisierender Antikörper induziert, welche das Parasitenwachstum *in vitro* inhibieren können (Payne et al., 2017). Aktuelle Untersuchungen konnten zudem bestätigen, dass auch das interagierende Protein Ripr einen

vielversprechenden Vakzin-Kandidaten darstellt. Antikörper gegen Ripr zeigten *in vitro* eine stärkere Inhibierung des Parasitenwachstums als Antikörper gegen Rh5, CyRPA oder den Gesamtkomplex (Healer et al., 2019).

2.2 Das chimere Protein PfCP-2.9. Des Weiteren stellen auch das *Merozoite Surface Protein 1* (MSP1) sowie das *Apical Membrane Antigen 1* (AMA1) als essentielle Invasine entsprechende Vakzin-Kandidaten dar und zeigten in Form eines chimären Proteins (*PfCP-2.9*) bei Tests in Kaninchen und Affen eine hohe Immunogenität. Zudem konnten die gebildeten Antikörper das Parasitenwachstum *in vitro* inhibieren (Pan et al., 2004). In ersten klinischen Studien konnte der potentielle Impfstoff zudem als sicher, gut tolerierbar und immunogen beschrieben werden. Jedoch konnte keine funktionelle Aktivität gegen den Erreger nachgewiesen werden (Hu et al., 2008b; Malkin et al., 2008).

2.3 Full-Length MSP1. In aktuellen Untersuchungen wurde zudem erstmals rekombinantes Full-Length MSP1 im Menschen getestet. Dieses konnte aufgrund der Größe von ca. 200 kDa bisher nicht erfolgreich heterolog exprimiert werden. Im Test konnte gezeigt werden, dass MSP1 sicher und hoch immunogen ist. Obwohl die gebildeten Antikörper *in vitro* Merozoiten opsonierten, konnte jedoch keine Inhibierung des Parasitenwachstums oder der Wirtszellinvasion nachgewiesen werden (Blank et al., 2020).

3. Gametozyten/Transmissions-blockierende Vakzine. Eine weitere Strategie stellen Impfstoffe dar, die eine Transmission des Erregers blockieren. Entsprechend stehen hierbei Antigene im Fokus, die essentiell für die Entwicklung der sexuellen Stadien in der Mücke sind. Bisher untersuchte Kandidaten sind beispielsweise die Proteine *Pfs230*, *Pfs25* und *Pfs28*, die auf der Oberfläche von Gametozyten, Zygoten und Ookineten exprimiert werden. Untersuchungen konnten zeigen, dass Antikörper gegen diese Oberflächenproteine eine Inhibierung der Erregertransmission vermitteln können (Pradel, 2007). In einer ersten klinischen Studie am Menschen wurde *Pfs25* in Form von Virus-ähnlichen Partikeln (als Fusion mit dem Hüllprotein des Alfalfa Mosaik Virus) verabreicht, wobei eine akzeptable Sicherheit und Tolerierbarkeit beschrieben werden konnte. Zudem konnte das Vakzin die Bildung *Pfs25*-spezifischer Antikörper induzieren, die jedoch nur eine schwache Inhibierung der Erregertransmission vermitteln konnten (Chichester et al., 2018).

1.1.7 weitere Präventionsstrategien

Da bisher kein Impfstoff verfügbar ist, der eine langanhaltende Immunität vermittelt, kommen besonders in endemischen Gebieten Afrikas weitere Präventionsstrategien zum Einsatz, die zur Reduzierung der Malariainfektionen beitragen sollen. Zur Malaria-Prävention empfiehlt die WHO Maßnahmen zur Vektorkontrolle (Reduzierung der Wahrscheinlichkeit von Mückenstichen) sowie eine Chemoprävention für einen Teil der Bevölkerung (schwängere Frauen, Kinder und andere Risikogruppen).

Eine der Hauptstrategien zur Vektorkontrolle ist das Schlafen unter Insektizid-behandelten Bettnetzen (*Insecticide-treated Nets*, ITNs), die laut WHO vor allem in den sub-Sahara Regionen zur Kontrolle des Mücken-Vektors zum Einsatz kommen. Im Jahr 2018 besaßen 72% der Haushalte in der Region wenigstens ein Netz, wobei 57% der Bevölkerung Zugang zu Netzen hatte und 40% der Bevölkerung in Haushalten mit ausreichend Netzen wohnte (WHO, 2019a Bhatt et al., 2015; Acosta et al., 2018). Diese Zahlen stellen laut WHO eine deutliche Verbesserung im Vergleich zum Jahr 2010, jedoch keine deutliche Veränderung zum Jahr 2016 dar. Bezüglich der Anwendung konnte gezeigt werden, dass jedoch nur 50% der Bevölkerung im Jahr 2018 die verfügbaren Netze auch nutzte. Trotz dessen stellt auch diese Zahl eine Verbesserung zum Jahr 2010 dar, wo nur 29% der Bevölkerung die vorhandenen Netze nutzte (WHO, 2019a Bhatt et al., 2015; Acosta et al., 2018). Da Mücken, die mit den Netzen in Kontakt kommen, aufgrund des vorhandenen Insektizids sterben und folglich auch Menschen ohne Bettnetz nicht mehr stechen können, kommt es laut WHO zu einer Art „Gemeinschaftseffekt“. Studien lassen vermuten, dass eine Anwendung durch 50% der Mitglieder einer Gemeinschaft zu einem nahezu vollständigen Schutz der übrigen Mitglieder führen kann (Majambere et al., 2010; Keating et al., 2011; West et al., 2014; Pinder et al., 2015; West et al., 2015).

Eine weitere Strategie zur Dezimierung der Mückenpopulation war das großflächige Ausbringen von Insektiziden. Hierfür wurde seit den 1950er Jahren die Substanz Dichlodiphenyltrichlorethan (DDT) verwendet, die Mücken effektiv abtötet. Da DDT aufgrund seiner hohen Stabilität jedoch im Menschen und der Umwelt akkumuliert, wurden negative Langzeitwirkungen befürchtet (Carson, 1962; Wolff, 2000; Longnecker, 2005; Ezkenazi et al., 2009). Im Jahr 2004 wurde multilateral vereinbart DDT nur noch zur Bekämpfung krankheitsübertragender Insekten einzusetzen (Stockholmer Konvention, 2001). Somit kommt DDT auch heute noch in Afrika als Insektizid zum Einsatz.

Zudem stellt das Versprühen von Insektiziden in Innenräumen (*Indoor Residual Spraying*, IRS) eine weitere Maßnahme zur Kontrolle der Mückenpopulation dar. Im Jahr 2010 hatten 10% der afrikanischen Bevölkerung in Risikogebieten Zugang zu diesen Schutzmaßnahmen. Bis zum Jahr 2018 sank diese Zahl auf 4,5% (WHO, 2019a). Laut WHO stellt das Auftreten von Resistenzen in der Mückenpopulation gegen die gängigen Pyrethroid-Insektizide eine mögliche Erklärung für diese Entwicklung dar. Als Reaktion auf entsprechende Resistenzen kommen nun andere Insektizide zum Einsatz, die jedoch deutlich teurer und demnach nicht in allen Regionen verfügbar sind (WHO, 2019a).

Studien konnten jedoch zeigen, dass vor allem die kombinierte Anwendung der Insektizid-behandelten Bettnetze sowie das *Indoor Residual Spraying* zu erheblichen Erfolgen bei der Verminderung der Infektionszahlen führte (Bhatt et al., 2015).

Unter bestimmten Umständen und in einigen Gebieten kann laut WHO zudem das *Larval Source Management* (LSM) mit Modifizierung der Umwelt zum Einsatz kommen. Ziel dieser Strategie ist es die Entwicklung von Larven zu adulten Stechmücken zu verhindern (Kitron &

Spielmann, 1989; Bockarie et al., 1999; Killeen et al., 2002; Fillinger & Lindsay, 2011). Mögliche Maßnahmen hierfür sind das Trockenlegen stehender Gewässer sowie das Ausbringen von Larviziden oder natürlicher Prädatoren in stehende Gewässer (WHO, 2019b). Bei einer Studie in Sri Lanka konnte durch das Ausbringen von Larviziden eine Reduktion der Parasiten Prävalenz um 90% erreicht werden. Auch Studien in urbanen Regionen Indiens konnte eine Verringerung der Malaria Inzidenz um 75% beschrieben, die durch das Ausbringen von Larviziden sowie das Entfernen offenstehender Wasser-Container erreicht werden konnte (Tusting et al., 2013).

Eine Chemoprävention wird von der WHO nur für bestimmte Risikogruppen wie schwangere Frauen oder Kinder empfohlen. Hierbei kommen verschiedene Therapeutika zum Einsatz, die präventiv verabreicht werden können und im Falle einer Infektion das Risiko eines kritischen Verlaufs der Erkrankung deutlich mindern. Für schwangere Frauen wird beispielsweise eine regelmäßige Präventivbehandlung (*Intermittent Preventive Treatment in Pregnancy*, IPTp) mit Sulfadoxin-Pyrimethamin (SP) empfohlen. IPTp-SP reduziert nachweislich das Risiko für eine Anämie während der Schwangerschaft sowie Untergewicht des Neugeborenen und führt zu einer Senkung der perinatalen Mortalität (WHO, 2018a). Im Jahr 2018 haben 60% der schwangeren Frauen in entsprechenden Risikogebieten Afrikas mindestens eine Dosis der Präventivbehandlung erhalten (WHO, 2019a). Die Präventivbehandlung von Kindern (*Intermittent Preventive Treatment in Infants*, IPTi) mit Sulfadoxin-Pyrimethamin kann ebenso vor einer klinischen Malaria mit Anämie schützen (WHO, 2017). Für Kinder im Alter zwischen 3 und 59 Monaten empfiehlt die WHO zudem eine saisonale Malaria Chemoprävention (*Seasonal Malaria Chemoprevention*, SMC) mit Amodiaquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin (AQ+SP), wodurch das Risiko für schwere Krankheitsverläufe um 75% reduziert werden kann (WHO, 2013). Im Jahr 2018 erhielten 62% der Kinder der Zielgruppe Zugang zur SMC (WHO, 2019a).

Darüber hinaus sind weitere Maßnahmen zum persönlichen Schutz wie das Tragen individueller Schutzkleidung sowie die Anwendung von Repellents zum Schutz vor Insektenstichen möglich. Eine regelmäßige und korrekte Anwendung scheint hier jedoch ein nicht unerhebliches Hindernis darzustellen (Sluydts et al., 2016).

1.2 Biologie des Erregers *Plasmodium falciparum*

1.2.1 Systematik

Plasmodium falciparum ist ein einzelliger Eukaryont und stellt einen humanpathogenen Protozoen dar. Die Gattung *Plasmodium* gehört der Familie der *Plasmodiidae* an, die der Ordnung der Haemosporida zugeordnet werden kann. Die Haemosporida und somit auch die Gattung *Plasmodium* sind neben Anderen in der phylogenetischen Gruppe der Apicomplexa zusammengefasst. Die Gruppe der Apicomplexa schließt neben *Plasmodium* zudem weitere Gattungen humanpathogener Parasiten wie *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Babesia* und

Theileria ein (Adl et al., 2012). Diese bilden zusammen mit den Dinoflagellaten (Dinoflagellata) und den Wimperntierchen (Ciliophora) das Phylum der Alveolata (Cavalier-Smith, 1991; Cavalier-Smith, 1993; Storch & Welch, 1999).

Ein typisches Merkmal der Apicomplexa ist die zelluläre Polarität, weshalb alle Vertreter des Stammes einen elektronendichten Bereich am apikalen Pol der Zelle aufweisen, den namensgebenden Apikalkomplex. Am Apikalkomplex weist die Zelle zudem Rhoptrien, Mikronemen und elektronendichte Granula (*Dense Granules*) als typische Organellen auf. Ein weiteres Merkmal einiger Apicomplexa ist der Apikoplast, wobei es sich um ein Plastid handelt, welches vermutlich über sekundäre Endosymbiose in die Zelle gelangt ist, und ein Chloroplasten-Relikt darstellt (McFadden et al., 1996; Moore et al., 2008; Janouskovec et al., 2010). Im Apikoplasten finden essentielle Stoffwechselforgänge wie die Fettsäure- und Isoprenoidsynthese statt (Lim & McFadden, 2010).

Die Gattung *Plasmodium* setzt sich aus über 200 verschiedenen Arten zusammen, von denen die fünf Arten *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, und *P. knowlesi* als humanpathogen gelten (Garcia, 2001). Wie sich die Spezifität dieser Arten für den Menschen evolutiv entwickelt hat, ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Untersuchungen lassen jedoch drauf schließen, dass die Art *P. falciparum* vom Gorilla auf den Menschen überggesprungen ist (Liu et al., 2010). Aktuelle Untersuchungen konnten zeigen, dass der Invasionsligand Rh5 von *P. falciparum* sich durch Punktmutationen vom entsprechenden Ortholog der Gorilla-infizierenden Art *P. praefalciparum* unterscheidet (Galaway et al., 2019). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine einzige Punktmutation in Rh5 dazu führen kann, dass der spezifische Rezeptor Basigin im Gorilla nicht mehr gebunden werden kann, jedoch im Menschen eine Bindung des Rezeptors möglich ist. Somit stellt dies einen möglichen Mechanismus für die Adaptation von *P. Praefalciparum* an den Menschen dar (Galaway et al., 2019). Darüber hinaus können jedoch auch inaktivierende Mutationen im Invasionsliganden EBA165 dazu führen, dass der Parasit humane Erythrozyten, jedoch keine Erythrozyten von Schimpansen mehr infizieren kann (Proto et al., 2019).

1.2.2 Lebenszyklus

1.2.2.1 Überblick

Der Erreger *Plasmodium falciparum* weist einen komplexen Lebenszyklus auf, der zwischen asexueller Replikation im Menschen und sexueller Vermehrung in der Mücke wechselt. Der Erreger wird in Form von Sporozoiten bei einer Blutmahlzeit der weiblichen Mücke in den Menschen injiziert und gelangt über den Blutkreislauf zunächst in die Leber. In den Hepatozyten findet die erste asexuelle Vermehrung des Parasiten statt, wobei mehrere Tausend Merozoiten entstehen. Diese werden anschließend in Form von Vesikeln (Merosomen) in die Sinusoide der Leber entlassen. Im Blut findet eine weitere Phase der asexuellen Replikation statt. Hierbei infizieren die Merozoiten rote Blutzellen und entwickeln

sich intrazellulär über das Ringstadium und den Trophozoiten zum Schizonten, der bis zu 32 Tochtermerozoiten enthält. Der reife Schizont platzt und entlässt die Merozoiten in die Blutbahn, sodass diese erneut Erythrozyten infizieren können. Einige Parasiten können diesen asexuellen Zyklus jedoch verlassen und sich zu geschlechtlich determinierten Gametozyten differenzieren. Diese können beim Stich durch eine weitere Mücke aufgenommen werden, woraufhin in der Mücke die sexuelle Reproduktion stattfindet. Hierbei entwickeln sich die Gametozyten zu Gameten, die anschließend zur Zygote fusionieren. Die Zygote entwickelt sich anschließend zum motilen Ookineten, der sich anschließend als Oocyste im Darmepithel der Mücke einnistet. In der Oocyste entstehen erneut Sporozoiten, die in die Hämolymphe der Mücke entlassen werden und anschließen in die Speicheldrüsen wandern. Bei einer weiteren Blutmahlzeit können diese Erreger erneut auf einen Menschen übertragen werden (Abb.1.4). Die einzelnen Phasen des Lebenszyklus sind im Folgenden näher erläutert.

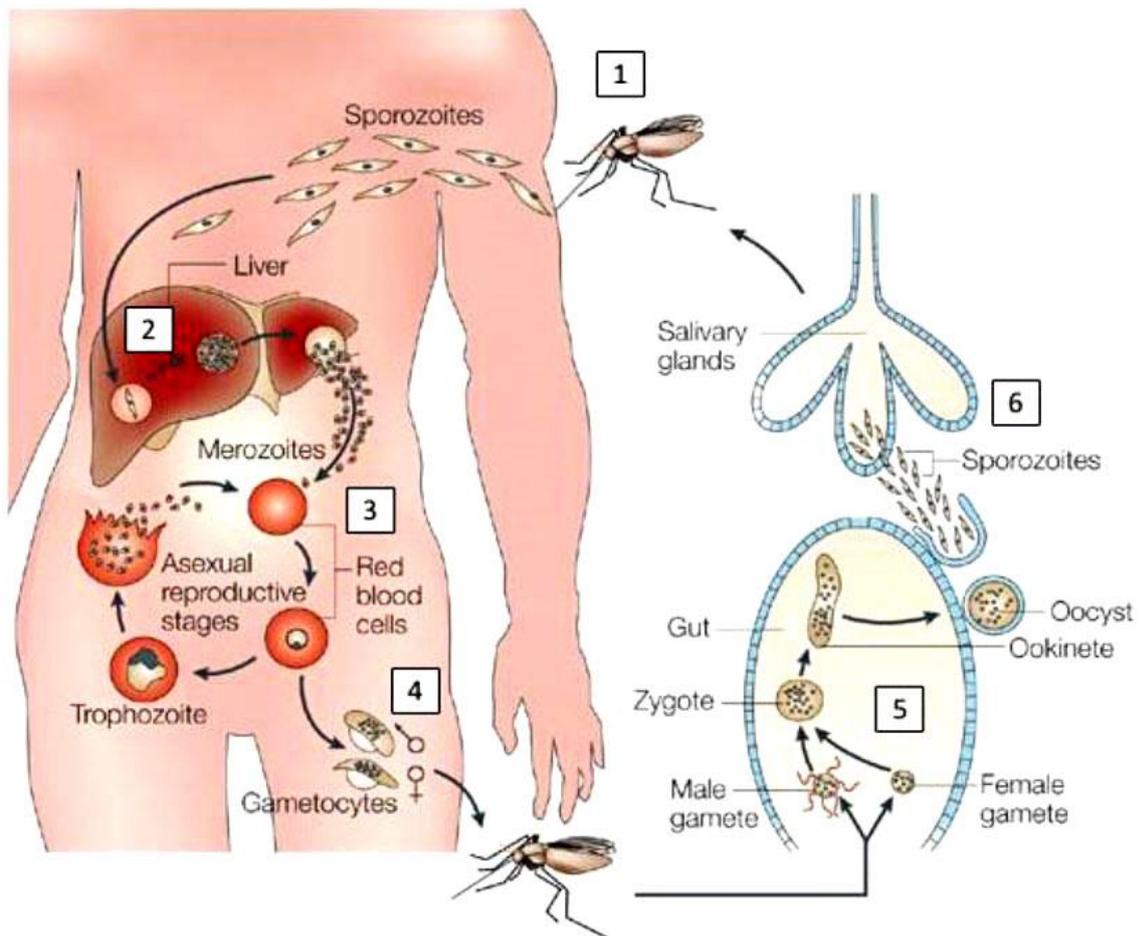


Abb.1.4: Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*. Der Erreger wird in Form von Sporozoiten bei der Blutmahlzeit einer weiblichen Mücke in die Blutbahn des Menschen injiziert [1]. Der Erreger gelangt über den Blutkreislauf in die Leber, wo eine erste asexuelle Vermehrung stattfindet [2]. Anschließend gelangt der Parasit in Form von Merozoiten erneut in den Blutstrom, wo eine weitere asexuelle Vermehrung [3] und die Bildung geschlechtlicher Gametozyten [4] stattfindet. Die Gametozyten können erneut von einer Mücke aufgenommen werden, woraufhin es nach der geschlechtlichen Vermehrung [5] erneut zur Bildung von Sporozoiten kommt. Abbildung aus Harper & Harmon, 2005 (modifiziert).

1.2.2.2 Asexuelle Leberstadien

Nachdem Sporozoitien beim Stich der Mücke übertragen wurden, penetrieren diese aktiv BlutgefäÙe um über den Blutkreislauf in die Leber gelangen zu können. Dort können die Erreger über Sinosoiden in die Leber migrieren, wo sie zunächst Kupfferzellen oder Epithelzellen passieren, bevor sie einen Hepatozyten erreichen (Amino et al., 2006; Hopp et al., 2015).

Nach Erreichen des ersten Hepatozyten, durchwandert der Parasit jedoch noch mehrere weitere dieser Zellen, bevor eine Replikation beginnt. Die Ursache hierfür konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Untersuchungen zeigten jedoch, dass Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) auf der Oberfläche der Hepatozyten mit dem Wechsel vom Passieren der Zellen zur finalen Invasion und anschließender Replikation in Zusammenhang steht. So werden Zellen mit wenig sulfatiertem HSPG vornehmlich durchwandert, Zellen mit stark sulfatiertem HSPG auf der Oberfläche jedoch invadiert (Coppi et al., 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von GAPDH auf der Oberfläche der Sporozoitien mit CD81 auf der Oberfläche von Kupffer-Zellen das Durchwandern der Zellen ermöglicht (Cha et al., 2016). Ebenso scheinen die Proteine PLP1 (*Perforin-Like Protein 1*) und SPECT (*Sporozoite Protein Essential For Cell Traversal*) eine essentielle Rolle beim Passieren von Hepatozyten zu spielen (Yang et al., 2017b).

Zur Invasion von Hepatozyten findet zunächst eine Anheftung der Sporozoitien an die Zelloberfläche statt, die durch die Proteine CSP (*Circumsporozoite Protein*) sowie TRAP (*Thrombospondin-Related Anonymous Protein*) vermittelt wird (Sultan et al., 1997; Nussenzweig et al., 1985). Die anschließende Invasion der Hepatozyten scheint vor allem durch die 6-Cys Proteine P36 und P52 vermittelt zu werden, wobei das Protein P36 den Rezeptor Ephrin A2 auf der Oberfläche der Hepatozyten bindet, welches auch für die anschließende Ausbildung einer parasitophoren Vakuole bedeutsam ist (Ishino et al., 2005; Labaied et al., 2007; VanBuskirk et al., 2009; Kaushansky et al., 2015). Als potentielle Interaktoren für P36 und P52 werden zudem CD81 und SR-B1 (*Scavenger Receptor B1*) diskutiert (Manzoni et al., 2017; Arredondo et al., 2018). Darüber hinaus spielen auch AMA1 (*Apical Membrane Antigen 1*) und MAEBL (*Merozoite Apical Erythrocyte-Binding Ligand*) eine wichtige Rolle bei sowohl dem Durchwandern als auch der Invasion von Hepatozyten (Yang et al., 2017b).

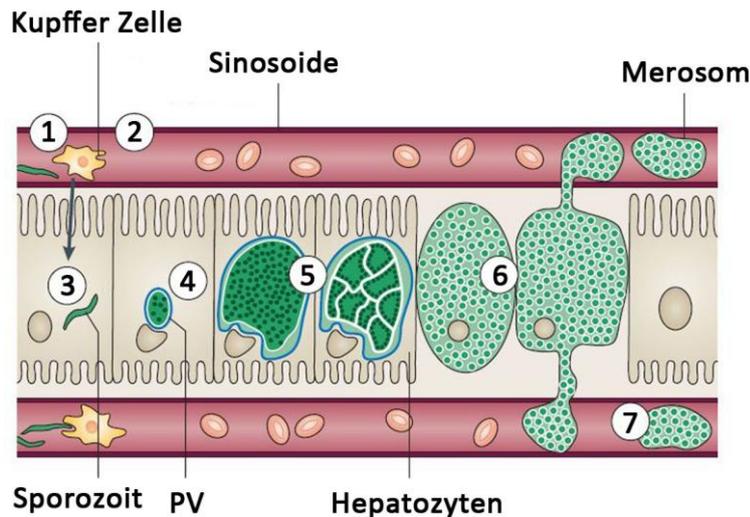


Abb.1.5: Asexuelle Leberstadien. Sporozoiten erreichen über die Sinusoide die Leber [1] und durchwandern Kupffer- oder Epithelzellen [2] bevor sie einen Hepatozyten erreichen. Nach Durchwandern mehrerer Hepatozyten [3], kommt es schließlich zur finalen Invasion und Ausbildung einer parasitären Vakuole [4]. Nach der asexuellen Replikation [5-6] werden Merozoiten in Merosomen in den Blutstrom entlassen [7]. Abbildung aus De Niz et al., 2016 (modifiziert).

Im Hepatozyten findet die erste asexuelle Replikation statt, wobei mehrere tausend Merozoiten gebildet werden (Abb.1.5). Beim Egress kommt es anschließend zu einer Destabilisierung des Zytoskeletts der Hepatozyten (Burda et al., 2017), sodass die Merozoiten in sehr flexiblen Vesikel-ähnlichen Strukturen, den sog. Merosomen, in die Sinusoide der Leber entlassen werden können. Diese wandern über den Blutkreislauf in die Kapillargefäße der Lunge, wo es zu einer Freisetzung der Merozoiten in den Blutstrom kommt (Sturm et al., 2006; Tarun et al., 2006; Baer et al., 2007).

1.2.2.3 Invasion von Erythrozyten

Die Invasion von roten Blutzellen stellt einen entscheidenden Schritt im Replikationszyklus des Parasiten dar und entspricht einem hoch komplexen Prozess, der durch ein Zusammenspiel zahlreicher Proteine vermittelt wird (Hu et al., 2010; Cowman et al., 2017). Die Invasion von Erythrozyten erfolgt durch invasive Stadien des Parasiten, die sog. Merozoiten, die beim Platzen eines Schizonten freigesetzt werden und eine Größe von 1-2 μm aufweisen (Bannister et al., 1986). Der Merozoit weist eine Polarität auf und kann somit in einen apikalen und einen distalen Bereich unterteilt werden. Am apikalen Pol des Merozoiten befinden sich verschiedene sekretorische Organellen, die Rhoptrien und Mikronemen sowie die *Dense Granules* und die Exonemen (Abb.1.6). Diese spezifischen Kompartimente dienen der Lagerung einer Vielzahl verschiedener Proteine, die am Prozess der Invasion beteiligt sind und hierfür auf die Oberfläche des Merozoiten entlassen werden.

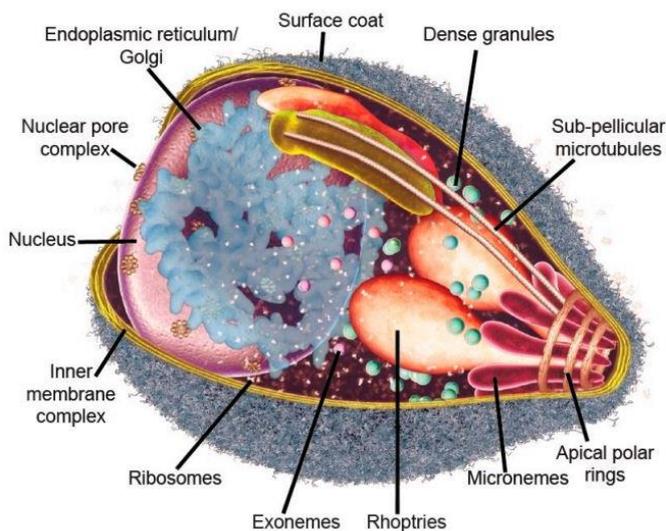


Abb.1.6: Schematische Darstellung des Merozoiten. Die Abbildung stellt den Merozoiten mit den Rhoptrien und Mikronemen sowie den *Dense Granules* und Exonemen als typische sekretorische Organellen am apikalen Pol des Parasiten schematisch dar. Im distalen Bereich befindet sich der Zellkern mit endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat sowie der Apikoplast und das Mitochondrium. Unter der Plasmamembran weist der Parasit den Alveolata-typischen *Inner Membrane Complex* (IMC) auf. Abbildung aus Cowman et al., 2012 (modifiziert).

Die Invasion von roten Blutzellen stellt den einzigen Zeitpunkt während der Blutphase dar, zu dem der Parasit extrazellulär vorliegt und somit für das Immunsystem zugänglich ist. Um einem Angriff des Immunsystems während dieser Phase zu entgehen, findet die Wirtszellinvasion in weniger als einer Minute statt (Dvorak et al., 1975; Aikawa et al., 1978; Gilson & Crabb, 2009; Treeck et al., 2009; Yahata et al., 2012). Der Invasionsprozess kann aufgrund seiner Dynamik und der beteiligten Proteine in unterschiedliche Phasen unterteilt werden (Abb.1.7).

Zunächst besteht ein initialer Kontakt zwischen Erreger und Wirtszelle. Dieser wird durch GPI-verankerte *Merozoite Surface Proteins* wie MSP1 auf der Oberfläche des Merozoiten vermittelt (Holder et al., 1992; Gilson et al., 2006). MSP1 wird hierbei durch die *Subtilisin-like Proteases* SUB1 und SUB2 in mehrere Fragmente prozessiert, die mit geringer Affinität reversibel mit den Rezeptoren AE1 (*Anion-Exchange Protein 1/Band 3*) und Glycophorin A auf der Wirtszelloberfläche interagieren (Blackman & Holder, 1992; Goel et al., 2003; Cowman et al., 2012; Baldwin et al., 2015). Neben MSPs finden sich weitere GPI-verankerte Proteine der 6-Cys-Familie wie Pf12 und Pf38 oder das cysteinreiche Protein Pf92 auf der Oberfläche von Merozoiten, die vermutlich ebenso an der initialen Anheftung an den Erythrozyten beteiligt sind (Sanders et al., 2005). Da die initiale Anheftung an die Wirtszelle eine reversible Interaktion darstellt, kann der Merozoit sich weiter auf der Oberfläche der Wirtszelle bewegen und dabei seine Orientierung ändern.

Sobald jedoch der Apex des Merozoiten mit der Oberfläche des Erythrozyten in Kontakt kommt, findet eine irreversible Bindung statt, sodass der apikale Pol des Parasiten der Oberfläche der Wirtszelle zugewandt ist. Die irreversible Bindung wird durch Adhäsine vermittelt, die aus den Mikronemen und Rhoptrien am Apex des Merozoiten auf die Oberfläche des Parasiten sekretiert werden, wodurch eine sog. „*Tight-Junction*“ zwischen dem Parasiten und der Wirtszelle entsteht, die einen direkten physikalischen Kontakt

zwischen den beiden Zellmembranen darstellt (Aikawa et al., 1978; Bannister & Mitchell, 1989). Diese meisten Adhäsine können zwei Proteinfamilien zugeordnet werden: Die *Reticulocyte-Binding Protein Homologues* (RH)-Proteine der Rhoptrien und die *Erythrocyte-Binding-Like* (EBL)-Proteine der Mikronemen (Cowman & Crabb, 2006).

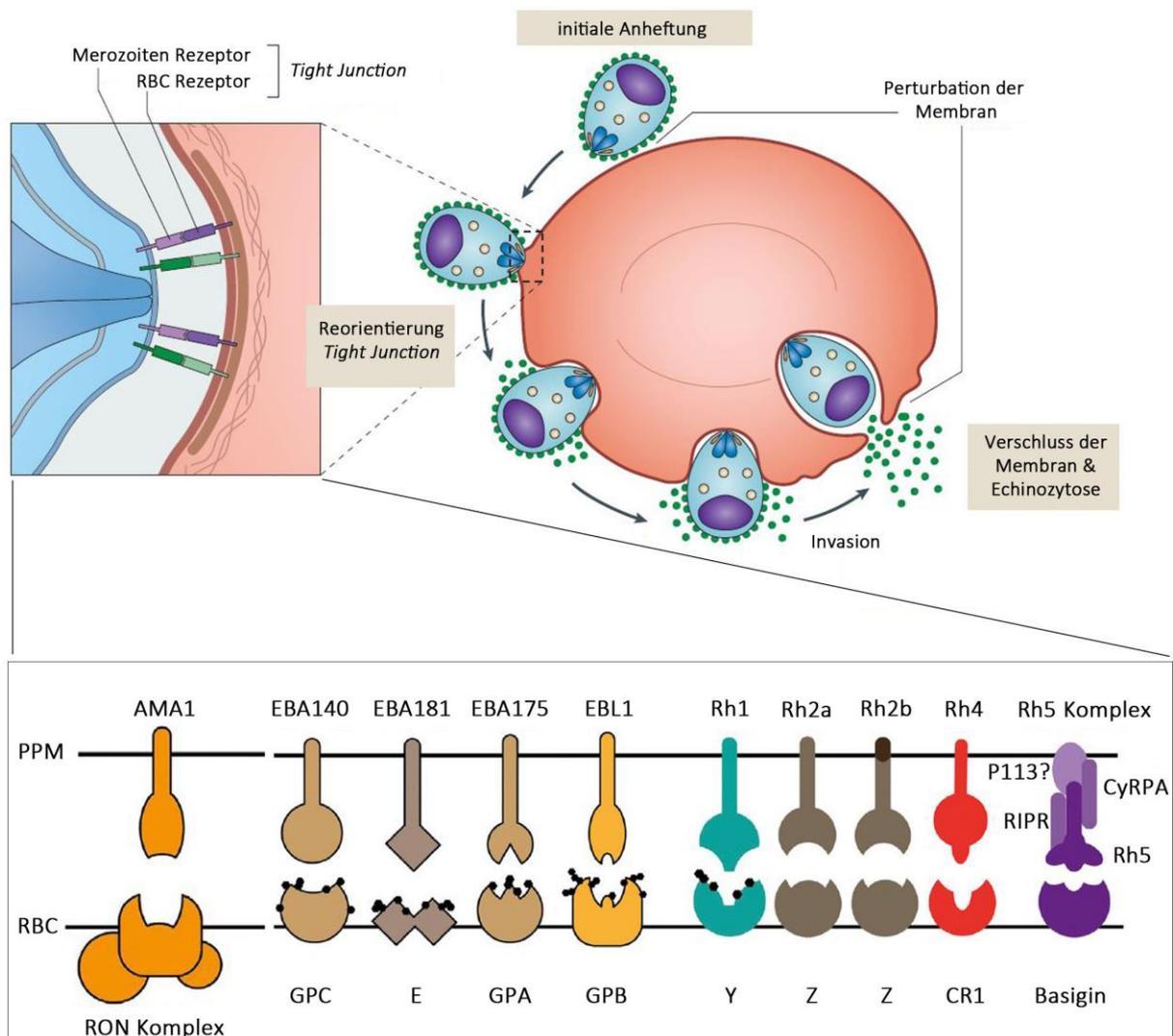


Abb.1.7: Invasion von Erythrozyten. Nach einer initialen Anheftung an den Erythrozyten und Reorientierung des Merozoiten kommt es zur Ausbildung einer „Tight-Junction“ zwischen dem apikalen Pol des Parasiten und der Membran der Wirtszelle. Die Bindung zwischen Merozoit und Wirtszelle erfolgt durch verschiedene Rezeptor-Liganden-Interaktionen. Invasionsliganden des Parasiten und (falls bekannt) die entsprechenden Rezeptoren der Wirtszelle sind im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Während der aktiven Aktin/Myosin-vermittelten Invasion bewegt sich die „Tight-Junction“ in Form einer „Moving-Junction“ entlang des Parasiten. Nach Invasion wird die Wirtszellmembran verschlossen und der Erythrozyt tritt in die Phase einer reversiblen Echinozytose ein. Oberer Teil der Abbildung aus De Niz et al., 2016 (modifiziert); unterer Teil der Abbildung aus Cowman et al., 2017 (modifiziert).

Die EBL-Familie setzt sich aus verschiedenen *Erythrocyte-Binding Antigens* wie EBA140 (BAEBL), EBA171 und EBA181 (JSEBL) sowie EBL1 und MAEBL zusammen (Camus & Hadley, 1985; Peterson & Wellems, 2000; Mayer et al., 2001, Thompson et al., 2001; Blair et al., 2002; Gilberger et al., 2003a; Maier et al., 2003;). Das Homolog EBA165 (PEBL) wird in *P. falciparum* nicht als funktionelles Protein exprimiert (Triglia et al., 2001a; Proto et al., 2019). Für die Homologe EBA175, EBL1 und EBA140 konnten die Sialoglycoproteine Glycophorin A, B und C als Rezeptoren auf der Oberfläche des Erythrozyten identifiziert werden (Orlandi et al., 1992; Dolan et al., 1994; Sim et al., 1994; Duraisingh et al., 2003a; Lobo et al., 2003; Mayer et al., 2009). Somit ist die Vermittlung der Invasion durch EBA140, EBA175 und EBL1 Sialinsäure-abhängig. Der Ligand EBA181 bindet ebenfalls Sialinsäure-Reste und scheint in der Lage mit dem Zytoskelett-assoziierten Erythrozyten-Protein 4.1R zu interagieren (Gilberger et al., 2003b; Lanzillotti & Coetzer, 2006). Sämtliche EBAs spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Erythrozyteninvasion, scheinen sich jedoch zum Teil redundant zu verhalten, sodass die Variation der verschiedenen EBAs vermutlich auch im Zusammenhang mit einer Immunevasion steht (Persson et al., 2013). Auch MAEBL ist kein essentielles Protein in asexuellen Blutstadien. Jedoch scheint MAEBL in Leberstadien und der Mücke eine essentielle Rolle bei der Wirtszellinvasion durch Sporozoiten zu spielen (Kariu et al., 2002; Saenz et al., 2008; Yang et al., 2017a).

Die RH-Proteine werden durch die Vertreter Rh1, Rh2a, Rh2b, Rh4 und Rh5 repräsentiert (Rayner et al., 2001; Triglia et al., 2001b; Stubbs et al., 2005; Triglia et al., 2005). Das Homolog Rh3 wurde hingegen als Pseudogen beschrieben (Taylor et al., 2001). Die Homologe Rh1, Rh2a und Rh2b binden unterschiedliche Rezeptoren auf der Erythrozyten-Oberfläche, die bisher nicht bekannt sind (Rayner et al., 2001; Duraisingh et al., 2003b). Die Bindung von Rh1 scheint Sialinsäure-abhängig zu sein (Triglia et al., 2005), wo hingegen Rh2a und Rh2b Sialinsäure-unabhängige Interaktionen vermitteln (De Simone et al., 2009). Für Rh4 konnte der Komplement Rezeptor 1 (CR1) als Interaktionspartner auf der Erythrozyten-Oberfläche beschrieben werden (Tham et al., 2010). Untersuchungen von Gunalan et al. (2011) zeigten zudem am Beispiel von Rh2a, dass eine Prozessierung des Liganden vermutlich die Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren vermitteln kann. Das Homolog Rh5 stellt den am besten charakterisierten Vertreter der RH-Proteine dar. Rh5 bindet den Rezeptor Basigin (CD147) auf der Oberfläche der Erythrozyten und stellt ein essentielles Protein bei der Wirtszell-Invasion dar (Baum et al., 2009; Crosnier et al., 2011). Die Struktur des Liganden als Komplex mit dem Rezeptor Basigin konnten mittels Röntgenkristallographie gelöst werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass Rh5 einen Komplex mit den Proteinen R1PR (*Rh5-interacting Protein*) und CyRPA (*Cysteine-Rich Protective Antigen*) auf der Oberfläche von Merozoiten bildet (Chen et al., 2011; Reddy et al., 2015; Volz et al., 2016). Ein weiteres interagierendes Protein ist das GPI-verankerte P113, welches sowohl mit Rh5 als auch mit Basigin interagiert und möglicherweise den Rh5-Komplex in der Merozoitenmembran verankert (Galaway et al., 2017). Die Struktur dieses Komplexes konnte ebenfalls mittels Cryo-EM gelöst werden und scheint essentiell für die Bindung des Rezeptors Basigin sowie für die Integration von Rh5 und R1PR in die Membran der Wirtszelle zu sein (Wong et al., 2019).

Darüber hinaus stellt das Mikronemen-Protein *Apical Membrane Antigen 1* (AMA1) einen essentiellen Liganden bei der Invasion von Erythrozyten dar (Triglia et al., 2000; Srinivasan et al., 2013). AMA1 bindet als Invasionsligand den Rezeptor RON2 (Srinivasan et al., 2011; Tonkin et al., 2011) als Teil des RON-Komplexes, der vom Parasiten selbst in die Membran der Wirtszelle integriert wird (Alexander et al. 2006; Collins et al., 2009; Richard et al., 2010; Tonkin et al., 2011). Zudem weist AMA1 eine zytoplasmatische Domäne auf, die mehrfach phosphoryliert vorliegt (vgl. Abschnitt 1.2.4). Diese Phosphorylierung scheint eine entscheidende Rolle für die Funktionalität von AMA1 bei der Wirtszellinvasion zu spielen (Treeck et al., 2009; Leykauf et al., 2010; Prinz et al., 2016; Patel et al., 2019; Wilde et al., 2019).

Nach Ausbildung der „*Tight-Juction*“ zwischen dem Parasiten und der Wirtszelle kommt es schließlich zur Invasion der roten Blutzelle durch den Merozoiten. Die Invasion stellt einen aktiven Prozess dar, der durch einen Aktin/Myosin-gesteuerten Motorkomplex (auch Glideosom genannt) vermittelt wird. Die Interaktion zwischen Aktin und Myosin findet zwischen der parasitären Plasmamembran und dem darunter liegenden Inneren Membran Komplex (IMC) statt (Abb.1.8). Der Innere Membran Komplex vermittelt zum einen eine strukturelle Stabilität der Zelle, dient zum anderen jedoch auch als Gerüst zur Verankerung des Glideosoms (Meissner et al., 2002; Gaskins et al., 2004; Frénel et al., 2010; Cowman et al., 2017). Zudem sind die *Glideosom-Associated Proteins* GAP40, GAP50 und GAPM in den IMC eingebettet und sind von Bedeutung für dessen Biogenese (Harding et al., 2016). Die exakte Anordnung dieser Proteine konnte bisher zwar nicht eindeutig aufgeklärt werden, jedoch scheinen die GAPs über die Untereinheit MLC1 (*Myosin Light Chain 1*) als Verankerungspunkt für Myosin A zu dienen. Das Protein GAP45 scheint zudem über Myristoylierungs- und Palmitoylierungsmotive mit dem IMC und der Plasmamembran assoziiert zu sein und durchspannt somit den dazwischen liegenden Raum (Frenal et al., 2010). Die Aktinfilamente sind wiederum über Adaptorproteine mit den cytoplasmatischen Domänen von Adhäsinen an der Plasmamembran assoziiert. Zunächst wurde angenommen, dass das Protein Aldolase diese Verbindung herstellt (Jewett & Sibley, 2003). Aktuellere Untersuchungen in *T. gondii* konnten jedoch das Protein GAC (*Glideosom-Associated Connector*) identifizieren, welches sowohl mit Aktin interagiert als auch über eine *Pleckstrin Homology*-Domäne Phosphatidsäure an der Plasmamembran bindet. Zudem kann GAC direkt mit cytoplasmatischen Domänen von Invasinen interagieren (Jacot et al., 2016; Cowman et al., 2017). Während der Invasion kommt es zudem zu einem Lösen der Rezeptor-Liganden-Bindung durch Vertreter der Rhomboid-Proteasen, sodass eine kontinuierliche Bewegung während der Penetration der Membran ermöglicht wird (Baker et al., 2006; O'Donnell et al., 2006). Nach erfolgter Invasion wird die Membran der Blutzelle fusioniert und der Parasit liegt innerhalb einer parasitophoren Vakuole in der Wirtszelle vor.

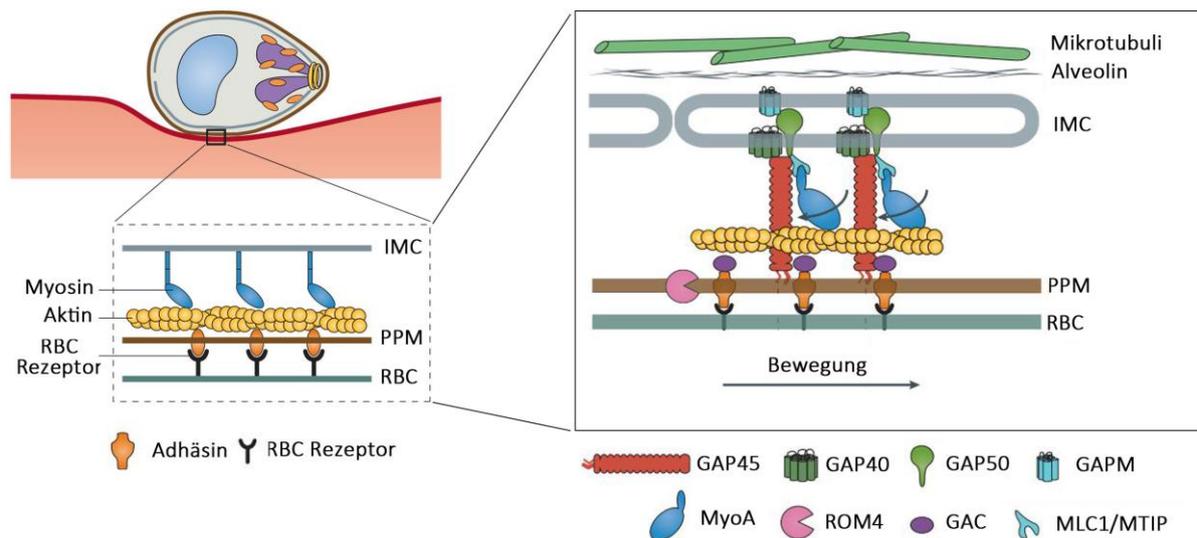


Abb.1.8: Das Glideosom. Die Motilität einiger Parasiten-Stadien sowie die aktive Wirtszellinvasion wird durch einen Motorkomplex (das Glideosom) vermittelt. Das Myosin ist über verschiedene Glideosom-assoziierte Proteine im IMC des Parasiten verankert. Die Aktinfilamente sind über das Adaptor-Protein GAC sowie verschiedene Adhäsine unter der Plasmamembran des Parasiten verankert. Die Rhomboid-Protease ROM4 löst entsprechende Bindungen im Verlauf der Aktin-Myosin-Interaktion um eine weitere Bewegung zu ermöglichen. Abbildung aus Frenal et al., 2017 (modifiziert).

Regulatorische Prozesse während der Wirtszellinvasion sind bisher nur wenig verstanden, es wird jedoch vermutet, dass der Regulation ein komplexes Ca^{2+} - und Phospholipid-Signalling zu Grunde liegt. Es konnte gezeigt werden, dass die niedrige K^+ -Konzentration im Blut nach Freisetzung der Merozoiten die Proteinsekretion aus Mikronemen und Rhoptrien sowie eine Freisetzung von Ca^{2+} induziert. Hierbei wird vermutet, dass die niedrige K^+ -Konzentration zunächst zu einer Aktivierung der Adenylylcyclase und somit zu einem Anstieg des cAMP-Level in der Zelle führt. Dies führt zu einer Aktivierung des Proteins EPAC (*Exchange Protein Activated by cAMP*), welches wiederum die Phospholipase C aktiviert, die eine Freisetzung von Ca^{2+} vermittelt. Letztlich scheint Ca^{2+} essentiell für die Sekretion von Proteinen aus den sekretorischen Organellen zu sein (Singh et al., 2010; Collins et al., 2013b; Dawn et al., 2014; Patel et al., 2019). Zudem wird angenommen, dass zunächst Mikronemenproteine entlassen werden und die Bindung von EBAs an spezifische Rezeptoren schließlich die Sekretion von Rhoptrienproteinen induziert (Singh et al. 2010). Darüber hinaus führen erhöhte Ca^{2+} und cAMP-Level zu einer Aktivierung weiterer Invasion-beteiligter Proteine. Somit kommt es beispielsweise zu einer Aktivierung der Ca^{2+} /cAMP-abhängigen Protein Kinase A. Diese ist von entscheidender Bedeutung für die Proteinsekretion und reguliert über Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von AMA1 dessen Funktionalität (Treeck et al., 2009; Leykauf et al., 2010; Prinz et al., 2016; Patel et al., 2019; Wilde et al., 2019). Gesteigerte Ca^{2+} -Level führen zudem zu einer Aktivierung von Calcium-abhängigen Proteinkinasen (CDPKs). Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die Kinase CDPK1 Invasion-beteiligte Proteine wie PKA sowie GAP45 und weitere IMC-Proteine phosphoryliert (Rees-Channer et al., 2006; Thomas et al.,

2012; Kumar et al., 2017). Somit stellen auch Kinasen potentielle Targets für Interventionsstrategien bei der Invasion von Erythrozyten dar.

1.2.2.4 Asexuelle Blutstadien

Nachdem ein Merozoit eine rote Blutzelle invadiert hat, entwickelt *P. falciparum* sich über das Ring- und Trophozoitenstadium innerhalb von ca. 48 Stunden zum reifen Schizonten (Abb.1.9). Während des Schizonten-Stadiums (ab ca. 40 hpi) erfolgt die asexuelle Vermehrung durch asynchrone Schizogonie, wobei es zur Bildung von bis zu 32 Tochtermerozoiten kommt. Die Merozoiten werden beim Egress des Schizonten in die Blutbahn entlassen (Abb.1.10) und infizieren weitere Erythrozyten.

Während des Ring- und Trophozoitenstadiums findet zunächst ein Wachstum des Parasiten statt, sodass dieser im Laufe des Replikationszyklus die Wirtszelle immer weiter ausfüllt. Als Nahrungsquelle während dieser Wachstumsphase dient das Hämoglobin der Wirtszelle, welches der Parasit aktiv aus dem Cytosol des Erythrozyten importiert und als Quelle für Aminosäuren in der Nahrungsvakuole verdaut (Sherman, 1977; Liu et al., 2006a). Neben dem Nährstoffgewinn wird durch den Import von bis zu 70% des Wirtszellcytosols Raum für weiteres Wachstum geschaffen (Francis et al., 1997; Lew et al., 2003; Hanssen et al., 2012). Der für die Aufnahme des Wirtszellcytosols zu Grunde liegende Mechanismus ist bisher nicht verstanden, es wird jedoch davon ausgegangen, dass durch einen Endozytose-ähnlichen Prozess Teile des Wirtszellcytosols in Vesikeln von der Plasmamembran zur Nahrungsvakuole im Parasiten transportiert werden (Francis et al., 1997; Aikawa et al., 1966; Elliott et al., 2008; Lazarus et al., 2008; Abu Bakar et al., 2010; Milani et al., 2015). Ein essentielles Protein für diesen Vorgang stellt VPS45 (*Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 45*) dar, dessen Inaktivierung den Transport von Wirtszellcytosol zur Nahrungsvakuole hemmt und zu einer Akkumulation von Vesikeln im Parasiten führt (Jonscher et al., 2018). Darüber hinaus scheinen auch das Protein Kelch13 und dessen Interaktionspartner Eps15 (*Epidermal Growth Factor Receptor Substrate 15*), UBP1 (*Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase 1*) und AP2 μ (*Adaptor Protein 2*) an der Aufnahme von Wirtszellcytosol beteiligt zu sein. In aktuellen Untersuchungen konnten Kelch13 und dessen Interaktionspartner in einem spezifischen Kompartiment nahe der Nahrungsvakuole lokalisiert werden. Eine Inaktivierung führt für jedes der Proteine zu einer verminderten Aufnahme von Wirtszellcytosol (Birnbauer et al., 2020; Henrici et al., 2020). Beim Verdau von Hämoglobin in der Nahrungsvakuole entsteht das toxische Abbauprodukt Hämatin. Um der Toxizität des Hämatins entgegen zu wirken, wird dieses zu unlöslichen Hämozoinkristallen polymerisiert, die als dunkles Pigment in der Nahrungsvakuole des Parasiten sichtbar sind (Arese & Schwarz, 1997; Abb. 1.9).

Nach der Invasion des Erythrozyten findet eine erhebliche Remodellierung der Wirtszelle durch den Parasiten statt. So werden Parasitenproteine gezielt in das Cytosol oder auf die Oberfläche der Wirtszelle exportiert. Ein Teil dieser Proteine wird mithilfe eines Signalmotivs (*Plasmodium Export Element*, PEXEL) aus fünf Aminosäuren (RxLxE/D/Q) exportiert (Marti et.

al., 2004). Darüber hinaus werden sog. PNEPs (*PEXEL Negative Exported Proteins*) ebenso exportiert, obwohl kein PEXEL Motiv vorhanden ist (Spielmann & Gilberger, 2010). Da es bei der Wirtszellinvasion durch Invagination der Erythrozytenmembran zur Ausbildung einer parasitophoren Vakuole (PV) kommt, müssen exportierte Proteine, die an der Plasmamembran des Parasiten sekretiert werden, darüber hinaus die Membran der PV (PVM) passieren. Dieser Transport von Proteinen entlang der PVM wird durch den PTEX-Komplex (*Plasmodium Translocon of Exported Proteins*) vermittelt (de Koning-Ward et al., 2009; Beck et al., 2014; Elsworth et al., 2014; Mesén-Ramírez et al., 2016; Ho et al., 2018). Darüber hinaus bildet die PTEX-Komponente EXP2 (*Exported Protein 2*) gemeinsam mit dem Protein EXP1 einen Kanal, der einen Nährstoffimport entlang der PVM ermöglicht (Desai et al., 1993; Garten et al., 2018; Mesén-Ramírez et al., 2019).

Eine weitere mit dem Proteinexport verbundene Modifikation der Wirtszelle ist die Ausbildung der sog. Maurers Clefts (Maurer, 1900). Hierbei handelt es sich um membranöse Zisternen-ähnliche Strukturen mit einer Größe von bis zu 500 nm (Hanssen et al., 2008). Die Maurers Clefts erscheinen bis ins späte Ringstadium (ca. 20 hpi) als motile Organellen im Cytoplasma der Wirtszelle und liegen in späteren Stadien gebunden an das Cytoskelett des Erythrozyten vor (McMillan et al., 2013; McHugh et al., 2020). Die genaue Funktion und Zusammensetzung der Maurers Clefts ist bisher nicht vollständig verstanden, es wird jedoch vermutet, dass diese ein sekretorisches Kompartiment beim Export von Proteinen darstellen (Vincensini et al., 2005; McHugh et al., 2020).

Ein prominentes Beispiel der exportierten Proteine stellt das *Erythrocyte Membrane Protein 1* (EMP1) dar, welches Bestandteil einer weiteren Modifikation der Wirtszelle, den sog. *Knobs* ist und von einer *var* Genfamilie mit ca. 60 Vertretern codiert wird (Udeinya et al., 1981; Merrick et al., 2012). Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass in den *Knobs* mithilfe des *Knob-Associated-Histidine-Rich-Proteins* (KAHRP) und vermutlich weiteren Proteinen eine spiralförmige Struktur ausgebildet wird, die eine Präsentation von EMP1 auf der Oberfläche der Wirtszelle ermöglicht (Looker et al., 2019; McHugh et al., 2020). Durch Interaktion von EMP1 mit Endothelrezeptoren oder Liganden auf der Oberfläche anderer Blutzellen vermitteln die *Knobs* eine Bindung von infizierten Erythrozyten an das Endothel der Blutgefäße (Cytoadhärenz oder Sequestrierung) sowie das Binden von weiteren uninfizierten Blutzellen (*Rosetting*) (Rowe et al., 2009; Turner et al., 2013; Wahlgren et al. 2017). Das *Rosetting* und die Sequestrierung stellen weitere Immunevasions-Strategien dar, die jedoch auch entscheidend für die Virulenz des Erregers sind. So verhindert die Cytoadhärenz, dass sich infizierte Blutzellen mit dem Blutstrom bewegen und beim Passieren der Milz eliminiert werden (Saul, 1999). Jedoch ist die Cytoadhärenz auch mitverantwortlich für schwere Verlaufsformen der Malaria, da sie zu einem Verschluss kapillarer Blutgefäße und somit zur Unterversorgung von Organen führen kann (vgl. Abschnitt 1.1.3) Das *Rosetting* stellt sicher, dass beim Egress eines Schizonten weitere Blutzellen in räumlicher Nähe zur Verfügung stehen, sodass die Effizienz der Wirtszellinvasion gesteigert wird (Wahlgren et al., 1989), ist jedoch auch für die Ausbildung von Embolien verantwortlich (vgl. Abschnitt 1.1.3). Des

Weiteren wurde für das *Rosetting* die Möglichkeit diskutiert, dass umgebenden Blutzellen während der Invasion möglicherweise eine räumliche Abschirmung vor einem Angriff durch Antikörper vermitteln. Ein entsprechender Effekt konnte jedoch nicht bestätigt werden (Rowe et al., 2002).

Im Schizontenstadium (ab ca. 40 hpi) beginnt der Parasit schließlich mit der Kernteilung und Ausbildung von Tochtermerozoiten. Die Replikation erfolgt hierbei durch Schizogonie wobei es zunächst durch asynchrone mitotische Teilung zur Bildung eines multinukleären Schizonten kommt. Erste gegen Ende der Schizogonie findet schließlich auch eine Cytokinese und die Ausbildung von Tochtermerozoiten statt (Francia & Striepen, 2014). Während der Segmentierung stellt der Innere Membran Komplex zudem ein stabilisierendes Gerüst bei der Ausbildung von Tochtermerozoiten dar (Hu et al., 2002; Striepen et al., 2007; Kono et al., 2013). Darüber hinaus befindet sich am basalen Pol des IMC eine kontraktile Ringstruktur, der sog. Basalkomplex, der die Auftrennung in Tochterzellen vermittelt (Ferguson et al., 2008; Hu, 2008a; Lorestani et al., 2010; Kono et al., 2016).

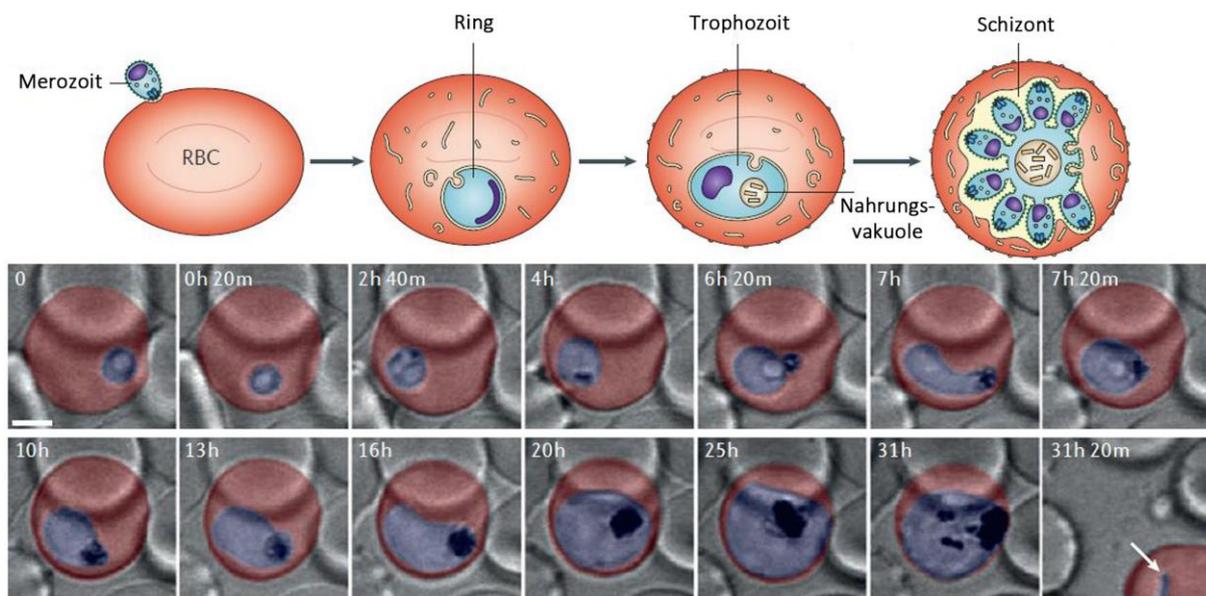


Abb.1.9: Asexuelle Blutstadien. Schematische Darstellung (oben) und *Live Cell Imaging* (unten) asexueller Blutstadien. Nach der Wirtszellinvasion entwickelt der Parasit sich über das Ringstadium und den Trophozoiten zum Schizonten. Der Schizonten entlässt anschließend Tochtermerozoiten, die weitere Erythrozyten infizieren können. Im *Live Cell Imaging* (unten) sind Wirtszelle und Parasit rot bzw. blau unterlegt. Abbildung aus De Niz et al., 2016 (modifiziert).

Die Tochtermerozoiten werden schließlich beim Egress des reifen Schizonten aus der Wirtszelle entlassen (Abb.1.10). Wie die Wirtszellinvasion scheint auch der Egress durch ein komplexes Ca^{2+} - und Phospholipid-Signalling reguliert zu sein. Durch einen bisher unbekanntem Stimulus scheint es zu einem Anstieg der cGMP-Konzentration zu kommen, wodurch es wiederum zu einer Aktivierung der cGMP-abhängigen Protein Kinase G kommt,

die eine essentielle Rolle beim Egress von Merozoiten spielt (Taylor et al., 2010; Collins et al., 2013b; Hale et al., 2017). Die Aktivität von PKG steht nachweislich im Zusammenhang erhöhten Ca^{2+} -Leveln und es wird vermutet, dass PKG durch Aktivierung von Phospholipase C eine Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER stimuliert (Brochet et al., 2014). Zudem konnte gezeigt werden, dass die *Subtilisin-Like Protease 1* (SUB1) eine essentielle Rolle beim Egress von Schizonten spielt (Yeoh et al., 2007; Tawk et al., 2013). SUB1 wird zunächst durch eine zweifache proteolytische Prozessierung aktiviert. Hierbei erfolgt eine Ca^{2+} -abhängige Autoprozessierung im ER, die von einer weiteren Prozessierung durch Plasmepsin X gefolgt wird (Blackman et al., 1998; Sajid et al., 2000; Nasamu et al., 2017; Pino et al., 2017). Sowohl SUB1 als auch Plasmepsin X befinden sich in den Exonemen des Parasiten. Die Proteasen werden kurz vor dem Egress in die parasitophore Vakuole sekretiert. Die Sekretion von SUB1 aus den Exonemen wird ebenso durch die Proteinkinase G und erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen vermittelt (Donald et al., 2002; Collins et al., 2013b; Brochet et al., 2014; Brochet & Billker, 2016). Darüber hinaus scheint die Protease SERA5 (*Serine Repeat Antigen 5*) ebenso eine entscheidende Rolle beim Egress von Merozoiten zu spielen (Stallmach et al., 2015; Collins et al., 2017). SERA5 wird in Folge erhöhter Ca^{2+} -Konzentrationen durch die Ca^{2+} -abhängige Kinase CDPK1 aktiviert (Iyer et al., 2018). Auch die Kinase CDPK5 konnte im Zusammenhang mit dem Egress beschrieben werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Perforin-ähnliche Proteine oder Membrankanäle als potentielle Substrate von CDPK5 schließlich die Destabilisierung der Wirtszelle und somit den Egress vermitteln (Chandramohanadas et al., 2009; Kafsack et al., 2009; Dvorin et al., 2010).

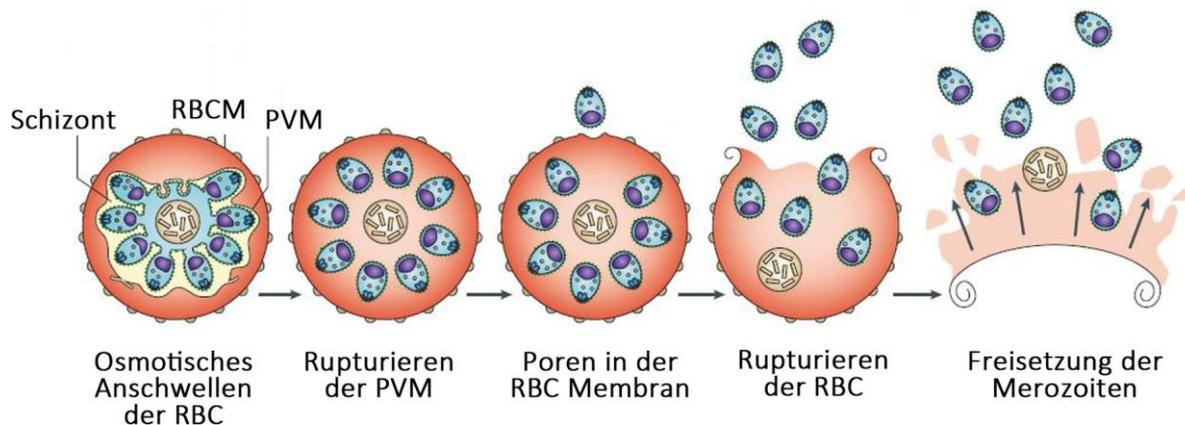


Abb.1.10: Egress des Schizonten. Im reifen, segmentierten Schizonten kommt es vor dem Egress zunächst zu einem osmotischen Anschwellen der Zelle, worauf hin zunächst die Membran der parasitophoren Vakuole rupturiert. Anschließend kommt es zur Bildung von Poren in der Membran des Erythrozyten, woraufhin auch diese rupturiert und es zur Freisetzung der Tochtermerozoiten kommt. Abbildung aus De Niz et al., 2016 (modifiziert).

1.2.2.5 Gametozyten

Während der asexuellen Replikation kommt es bei einigen Erregern zu einer Differenzierung in geschlechtlich determinierte Gametozyten, die in der Lage sind im Mückenwirt zu proliferieren.

In der Regel erfolgt der Eintritt in die Gametozytogenese in Form der sog. *Next-Cycle-Conversion*. Hierbei findet vor dem Egress in jedem Merozoiten eines Schizonten eine Festlegung auf weitere asexuelle Replikation oder sexuelle Differenzierung statt. Die entsprechende Entwicklung erfolgt dann nach Egress und erneuter Invasion einer Wirtszelle (Bruce et al., 1990). Zudem ist jedoch auch die sog. *Same-Cycle Conversion* möglich, wobei der Eintritt in die Gametozytogenese ohne vorherige Schizogonie in jungen Ringstadien erfolgt (Bancells et al., 2019).

Ein entsprechender Stimulus, der den Eintritt in die Gametozytogenese induziert, ist bisher jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Ein Auslöser für den Wechsel von asexueller Replikation zur sexuellen Differenzierung ist das vom Wirtsorganismus generierte Lipid Lysophosphatidylcholine (LysoPC), welches vom Parasiten zur Synthese von essentiellen Membranbestandteilen wie Phospholipiden benötigt wird (Brancucci et al., 2017). Besonders Infektionen mit hohen Parasitämien führen zu einer deutlichen Verringerung der LysoPC-Konzentration im Serum, welches folglich einen limitierenden Faktor für die asexuelle Replikation darstellt (Lakshmanan et al., 2012; Orikiiriza et al., 2017). Untersuchungen zeigten, dass der Parasit in der Lage ist LysoPC-Level im Serum des Wirts wahrzunehmen und bei abnehmender Konzentration vermehrt zur sexuellen Entwicklung durch Veränderung der Stadien-spezifischen Transkription wechselt (Brancucci et al., 2017). Zudem variiert die LysoPC-Konzentration auch Gewebe-spezifisch, sodass das generell geringere LysoPC-Level im Knochenmark das vermehrte Auftreten von Gametozyten in diesem Gewebe erklärt (Aguilar et al., 2014; Joice et al., 2014; Brancucci et al., 2017).

Auf genetischer Ebene stellt der Transkriptionsfaktor AP2-G (*Apetala 2 G*) einen Hauptregulator bei der Gametozytogenese dar. Untersuchungen konnte zeigen, dass Parasiten, die kein AP2-G exprimieren, in der asexuellen Replikation verbleiben, wo hingegen es zur Gametozytogenese kommt, sobald AP2-G exprimiert wird (Kafsack et al., 2014; Sinha et al., 2014; Modrzyńska et al., 2017; Zhang et al., 2017; Kent et al., 2018; Josling et al., 2020). Die fehlende Expression von AP2-G in asexuellen Stadien ist hierbei auf epigenetische Repression durch eine Trimethylierung von Lys9 in Histon 3 (H3K9me3), das Heterochromatin Protein 1 (HP1) sowie die Histondeacetylase 2 (Hda2) zurückzuführen (Lopez-Rubio et al., 2009; Brancucci et al., 2014; Coleman et al., 2014). Als Positiv-Regulator der Gametozytogenese konnte zudem das Protein GDV1 identifiziert werden, welches HP1 vom *ap2-g*-Genlocus entfernt und somit dessen Expression induziert (Eksi et al., 2012; Filarsky et al., 2018; Usui et al., 2019). Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen zeigten, dass AP2-G in Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor AP2-I die Expression einer Vielzahl Gametozyten-spezifischer Gene reguliert (Josling et al., 2020). Dies sind vor allem exportierte Proteine oder Proteine des Fettsäure- und Lipidmetabolismus, die nachweislich bei der Remodellierung der

Wirtszelle während der Gametozytogenese von Bedeutung sind (Silvestrini et al., 2010; Gulati et al., 2015; Josling et al., 2020).

Die Differenzierung zu reifen Gametozyten erfolgt innerhalb von 10-12 Tagen, wobei fünf verschiedene Entwicklungsstadien (Stage I-V) durchlaufen werden (Josling & Llinás, 2012; Josling et al., 2018). Das finale Stadium V kann schließlich auch morphologisch in weibliche und männliche Gametozyten unterschieden werden (Abb.1.11).

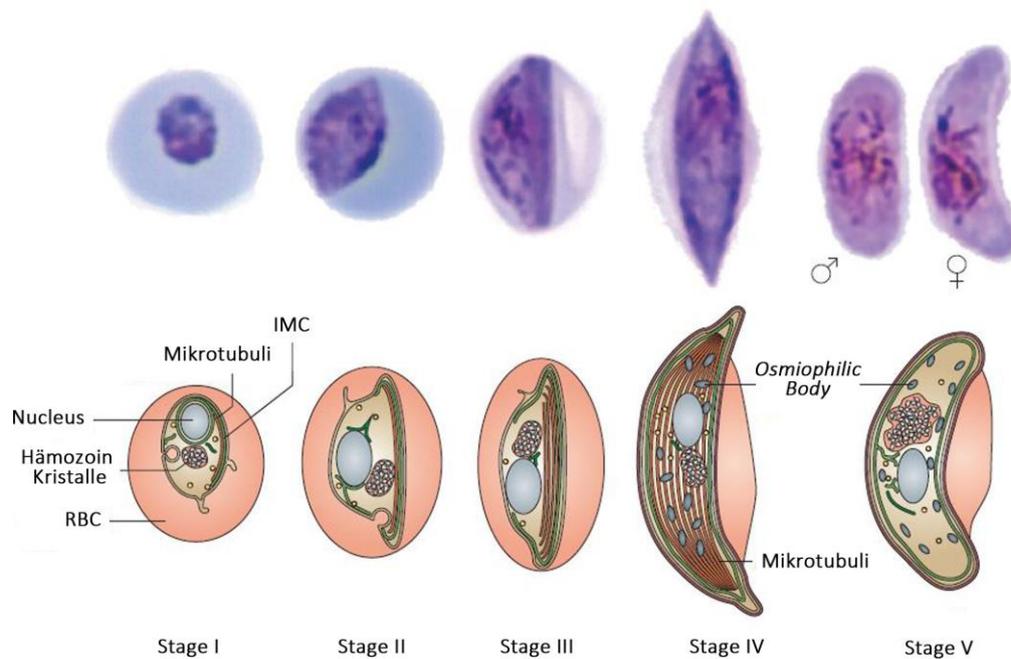


Abb.1.11: Gametozyten. Während der asexuellen Replikation in Erythrozyten treten einige Parasiten in die Phase der Gametozytogenese ein. Hierbei differenzieren die Parasiten sich innerhalb von 10-12 Tagen zu geschlechtlich determinierten Gametozyten, wobei fünf verschiedene Stadien durchlaufen werden. Die Abbildung zeigt Stadienbeispiele aus Giemsa-gefärbten Blutausstrichen (oben) und sowie eine schematische Darstellung der Stadien (unten). Abbildung aus Josling & Llinás, 2015 (modifiziert).

1.2.2.6 Sexuelle Stadien in der Mücke

Die sexuelle Entwicklung des Erregers erfolgt im Mitteldarm der Mücke, nachdem der Parasit bei einem weiteren Stich aus dem Blut des Menschen aufgenommen wurde. Die Phase im Mitteldarm der Mücke dauert etwa 20 Stunden, wobei es zur einem zweifachen Stadienwandel kommt (Bennink et al., 2016).

Nach dem Eintritt der Gametozyten in den Darm der Mücke kommt es induziert durch die geringere Temperatur sowie den höheren pH-Wert zu einer raschen Aktivierung der Gametozyten (Kawamoto et al., 1991; Billker et al., 1997). Zudem konnte die Substanz Xanthurensäure, welche einem Zwischenprodukt des Tryptophan-Katabolismus in der Mücke entspricht, im Zusammenhang mit der Aktivierung von Gametozyten beschrieben werden

(Billker et al., 1998; Garcia et al., 1998; Sologub et al., 2011). Xanthurensäure induziert die Aktivität der Guanylyl-Cyclase, wodurch es zu einem Anstieg von cGMP kommt, welches wiederum die cGMP-abhängige Kinase PKG aktiviert (Muhia et al., 2001; McRobert et al., 2008; Taylor et al., 2008). Proteinkinase G induziert daraufhin eine Signalkaskade, in die verschiedene Phospholipide involviert sind, wodurch es letztlich zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum kommt (Brochet et al., 2014). Die Freisetzung von Ca^{2+} führt wiederum zu einer Aktivierung von Calcium-abhängigen Protein Kinasen (CDPKs), die die anschließende Differenzierung in männliche und weibliche Gameten regulieren.

Nach der Aktivierung findet jedoch zunächst ein Austritt der Gametozyten aus dem Erythrozyten statt. Der erste Schritt hierbei ist die Ca^{2+} -unabhängige Desintegration der PVM, welche durch Proteine wie MDV-1/PEG3 (*Male Development-1/Protein of Early Gametocyte 3*) und GEST (*Gamete Egress & Sporozoite Traversal*) vermittelt wird, die aus spezifischen Vesikeln (*Osmophilic Bodies*) in die PV entlassen werden (Furuya et al., 2005; Silvestrini et al., 2005; Lanfrancotti et al., 2007; Ponzi et al., 2009; Talman et al., 2011). In einem zweiten, Ca^{2+} -abhängigen Schritt werden weitere Vesikel in das Cytoplasma des Erythrozyten entlassen, welche das Perforin PPLP2 (*Plasmodium Perforin-Like Protein 2*) enthalten und somit den Egress aus der Wirtszelle vermitteln (Sologub et al., 2011; Deligianni et al., 2013; Wirth et al., 2014; Bennink et al., 2016).

Anschließend beginnen die Gametozyten sich in weibliche Makrogameten sowie männliche Mikrogameten zu differenzieren. Hierbei sind die oben beschriebenen Ca^{2+} -aktivierten CDPKs von essentieller Bedeutung (Billker et al., 2004; Ojo et al., 2012; Sebastian et al., 2012; Ojo et al., 2014). Während der Differenzierung kommt es in den Mikrogametozyten zu einer dreifachen Replikation des haploiden Genoms, sodass diese letztlich Octaploid vorliegen (Janse et al., 1986; Janse et al., 1988). Zudem kommt es während der Differenzierung zur Ausbildung eines Flagellums, weshalb die Differenzierung der Mikrogametozyten als *Exflagellation* bezeichnet wird. Hierbei wird die DNA-Replikation, Chromatin-Kondensation und Cytokinese durch Proteine wie FACT (*Facilitates Chromatin Transcription*), CDC20 (*Cell Division Cycle Protein 20*) und die Kinase map-2 vermittelt (Rangarajan et al., 2005; Tewari et al., 2005; Laurentino et al., 2011; Guttery et al., 2012). Die Ausbildung des Flagellums sowie dessen Beweglichkeit wird durch Proteine wie das Centriolen/Basalkörper-Protein SAS-6 (*Spindle Assembly Abnormal Protein*) sowie das *Armadillo-Repeat*-Protein PF16 vermittelt (Straschil et al., 2010; Marques et al., 2015). Zudem scheinen die Phosphatasen PPM2 (*Protein Phosphatase Methyltransferase 1*) sowie Calcineurin essentiell für die männliche Gametogenese und anschließende Fertilisation zu sein (Guttery et al., 2014; Philip & Waters, 2015; Bennink et al., 2016).

Nach der Gametogenese kommt es durch einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus zu einer Anheftung des motilen Mikrogameten an den Makrogameten, woraufhin diese zur Zygote fusionieren. Untersuchungen lassen darauf schließen, dass sog. LCCL-Proteine (*Limulus Coagulation factor C-Like*), die in *Plasmodium* als CCp-Proteine bezeichnet werden und in Form von sechs Orthologen vorliegen, einen Multi-Protein-Komplex

in der PV von Gametozyten bilden (Pradel et al., 2006; Scholz et al., 2008; Simon et al., 2009). Dieser Komplex lokalisiert nach der Gametogenese auf der Oberfläche von Makrogameten und wird vermutlich durch Interaktion mit dem GPI-verankerten Protein s25 auf der Oberfläche weiblicher Gameten gebunden (Simon et al., 2016). Zudem konnte gezeigt werden, dass der CCp-Komplex ebenso mit dem Protein s230 interagiert, welches wiederum mit dem GPI-verankerten Protein s48/45 auf der Oberfläche von Mikrogameten interagiert (Kumar, 1987; Kumar & Wizel, 1992; Scholz et al., 2008; Simon et al., 2016). Nach Anheftung des Mikrogameten an den Makrogameten kommt es zu einer Membran- sowie Zellkernfusion woraufhin eine meiotische Teilung folgt, sodass die entstandene Zygote tetraploid ist (Janse et al., 1986). Proteine, die in den Prozess der Gametenfusion involviert sind, bleiben bisher weitgehend unbekannt, jedoch scheint das Protein GCS1 (*Generative Cell Specific 1*) bei der Fertilisation von Bedeutung zu sein (Hirai et al., 2008; Liu et al., 2008). Bei der meiotischen Teilung spielen zudem die Kinasen Nek-2 und Nek-4 eine essentielle Rolle (Dorin et al., 2001; Reininger et al., 2005; Reininger et al., 2009; Dorin-Semblat et al., 2011; Miranda-Saavedra et al., 2012; Reininger et al., 2012; Mitcheson et al., 2016).

Die Zygote entwickelt sich anschließend innerhalb von 15-18 Stunden zum einem motilen, sichelförmigen Ookineten, wobei es zur Ausbildung einer apikalen Polarität sowie einer Elongation von Mikrotubuli und dem Inneren Membran Komplex (IMC) kommt (Poulin et al., 2013). Der Ookinet penetriert anschließend das Epithel des Mitteldarms und entwickelt sich unter der Basalmembran zur Oocyste, in der nach mehrfacher Replikation innerhalb der nächste 10 Tage mehrere Tausend Sporozoiten entstehen (Deligianni et al., 2018). Die Invasion des Epithels und somit die Entwicklung vom Ookineten zur Oocyste wird hierbei durch verschiedene Perforine vermittelt. Untersuchungen konnten zeigen, dass die Perforine PPLP3/MAOP (*Plasmodium Perforin-Like Protein/Membrane-Attack Ookinete Protein*), PPLP4 und PPLP5 von entscheidender Bedeutung bei diesem Prozess sind (Kadota et al., 2004; Ecker et al., 2007; Wirth et al., 2015; Deligianni et al., 2018).

Beim Egress der Sporozoiten kommt es anschließend zu einer Destabilisierung der Oocyste. Hierbei spielen die *Oocyste Rupture Proteins* ORP1 und ORP2, das *Circumsporozoite Protein* (CSP) sowie die Protease ECP1 (*Egress Cysteine Protease 1*) eine essentielle Rolle (Aly & Matuschewski, 2005; Wang et al., 2005; Currà et al., 2016; Siden-Kiamos et al., 2018). Somit werden die Sporozoiten in die Hämolymphe der Mücke entlassen und wandern in die Speicheldrüsen. Hier findet eine finale Invasion der Speicheldrüsen statt, die durch verschiedene Mikronemen- und Rhoptrienproteine wie TRAP (*Thrombospondin-Related Anonymous Protein*), SIAP-1 (*Sporozoite Invasion-Associated Protein-1*), MAEBL (*Merozoite Apical Erythrocyte-Binding Ligand*), RON2 (*Rhoptry Neck Protein 2*) oder RON11 vermittelt wird (Sultan et al., 1997; Kariu et al., 2002; Saenz et al., 2008; Engelmann et al., 2009; Ejigiri et al., 2012; Bantuchai et al., 2019; Ishino et al., 2019). Anschließend können die Sporozoiten bei einer Blutmahlzeit erneut auf den Menschen übertragen werden (Abb.1.12).

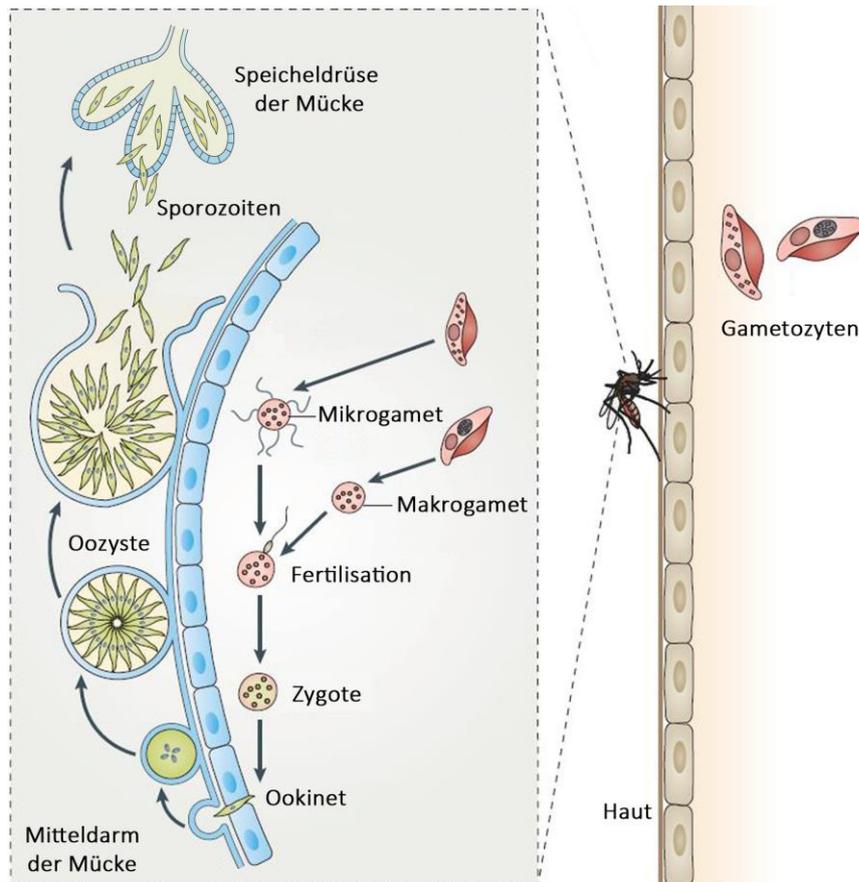


Abb.1.12: Sexuelle Vermehrung von *P. falciparum* in der Mücke. Gametozyten, die von der Mücke aufgenommen wurden, differenzieren im Mitteldarm der Mücke zu weiblichen Makrogameten und männlichen Mikrogameten. Bei der Befruchtung verschmelzen diese zur Zygote, die sich anschließend zum motilen Ookineten differenziert. Der Ookinete penetriert das Darmepithel und bildet eine Oocyste, in der sich durch asexuelle Replikation Sporozoiten bilden. Diese werden in die Hämolymphe der Mücke entlassen und migrieren in die Speicheldrüsen, sodass bei einer erneuten Blutmahlzeit ein weiterer Wirt infiziert werden kann. Abbildung aus de Koning-Ward et al., 2016 (modifiziert).

1.2.3 Protein-Phosphorylierung als physiologischer Regulator

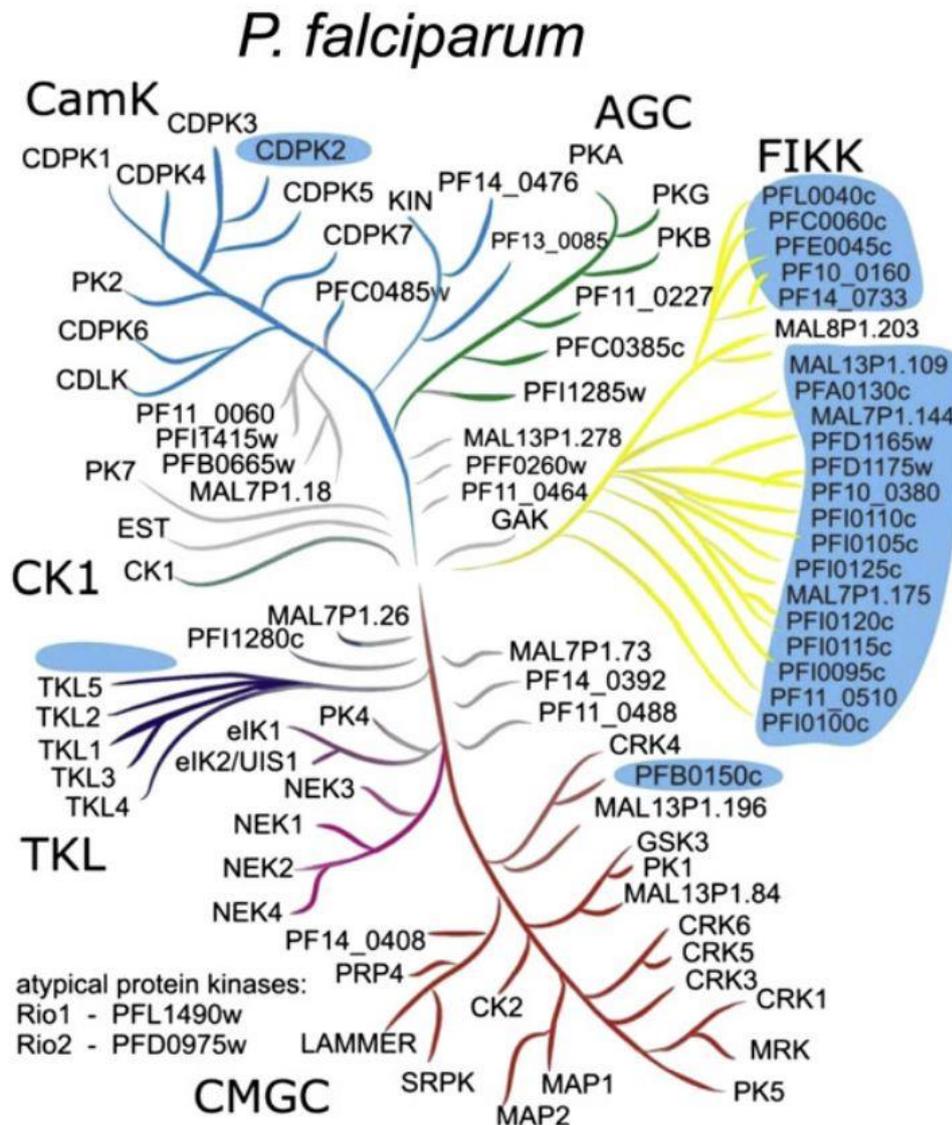
Die Proteinphosphorylierung stellt eine posttranslationale Modifikation dar, die bei der Regulation zahlreicher zellbiologischer Prozesse von Bedeutung ist (Cohen, 2001; Salazar & Höfer, 2009). Hierbei werden Phosphatgruppen durch Phosphattransferasen (Kinasen) auf ein Zielprotein übertragen. Kinasen können über den Transfer von Phosphatgruppen eine Aktivierung oder Deaktivierung von Zielproteinen vermitteln oder Protein-Protein Interaktionen kontrollieren (Johnson & Lewis, 2001). Zudem können Phosphorylierungen ein Erkennungsmotiv für interagierende Proteine oder Kinasen selbst darstellen (Johnson & Lewis, 2001). Somit stellen Kinase essentielle physiologische Regulatoren dar. Die große Bedeutsamkeit von Kinasen wird zudem durch die Größe dieser Enzym-Familie verdeutlicht. So werden im humanen Genom über 500 verschiedene Kinasen codiert, die somit ca. 2% aller Gene repräsentieren (Kostich et al., 2002; Manning et al., 2002; Doering et al., 2008).

1.2.4 Phosphorylierung von PfAMA1

Wie bereits beschrieben stellt das *Apical Membrane Antigen 1* (AMA1) einen essentiellen Liganden bei der Invasion von roten Blutzellen dar (Triglia et al., 2000). Im Schizonten ist AMA1 zunächst in den Mikronemen des Merozoiten lokalisiert und wird nach dem Egress auf die Oberfläche der Merozoiten transloziert (Narum & Thomas, 1994; Triglia et al., 2000; Treeck et al., 2009; Collins et al., 2013b). Hierbei ist AMA1 über eine Transmembrandomäne in die Plasmamembran des Parasiten integriert und kann über eine extrazelluläre Domäne die Bindung an rote Blutzellen vermitteln. Darüber hinaus weist der Ligand eine kleinere intrazelluläre Domäne auf, die in das Cytoplasma des Parasiten reicht (Narum & Thomas, 1994; Hodder et al., 1996). Phosphoproteomische Untersuchungen konnten biochemische Untersuchungen bestätigen, denen zufolge AMA1 im Parasiten phosphoryliert vorliegt (Treeck et al., 2009; Leykauf et al., 2010; Solyakov et al., 2011; Treeck et al., 2011; Lasonder et al., 2012). Dabei konnte gezeigt werden, dass die cytoplasmatische Domäne von AMA1 eine Anzahl von Phosphorylierungsstellen aufweist, die durch mindestens zwei verschiedene Kinasen phosphoryliert werden (Prinz et al., 2016). Hierbei kommt es zunächst zu einer Ca^{2+} /cAMP-abhängigen Phosphorylierung von S610 durch Protein Kinase A (Leykauf et al., 2010). Es wird vermutet, dass diese erste Phosphorylierung als „Phospho-Priming“ Schritt dient und eine zweite Phosphorylierung an T613 induziert, welche vermutlich durch die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) vermittelt wird (Prinz et al., 2016). Diese Phosphorylierungen sind essentiell für eine effiziente Wirtszellinvasion (Treeck et al., 2009; Leykauf et al., 2010; Prinz et al., 2016). Weitere Untersuchungen konnten zudem bestätigen, dass die Phosphorylierung von S610 durch Protein Kinase A vermittelt wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung eine Konformationsänderung der cytoplasmatischen Domäne induziert, wodurch vermutlich eine Art funktionelle Aktivierung des Liganden erfolgt (Patel et al., 2019; Wilde et al., 2019). Da die Phosphorylierung von AMA1 essentiell für die effiziente Wirtszellinvasion und somit das Überleben des Parasiten ist, stellen nicht nur Liganden wie AMA1 selbst, sondern auch Kinasen wie PKA und GSK3 potentielle Drug Targets für die Entwicklung antiplasmodialer Wirkstoffe dar.

1.2.5 Das Kinom

Nach phylogenetischen Analysen können die eukaryontischen Proteinkinasen in sieben Hauptgruppen eingeteilt werden (Abb.1.13) (Hanks, 2003; Doerig et al., 2008). Weitere eukaryontische Proteinkinasen, die keiner der genannten Gruppen zugeordnet werden können, werden als *Other Protein Kinases* (OPKs) bezeichnet. Die eukaryontischen Proteinkinasen weisen Gemeinsamkeiten in Form von konservierten Aminosäuresequenzen oder strukturell ähnlicher Domänen auf. Für einige Proteinkinasen kann jedoch keines der gemeinsamen Merkmale beschrieben werden, weshalb diese als atypische Proteinkinasen (aPKs) bezeichnet werden (Doerig et al., 2008).



CMGC-Gruppe

- Cyclin-dependent Kinases (CDKs)
- Mitogen-activated Protein Kinases (MAPK)
- Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3)
- CDK-like Kinases (CLKs)

AGC-Gruppe

- Protein Kinase **A** (cAMP-abhängig)
- Protein Kinase **G** (cGMP-abhängig)
- Protein Kinase **C** (und related Proteins)

TKL-Gruppe

- Tyrosine Kinase like

CamK-Gruppe

- Calcium/Calmodulin-dependent Kinases

STE-Gruppe

- Regulatoren der MAPKs

TyrK-Gruppe

- Tyrosinkinases

CK1-Gruppe

- Casein Kinase 1

Abb.1.13: Proteinkinasen in *P. falciparum*. Dargestellt ist eine systematische Einordnung aller Proteinkinasen des Stammes 3D7. Blau unterlegte Kinase konnten lediglich in *P. falciparum*, jedoch nicht *P. berghei* identifiziert werden. Abbildung aus Tewari et al. (2010)

Das Kinom von *Plasmodium falciparum* (Abb.1.13) weist einige generelle Besonderheiten im Vergleich zum humanen Kinom auf (Doerig & Meijer, 2007; Doerig et al., 2008). Zum einen konnten keine Vertreter der Tyrosinkinase oder der STE-Familie identifiziert werden. Besonders das Fehlen von Tyrosinkinase erscheint interessant, da bei phosphoproteomischen Analysen Tyrosinphosphate im Parasiten nachgewiesen werden konnten (Solyakov et al., 2011; Treeck et al., 2011; Lasonder et al., 2012). Zudem finden sich im plasmodialen Kinom sog. „Orphan“ Kinasen, für die keine Orthologe bei Säugetieren existieren. Hierbei handelt es sich um atypische Proteinkinase, die mehrere der typischen Eigenschaften der beschriebenen ePK-Gruppen vereinen. Zudem findet sich im Kinom von *Plasmodium* die Familie der *Calcium-dependent Protein Kinases* (CDPKs), bei denen die Kinasedomäne mit einer Calmodulindomäne fusioniert ist, eine Eigenschaft, die bei Pflanzen und Alveolaten beobachtet werden konnte, jedoch nicht bei Metazoa (Zhang & Choi, 2001; Doerig et al., 2008). Darüber hinaus scheint es für plasmodiale Kinasen generell schwierig zu sein, eindeutige Orthologe bei Säugern zu identifizieren, auch wenn die entsprechenden plasmodialen Kinasen eindeutig einer Gruppe der ePKs zugeordnet werden können (Doerig et al., 2008).

Je nachdem, welche Strategie zur Klassifizierung vorgenommen wurde, lassen sich im Genom von *Plasmodium falciparum* 99 oder 86 ePK-verwandte Kinasen finden (Ward et al., 2004; Anamika et al., 2005). Eine aktuellere Klassifizierung geht von 89 Proteinkinase aus, von denen 65 eukaryontischen Proteinkinase entsprechen, die einer der beschriebenen Kinasegruppen zugesprochen werden können. Fünf weitere Kinasen im plasmodialen Genom konnten keiner der Gruppen zugeordnet werden und entsprechen somit aPKs. Bei den übrigen 19 Kinasen handelt es sich um FIKK-Kinasen (Miranda-Saavedra et al., 2012).

Die größte Kinasegruppe im Parasiten stellt die CMGC-Gruppe mit 22 Vertretern dar, von denen 16 als vermutlich essentiell beschrieben worden sind (Solyakov et al., 2011). Zudem sind ca. 70% der Kinasen in dieser Gruppe spezifische Kinasen der Alveolata und weisen keine Orthologe in Metazoa auf (Miranda-Saavedra et al., 2012). Vertreter, die auch in Metazoa konserviert sind, stellen beispielsweise die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3, vgl. Abschnitt 1.2.6) oder die Casein Kinase 2 (CK2) dar. Von zwei identifizierten Vertretern der MAP-Kinasen konnte nur für Pfmap-1 ein Ortholog in Metazoa identifiziert werden. Auch für Vertreter der CDKs (Pfcrk-1, PfPK5) und CLKs (PfCLK1, PfCLK3) konnten Orthologe in Metazoa identifiziert werden (Miranda-Saavedra et al., 2012).

Die zweitgrößte Gruppe der plasmodialen Kinasen sind die CamKs mit 18 Vertretern die in ihrer Aktivität Calmodulin- bzw. Calcium-abhängig sind. Die CamK-Gruppe weist eine sehr geringe Orthologie im Vergleich zu anderen Kinasegruppen des Parasiten auf, sodass 16 Vertreter dieser Gruppe Apicomplexa-spezifische Kinasen darstellen. Eine bedeutsame Familie dieser Gruppe sind beispielsweise die Calcium-abhängigen Proteinkinase (CDPKs) mit insgesamt sieben Vertretern in *Plasmodium* (CDPK1-CDPK7), die keine Orthologe im humanen Genom aufweisen (Murphy et al., 2010). CDPKs sind im Parasiten bei einer Vielzahl

zellbiologischer Prozesse wie Wirtszellinvasion und Egress sowie sexueller Differenzierung und Vermehrung von essentieller Bedeutung (Ghartey-Kwansah et al., 2020).

Weitere essentielle Kinasen finden sich auch in der AGC-Gruppe, die sich in *Plasmodium* aus insgesamt sechs Kinasen zusammensetzt (Miranda-Saavedra et al., 2012). Hierbei sind vor allem die Protein Kinase A, Protein Kinase B und Protein Kinase G von Bedeutung. PKA konnte bereits im Zusammenhang mit der Phosphorylierung von AMA1 als essentielle Kinase bei der Invasion von roten Blutzellen beschrieben werden (Patel et al., 2019; Wilde et al., 2019). Ebenso scheint Protein Kinase B durch Phosphorylierung des Glideosom-Proteins GAP45 an der Wirtszellinvasion beteiligt zu sein (Vaid & Sharma, 2006; Vaid et al., 2008). Auch Protein Kinase G stellt eine essentielle Kinase für den Parasiten dar und konnte im Zusammenhang mit dem Egress von Merozoiten beschrieben werden (Taylor et al., 2010; Collins et al., 2013b; Baker et al., 2017; Koussis et al., 2020).

Kinasen der TKL-Gruppe weisen Ähnlichkeiten mit Tyrosin-Kinasen auf, stellen selbst jedoch Serin/Threonin Kinasen dar. Die Vertreter TLK1, TLK3 und PK4 weisen eine SAM-Domäne (*Sterile Alpha Motif*) auf, die eine Oligomerisierung vermitteln kann (Miranda-Saavedra et al., 2012). Die Kinase PfTLK3 wurde als potentiell Drug Target untersucht, wobei eine Expression der Kinase sowohl in asexuellen Stadien des Parasiten als auch in Gametozyten beschrieben werden konnte (Abdi et al., 2010). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass PfTLK3 in Gametozyten entlang der Cytoskelett-bildenden Mikrotubuli lokalisiert und in asexuellen Stadien eine essentielle Kinase darstellt, deren katalytische Aktivität durch die SAM-Domäne vermittelt wird (Abdi et al., 2010). Auch die Vertreter TLK1 und PK4 konnte als essentielle Kinasen beschrieben werden (Solyakov et al., 2011).

Die CK1-Gruppe wird durch die Casein Kinase 1 als einzigen Vertreter repräsentiert. Alle Apicomplexa weisen entsprechende CK1 Orthologe auf, die auch in Alveolaten und Metazoa identifiziert werden konnten, jedoch nur eine geringe Homologie aufweisen (Miranda-Saavedra et al., 2012). PfCK1 stellt eine essentielle Kinase dar und ist sowohl in den Mikronemen des Parasiten als auch exportiert in der Wirtszelle sowie im Überstand einer Parasitenkultur detektiert worden, sodass CK1 möglicherweise eine Ektokinase darstellt (Dorin-Semlat et al., 2015)

Kinasen der STE-Gruppe scheinen zumeist als Regulatoren in MAPK-vermittelten Signalkaskaden von Bedeutung zu sein. In den Apicomplexa sind nur sehr wenige Vertreter der STE-Gruppe zu finden, für die zudem keine Orthologe in Alveolaten oder Metazoa identifiziert werden konnten (Miranda-Saavedra et al., 2012).

Die Familien der Aurora-Kinasen sowie die *NIMA (Never in Mitosis Gene A)-related Kinases*, auch als NEKs bezeichnet, können nicht eindeutig einer der oben beschriebenen Gruppen zugeordnet werden und sind somit als *Other Protein Kinases* (OPK-Gruppe) klassifiziert worden. Aurora-Kinasen stellen Serin/Threonin Kinasen dar und sind in *Plasmodium* durch drei, vermutlich essentielle Orthologe (PfARK1-3) vertreten. Aurora-Kinasen sind in erster

Linie an der Kontrolle der Zellteilung beteiligt: In Übereinstimmung damit konnte *PfARK1* im Parasiten an den Spindelpolen nahe dem Zellkern lokalisiert werden (Reininger et al., 2011; Miranda-Saavedra et al., 2012). Ebenso wie die Aurora-Kinasen scheinen auch die Kinasen der NEK-Familie in Prozesse der mitotischen und meiotischen Zellteilung involviert zu sein. Für die NEK-Familie konnten vier Orthologe in *Plasmodium* (*Pfnek1-4*) identifiziert werden. *Pfnek1* wurde als vermutlich essentiell für den asexuellen Zyklus der Blutstadien beschrieben. *Pfnek2* hingegen scheint nicht essentiell für die intraerythrozytäre Entwicklung, jedoch essentiell für die sexuelle Vermehrung in der Mücke zu sein. Untersuchungen in *P. berghei* konnten bestätigen das NEKs essentiell für die meiotische Teilung in der Mücke sind (Dorin et al., 2001; Reininger et al., 2005; Reininger et al., 2009; Dorin-Semblat et al., 2011; Miranda-Saavedra et al., 2012; Reininger et al., 2012; Mitcheson et al., 2016).

Neben den 65 Kinasen, die in die oben beschriebenen Gruppen der eukaryontischen Proteinkinase eingeordnet werden konnten, weist *Plasmodium falciparum* zudem fünf atypische Proteinkinasen (aPKs) auf. Diese entsprechen drei Orthologen der PIKK-Familie (*Phosphatidylinositol 3' Kinase-related Kinases*), sowie zwei Orthologen der RIO-Familie (*Right Open Reading Frame*) für die keine Orthologe in anderen Alveolaten oder Metazoa identifiziert werden konnten (Miranda-Saavedra et al., 2012). *PfRIO-2* wurde bisher als potentiell Target für Kinase-Inhibitoren sowie als potentiell DNA-interagierende Kinase untersucht, wobei *PfRIO-2*-Inhibitoren einen antiplasmodialen Effekt vermitteln konnten (Chouhan et al., 2013; Nag et al., 2013; Parveen et al., 2013). Für PIKK Kinasen in *Plasmodium* liegen bisher keine funktionellen Daten vor.

Eine Besonderheit stellt die Familie der FIKK-Kinasen in *Plasmodium falciparum* dar, die nach einem Sequenzmotiv der Aminosäuren Phe-Ile-Lys-Lys in ihrer katalytischen Domäne benannt sind. FIKK-Kinasen konnten ausschließlich in Apicomplexa identifiziert werden und können zudem keiner der klassischen Gruppen der eukaryontischen Proteinkinasen zugeordnet werden (Ward et al., 2004; Miranda-Saavedra et al., 2012). Somit wurden die FIKK Kinasen der OPK-Gruppe zugeordnet und stellen zudem sog. *Orphan*-Kinasen dar, da sich keine Orthologe in anderen Organismen finden. Darüber hinaus weisen FIKK Kinasen ein PEXEL Motiv auf, welches einen Export der Kinase in die Wirtszelle vermittelt (Schneider & Mercereau-Puijalon, 2005). Als weitere Besonderheit konnten bei *Plasmodium falciparum* 19 FIKK Kinasen identifiziert werden, wo hingegen andere *Plasmodium*-Arten lediglich ein Ortholog aufweisen, welches FIKK8 in *P. falciparum* entspricht und nicht exportiert wird (Miranda-Saavedra et al., 2012; Lin et al., 2017; Davies et al., 2020). In kürzlich veröffentlichten Untersuchungen wurden alle 19 FIKK Kinasen in *P. falciparum* mittels konditionellem Knock-out und quantitativer Phosphoproteom-Analyse untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass FIKK Kinasen sowohl Parasitenproteine als auch Proteine der Wirtszelle phosphorylieren, wobei jedoch lediglich das nicht exportierte Ortholog FIKK8 keine redundante Funktion bei der asexuellen Replikation der Parasiten zu haben scheint. Zudem konnte FIKK4.1 im Zusammenhang mit der Rigidität des Zytoskeletts der Wirtszelle sowie dem Export des Adhäsins EMP1 beschrieben werden (Davies et al., 2020).

1.2.6 PfGSK3 als potentieller Medikamentenangriffspunkt

Die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) ist eine Serin/Threonin-Kinase der CMGC-Gruppe, die evolutiv ubiquitär verbreitet ist (Woodgett, 1991; Mukai et al., 2002; Wood-Kaczmar et al., 2009; Castano et al., 2010; Soutar et al., 2010). Die Kinase wurde in Skelettmuskeln im Zusammenhang mit der Phosphorylierung der Glykogen Synthase entdeckt, woraus ihr Name resultierte (Embi et al., 1980). Im Menschen und vielen weiteren Organismen existieren zwei Isoformen der Kinase (GSK3 α und GSK3 β), die durch zwei separate Gene codiert werden. Darüber hinaus entstehen im Menschen durch alternatives Spleißen der mRNA von GSK3 β die Varianten GSK3 β 1 und GSK3 β 2 (Woodgett, 1991). Alle Isoformen der GSK3 werden bei Säugern in allen Geweben exprimiert, jedoch variiert die Expression gewebespezifisch. Somit ist in Geweben des Gehirns vor allem GSK3 β zu finden, wobei GSK3 β 2 besonders stark in Neuronen exprimiert wird (Woodgett, 1991; Mukai et al., 2002; Wood-Kaczmar et al., 2009; Castano et al., 2010; Soutar et al., 2010). In der Zelle lokalisieren beide Isoformen von *HsGSK3* sowohl cytosolisch als auch im Zellkern und in den Mitochondrien (Bijur & Jope, 2003). Im Zellkern ist die GSK3 vor allem in der S-Phase des Zellzyklus sowie bei Beginn einer Apoptose zu beobachten (Diehl et al., 1998; Bijur & Jope, 2003). Das Molekulargewicht der humanen α -Isoform beträgt 51 kDa, die β -Isoform weist ein Molekulargewicht von 47 kDa auf. Vergleicht man die Aminosäuresequenz der beiden humanen GSK3-Isoformen, wird deutlich, dass diese besonders im Bereich der Kinase-Domäne eine starke Konservierung (97%) aufweisen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den humanen Isoformen weist der N-Terminus auf, der bei der α -Isoform deutlich verlängert ist, woraus das erhöhte Molekulargewicht resultiert (Woodgett, 1990). Untersuchungen in Mäusen zeigten, dass GSK3 β eine essentielle Kinase darstellt, sodass ein Knock-out von GSK3 β bereits während der Embryonalentwicklung letal wirkt (Hoefflich et al., 2000; Kerkela et al., 2008). Somit scheinen die beiden Isoformen der Kinase ihrer Funktion nicht vollständig redundant zu sein. Ein Knock-out von GSK3 α in Mäusen ist möglich, jedoch resultiert das Fehlen der GSK3 α in einer gesteigerten Glykogeneinlagerung in der Leber mit erhöhter Insulinsensitivität (MacAulay et al., 2007).

Für die humane GSK3 konnte eine Vielzahl von Substraten identifiziert werden, sodass *HsGSK3* an der Regulation verschiedenster Stoffwechselprozesse beteiligt ist. Hierbei kann eine Phosphorylierung durch *HsGSK3* sowohl eine Aktivierung oder Inaktivierung des Substrates als auch dessen Degradation oder Interaktion mit weiteren Proteinen vermitteln. (Sutherland, 2011). So ist *HsGSK3* durch Phosphorylierung der namensgebenden Glykogen Synthase am Glykogenstoffwechsel und somit der Regulation des Blutzuckerspiegels beteiligt (Rylatt et al., 1980; Parker et al., 1983; Welsh & Proud, 1993; Cross et al., 1995). Zudem reguliert *HsGSK3* durch Phosphorylierung von beispielsweise Cyklin D, p53, β -Catenin und Axin den Zellzyklus, das Gewebewachstum und den Wnt-Signalweg während der Embryonalentwicklung (Diehl et al., 1998; Ikeda et al., 1998; Yamamoto et al., 1999; Turenne & Price, 2001). Darüber hinaus ist *HsGSK3* durch Phosphorylierung des Mikrotubuli-bindenden Proteins Tau oder des Amyloid-Vorläuferproteins an neuronalen Prozessen beteiligt (Hanger et al., 1992; Yang et al., 1993; Aplin et al., 1996; Woods et al., 2001; Ryder et al., 2003; Santos et al., 2011). Im Hinblick auf die oben beschriebenen zellulären Prozesse kann eine fehlerhafte Aktivität von *HsGSK3*

möglicherweise im Zusammenhang mit der Entstehung von Erkrankungen wie Diabetes, Krebs, bipolaren Störungen sowie neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer stehen (Beurel et al., 2015; Zhang et al., 2018a). Somit werden GSK3-Inhibitoren als potentielle Therapeutika für eine Vielzahl von Erkrankungen im Menschen untersucht (Wagman et al., 2004; Maqbool & Hoda, 2017; Dandekar et al., 2018; O'Flaherty et al., 2019).

Eine Kristallstruktur der humanen GSK3 β liegt seit 2001 vor (Bax et al., 2001; Dajani et al., 2001; ter Haar et al., 2001). Anhand der Struktur konnte gezeigt werden, dass *HsGSK3 β* im Vergleich zu anderen eukaryontischen Proteinkinasen eine ähnliche Grundstruktur aufweist. Die *HsGSK3 β* kann in eine N-terminale Domäne, die sich aus β -Faltblättern zusammensetzt, sowie eine C-terminale Domäne aus α -Helices unterteilt werden (Abb.1.14). Die N-terminale Domäne (Aminosäure 1-134) stellt eine β -Faltblattstruktur dar, die sich aus sieben antiparallel angeordneten Strängen zusammensetzt, die somit die Form eines β -Barrels bilden. Laut Dajani et al. (2001) stellt diese Domäne einen deutlichen Unterschied zu verwandten Serin/Threonin-Kinasen dar, da entsprechende β -Barrel-Strukturen am C-Terminus vor allem bei Tyrosin-Kinasen wie der Insulin Rezeptor Kinase oder Kinasen der Scr-Familie beobachtet werden können (Hubbard et al., 1994; Sicheri et al., 1997; Xu et al., 1997). Die Verbindung zwischen der N-terminalen Domäne und dem anschließenden C-Terminus bildet eine α -Helix, die am Ende des siebten β -Stranges des N-Terminus beginnt. Der C-Terminus weist in seiner Kerndomäne (Aminosäure 152-342) wiederum Ähnlichkeiten zu MAP-Kinasen wie ERK2 oder p38 auf (Zhang et al., 1994; Wang et al., 1997; Dajani et al., 2001). Der auf Aminosäure 342 folgende Teil des C-Terminus setzt sich aus mehreren kurzen Helices und Schleifen zusammen und weist somit keine Ähnlichkeit zu MAP-Kinasen auf, deren C-terminales Ende sich schließlich wieder der N-terminalen Domäne anschließt (Dajani et al., 2001).

Eine weitere Besonderheit der GSK3 ist die Phosphorylierung von vor-phosphorylierten Substraten an einem spezifischen Sequenzmotiv. Die kanonische Erkennungssequenz für GSK3-Substrate entspricht einem sog. P+4 Motiv, welches mit einem Serin beginnt, worauf getrennt durch drei beliebige Aminosäuren ein weiteres Serin folgt (Ser-X-X-X-Ser). Hierbei wird das C-terminale Serin zunächst durch eine andere Kinase phosphoryliert („Phospho-Priming“) worauf die GSK3 anschließend das Serin vier Aminosäuren N-terminal phosphoryliert (ter Haar et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass das Phospho-Priming die Effizienz der Phosphorylierung durch GSK3 im Vergleich zu nicht vor-phosphorylierten Substraten um das 100-1000-fache steigert (Thomas et al., 1999). Für die Glykogen Synthase konnten mehrere der P+4 Motive in einer Phosphorylierungs-Sequenz (Ser⁶⁴⁰-X-X-X-Ser⁶⁴⁴-X-X-X-Ser⁶⁴⁸-X-X-X-Ser⁶⁵²-X-X-X-Ser⁶⁵⁶) identifiziert werden. Hierbei erfolgt zunächst ein Phospho-Priming an Ser⁶⁵⁶ durch die Casein Kinase 2 (CK2), woraufhin GSK3 die weiteren Serine sequenziell in N-terminaler Richtung phosphoryliert (Woodgett & Cohen, 1984; Kuret et al., 1985; Fiol et al., 1987; ter Haar et al., 2001). Weitere Beispiele für Substrate mit Phospho-Priming sind der eukaryontische Translations-Initiationsfaktor 2B (eIF2b) mit dem Motiv Ser⁵³⁵-X-X-X-X-Ser⁵³⁹ oder β -Catenin mit dem Motiv Ser³³-X-X-X-Ser³⁷-X-X-X-Thr⁴¹-X-X-X-Ser⁴⁵. Hierbei wird eIF2b durch DYRK und β -Catenin durch CK1 vor-phosphoryliert. Wie bei

den phosphorylierten Sequenzen ersichtlich kann das Motiv leicht von der kanonischen Erkennungssequenz P+4 (s.o.) abweichen. Somit kann der von GSK3 phosphorylierte Rest auch ein Threonin sein (vgl. β -Catenin) und fünf Aminosäuren N-terminal (vgl. eIF2b) der Phospho-Priming Stelle liegen (Ikeda et al., 1998; Welsh et al., 1998; Wang et al., 2001; Woods et al., 2001; Sutherland, 2011). Darüber hinaus gibt es einige GSK3-Substrate, die kein Phospho-Priming aufweisen. Entsprechende Substrate sind beispielsweise Cyklin D1 oder Histon H1.5 (Diehl et al., 1998; Happel et al., 2009). Einen Sonderfall stellt das Substrat MAP1B dar, welches sowohl Phosphorylierungsstellen mit Phospho-Priming als auch „non-primed“ Motive aufweist (Lucas et al., 1998; Trivedi et al., 2005; Scales et al., 2009).

Neben der Phosphorylierung von Substraten weist die GSK3 selbst ebenfalls Phosphorylierungsstellen auf, die für die katalytische Aktivität der Kinase von Bedeutung sind. Untersuchungen zeigten, dass die Phosphorylierung von Tyr216 in der Aktivierungsschleife von *HsGSK3 β* die katalytische Aktivität der Kinase um das 200-fache steigert (Hughes et al., 1993). Anhand der Kristallstruktur von *HsGSK3 β* untersuchten ter Haar et al. (2001) welche Bedeutung die Phosphorylierung von Tyr216 in der Aktivierungsschleife auf struktureller Ebene hat. Ein Vergleich mit den verwandten Kinasen ERK2 und p38 zeigte, dass auch diese einen entsprechenden Tyrosinrest in der Aktivierungsschleife aufweisen. Eine Phosphorylierung dieses Tyrosins führt zu einer Strukturänderung, die den Zugang zur Substratbindetasche freigibt. Zudem findet sich in ERK2 und p38 eine weitere Phosphorylierung an einem Threonin der Aktivierungsschleife. Eine Interaktion dieses Phosphothreonins mit nahegelegenen polaren Arginin- und Lysinresten führt zu einer korrekten Orientierung der N-terminalen und C-terminalen Kinaseuntereinheiten zueinander (Bax et al., 2001; ter Haar et al., 2001). Eine derartige zweite Phosphorylierung fehlt jedoch bei *HsGSK3 β* und stellt möglicherweise den Grund für das erforderliche Phospho-Priming dar. Es wird angenommen, dass der vor-phosphorylierte Rest des Substrats die Threoninphosphorylierung in der Aktivierungsschleife ersetzt und somit eine korrekte Orientierung des Substrats im katalytischen Zentrum der Kinase ermöglicht. Bei Substraten ohne Phospho-Priming konnten in den meisten Fällen negativ geladene Seitenketten nahe dem Phospho-Priming-Motiv identifiziert werden, die vermutlich die erforderliche Phosphorylierung imitieren (Doble & Woodgett, 2003). Die Phosphorylierung von Tyr216 in *HsGSK3 β* erfolgt durch eine Autophosphorylierung innerhalb eines Chaperonkomplexes während der Proteinfaltung (Lochhead et al., 2006).

Darüber hinaus kann eine Phosphorylierung von *HsGSK3 β* jedoch auch zu einer Inaktivierung der Kinase führen. Hierbei kann die Phosphorylierung von Ser9 in *HsGSK3 β* dazu führen, dass der phosphorylierte N-Terminus als Pseudosubstrat das katalytische Zentrum blockiert und somit zu einer Inaktivierung der Kinase führt (Sutherland et al., 1993; Sutherland & Cohen, 1994). Während die aktivierende Phosphorylierung (s.o.) durch eine Autophosphorylierung vermittelt wird, erfolgt die inaktivierende Phosphorylierung durch andere Kinasen, um eine Regulation spezifischer Stoffwechselprozesse zu erreichen. So kann die Phosphorylierung von Ser9 in *HsGSK3 β* beispielweise durch die Kinase AKT als Reaktion auf einen gesteigerten

Insulinspiegel vermittelt werden. Eine Inaktivierung der GSK3 β führt wiederum zu einer gesteigerten Aktivität der Glykogensynthese und somit zum Aufbau von Glykogen als Reaktion auf die Ausschüttung von Insulin (Welsh & Proud, 1993; Cross et al., 1995). Sowohl die aktivierende (Tyr216) als auch die inaktivierende (Ser9) Phosphorylierungsstelle sind in HsGSK3 α als Tyr279 bzw. Ser21 konserviert.

Auch in *Plasmodium falciparum* konnten zwei entsprechende Orthologe der GSK3 identifiziert werden. Eine mögliche Isoform stellt das Gen PF3D7_0312400 dar, welches in der Genomdatenbank PlasmoDB als GSK3 annotiert ist (Droucheau et al., 2003) und vermutlich ein essentielles Gen in plasmodialen Blutstadien darstellt (Solyakov et al., 2011, Zhang et al., 2018b). PF3D7_0312400 weist 54% Homologie zur humanen GSK3 β auf, weshalb die Kinase im Folgenden als PfGSK3 β bezeichnet wird. PfGSK3 β weist ein Molekulargewicht von 51 kDa auf und wird in asexuellen Blutstadien des Parasiten vor allem im Trophozoiten und frühen Schizonten exprimiert (Bozdech et al., 2003; Le Roch et al., 2003; Llinás et al., 2006; Mok et al., 2007; Bartfai et al., 2010; Otto et al., 2010; López-Barragán et al., 2011; Rovira-Grealls et al., 2012; Bunni et al., 2013; Siegel et al., 2014; Painter et al., 2018; Toenhake et al., 2018; Lee et al., 2018). Am BNITM durchgeführte Expressionsanalysen mittels RNA-Sequenzierung (Wichers et al., 2019) konnten diese Expressionsdaten bestätigen (Abb.1.15). Ebenso wie die humane GSK3 lokalisiert PfGSK3 β im Parasiten vor allem im Zellkern und Cytosol des Erregers (Prinz et al., 2016). Zudem konnte PfGSK3 β im Zusammenhang mit der Phosphorylierung des essentiellen Invasionsliganden PfAMA1 beschrieben werden, sodass die Kinase vermutlich eine essentielle regulatorische Rolle bei der Wirtszellinvasion des Parasiten spielt (Prinz et al., 2016; vgl. Abschnitt 1.2.4). Die duale Lokalisation von PfGSK3 β im Parasiten lässt zudem weitere Funktionen der Kinase vermuten. Eine Kristallstruktur liegt für PfGSK3 β bisher nicht vor.

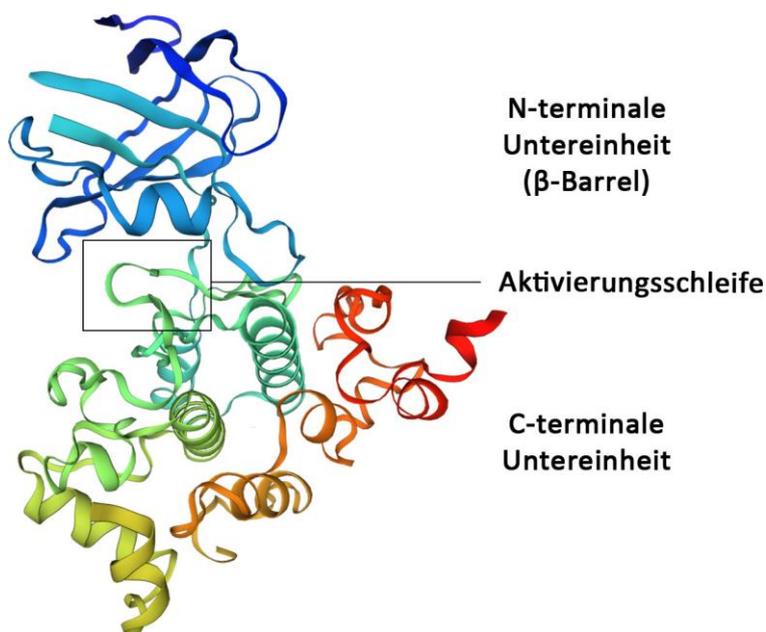


Abb.1.14: Strukturmodell der humanen GSK3 β . Die Darstellung basiert auf der Kristallstruktur nach ter Haar et al. (2001). Die Struktur wurden der SWISS MODEL Datenbank (Bienert et al., 2017) entnommen.

Eine mögliche zweite Isoform der *PfGSK3* stellt das Gen PF3D7_1316000 dar, welches in der Genomdatenbank PlasmoDB als putative Proteinkinase annotiert wurde, die mit der GSK3-Familie clustert (Ward et al., 2004). PF3D7_1316000 wird ebenso als essentielles Gen in asexuellen Stadien des Parasiten betrachtet (Solyakov et al., 2011; Zhang et al., 2018b). Da die oben beschriebene Isoform der *PfGSK3* (PF3D7_0312400) aufgrund der größeren Homologie zur humanen β -Isoform als *PfGSK3 β* bezeichnet wurde, wird das Ortholog PF3D7_1316000 im Folgenden als *PfGSK3 α* bezeichnet. Bei verschiedenen Expressionsanalysen konnte für *PfGSK3 α* jedoch keine Genexpression in asexuellen Blutstadien des Parasiten nachgewiesen werden (Bozdech et al., 2003; Le Roch et al., 2003; Llinás et al., 2006; Mok et al., 2007; Bartfai et al., 2010; Otto et al., 2010; López-Barragán et al., 2011; Rovira-Grells et al., 2012; Bunni et al., 2013; Siegel et al., 2014; Painter et al., 2018; Toenhake et al., 2018; Lee et al., 2018, Wichers et al., 2019), welches die oben genannten Ergebnisse der Gendeletion fraglich erscheinen lassen. *PfGSK3 α* scheint jedoch in Gametozyten-Stadien exprimiert zu sein (López-Barragán et al., 2011; Lasonder et al., 2016). Es erscheint daher fraglich, ob *PfGSK3 α* tatsächlich eine essentielle Kinase für asexuelle Blutstadien darstellt. Funktionelle Daten liegen für *PfGSK3 α* bisher nicht vor.

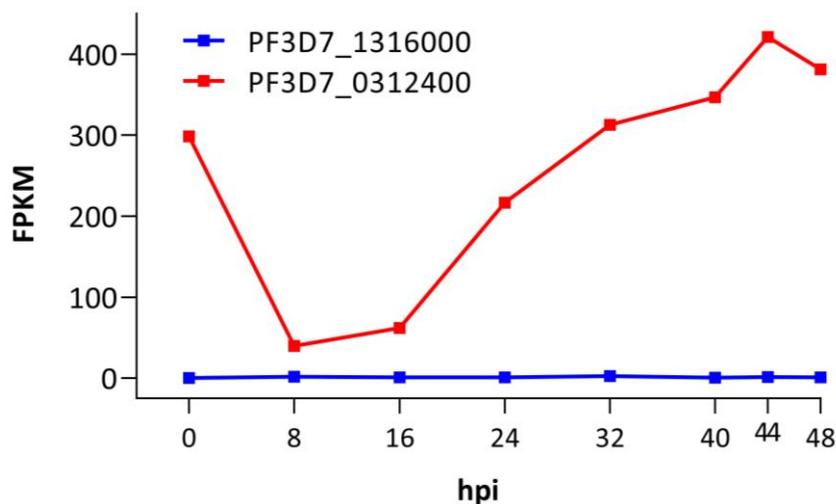


Abb.1.15: Expression der GSK3-Isoformen in *P. falciparum*. RNA wurde zu mehreren Zeitpunkten des Replikationszyklus der Blutstadien isoliert und die Genexpression mittels RNA-Sequenzierung analysiert (Wichers et al., 2019). Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert von drei biologischen Replikaten. FPKM = Frames per Kilobase Million; hpi = *hours post infection*.

Wie oben bereits beschrieben kann eine Phosphorylierung von GSK3 sowohl zu einer Aktivierung als auch zu einer Inaktivierung der Kinase führen. Das aktivierende Phosphorylierungsmotiv der humanen GSK3-Isoformen (Tyr279 in GSK3 α bzw. Tyr216 in GSK3 β) ist in *Plasmodium* ebenfalls als Tyr181 in GSK3 α bzw. Tyr229 in GSK3 β konserviert. Da die N-Termini der humanen und plasmodialen GSK3-Isoformen generell keine nennenswerte Konservierung aufweisen, kann anhand von Sequenz-Alignments in der plasmodialen GSK3

kein entsprechendes Serin für eine inaktivierende Phosphorylierung identifiziert werden. *PfGSK3 β* weist im Vergleich zur humanen GSK3 einen leicht verlängerten N-Terminus auf. Der erste Serinrest im N-Terminus von *PfGSK3 β* wird durch Ser31 repräsentiert. Die plasmodiale *PfGSK3 α* weist im Vergleich zu *PfGSK3 β* sowie den humanen Isoformen einen deutlich kürzeren N-Terminus und somit kein entsprechendes Serin auf (Abb.5.7, siehe Anhang).

Da *PfGSK3 β* , wie oben beschrieben, im Zusammenhang mit der Phosphorylierung des Invasionsliganden *PfAMA1* eine vermutlich essentielle Rolle bei Wirtszellinvasion des Parasiten spielt, ist die Kinase als potentiell Drug Target für antiplasmodiale Verbindungen relevant. Somit stellen spezifische *PfGSK3 β* -Inhibitoren potentielle Malaria-Therapeutika dar (vgl. Abschnitt 1.2.8).

1.2.7 Identifizierung neuer antiplasmodialer Wirkstoffe

Aufgrund der zunehmenden Entwicklung und Verbreitung von Resistenzen gegen die verfügbaren antiplasmodialen Therapeutika und des Fehlens einer effektiven Impfung ist die Identifizierung und Entwicklung neuer Wirkstoffe von großer Wichtigkeit. Hierbei kann sowohl die Identifizierung und Validierung natürlicher Wirkstoffe als auch die Entwicklung synthetischer Verbindungen in Betracht gezogen werden. Im Hinblick auf die bereits bestehenden Resistenzen wäre es zudem von Vorteil, wenn neue Verbindungen auf andere Zielstrukturen im Parasiten wirken als die bisher verfügbaren Wirkstoffe. Darüber hinaus sind auch Kriterien wie Zytotoxizität, Löslichkeit und Stabilität sowie Herstellungskosten und Wechselwirkungen mit anderen Wirkstoffen bei der Suche und Entwicklung neuer Therapeutika von Bedeutung (Fan & Lannoy, 2014; Wells et al., 2015).

Generell werden bei der Identifizierung neuer Wirkstoffe zwei verschiedene Strategien verfolgt. Zu einem können bereits vorhandene Verbindungen in phänotypischen Screens gegen den Erreger getestet werden, um potentielle Wirkstoffe mit antiplasmodialer Aktivität zu identifizieren. Phänotypische Screens ermöglichen zwar keine direkte Ermittlung von Zielstrukturen, jedoch können hierbei physiologische Bedingungen nachgestellt werden, sodass von vornherein Verbindungen mit guter Löslichkeit und Membranpermeabilität identifiziert werden können (Chatterjee & Yeung, 2012).

In einem phänotypischen Screen der Firma Novartis GNF (La Jolla, USA) wurde zunächst eine Naturstoff Bibliothek mit 12.000 Verbindungen gegen Blutstadien von *P. falciparum* getestet, wobei 275 Hits mit antiplasmodialer Aktivität bei sub-mikromolaren Konzentrationen identifiziert werden konnten. In weiteren Tests wurden Verbindungen verworfen, die keine Aktivität gegenüber multiresistenten *P. falciparum* Stämmen zeigten oder bei 10 μ M mehr als 50% Aktivität gegenüber Säuger-Zelllinien zeigten. Aus den finalen 17 Hits wurde eine Verbindung als Leitstruktur für die Synthese von 200 Derivaten verwendet, wobei die vielversprechende Spiroindolon-Verbindung NITD609 identifiziert werden konnte. Diese Verbindung weist eine IC_{50} von ca. 1nM gegenüber *P. falciparum* sowie eine 10.000-fache

Selektivität gegenüber-Säuger-Zelllinien auf (Rottmann et al., 2010). Als Zielstruktur der Spiroindolon-Verbindungen konnte die ATPase *Pf*ATP4 identifiziert werden, welche als H^+/Na^+ -Pumpe den pH-Werte im Parasiten reguliert (Lehane et al., 2014; Goldgof et al., 2016; Dennis et al., 2018). Somit repräsentiert ATP4 eine vielversprechende Zielstruktur für neue antiplasmodiale Wirkstoffe. Die Verbindung NITD609 sowie weitere ATP4-inhibierende Spiroindolone wurden bereits in ersten klinischen Studien am Menschen getestet und zeigten eine schnelle antiplasmodiale Wirkung (White et al., 2014; Gaur et al., 2020). In einem weiteren Screen wurden 1,7 Mio. Verbindungen gegen Blutstadien des Parasiten getestet, wobei 17.000 primäre Hits identifiziert werden konnten. Weitere Untersuchungen der Hits konnten 5973 Verbindungen mit einer IC_{50} unter $1,25 \mu M$ bzw. 648 Verbindungen mit einer IC_{50} unter 100 nM identifizieren (Plouffe et al., 2008).

In einem weiteren phänotypischen Screen des St. Jude Children's Research Hospitals (Memphis, USA) wurden insgesamt 300.000 Verbindungen bei einer Konzentration von $7 \mu M$ gegen Blutstadien des Parasiten getestet (Guiguemde et al., 2010). Im Screen konnten 1.300 Verbindungen als vielversprechende Hits identifiziert werden, die in weiteren Dose-Response-Experimenten gegen den Erreger sowie verschiedene Säuger-Zelllinien getestet wurden. Hierbei konnten 650 Hits mit einer antiplasmodialen Aktivität bei unter $2 \mu M$ sowie einer mindestens 10-fachen Selektivität gegen Säuger-Zelllinien identifiziert werden. Weitere Untersuchungen der Hits lassen vermuten, dass 80% dieser Verbindungen einen neuartigen Wirkmechanismus und keine Kreuz-Resistenz gegenüber existierenden Wirkstoffen aufweisen (Guiguemde et al., 2010; Guiguemde et al., 2012).

Bei Phänotypischen Screens von Gamo et al. (2010) wurde in Kooperation mit GlaxoSmithKline (Tres Cantos, Spanien) eine chemische Bibliothek mit ca. zwei Mio. Verbindungen gegen *P. falciparum* getestet. Hierbei konnten 13.533 Verbindungen identifiziert werden, die bei einer Konzentration von $2 \mu M$ mindestens 80% Inhibierung des Parasitenwachstums vermittelten und somit potentielle neue antiplasmodiale Wirkstoffe darstellen. Sämtliche Verbindungen und dazu gehörige Daten des Screens wurden anschließend als das *Tres Cantos Antimalarial Compound Set* (TCAMS) öffentlich zugänglich gemacht. Basierend auf der Substanzklasse sowie bereits bekannten Targets im Menschen konnten für einige der identifizierten antiplasmodialen Verbindungen potentielle Zielstrukturen im Parasiten vorausgesagt werden. Bei 48% dieser Verbindungen handelte es sich um Kinase-Inhibitoren, welches verdeutlicht, dass Kinasen vielversprechende Targets für neue antiplasmodiale Wirkstoffe darstellen (Gamo et al., 2010).

Eine weitere öffentlich zugängliche Sammlung antiplasmodialer Verbindungen stellt die Malaria Box dar, die von der öffentlichen Partnerschaft *Medicines for Malaria Venture* (MMV) zur Verfügung gestellt wurde. Diese beruht auf insgesamt 20.000 antiplasmodialen Hits, die aus der TCAMS-Sammlung von GlaxoSmithKline sowie den oben beschriebenen Screens der Firma Novartis GNF (La Jolla, USA) und dem St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, USA) stammen. Sämtliche Daten der Screens mit der Struktur aller identifizierten Hits wurden für weitere Forschung öffentlich zugänglich gemacht. Zudem wurde auf Grundlage von

Kriterien wie kommerzieller Verfügbarkeit, antiplasmodialer Aktivität, Zytotoxizität und chemischer Diversität eine Auswahl von 400 Verbindungen als *Malaria-Box* öffentlich zur Verfügung gestellt. Die Substanzen konnten bis Ende 2015 als gebrauchsfertige Stocklösungen (10mM in DMSO) in 96-Well-Platten erworben werden (Spangenberg et al., 2013; van Voorhis et al., 2016).

Neben phänotypischen Strategien können Verbindungen jedoch auch in Target-basierten Tests direkt gegen eine entsprechende Zielstruktur getestet werden. Der Vorteil von Target-basierten Strategien ist die Tatsache, dass der Wirkmechanismus der untersuchten Verbindungen bereits bekannt ist. Ein Inhibitor, der im Test eine vielversprechende Hemmung des Targets zeigt, muss jedoch nicht automatisch auch im Parasiten die gewünschte Aktivität haben (Chatterjee & Yeung, 2012). Ist die räumliche Struktur eines Wirkstoffziels bekannt, kann zudem eine Optimierung von Wirkstoffen mittels *Structure Based Inhibitor Optimization* erfolgen. Hierbei kann durch Modifikation einer Leitstruktur nicht nur eine Verbesserung der Aktivität und Spezifität des Wirkstoffes erfolgen, sondern auch eine Erhöhung der Löslichkeit, Stabilität oder Bioverfügbarkeit erreicht werden.

Zudem können mittels *Structure Based Drug Design* oder *Molecular Docking* auf Grundlage der Kristallstruktur eines Proteins gezielt neue Wirkstoffe entworfen werden, die in der Lage sind das gewählte Target zu binden. Somit kann basierend auf Strukturdaten und validierten Zielstrukturen auch ein virtuelles Screening zur Identifizierung neuer Wirkstoffe erfolgen. Entsprechende Studien finden sich bisher relativ selten, könnten jedoch mit vermehrter Verfügbarkeit von Strukturdaten und potentiellen Targets an Bedeutung gewinnen (Nicola et al., 2007; Penna-Coutinho et al., 2011; Eubanks et al., 2018; Lima et al., 2019).

Untersuchungen von Swinney & Anthony (2011) zeigten, dass vor allem Phänotypische Screens zur Identifizierung von Wirkstoffen mit völlig neuen Wirkmechanismen (*First-in Class Drugs*) beitragen. Target-basierte Screens hingegen führten vor allem zur Identifizierung von *Follower Drugs*, die auf bereits bekannte Mechanismen abzielen (Swinney & Anthony, 2011).

1.2.8 Kinase-Inhibitoren als antiplasmodiale Wirkstoffe

Kinasen sind auch in *Plasmodium falciparum* essentielle Regulatoren für eine Vielzahl zellulärer Prozesse und stellen somit vielversprechende Angriffspunkte für antiplasmodiale Wirkstoffe dar. Die Tatsache, dass 48% der über 13.000 antiplasmodialen Hits des TCAM Sets (s.o.) Kinase-Inhibitoren sind, verdeutlicht ebenso das Potential von Kinasen als Zielstruktur für neue antiplasmodiale Wirkstoffe (Gamo et al., 2010).

Die Verbindung MMV390048 stellt den ersten und bisher einzigen Kinase-Inhibitor zur Behandlung von Malaria dar, der die Phase klinischer Studien erreicht hat. MMV390048 gehört zur Klasse der 2-Aminopyridine und inhibiert die plasmodiale Phosphatidylinositol-4-Kinase (Younis et al., 2012; McNamara et al., 2013). Die Verbindung zeigt *in vivo* im nanomolaren Konzentrationsbereich eine antiplasmodiale Aktivität gegen alle Stadien des

parasitären Lebenszyklus mit Ausnahme von Hypnozoiten (Younis et al., 2012; Paquet et al., 2018). Basierend auf dem Inhibitor MMV390048 sind bereits weitere PI4K-Inhibitoren mit verbesserter Löslichkeit und Bioverfügbarkeit in der Entwicklung (Brunschwig et al., 2018; Gibhard et al., 2018; Ibrahim et al., 2019; Liang et al., 2020). Erste klinische Studien am Menschen zeigten, dass die Verbindung MMV390048 gut toleriert wird, sicher ist und eine hohe antiplasmodiale Aktivität zeigt. Somit stellt die Verbindung einen potentiellen Partnerwirkstoff bei der Malariatherapie oder Prophylaxe dar (McCarthy et al., 2020; Sinxadi et al., 2020).

Ebenso stellen die Vertreter der FIKK-Kinasen vielversprechende Ziele für antiplasmodiale Kinase-Inhibitoren dar. Da für diese Kinase-Familie keine Orthologe im Menschen existieren, würden entsprechende Kinase-Inhibitoren vermutlich weniger unspezifische Wechselwirkungen mit humanen Kinasen aufweisen. Untersuchungen aus dem Jahr 2017 identifizierten erstmals einen FIKK8-spezifischen Inhibitor, bei dem es sich um das Anthrachinon Emodin handelt (Lin et al., 2017). Diese Verbindung kann als Grundlage für die Entwicklung weiterer FIKK-spezifischer Inhibitoren dienen. Eine antiplasmodiale Wirkung von Emodin wurde bisher jedoch nicht untersucht.

In einem virtuellen Screen wurden die Kinasen CDPK1, CDPK4 und PK6 als Zielstrukturen zur Identifizierung von Multi-Kinase-Inhibitoren untersucht. Zwei der 10 identifizierten Hits zeigten hierbei eine antiplasmodiale Aktivität im nanomolaren Konzentrationsbereich mit Inhibierung von Ookineten im Mausmodell. Somit stellen diese Inhibitoren potentielle Wirkstoffe zur Blockierung der Erregertransmission dar (Lima et al., 2019).

In einem Target-basierten Screen wurden über 24.600 Verbindungen, darunter auch das TCAM Set (Gamo et al., 2010), gegen die Kinasen *PfCLK1* und *PfCLK3* getestet, wobei die Verbindung TCMDC-135051 von insgesamt über 2500 Hits die vielversprechendste Aktivität und Selektivität zeigte. TCMDC-135051 zeigte keine Aktivität gegenüber dem humanen Ortholog oder den nahe verwandten plasmodialen Kinasen CDPK1 und PKG. Zudem wirkt die Verbindung bei nanomolaren Konzentrationen antiplasmodial gegenüber Blut- und Leberstadien sowie Gametozyten von *P. falciparum*, *P. knowlesi* und *P. berghei*. Somit stellt *PfCLK3* ein weiteres potentielles Target für antiplasmodiale Wirkstoffe dar, die zur symptomatischen Behandlung von Malaria und zur Blockierung der Erreger-Transmission dienen können (Alam et al., 2019).

In einem phänotypischen Screen wurden zudem 4731 Protein-Kinase-Inhibitor-ähnliche Verbindungen der DDU-Bibliothek (*Drug Discovery Unit, University of Dundee*, Brenk et al., 2008), die gegen die *Hinge*-Region von eukaryontischen Proteinkinase designiert wurden, gegen Blutstadien von *P. falciparum* getestet. Letztlich konnten 21 Verbindungen identifiziert werden, die *P. falciparum* mit einer IC_{50} von unter 1 μ M inhibierten. In einem weiteren Screen wurden 10 dieser Verbindungen gegen 76 eukaryontische Proteinkinasen getestet, wobei nahezu keine Aktivität der Verbindungen beobachtet werden konnte. Somit stellen diese Verbindungen entweder *Plasmodium*-spezifische Kinase-Inhibitoren dar oder vermitteln ihre

antiplasmodiale Aktivität über einen nicht Kinase-basierten Wirkmechanismus (Hallyburton et al., 2017).

Auch die Kinase GSK3 stellt eine potentielle Zielstruktur für antiplasmodiale Verbindungen dar. Da jedoch auch im Menschen entsprechende Homologe der GSK3 existieren, ist hierfür eine Identifizierung von *Plasmodium*-spezifischen GSK3-Inhibitoren erforderlich. Strukturmodelle der plasmodialen GSK3 β von Kruggel & Lemcke (2009) lassen den Schluss zu, dass *Pf*GSK3 β und *Hs*GSK3 β ausreichend Divergenz für eine selektive Hemmung zulassen. Bei bioinformatischen Sequenz- und Strukturvergleichen von 21 verschiedenen eukaryontischen Orthologen der GSK3 kamen Osolodkin et al. (2011) ebenso zu dem Schluss, dass eine selektive Hemmung von *Pf*GSK3 möglich wäre. Dies bestätigt Untersuchungen durch Droucheau et al. (2004), die zeigten, dass *Pf*GSK3 und *Hs*GSK3 durch Inhibitoren wie Alsterpaullon (Schultz et al., 1999; Leost et al., 2000) selektiv gehemmt werden können. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Alsterpaullon die humane GSK3 mit einer IC₅₀ von 4 nM hemmt, gegenüber *Pf*GSK3 jedoch eine IC₅₀ von 320nM aufweist. Somit scheinen die Kinasen ausreichend strukturelle Unterschiede für eine selektive Hemmung aufzuweisen (Leost et al., 2000; Droucheau et al., 2004). Schließlich wurde mit einem *High-Throughput Screening* nach Inhibitoren der plasmodialen GSK3 gesucht. Hierbei zeigten 18 von insgesamt 10.480 untersuchten Verbindungen bei einer Konzentration von 10 μ M mindestens 50% Hemmung der *Pf*GSK3 β . Zudem zeigten fünf der 18 identifizierten Verbindungen ein 3-Amino-4-arylthieno[2,3-b]pyridine-Motiv als einheitliche Grundstruktur (Fugel et al., 2013). Beim Screen einer weiteren Substanzbibliothek mit 427 ähnlichen Verbindungen konnte schließlich eine Leitstruktur identifiziert werden, die *Pf*GSK3 β mit einer IC₅₀ von 1,61 μ M inhibiert, jedoch keine Aktivität gegenüber GSK3 β aus *Sus scrofa* zeigte. Auf Grundlage dieser Leitstruktur gelang es schließlich den *Pf*GSK3-Inhibitor 5v zu synthetisieren, der eine vielversprechende Selektivität und Aktivität gegenüber der Kinase aufweist (IC₅₀[*Pf*]: 480 nM vs. IC₅₀[*Hs*]: 3,3 μ M) und zudem antiplasmodial wirkt (Fugel et al., 2013).

Bei den phänotypischen Screens der Firmen Novartis und GlaxoSmithKline (vgl. Abschnitt 1.2.7) konnte *Pf*GSK3 ebenso als potentielles Target für einige der antiplasmodialen Hits identifiziert werden (Gamo et al., 2010; Guigumede et al., 2010). Somit stellen auch antiplasmodiale Verbindungen dieser Wirkstoff-Screens potentielle Leitstrukturen für die Entwicklung selektiver *Pf*GSK3-Inhibitoren dar.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der zunehmenden Entwicklung und Verbreitung von Wirkstoffresistenzen gegen die verfügbaren Malaria-Therapeutika werden dringend neue antiplasmodiale Zielstrukturen und Wirkstoffe benötigt. Hierbei stellen Kinasen vielversprechende Drug Targets für neue antiplasmodiale Verbindungen dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Validierung neuer antiplasmodialer Verbindungen sowie die Charakterisierung von *PfGSK3* als potentielles antiplasmodiales Drug Target. Hierfür sollten zunächst *in vitro* mithilfe von rekombinanter *PfGSK3* spezifische Kinase-Inhibitoren identifiziert werden. Anschließend sollte *PfGSK3* mithilfe dieser Inhibitoren sowie *Reverse Genetics* als antiplasmodiales Drug Target validiert werden.

Zusätzlich sollte ein Naturstoff aus *Streptomyces sp.* als neuer antiplasmodialer Wirkstoff validiert werden.

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien & Reagenzien

Chemikalie	Hersteller (Standort)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)	Roche (Mannheim)
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe)
Accutase Cell Detachment Solution	PAN Biotech (Aidenbach)
Adenosintriphosphat (Ultrapure)	Promega (Mannheim)
Agar	Becton Dickinson (Heidelberg)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
AlbumaxII	Invitrogen (Karlsruhe)
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Biomol (Hamburg)
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Ampuva Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi (Bad Homburg)
Bacto™ Hefeextrakt	Becton Dickinson (Heidelberg)
Bacto™ Pepton	Becton Dickinson (Heidelberg)
Bodipy TR C ₅ -Ceramide	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Concanavalin A (ConA)	Merck (Darmstadt)
Coomassie Brilliantblau R250	Merck (Darmstadt)
Descosept	Dr. Schuhmacher GmbH (Malsfeld)
Desoxynukleotide (dNTPs)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Dihydroethidium (DHE)	Biomol (Hamburg)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (EtOH)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Formaldehyd Ultra Pure (methanolfrei, 10%)	Polysciences Inc. (Hirschberg)

Giemsa's Azur-Eosin-Methylenlösung	Merck (Darmstadt)
Glukose	Merck (Darmstadt)
Glutaraldehyd	Roth (Karlsruhe)
Glutathion	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycerol	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Merck (Darmstadt)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Hoechst 3842	Biomol (Hamburg)
Hypoxathin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Immersionsöl TypF $N_e^{23}=1,5180 / v_e=46$	Leica (Wetzlar)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Manganchlorid	Merck (Darmstadt)
Methanol (MeOH)	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Mounting Medium	Dako (Carpinteria, USA)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natronlauge	Merck (Darmstadt)
N-Laurylsarcosin (NLS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Percoll	GE Healthcare (Freiburg)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche (Mannheim)
Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PrestoBlue Cell Viability Agent	Invitrogen (Karlsruhe)
RNaseOUT	Invitrogen (Karlsruhe)
RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
Saponin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Sekusept Plus	Ecolab GmbH (Monheim am Rhein)

Sorbitol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Triethylammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trisbase	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	United States Biological (Salem, USA)
Trizol	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)

2.1.2 Reinstwasser

Für sämtliche Puffer und Medien sowie Reaktionsansätze wurde Wasser aus seiner MilliQ-Reinstwasseranlage (Millipore, USA) verwendet, welches im Folgenden als H₂O bezeichnet wird.

2.1.3 Kulturmedien

Luria-Bertani (LB)-Medium

in H₂O, autoklaviert

1% (w/v) Natriumchlorid
1% (w/v) Pepton
1% (w/v) Hefeextrakt

LB-Agar

in LB Medium

1,5% (w/v) Agar-Agar

Super Optimal Broth (SOB)-Medium

in H₂O, autoklaviert
pH 7,0 mit NaOH

10 mM Natriumchlorid
2,5 mM Kaliumchlorid
2% (w/v) Trypton
0,5% (w/v) Hefeextrakt

RPMI Kompletmedium

in H₂O, sterilfiltriert
pH 7,2 mit NaOH

1,587% (w/v) RPMI 1640
12 mM NaHCO₃
6 mM D-Glucose
0,2 mM Hypoxanthin
0,4 mM Gentamicin
0,5% (w/v) Albumax II

DMEM (PAN Biotech)

+ 10% fötales Kälberserum
+100 U/mL Penicillin
+100 µg/mL Streptomycin
sterilfiltriert

200 mg/L Calciumchlorid-Anhydrat
0,1 mg/L Eisen(III)-nitrat x 9H₂O
97,66 mg/L Magnesiumsulfat-Anhydrat
400 mg/L Kaliumchlorid
6,4 g/L Natriumchlorid
108 mg/L Natriumdihydrogenphosphat

4,5 g/L D(+)-Glucose-Anhydrat
 110 mg/L Natriumpyruvat
 15 mg/L Phenolrot
 84 mg/L L-Arginin x HCl
 62,58 mg/L L-Cystein x 2HCl
 30 mg/L Glycin
 42 mg/L L-Histidin x HCl x H₂O
 104,8 mg/L L-Isoleucin
 104,8 mg/L L-Leucin
 146,2 mg/L L-Lysin x HCl
 30 mg/L L-Methionin
 66 mg/L L-Phenylalanin
 42 mg/L L-Serin
 95,2 mg/L L-Threonin
 16 mg/L L-Tryptophan
 103,79 mg/L L-Tyrosin x Na
 93,6 mg/mL L-Valin
 4 mg/L D-CalciumPantothentat
 4 mg/L Cholinchlorid
 4 mg/L Folsäure
 7 mg/L myo-Inositol
 4 mg/L Nicotinamid
 4 mg/L Pyridoxin x HCl
 0,4 mg/L Riboflavin
 4 mg/L Thiamin x HCl
 2,2 g/L NaHCO₃

2.1.4 Puffer & Lösungen

Mikrobiologische Methoden

Transformationspuffer
 In H₂O, sterilfiltriert
 pH 6,7 mit KOH
 (vor Zugabe von MnCl₂)

10 mM PIPES
 15 mM CaCl₂
 250 mM KCl
 55 mM MnCl₂

Cryostabilat-Lösung
 in LB-Medium

50% (v/v) Glycerol

Molekularbiologische Methoden

TAE-Puffer autoklaviert	40 mM Tris 1 mM EDTA 20 mM Essigsäure
TE-Puffer (pH 8,0) autoklaviert	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1mM EDTA
Natriumacetat-Lösung in H ₂ O	3 M Natriumacetat

Proteinbiochemische Methoden

Protein-Standardpuffer in H ₂ O (pH 7,0) + 1x Protease-Inhibitor	150 mM NaCl 50 mM NaH ₂ PO ₄ 10% (v/v) Glycerol
Protein-Lysepuffer in H ₂ O (pH 8,0) +1x Protease-Inhibitor	150 mM NaCl 50 mM NaH ₂ PO ₄ 0,5 mM DTT 10% (v/v) Glycerol
Protein-Waschpuffer in H ₂ O (pH 8,0) +1x Protease-Inhibitor	150 mM NaCl 50 mM NaH ₂ PO ₄ 0,5 mM DTT 10% (v/v) Glycerol 1% (v/v) Triton-X-100
Protein-Elutionspuffer in H ₂ O (pH 8,0) +1x Protease-Inhibitor	150 mM NaCl 50 mM NaH ₂ PO ₄ 0,5 mM DTT 10% (v/v) Glycerol 20 mM Glutathion
SDS-Ladepuffer (5x) in H ₂ O	416 mM SDS 300 mM Tris-HCl pH 6,8 596 mM DTT 60% Glycerol 0,01% (w/v) Bromphenolblau
Trenngelpuffer in H ₂ O (pH 8,8)	1,5 M Tris-HCl

Sammelgelpuffer in H ₂ O (pH 6,8)	1 M Tris-HCl
Ammoniumpersulfat-Lösung in H ₂ O	10% (w/v) APS
SDS-Laufpuffer	25mM Tris 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
Coomassie-Färbelösung in H ₂ O	0,25% Coomassie Brilliant Blue R250 10% Essigsäure 40% Methanol
Coomassie-Entfärbelösung in H ₂ O	40% Methanol 10% Essigsäure
Westernblot-Transferpuffer in SDS-Laufpuffer	20% Methanol
Westernblot-Blockierlösung in PBS-Tween oder TBS-Tween	5% (w/v) Milchpulver
PBS (10x) in H ₂ O (7,4)	17,8 g/L Na ₂ HPO ₄ 80 g/L NaCl 2,4 g/L KH ₂ PO ₄ 2 g/L KCl
PBS-Tween in 1x PBS	0,05% Tween
TBS (10x) in H ₂ O (pH 7,4)	1,5 M NaCl 30 mM KCl 250 mM Tris
TBS-Tween in 1x TBS	0,05 % Tween
Kinase Reaktionspuffer in H ₂ O (pH 7,5)	40 mM Tris 20 mM MgCl ₂ 0,1 mg/mL BSA
3C-Protease-Puffer in H ₂ O (pH 7,5)	20 mM Tris 150 mM Natriumchlorid 1 mM DTT 0,5 mM EDTA 0,1 % (v/v) Triton-X-100

Zellbiologische Methoden

Giemsa-Lösung in H ₂ O	10% (v/v) Giemsa azur-Eosin-Methylenlösung
Sorbitol-Synchronisierungslösung in H ₂ O, sterilfiltriert	5% (w/v) D-Sorbitol
Saponin in PBS	0,03% Saponin
Amaxa Transfektionspuffer in H ₂ O, sterilfiltriert	90 mM Na ₂ HPO ₄ 5 mM KCl 50 mM HEPES 150 µM CaCl ₂
Malaria Freezing Solution (MFS) in H ₂ O, sterilfiltriert	208 mM D-Sorbitol 139 mM NaCl 35% (v/v) Glycerol
Malaria Thawing Solution (MTS) in H ₂ O, sterilfiltriert	3,5% (w/v) Natriumchlorid
Percoll-Stammlösung sterilfiltriert	90% (v/v) Percoll 10% (v/v) 10xPBS
40% Percoll sterilfiltriert	44% (v/v) Percoll Stammlösung 56% (v/v) RPMI Komplettmedium 0,08 g/mL D-Sorbitol
60% Percoll sterilfiltriert	67% (v/v) Percoll Stammlösung 33% (v/v) RPMI Komplettmedium 0,08 g/mL D-Sorbitol
80% Percoll sterilfiltriert	89% (v/v) Percoll Stammlösung 11% (v/v) RPMI Komplettmedium 0,08 g/mL D-Sorbitol
BSA-Lösung in PBS	3% (w/v) BSA
PFA-Fixierlösung in PBS	4% (w/v) Paraformaldehyd 0,0075% (v/v) Glutaraldehyd
DAPI in H ₂ O	1 mg/mL DAPI

Bodipy in PBS	5µM Bodipy
SYBR Gold in DMSO	10.000x SYBR Gold
SYBR Green in DMSO	100x SYBR Green
DHE in DMSO	0,5 mg/mL DHE
Hoechst33342 in DMSO	0,45 mg/mL Hoechst33342
FACS Stopp Lösung in RPMI Komplettmedium	0,0003% Glutaraldehyd
Rapalog-Stocklösung in Ethanol	500 mM Rapalog (AP21967)
Rapalog-Lösung in RPMI Komplettmedium	1:20 Rapalog-Stocklösung
Drug Screen Lysepuffer in H ₂ O pH 7,5	20 mM Tris 5 mM EDTA 0,008% Saponin 0,08% Triton-X-100
Parasiten-Lysepuffer in H ₂ O	4% SDS 0,5% Triton-X-100 0,5x PBS
Humanes Erythrozytenkonzentrat	Steriles Erythrozytenkonzentrat der Blut-gruppe 0+ (Blutbank Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf)
HEK Freezing Solution in DMEM	10% fötales Kälberserum 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin 10% DMSO

2.1.5 Antibiotika

Antibiotikum	Stocklösung	Hersteller (Standort)
Ampicillin	100 mg/mL in 70% Ethanol	Roche (Mannheim)
Blasticidin S	5 mg/mL in RPMI Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Chloramphenicol	25 mg/mL in 70% Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Chloroquin	10 mM in PBS	Merck (Darmstadt)
Duocarmycin TM	10 mM in DMSO	MedChemExpress (USA)
Gentamicin	80 mg/ 2 mL SF-Injektionslösung	Ratiopharm (Ulm)
Neomycin	50 mg/mL in RPMI Medium	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Penicillin	10.000 U/mL in H ₂ O	PAN-Biotech (Aidenbach)
Pyrimethamin	5 mg/mL in DMSO	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Streptomycin	10 mg/mL H ₂ O	PAN-Biotech (Aidenbach)
WR99210	20 mM in DMSO	Jacobus Pharamceuticals (USA)

2.1.6 Antikörper & Seren

Tab.2.1: Antikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung		Hersteller/ Ursprung
		WB	IFA	
anti-GFP	Maus	1:1000	1:1000	Roche (Karlsruhe)
anti-GFP	Kaninchen	1:1000	1:500	Thermo Scientific (Waltham, USA)
anti-HA	Ratte	1:1000	1:500	Roche (Karlsruhe)
anti-AMA1 1F9	Maus	-	1:5000	Coley et al., 2006
anti-GAPDH	Maus	1:2000	-	Daubenberger et al., 2003
Anti-BiP	Kaninchen	1:2000	-	Struck et al., 2005
anti-Maus 800CW	Ziege	1:10000	-	LI-COR Lincoln (USA)
anti-Maus 680RD	Ziege	1:10000	-	LI-COR Lincoln (USA)
anti-Maus Alexa594	Ziege	-	1:2000	Invitrogen (Karlsruhe)
anti-Kaninchen 680RD	Ziege	1:10000	-	LI-COR Lincoln (USA)
anti-Ratte 800CW	Ziege	1:10000	-	LI-COR Lincoln (USA)
anti-Ratte 680RD	Ziege	1:10000	-	LI-COR Lincoln (USA)

Serum	Hersteller/Ursprung
Fötale Kälberserum (sterilfiltriert)	Pan Biotech GmbH (Aidenbach)

2.1.7 Enzyme & Peptide

Restriktionsendonuklease	Schnittstelle	Konzentration	Hersteller (Standort)
AvrII	5'...C ^v CTAGG...3' 3'...GGATC [^] A...5'	5U/μL	NEB (Frankfurt am Main)
BglII	5'...A ^v GATCT...3' 3'...TCTAG [^] A...5'	10U/μL	NEB (Frankfurt am Main)
DpnI	5'...GA ^{CH3v} CT...3' 3'...CT [^] A ^{CH3} G...5'	20U/μL	NEB (Frankfurt am Main)
HindIII	5'...A ^v AGCTT...3' 3'...TTCGA [^] A...5'	20U/μL	NEB (Frankfurt am Main)
KpnI	5'...G ^v GTACC...3' 3'...CCATG [^] G...5'	20U/μL	NEB (Frankfurt am Main)
MluI	5'...A ^v CGCGT...3' 3'...TGCGC [^] A...5'	10U/μL	NEB (Frankfurt am Main)
NotI	5'...G ^v CGGCCGC...3' 3'...CGCCGGC [^] G...5'	20U/μL	NEB (Frankfurt am Main)
Sall	5'...G ^v TCGAC...3' 3'...CAGCT [^] G...5'	20U/μL	NEB (Frankfurt am Main)
SpeI	5'...A ^v CTAGT...3' 3'...TGATC [^] A...5'	10U/μL	NEB (Frankfurt am Main)
XhoI	5'...C ^v TCGAG...3' 3'...GAGTC [^] T...5'	20U/μL	NEB (Frankfurt am Main)

Polymerase	Konzentration	Hersteller (Standort)
FirePol DNA Polymerase	5 U/μL	Solis Biodyne (Tartu, Estland)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	2 U/μL	NEB (Frankfurt am Main)
Reverse Transkriptase Superscript III	200U/μL	Invitrogen (Karlsruhe)

Ligase	Konzentration	Hersteller (Standort)
---------------	----------------------	------------------------------

T4 DNA Ligase	400 U/μL	NEB (Frankfurt am Main)
---------------	----------	-------------------------

Phosphatase	Konzentration	Hersteller (Standort)
--------------------	----------------------	------------------------------

Calf Intestine Alkalische Phosphatase	5 U/μL	NEB (Frankfurt am Main)
---------------------------------------	--------	-------------------------

Protease	Konzentration	Hersteller (Standort)
-----------------	----------------------	------------------------------

HRV 3C Protease	1 U/μL	Exprimiert in <i>E. coli</i> , zur Verfügung gestellt von Dr. Sophia Reindl (BNITM)
-----------------	--------	-------------------------------------------------------------------------------------

Glycosidase	Konzentration	Hersteller (Standort)
--------------------	----------------------	------------------------------

Lysozym	100.000 U/mg	Fluka (Steinheim)
---------	--------------	-------------------

Kinasen	Hersteller (Standort)
----------------	------------------------------

<i>Pf</i> GSK3β (BL21)	Exprimiert in <i>E. coli</i> BL21 RIL, siehe Abschnitt 3.1.1
------------------------	--------------------------------------------------------------

<i>Pf</i> GSK3β (C41)	Exprimiert in <i>E. coli</i> C41, zur Verfügung gestellt von Samuel Pazicky (EMBL/CSSB, Arbeitsgruppe Dr. Christian Löw) siehe Abschnitt 3.1.1
-----------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<i>Hs</i> GSK3β	aktives Full-Length Protein, Promega (Mannheim)
-----------------	-------------------------------------------------

Peptid (GSK3 Substrat)	Hersteller (Standort)
-------------------------------	------------------------------

GS-1 Peptid (Peptid der humanen Glykogen Synthase 1) Aminosäuren 636-661 Sequenz: YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQ(pS)EDEEE (pS= vorphosphoryliertes Serin)	Promega (Mannheim)
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------

2.1.8 PfGSK3-Inhibitoren

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten potentiellen PfGSK3-Inhibitoren wurden zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Conrad Kunick (TU Braunschweig). Verbindungen mit der Bezeichnung KuMas wurden von Dr. Andreas Masch (TU Braunschweig) synthetisiert (Masch & Kunick, 2015; Masch, 2016; Masch et al., 2019). Verbindungen mit der Bezeichnung KuBra wurden von Dr. Wiebke Brandt (TU Braunschweig) synthetisiert (Brandt, 2009; Fugel et al., 2013). Die Synthese von Verbindungen mit der Bezeichnung KuHL erfolgte durch Dr. Hoang Lande (TU Braunschweig, vgl. Lande, 2016). Verbindungen mit der Bezeichnung KuSaSch wurden von Sandra Schweda (TU Braunschweig) synthetisiert. Sämtliche Verbindungen sind mit entsprechender Strukturformel, Summenformel sowie relativer Molekülmasse in Tabelle 5.1 dargestellt (siehe Anhang).

2.1.9 DNA-und Proteinstandards

Marker	Hersteller (Standort)
Chameleon Duo Prestained Protein Ladder	LI-COR (Lincoln, USA)
GeneRuler 1kb	Fermentas (St. Leon-Rot)
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.10 Synthetische Gene und Oligonukleotide

Synthetische Gene wurden in lyophilisierter Form von der Firma GeneScript Biotech (Leiden, Niederlande) bezogen und wurden im Plasmid pUC57-simple mit den gewünschten Restriktionsschnittstellen geliefert.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert. Zur Herstellung einer 100 μ M Stocklösung wurde gemäß den Herstellerangaben eine entsprechende Menge Wasser zum Lösen der lyophilisierten Oligonukleotide hinzugegeben. Zur weiteren Verwendung wurden Aliquots mit einer Konzentration von 10 μ M hergestellt. Sämtliche Aliquots sowie die Stocklösung wurden bei -20°C gelagert. Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide sowie die zugehörigen DNA-Sequenzen sind in Tabelle 2.2 dargestellt.

Zur cDNA-Synthese wurde Random Hexamer Primer der Firma Invitrogen verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Gemisch aus Primern, die sich aus sechs zufälligen Nukleotiden zusammensetzen.

Tab.2.2 Synthetische Oligonukleotide (Primer) mit entsprechenden Sequenzen. Enthaltene Restriktionsschnittstellen bzw. Primer-Überhänge für eine ligationsunabhängige Klonierung sind in Kleinbuchstaben dargestellt.

¹Salanti et al., 2003

Bezeichnung	Sequenz
GSK3_NotI_sense	5'-GCGCgcgccgcTAACGGGACAGTCAAGTGTGG-3'
GSK3_AvrII_as_forced_int	5'-GCGCcctaggACTTTCTATGATAACGTGCG-3'
GSK3_inte check 1221bp_fwd	5'-GCGCGCTCAACAAATTACACAACAC-3'
GSK3_3'UTR_120_rev	5'-GCGCATGTTTACAGTTTAATTATTTCTG-3'
GSK3_5'UTR_125_fwd	5'-CCTTTTGTCAATTTTGAATTATAC-3'
GSK3_TGD_NotI_TAA_fwd	5'-GCGCgcgccgcTAAAAAATTGGCCTATAGGTATAGAG-3'
GSK3_TGD_MluI_rev	5'-GCGCacgcgtAACACAAAACCTACCATTCCCTAT-3'
GSK3_TGD_inte check_rev	5'-ATAGATACGTCAGAACAAGTTGCGA-3'
GSK3_MBP_HIS_fwd	5'-aagtctgtttcagggcccgATGAAAAATTGGCCTATAG-3'
GSK3_MBP_HIS_rev	5'-atggtctagaagctttaACTTTCTATGATAACTGCG-3'
GSK3-I-TGD_qPCR_fwd	5'-AGTGAGGATGAAGATGAGGAAAGA-3'
GSK3-I-TGD_qPCR_rev	5'-AACACAAAACCTACCATTCCCT-3'
GSK3-I-WT_qPCR_fwd	5'-GTACCCCTACGGAAGATCAGC-3'
GSK3-I-WT_qPCR_rev	5'-GCCTCATCTGGTGTACCCTT-3'
GSK3B_XhoI_fwd	5'-GCGCctcgagATGAAAAATTGGCCTATAGA-3'
GSK3B_SpeI_rev	5'-GCGCactagtACTTTCTATGATAACGTGCG-3'
GSK3B_T226A_fwd	5'-TCTATTAGCTGGGCAAAGAGCTGTCTCATATATTTGTTCAAGGTTTTATCG-3'
GSK3B_T226A_rev	5'-CGATAAACCTTGAACAAATATATGAGACAGCTCTTGCCAGCTAATAGA-3'
GSK3B_T229A_fwd	5'-CTGGGCAAAGAAGTGTCTCAGCAATTTGTTCAAGGTTTTATCG-3'
GSK3B_T229A_rev	5'-CGATAAACCTTGAACAAATTGCTGAGACACTTCTTGCCAG-3'
GSK3B_T226A+T229A_fwd	5'-TCTATTAGCTGGGCAAAGAGCTGTCTCAGCAATTTGTTCAAGGTTTTATCG-3'
GSK3B_T226A+T229A_rev	5'-CGATAAACCTTGAACAAATTGCTGAGACAGCTCTTGCCAGCTAATAGA-3'
GSK3B_recod_intecheck_rev	5'-TTCTTGACTGAGGGTCTGAAG-3'
MAL13P1.84_SLI_NotI_fwd	5'-GAGAgcgccgcTAAGAAAATATTAAGACCACACCAGTA-3'
MAL13P1.84_SLI_AvrII_rev	5'-GAGAcctaggTTTATTTAACGTAGAAAAGTAAGGG-3'
MAL13P1.84_TGD_NotI_fwd	5'-GAGAgcgccgcTAAATATAATGAAAAGTACTAAAATTG-3'
MAL13P1.84_TGD_MluI_rev	5'-GAGAacgcgtTAAGTCAGCTGGATTAATTCTATCA-3'
MAL13P1.84_LIC_pOPIN_fwd	5'-aagtctgtttcagggcccgATGAATAAAATGAAAAGTACT-3'
MAL13P1.84_LIC_pOPIN_rev	5'-atggtctagaagctttaTTTATTTAACGTAGAAAAGTAAGGG-3'
GSK3A_SLI_intecheck_fwd	5'-ATAAATTTAATTGAAGTCATAGGTT-3'
GSK3A_3'UTR_rev	5'-GACCTTTACTAAAATTTATCAAT-3'
GSK3A_XhoI_fwd	5'-GCGCctcgagATGAATAAAATGAAAAGTACT-3'
GSK3A_SpeI_rev	5'-GCGCactagtTTTATTTAACGTAGAAAAGTAAGGG-3'
GSK3A_KpnI_fwd	5'-GAGAggtaccATGAATAAAATGAAAAGTACTAAAATTG-3'
T7_sense	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
pOPIN E/F_rev	5'-CATATGTCCTCCGAGTGAGA-3'
pA55_sense	5'-GGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGG-3'
GFP_272_as	5'-CCTTCGGCATGGCACTC-3'
GST_505_sense	5'-GCCTGGATGCGTTCCTCCAAAAT-3'
mCherry_88_as	5'-GGCCGTTACGGAGCCCTC-3'
nmd3-SEQ_fwd	5'-TATATGACTTTTAAATTAGGAATATTCTC-3'
AMA1-sense	5'-ACCCATATTTATGGGTTTAAATTTTTTTTTTTTTTAAAAA-3'
FKBP_39_rev	5'-TTGACCTCTTTTGGAAATGTACG-3'
Aldolase_qPCR_fwd ¹	5'-TGTACCACCAGCCTTACCAG-3'
Aldolase_qPCR_rev ¹	5'-TTCCTTGCCATGTGTTCAAT-3'

2.1.11 Plasmide

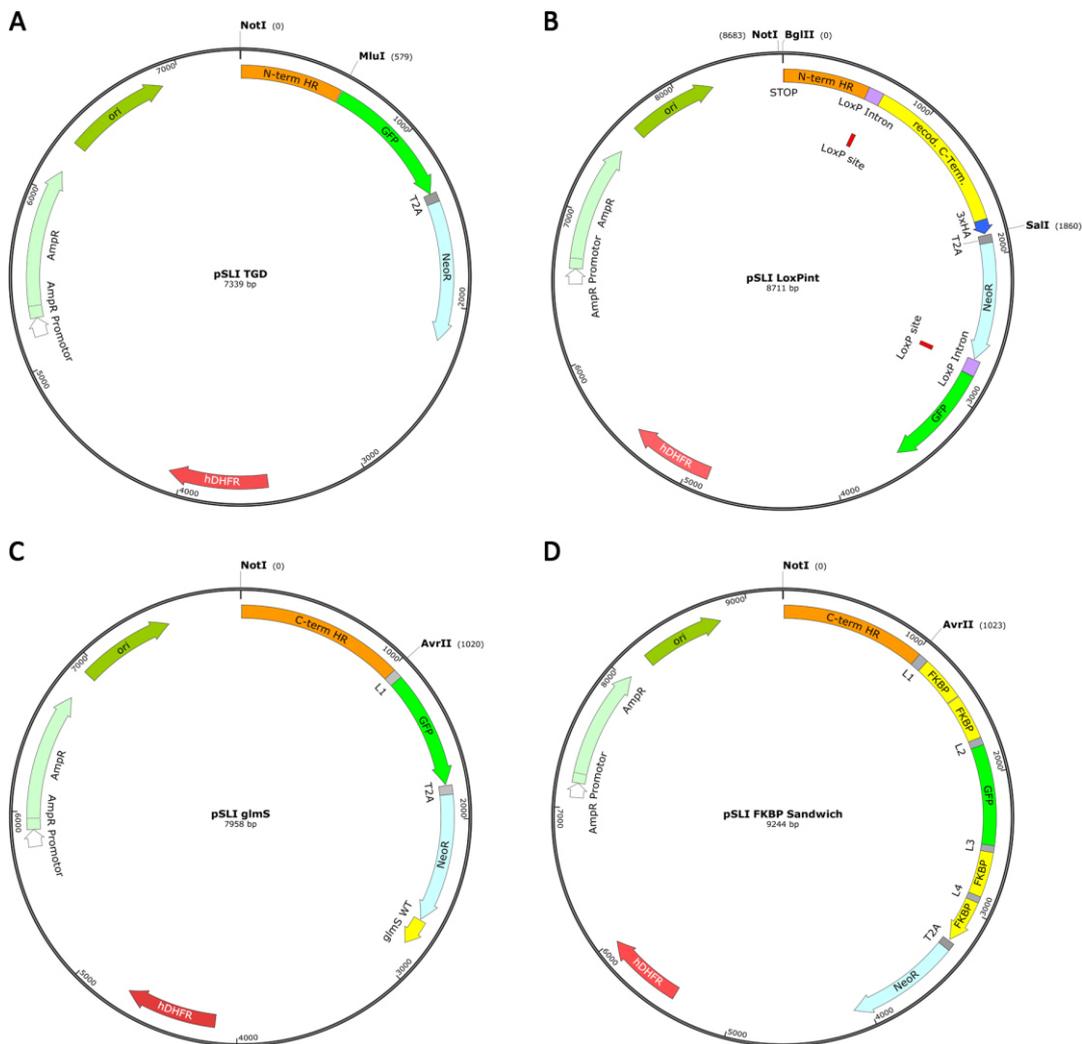


Abb.2.1: Plasmidkarten SLI-basierter Konstrukte. Die SLI-Vektoren erlauben eine N-terminale oder C-terminale Integration des Zielkonstrukts mithilfe einer Homologie-Region. Mittels homologer Rekombination kann somit das gesamte Konstrukt in das Genom des Parasiten integriert werden (Birnbäum et al., 2017). Nach Integration in das Genom des Parasiten wird zudem mithilfe des Skip-Peptids ein weiteres Gen (NeoR) zur Vermittlung einer Neomycin-Resistenz exprimiert, sodass Parasiten, in denen eine Integration erfolgt ist, selektiert werden können. Die codierte hDHFR (humane Dihydrofolatreduktase) vermittelt eine Resistenz gegenüber WR99210 zur Selektion des Episoms in der Parasitenkultur. In einer Bakterienkultur kann das Plasmid mithilfe der codierten Ampicillin-Resistenz (Amp-R) selektiert werden. **(A)** pSLI-TGD erlaubt eine *Targeted Gene Disruption* mittels N-terminaler Integration. Die N-terminale Homologie-Region kann über die Restriktionsschnittstellen NotI/MluI inseriert werden (Birnbäum et al., 2017). **(B)** pSLI LoxP^{int} ermöglicht die Integration von LoxP Introns zur induzierten Exzision des C-Terminus des Zielgens (zur Verfügung gestellt von Dr. Paul Burda, BNITM/CSSB Hamburg). Das Konstrukt kann als synthetisches Gen über die Restriktionsschnittstellen BglII/SalI inseriert werden. **(C)** pSLI FKBP Sandwich erlaubt ein C-terminales Tagging des Zielgens mit GFP und FKBP für einen Knock Sideways (Birnbäum et al., 2017) Die Homologie-Region kann über die Restriktionsschnittstellen NotI/AvrII inseriert werden. **(D)** pSLI glms erlaubt ein C-terminales Tagging des Zielgens mit GFP sowie ein Tagging der mRNA des Gesamtkonstrukts mit einem glms Ribozym (zur Verfügung gestellt von Dr. Paul Burda, BNITM/CSSB Hamburg). Die Homologie-Region kann über eine Restriktion mit NotI/AvrII inseriert werden.

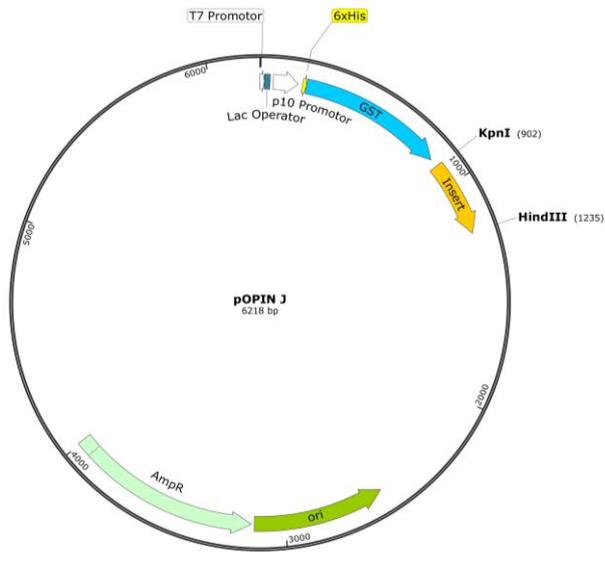


Abb.2.2: Plasmidkarte pOPIN J. Der Vektor pOPIN J erlaubt eine rekombinante Expression von Proteinen in *E. coli* nach Induktion mit IPTG (Berrow et al., 2007). In der Bakterienkultur kann das Plasmid anhand der codierten Ampicillin-Resistenz (Amp-R) selektioniert werden. Das Zielgen kann nach Linearisierung des Vektors mithilfe der Restriktionsschnittstellen KpnI und HindIII über Ligationsunabhängige Klonierung inseriert werden. Das Zielgen liegt anschließend N-terminal fusioniert mit den Affinitätstags 6xHis und GST vor.

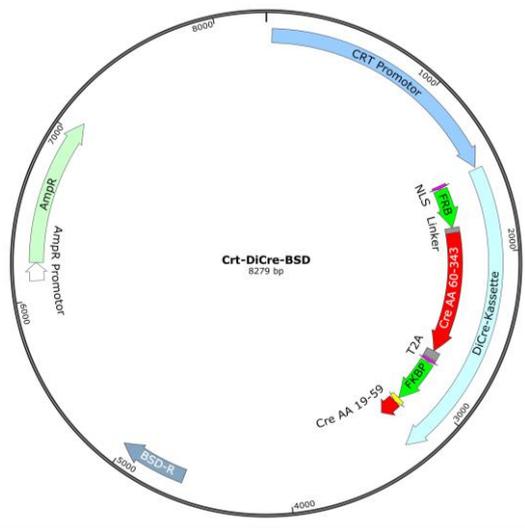


Abb.2.3: Plasmidkarte CRT-DiCre-BSD. Der Vektor erlaubt eine episodale Expression einer in zwei Fragmente geteilten Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines CRT-Promotors im Parasiten und kann über eine Blasticidin-Resistenz (BSD-R) selektioniert werden. Der N-terminale Teil der Cre-Rekombinase liegt zudem als Fusion mit einer FRB-Domäne vor, wohingegen der C-terminale Teil mit einer FKBP-Domäne fusioniert ist. Beide Fragmente sind zudem mit einem Kernlokalisierungssignal (NLS) versehen und können mithilfe eines Skip-Peptids unabhängig von einander exprimiert werden. In der Bakterienkultur kann das Plasmid anhand der codierten Ampicillin-Resistenz (Amp-R) selektioniert werden. Das Plasmid wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Moritz Treck (Francis Crick Institute, London).

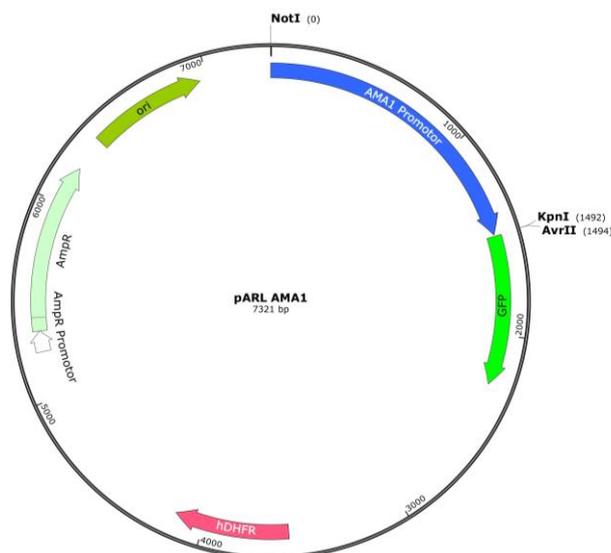


Abb.2.4: Plasmidkarte pARL AMA1. Der Vektor basiert auf dem Vektor pARL1a (Crabb et al., 2004) und erlaubt eine episodale Expression des Zielgens als Fusion mit GFP unter Kontrolle eines AMA1-Promotors (Treck et al., 2009). Die codierte hDHFR (humane Dihydrofolatreduktase) vermittelt eine Resistenz gegenüber WR99210 zur Selektion des Episoms in der Parasitenkultur. Das Zielgen kann über die Restriktionsschnittstellen KpnI/AvrII inseriert werden. In der Bakterienkultur kann das Plasmid anhand der codierten Ampicillin-Resistenz (Amp-R) selektioniert werden.

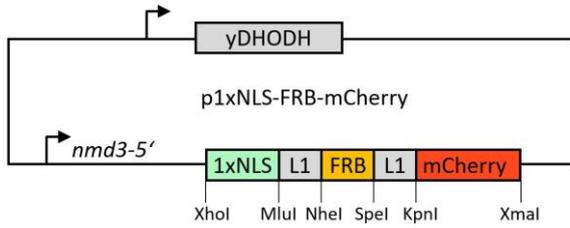


Abb.2.5: Plasmidkarte Zellkern-Mislocalizer. Der Mislocalizer erlaubt eine episodale Expression einer FRB-Domäne als Fusion mit mCherry und 1xNLS als Lokalisationssignal für den Zellkern unter Kontrolle eines nmd3-Promotors (Birnbaum et al., 2017). Die codierte yDHODH (Dihydroorotatdehydrogenase aus Hefe) vermittelt eine Resistenz gegenüber DSM1 zur Selektion des Episoms in der Parasitenkultur.

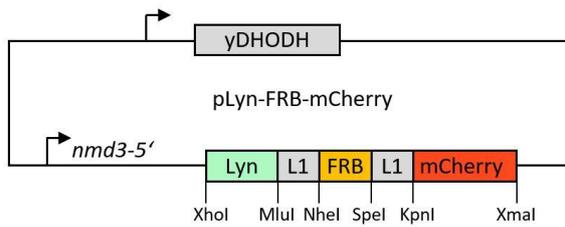


Abb.2.6: Plasmidkarte PPM-Mislocalizer. Der Mislocalizer erlaubt eine episodale Expression einer FRB-Domäne als Fusion mit mCherry und Lyn als Lokalisationssignal für die parasitäre Plasmamembran unter Kontrolle eines nmd3-Promotors (Birnbaum et al., 2017). Die codierte yDHODH (Dihydroorotatdehydrogenase aus Hefe) vermittelt eine Resistenz gegenüber DSM1 zur Selektion des Episoms in der Parasitenkultur.

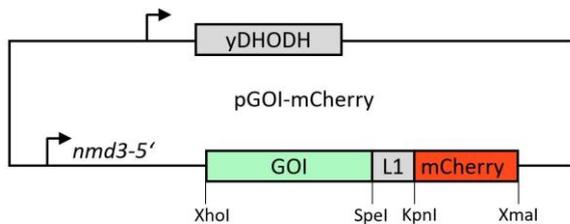


Abb.2.7: Plasmidkarte nmd3-GOI-mCherry. Der Vektor basiert auf den Mislocalizer-Plasmiden (s.o.) und erlaubt eine episodale Expression des Zielgens als Fusion mit mCherry unter Kontrolle eines nmd3-Promotors. Die codierte yDHODH (Dihydroorotatdehydrogenase aus Hefe) vermittelt eine Resistenz gegenüber DSM1 zur Selektion des Episoms in der Parasitenkultur. Das Zielgen kann über die Restriktionsschnittstellen XhoI/SpeI inseriert werden.

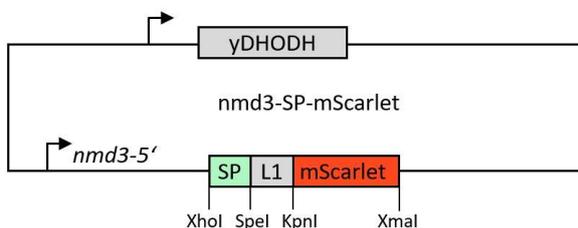


Abb.2.8: Plasmid karte nmd3-SP-mScarlet. Der Vektor basiert auf den Mislocalizer-Plasmiden (s.o.) und erlaubt eine episodale Expression von mScarlet als Fusion mit einem Signalpeptid (SP) für die parasitäre Vakuole (PV) unter Kontrolle eines nmd3-Promotors (zur Verfügung gestellt von Dr. Paolo Mesen-Ramirez, BNITM Hamburg). Die codierte yDHODH (Dihydroorotatdehydrogenase aus Hefe) vermittelt eine Resistenz gegenüber DSM1 zur Selektion des Episoms in der Parasitenkultur.

2.1.12 Reaktionskits und Fertigversuchsansätze

Produkt	Hersteller (Standort)
Cut Smart Puffer	NEB (Frankfurt am Main)
DNA Loading Dye (6x)	Thermo Fisher (Waltham, USA)
DPBS Puffer	PAN Biotech
Glutathion Sepharose Beads	GenScript (Piscataway, USA)
GSK3 β Kinase Enzyme System	Promega (Mannheim)
In-Fusion [®] HD Eco Dry [™] Cloning Kit	Takara Clontech (Mountain View, USA)
KinaseGlo Plus Assay	Promega (Mannheim)
Nucleo Spin [®] Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel (Düren)
Nucleo Spin [®] Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)
Pierce [™] BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim)
PureYield [™] Plasmid Midiprep System	Promega (Mannheim)
QIAamp [®] DNA Mini Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAGEN [®] Plasmid Midi Kit	QIAGEN (Hilden)
RNeasy Mini Kit	QIAGEN (Hilden)

2.1.13 Organismen & Zelllinien

E. coli Stämme

<i>E. coli</i> XL10 Gold	Tetr Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB</i> - <i>hsdSMRmrr</i>) 173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lacIqZ</i> Δ M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)-RIL	B F- <i>ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>dcm</i> + Tetr <i>gal endA</i> Hte [<i>argU ileY leuW Camr</i>]

<i>Plasmodium falciparum</i> Stamm	Ursprung	Resistenz
3D7 (NF54-Klon)	Isolat eines Malaria-Patienten nahe Schipol Airport (Amsterdam), Ursprung wahrscheinlich West-Afrika vgl. Walliker et al. (1987)	----
7G8 (IMTM22-Klon)	Ursprung: Brasilien vgl. Burkot et al. (1984)	CQ, PYR, CYC

Zelllinien

HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen (<i>Human Embryonic Kidney</i>)
---------	---------------------------------------------------------------------

2.1.14 Geräte

Gerät	Hersteller (Standort)
Abzug	Köttermann Labortechnik (Uetze)
Abzug	WALDNER Laboreinrichtungen (Wangen)
ÄKTA Protein Purification System	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
ChemiDoc™XRS+ Molecular Imager®	BIO-RAD (München)
CO ₂ Incubator CO 150	Eppendorf (Hamburg)
CryoCube F74hi	Eppendorf (Hamburg)
CryoCube FC660h	Eppendorf (Hamburg)
Durchflusszytometer BD™ LSR II	BD Biosciences (Erembodegem, Belgien)
Eismaschine EF 156 easy fit	Scotsman® (Vernon Hills, USA)
Electrophoresis Power Supply E835	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Electrophoresis Power Supply EV231	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Elektrophoresesystem 40-0708 + Zubehör	PEQLAB (Erlangen)
Elektrophoresesystem 40-1214 + Zubehör	PEQLAB (Erlangen)
Elektroporator Nucleofector®II	Lonza (Köln)

EnVision Multilable Plate Reader	PerkinElmer (Hamburg)
Feinwaage ATILON	Satorius (Göttingen)
Feinwaage KERN 572	KERN & SOHN GmbH (Balingen-Frommern)
Feinwaage KERN EW	KERN & SOHN GmbH (Balingen-Frommern)
Feinwaage KERN PCBM	KERN & SOHN GmbH (Balingen-Frommern)
Flow Cytometer Novocyte 1000	ACEA Biosciences Inc. (San Diego, USA)
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC control	VACUUBRAND (Wertheim)
Inkubator HERA THERM	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Leuchtplatte REX	REX Messinstrumentebau (Erlangen)
Magnetrührer mit Heizung MR 3001	Heidolph (Schwabach)
Magnetrührer mit Heizung RSM-01Hs	Phoenix Instrument GmbH (Garbsen)
Magnetrührer mit Heizung RSM-10HP	Phoenix Instrument GmbH (Garbsen)
Mikrowelle micromaxx® MM41568	Medion (Mülheim)
Mikrowelle MW5717	MCC Trading International GmbH (Düsseldorf)
Milli-Q-Reinstwasseranlage	Millipore (Bedford, USA)
Nano Drop 2000c Spectrometer	Thermo Scientific (Schwerte)
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
Odyssey® Fc Imaging System	LI-COR (Bad Homburg)
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH (Berlin)
pH-Meter Lab 850	SI Analytics (Mainz)
pH-Meter Seven Easy	Mettler Toledo (Columbus, USA)
Pipettierhilfe Matric CellMate II	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Pipettierhilfe Pipetboy 2	INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal)
Pipettierroboter JANUS	PerkinElmer (Hamburg)
Plattformschüttler GFL-3006	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Plattformschüttler UNIMAX 1010	Heidolph (Schwabach)
Power Pac™ Basic	BIO-RAD (München)
Power Pac™ HC	BIO-RAD (München)
Roller Mixer SRT6D	Bibby Scientific Limited (Staffordshire, UK)
Roller Mixer Sun Lab SU1400	Sunlab (Aschaffenburg)
Rotator SB3	Bibby Scientific Limited (Staffordshire, UK)
Schüttelinkubator Innova®40	Eppendorf (Hamburg)
Schüttelinkubator Max ^Q 4000	Thermofisher Scientific (Waltham, USA)
SDS-PAGE und Westernblot Kammer	BIO-RAD (München)
Sonifier Branson 250	Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
Spectrophotometer DS-11+	DeNovix (Wilmington, USA)

Sterilbank MAXI SAFE 2020	ThermoScientific (Waltham, USA)
Sterilbank SAFE 2020	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Sterilbank Steril GARD®III Advance	The Baker Company (Sanford, USA)
Thermal Cycler C1000 Touch™	BIO-RAD (München)
Thermal Cycler GeneTouch	BIOER (Hangzhou, China)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer F1.5	Eppendorf (Hamburg)
Transferpette-8 elektronisch (0,5-10 µL)	BRAND GmbH & Co KG (Wertheim)
Transferpette-8 elektronisch (10-200 µL)	BRAND GmbH & Co KG (Wertheim)
Vakuumpumpe 2522Z	WELCH/Garden Denver (Monroe, USA)
Vakuumpumpe Laboport	KNF Neuberger (Freiburg)
Vakuumpumpe VACUSAFE Absaugsystem	INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal)
Vortex Genie 2	Scientific Industries™ (New York)
Vortex VF2	JANKE & KUNKEL IKA Labortechnik (Staufen)
Wasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Wasserbad Typ 1002	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)

Zentrifugen (Rotoren)

Avanti J-26 XP Centrifuge (JA-14, JA-25.50)	Beckman (Krefeld)
Centrifuge 5412 D (F45-24-11)	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5424 (FA-45-24-11)	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5424R (FA-45-24-11)	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5810R (A-4-62)	Eppendorf (Hamburg)
J2-HS Centrifuge (JA-12)	Beckman (Krefeld)
Megafuge 1.0R (7570E)	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Micro Centrifuge (Butterfly 2x 8x 0,2 mL)	Fisher Scientific (Schwerte)
Sprout™ Mini Centrifuge (2x 8x 0,2 mL)	Heathrow Scientific (Vernon Hills, USA)
Sprout™ Mini Centrifuge (6x 1,5/2 mL)	Heathrow Scientific (Vernon Hills, USA)

Hersteller (Standort)

Mikroskope

Floureszenzmikroskop Axio Imager M1	ZEISS (Oberkochen)
Floureszenzmikroskop Axio Imager M2	ZEISS (Oberkochen)
Floureszenzmikroskop DM6B	Leica (Wetzlar)
Lichtmikroskop Axio Lab.A1	ZEISS (Oberkochen)
Lichtmikroskop DM 2000 LED	Leica (Wetzlar)

Hersteller (Standort)

2.1.15 Verbrauchsmaterialien & Glaswaren

Material	Hersteller (Standort)
384-Well Platte NUNC, weiß, Flachboden	Merck (Darmstadt)
Becherglas KIMAX (100, 250, 600, 1000 mL, Glas)	Kimble Chase Life Science (Meiningen)
Becherglas (100, 400, 1000, 2000 mL Kunststoff)	VITLAB GmbH (Grossostheim)
Chirurgische Einmalskalpelle	Braun (Melsungen)
Codierplättchen, weiß	Sarstedt (Nümbrecht)
CryoPure Gefäß 1,6mL, weiß	Sarstedt (Nümbrecht)
Dako Stift	Dako (Glostrup, Dänemark)
Deckgläschen	R. Langenbrinck GmbH (Emmendingen)
Dialyseschlauch Spectr/Por® MWCO 6000-8000	Serva (Heidelberg)
Einmalhandschuhe Latex ecoSHIELD	SHIELD Scientific (Bennekom, NL)
Einmalhandschuhe Nitril Purple	KIMBERLY-CLARK GmbH (Koblenz)
Einmal-Injektionskanüle 0,9x40/0,4x20 mm	Braun (Melsungen)
Einmalküvette, UV-transparent (12,2x12.5x45 mm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Elektroporationsküvetten	BIO-RAD (München)
Entsorgungsbehälter Sekuroka®	Roth (Karlsruhe)
Erlenmeyerkolben (500, 1000, 2000 mL, Glas)	Kimble Chase Life Science (Meiningen)
Glasflasche (100, 250, 500, 1000, 2000 mL)	SCHOTT (Mainz)
Glasperlen (1,7-2,1 mm)	Roth (Karlsruhe)
Indikatortape Comply Steam	3M (St. Paul, USA)
Leukosilk® Rollenpflaster	BSN medical GmbH (Hamburg)
Linsenreinigungstücher „dusper“	Nikon (Ozu, Japan)
lumox® multiwell 96 Zellkulturplatte, schwarz	Sarstedt (Nümbrecht)
Messbecher (5000 mL Kunststoff)	VITLAB GmbH (Grossostheim)
Messzylinder (250, 2000 mL, Glas)	KAVALIERRGLASS (Sázava, Tschechien)
Nitrocellulosemembran Odyssey®	LI-COR (Bad Homburg)
Objektträger	Engelbrecht (Edermünde)
Parafilm Bemis	neoLab Migge GmbH (Heidelberg)
Pasteurpipetten, Glas	Thermo Scientific (Schwerte)
PCR-8er-Kette 0,2mL	Sarstedt (Nümbrecht)
Petrischale 60x15 mm mit Nocken	Sarstedt (Nümbrecht)
Petrischale 35x10 mm mit Nocken	Sarstedt (Nümbrecht)

Petrischale 92x16 mm mit Nocken	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipette PIPETMAN (P2, P20, P200, P1000)	Gilson (Middleton, USA)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettierwanne für Mehrkanalpipetten	Eppendorf (Hamburg)
Präzisionswischtücher (11x21 cm)	KIMBERLY-CLARK GmbH (Koblenz)
SafeSeal Reagiergefäß (1,5mL & 2.0mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Schraubröhre, 15mL, Spitzboden, Polypropylen	Sarstedt (Nümbrecht)
Schraubröhre, 15mL, Spitzboden, Polystyrol	Sarstedt (Nümbrecht)
Schraubröhre, 50mL, Spitzboden, Polystyrol	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipette (10mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipetten wattiert (5mL, 10mL, 25mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Spritze (5 mL, 20 mL)	Braun (Melsungen)
Sterilfilter Filtropur 0,2 µM	Sarstedt (Nümbrecht)
Sterilfilter Stericup® Quick Release Filter 0,22 µM	Merck (Darmstadt)
TC-Platte 12-Well, transparent, Flachboden	Sarstedt (Nümbrecht)
TC-Platte 24-Well, transparent, Flachboden	Sarstedt (Nümbrecht)
TC-Platte 6-Well, transparent, Flachboden	Sarstedt (Nümbrecht)
TC-Platte 96-Well, transparent, Flachboden	Sarstedt (Nümbrecht)
Transferpipette 3,5mL	Sarstedt (Nümbrecht)
Tuchrolle Incidin Premium Wipes	Ecolab GmbH (Monheim am Rhein)
Vernichtungsbeutel 200x300mm	neoLab Migge GmbH (Heidelberg)
Whatman Chromatographie Papier	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Zellkulturflasche T25/T75	Sarstedt (Nümbrecht)

2.1.16 Software & Online-Hilfsprogramme

Software	Hersteller / URL
Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems
Axio Vision 40 V 4.7.0.0	ZEISS
BD FACSDiva	BD Biosciences
BLAST	https://www.uniprot.org/blast/
EMBOSS Needle Sequence Alignment	https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/
EnVision Manager	Perkin Elmer

Expasy ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/
Expasy Translate	https://web.expasy.org/translate/
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc.
Image Lab™ 5.2	BIO-RAD
Image Studio V5.2	LI-COR
Leica Application Suite X	Leica
Microsoft Office 2016	Microsoft
NanoDrop 2000/2000c 1.5	Thermo Fisher Scientific Inc.
NovoExpress 1.2.5	ACEA Biosciences Inc.
PRALINE Multiple Sequence Alignment	http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/
Snap Gene Viewer	GSL Biotech LLC
WinPREP®	Perkin Elmer
ZEN 2 (blue edition)	ZEISS

2.1.17 Datenbanken

Datenbank	URL
PlasmoDB (Aurrecoechea et al., 2008)	https://plasmodb.org/plasmo/
UniProt (The UniProt Consortium, 2019)	https://www.uniprot.org/

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Sterilisation von Lösungen und Materialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lösungen und Materialien wurden zur Sterilisation bei 121 °C sowie 1,5 bar Dampfdruck autoklaviert. Hitzelabile Flüssigkeiten wurden bei einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert.

2.2.1.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

(Inoue et al., 1990)

E. coli Bakterien können zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA sowie zur Expression rekombinanter Proteine dienen. Um eine Transformation der Bakterien mit Plasmid-DNA zu ermöglichen, wurden zunächst chemisch kompetente *E. coli* Bakterien hergestellt. Hierfür wurden 10 mL LB Medium (+ 50 µg/mL Ampicillin) mit einem *E. coli* XL 10 Gold Glycerol Stabilat inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Zudem wurde 1 L SOB Medium mit 5 mL einer 2M MgCl₂ Lösung vermischt. Anschließend wurden 200 mL SOB Medium mit 5 mL der über Nacht Kultur inokuliert. Als Backup wurden zusätzlich 200 mL SOB Medium mit 1 mL der über Nacht Kultur inokuliert. Beide Ansätze wurde bei 18 °C unter Schütteln bei 160 rpm inkubiert bis eine optische Dichte von OD₆₀₀ = 0,45-0,6 erreicht war. Nach Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurde die Bakterienkultur bei 3000 xg und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20 mL eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 16 mL eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert. Zudem wurde der Ansatz mit 1,2 mL DMSO vermischt, wobei das DMSO langsam bei stetigem Durchmischen der Suspension zugegeben wurde. Letztlich wurden die kompetenten Bakterien in 100 µL Aliquots auf Eis in vorgekühlte 1,5 mL Reaktionsgefäße transferiert und die Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.1.3 Kultivierung von *E. coli*

(Sambrook et al., 1989)

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten. Kompetente Bakterien wurden nach Transformation mit Plasmid-DNA in LB-Flüssigmedium überführt oder mithilfe von Gaspellets auf eine LB-Agarplatte ausplattiert, wodurch einzelne Bakterienkolonien erhalten werden können. Die Kultivierung in Flüssigmedium erfolgte bei 37°C unter Schütteln. LB-Agarplatten wurden bei 37°C im Brutschrank gelagert. Erfolgreich

transformierte Bakterien wurden mithilfe von Antibiotika-Resistenzgenen selektiert, welche auf der Plasmid-DNA codiert sind. Das Antibiotikum Ampicillin wurde hierfür in einer Endkonzentration von 100 µg/mL dem LB-Flüssigmedium bzw. dem LB-Agar zugegeben. Der *E. coli* Expressionsstamm BL21 (DE3)-RIL enthält zudem ein weiteres Plasmid, welches zur Codon-Optimierung dient und seltene tRNAs codiert. Zur Selektion dieses weiteren Plasmids wurde der Kultur das Antibiotikum Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 25 µg/mL zugegeben.

2.2.1.4 Herstellung und Auftauen von *E. coli* Cryostabilaten

Zur Herstellung von *E. coli* Cryostabilaten wurden 500 µL einer Bakterien-Flüssigkultur mit 500 µL einer 50%igen Glycerol-Lösung vermischt und anschließend bei -80°C gelagert. Zur erneuten Kultivierung kann ein Teil dieses Stabilats wieder in Kultur genommen werden. Hierfür wurde LB-Flüssigmedium mit ca. 5 µL des Stabilats inokuliert und unter Standardbedingungen kultiviert (2.2.1.3).

2.2.1.5 Hitzeschocktransformation kompetenter *E. coli*

(Dower et al., 1988; Taketo 1989)

Plasmid-DNA wurde mittels Hitzeschocktransformation in kompetente *E. coli* eingebracht. Hierfür wurden 100 µL kompetenter *E. coli* Bakterien zunächst für 10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50-100 ng der entsprechenden Plasmid-DNA zugegeben und der Ansatz für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschock durch Inkubation für 45 sec bei 42°C. Nach dem Hitzeschock wurde der Ansatz für 2 min auf Eis inkubiert, 1mL LB-Flüssigmedium ohne Antibiotikum zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterienzellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 6000 xg für 2 min sedimentiert und das Zellpellet in 200 µL des Überstandes resuspendiert. Die transformierten Bakterien wurden mithilfe von Glasperlen auf LB_{Amp}-Agarplatten ausplattiert oder zur Inokulierung von LB_{Amp}-Flüssigmedium verwendet. Die weitere Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen (2.2.1.3).

2.2.1.6 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3)-RIL verwendet. Dieser verfügt über ein zusätzliches Plasmid, welche Gene seltener tRNAs enthält und zur Codon-Optimierung dient. Das entsprechende Plasmid kann über ein Chloramphenicol-Resistenzgen selektiert werden. Die Bakterien wurden mit einem entsprechenden Plasmid zur Expression des gewünschten Proteins transformiert (2.2.1.5) und auf LB-Agarplatten ausplattiert. Anschließend wurde eine Einzelkolonie in 100 mL LB_{Amp}/Chloramp-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Am

darauffolgenden Tag wurde die über Nacht Kultur 1:50 in 2,5 Litern LB_{Amp}/Chloramp⁻ Flüssigmedium verdünnt und unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bis eine optische Dichte von OD₆₀₀ = 0,5-0,6 erreicht war. Anschließend wurde die Expression rekombinanter Proteine durch Zugabe von 2mM IPTG induziert. Zudem wurden zum Zeitpunkt der Induktion erneut 100 µg/mL Ampicillin zugegeben. Die Kultur wurde für weitere 5 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur durch Zentrifugation bei 6000 xg und 4 °C für 15 min sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Isolation und Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte anschließend mittels Affinitätschromatographie (2.2.3.1).

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

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

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) werden spezifische DNA-Abschnitte exponentiell vervielfältigt. Die DNA-amplifizierende Polymerase benötigt hierfür ein Oligonukleotid (Primer), welches an die DNA-Matrize (Template) hybridisiert und ein freies 3'OH-Ende als Startpunkt für die DNA-Synthese zur Verfügung stellt. Entsprechende Primer können so gewählt werden, dass sie einen gewünschten DNA-Abschnitt flankieren, wodurch die Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Sequenz ermöglicht wird. Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde eine hitzestabile Phusion High Fidelity DNA Polymerase verwendet. Diese weist eine Korrekturleseaktivität auf, wodurch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Mutationen während der DNA-Amplifikation verringert werden kann. Generell lässt sich die Polymerase-Kettenreaktion in drei Phasen unterteilen. Im ersten Schritt (Denaturierung) wird die doppelsträngige DNA-Matrize durch hohe Temperaturen in die jeweiligen Einzelstränge aufgetrennt. Beim anschließenden Annealing hybridisieren die Primer an die komplementären Bereiche der DNA-Matrize. Bei der folgenden Elongationsphase wird die DNA schließlich durch die Polymerase ausgehend von den Primern verdoppelt. Diese drei Reaktionsschritte werden 30-35x wiederholt, wobei es bei jedem Zyklus zu einer weiteren Verdopplung des Ausgangsmaterials und somit zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA kommt.

Folgender Reaktionsansatz wurde für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet:

Phusion Polymerase Puffer (5x)	10 µL
dNTPs (2 mM)	5 µL
Primer fwd (10 µM)	1 µL
Primer rev (10 µM)	1 µL
Phusion DNA-Polymerase	0,2 µL
DNA Template	10-50 ng
mit H ₂ O	Ad 50 µL

Anschließend wurde der Reaktionsansatz durchmischt und folgendes PCR-Programm verwendet:

Initiale Denaturierung	94°C	2 min	
Denaturierung	94°C	20 sec	} 35x
Annealing	42°C	45 sec	
Elongation	62,5°C	3 min	
Finale Elongation	72°C	2 min	
Reaktionsende	4°C	∞	

Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.2.4) analysiert und aufgereinigt (2.2.2.7).

2.2.2.2 Mutagenese mittels Overlap-Extension PCR

(Higuchi et al., 1988; Ho et al., 1989; Senanayake & Brian, 1995)

Mithilfe der Overlap-Extension-PCR (OE-PCR) können gezielt Mutationen in DNA-Fragmente eingebracht werden. Das Einfügen der gewünschten Mutation sowie die Amplifikation der Zielsequenz erfolgen in mehreren Schritten, wofür vier spezifische Primer benötigt werden. Zwei dieser Primer sind zueinander komplementär, enthalten jeweils die einzufügende Mutation und binden am zu mutierenden Bereich innerhalb der Zielsequenz. Die zwei weiteren Primer flankieren das gesamte DNA-Fragment.

Im ersten Schritt werden zwei Fragmente des Zielgens amplifiziert. Fragment A wird mithilfe des innenliegenden rev-Primer sowie dem flankierenden 5'Primer amplifiziert. Fragment B wird entsprechend mithilfe des innenliegenden fwd-Primers sowie dem flankierenden 3'Primer generiert. Da die innen liegenden Primer komplementär zueinander sind, weisen auch die entstehenden Fragmente A und B zueinander komplementäre Bereiche auf, in dem sich nun die gewünschte Mutation befindet.

Im zweiten Schritt werden die Fragmente A und B mittels PCR zu einem Fragment verbunden. Hierfür wurden beide Fragmente aufgereinigt (2.2.2.7) und in equimolarer Menge in einer weiteren PCR-Reaktion eingesetzt. Aufgrund der zueinander komplementären Bereiche können die beiden Fragmente sich selbst als Primer dienen und somit in 5 PCR-Zyklen zu einem Fragment verbunden werden.

Letztlich wurde das gesamte Fragment durch Zugabe der beiden flankierenden Primer in großer Menge amplifiziert. Das Endprodukt wurde erneut aufgereinigt und zur Klonierung verwendet. Reaktionsansätze für die genannten PCR-Reaktionen sowie verwendete PCR-Programme können Punkt 2.2.2.1 entnommen werden.

2.2.3.3 Integrations- und Exzisions-PCR

Die erfolgreiche Modifikation von Zielgenen im Parasitengenom wurde mittels PCR untersucht. Eine Integration von DNA-Sequenzen oder das Ausschneiden von Genbereichen aus dem plasmodialen Genom konnten mithilfe von spezifischen Primern nachgewiesen werden. Als Template wurde genomische DNA der zu untersuchenden Zelllinie analysiert. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

Firepol Puffer (10x)	1 μ L
dNTPs (2 mM)	1 μ L
Primer fwd (10 μ M)	0,4 μ L
Primer rev (10 μ M)	0,4 μ L
MgCl ₂	1 μ L
Template	10 ng gDNA
Firepol DNA Polymerase (2U/ μ L)	0,1 μ L
H ₂ O	ad 10 μ L

Anschließend wurde folgendes PCR Programm verwendet:

Initiale Denaturierung	95°C	3 min	} 30x
Denaturierung	95°C	35 sec	
Annealing	42°C	40 sec	
Elongation	62°C	1 min/kb	
Finale Elongation	64°C	3 min	
Reaktionsende	4°C	∞	

PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.2.4) analysiert.

2.2.2.4 Agarosegelelektrophorese

(Garoff & Ansorge, 1981)

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente in einem Agarosegel durch Anlegen einer elektrischen Spannung abhängig von der Fragmentgröße aufgetrennt. Durch das negativ geladene Phosphatrückgrat bewegen sich DNA-Fragmente im elektrischen Feld in Richtung des Pluspols. Hierbei migrieren gleich große Fragmente gleich schnell und kleinere Fragmente schneller als größere, wodurch es zur Auftrennung der DNA in ein spezifisches Bandenmuster kommt. Hierfür wurden zunächst 1% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer in der Microwelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurden vier Tropfen Ethidiumbromidlösung zugegeben und die Lösung auf einen Gelschlitten gegossen. Zur Taschenbildung wurde ein entsprechender Kunststoffkamm eingesteckt und das Gel zur Aushärtung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Aushärtung der Gels wurde dieses mit Schlitten in einer entsprechenden Elektrophoresekammer platziert, der Kamm entfernt und die Kammer mit 1x TAE-Puffer befüllt. Zu analysierende DNA-Proben wurden mit Loading Dye

versetzt und in die Taschen pipettiert. Zum Größenvergleich wurde ein DNA-Größenstandard (GeneRuler 1kb) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte anschließend bei 120V für 30min. Zur Analyse größerer DNA-Fragmente kann die Laufzeit entsprechend verlängert werden. Durch das im Gel enthaltene Ethidiumbromid konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente anschließend mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden, da Ethidiumbromid durch Interkalation in die DNA Doppelhelix eine Veränderung des Emissionsspektrums bewirkt. Visualisierung der Banden sowie Fotografieren des Gels erfolgten in einem UV-Transilluminator (GelDoc, BIO-RAD).

2.2.2.5 Restriktionsverdau

(Summers et al., 1975)

Beim Restriktionsverdau wird Doppelstränge-DNA an einer spezifischen Erkennungssequenz von einer Restriktionsendonukleasen geschnitten. Hierbei entstehen an den Enden des DNA Fragments kohäsive Überhänge. Werden Plasmid-DNA und ein einzufügendes Insert an den gleichen Erkennungssequenzen restringiert, kann das Insert anschließend über die komplementären kohäsiven Überhänge gezielt über Ligation (2.2.2.8) in das Plasmid eingefügt werden.

Für den Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

	PCR-Produkt Verdau	Plasmid-Verdau
Cut Smart Puffer	5 µL	1 µL
PCR-Produkt bzw. Plasmid	44 µL	1 µg
Enzym 1	0,5 µL	0,2 µL
Enzym 2	0,5 µL	0,2 µL
H ₂ O	-	ad 10 µL

Der Verdau erfolgte anschließend für 1-2h bei 37°C. Die restringierte DNA wurde anschließend für die weitere Verwendung aufgereinigt (2.2.2.7).

2.2.2.6 Dephosphorylierung restringierter Plasmid-DNA

Um eine Religation restringierter Plasmid-DNA ohne Insert zu verhindern wurden die 5'Enden von restringierten Vektoren mithilfe von Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIP) dephosphoryliert.

Hierfür wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

restringierte Plasmid-DNA	500 ng
Cut Smart Puffer (10x)	2 µL
CIP	1 U
H ₂ O	ad 20 µL

Die Dephosphorylierung erfolgte anschließend für 1h bei 37°C. Die Plasmid-DNA wurde anschließend aufgereinigt (2.2.2.7).

2.2.2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA

Nach der PCR bzw. dem Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Plasmid-DNA wurden diese mithilfe eines kommerziellen Kits (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel) aufgereinigt. Zur Aufreinigung von DNA aus dem Agarosegel wurde diese unter UV-Licht sichtbar gemacht und die gewünschten Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte anschließend nach Herstellerprotokoll. PCR-Produkte wurden für einen anschließenden Restriktionsverdau (2.2.2.5) in 44 µL H₂O eluiert. DNA aus Restriktionsverdauen wurde nach Aufreinigung aus dem Agarosegel in 30 µL H₂O eluiert. Die aufgereinigte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.8 Ligation von PCR-Produkt und Vektor

Mithilfe der Ligation wurden DNA-Fragmente gezielt in einen gewünschten DNA-Vektor eingefügt. Über die kohäsiven Enden, die beim Restriktionsverdau von Plasmid und Insert entstanden sind, können Insert und Vektor aneinander hybridisieren. Anschließend findet eine Verknüpfung der freien Enden von Plasmid und Insert durch eine T4 DNA-Ligase statt, indem diese die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem freien 5'-Phosphat und der 3'-Hydroxylgruppe vermittelt.

Für die Ligation wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

T4 DNA Ligase Puffer (10x)	2 µL
restringierter Vektor	50 ng
restringiertes Insert	37,5 ng
H ₂ O	ad 20 µL

Der Reaktionsansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Nach der Inaktivierung wurde der Ansatz für 1 min auf Eis gekühlt. Zur Transformation von *E. coli* wurden 10 µL der Ligation verwendet. Alternativ kann der Ansatz bis zur Transformation bei -20°C gelagert werden.

2.2.2.9 Ligationsunabhängige Klonierung

(Berrow et al., 2007)

Bei der ligationsunabhängigen Klonierung kann eine spezifische DNA-Sequenz mittels komplementärer 5'-Überhänge in einen pOPIN-Vektor inseriert werden. Hierfür wurde der Vektor zunächst mit den Restriktionsenzymen KpnI und HindIII linearisiert (2.2.2.5) und anschließend dephosphoryliert (2.2.2.6). Das in den Vektor einzufügende Insert wurde mittels PCR generiert. Hierbei wurde das Insert mithilfe entsprechender Primer mit zum Vektor komplementären Überhängen versehen. Das PCR-Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und aus dem Agarosegel aufgereinigt (2.2.2.7). Anschließend erfolgte die Klonierung gemäß den Herstellerangaben in folgendem Reaktionsansatz:

Insert	10-200 ng
linearisierter Vektor	50-200 ng
H ₂ O	ad 10 µL

Das lyophilisierte InFusion EcoDry Pellet wurde im Reaktionsansatz gelöst und die Reaktion 15 min bei 37°C sowie anschließend 15 min bei 50°C inkubiert. Während der Inkubation generiert eine im Reaktionsansatz enthaltene Exonuklease zum Insert komplementäre Überhänge an den Enden des linearisierten Vektors, sodass Vektor und Insert aneinander hybridisieren können. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 5 min auf Eis gekühlt und konnte letztlich zur Transformation kompetenter *E. coli* verwendet werden.

2.2.2.10 Kolonie Screen PCR

Nach der Transformation kompetenter *E. coli* mit Plasmid-DNA wurden Bakterienkolonien mittels PCR auf das Vorhandensein des entsprechenden Plasmids untersucht. Hierfür wurde eine Bakterienkolonie als Template im PCR-Reaktionsansatz resuspendiert und das nachzuweisende Insert mithilfe von spezifischen Primern amplifiziert. Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Firepol Puffer (10x)	1 µL
dNTPs (2 mM)	1 µL
Primer fwd (10 µM)	0,4 µL
Primer rev (10 µM)	0,4 µL
MgCl ₂	1 µL
Template	Bakterienkolonie
Firepol DNA Polymerase (2U/µL)	0,1 µL
H ₂ O	ad 10 µL

Anschließend wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Initiale Denaturierung	95°C	3 min	} 30x
Denaturierung	95°C	35 sec	
Annealing	42°C	40 sec	
Elongation	62°C	1 min/kb	
Finale Elongation	64°C	3 min	
Reaktionsende	4°C	∞	

PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.2.4) analysiert.

2.2.2.11 Plasmidisolierung aus *E. coli*-Kulturen

Minipräparation mittels NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel). Hierfür wurden zunächst 2 mL einer *E. coli* Übernachtskultur durch Zentrifugation bei 6000 xg für 2 min geerntet und der Überstand verworfen. Die Plasmidisolierung erfolgte anschließend nach Herstellerprotokoll. Die DNA wurde in 30 µL H₂O eluiert.

Midipräparation mittels Plasmid Midi Kit (QIAGEN®). Hierfür wurden zunächst 200 mL einer *E. coli* Übernachtskultur durch Zentrifugation bei 3200 xg und 4°C für 15 min geerntet und der Überstand verworfen. Die Plasmidisolierung erfolgte anschließend nach Herstellerprotokoll. Die DNA wurde in 200 µL TE eluiert.

Midipräparation mittels PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega). Hierfür wurden zunächst 100 mL einer *E. coli* Übernachtskultur durch Zentrifugation bei 3200 xg und 4°C für 15 min geerntet und der Überstand verworfen. Die Plasmidisolierung erfolgte anschließend nach Herstellerprotokoll. Die DNA wurde in 1 mL H₂O eluiert.

Die Konzentration der aufgereinigten Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt (2.2.2.13) und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA

DNA-Sequenzierungen erfolgten bei der Firma SeqLab in Göttingen. Zur Sequenzierung wurde folgender Reaktionsansatz eingeschickt:

Plasmid DNA	480-1200 ng
Primer (10µM)	3 µL
H ₂ O	ad 15 µL

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden am folgenden Werktag auf der Internetseite der Firma SeqLab zum Download zur Verfügung gestellt.

2.2.2.13 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA & Proteinen

Die Konzentration von Nukleinsäuren und Proteinen wurde photometrisch mit einem Nano Drop 2000c Spectrometer (ThermoScientific, Schwerte) ermittelt. Nukleinsäuren weisen aufgrund der enthaltenen Basen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm auf. Bei Proteinen hingegen ist die Absorption bedingt durch enthaltene aromatische Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm maximal. Folglich kann das Spectrometer anhand der gemessenen Absorption die Nukleinsäure- bzw. Proteinkonzentration berechnen. Hierbei entspricht ein Wert von $A_{260}=1$ einer dsDNA-Konzentration von ca. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Eine Absorption von $A_{280}=1,4$ entspricht einer Proteinkonzentration von ca. 1 mg/mL . Zusätzlich kann der Quotient A_{260}/A_{280} berechnet werden, um auf die Reinheit einer Nukleinsäureprobe zu schließen. Liegt der Wert A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2,0 kann von einer sehr reinen Probe ausgegangen werden. Darunter liegende Werte lassen auf Verunreinigungen schließen.

Zur Messung der Nukleinsäure- bzw. Proteinkonzentration wurden 1 μL verwendet. Zuvor wurde mit dem verwendeten Puffer ein Nullwert gesetzt.

2.2.2.14 DNA-Fällung mit Natriumacetat

Zur Fällung von DNA wurde die gewünschte DNA-Menge mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat sowie dem dreifachen Volumen 100% Ethanol versetzt und durchmischt. Beim Durchmischen der Probe wird die gefällte DNA als weißer Niederschlag in der Probe sichtbar. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 20.000 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 1 mL 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet unter einer Sterilwerkbank luftgetrocknet und anschließend in einem gewünschten Volumen sterilem TE-Puffer gelöst. Die DNA wurde anschließend zur Transfektion von *P. falciparum* (2.2.4.8) verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.15 Isolation genomischer DNA aus *Plasmodium falciparum*

Zur Isolation von genomischer DNA aus *Plasmodium falciparum* wurden 5 mL einer Parasitenkultur (mind. 5% Parasitämie) durch Zentrifugation bei 800 xg für 3 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zur Isolation der genomischen DNA mithilfe eines kommerziellen Kits (2.1.12) verwendet. Die Isolation erfolgte gemäß des Herstellerprotokolls. Die DNA wurde in 50 μL H_2O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.16 RNA-Isolierung aus *Plasmodium falciparum*

Zur Isolierung von RNA aus *Plasmodium falciparum* wurden 10 mL resuspendierte Parasitenkultur (5% Parasitämie) durch Zentrifugation bei 800 xg für 5 min in einem RNase-freien Reaktionsgefäß sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet unter

einem Abzug im 20-fachen Volumen TRIzol durch kräftiges Schütteln resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Falls die RNA-Isolierung zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen soll, kann dieser Ansatz bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden. Zur RNA-Isolierung wurde der Ansatz anschließend in 1 mL Aliquots auf RNase-freie Reaktionsgefäße verteilt, pro 1 mL-Aliquot 200 µL kaltes Chloroform zugegeben und die RNA durch kräftiges Schütteln für 15 sec extrahiert. Der Ansatz wurde 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 30 min bei 20.000 xg und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der wässrige Überstand (ca. 400-500 µL pro Aliquot) abgenommen und in ein weiteres RNase-freies Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Hierbei wurde sämtliche Überstände der einzelnen Aliquots vereint. Beim Abnehmen der Überstände ist darauf zu achten, dass die Interphase, welche DNA-Fragmente enthält, großzügig vermieden wird. Anschließend wurde ein äquivalentes Volumen 70% Ethanol zugegeben und der Ansatz durchmischt. Die RNA-Aufreinigung erfolgte anschließend mithilfe eines RNeasy Mini Kits (2.2.11). Die RNA wurde zweimal mit 25 µL RNase-freiem Wasser eluiert.

2.2.2.17 Reverse Transkription

Mithilfe der reversen Transkription wurde aus RNA die entsprechende komplementäre cDNA (*complementary DNA*) synthetisiert. Als Startpunkt für die cDNA-Synthese dienten Random Primer (bestehend aus sechs zufälligen Nukleotiden). Für das Primer-Annealing wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

RNA	1 µg
Random Primer (3µg/µL)	1 µL
dNTPS (10mM)	1 µL
H ₂ O	ad 13 µL

Der Ansatz wurde 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend für 1 min aus Eis gekühlt. Für die cDNA-Synthese wurde anschließend folgender Reaktionsansatz verwendet:

Reaktionsansatz Primer Annealing (s.o.)	13 µL
DTT (0,1M)	1 µL
Superscript III Reverse Transkriptase	1 µL
RNase OUT	1 µL

Anschließend wurde folgendes Programm für die cDNA-Synthese verwendet:

25°C	5 min
50°C	60 min
70°C	15 min

Die cDNA konnte anschließend als Template für eine quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) genutzt werden (2.2.2.18) und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.18 Quantitative *Real Time* PCR (qRT-PCR)

Expressionslevel plasmodialer Gene wurden mittels quantitativer *Real Time* PCR in einem LightCycler 480 (Roche) und der zugehörigen Software untersucht. Hierfür wurde zunächst RNA aus der zu untersuchenden Parasitenkultur isoliert (2.2.2.16). Mittels reverser Transkription wurde anschließend entsprechende cDNA synthetisiert und als Template in folgendem Reaktionsansatz verwendet:

QuantiTect SYBR Green PCR Reagent	5 µL
Primer fwd	0,3 µM
Primer rev	0,3 µM
Template	50 ng cDNA
H ₂ O	ad 10 µL

Anschließend wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Initiale Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	95°C	15 sec	} 40x
Annealing	50-60°C	30 sec	
Elongation	60°C	1 min	

Während der PCR-Reaktion wird eine Sequenz des zu untersuchenden Gens mithilfe der spezifischen Primer amplifiziert. Die Menge der vorhandenen doppelsträngigen Amplifikate kann in jedem Zyklus mithilfe des im Reaktionsansatz enthaltenen SYBR Greens analysiert werden. Mithilfe des SYBR Green-Signals kann der Ct-Wert (*Cycle Threshold*) ermittelt werden, welcher den PCR-Zyklus beschreibt, bei dem es erstmals zu einem signifikanten Anstieg dieses Signals kommt. Je mehr Transkripte des zu untersuchenden Gens in Form von cDNA in der Probe als Template vorlagen, desto früher wird dieser Schwellenwert erreicht. Folglich kann der Ct-Wert genutzt werden, um Expressionslevel von Genen zu untersuchen und zu vergleichen.

Hierfür wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001) verwendet. Zur Normalisierung kann zunächst die Differenz zwischen den Ct-Werten des Zielgens und einem Referenzgen gebildet werden (ΔCt -Wert). Um die Genexpression zweier Gruppen zu Vergleichen (z.B. Zelllinie A vs. Zelllinie B) kann nun die Differenz der ΔCt -Werte der beiden Gruppen berechnet werden ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert). Wird dieser Wert in die Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt, ergibt sich daraus die n-fache Expression (*fold change*) von z.B. Zelllinie A zu Zelllinie B.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Affinitätschromatographie mit Glutathion Sepharose

(Smith & Johnson, 1988)

Nach der Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* (2.2.1.6) wurden diese mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Hierfür wurden zunächst 2,5 Liter einer entsprechenden *E. coli* BL21 Kultur durch Zentrifugation bei 6.000 xg und 4°C für 30 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 mL Protein-Lysepuffer resuspendiert. Der Suspension wurden 20 µg/mL Lysozym zugegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis fünfmal für 30 sec sonifiziert (50% Duty Cycle, Output Control 3). Der Lösung wurden Triton-X-100 und NLS zugegeben (je 1% Endkonzentration) und der Ansatz 30 min bei 4°C unter Invertieren inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für 30 min bei 4°C und 30.000 xg zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurden 200 µL aufgeschwemmte Glutathion-Sepharose-Beads dreimal mit 1 mL Protein-Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurden die Beads im Überstand des zentrifugierten Lysats resuspendiert und 2 h oder über Nacht rollend bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Beads durch Zentrifugation bei 500 xg und 4°C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet fünfmal bei 4°C für 30 min mit 10 mL vorgekühltem Protein-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Beads in 1 mL 3C-Protease Puffer überführt und das rekombinante Protein durch Abspaltung des Affinitäts-Tags von den Beads (2.2.3.2) eluiert.

2.2.3.2 Verdau von GST-Fusionsproteinen mit 3C-Protease

Mithilfe der 3C-Protease des Humanen Rhinovirus (HRV-3C) wurden Affinitäts-Tags von rekombinant exprimierten Proteinen abgespalten. Die pOPIN-Expressionsvektoren, die in der vorliegenden Arbeit zur Expression von rekombinanten Proteinen genutzt wurden, enthalten eine Erkennungssequenz für die 3C-Protease, sodass Affinitäts-Tags durch einen 3C-Verdau entfernt werden konnten. Hierfür wurden Proteineluate zunächst im 1000-fachen Volumen 3C-Protease-Puffer dialysiert. Anschließend wurde 1 U 3C Protease mit je 100 µg rekombinantes Protein vermischt und der Verdau für 12 h bei 4°C inkubiert. Nach dem Verdau wurde der abgespaltenen GST-Tag sowie die 3C-Protease, die selbst als GST-Fusionsprotein vorlag, durch Zugabe von Glutathion-Sepharose Beads aus der Probe entfernt.

2.2.3.3 Dialyse

Um Chemikalien wie z.B. Glutathion aus Proteineluaten zu entfernen, wurden diese dialysiert. Hierfür wurde ein Dialyseschlauch mit einer Porengröße von 10 kDa zunächst für 1 h in Wasser inkubiert. Anschließend wurde der Dialyseschlauch an einer Seite mit einer Kunststoffklammer verschlossen, die Proteinprobe eingefüllt und schließlich am anderen Ende mit einer weiteren Kunststoffklammer verschlossen. Der Dialyseschlauch mit der enthaltenen

Proteinprobe wurde über Nacht im 1000-fachen Volumen des gewünschten Puffers bei 4°C unter Rühren inkubiert. Hierbei diffundieren unerwünschte Chemikalien gemäß des Konzentrationsgradienten durch die Poren des Schlauches in den umgebenden Puffer und können somit aus der Proteinprobe entfernt werden.

2.2.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Laemmli (1970)

Mithilfe der denaturierenden SDS-PAGE nach Laemmli (1970) wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierfür wurden SDS-PAGE- und Gelkammern der Firma BIO-RAD (München) mit entsprechendem Zubehör verwendet.

Zunächst wurde ein Trenngel (12%) wie folgt angesetzt:

Trenngelpuffer	1,5 mL
40% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	2,0 mL
TEMED	5 µL
SDS (10%)	60 µL
APS (10%)	25 µL
H ₂ O	2,5 mL

Der Ansatz wurde in die Gelkammer eingefüllt und mit 1 mL Isopropanol überschichtet, wodurch eine gerade Lauffront entsteht. Der Ansatz wurde zum Aushärten 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde das Sammelgel (4%) wie folgt angesetzt:

Sammelgelpuffer	1,0 mL
40% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	500 µL
TEMED	5 µL
SDS (10%)	40 µL
APS (10%)	20 µL
H ₂ O	2,8 mL

Das Isopropanol wurde aus der Gelkammer entfernt und das noch flüssige Sammelgel drüber geschichtet. Zu Taschenbildung wurde ein Kunststoffkamm eingesteckt und der Ansatz zum Aushärten für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Vor Beladen des Gels wurden die aufzutrennenden Proteinproben im Verhältnis 1:5 mit 5x SDS-Ladepuffer vermischt und für 5 min bei 95°C inkubiert, wobei es zu Denaturierung der Proteinstruktur kommt. Das im Puffer enthaltene DTT bewirkt zudem eine Reduktion von Disulfidbrücken, wodurch ebenfalls eine Denaturierung der Proteinstruktur bewirkt wird. Zusätzlich lagert sich das im Puffer enthaltene SDS über hydrophobe Wechselwirkung an das

denaturierte Protein an, wodurch dieses durch die enthaltenen Phosphatgruppen mit negativen Ladungen versehen wird. Die Anlagerung von Negativladungen verhindert zudem eine Rückfaltung des denaturierten Proteins. Da somit alle Proteine in Form ihrer Primärstruktur vorliegen und proportional zur Größe des Moleküls mit negativen Ladungen versehen wurden, erfolgt die Auftrennung ausschließlich nach Molekulargewicht. Leere Taschen im Gel wurden mit einem vergleichbaren Volumen SDS-Ladepuffer befüllt. Zudem wurde ein Molekulargewichtsstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder oder Chameleon Duo Prestained Protein Ladder) aufgetragen, um das Molekulargewicht anhand der Laufweite analysieren zu können.

Die Auftrennung erfolgte anschließend bei 120 V für ca. 120 min, sodass die Lauffront das untere Ende der Gelkammer erreichte.

2.2.3.5 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue

(Weber & Osborn, 1969)

Proteine, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, konnten durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue im Gel visualisiert werden. Hierfür wurde das Trenngel nach der Elektrophorese in ca. 30 mL Coomassie Brilliant Blue Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt und so lange mit Coomassie Entfärbelösung gewaschen bis Proteinbanden im Gel sichtbar wurden.

2.2.3.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen im Westernblot

(Kyhse-Andersen, 1984)

Nach elektrophoretischer Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE konnten diese im Westernblot mithilfe spezifischer Antikörper detektiert werden. Hierfür wurden die Proteine zunächst mit dem Tankblotverfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Für den Proteintransfer wurden eine Westernblot-Transferkammer und entsprechendes Zubehör der Firma BIO-RAD (München) verwendet. Auf der Halterungskassette wurde zunächst ein mit Westernblot-Transferpuffer befeuchteter Kunststoffschwamm platziert. Anschließend wurden drei Lagen Whatman Chromatographiepapier darübergelegt. Auf dem Papier wurde die Nitrocellulosemembran platziert und anschließend das Trenngel der SDS-PAGE daraufgelegt. Hierbei ist darauf zu achten, dass sich zwischen Nitrocellulosemembran und Trenngel keine Luftblasen befinden. Zudem muss sich die Membran auf der Seite der Anode befinden, da die negativ geladenen Proteine im elektrischen zur Anode wandern und somit auf die Membran übertragen werden. Auf das Trenngel wurden drei weitere Lagen Whatman Chromatographiepapier sowie ein weiterer Kunststoffschwamm gelegt. Die Kassette wurde verschlossen, in die vorgesehene Halterung eingesteckt und in der Transferkammer platziert. Der Transfer erfolgte anschließend in Westernblot-Transferpuffer für 1 h bei 90 V und 4°C.

Nach dem Transfer wurden freie Bindestellen auf der Membran durch Inkubation mit 5% Milchpulver in PBS für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Tab.2.1) in 2,5% Milchpulver in PBS zugegeben. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht rollend bei 4°C. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 min mit PBS-T gewaschen und der sekundäre Antikörper in entsprechender Verdünnung in 2,5% Milch in PBS zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 h im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran erneut dreimal 5 min mit PBS-T gewaschen. Da es sich bei den Sekundärantikörpern um Fluoreszenz-markierte Antikörper handelt, konnte das Zielprotein anschließend mithilfe eines Odyssey® Fc Imaging Systems (LI-COR) detektiert werden.

2.2.3.7 Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA Analyse

(Smith et al., 1985)

Bei der BCA Analyse wird die Verbindung Bicinchoninsäure (BCA) in Anwesenheit zweiwertiger Kupferionen mit der zu untersuchenden Probe vermischt. In Abhängigkeit der Proteinmenge kommt es hierbei zu einer Reduktion der Kupferionen, welche anschließend einen Farbkomplex mit der BCA Substanz ausbilden. Die Farbreaktion kann anschließend zur Bestimmung der Proteinmenge photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm quantifiziert werden.

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde ein Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher) verwendet. Zunächst wurde gemäß des Herstellerprotokolls eine Standardverdünnungsreihe mit Albumin hergestellt. Zudem wurden Lösung A und Lösung B in einem Verhältnis von 50:1 vermischt, um die finale Reaktionslösung zu erhalten. Anschließend wurden 50 µL der zu untersuchenden Proteinprobe mit 1 mL der Reaktionslösung vermischt. Gleiches geschah mit jeder Verdünnung der Albumin-Standardreihe. Die Reaktionsansätze wurden durchmischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt, in eine UV-transparente Einmalküvette (Sarstedt) überführt und die Absorption bei 562 nm in einem DS-11+ Spectrophotometer (DeNovix) gemessen. Die Absorptionswerte der Albumin-Standardreihe wurde in Graphpad Prism geplottet und eine Eichgerade mittels linearer Regression erstellt. Anhand der Eichgerade konnte die Proteinkonzentration der zu untersuchenden Probe mithilfe der gemessenen Absorption interpoliert werden.

2.2.3.8 KinaseGlo Plus Assay

Zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Kinasen sowie dem Testen potentieller Kinase-Inhibitoren wurde ein kommerzieller Lumineszenz-basierter Kinase-Assay (KinaseGlo Plus, Promega) verwendet. Der KinaseGlo Plus Assay ermöglicht ein lineares Lumineszenz-

Signal bei ATP-Konzentrationen von bis zu 100 μM und verspricht eine hohe Signalstabilität. Zunächst wird mit der zu untersuchenden Kinase sowie einem entsprechenden Substrat in Anwesenheit von ATP die Kinasereaktion durchgeführt. Während der Substratphosphorylierung kommt es hierbei zu einem Verbrauch von ATP in Abhängigkeit von der Kinaseaktivität. Anschließend wird mithilfe einer im KinaseGlo Reagent enthaltenen Luciferase Lumineszenz generiert. Die Intensität des Lumineszenz-Signals ist hierbei Abhängig von der Menge des im Reaktionsansatz verbliebenen ATPs. Folglich spiegelt das Lumineszenz-Signal invers proportional die enzymatische Aktivität der Kinase wieder.

Zunächst wurden gemäß des Herstellerprotokolls die optimalen Reaktionsbedingungen für die Kinasereaktion ermittelt. Genauere Informationen zur Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen sowie Untersuchungen zur Linearität und Stabilität des Lumineszenz-Signals sind im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit dargestellt (3.1.3). Für die Kinasereaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

<i>rPfGSK3</i> bzw. <i>rHsGSK3</i>	20 ng
GS-1 Substrat	12 μM
ATP (Ultra Pure, Promega)	6 μM
ggf. zu testende Kinase-Inhibitoren	

in 1x Kinase-Reaktionspuffer (finales Reaktionsvolumen 5 μL).

Die Kinasereaktion erfolgte für 30 min bei 30°C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 5 μL KinaseGlo Reagent vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde in eine weiße 384-Well Platte (NUNC, ThermoFisher) transferiert und das Lumineszenz-Signal in einem EnVision Multilable Plate Reader (PerkinElmer, Integration Time 0,5sec/Well) gemessen.

Zur Untersuchung potentieller Kinase-Inhibitoren konnten diese direkt der Kinasereaktion beigelegt werden. Sämtliche Kinase-Inhibitoren lagen gelöst in DMSO vor. Durch entsprechende Vorverdünnungen der Inhibitoren in Kinase-Reaktionspuffer betrug die finale DMSO-Konzentration in der Kinasereaktion maximal 1%. Zur Ermittlung von IC_{50} -Werten wurden entsprechende Verdünnungsreihen der potentiellen Kinase-Inhibitoren im Kinase-Assay getestet. Als Negativkontrolle wurde 1% DMSO ohne Verbindung zugegeben.

Da das Lumineszenz-Signal invers proportional zur ATP Konzentration ist, wurde gleichzeitig eine Kontrollreaktion (Reaktion ohne Kinase) gemessen. Die Differenz zwischen Kinasereaktion und Kontrollreaktion entspricht der Kinase-Aktivität.

Zur Berechnung von IC_{50} -Werten wurden die erhaltenen Messwerte in Graphpad Prism geplottet, zur DMSO-Kontrolle normalisiert und IC_{50} -Werte mittels nonlinearer Regression anhand von Dose-Response-Kurven ermittelt.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Kultivierung von *Plasmodium falciparum*

(Trager & Jensen, 1976)

Blutstadien des *Plasmodium falciparum* Parasiten wurden in RPMI Komplettmedium mit 5% humanen Erythrozyten der Blutgruppe 0 Rh+ in Gegenwart von 5% CO₂, 1% O₂ und 94% N₂ bei 37°C kultiviert. Der intraerythrozytäre Entwicklungszyklus der asexuellen Stadien dauert ca. 48h, wobei es nach Vollendung des Zyklus zu einem Anstieg der Parasitämie um den Faktor 5 bis 8 kommt. Die Parasitämie von Parasitenkulturen wurde durch lichtmikroskopische Untersuchung (2.2.4.10) von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen (2.2.4.2) untersucht und die Kultur in der Regel alle 48h auf 1% Parasitämie verdünnt. Wurden für bestimmte Experimente höhere Parasitämien benötigt, wurde das Medium täglich gewechselt. Falls erforderlich wurde zudem der Hämatokrit dem Experiment entsprechend angepasst.

2.2.4.2 Giemsa-Färbung von Blutaussstrichen

(Giemsa, 1904)

Zur Analyse der Parasitämie von Parasitenkulturen wurde diese anhand von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen untersucht. Zur Herstellung eines Blutaussstrichs wurden ca. 0,5 µL sedimentierte Erythrozyten auf einen Objektträger pipettiert. Anschließend wurde ein zweiter Objektträger darüber geschoben um die Zellen auszustreichen. Der Ausstrich wurde luftgetrocknet und zur Fixierung ca. 10 sec in Methanol inkubiert. Der fixierte Ausstrich wurde anschließend mind. 5 min in 10% Giemsa-Färbelösung gefärbt. Nach der Färbung erscheinen die Parasiten im Lichtmikroskop blau bis violett.

2.2.4.3 Herstellung und Auftauen von *Plasmodium*-Cryostabilaten

(Lamborss & Vanderberg, 1979)

Zur Herstellung eines Cryostabilates wurden mindestens 5 mL einer resuspendierten Parasitenkultur (5% Hämatokrit) bei 800 xg für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Erythrozyten in 1 mL *Malaria Freezing Solution* (MFS) resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Cryogefäß überführt und bei -80°C oder in der Gasphase von Flüssigstickstoff gelagert. Die Kultur zur Herstellung des Stabilates sollte eine möglichst hohe Ringparasitämie aufweisen (>5%), da nur diese Stadien den Vorgang überleben.

Zum Auftauen von Cryostabilaten wurden diese für eine Minute bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Erythrozyten wurden anschließend durch Zentrifugation für 3 min bei 800 xg sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 mL *Malaria Thawing Solution* (MTS) resuspendiert. Die Zellen wurden durch einen weiteren Zentrifugationsschritt erneut

sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 mL RPMI Kompletmedium gewaschen. Anschließend wurden die Erythrozyten unter Standardbedingungen in Kultur genommen.

2.2.4.4 Isolation von Parasiten durch begrenzte Saponin-Lyse

(Umlas & Fallon, 1971)

Die hämolytischen Eigenschaften von Saponin erlauben eine spezifische Lyse der Erythrozyten während die Parasiten intakt bleiben, sodass diese aus der Kultur isoliert werden können. Zur Isolation von Parasiten wurde die Zellkultur zunächst durch Zentrifugation bei 800 xg für 5 min sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 0,03% Saponin in PBS resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Parasiten durch Zentrifugation bei 20.000 xg für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend mehrmals mit eiskaltem PBS gewaschen bis der Überstand farblos war. Der Überstand wurde verworfen und das Parasitenpellet bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.5 Isolation von *P. falciparum* Schizonten mit Percoll

(Pertoft et al., 1978; Rivadeneira et al., 1983)

Schizonten-Stadien können mittels Percoll aus einer Parasitenkultur isoliert werden. Hierfür wurden 4 mL 60% Percoll-Lösung in einem 15 mL Reaktionsgefäß vorgelegt und mit der resuspendierten Parasitenkultur überschichtet. Der Ansatz wurde anschließend für 5 min bei 800 xg zentrifugiert. Schizonten-Stadien sind nach der Zentrifugation als dunkel gefärbte Bande zwischen der Percoll-Lösung und dem darüber liegenden Medium zu erkennen. Uninfizierte Erythrozyten sowie mit anderen Stadien infizierte Zellen finden sich hingegen im Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Die Schizonten-Bande wurde abgenommen und mit 10 mL RPMI Kompletmedium gewaschen. Die Schizonten konnten anschließend zur Transfektion verwendet werden (2.2.4.8) oder unter Standardbedingungen wieder in Kultur genommen werden.

2.2.4.6 Synchronisation von *P. falciparum* Kulturen mit Sorbitol

(Lambross & Vanderberg, 1979)

Parasiten Kulturen können mittels Sorbitol-Lyse synchronisiert werden. Hierfür wird die Kultur durch Zentrifugation bei 800 xg für 5 min sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet im 5-fachen Volumen 5% D-Sorbitol resuspendiert. Die resuspendierte Kultur wird anschließend für 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Hierbei kommt es zur osmotischen Lyse von allen Parasitenstadien, die älter als 16-20 hpi sind. Jüngere Ringstadien sowie

uninfizierte Erythrozyten bleiben intakt. Nach der Lyse wird die Kultur erneut durch Zentrifugation sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 10 mL RPMI-Komplettmedium gewaschen. Anschließend können die synchronisierten Parasiten unter Standardbedingungen wieder in Kultur genommen werden.

2.2.4.7 Synchronisation von *P. falciparum* Kulturen mittels Reinvansion

Um eine hoch synchrone Parasitenkultur zu erhalten, wurde diese mittels Reinvansion und anschließender Behandlung mit Sorbitol synchronisiert. Hierfür wurden zunächst möglichst späte Schizonten-Stadien mittels Percoll isoliert (2.2.4.5), mit 250 µL Erythrozyten sowie 200 µL RPMI Komplettmedium vermischt und in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß unter Schütteln für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Parasiten unter Standardbedingungen für weitere 2,5 h wieder in Kultur genommen. Innerhalb dieser drei Stunden kann es zum Egress der Schizonten mit anschließender Reinvansion der Merozoiten kommen, sodass junge Ringstadien entstehen. Nach dieser dreistündigen Reinvasionsphase wird die Kultur zusätzlich mit Sorbitol synchronisiert (2.2.4.6), wobei es zur Lyse der verbliebenen Schizonten kommt. Folglich verbleiben nur junge Ringstadien in der Kultur, die ein Alter von maximal drei Stunden aufweisen. Falls benötigt, kann die Reinvasionsphase verlängert oder weiter verkürzt werden.

2.2.4.8 Transfektion von *P. falciparum* durch Elektroporation

(Moon et al., 2013)

Plasmid-DNA wurde mittels Elektroporation in *P. falciparum* Parasiten eingebracht. Hierfür wurden zunächst Schizonten-Stadien mittels Percoll isoliert (2.2.4.5) und in 90 µL TB-BSF resuspendiert. Zur Transfektion wurden 40-50 µg der entsprechenden Plasmid-DNA mithilfe von Natriumacetat gefällt (2.2.2.14) und in 10 µL TE-Puffer resuspendiert. Schizonten sowie Plasmid-DNA wurden vermischt, in eine Elektroporationsküvette überführt und mit einem Amaxa Biosystems Nucleofector II (Lonza) elektroporiert (Programm U033). Die elektroporierten Parasiten wurden anschließend mit 200 µL vorgewärmtem RPMI Komplettmedium sowie 300 µL Erythrozyten vermischt und für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Parasiten unter Standardbedingungen in Kultur genommen. In den darauffolgenden fünf Tagen wurde das Kulturmedium täglich gewechselt und ein entsprechendes Antibiotikum zur Selektion transgener Parasiten zugegeben.

2.2.4.9 Immunfluoreszenzassay (IFA) transgener Parasiten

Die Lokalisation von Proteinen im Parasiten konnte mithilfe eines Immunfluoreszenzassays untersucht werden. Hierbei wurde das Zielprotein in fixierten Parasiten mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Mithilfe von Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern kann das entsprechende Antigen schließlich fluoreszenzmikroskopisch

visualisiert werden. Zur Fixierung von Parasiten wurden Methanol oder Paraformaldehyd verwendet.

IFA mit Methanol-fixierten Parasiten. Hierfür wurde die zu untersuchende Parasitenkultur auf einen Objektträger ausgestrichen und der Blutausschlag für 30 min luftgetrocknet. Anschließend wurde der Ausstrich durch Inkubation in eiskaltem Methanol für 10 min fixiert und erneut luftgetrocknet. Mit einem Dako Stift wurde ein Flüssigkeits-abweisender Rahmen um den zu untersuchenden Bereich des Ausstrichs gezogen. Der fixierte Ausstrich wurde anschließend mit PBS für 5 min rehydriert bevor der primäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung (Tab.2.1) in 3% BSA in PBS zugegeben wurde. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wurde der Ausstrich dreimal mit PBS gewaschen bevor der Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung in 3% BSA in PBS zugegeben wurde. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Ausstrich erneut dreimal mit PBS gewaschen, wobei beim ersten Waschschrift 1 µg/mL DAPI oder oder 4,5 µg/mL Hoechst33342 zur Färbung des Zellkerns zugegeben wurde. Nach 10-minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur folgten die weiteren Waschschrift. Schließlich wurde ein Tropfen Mounting Medium auf den Ausstrich gegeben und ein Deckgläschen aufgelegt.

IFA mit Paraformaldehyd-fixierten Parasiten. Hierfür wurde 1 mL resuspendierte Parasitenkultur durch Zentrifugation bei 800 xg für 3 min sedimentiert. Alle weiteren Zentrifugationsschrift erfolgte bei 1500 xg für 1 min bei Raumtemperatur. Die sedimentierte Kultur wurde zweimal mit 1 mL PBS gewaschen, in 750 µL PFA Fixierlösung resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden dreimal mit 1 mL PBS gewaschen und anschließend zur Permeabilisierung in 1 mL 0,1% Triton-X-100 in PBS resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit 1 mL PBS gewaschen und zur Blockierung freier Bindestellen eine Stunde bei Raumtemperatur in 3% BSA in PBS inkubiert. Nach dem Blockieren wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 100 µL des Primärantikörpers in entsprechender Verdünnung (Tab.2.1) in 3% BSA in PBS zugegeben. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte rollend für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Zellen dreimal mit 1 mL PBS gewaschen und der Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung (Tab.2.1) in 3% BSA in PBS (+1 µg/mL DAPI) zugegeben. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte rollend im Dunkeln für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in 100 µL PBS bei 4°C gelagert. Zur mikroskopischen Untersuchung wurden die Zellen im Überstand resuspendiert, 5 µL der Suspension auf einen Objektträger gegeben und ein Deckgläschen aufgelegt (siehe 2.2.4.10).

2.2.4.10 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Lichtmikroskopie Giemsa-gefärbte Blutausstriche wurden lichtmikroskopisch untersucht. Hierfür wurde ein Tropfen Immersionsöl auf den Objektträger gegeben und der Ausstrich anschließend mithilfe eines Axio Lab.A1- (ZEISS) oder DM 2000 LED (Leica)-Lichtmikroskops (63x oder 100x Ölobjektiv) untersucht.

Fluoreszenzmikroskopie. Fixierte Parasitenpräparate aus Immunfluoreszenzassays (2.2.4.9) sowie Lebendpräparate transgener Parasiten wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Neben Fluoreszenz-markierten Proteinen, konnten zusätzlich der Zellkern durch Färbung mit DAPI oder Hoechst33342 sowie Zellmembranen durch Färbung mit BODIPY visualisiert werden. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit 1 µg/mL DAPI oder 4,5 µg/mL Hoechst33342 für 10 min bei 37°C. Die Färbung von Membranen erfolgte mit 2,5 µM BODIPY-TR-C5-Ceramid für 15 min bei 37°C. Die Färbung von Lebendpräparaten erfolgte in einem Volumen von 500 µL. Die gefärbten Parasiten wurden anschließend bei 1000 xg für 3 min zentrifugiert und das Zellpellet im Verhältnis 1:1 im Überstand resuspendiert. Anschließend wurden 5 µL der resuspendierten Probe auf einen Objektträger gegeben und ein Deckgläschen aufgelegt. Die Mikroskopische Untersuchung erfolgte mithilfe eines Leica DM6-Fluoreszenzmikroskops (DFC 9000 GT Kamera) mit einem 100x/1.40 Ölobjektiv und folgenden Filterspektren:

	Excitation	Emission
DAPI	325-375	435-485
GFP	460-500	512-542
TXR	542-582	604-644
Y5	590-650	602-738

2.2.4.11 Durchflusszytometrie

(Malleret et al., 2011)

Die Bestimmung der Parasitämie einer *P. falciparum* Kultur sowie die Quantifizierung bestimmter asexueller Parasitenstadien erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Infizierte Erythrozyten wurden hierbei anhand der Parasiten DNA mithilfe von spezifischen Färbungen detektiert. Die Färbung sowie das Gating erfolgten nach Malleret et al. (2011). Zur Erstellung von Wachstumskurven wurde die Parasitämie einer *P. falciparum* Kultur auf 0,1% eingestellt und die Parasitämie anschließend täglich über einen Zeitraum von mindestens zwei intraerythrozytären Zyklen gemessen.

Durchflusszytometrie mittels BD™ LSR II. Hierfür wurden 20 µL resuspendierte Parasitenkultur mit 80 µL RPMI Komplettmedium sowie 1 µL DHE-Lösung (finale Konzentration 5 µg/mL) und 1 µL Hoechst33342-Lösung (finale Konzentration 4,5 µg/mL) vermischt. Der Ansatz für 20 min im Dunkeln inkubiert. Zur Fixierung wurden 400 µL FACS Stopp Lösung zugegeben und anschließend mindestens 100.000 Zellen gemessen.

Durchflusszytometrie mittels ACEA Novo Cyte 1000. Hierfür wurden 20 µL resuspendierte Parasitenkultur mit 80 µL RPMI Komplettmedium sowie 1 µL DHE-Lösung (finale Konzentration 5 µg/mL) und 0,25 µL 100x SYBR Green-Lösung (finale Konzentration 0,25x) vermischt. Der Ansatz für 20 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden mindestens 100.000 Zellen gemessen.

2.2.4.12 Proliferationsassay mit *Plasmodium falciparum*

(Smilkstein et al., 2004; Johnson et al., 2007)

Die Proliferation von *Plasmodium*-Parasiten wurde durch Quantifizierung des DNA-Gehalts in infizierten Erythrozyten analysiert. Da rote Blutzellen keine DNA enthalten, kann durch Färbung der Parasiten-DNA mit SYBR-Gold auf die Proliferation der Parasiten in der Kultur geschlossen werden. Hierfür wurde zunächst die Parasitämie einer Parasiten-Kultur mittels Durchflusszytometrie (2.2.4.11) bestimmt. Anschließend wurden 0,1% Parasitämie und 2% Hämatokrit eingestellt und die Kultur auf lichtundurchlässige schwarze 96-Well-Platten (200 µL Kultur pro Well) verteilt. Das Verteilen der Kultur erfolgte mit einer automatischen Multikanalpipette (Transferpette-8, BRAND) oder mithilfe einer Janus Automated Workstation (Perkin Elmer). Zur Untersuchung potentiell antiplasmodialer Verbindungen wurden diese in DMSO gelöst und anschließend in die Kultur gegeben. Die finale DMSO-Konzentration betrug maximal 0,5%. Als Negativkontrolle diente DMSO ohne Verbindung sowie 2% uninfizierte Erythrozyten. Anschließend wurde die Kultur unter Standardbedingungen (2.2.4.1) für 96 h inkubiert und dabei täglich begast. Die Proliferation der Parasiten nach 96 h wurde anhand des DNA-Gehalts durch eine SYBR-Gold-Färbung quantifiziert. Hierfür wurden zunächst aus jedem Well 100 µL des Kultur-Überstandes abgenommen, anschließend 100 µL Drug-Screen-Lysepuffer (+ 1xSYBR Gold) zugegeben und resuspendiert. Die Färbung erfolgte durch Inkubation für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur. Der DNA-Gehalt wurde anschließend in einem EnVision Multilable Plate Reader (PerkinElmer) gemessen. Zur Berechnung von IC₅₀-Werten wurden die Messwerte zur Erythrozyten-Kontrolle (uninfiziert) normalisiert, als % der DMSO-Kontrolle in Graphpad Prism geplottet und Dose-Response-Kurven mittels nonlinearer Regression erstellt.

2.2.4.13 Kultivierung von HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin (finale Konzentration 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden standardmäßig in einer T25 TC-Zellkulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht) in einem Volumen von 5 mL kultiviert wobei die Konfluenz der Zellen lichtmikroskopisch beobachtet wurde. Die Zellkultur wurde vor Erreichen einer 100%igen Konfluenz entsprechend verdünnt (2.2.4.14).

2.2.4.14 Passagieren von HEK293T-Zellen

Da HEK293T-Zellen adhärent wachsen, müssen diese zum Verdünnen zunächst vom Boden des Kulturgefäßes gelöst werden. Bei einer Konfluenz von nahezu 100% können die Zellen in der Regel durch auf- und abpipettieren des Überstandes heruntergewaschen werden. War dies nicht möglich, wurden die Zellen durch Behandlung mit Accutase vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Hierfür wurde der Überstand entfernt und die Zellen zunächst mit 10 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 mL Accutase Cell Detachment Solution überschichtet und 5 min bei 37°C inkubiert. Die nun gelösten Zellen wurden bei 500 xg für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in einem definierten Volumen DMEM resuspendiert. Anschließend konnten die Zellen durch Mischen mit frischem Medium verdünnt werden. In der Regel wurden die Zellen alle drei Tage 1:5 verdünnt.

2.2.4.15 Bestimmung der Zellzahl in HEK293T-Kulturen

Um definierte Zellzahlen aussäen zu können, wurde die Zellzahl in einer HEK293T-Kultur mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurde zunächst das Deckglas der Kammer mit 70% Ethanol gereinigt. Das trockene Deckglas wurde anschließend mit Wasser befeuchtet und mit leichtem Druck auf die Stege des Objektträgers geschoben. Das Anhaften des Deckglases kann durch das Sichtbarwerden von Newton'schen Interferenzfarben („Newton'sche Ringe“) überprüft werden. Anschließend wurde die auszuzählende Zellkultur im Kulturmedium resuspendiert (2.2.4.14) und die Zellsuspension seitlich unter das Deckglas pipettiert. Die Zellzahl wurde im Lichtmikroskop (10x Objektiv) in 4 Eckquadraten mit jeweils 16 Kleinquadraten ausgezählt und anschließend der Mittelwert der Eckquadrate berechnet. Da anhand des Abstandes zwischen Deckglas und Zählkammer das Volumen über einem Eckquadrat definiert ist, kann die Zellzahl pro Milliliter anhand eines entsprechenden Verdünnungsfaktors berechnet werden. Entsprechend wurde die mittlere Zellzahl der ausgezählten Eckquadrate mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, woraus sich die Anzahl der Zellen pro Milliliter ergab.

2.2.4.16 Herstellung und Auftauen von HEK293T-Zell-Cryostabilaten

Zur Herstellung eines Cryostabilates wurde zunächst die Zellzahl einer HEK293T-Zellkultur (ca. 80% Konfluenz) bestimmt (2.2.4.15). Die Zellen wurde im Überstand resuspendiert (2.2.4.14) und durch Zentrifugation bei 500 xg für 5 min sedimentiert. Anschließend wurde das Zellpellet in einem entsprechenden Volumen HEK Freezing Solution resuspendiert, sodass eine Zellzahl von ca. 2×10^6 Zellen/mL erreicht wurde. Die Zellsuspension wurde in Aliquots zu je 1 mL in Cryogefäße überführt, die anschließend in einen Gefrierbehälter (Mr Frosty™, Thermo Scientific™) gestellt wurden. Der Gefrierbehälter wurde über Nacht bei -80°C inkubiert. Hierbei verhindert der Gefrierbehälter ein zu schnelles Einfrieren der Proben und gewährleistet eine Kühlrate von ca. $-1^\circ\text{C}/\text{Minute}$. Nach dem Einfrieren wurden die Cryostabilate in der Gasphase von Flüssigstickstoff gelagert.

Zum Auftauen von Cryostabilaten wurden diese für eine Minute bei 37°C im Wasserbad inkubiert und in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden tropfenweise 10 mL vorgewärmtes DMEM hinzugegeben und die Zellen durch Zentrifugation bei 500 xg für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem DMEM unter Standardbedingungen (2.2.4.13) in Kultur genommen.

2.2.4.17 HEK-Zell-Viabilitätsassay

Zytotoxische Effekte von zu untersuchenden Verbindungen gegenüber eukaryontischen Zellen wurden mithilfe eines HEK-Zell-Viabilitätsassays untersucht. Hierfür wurde zunächst die Zelldichte einer HEK293T-Kultur bestimmt (2.2.4.15). Anschließend wurden die Zellen in eine schwarze 96-Well-Platte ($2,5 \times 10^4$ Zellen pro Well in einem Volumen von 200 μL) ausgesät und 24 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und 200 μL frisches Kulturmedium zugegeben, in welches zuvor die zu testenden Verbindungen gegeben wurden. Zur Bestimmung von IC_{50} -Werten wurden verschiedene Konzentrationen der zu testenden Verbindungen untersucht. Sämtliche Verbindungen wurden in DMSO gelöst. Die finale DMSO-Konzentration im Assay betrug maximal 0,5%. Zudem dienten 0,5% DMSO als Negativkontrolle sowie 10% DMSO und 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSD als Positivkontrollen. Nach Zugabe der zu testenden Verbindungen wurden die HEK293T-Zellkultur für weitere 48 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Viabilität der Zellen wurde anschließend durch Zugabe von PrestoBlue® Cell Viability Agent (Invitrogen) untersucht. Hierfür wurde der Überstand abgenommen, 200 μL 10% PrestoBlue in vorgewärmtem PBS zugegeben und die Kultur 30 min bei 37°C inkubiert. In Zellen, die einen aktiven Stoffwechsel aufweisen, wird der PrestoBlue-Farbstoff reduziert, wodurch dieser zu fluoreszieren beginnt. Die Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 560 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$) wurde in einem EnVision Multilable Plate Reader (Perkin Elmer, Integration Time 0,1sec/Well) gemessen. Die erhaltenen Messwerte wurden in Graphpad Prism geplottet, zur DMSO-Kontrolle normalisiert und IC_{50} -Werte mittels nonlinearer Regression berechnet.

2.2.5 Bioinformatische Methoden

2.2.5.1 Alignment von DNA- und Aminosäuresequenzen

Alignments von DNA-Sequenzen erfolgten mithilfe des Onlinetools EMBOSS Needle Pairwise Sequence Alignment (Madeira et al., 2019).

Um Alignments von Aminosäuresequenzen verschiedener Proteine zu erstellen, wurde das Onlinetool PRALINE Multiple Sequence Alignment verwendet (Simossis & Heringa, 2005). Die Konservierung der Aminosäuren innerhalb der verglichenen Sequenzen wurde hierbei anhand eines Farbcodes dargestellt.

2.2.5.2 Recodonisierung von DNA-Sequenzen

Die Recodonisierung von DNA-Sequenzen erfolgte mit einem Softwaretool (zur Verfügung gestellt von Dr. Stephan Lorenzen, BNITM) zur Anpassung von Basentriplets nach gewünschten Kriterien. Hierbei wurde jedes Basentriplett der ursprünglichen DNA-Sequenz zu einem anderen Basentriplett verändert, welches jedoch weiterhin die gleiche Aminosäure codiert. Zudem wurde stets jenes mögliche Triplet gewählt, welches sich am stärksten vom ursprünglichen Codon unterscheidet. Als weiteres Kriterium wurde von jedem möglichen Triplet stets das AT-reichste gewählt.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von rekombinanter *PfGSK3 β*

3.1.1 Expression und Aufreinigung von *rPfGSK3 β*

Zur Charakterisierung rekombinanter *PfGSK3 β* wurde diese zunächst heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Im Rahmen meiner Masterarbeit wurde bereits ein Protokoll zur Expression und Aufreinigung rekombinanter *PfGSK3 β* etabliert. Gemäß diesem Protokoll wurde *rPfGSK3 β* in *E. coli* BL21 (DE3-)RIL exprimiert und aufgereinigt, jedoch war die Ausbeute an gereinigtem Protein mit 250 μ g pro drei Liter Bakterienkultur gering. In Zusammenarbeit mit Dr. Christian Löw und Samuel Pazicky (EMBL/CSSB Hamburg) wurde das Protokoll zur Expression rekombinanter *PfGSK3 β* weiterentwickelt. Unter Verwendung von *E. coli* C41 konnte die Proteinausbeute auf mehrere Milligramm Protein pro ein Liter Bakterienkultur gesteigert werden. Zudem wurde beim Zellaufschluss das Reduktionsmittel TCEP beigefügt, welches möglicherweise ebenfalls die Ausbeute löslichen Proteins erhöht. Die Reinheit des rekombinanten Proteins konnte zudem durch zusätzliche Auftrennungen mittels Anionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie gesteigert werden. Der His-Tag wurde nach der Aufreinigung mithilfe einer 3C-Protease (siehe 2.2.3.2) abgespalten.

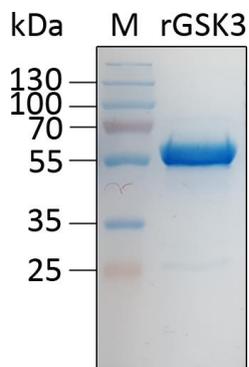


Abb.3.1: Aufreinigung von *rPfGSK3 β* nach Expression in *E. coli* C41. Rekombinante *PfGSK3 β* wurde als Fusionsprotein mit einem His-Tag in *E. coli* C41 exprimiert, affinitätschromatographisch aufgereinigt und der Affinitätstag nach Aufreinigung abgespalten (durchgeführt und zur Verfügung gestellt von Samuel Pazicky, EMBL/CSSB Hamburg). *rPfGSK3 β* wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Brilliant Blue analysiert. Erwartetes Molekulargewicht: 51,6 kDa; M = Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Wie in Abbildung 3.1 ersichtlich konnte *rPfGSK3 β* in Reinform dargestellt werden und läuft in der SDS-PAGE etwas über dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 52 kDa, welches möglicherweise durch Autophosphorylierung erklärt werden kann. Beide Aufreinigungen der rekombinanten *PfGSK3 β* (exprimiert in *E. coli* BL21 und C41) wurden im Folgenden zur Charakterisierung potentieller *PfGSK3*-Inhibitoren verwendet (Abschnitt 3.2). Rekombinante *PfGSK3 β* aus *E. coli* C41 wurde im Folgenden für eine biophysikalische Charakterisierung (Abschnitt 3.1.2) sowie Untersuchungen zur Reaktionskinetik (Abschnitt 3.1.4) verwendet.

3.1.2 Biophysikalische Charakterisierung von *rPfGSK3 β*

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die strukturelle Analyse von *PfGSK3 β* . Hierfür wurde *rPfGSK3 β* anhand verschiedener biophysikalischer Verfahren analysiert. Sämtliche Untersuchungen zur biophysikalischen Charakterisierung, die im Folgenden zusammenfassend dargestellt werden, erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Christian Löw durch Samuel Pazicky (EMBL/CSSB Hamburg).

Bei der biophysikalischen Charakterisierung mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS), Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie sowie Nano-Differential-Scanning-Fluorimetrie (nanoDSF) konnte gezeigt werden, dass es sich bei *rPfGSK3 β* um ein stabiles Monomer handelt, welches durch ATP und ATP-Analoga weiter stabilisiert wird und strukturell hauptsächlich α -Helices aufweist.

Letztlich sollte die dreidimensionale Struktur des Proteins anhand von Proteinkristallisation mit anschließender Röntgenstrukturanalyse untersucht werden. In Kristallisations-Screens wurde nach geeigneten Bedingungen für eine Kristallisation des Proteins gesucht, wobei pH-Wert, Salz- und PEG-Konzentrationen variiert wurden. Es konnten jedoch bei keiner der getesteten Bedingungen auswertbare Kristalle von *rPfGSK3 β* geerntet werden.

In weiteren Experimenten wurden nach möglichen Ursachen hierfür gesucht. Massenspektrometrische Untersuchungen von *rPfGSK3 β* zeigten, dass das Protein in bis zu siebenfach phosphorylierter Form vorliegt. Zudem liegen in der Probe verschiedene Varianten unterschiedlich stark phosphorylierter *rPfGSK3 β* vor. Die resultierende Polydispersität der Probe führt möglicherweise zu einer Inhibierung der Proteinkristallisation.

Zur Erhöhung der Monodispersität wurde *rPfGSK3 β* mittels Ionenaustauschchromatographie analysiert, um eventuell vorhandene Phospho-Varianten voneinander zu trennen. Hierbei war zu erwarten, dass eine weniger phosphorylierte Variante der *rPfGSK3 β* früher eluiert, als stärker phosphorylierte Varianten. Bei der Auftrennung konnten vier Peaks detektiert werden (Abb.3.7). Dennoch konnte auch nach Auftrennung dieser Varianten keine auswertbare Proteinkristallisation erreicht werden.

Des Weiteren sollte zur Erhöhung der Monodispersität eine nicht phosphorylierte Form der rekombinanten *PfGSK3 β* aufgereinigt werden. Hierfür wurde eine Dephosphorylierung des Proteins mithilfe einer Phosphatase in Betracht gezogen. Weder die Co-Expression von *PfGSK3 β* mit einer Lambda-Phosphatase in *E. coli*, noch eine nachträgliche Phosphatase-Behandlung aufgereinigter *rPfGSK3 β* führten zu einer nachweisbaren Dephosphorylierung des Proteins.

Eine Erklärung hierfür könnte die Autophosphorylierungs-Aktivität der *rPfGSK3 β* sein, die bereits für die humane und auch die plasmodiale *GSK3 β* beschrieben werden konnte (Cole et al., 2004; Bui et al., 2019). Eine Analyse der rekombinanten *PfGSK3 β* mittels Ionenaustauschchromatographie (IEX) bestätigte die angenommene Autophosphorylierungs-

Aktivität. Wie bereits erwähnt, ist zu erwarten, dass stärker phosphorylierte Varianten des Proteins bei einer Ionenaustauschchromatographie später eluieren als weniger stark phosphorylierte Proteine. Bei entsprechenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von ATP zu einer verzögerten Elution von *rPfGSK3 β* während der Chromatographie führt (3.1.4; Abb.3.7).

Um diese vermeintliche Autophosphorylierungs-Aktivität zu umgehen, sollte durch eingebrachte Mutationen in *rPfGSK3 β* die Phosphorylierung des Proteins moduliert werden. Es wurden zwei Strategien verfolgt: Zum einen wurde die ATP-Bindestelle der Kinase mutiert. Bei der humanen GSK3 β ist das Lysin an Position 85 (K85) als die dafür entscheidende Aminosäure identifiziert worden (Sun et al., 2008), wobei die homologe Aminosäure in *PfGSK3 β* K96 entspricht (vgl. Alignment Abb.5.7 im Anhang). K96 wurde zu Alanin mutiert. Zum anderen wurde S226 und Y229, zwei identifizierte Phosphorylierungsstellen (Solyakov et al., 2011; Treeck et al., 2011; Lasonder et al., 2012) innerhalb der Sequenz von *PfGSK3 β* mutiert. Hierfür wurden zwei Einzelmutanten (S226A oder Y229A) sowie eine Doppelmutante (S226A+Y229A) generiert. Bei anschließender heterologer Expression zeigte sich jedoch, dass keine der oben beschriebenen Mutanten in löslicher Form aufgereinigt werden konnte, da sich stets unlösliche *Inclusion Bodies* formten. Diese *Inclusion Bodies* wurden isoliert massenspektrometrisch untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass diese *rPfGSK3 β* -Mutanten keinerlei Phosphorylierung aufweisen (Samuel Pazicky, persönliche Mitteilung).

Folglich ist davon auszugehen, dass eine Phosphorylierung von *rPfGSK3 β* notwendig ist, um eine Löslichkeit des Proteins zu gewährleisten. Dem gegenüber scheint sich eine Phosphorylierung des Proteins jedoch negativ auf die Monodispersität der Probe auszuwirken und somit zu einer Inhibierung der Proteinkristallisation zu führen. Insgesamt konnte daher keine Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von *PfGSK3 β* erreicht werden.

3.1.3 In Vitro Kinase-Aktivitätsbestimmung: Etablierung von KinaseGlo Plus

Die enzymatische Aktivität rekombinanter Kinasen wurden mithilfe eines kommerziellen Kinase Assays (KinaseGlo Plus, Promega) untersucht. Hierfür wurde zunächst eine Kinasereaktion mit einem spezifischen Substrat in Gegenwart von ATP durchgeführt, wobei es in Abhängigkeit von der enzymatischen Aktivität der Kinase zu einem Verbrauch des enthaltenen ATPs kommt. Anschließend wurde durch Zugabe einer Luciferase Lumineszenz generiert, deren Intensität anhängig von der Konzentration des enthaltenen ATPs ist. Da eine hohe Kinaseaktivität in einem höheren Verbrauch von ATP resultiert, führt dies zu einer verminderten Intensität der Lumineszenz im Vergleich zu einer Kontrollreaktion ohne Kinase. Folglich spiegelt die Intensität des Lumineszenz-Signals invers die enzymatische Aktivität der rekombinanten Kinase wieder. Im Folgenden wurden zunächst geeignete Reaktionsbedingungen für die Kinasereaktion mit rekombinanter GSK3 ermittelt.

Der KinaseGlo Plus Assay verspricht eine lineare Abhängigkeit zwischen Lumineszenz-Signal und ATP-Konzentration für ATP-Konzentrationen bis 100 μM . Um die Abhängigkeit zwischen ATP-Konzentration und Signalintensität zu untersuchen, wurde eine ATP-Verdünnungsreihe direkt, ohne vorangegangene Kinasereaktion, mit der Luciferase inkubiert und das resultierende Lumineszenz-Signal gemessen. Es konnte die lineare Abhängigkeit zwischen ATP-Konzentration und der Intensität des Lumineszenz-Signals bei ATP-Konzentrationen bis 100 μM bestätigt werden (Abb.3.2).

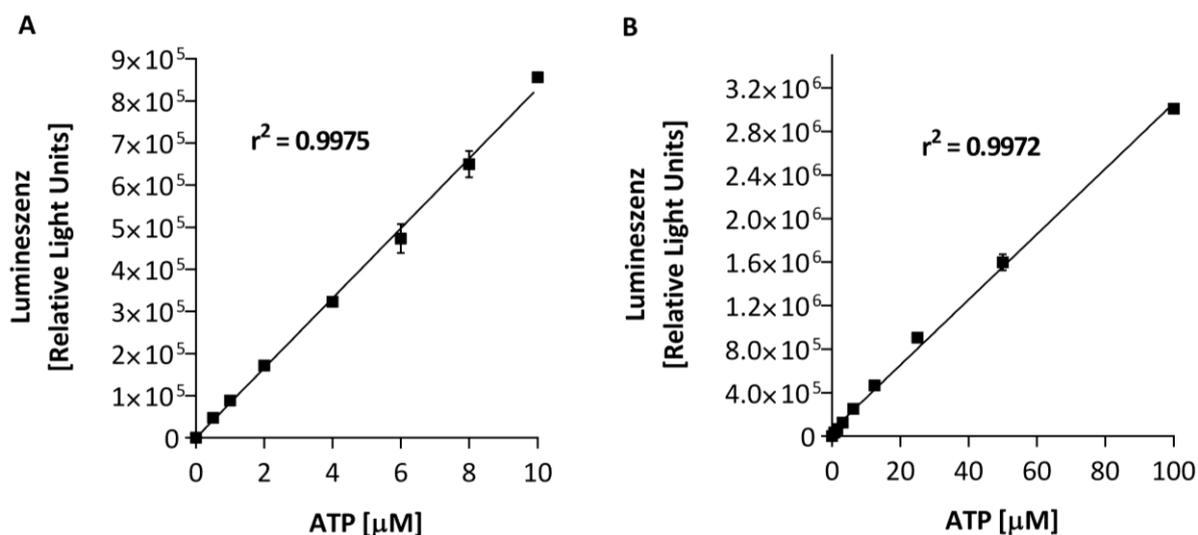


Abb.3.2: Lineare Abhängigkeit zwischen Lumineszenz-Signal und ATP-Konzentration. Die Abhängigkeit der Intensität des Lumineszenz-Signals von der eingesetzten ATP-Konzentration wurde anhand von ATP-Verdünnungsreihen zwischen (A) 0 und 10 μM sowie (B) 0 und 100 μM ohne vorangegangene Kinasereaktion untersucht. Alle Datenpunkte zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Messungen. Die dargestellten Geraden wurden in Graphpad Prism mittels linearer Regression erstellt.

Des Weiteren verspricht der Assay durch die sog. "Glow-Lumineszenz" eine hohe Signalstabilität, sodass das Lumineszenz-Signal auch mehrere Stunden nach Starten der Reaktion noch messbar sein sollte. Zur Untersuchung der Signalstabilität wurden Proben mit drei verschiedenen ATP-Konzentrationen (1 μM , 10 μM und 100 μM) erneut direkt, ohne vorangegangene Kinasereaktion mit der Luciferase inkubiert. Das resultierende Lumineszenz-Signal wurde nach 10 min und anschließend stündlich bis vier Stunden nach Starten der Reaktion gemessen. Wie in Abb.3.3 ersichtlich konnte vier Stunden nach Starten der Reaktion für alle ATP-Konzentrationen noch mindestens 50% der initialen Signalintensität gemessen werden, welches eine hohe Signalstabilität bestätigt.

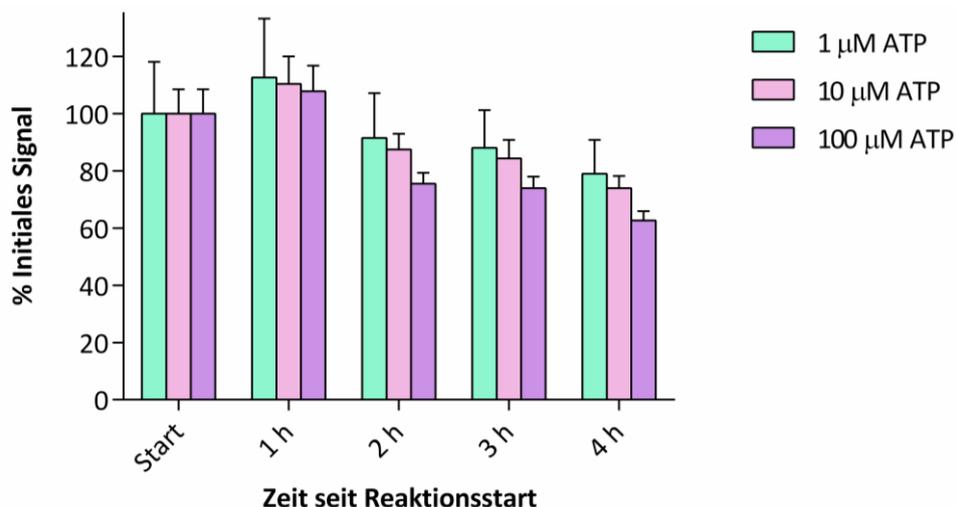


Abb.3.3: Signal-Stabilität von Glow-Lumineszenz. Die Stabilität des Lumineszenz-Signals bei 1 μM, 10 μM sowie 100 μM ATP wurde stündlich bis vier Stunden nach Zugabe der Luciferase ohne vorangegangene Kinasereaktion gemessen. Vier Stunden nach Zugabe der Luciferase war für alle getesteten ATP-Konzentrationen mind. 50% des ursprünglichen Signals detektierbar. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung von drei Messungen.

Um optimale Reaktionsbedingungen für die Kinasereaktion mit rekombinanter *PfGSK3β* zu etablieren wurde zunächst die optimale Substratkonzentration ermittelt. Als Substrat diente ein Peptid der humanen Glykogen Synthase (Sequenz: YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQ(pS)EDEEE, pS = vorphosphoryliertes Serin). Zur Ermittlung der optimalen Substratkonzentration wurde die Kinase im Überschuss eingesetzt (100 ng) und in Gegenwart von 6 μM ATP wurden verschiedene Substratkonzentrationen getestet. Als Negativkontrolle wurden zudem sämtliche Substratkonzentration ohne Zugabe von Kinase getestet. Die Kinasereaktion wurde 30 min bei 30°C inkubiert und das Lumineszenz-Signal 10 min nach Zugabe der Luciferase gemessen. Hierbei konnte ein Anstieg der Kinaseaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratmenge bis zu einer Substratkonzentration von 12 μM gemessen werden. Bei höheren Substratkonzentrationen kam es zu einer Sättigung der Reaktion (Abb.3.4A). Laut Herstellerprotokoll entspricht die optimale Substratkonzentration der Konzentration, bei der die größtmögliche Differenz zwischen Kinaseaktivität und unspezifischem Hintergrundsignal der entsprechenden Negativkontrolle zu verzeichnen ist. In Abb.3.4B ist das Verhältnis von Hintergrundsignal (Negativkontrolle) und der Kinasereaktion für alle getesteten Substratkonzentrationen dargestellt. Bei einer Substratkonzentration von 12 μM konnte das optimale Signal/Hintergrund-Verhältnis erreicht werden. Folglich wurde diese Konzentration als optimale Substratmenge für alle folgenden Experimente gewählt.

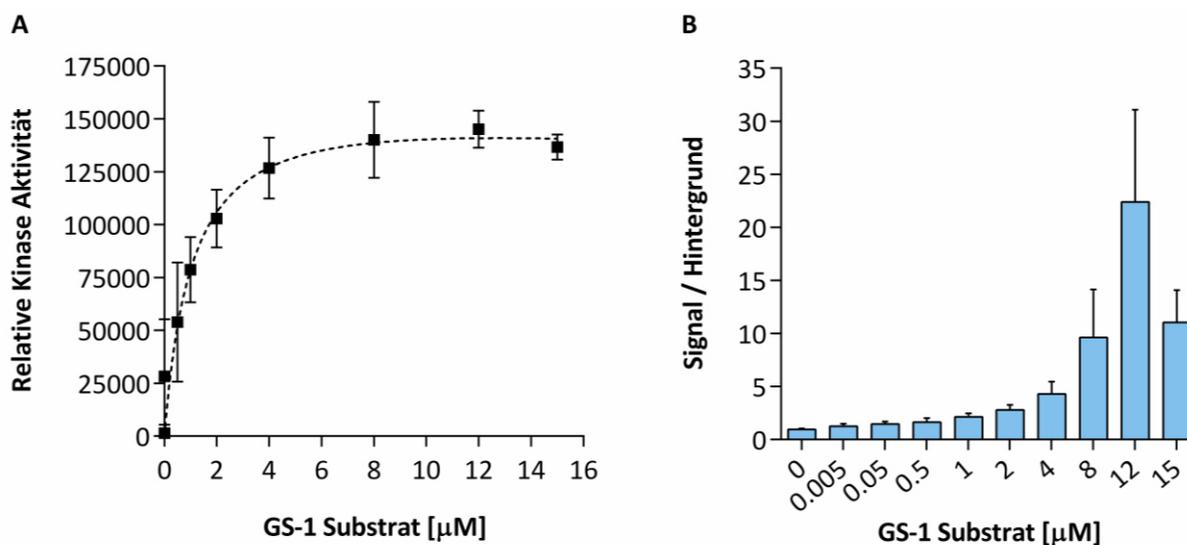


Abb.3.4: Optimale Substratkonzentration für eine Kinasereaktion mit *rPfGSK3*. Zur Ermittlung der optimalen Substratkonzentration wurde verschiedene Substratkonzentrationen in Gegenwart von 100 ng *rPfGSK3* und 6 μM ATP im Vergleich zu Kontrollreaktionen ohne Kinase getestet. **(A)** Kinaseaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration bei 100 ng *rPfGSK3* und 6 μM ATP. **(B)** Verhältnis von Signal zu unspezifischem Hintergrund (Kontrollreaktion ohne Kinase). Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung von drei Kinasereaktionen. Die dargestellte Kurve wurde in Graphpad Prism mittels non-linearer Regression moduliert.

Zur Ermittlung der optimalen Kinasekonzentration wurden verschiedene Kinasekonzentrationen in Gegenwart von 6 μM ATP sowie der zuvor ermittelten optimalen Substratkonzentration getestet. Die Reaktion wurde wie oben beschrieben 30 min bei 30° inkubiert und das Lumineszenzsignal 10 min nach Zugabe der Luciferase gemessen. Hierbei konnte eine Abhängigkeit der gemessenen Kinaseaktivität von der eingesetzten Kinasekonzentration ermittelt werden. Ab einer Kinasekonzentration von mehr als 20 ng pro Reaktion erreichte die Reaktion einen Sättigungsbereich (Abb.3.5). Laut Herstellerprotokoll sollte sich die optimale Kinasekonzentration in einem Bereich befinden, in dem noch keine Sättigung des Signals erreicht wurde. Folglich wurden 20 ng pro Reaktion als optimale Kinasekonzentration für alle weiteren Experimente gewählt.

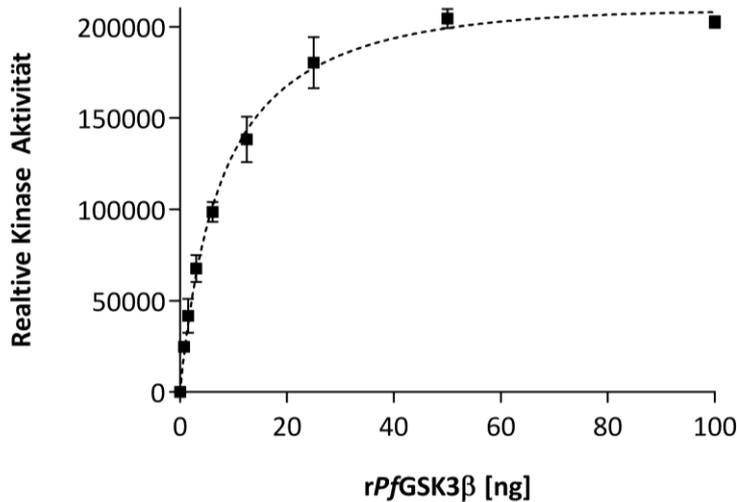


Abb.3.5: Optimale Kinasemenge für eine Kinasereaktion mit rPfGSK3β. Die Abhängigkeit zwischen detektierter Kinaseaktivität und eingesetzter Kinasemenge wurde durch Testung von verschiedenen Kinasekonzentrationen in Gegenwart von 6 μM ATP sowie der optimalen Substratkonzentration untersucht. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Kinasereaktionen. Die dargestellte Kurve wurde in Graphpad Prism mittels non-linearer Regression moduliert.

Für die Etablierung der optimalen Reaktionsbedingungen sowie für alle folgenden Kinasereaktionen wurde rekombinante *PfGSK3β* verwendet, die in *E. coli* C41 exprimiert wurde (3.1.1). Entsprechend den ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen wurde folgender Ansatz als Standard-Reaktionsansatz für eine Kinasereaktion mit rekombinanter *PfGSK3β* für alle weiteren Untersuchungen verwendet:

- 20 ng rGSK3
- 12 μM GS-1 Peptid Substrat
- 6 μM ATP

Die Kinasereaktion erfolgte in einem Volumen von 5 μL für 30 min bei 30°C. Damit wurde eine solide Grundlage geschaffen, Kinaseaktivitäten und die Eigenschaften von potentiellen Kinase-Inhibitoren reproduzierbar zu analysieren. Zu testende Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und in der gewünschten Konzentration dem Reaktionsansatz zugefügt. Die finale DMSO-Konzentration pro Kinasereaktion betrug maximal 0,5%. Um bei Testung von Kinase-Inhibitoren gegen humane rGSK3 eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden hierbei identische Reaktionsbedingungen gewählt.

3.1.4 Reaktionskinetik von *rPfGSK3β*

Zur Untersuchung, ob es sich bei der rekombinanten *PfGSK3β* um ein funktionelles Protein handelt, wurde ein Lumineszenz-basierter Kinase Assay (KinaseGlo Plus, Promega) etabliert, der eine Analyse der spezifischen Kinase-Aktivität von *rPfGSK3β* erlaubt (Abschnitt 3.1.3). Mithilfe des *in vitro* Kinaseassays konnte gezeigt werden, dass *rPfGSK3β* katalytisch aktiv ist und konzentrationsabhängig ein spezifisches Substrat (Peptid der humanen Glykogen Synthase) phosphoryliert. Die Kinasereaktion folgt hierbei einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb.3.6). Mithilfe des Kinaseassays wurde die Substratphosphorylierung bei verschiedenen Substratkonzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (Abb.3.6A). Während der initialen Kinasereaktion ergibt sich eine lineare Abhängigkeit zwischen Substratumsatz und Reaktionszeit. Die Steigung der entsprechenden Geraden entspricht der Reaktionsgeschwindigkeit. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde anschließend in Abhängigkeit von der Substratkonzentration dargestellt (Michaelis-Menten-Sättigungskurve, Abb.3.6B). Die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) entspricht der Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Die Wechselzahl K_{cat} beschreibt die Anzahl Substratmoleküle, die von einem Kinase-molekül pro Sekunde phosphoryliert werden und kann mithilfe der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit sowie der eingesetzten Kinase-menge berechnet werden.

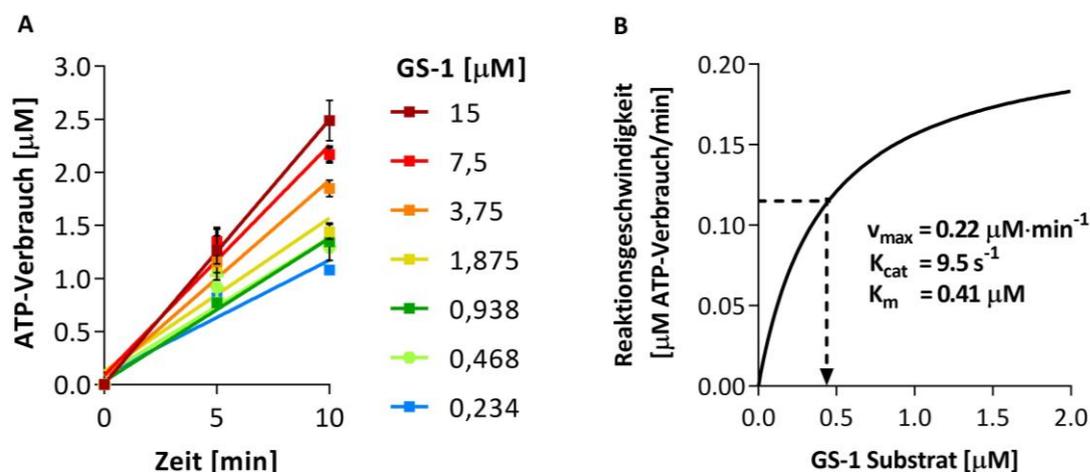


Abb.3.6: Michaelis-Menten-Reaktionskinetik von *rPfGSK3β*. Die Kinasereaktion mit *rPfGSK3β* folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik. **(A)** Kinaseaktivität (ATP-Verbrauch) 5 und 10 min nach Reaktionsstart für verschiedene Substratkonzentrationen. Die Steigung der Geraden entspricht der Reaktionsgeschwindigkeit [ATP-Verbrauch pro Minute]. **(B)** Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Michaelis-Menten-Sättigungskurve). v_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit; K_{cat} = Substratmoleküle, die pro Sekunde von einem Kinase-molekül phosphoryliert werden; K_m = Michaelis-Menten-Konstante (Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist). Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Kinasereaktionen. Die dargestellte Michaelis-Menten-Reaktionskinetik wurde in Graphpad Prism analysiert.

Mithilfe des Assays konnte für *rPfGSK3 β* eine Michalis-Menten-Konstante von $K_m=0,41 \mu\text{M}$ berechnet werden. Ein ähnlicher Wert von $0,5 \mu\text{M}$ wurde bereits für die humane GSK3 bei Phosphorylierung des Substrates CdGAP (*cell division cycle 42 GTPase activating protein*) beschrieben (Danek et al., 2007). Zudem konnte eine Wechselzahl von $K_{cat}=9,5s^{-1}$ berechnet werden. Entsprechende Werte dieser Größenordnung konnten ebenfalls bereits für die humane GSK3 β beschrieben werden (Dajani et al., 2003).

Neben der Phosphorylierung von spezifischen Substraten wurde für die humane GSK3 β eine Autophosphorylierungs-Aktivität beschrieben (Cole et al., 2004) und die unter 3.1.1 und 3.1.2 beschriebenen Daten legen dies auch für *PfGSK3 β* nahe. Um dies zu überprüfen, wurde *rPfGSK3 β* zunächst in Gegenwart von ATP (200 μM sowie 2 mM) inkubiert und anschließend im Vergleich zu einer Kontrolle mittels Anionenaustauschchromatographie analysiert. Sollte ein Autophosphorylierung erfolgen, wäre zu erwarten, dass die phosphorylierte *rPfGSK3 β* später eluiert bzw. dass entsprechende Peaks später eluierender Varianten eine gesteigerte Intensität aufweisen. Wie in Abb. 3.7 ersichtlich, konnten nach Anionenaustauschchromatographie erneut vier Peaks (P1-P4) detektiert werden.

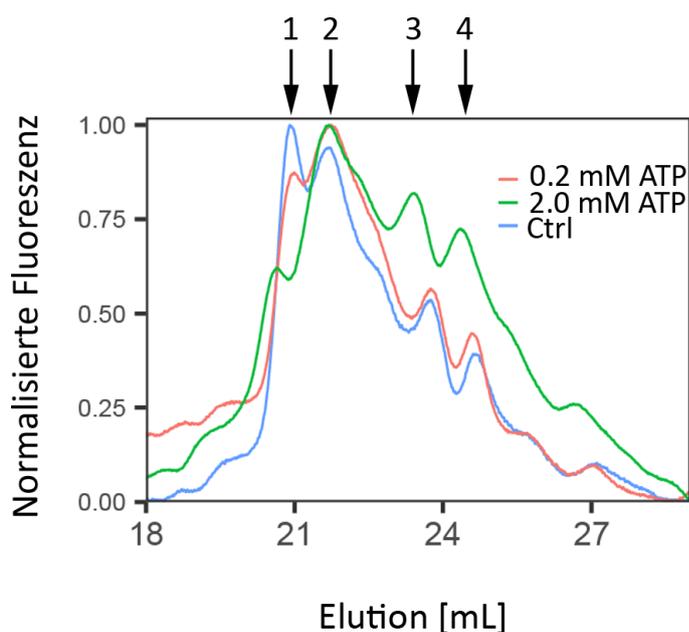


Abb. 3.7: Autophosphorylierung von *rPfGSK3 β* . Chromatographische Auftrennung *rPfGSK3 β* mittels IEX nach Inkubation mit 200 μM (rote Kurve) oder 2 mM (grüne Kurve) ATP im Vergleich zur Kontrolle (blaue Kurve). Detektierte Peaks (Pfeile 1-4) entsprechen unterschiedlich stark phosphorylierten Varianten des Proteins.

Es kann davon ausgegangen werden, dass P1 der am wenigsten phosphorylierten Variante des Proteins entspricht. Erwartungsgemäß zeigt der Peak der Kontrolle (blau) die stärkste Intensität. P2 repräsentiert entsprechend stärker phosphorylierte Varianten des Proteins. Bereits bei P2 weisen die ATP-behandelten Proben (grün und rot) eine stärkere Fluoreszenz auf als die Kontrolle. Dies lässt drauf schließen, dass sich in den ATP-behandelten Proben vermehrt stärker phosphorylierte Varianten der *rPfGSK3 β* finden. Bei P3 und P4 weist die mit 2 mM ATP behandelte *rPfGSK3 β* (grün) eine deutlich stärkere Fluoreszenz auf als die übrigen Proben. Dies lässt darauf schließen, dass vor allem die Behandlung mit 2 mM ATP dazu führt,

dass vermehrt stärker phosphorylierte Varianten der Kinase detektierbar sind, die aus einer Autophosphorylierung resultieren.

Im KinaseGlo Assay würde eine Autophosphorylierung in einem Verbrauch von ATP trotz Fehlen eines spezifischen Substrats resultieren. Ein entsprechender ATP-Verbrauch konnte jedoch in Kontrollreaktionen ohne GS-1 Substrat nicht detektiert werden (Abb.3.4). Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass dies auf die äußerst geringe Kinasemenge zurückzuführen ist, die in diesem Assay eingesetzt wurde. Die eingesetzte Kinasemenge von 20 ng entspricht einer Molmenge von 0,4 pM *rPfGSK3 β* pro Reaktion. Eine Autophosphorylierung ist demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit in diesem Assay nicht detektierbar.

Um eine mögliche Regulation der Kinaseaktivität von *rPfGSK3 β* durch Phosphorylierung zu untersuchen, wurde die Kinaseaktivität verschiedener Phospho-Varianten der Kinase mittels KinaseGlo Plus untersucht. Wie bereits bei 3.1.2 beschrieben, zeigte eine massenspektrometrische Untersuchung von *rPfGSK3 β* , dass die Kinase selbst in Form von verschiedenen Phospho-Varianten vorliegt. Wie ebenfalls bereits beschrieben, wurde rekombinante *PfGSK3 β* mittels Anionenaustauschchromatographie (IEX) analysiert, um diese Phospho-Varianten voneinander zu trennen. Hierbei war zu erwarten, dass eine weniger phosphorylierte Variante der *rPfGSK3 β* früher eluiert, als stärker phosphorylierte Varianten. Bei der Auftrennung konnten vier Peaks (P1-P4) detektiert werden, wobei es sich eventuell entsprechende unterschiedlich stark phosphorylierte Varianten des Proteins handelt (s.o.). Der Grad der Phosphorylierung dieser Varianten wurde anschließend mithilfe einer Phospho-spezifischen Färbung (DiamondQ) analysiert. Hierbei konnte bestätigt werden, dass die Variante P1 weniger stark phosphoryliert scheint, als die übrigen Varianten. Zudem nimmt die Intensität der Phosphorylierung von Variante P1 zu P4 stetig zu. (Abb.3.8A). Die Chromatographische Auftrennung sowie die Analyse der Phosphorylierung erfolgte durch Samuel Pazicky (Arbeitsgruppe Dr. Christian Löw, EMBL/CSSB Hamburg).

Anschließend wurde die Kinaseaktivität der vier *rPfGSK3 β* -Phosphovarianten mithilfe des KinaseGlo *in vitro* Assays bei den bereits etablierten Reaktionsbedingungen (3.1.3), jedoch bei drei verschiedenen Kinasekonzentrationen (100 ng, 50 ng, 25 ng) untersucht. Als Kontrolle wurde *rPfGSK3 β* ohne vorherige Auftrennung mittels IEX untersucht. Die Kinaseaktivität der getesteten Phospho-Varianten wurden anschließend als % der Kontrolle dargestellt. Im Kinase Assay zeigten alle vier Phospho-Varianten von *rPfGSK3 β* eine Kinaseaktivität in Abhängigkeit vom Grad der Phosphorylierung. Hierbei resultiert eine stärkere Phosphorylierung von *rPfGSK3 β* in einer gesteigerten Kinaseaktivität.

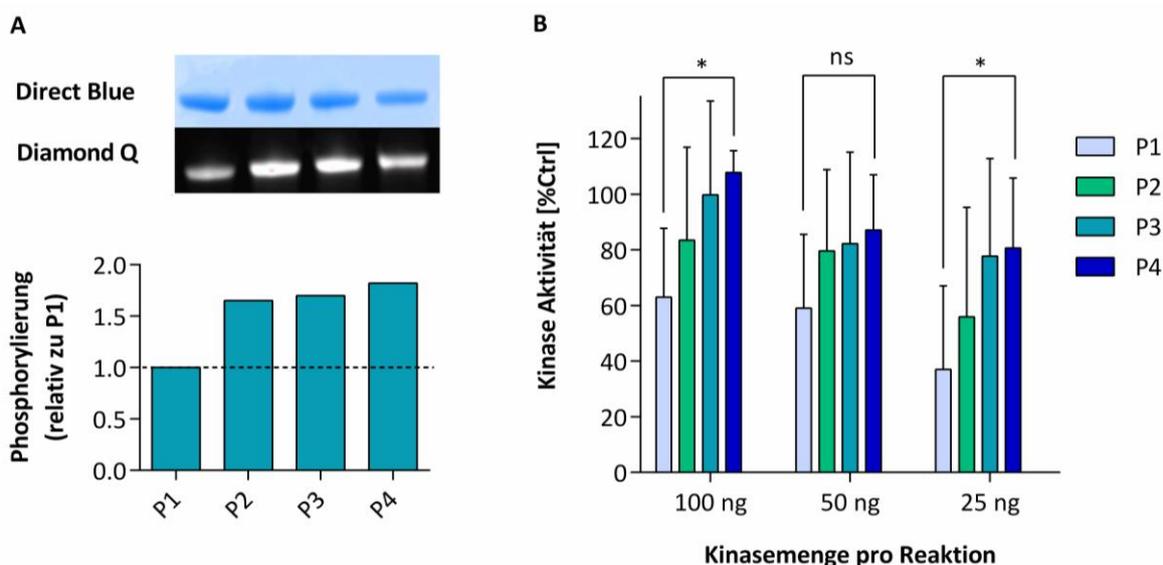


Abb.3.8: Kinaseaktivität von *rPfGSK3β*-Phosphovarianten. Rekombinante *PfGSK3β* wurde mittels Ionenaustauschchromatographie analysiert und die Kinaseaktivität der aufgetrennten Varianten mittels KinaseGlo Plus untersucht. **(A)** SDS-PAGE mit anschließender Direct Blue- und Phosphospezifischer DiamondQ-Färbung der aufgetrennten *rPfGSK3β*-Varianten. Die Phosphorylierung der aufgetrennten Varianten wurde anschließend anhand der DiamondQ-Färbung relativ zu Variante P1 quantifiziert. **(B)** Analyse der Kinaseaktivität der aufgetrennten *rPfGSK3β*-Varianten mittels KinaseGlo Plus bei Standard-Reaktionsbedingungen. Ctrl entspricht *rPfGSK3β* vor chromatographischer Auftrennung. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von Triplikaten aus drei unabhängigen *PfGSK3β* IEX-Analysen.

Zur Identifizierung von entsprechenden Phosphorylierungsstellen wurden die Varianten P1-P4 aus je drei unabhängigen Aufreinigungen mittels Massenspektrometrie untersucht. Hierbei konnten Unterschiede im Phosphorylierungsmuster detektiert werden, die sich auf den N-Terminus des Proteins konzentrieren. Von Variante P1 zu Variante P4 konnte ein stetiger Anstieg der Intensität der Phosphorylierung nachgewiesen werden, der vor allem auf einer Phosphorylierung der Aminosäuren S39/Y40 sowie S42/S43 beruht (Abb.5.6, siehe Anhang). Folglich wäre es möglich, dass die Phosphorylierung des N-Terminus die Kinaseaktivität von *PfGSK3β* reguliert.

3.2 Charakterisierung von *PfGSK3β* mittels spezifischer Kinase-Inhibitoren

3.2.1 Identifizierung *PfGSK3β*-spezifischer Inhibitoren

Zur Charakterisierung von *PfGSK3β* mithilfe von spezifischen Kinase-Inhibitoren, wurden anhand eines Strukturmodells Verbindungen moduliert, die aufgrund ihrer Struktur potentiell in der Lage sind, mit der ATP-Bindetasche von *PfGSK3β* zu interagieren (Fugel et al., 2013). Die Verbindung KuBra389 (5v) wurde bereits als *PfGSK3β*-spezifischer Inhibitor beschrieben (Fugel et al., 2013) und als Positivkontrolle mitgeführt. Die Verbindung KuBra228 (6c)

Einige dieser Verbindungen wurden in der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung neuer *PfGSK3 β* -Inhibitoren untersucht. Hierbei wurden zum einem sieben Verbindungen der KuMas-Reihe (synthetisiert von Andreas Masch) untersucht, wobei es sich um weitere Thieno[2,3-b]pyridine handelt. Zum anderen wurden drei weitere Verbindungen der KuHL-Reihe untersucht (synthetisiert von Hoang Lande), wobei es sich um Bisindolylcyclobutendione handelt. Weitere Informationen sowie Referenzen zu den untersuchten Verbindungen können Abschnitt 2.1.8 entnommen werden. In Tabelle 5.1 (siehe Anhang) sind sämtliche in der vorliegenden Arbeit untersuchte Verbindungen mit Strukturformel und Molekulargewicht dargestellt. Sämtliche Verbindungen wurden zunächst bei einer Konzentration von 10 μ M gegen rekombinante *PfGSK3 β* (Aufreinigung aus *E. coli* C41) im *in vitro* Kinase Assay getestet. Verbindungen, die bei einer Konzentration von 10 μ M eine Inhibierung der Kinaseaktivität von mindestens 50% zeigten, wurden als aktiv definiert.

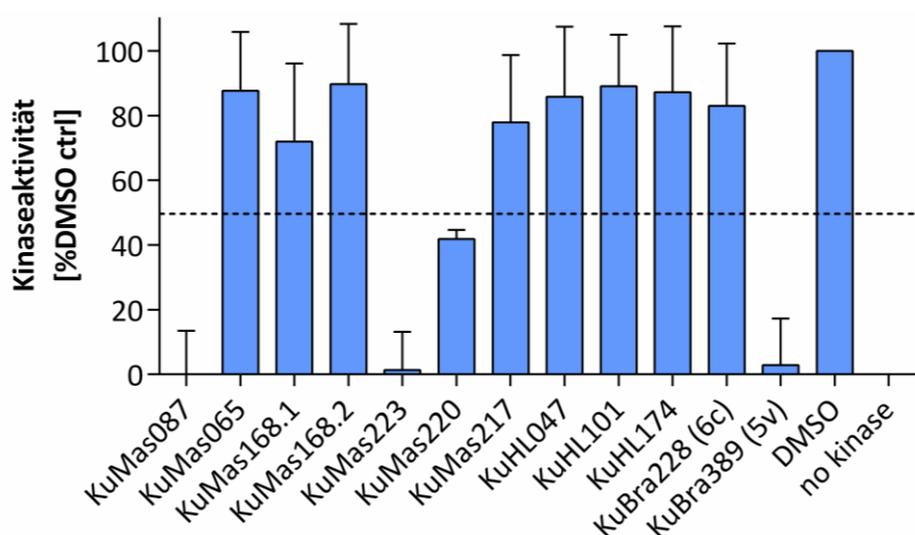


Abb.3.10: Identifizierung *PfGSK3 β* -inhibierender Verbindungen mittels KinaseGlo Plus. Potentielle *rPfGSK3 β* -Inhibitoren wurden mittels KinaseGlo Plus bei einer Konzentration von 10 μ M unter Standard-Reaktionsbedingungen gegen rekombinante *PfGSK3 β* getestet. Alle Werte wurden zu einer Kontrollreaktion ohne Kinase normalisiert und als % der DMSO Kontrolle dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von Triplikaten aus zwei Kinasereaktionen.

Im Test zeigten die Verbindungen KuMas087, KuMas223, KuMas220 sowie die Kontrollverbindung KuBra389 (5v) eine *rPfGSK3 β* -inhibitorische Aktivität. Für alle weiteren Verbindungen sowie den Kontrollverbindung KuBra228 (6c) konnte keine Inhibierung der Kinaseaktivität detektiert werden (Abb.3.10). Das Ergebnis wurde durch eine weitere Versuchsreihe mit einer anderen Aufreinigung rekombinanter *PfGSK3 β* (exprimiert in *E. coli* BL21) bestätigt (Abb.5.1, siehe Anhang).

Um die Aktivität sowie die Spezifität der Inhibitoren weiter zu analysieren, wurden für die aktiven Verbindungen *Plasmodium*- sowie Human-spezifische IC_{50} -Werte anhand von Dose-Response-Kurven berechnet (Abb. 3.11). Hierbei konnte für den bereits beschriebenen *Pf*GSK3 β -Inhibitor KuBra389 (5v) ein IC_{50} -Wert von 0,26 μ M ermittelt werden. Die Verbindungen KuMas087 und KuMas223 zeigten IC_{50} -Werte, die sich in einem vergleichbaren Bereich (1,11 μ M bzw. 0,72 μ M) bewegten. Die Verbindung KuMas220 zeigte im Vergleich zu den übrigen Verbindungen eine geringere Aktivität gegenüber *rPf*GSK3 β (IC_{50} : 4,53 μ M). Alle drei KuMas-Verbindungen zeigten im Vergleich zum Kontroll-Inhibitor KuBra389 (5v) jedoch eine deutlich gesteigerte Spezifität für die plasmodiale Kinase. Hier konnte für die Kontrollverbindung KuBra389 (5v) ein Human-spezifischer IC_{50} -Wert von 9,3 μ M ermittelt werden. Entsprechende IC_{50} -Werte für die Verbindungen KuMas0087, KuMas223 und KuMas220 bewegten sich jedoch einem Bereich zwischen 40,2 μ M und bis zu 132,3 μ M (Abb.3.11). Somit konnten drei neue GSK3-Inhibitoren identifiziert werden, die gegenüber der plasmodialen Kinase eine vergleichbare Aktivität wie die Kontrollverbindung KuBra389 (5v) zeigten, jedoch eine deutlich gesteigerte *Plasmodium*-Spezifität aufwiesen.

Des Weiteren wurde anhand der Verbindung KuMas065 beispielhaft eine Stereoisomer-spezifische Inhibierung von *rPf*GSK3 β untersucht. Da der *ortho*-Chlor-Substituent in der Grundstruktur der KuMas-Verbindungen eine Rotation des Phenylrings verhindert, ergibt sich eine axiale Chiralität des Moleküls entlang der Biarylbindung. Die Verbindung KuMas065 entspricht dem racemischen Gemisch, wo hingegen KuMas168.1 und KuMas168.2 die entsprechenden Atropisomere dieser Verbindung bilden (Abb.3.12). Obwohl für diese Verbindungen keine Inhibierung von *rPf*GSK3 β bei einer Konzentration von 10 μ M detektiert werden konnte (Abb. 3.10), wurden dennoch *Plasmodium*- sowie Human-spezifische IC_{50} -Werte berechnet, um die vermutete Stereoisomer-spezifische Aktivität zu untersuchen.

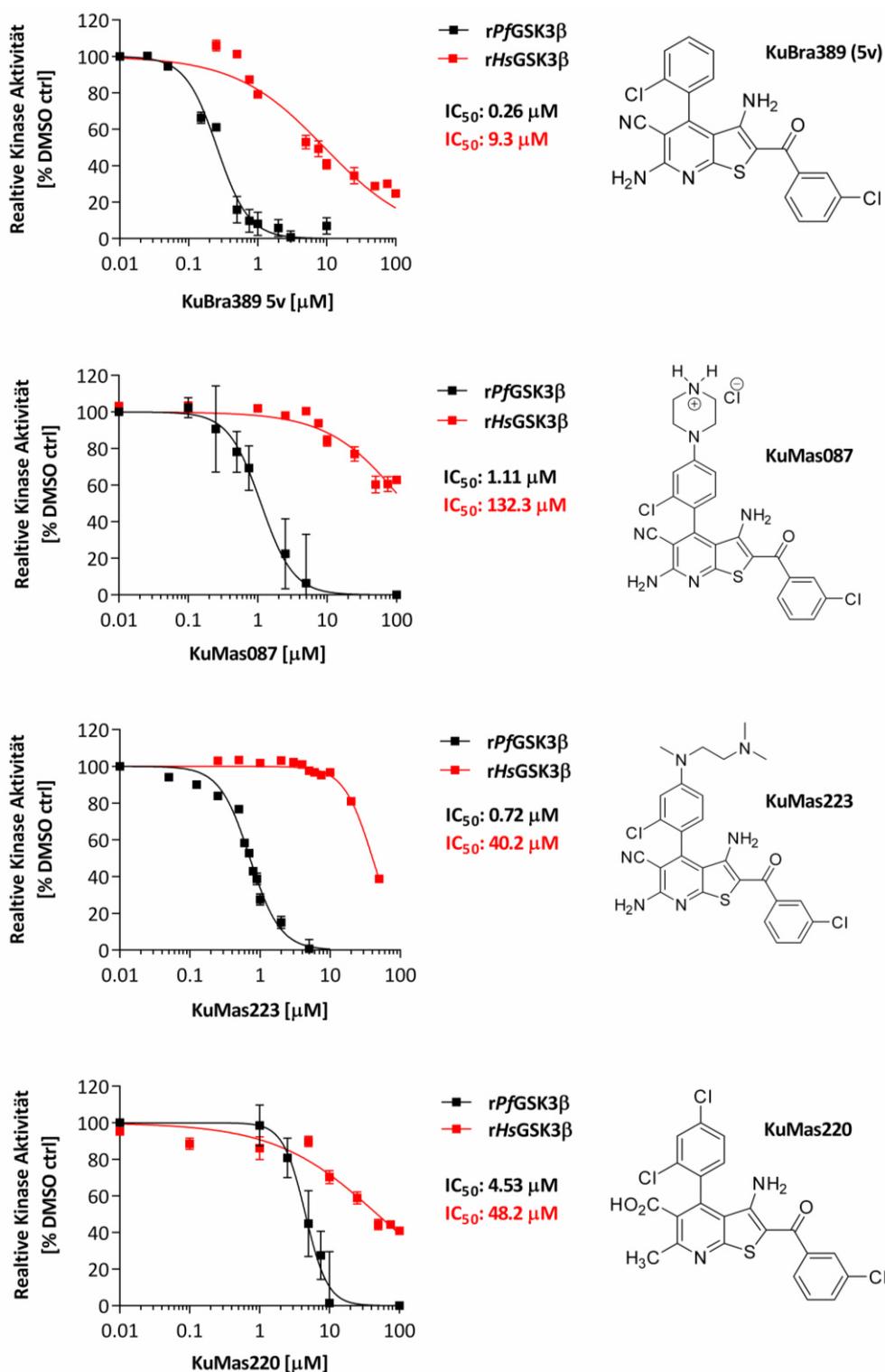


Abb.3.11: Analyse der Plasmodium-Spezifität von rGSK3β-Inhibitoren. Mittels KinaseGlo Plus wurden anhand von Dose-Response-Kurven spezifische IC₅₀-Werte für rPfGSK3β (schwarz) sowie rHsGSK3β (rot) berechnet. Neben den entsprechenden Graphen ist jeweils die Strukturformel der untersuchten Verbindung dargestellt. Alle Messungen wurden zu einer Negativkontrolle (Reaktion ohne Kinase) normalisiert und als % der DMSO-Kontrolle in Graphpad Prism geplottet. Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgte anschließend mittels non-linearer Regression. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung von drei Kinasereaktionen.

Im Test konnte gezeigt werden, dass die Verbindung KuMas168.1 bei höheren Konzentrationen (bis 100 μM) eine inhibitorische Aktivität gegenüber *rPfGSK3 β* aufweist. Es konnte ein IC_{50} -Wert von 45,8 μM ermittelt werden. Für die Verbindung KuMas168.2 konnte hingegen keine Aktivität gegenüber *rPfGSK3 β* detektiert werden ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). Beide Verbindungen zeigten keine Inhibierung der humanen *rGSK3 β* ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). Folglich konnte anhand dieser Verbindungen eine entsprechende Struktur-Aktivitäts-Beziehung bestätigt werden, wobei KuMas168.1 (R_a -Konfiguration) dem aktiven Eutomer entspricht, wo hingegen KuMas168.2 (S_a -Konfiguration) das inaktive Distomer darstellt (Abb.3.12).

Die ermittelten Inhibitionswerte sind in Tabelle 3.1 zusammenfasst.

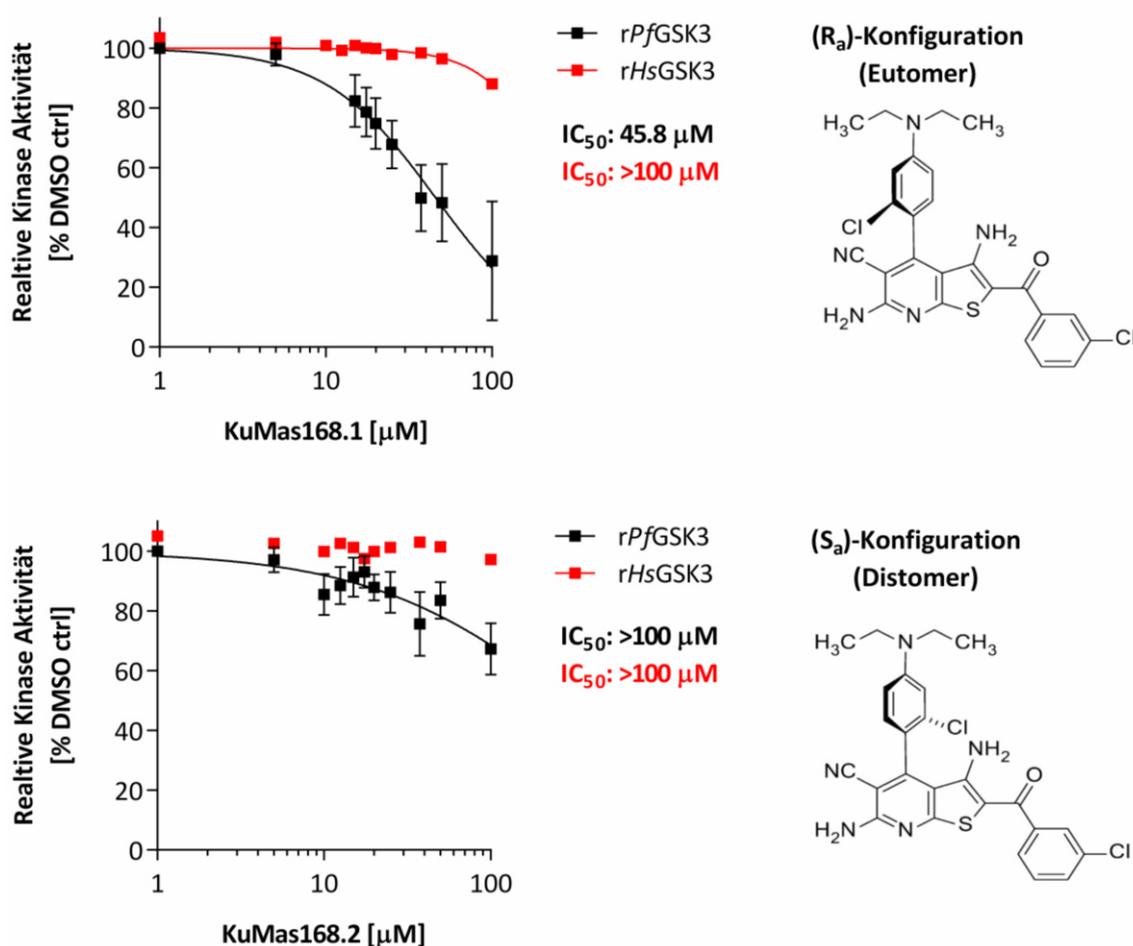


Abb.3.12: Stereoisomer-abhängige Aktivität der Verbindung KuMas065. Die Stereoisomer-spezifische Aktivität der Verbindungen KuMas168.1 und KuMas168.2 wurde mittels KinaseGlo Plus anhand von IC_{50} -Werten für *rPfGSK3 β* (schwarz) sowie *rHsGSK3 β* (rot) berechnet. Neben den Graphen sind jeweils die Strukturformel sowie die Konfiguration des Moleküls dargestellt. Alle Messungen wurden zu einer Negativkontrolle (Reaktion ohne Kinase) normalisiert und als % der DMSO-Kontrolle in Graphpad Prism geplottet. Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte anschließend mittels non-linearer Regression. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Kinasereaktionen.

3.2.2 Antiplasmodiale Aktivität *Pf*GSK3 β -inhibierender Verbindungen

Zur Untersuchung, ob die potentiellen *Pf*GSK3 β -Inhibitoren ebenso eine antiplasmodiale Aktivität aufweisen, wurden sämtliche Verbindungen bei einer Konzentration von 15 μ M in einem Proliferationsassay (Smilkstein et al., 2004) gegen *Plasmodium falciparum* 3D7 Wildtyp Parasiten getestet. Verbindungen, die bei dieser Konzentration eine Inhibierung der Parasiten-Proliferation von mindestens 80% aufwiesen, wurden als aktiv definiert. Im Test zeigten alle Verbindungen mit Ausnahme der Verbindungen KuMas168.2 sowie KuMas220 eine antiplasmodiale Aktivität (Abb. 3.13).

Zusätzlich wurden sämtliche Verbindungen bei gleichen Bedingungen gegen den multiresistenten *P. falciparum* Stamm 7G8 getestet. Um zu überprüfen, ob es sich bei diesem Stamm tatsächlich um multiresistenten Stamm handelt, wurde dieser beispielhaft gegen die Wirkstoffe Chloroquin (CQ) und Pyrimethamin (PYR) getestet. Gegen diese Verbindungen sollte der Stamm 7G8 eine Resistenz aufweisen. Eine Resistenz gegenüber Chloroquin sowie Pyrimethamin konnte im Test bestätigt werden (Abb.5.3, siehe Anhang). Zudem konnte die antiplasmodiale Aktivität aller in Abb.3.13 getesteten Verbindungen im Test gegen *Pf*7G8 reproduziert werden (Abb.5.2, siehe Anhang).

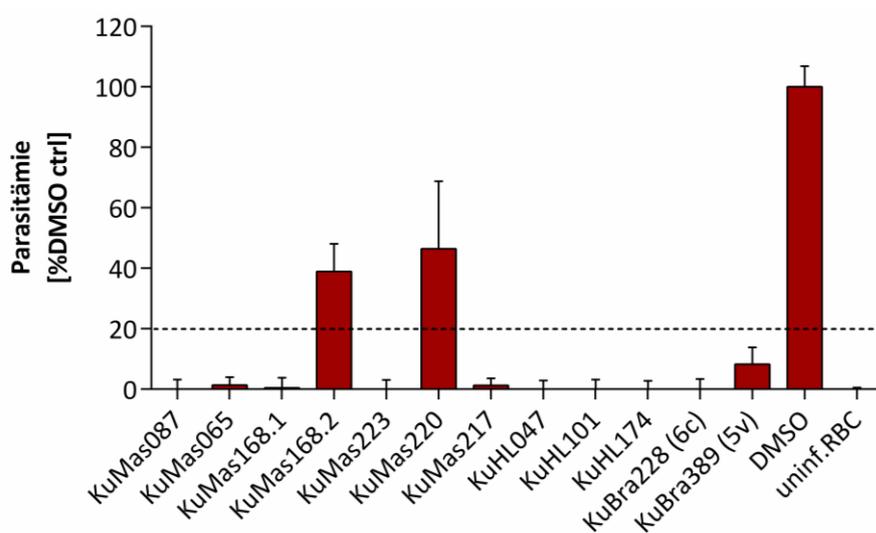


Abb.3.13: Antiplasmodiale Aktivität von KuBra-, KuMas- und KuHL-Verbindungen. Potentielle *Pf*GSK3 β -Inhibitoren wurden mittels Proliferationsassay gegen *Pf*3D7-Parasiten getestet. Eine synchrone Parasitenkultur wurde auf 0,1% Parasitämie eingestellt und für 96 h in Gegenwart von 15 μ M der zu testenden Verbindung inkubiert. Sämtliche Verbindungen wurden in DMSO gelöst. Als Negativkontrolle diente DMSO ohne Inhibitor. Die Parasitämie wurden anschließend mittels SYBR Gold-Färbung in einem EnVision Multilable Plate Reader (Perkin Elmer) quantifiziert. Sämtliche Messwerte wurden zu einer Kontrolle (uninfizierte Erythrozyten) normalisiert und als % der DMSO-Kontrolle dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von Triplikaten aus je zwei unabhängigen Experimenten. Verbindungen, die mind. 80% Inhibierung der Parasiten-Proliferation zeigten, wurden als aktiv eingestuft.

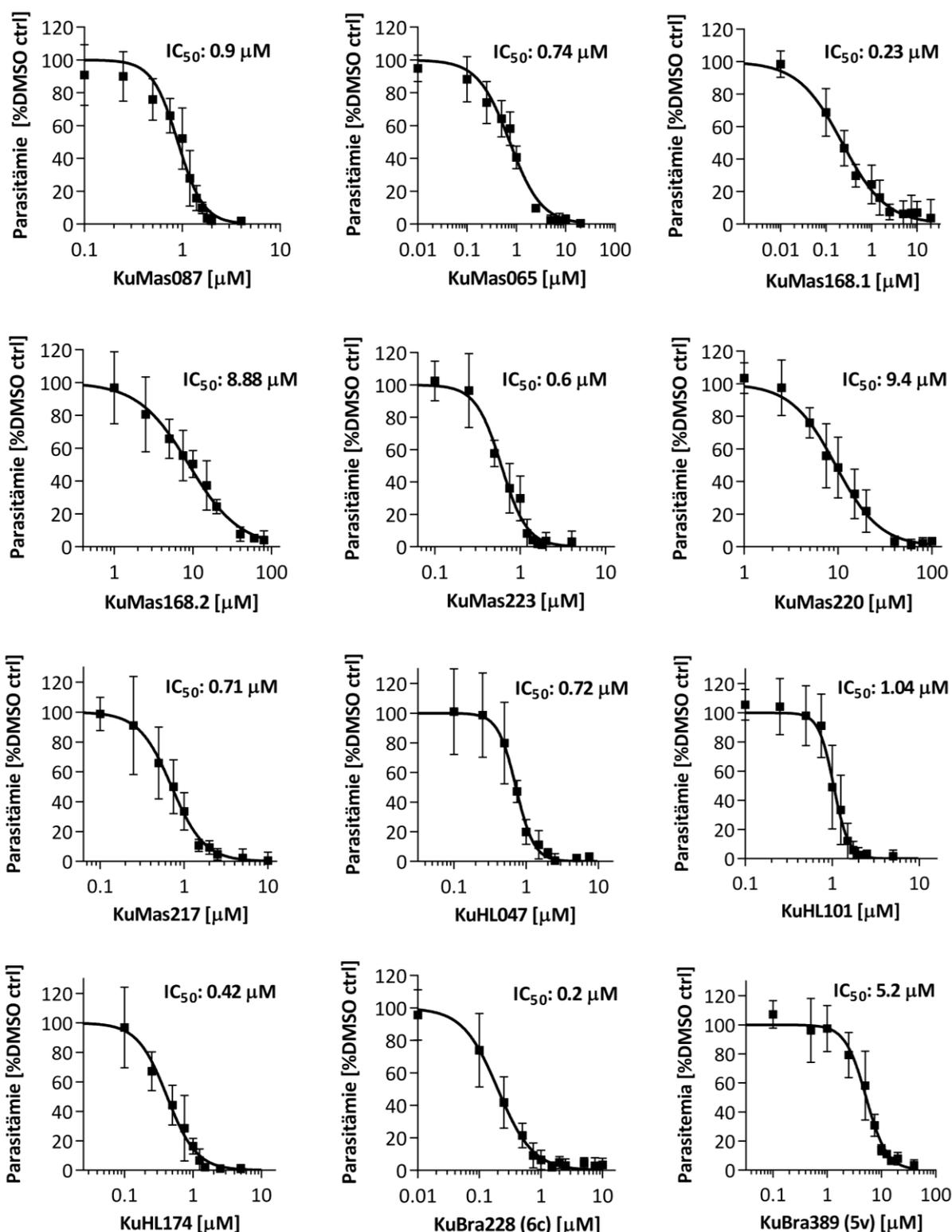


Abb.3.14: Ermittlung *Pf*3D7-spezifischer IC_{50} -Werte potentieller *Pf*GSK3 β -Inhibitoren. Verdünnungsreihen der zu testenden Verbindungen wurden in einem 96 h Proliferationsassay gegen *Pf*3D7 (0,1% Parasitämie) getestet. Die Parasitämie wurden mittels SYBR Gold-Färbung in einem EnVision Multilable Plate Reader (Perkin Elmer) quantifiziert. Sämtliche Messwerte wurden zu einer Kontrolle (μRBCs) normalisiert und als % der DMSO-Kontrolle in Graphpad Prism geplottet. Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte mittels non-linearer Regression. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von Duplikaten aus je drei unabhängigen Experimenten.

Anschließend wurden für alle Verbindungen im Proliferationsassay *P. falciparum* Parasiten-spezifische IC₅₀-Werte ermittelt (Abb.3.14). Insgesamt konnten IC₅₀-Werte ermittelt werden, die sich im unteren mikromolaren oder nanomolaren Bereich bewegten (0,2 µM bis 9,4 µM). Generell scheinen nahezu alle der getesteten Verbindungen eine antiplasmodiale Aktivität zu zeigen, die jedoch nicht bei allen Verbindungen durch eine Inhibierung von PfGSK3β vermittelt wird. Dies lässt darauf schließen, dass zumindest einige der getesteten Verbindungen noch weitere Zielstrukturen inhibieren. Für die rPfGSK3β-inhibierenden Verbindungen KuMas087 und KuMas223 konnten *in vitro* und *in vivo* vergleichbare IC₅₀-Werte ermittelt werden (vgl. Abb.3.11 und Abb.3.14 sowie Tab.3.1).

Der antiplasmodiale Effekt wurde im Folgenden für die drei rPfGSK3β-inhibierenden Verbindungen (KuMas087, KuMas223 und KuMas220) sowie den Kontroll-Inhibitor KuBra389 (5v) weiter charakterisiert.

Zunächst wurde untersucht, ob die Verbindungen eine Inhibierung der Parasiten in einem spezifischen Stadium während des asexuellen Replikationszyklus hervorrufen. Hierfür wurde eine synchrone Ringkultur von 3D7 Wildtyp Parasiten (ca. 3 hpi) mit den entsprechenden Verbindungen (IC₉₀) behandelt. Anschließend wurde alle acht Stunden im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle der Anteil enthaltener Parasitenstadien in der Kultur anhand von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen quantifiziert (Abb.3.15).

Hierbei konnte beobachtet werden, dass Parasiten, die mit den Verbindungen KuMas087 sowie KuMas223 behandelt wurden, bis 24 hpi eine leicht verlangsamte Entwicklung im Vergleich zu Kontrolle zeigten. Ab 32 hpi erschienen entsprechende Parasiten jedoch größtenteils pyknotisch. Dieser Effekt verstärkte sich zu späteren Zeitpunkten, sodass bei 48 hpi nahezu keine lebenden Parasiten mehr in der Kultur detektiert werden konnten (Abb.3.15). Demnach scheinen Parasiten, die bereits im Ringstadium mit der IC₉₀ der Verbindungen KuMas087 und KuMas223 behandelt wurden, einen starken Wachstumsdefekt im Trophozoiten-Stadium aufzuweisen.

Entgegen dieser Beobachtung zeigten Parasiten, die mit den Verbindungen KuBra389 (5v) oder KuMas220 behandelt wurden, zunächst eine ähnliche Entwicklung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Im Schizonten-Stadium (40 hpi) konnte jedoch ebenfalls eine leicht verzögerte Entwicklung im Vergleich zu Kontrollparasiten beobachtet werden. Bei 48 hpi konnte in den KuMas220- sowie KuBra389-behandelten Kulturen ein erhöhter Anteil an freien Merozoiten detektiert werden, welcher auf einen Defekt bei der Wirtszellinvasion hinweist.

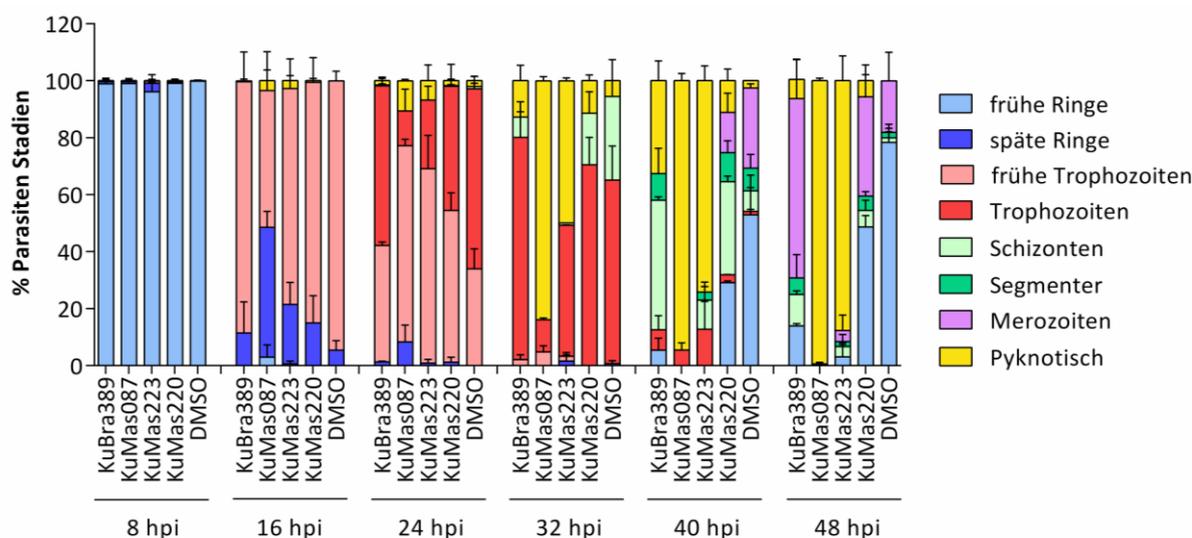


Abb.3.15: Stadien-spezifische Aktivität von *PfGSK3β*-Inhibitoren gegenüber *Pf3D7*-Parasiten. Synchrone *Pf3D7*-Wildtyp-Parasiten wurden 3 hpi mit der IC_{90} der Verbindungen KuBra389 (5v), KuMas087, KuMas223, KuMas220 oder DMSO ohne Verbindung behandelt und über einen Replikationszyklus hinweg kultiviert. Die Kulturen wurden alle 8 h anhand von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen untersucht und die enthaltenen Parasiten in entsprechende Stadien unterteilt (siehe Legende in der Abbildung). Der Anteil der verschiedenen Stadien wurde als % aller detektierten Parasiten des untersuchten Zeitpunktes dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten. Pro untersuchten Zeitpunkt wurden insgesamt mindestens 600 Parasiten quantifiziert.

Da die *PfGSK3β* im Zusammenhang mit der Phosphorylierung des essentiellen Invasionsliganden *PfAMA1* (1.2.4, siehe Einleitung) möglicherweise selbst eine essentielle Rolle bei der Wirtszellinvasion spielt, wäre zu erwarten, dass *PfGSK3β*-spezifische Inhibitoren ebenfalls zu einer Inhibierung der Wirtszellinvasion führen. Da der in Abbildung 3.15 dargestellte Assay keine Quantifizierung der Invasionsrate ermöglicht, da die Verbindungen bereits 3 hpi zugesetzt werden, wurde die Wirtszellinvasion in weiteren Experimenten untersucht. Hierfür wurden synchrone 3D7 Wildtyp-Parasiten erst im Schizonten Stadium (ca. 40 hpi, 1% Parasitämie) mit den zuvor identifizierten *PfGSK3β*-Inhibitoren bei einer Konzentration von 10 μ M inkubiert. Anschließend wurden nach weiteren 12 Stunden, die unter Normalbedingungen eine vollständige Reinvasion gewährleisten, die Schizonten und Ringstadien mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Dies ermöglicht die prozentuale Berechnung der Egress-Kapazität sowie der Wirtszellinvasion in Anwesenheit der verschiedenen Inhibitoren. Die Egress-Kapazität ergibt sich als Abnahme der Schizonten-Parasitämie im Vergleich zum Startpunkt (40 hpi), wobei die Rate der Wirtszellinvasion als Anzahl der detektierten Ringstadien pro rupturierten Schizonten berechnet wurde.

Abb. 3.16 zeigt beispielhaft die Wirtszellinvasion anhand von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen von KuBra389-behandelten sowie DMSO-behandelten-Kontrollparasiten. Wie in Abb.3.16A ersichtlich sind in der KuBra389-behandelten Kultur nach Reinvasion freie

Merozoiten zu erkennen, wo hingegen in der DMSO-Kontrolle nach Reinvasion Ringstadien zu detektieren waren. Dies lässt auf eine Inhibierung der Wirtszellinvasion schließen.

Wie in Abb.3.16B ersichtlich, führte eine Inkubation mit den Verbindungen KuBra389 (5v), KuMas087 und KuMas223 bei einer Konzentration von 10 μM zu einer Reduktion der Wirtszellinvasion um 30%, 96% bzw. 90%. Für die Verbindung KuMas223 konnte zusätzlich ein um 65% verminderter Egress der Parasiten beobachtet werden. Die Verbindung KuMas220 führte bei einer Konzentration von 10 μM weder zu einer verminderten Wirtszellinvasion noch zu einem Egress-Defekt.

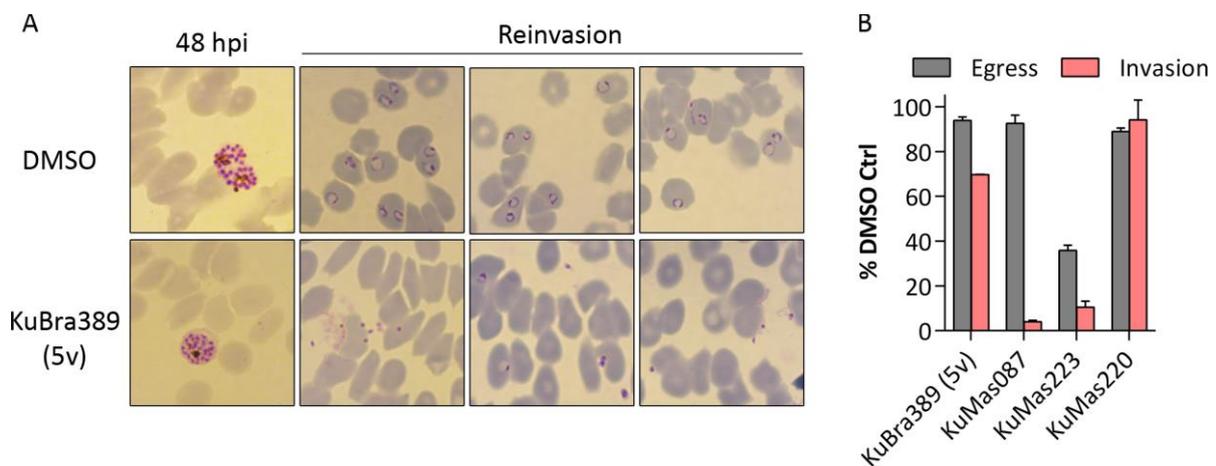


Abb.3.16: Inhibierung von Egress und Wirtszellinvasion durch PfGSK3 β -Inhibitoren. (A) Beispielhafte Darstellung der Inhibierung der Wirtszell-Invasion durch die Verbindung KuBra389 (5v) anhand von Giemsa-gefärbten Blutausstrichen. Synchron Parasiten (ca. 40 hpi) wurden mit 10 μM KuBra389 (5v) oder DMSO behandelt. 52 hpi konnte eine verminderte Ringparasitämie sowie eine erhöhte Zahl an freien Merozoiten in KuBra389-behandelten Parasiten im Vergleich zur DMSO-Kontrolle detektiert werden. (B) Inhibierung von Egress- und Invasion durch die Verbindungen KuBra389 (5v), KuMas087, KuMas223 und KuMas220 bei einer Konzentration von 10 μM . Synchron Parasiten (1% Parasitämie, ca. 40 hpi) wurden mit 10 μM der zu untersuchenden Verbindungen behandelt und die Schizonten-sowie Ringparasitämie 52 hpi mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Zur Quantifizierung des Egress wurde die Abnahme der Schizonten-Parasitämie im Vergleich zu Startparasitämie untersucht. Die Wirtszell-Invasion wurde als Anzahl der Ringstadien pro rupturierten Schizonten dargestellt. Sämtliche Werte wurden als % der DMSO-Kontrolle dargestellt. Für jede Verbindung wurden zwei Replikate gemessen.

Darüber hinaus wurden für alle oben untersuchten Verbindungen weitere Konzentrationen getestet, sodass anhand von Dose-Response-Kurven Egress- sowie Invasions-spezifische IC_{50} -Werte berechnet werden konnten. Hierbei konnte bestätigt werden, dass die Kontrollverbindung KuBra389 (5v) die Wirtszellinvasion der Parasiten inhibiert (IC_{50} : 16,1 μM), jedoch keine Auswirkungen auf den Egress der Parasiten hatte (IC_{50} > 100 μM). Ebenso zeigten die Verbindungen KuMas087 und KuMas223 eine Inhibierung der Wirtszellinvasion, jedoch bereits bei geringeren Konzentrationen (IC_{50} : 2,4 μM bzw. 3,2 μM). Zudem konnte für diese Verbindungen bei höheren Konzentrationen eine zusätzliche Inhibierung des Egress

beobachtet werden (IC_{50} : 16,2 μ M bzw. 5,2 μ M). Für die Verbindung KuMas220 konnte bei höheren Konzentrationen sowohl eine Inhibierung der Wirtszellinvasion (IC_{50} : 32,31 μ M) als auch ein Egress-Defekt (IC_{50} : 23,02 μ M) beobachtet werden.

Folglich bewirken alle *rPfGSK3 β* -inhibierenden Verbindungen eine Reduktion der Wirtszellinvasion bei Konzentrationen im unteren mikromolaren Bereich. Einige der Inhibitoren zeigen bei höheren Konzentrationen zudem eine Inhibierung des Egress.

Sämtliche Inhibitionswerte sind in Tab. 3.1 zusammengefasst. Die Dose-Response-Kurven, die zur Berechnung der Invasions- bzw. Egress-spezifischen IC_{50} -Werte dienten, sind in Abb.5.5 (siehe Anhang) dargestellt.

Abschließend wurden zudem sämtliche Verbindungen gegen HEK293T-Zellen getestet, um ihre Zytotoxizität gegenüber menschlichen Zellen zu untersuchen. Alle Verbindungen wurden bei einer Konzentration von 15 μ M sowie 50 μ M gegen HEK293T-Zellen getestet (Abb.3.17). Erneut wurden Verbindungen, die bei einer Konzentration von 15 μ M eine Inhibierung der Zellviabilität von mindestens 80 % zeigten, als aktiv definiert.

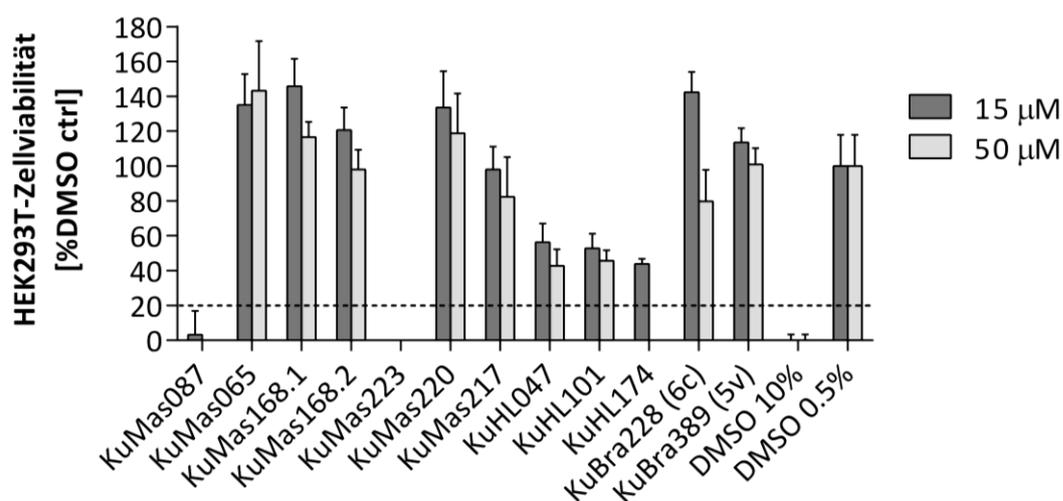


Abb.3.17: Zytotoxizität von KuBra-, KuMas- und KuHL-Verbindungen. Die Zytotoxizität potentieller *PfGSK3 β* -Inhibitoren wurde mithilfe eines Viabilitätsassays an HEK293T-Zellen getestet. HEK293T-Zellen wurden für 48h in Gegenwart von 15 μ M sowie 50 μ M der zu testenden Verbindung kultiviert. Sämtliche Verbindungen wurden in DMSO gelöst. Als Negativkontrolle diente DMSO ohne Verbindung, als Positivkontrolle wurden 10% DMSO eingesetzt. Die Viabilität der HEK-Zellen wurden anschließend mittels Presto Blue-Färbung in einem EnVision Multilable Plate Reader (Perkin Elmer) quantifiziert. Sämtliche Messwerte wurden zur 10% DMSO-Kontrolle normalisiert und als % der 0,5%-DMSO-Kontrolle dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von Duplikaten aus je zwei unabhängigen Experimenten. Verbindungen, die mind. 80% Inhibierung der Zellviabilität zeigten, wurden als aktiv eingestuft.

Im Test zeigten lediglich die Verbindungen KuMas087 sowie KuMas223 eine Inhibierung der HEK293T-Zellviabilität von mehr als 80 % (Abb.3.17). Zur Bestimmung von Selektivitätsindices im Vergleich zu *Pf3D7* wurden für die Verbindungen KuMas087 und KuMas223 HEK293T-

spezifische IC₅₀-Werte anhand von Dose-Response-Kurven berechnet. Anhand der ermittelten IC₅₀-Werte ergab sich für KuMas087 eine Selektivitätsindex von 6,22 sowie ein Selektivitätsindex von 19,8 für die Verbindung KuMas223 (Tab.3.1). Somit sind die Verbindungen mehr als 6-fach bzw. mehr als 20-fach aktiver gegenüber Plasmodien im Vergleich zu HEK-Zellen.

3.2.3 Zusammengefasste Inhibitionswerte

Sämtliche Inhibitionswerte, die anhand rekombinanter *PfGSK3β*, *Plasmodium falciparum* Parasiten sowie HEK293T-Zellen in den zuvor beschriebenen Untersuchungen ermittelt wurden, sind zusammenfassend in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tab.3.1 Zusammengefasste Inhibitionswerte potentieller *PfGSK3β*-Inhibitoren. Die Tabelle fasst sämtliche IC₅₀-Werte zusammen, die in den oben dargestellten Assays ermittelt wurden. Spezifische IC₅₀-Werte wurden im Kinase-Assay für *rPfGSK3* und *rHsGSK3* sowie in Zellkultur für *Pf3D7*-Parasiten und HEK293T-Zellen ermittelt. Im Test gegen *Pf3D7*-Parasiten wurden zudem Egress- und Invasion-spezifische Inhibitionswerte ermittelt. nt = nicht getestet.

	IC ₅₀ [μM]						
	<i>rPfGSK3</i>	<i>rHsGSK3</i>	<i>Pf3D7</i>	Invasion	Egress	HEK293T	SI*
KuMas087	1,11	132,3	0,9	2,4	16,2	5,6	6,22
KuMas065	>10	nt	0,74	nt	nt	>50	>67
KuMas168.1	45,8	>100	0,23	nt	nt	>50	>217
KuMas168.2	>100	>100	8,88	nt	nt	>50	>5,6
KuMas223	0,72	40,2	0,6	3,2	5,2	11,9	19,8
KuMas220	4,53	48,2	9,4	32,31	23,02	>50	>5,3
KuMas217	>10	nt	0,71	nt	nt	>50	>70
KuHL047	>10	nt	0,72	nt	nt	>50	>69
KuHL101	>10	nt	1,04	nt	nt	>50	>48
KuHL174	>10	nt	0,42	nt	nt	>15	>35
KuBra228 (6c)	>10	nt	0,2	nt	nt	>50	>250
KuBra389 (5v)	0,26	9,3	5,2	16,1	>100	>50	>9,6

*Selektivitätsindex [IC₅₀ HEK293T / IC₅₀ *Pf3D7*)

3.3 Charakterisierung von *PfGSK3β* in *P. falciparum*

3.3.1 Targeted Gene Disruption von *PfGSK3β*

Die physiologische Rolle von *PfGSK3β* bei der asexuellen Proliferation in Erythrozyten sollte auch mithilfe von revers-genetischen Ansätzen untersucht werden. Zunächst wurde ein funktioneller Knock-out durch *Targeted Gene Disruption* (TGD) mithilfe des SLI-Systems (*Selection Linked Integration*, Birnbaum et al., 2017) generiert (siehe Abb.3.18). Hierfür wurden *P. falciparum* Parasiten mit einem Plasmid (pSLI-TGD, Birnbaum et al., 2017) transfiziert, welches eine N-terminale Homologie-Region des Zielgens sowie die Gensequenzen des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) und einer Neomycin-Resistenz ohne Promotor enthielt. Über die klonierten 570 bp des 5'-Bereichs des *PfGSK3β*-Gens kann das gesamte Konstrukt über homologe Rekombination in das Genom des Parasiten integriert werden, welches zu einer Deletion des codierenden Bereiches der *PfGSK3β* führt. Parasiten, die das Konstrukt erfolgreich in den endogenen Locus integriert haben, exprimieren somit eine trunkierte Version des Zielgens (Homologie-Region) als Fusion mit GFP und eine Neomycin-Resistenz unter Kontrolle des endogenen Promotors und können mit Neomycin selektioniert werden (*Selection Linked Integration*). Ist es nicht möglich Parasiten mit Neomycin zu selektionieren, deutet dies darauf hin, dass das Genprodukt essentiell ist.

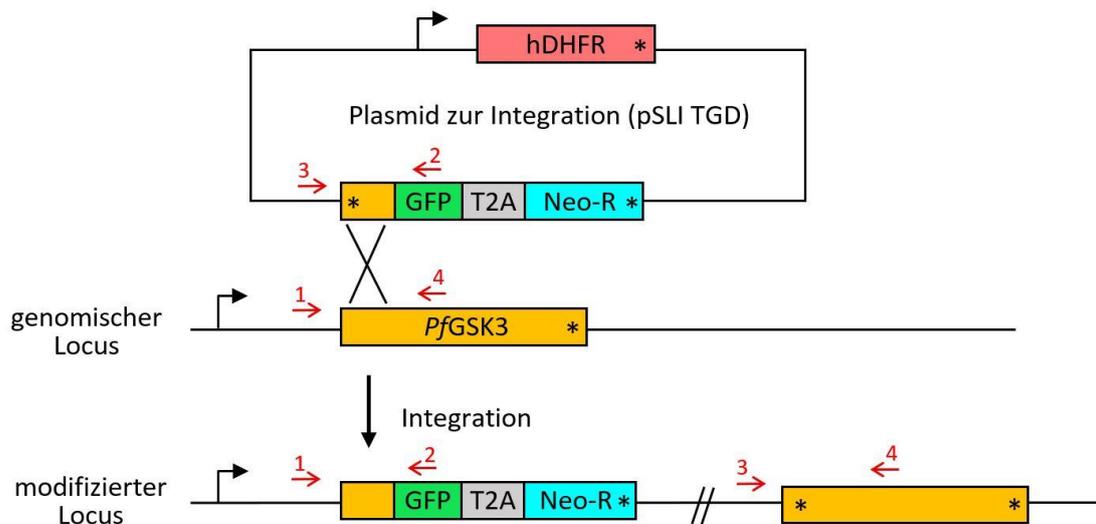


Abb.3.18: Targeted Gene Disruption Strategie mittels Selection Linked Integration. Die ersten 570bp von *pfgsk3β* (ohne Start-Codon) wurden als Homologie-Region in das Plasmid pSLI TGD kloniert. Nach N-terminaler Integration des Konstrukts in den endogenen Locus von *pfgsk3β* wird eine trunkierte Version des Zielgens als GFP-Fusion sowie eine Neomycin-Resistenz unter Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert. Durch das eingefügte Skip-Peptid (T2A) werden das trunkierte Zielgen und die Neomycin-Resistenz unabhängig voneinander exprimiert. *= Stopp-Codon; hDHFR= humane Dihydrofolatreduktase als Selektionsmarker des Episoms; rote Pfeile = Primer zur Überprüfung der korrekten genomischen Integration (vgl. Abb.3.19)

Um einen funktionellen Knock-out der *PfGSK3 β* zu generieren, wurden die ersten 570 bp des Gens als Homologie-Region gewählt. Da essentielle Bereiche wie die ATP-Bindetasche nicht in den ersten 570 bp des Gens codiert werden, sollte diese Trunkierung der *PfGSK3 β* zu einer Inaktivierung der Kinase führen.

Nach Transfektion mit dem SLI-TGD-Plasmid, wurden die Transfektanten auf sechs verschiedene Kulturgefäße verteilt, sodass in sechs technischen Wiederholungen Integranten mittels Neomycin selektioniert werden konnten. In drei der Neomycin-behandelten Kulturen konnten nach neun Wochen Parasiten detektiert werden. Mittels Integrations-PCR wurde anschließend überprüft, ob eine korrekte Integration des Konstrukts in das Genom der Parasiten erfolgt war. Hierfür wurden Primerpaare genutzt, die jeweils die N-terminale und C-terminale Integration des Konstrukts detektieren. Zudem wurde anhand eines weiteren Primerpaares eventuell verbliebener Wildtyp Locus detektiert. Die entsprechenden Bindestellen der Primer sind in Abb. 3.18 dargestellt. Anhand der Integrations-PCR konnte gezeigt werden, dass ein Knock-out in zwei der drei Kulturen (TGD#1 und TGD#2, Abb.3.19A) erfolgreich war. Zudem konnte kein Wildtyp-Locus in der Kultur detektiert werden. In der dritten Kultur (TGD#5) konnte keine korrekte Integration nachgewiesen werden (Abb.3.19A). Folglich war ein Knock-out in zwei der sechs Kulturen erfolgreich, woraus geschlossen werden kann, dass die *PfGSK3 β* nicht essentiell für das Überleben der Parasiten ist.

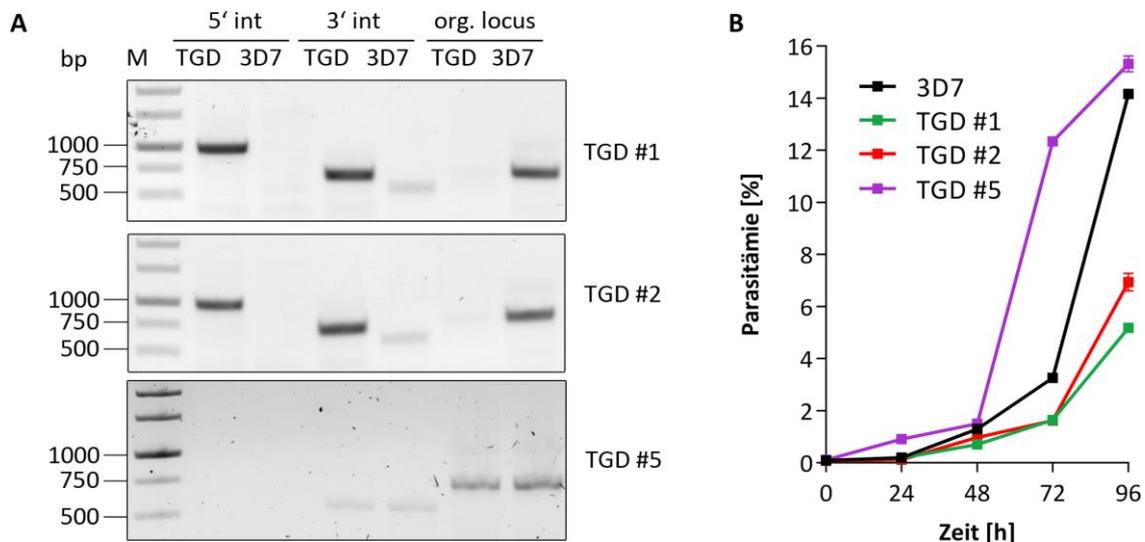


Abb.3.19: Wachstumsdefekt nach Targeted Gene Disruption von *pfgsk3 β* . (A) Integrations-PCR mit genomischer DNA der Kulturen *PfGSK3 β* TGD #1, TGD #2, TGD #5 sowie genomischer DNA von Wildtyp-Parasiten (3D7). Bindestellen der verwendeten Primer sind in Abb.3.18 schematisch dargestellt. Die Primer 1+2 flankieren die 5'-Bereich, Primerpaar 3+4 flankiert die 3'-Bereich. Durch Kombination der Primer 1+4 konnte eventuell verbliebener Wildtyp-Locus detektiert werden. Erwartete Größen der PCR-Produkte: 1+2: 969bp; 3+4: 713bp; 1+4: 743bp. (B) Das Wachstum der Kulturen #1, #2 #5 sowie von 3D7-Wildtyp-Parasiten wurde vergleichend über einen Zeitraum von 96 h untersucht. Hierfür wurde eine Startparasitämie von 0,1% in der Parasitenkultur eingestellt und die Parasitämie anschließend alle 24h mittels Durchflusszytometrie gemessen. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von Triplikaten aus einem initialen Experiment.

In einem Wachstumsassay wurde anschließend die Proliferation der drei Integranen (TGD #1, #2 und #5) im Vergleich zu 3D7 Wildtyp-Parasiten analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Parasiten, bei denen ein Knock-out von *PfGSK3β* erfolgreich war, ein um bis zu 73,5% reduziertes Wachstum im Vergleich zu 3D7 Wildtyp-Parasiten aufweisen. Parasiten, bei denen der Knock-out von *PfGSK3β* nicht erfolgreich war (TGD#5), zeigten hingegen ein vergleichbares Wachstum gegenüber der 3D7 Kontrolle (Abb.3.19B). Dies lässt darauf schließen, dass *PfGSK3β* zwar nicht unverzichtbar für ein Überleben der Parasiten ist, jedoch essentiell für eine effiziente Proliferation.

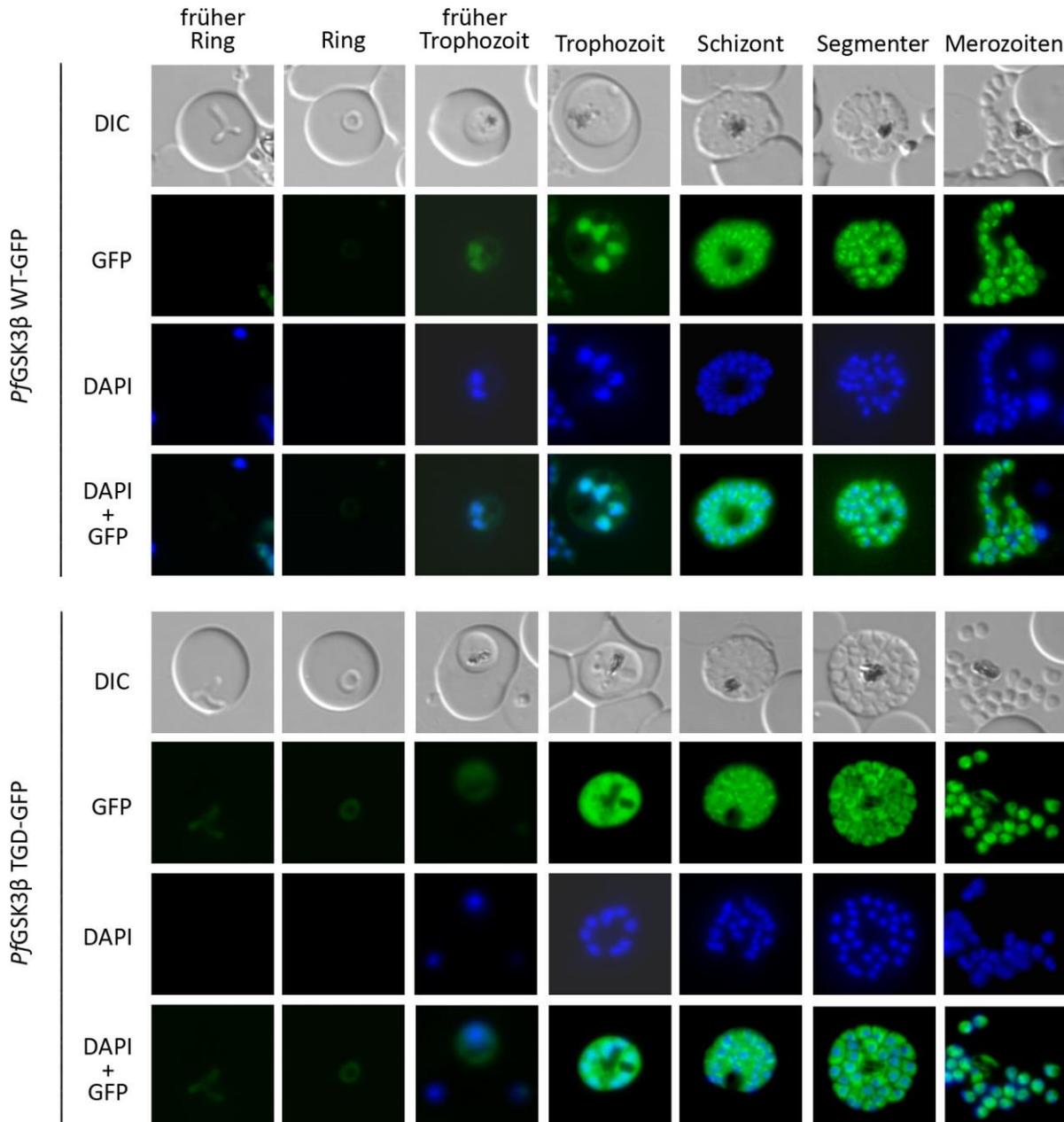


Abb.3.20: Lokalisation von *PfGSK3β*-TGD im Vergleich zu *PfGSK3β*-WT (Prinz et al., 2016) in *P. falciparum*. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung verschiedener Parasitenstadien zur Lokalisation von *PfGSK3β* WT-GFP (oben, vgl. Abb.3.29) im Vergleich *PfGSK3β* TGD-GFP. Zellkerne wurden durch Färbung mit DAPI dargestellt.

In weiteren Untersuchungen wurde die Integrante TGD#1 näher charakterisiert und wird im Folgenden als *PfGSK3 β -TGD* bezeichnet.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde zunächst Expression sowie die Lokalisation von *PfGSK3 β -TGD* im Vergleich zu Wildtyp-*PfGSK3 β* untersucht, die ebenfalls endogen mit GFP getaggt wurde (vgl. Abb.3.29). Hierbei konnte bestätigt werden, dass *PfGSK3 β* erwartungsgemäß hauptsächlich im Trophozoiten und Schizonten-Stadium exprimiert wird (Prinz et al., 2016, Abb.3.20). Für die Wildtyp *PfGSK3 β* konnte gezeigt werden, dass diese im Trophozoiten hauptsächlich im Zellkern des Parasiten lokalisiert ist. Im Schizonten weist die Kinase jedoch eine bereits beschriebene (Prinz et al., 2016) perinukleäre Lokalisation mit cytosolischem Anteil auf. In freien Merozoiten konnte eine überwiegend cytosolische Lokalisation beobachtet werden (Abb. 3.20). Die trunkierte *PfGSK3 β -TGD* wies dem gegenüber jedoch eine überwiegend cytosolische Lokalisation allen Stadien des Parasiten auf (Abb.3.20). Lediglich im Schizonten konnte eine leicht perinukleäre Lokalisation beobachtet werden.

Die Expression der trunkierten *PfGSK3 β -TGD* als GFP-Fusion zudem mittels Westernblot bestätigt (Abb.3.21A). Zudem wurde der Wachstumsassay für *PfGSK3 β -TGD* im Vergleich zu 3D7-Wildtyp-Parasiten mit synchronen Parasitenkulturen über einen Zeitraum von vier Replikationszyklen hinweg in fünf unabhängigen Experimenten wiederholt (Abb.3.21B).

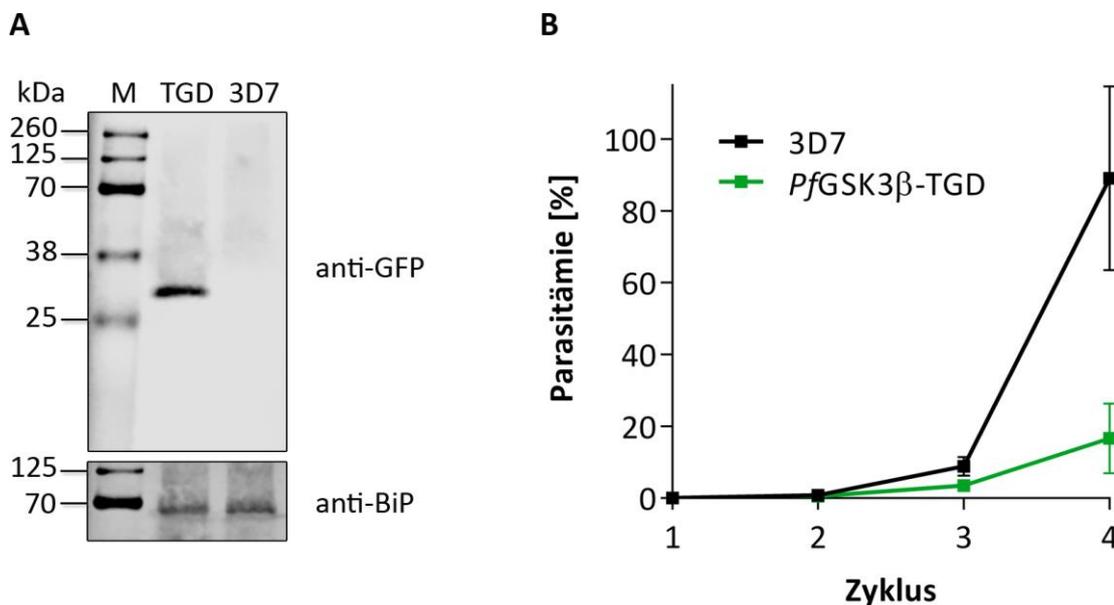


Abb.3.21: Expression der *PfGSK3 β -TGD-GFP-Fusion* und Wachstumsdefekt in *PfGSK3 β TGD #1*.

(A) Westernblot mit Lysaten aus *PfGSK3 β TGD #1* sowie 3D7-Wildtyp-Parasiten zur Detektion der trunkierten *PfGSK3 β* als GFP-Fusionsprotein (ca. 37kDa) mithilfe eines anti-GFP-Antikörpers. Als Ladekontrolle diente BiP (ca. 70kDa). M = Cameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder (LI-COR) **(B)** Wachstumskurve mit synchronen *PfGSK3 β TGD #1* sowie 3D7-Wildtyp-Parasiten über einen Zeitraum von vier Replikationszyklen (Startparasitämie 0,1%). Die Parasitämie wurde alle 48 h mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Kultur wurde im dritten Zyklus verdünnt und anschließend eine kumulative Parasitämie berechnet. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten.

Im Westernblot konnte die trunkierte *PfGSK3 β* mithilfe eines anti-GFP-Antikörpers bei der erwarteten Größe von ca. 37 kDa detektiert werden. In 3D7-Kontrollparasiten konnte kein GFP-Fusionsprotein nachgewiesen werden. BiP diente als Ladekontrolle und konnte in beiden Proben bei der erwarteten Größe von ca. 69 kDa detektiert werden (Abb.3.21A).

Im Wachstumsassay mit synchronen Parasiten konnte der Wachstumsdefekt von *PfGSK3 β -TGD* im Vergleich zu 3D7-Wildtyp-Parasiten reproduziert werden. Nach vier Replikationszyklen und der Berechnung einer kumulativen Parasitämie konnte ein Wachstumsdefekt von über 70% beobachtet werden (Abb.3.21B).

Zur weiteren Charakterisierung dieses Wachstumsdefekts wurden erneut synchrone *PfGSK3 β -TGD*-Parasiten im Vergleich zu einer 3D7-Kontrolle untersucht. Hierbei wurden die Parasiten-Stadien alle acht Stunden über einen parasitären Replikationszyklus hinweg anhand von Giemsa-gefärbten Blutausstrichen quantifiziert.

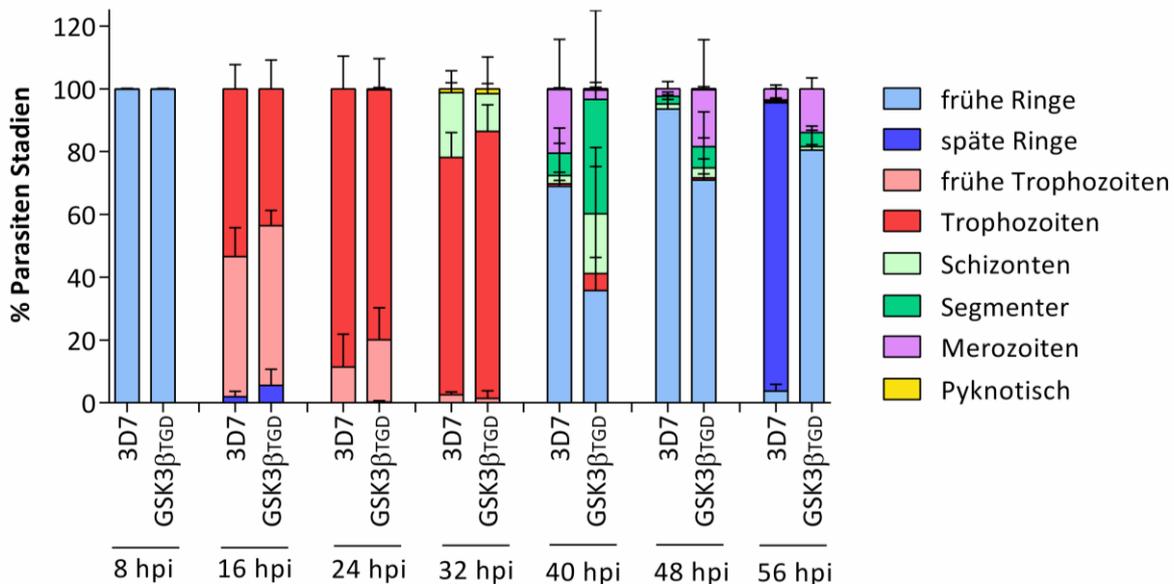


Abb.3.22: Stadien-spezifische Phänotypisierung von *PfGSK3 β -TGD*-Parasiten. Synchrone *PfGSK3 β -TGD* Parasiten sowie eine 3D7-Wildtyp-Kontrolle wurden über einen intraerythrozytären Replikationszyklus hinweg alle 8 h anhand von Giemsa-gefärbten Blutausstrichen untersucht und die enthaltenen Parasiten in entsprechende Stadien unterteilt (siehe Legende in der Abbildung). Der Anteil der verschiedenen Stadien wurde als % aller detektierten Parasiten des untersuchten Zeitpunktes dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Pro untersuchten Zeitpunkt wurden insgesamt mindestens 1000 infizierte Erythrozyten analysiert.

Anhand der Stadien-Quantifizierung konnte gezeigt werden, dass *PfGSK3 β -TGD*-Parasiten bis ca. 32 hpi eine vergleichbare Entwicklung zu 3D7-Kontrollparasiten zeigen. Im frühen Schizonten-Stadium (ca. 40 hpi) zeigen *PfGSK3 β -TGD* Parasiten jedoch ein leicht verzögertes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle. Zu diesem Zeitpunkt war bei Kontrollparasiten bereits eine Reinvansion mit entsprechenden Ringstadien zu beobachten. Knock-out Parasiten

befanden sich hingegen zum Großteil noch im Schizonten-Stadium. Im weiteren Verlauf des Lebenszyklus konnte diese Verzögerung weiterhin beobachtet werden. Somit konnten nach erfolgter Reinvansion bei ca. 56 hpi in der 3D7-Kontrolle bereits späte Ringstadien detektiert werden. In Knock-out Parasiten fanden sich hingegen zum Großteil frühe Ringstadien (Abb.3.22). Demnach scheinen *PfGSK3 β* -TGD-Parasiten in der Lage sämtliche Stadien des parasitären Lebenszyklus durchlaufen zu können, jedoch ist hierbei eine leichte zeitliche Verzögerung im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten.

Da die leichte Verzögerung während des Lebenszyklus jedoch nicht die verminderte Proliferation im Wachstumsassay erklärt, wurde der beobachtete Wachstumsdefekt in weiteren Experimenten charakterisiert. Wie bereits in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, wäre zu erwarten, dass *PfGSK3 β* im Zusammenhang mit der Phosphorylierung des essentiellen Invasionsliganden AMA1 (1.2.4, siehe Einleitung) möglicherweise selbst eine essentielle Rolle bei der Wirtszellinvasion spielt. Zudem konnte für die humane GSK3 β bereits eine Beteiligung an der Regulation des Zellzyklus beschrieben werden (Diehl et al., 1998; Ikeda et al., 1998; Yamamoto et al., 1999; Turenne & Price, 2001), weshalb ebenso ein Defekt bei der Kernteilung bzw. der Bildung von Tochtermerozoiten möglich wäre. Im Folgenden wurde daher die Bildung von Tochtermerozoiten, der Egress sowie die Wirtszellinvasion untersucht.

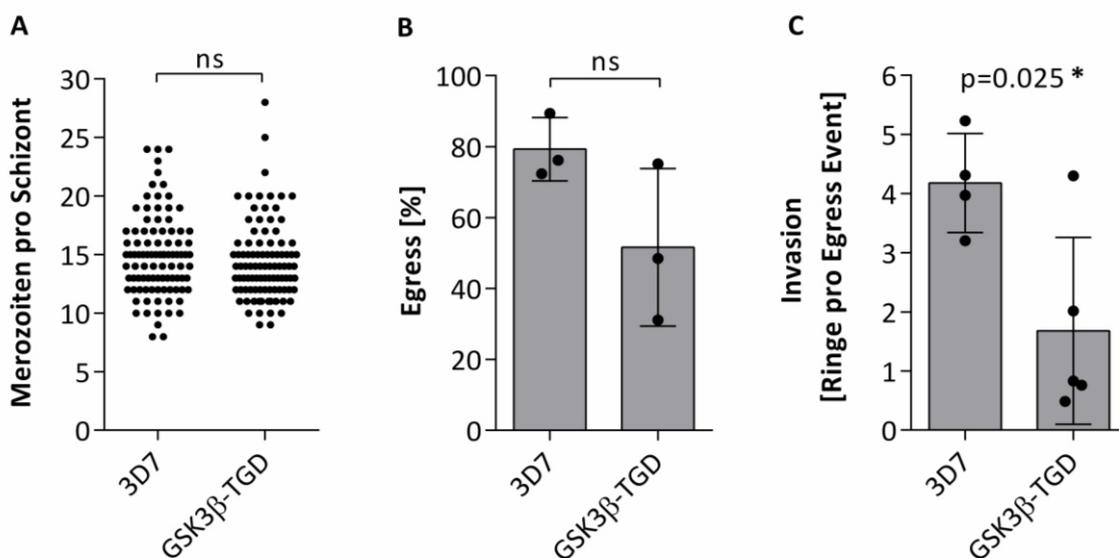


Abb.3.23: Charakterisierung des Wachstumsdefekts von *PfGSK3 β* -TGD. **(A)** Dot Plot mit Anzahl der Merozoiten pro Schizont in *PfGSK3 β* TGD #1 sowie 3D7-Wildtyp-Parasiten aus drei unabhängigen Experimenten (n = 96) **(B)** Egress und **(C)** Invasion von *PfGSK3 β* TGD #1 sowie 3D7-Wildtyp-Parasiten. Segmentierte Schizonten (1% Parasitämie) wurden für weitere 4 h kultiviert und anschließend Egress und Invasion anhand von Giemsa-gefärbten Blutausstrichen untersucht. Der Egress entspricht der Abnahme der Schizonten-Parasitämie im Vergleich zur Startparasitämie. Die Wirtszellinvasion wurde als Anzahl der Ringstadien pro rupturierten Schizonten dargestellt. Alle Werte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment wurden mindestens 5000 Zellen quantifiziert.

Die Bildung von Tochtermerozoiten wurde durch Zählen der Merozoiten in segmentierten Schizonten anhand von Giemsa-gefärbten Blutausstrichen untersucht. Die segmentierten Schizonten, die zur Quantifizierung herangezogen wurden, sind in Abb.5.8 und Abb.5.9 dargestellt (siehe Anhang). Wie in Abb.3.23A ersichtlich konnte kein Unterschied in der Anzahl der Merozoiten pro Schizont beim Vergleich von *PfGSK3β*-TGD und 3D7-Kontrolle detektiert werden. Bei Quantifizierung der Wirtszellinvasion konnte jedoch für Knock-out Parasiten eine signifikante Reduktion der Invasionsrate von ca. 60% im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden, wobei der leicht verminderte Egress in *PfGSK3β*-TGD nicht signifikant ist (Abb.3.23B+C).

Wie bereits beschrieben steht der beobachtete Invasionsdefekt vermutlich im Zusammenhang mit einer geminderten Funktionalität des Invasionsliganden AMA1 (siehe Einleitung und Prinz et al., 2016). AMA1 wird im Parasiten zunächst in die Mikronemen transportiert und anschließend während des Invasionsvorgangs auf die Oberfläche des Parasiten transloziert (Narum & Thomas, 1994; Triglia et al., 2000; Collins et al., 2013b). Um zu überprüfen, ob die fehlende Phosphorylierung von AMA1 für eine Mislokation des Invasionsliganden verantwortlich ist, wurde dessen Translokation in freien Merozoiten anhand von Immunfluoreszenzassays untersucht (Abb.3.24). Dieser Zusammenhang wurde schon durch Untersuchungen der Kinase CDPK5 gezeigt, bei der eine Rolle für die korrekten Lokalisation von AMA1 diskutiert wurde (Absalon et al., 2018).

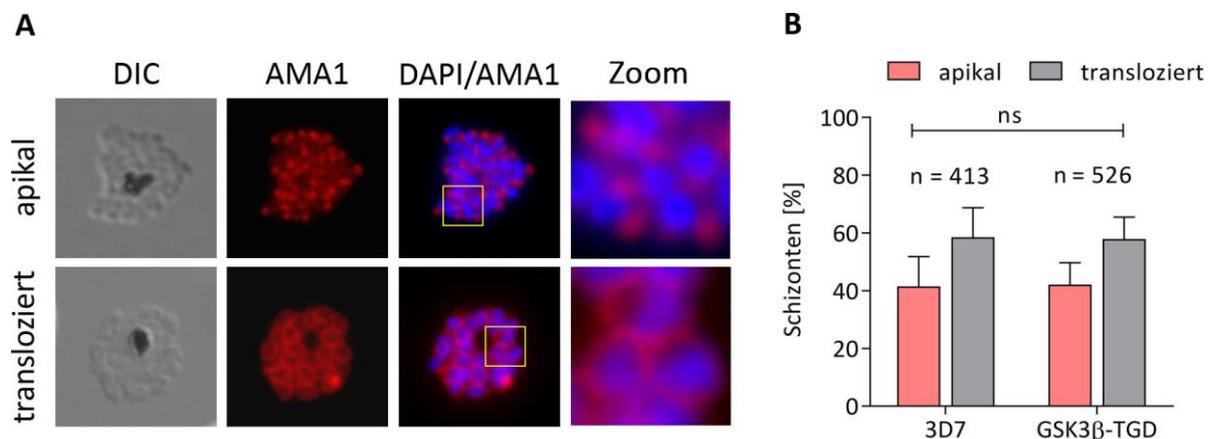


Abb.3.24: Translokation von *PfAMA1* in *PfGSK3β*-TGD-Parasiten. Die Lokalisation von *PfAMA1* wurde in E64-behandelten *PfGSK3β*-TGD Parasiten sowie einer 3D7 Wildtyp-Kontrolle 48 hpi anhand von Immunfluoreszenz mithilfe eines anti-AMA1-Antikörpers in Methanol-fixierten Parasiten detektiert (Zellkernfärbung mittels DAPI). Die gelben Rahmen markierten die Ausschnitte im Zoom **(A)** Beispielhafte Darstellung von apikalem und transloziertem *PfAMA1*. **(B)** Quantifizierung der Translokation von *PfAMA1*. Parasiten wurden in Zellen mit apikalem oder transloziertem AMA1 unterteilt und der entsprechende Anteil als % aller untersuchten Parasiten dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzanalyse mittels Anova in Graphpad Prism; ns = nicht signifikant; n = Anzahl insgesamt analysierter Parasiten.

Wie in Abb.3.24A beispielhaft dargestellt, konnten 48 hpi in E64-behandelten Parasiten sowohl Merozoiten mit apikal lokalisiertem als auch Parasiten mit translozierten *PfAMA1* detektiert werden. Nach Quantifizierung der Lokalisation konnte jedoch gezeigt werden, dass die Lokalisation von *PfAMA1* in *PfGSK3 β* -TGD-Parasiten sich nicht signifikant von der Lokalisation in 3D7-Wildtyp-Parasiten unterscheidet (Abb.3.24B).

Letztlich wurde untersucht, ob der Wachstumsdefekt in *PfGSK3 β* -TGD-Parasiten spezifisch auf das Fehlen einer funktionellen *PfGSK3 β* im Parasiten zurückzuführen ist. Hierfür wurden Knock-out Parasiten mit einer Wildtyp-Kopie von *pfgsk3 β* komplementiert, die episomal als Fusion mit mCherry unter Kontrolle eines *nmd3*-Promotors exprimiert wurde. Als Leerkontrolle wurden zudem Knock-out Parasiten mit einem entsprechenden Plasmid transfiziert, das mScarlet als Fusion mit einem Signalpeptid unter Kontrolle des *nmd3*-Promotors enthielt (Zur Verfügung gestellt von Dr. Paolo Mesen-Ramirez, BNITM). Anschließend wurde das Wachstum von Knock-out Parasiten sowie komplementierten Parasiten im Vergleich zur 3D7-Wildtyp-Kontrolle mithilfe eines Proliferationsassays untersucht.

Zunächst wurde die Lokalisation der episomal exprimierten Konstrukte mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Für die Wildtyp-Kopie von *pfgsk3 β* konnte die typische Kernlokalisierung in Trophozoiten sowie die perinukleäre Lokalisation in Schizonten beobachtet werden (Abb.3.25B). Für die Leerkontrolle konnte eine Lokalisation des mScarlets in der parasitophoren Vakuole (PV) beobachtet werden (Abb.3.25C). Dies entspricht der erwarteten Lokalisation, da das fusionierte Signalpeptid einen Export in die PV vermittelt. Entsprechend konnte in freien Merozoiten kein Signal mehr in Parasiten detektiert werden (Abb.3.25C).

Im Proliferationsassay konnte erneut gezeigt werden, dass *PfGSK3 β* -TGD-Parasiten im Vergleich zur 3D7-Wildtyp-Kontrolle eine signifikante Reduktion des Wachstums aufweisen (Abb.3.25D). Nach Transfektion mit der Wildtyp-Kopie der *PfGSK3 β* wiesen Knock-out Parasiten jedoch ein Wachstum auf, das 100% der 3D7-Kontrolle entspricht (Abb.3.25E). Nach Transfektion mit der Leerkontrolle konnte jedoch weiterhin ein signifikant reduziertes Wachstum im Vergleich zur 3D7-Kontrolle beobachtet werden (Abb.3.25F). Demnach kann eine Wildtyp-Kopie der *PfGSK3 β* den Wachstumsdefekt komplementieren, welches bestätigt, dass der Defekt in *PfGSK3 β* -TGD-Parasiten spezifisch auf das Fehlen einer funktionellen *PfGSK3 β* im Parasiten zurückzuführen ist.

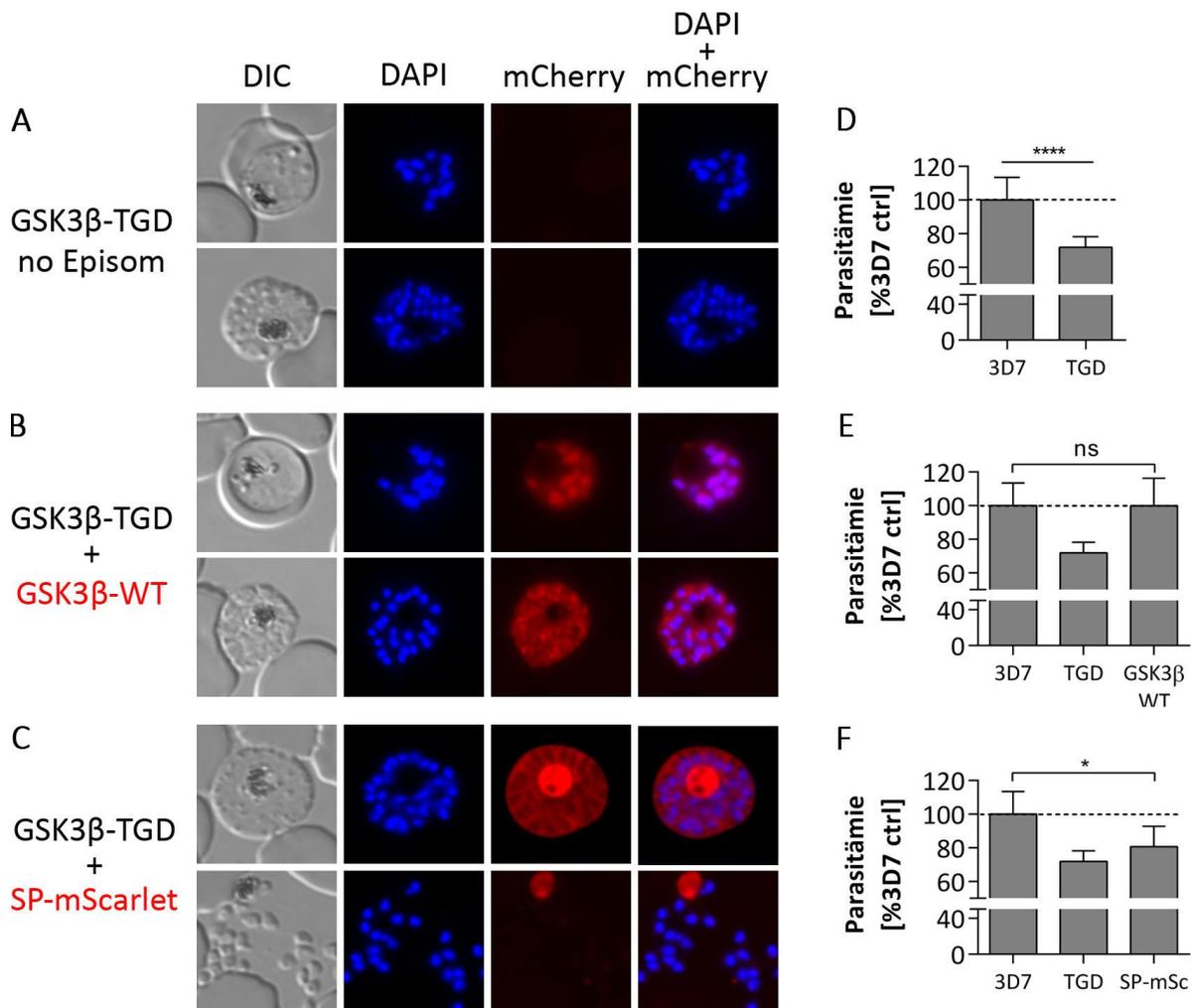


Abb.3.25: Komplementierung von *PfGSK3β*-TGD mit WT-*PfGSK3* mit episomal exprimierter Full Length *PfGSK3β* und als Fusion mit mCherry unter Kontrolle eines nmd3-Promotors. Als Leervektor-Kontrolle wurde mScarlet als Fusion mit einem Signal-Peptid (SP-mScarlet) transfiziert. **(A-C)** Fluoreszenzmikroskopie zur Lokalisation der episomal exprimierten Konstrukte in *PfGSK3β*-TGD-Parasiten. Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung dargestellt. **(D-F)** Proliferationsassay mit synchronen 3D7-Wildtyp-Parasiten, *PfGSK3β*-TGD #1 sowie den komplementierten Zelllinien (Startparasitämie 0,1%) über 96 h. Die Parasitämie wurden anschließend mittels SYBR-Gold Färbung in einem EnVision Multilable Plate Reader (Perkin Elmer) quantifiziert. Sämtliche Messwerte wurden zu einer Kontrolle (uninfizierte Erythrozyten) normalisiert und als % der 3D7-Kontrolle dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs technischen Replikaten aus je zwei unabhängigen Experimenten.

Die funktionelle Inaktivierung von *PfGSK3β* durch SLI-vermittelte Deletion hat eine 70%ige Verminderung des Wachstums (s.o.), jedoch keine vollständige Inhibition zur Folge. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine physiologische Kompensation des *PfGSK3β* Knock-outs, die während der Selektionierung von Integrianten stattgefunden hat. Dies könnte auf transkriptioneller Ebene erfolgt sein und zu einer gesteigerten Expression anderer Kinasen geführt haben. Eine naheliegende Möglichkeit wäre eine gesteigerte Expression der zweiten Isoform von *PfGSK3*, welche in Blutstadien gewöhnlich nicht exprimiert wird. Um dies zu

untersuchen, wurde die Genexpression beider Isoformen von *PfGSK3* mittels qPCR in *PfGSK3 β* -TGD sowie 3D7-Kontrollparasiten untersucht. Hierbei wurde die trunkierte Form von *pfgsk3 β* , die Full Length Form von *pfgsk3 β* sowie *pfgsk3 α* mithilfe von spezifischen Primerpaaren detektiert (Abb.3.26A). Wie zu erwarten konnten in *PfGSK3 β* -TGD-Parasiten nahezu keine Transkripte der Full Length Form von *pfgsk3 β* nachgewiesen werden. Diese konnten jedoch erwartungsgemäß in 3D7-Wildtyp-Parasiten detektiert werden. Für die zweite Isoform *PfGSK3 α* konnten hingegen sowohl in 3D7-Wildtyp-Parasiten als auch in *PfGSK3 β* -TGD-Parasiten nahezu keine Transkripte des Gens nachgewiesen werden (Abb.3.26B). Folglich kam es nach dem Knock-out von *PfGSK3 β* zu keiner gesteigerten Expression der zweiten Isoform der Kinase. Eine globale Transkriptomanalyse wurde nicht durchgeführt.

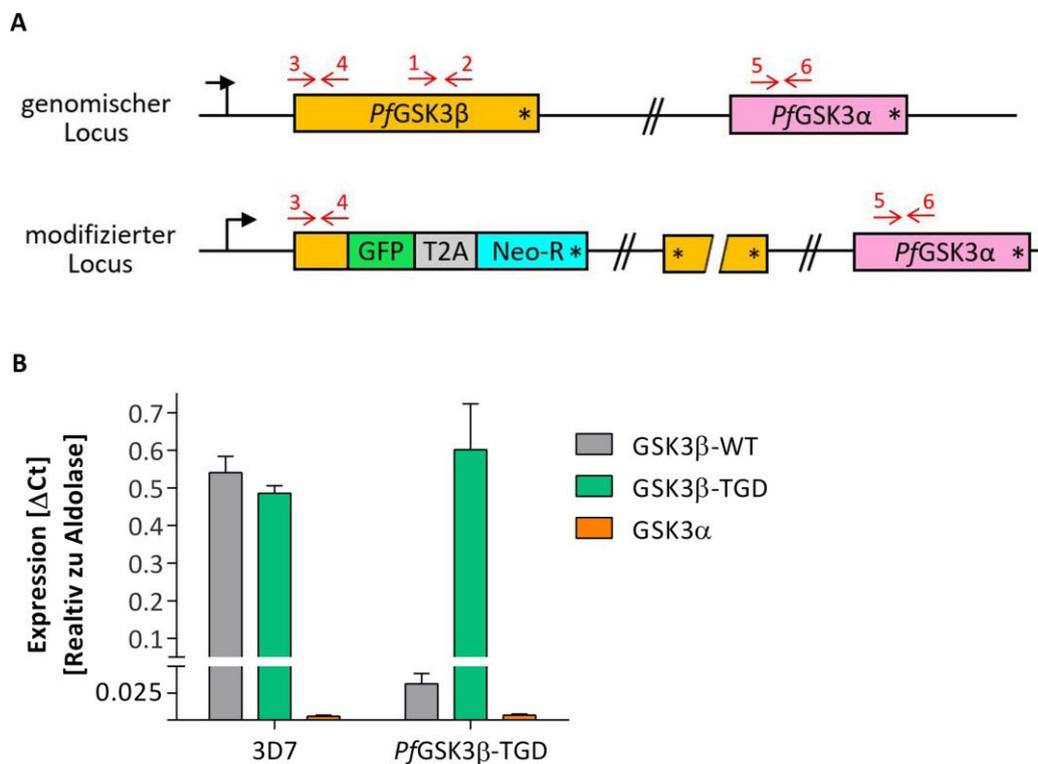


Abb.3.26: qPCR-Analyse der Genexpression beider *PfGSK3*-Isoformen in *PfGSK3 β* -TGD-Parasiten. (A) Schematische Darstellung der Wildtyp-Loci von *PfGSK3* α + β sowie dem modifizierten Locus nach Targeted Gene Disruption von *PfGSK3 β* . Rote Pfeile stellen Primer dar, die in der anschließenden qPCR verwendet wurden. (B) Expressionsanalyse von *PfGSK3 β* -WT (Primerpaar 1+2), *PfGSK3 β* -TGD (Primerpaar 3+4) und *PfGSK3 α* (Primerpaar 5+6) mittels qPCR. Aldolase diente als Kontrollgen. Dargestellt ist die Genexpression (Δ Ct) relativ zu Aldolase in 3D7-Wildtyp und *PfGSK3 β* -TGD-Parasiten.

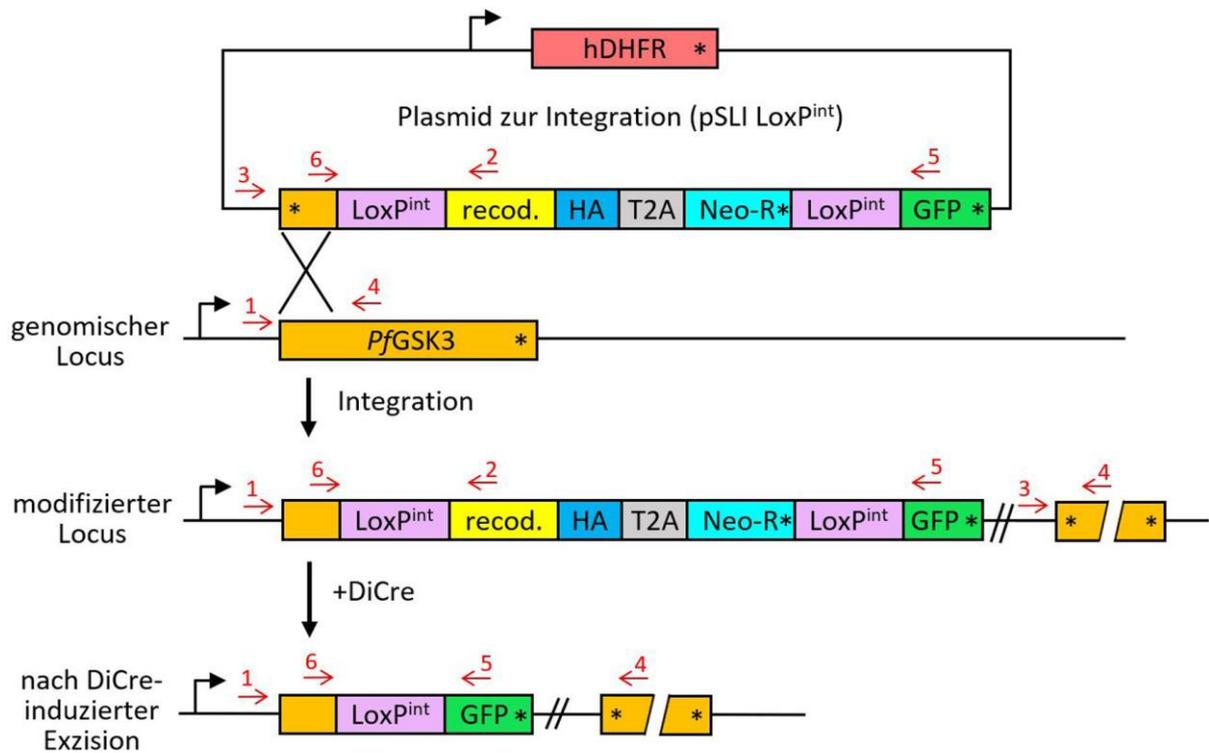
Die SLI-basierte Gendeletion beruht auf einem mehrwöchigen Selektionsprozess, der eine eventuelle Anpassung der Parasiten an den Knock-out der *PfGSK3 β* begünstigen könnte. Um eine mögliche Anpassung an den Knock-out zu umgehen, wurden zusätzlich verschiedene induzierbare Knock-down Systeme zur Charakterisierung verwendet werden.

3.3.2 Knock-down von *PfGSK3 β* durch DNA-Exzision mittels CreLoxP^{int}

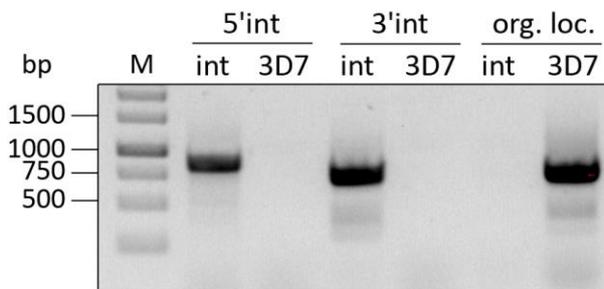
Zunächst wurde ein auf der Cre-Rekombinase basierendes, induzierbares Knock-down System verwendet, welches eine Exzision spezifischer Gensequenzen im Genom des Parasiten erlaubt (Collins et al., 2013a). Hierfür wurde zunächst mittels N-terminaler *Selection Linked Integration* ein recodonisierter C-Terminus von *pfgsk3 β* als Fusion mit einem HA-Tag, Skip-Peptid, einer Neomycin-Resistenz sowie GFP in den endogenen Locus integriert (Abb.3.27A). Der recodonisierte C-Terminus als Fusion mit HA-Tag, Skip-Peptid und Neomycin-Resistenz war zudem mit LoxP-Erkennungssequenzen flankiert, die sich jeweils in einem Intron befanden. Die Integration erfolgte mithilfe einer N-terminalen Homologie-Region, die bereits bei der *Targeted Gene Disruption* (Abb.3.18) verwendet wurde. Somit weisen Parasiten auch nach der Integration des Konstrukts eine vollständige Kopie von *pfgsk3 β* auf, die nun jedoch als Fusion mit einem HA-Tag vorliegt. Durch das enthaltene Skip-Peptid wird die integrierte Neomycin-Resistenz als separates Protein exprimiert. Das gesamte Konstrukt liegt zudem flankiert von LoxP-Introns vor. Da die Sequenz der Neomycin-Resistenz mit einem Stopp-Codon endet, kommt es zu diesem Zeitpunkt zu keiner Expression des darauffolgenden GFP (Abb.3.27, „modifizierter Locus“). Nach Selektion von Integranten mit Neomycin wurde die korrekte Integration des Konstrukts mittels PCR bestätigt. Zudem konnte kein verbliebener Wildtyp-Locus detektiert werden (Abb.3.27B). Die Expression von *PfGSK3 β* als Fusion mit HA wurde zudem mithilfe eines anti-HA-Antikörpers im Westernblot analysiert. Hierbei konnte das HA-Fusionsprotein mit einem erwarteten Molekulargewicht von ca. 57 kDa detektiert werden (Abb.3.27C).

Die Integrierte wurde anschließend mit einem Plasmid zur episomalen Expression einer dimerisierten Cre-Rekombinase (DiCre) transfiziert (Zur Verfügung gestellt von Dr. Moritz Treack, Francis Crick Institut; Jones et al., 2016). Der N-terminale Teil der Cre-Rekombinase lag hierbei als Fusion mit einer FRB-Domäne vor, wo hingegen der C-Terminus als Fusion mit einer FKBP-Domäne vorlag. Durch Zugabe von Rapalog, kann eine Dimerisierung von FRB und FKBP induziert werden, wodurch es folglich auch zur Dimerisierung der Fragmente der Cre-Rekombinase kommt. Die nun intakte Cre-Rekombinase kann anhand der LoxP-Erkennungssequenzen eine spezifische Exzision der flankierten Sequenz vermitteln. Folglich kann durch Zugabe von Rapalog ein Knock-down der LoxP-flankierten Gensequenz induziert werden. Nach der DiCre-vermittelten Exzision wird wie schon bei der *Targeted Gene Disruption* eine trunkierte Version der *PfGSK3 β* exprimiert, die nun als Fusion mit GFP vorliegt (Abb.3.27).

A



B



C

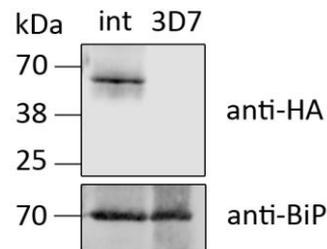


Abb.3.27: Endogenes Tagging von *PfGSK3β* für einen CreLoxP^{int}-vermittelten Knock-down. (A) Schematische Darstellung der Knock-down Strategie mittels CreLox. Über eine N-terminale Homologie-Region (orange) wurde ein recodonisierter C-Terminus (gelb) als 3xHA (blau)-Fusion sowie ein Skip-Peptid (grau) und eine Neomycin-Resistenz (hellblau) flankiert durch LoXP-Sequenzen (lila) in den endogenen Locus integriert. Nach DiCre vermittelter DNA-Exzision wird eine truncierte Version von *PfGSK3β* als Fusion mit GFP (grün) exprimiert. *= Stopp-Codon; hDHFR= humane Dihydrofolatreduktase als Selektionsmarker des Episoms; rote Pfeile = Primer zur Überprüfung der korrekten genomischen Integration. **(B)** Integrations-PCR mit genomischer DNA der Integrierte *PfGSK3β*-LoXP^{int} sowie genomischer DNA von Wildtyp-Parasiten (3D7). Die Primer 1+2 flankieren den 5' Bereich, Primerpaar 3+4 flankiert den 3' Bereich. Durch Kombination der Primer 1+4 konnte eventuell verbliebener Wildtyp-Locus detektiert werden. Erwartete Größen der PCR-Produkte: 1+2: 877 bp; 3+4: 740 bp; 1+4: 743 bp. **(C)** Westernblot mit Lysaten aus *PfGSK3β*-LoXP^{int} sowie 3D7-Wildtyp-Parasiten zur Detektion der 3xHA-markierten *PfGSK3β* (ca. 57 kDa) mithilfe eines anti-HA-Antikörpers. Als Ladekontrolle diente BiP (ca. 69 kDa). M = Cameleon[®] Duo Pre-stained Protein Ladder (LI-COR).

Zur Induktion des DiCre-vermittelten Knock-downs wurde stets eine synchrone Ringkultur mit Rapalog behandelt und im Vergleich zu unbehandelten Kontrollparasiten analysiert.

Zunächst wurde die DiCre-vermittelte Exzision des LoxP-flankierten C-terminus von *pfgsk3β* analysiert. Hierfür wurde genomische DNA aus Schizonten-Stadien isoliert nachdem diese im Ringstadium mit Rapalog behandelt wurden. Die DiCre vermittelte Exzision wurde anschließend mittels PCR im Vergleich zu unbehandelten Kontrollparasiten untersucht. Hierfür wurde ein Primerpaar gewählt, welches die gesamte LoxP-flankierte Sequenz detektiert (vor Exzision: 2625 bp bzw. nach Exzision: 480 bp). Wie in Abb.3.28A ersichtlich war in Rapalog-behandelten Parasiten eine vollständige Exzision der Zielsequenz detektierbar (Bande bei 480 bp). In Kontrollparasiten war weiterhin der unveränderte Locus detektierbar, jedoch konnte zum Teil bereits eine Exzision der Zielsequenz beobachtet werden (Bande bei 2625 bp sowie 480 bp).

Wie in Abb.3.27 beschrieben sollte nach der DiCre-vermittelten Exzision des C-Terminus eine trunkierte Form von *PfGSK3β* exprimiert werden, die als Fusion mit GFP vorliegt. Die Expression von GFP wurde fluoreszenzmikroskopisch in Rapalog-behandelten sowie Kontrollparasiten untersucht. Wie in Abb.3.28B beispielhaft dargestellt, konnte in Rapalog-behandelten Parasiten eine Expression von GFP beobachtet werden, wo hingegen in Kontrollparasiten keine GFP-Signale detektierbar waren. Zudem wurde die GFP-Expression nach Rapalog-Behandlung anhand von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen quantifiziert (Abb.3.28C). Hierbei konnte gezeigt werden, dass nach DiCre-vermittelter Exzision 95% der untersuchten Parasiten ein GFP-Signal aufwiesen. In der Kontrollkultur konnte hingegen in nur 1,6% der untersuchten Parasiten ein GFP-Signal detektiert werden (Abb.3.28C).

Des Weiteren wurde der Knock-down auf Proteinebene mittels Westernblot untersucht. Hierbei wurden erneut synchrone Ringstadien mit Rapalog behandelt und die Expression des *PfGSK3β*-HA-Fusionsproteins anschließend in Proteinextrakten von Schizonten-Stadien des gleichen Zyklus (48 hpi) sowie Schizonten des darauffolgenden Zyklus (96 hpi) untersucht. Wie in Abb.3.27D ersichtlich konnte 48 hpi sowie 96 hpi in Kontrollparasiten die *PfGSK3β* als Fusionsprotein mit HA bei der erwarteten Größe von ca. 57 kDa detektiert werden. Nach Rapalog-Behandlung konnte 48 hpi eine deutlich schwächere Expression des Zielproteins beobachtet werden. Zum Zeitpunkt von 96 hpi war *PfGSK3β*-HA im Westernblot nicht mehr detektierbar (Abb.3.28D, 96 hpi). Die Expression von *PfGSK3β*-HA wurde zusätzlich anhand des Westernblots relativ zur verwendeten Ladekontrolle GAPDH quantifiziert (Abb.3.28E). Hierbei konnte bestätigt werden, dass die Expression von *PfGSK3β*-HA zum Zeitpunkt von 48 hpi deutlich reduziert ist (14% der Kontrolle). Zum Zeitpunkt von 96 hpi betrug die Expression von *PfGSK3β*-HA nur noch 2,5% der Kontrolle (Abb.3.28E).

Letztlich wurde die Proliferation von Rapalog-behandelten Parasiten im Vergleich zu Kontrollparasiten über einen Zeitraum von vier Entwicklungszyklen im Wachstumsassay untersucht. Hierbei konnte jedoch keine signifikante Reduktion des Parasitenwachstums nach Exzision des C-Terminus von *PfGSK3β* beobachtet werden (Abb.3.28F).

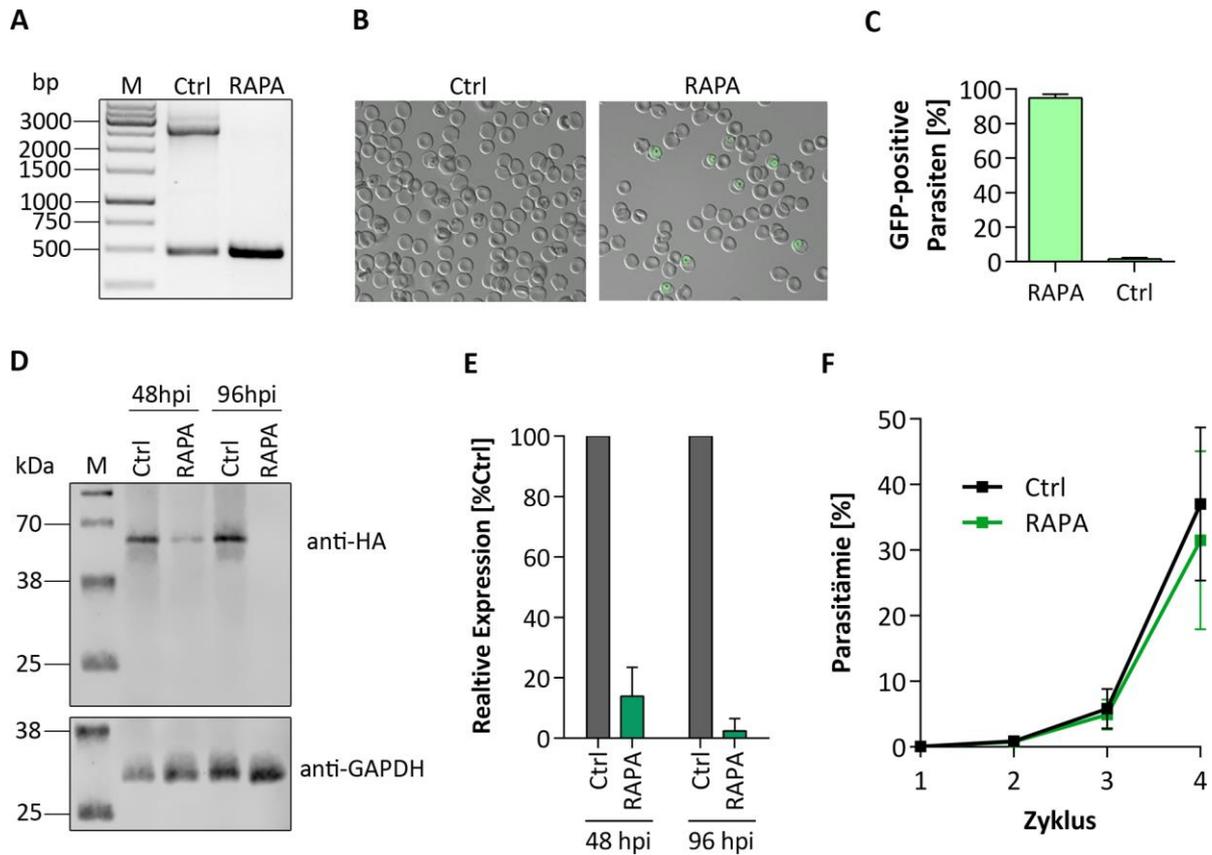


Abb.3.28: Phänotypisierung von *PfGSK3β*-LoxP^{int}-Parasiten nach DiCre-vermitteltem Knockdown. **(A)** PCR mit genomischer DNA von Rapalog-behandelten sowie Kontrollparasiten zur Überprüfung der DiCre-vermittelten DNA-Exzision mit Primerpaar 5+6 (vgl. Abb.3.27). Erwartete PCR-Produkte: nach Exzision: 480 bp, Kontrolle: 2625 bp. **(B)** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Darstellung von *PfGSK3β*-LoxP^{int} Parasiten zum Nachweis der GFP-Expression nach Rapalog-Behandlung. Parasiten wurden im Ringstadium behandelt und die GFP-Expression im Schizonten-Stadium (ca. 40 hpi) untersucht **(C)** Quantifizierung GFP-positiver Parasiten nach Rapalog-Behandlung aus drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. n_{RAPA} = 1056; n_{Ctrl} = 732. **(D)** Repräsentativer Westernblot mit anti-HA-Antikörper zum Nachweis des DiCre induzierten Knock-downs. Parasiten wurden im Ringstadium mit Rapalog behandelt und Lysate von Schizonten-Stadien (48 hpi) sowie Schizonten des folgenden Zyklus (96 hpi) hergestellt. Als Ladekontrolle diente GAPDH (ca. 37 kDa). M = Cameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder (LI-COR). **(E)** Quantifizierung der Intensität der *PfGSK3β*-HA (ca. 57 kDa) entsprechenden Bande mithilfe eines LI-COR Odyssey® Fc Imaging Systems. Die Intensität wurde zur Ladekontrolle normalisiert und als % der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Quantifizierung entspricht dem Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. **(F)** Wachstumskurve mit *PfGSK3β*-LoxP^{int} Parasiten \pm Rapalog (0,1% Startparasitämie) über einen Zeitraum von vier Replikationszyklen. Die Parasitämie wurde alle 48 h mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Kultur wurde im dritten Zyklus verdünnt und anschließend eine kumulative Parasitämie berechnet. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten.

3.3.3 Knock-down von *PfGSK3 β* durch mRNA-Destabilisierung mittels Ribozym

Als weitere Strategie wurde ein Knock-down System auf RNA-Ebene verwendet, wobei mithilfe eines Ribozyms (*glmS*) eine Destabilisierung der mRNA des Zielgens vermittelt werden kann (Prommana et al., 2013). Hierfür wurde *PfGSK3 β* zunächst C-terminal mittels Selection Linked Integration mit GFP, einem Skip-Peptid, einer Neomycin-Resistenz sowie dem *glmS* Ribozym getaggt. Nach Integration des Konstrukts in den endogenen Locus wird folglich *PfGSK3 β* als Fusion mit GFP exprimiert, wobei Integranten über die Neomycin-Resistenz selektioniert werden können. Zudem wird durch die Integration die mRNA des Gesamtkonstrukts mit der Sequenz des *glmS* Ribozyms versehen (Abb.3.29A). Das Ribozym kann durch die Zugabe von Glucosamin (Glc) aktiviert werden, woraufhin es zu einer Destabilisierung der mRNA und folglich zu einem Knock-down des Zielgens kommt.

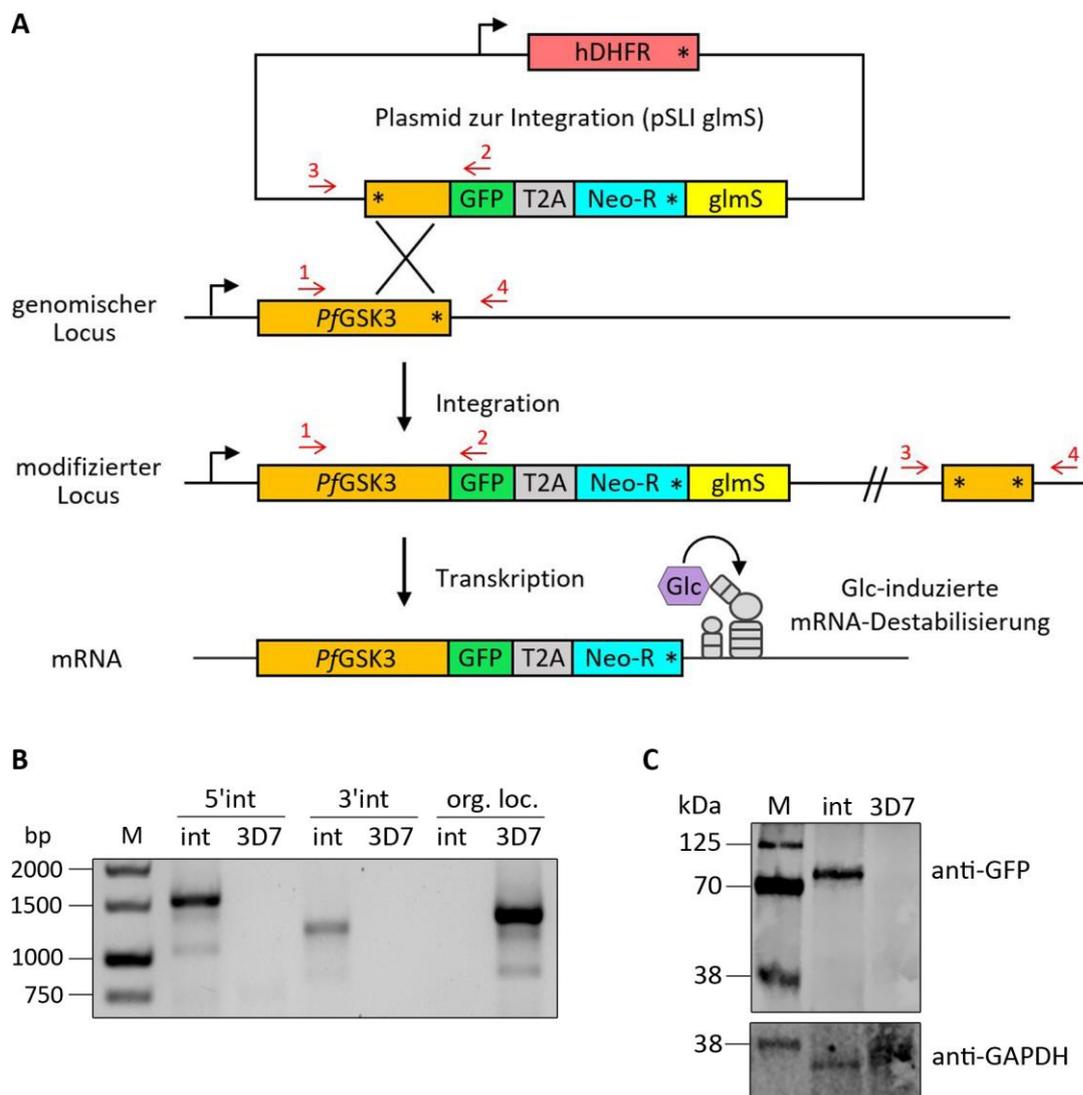


Abb.3.29: Endogenes Tagging von *pfgsk3 β* mit GFP und *glmS* Ribozym mittels Selection Linked Integration. (A) Eine C-terminale Homologie-Region (1013 Basenpaare ohne Stopp-Codon) wurden in das Plasmid pSLI *glmS* kloniert. Nach C-terminaler Integration des Konstrukts in den endogenen Locus von *pfgsk3 β* werden das Zielgen als Fusion mit GFP sowie eine Neomycin-Resistenz unter Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert. Durch die enthaltene *glmS*-Sequenz wird die

resultierenden mRNA mit dem glmS-Ribozym versehen. Mithilfe des eingefügten Skip-Peptids (T2A) werden das markierte Zielgen und die Neomycin-Resistenz unabhängig voneinander exprimiert. *= Stopp-Codon; hDHFR= humane Dihydrofolatreduktase als Selektionsmarker des Episoms; rote Pfeile= Primer zur Überprüfung der korrekten genomischen Integration. **(B)** Integrations-PCR mit genomischer DNA der Integrierte *PfGSK3β*-glmS sowie genomischer DNA von Wildtyp-Parasiten (3D7). Die Primer 1+2 flankieren den 5' Bereich, Primerpaar 3+4 flankiert den 3' Bereich. Durch Kombination der Primer 1+4 konnte eventuell verbliebener Wildtyp-Locus detektiert werden. Erwartete Größen der PCR-Produkte: 1+2: 1470 bp; 3+4: 1234 bp; 1+4: 1344 bp. M = GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) **(C)** Westernblot mit Lysaten aus *PfGSK3β*-glmS sowie 3D7-Wildtyp-Parasiten zur Detektion der markierten *PfGSK3β*-GFP (ca. 80 kDa) mithilfe eines anti-GFP-Antikörpers. Als Ladekontrolle diente GAPDH (ca. 37 kDa). M = Cameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder (LI-COR).

Nach Selektion von Integrierten mit Neomycin wurde die korrekte Integration des Konstrukts mittels PCR bestätigt. Zudem konnte kein verbliebener Wildtyp-Locus detektiert werden (Abb.3.29B). Die Expression von *PfGSK3β* als Fusion mit GFP wurde zudem mithilfe eines anti-GFP-Antikörpers im Westernblot analysiert. Hierbei konnte das GFP-Fusionsprotein mit einem erwarteten Molekulargewicht von ca. 80 kDa detektiert werden (Abb.3.29C).

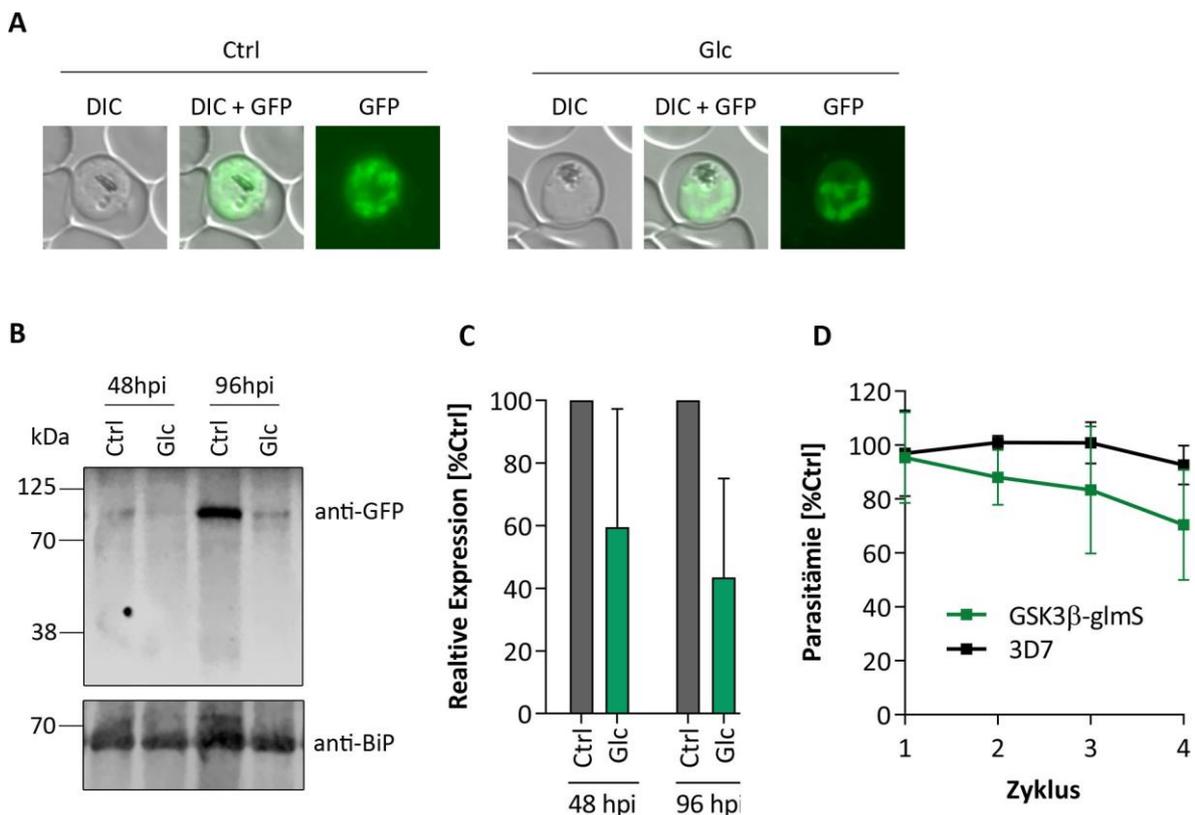


Abb.3.30: Phänotypisierung von *PfGSK3β*-glmS-Parasiten nach glmS-vermitteltem Knockdown. **(A)** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Glc-behandelten *PfGSK3β*-glmS Parasiten sowie unbehandelten Parasiten zur Analyse der GFP-Expression. Parasiten wurden im Ringstadium mit 2,5 mM Glc bzw. PBS (Ctrl) behandelt und die GFP-Expression im Schizonten-Stadium (ca. 40 hpi) untersucht **(B)** Repräsentativer Westernblot mit anti-GFP-Antikörper zum Nachweis des glmS induzierten Knock-downs. Parasiten wurden im Ringstadium mit 2,5 mM Glc behandelt und Lysate von Schizonten-Stadien des gleichen Zyklus (48 hpi) sowie Schizonten des

folgenden Zyklus (96 hpi) hergestellt. Als Ladekontrolle diente BiP (ca. 69 kDa). M = Cameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder (LI-COR). **(C)** Quantifizierung der Intensität der *PfGSK3β*-GFP (ca. 80 kDa) entsprechenden Bande mithilfe eines LI-COR Odyssey® Fc Imaging Systems. Die Intensität wurde zur Ladekontrolle normalisiert und als % der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Quantifizierung entspricht dem Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. **(D)** Wachstumskurve mit *PfGSK3β*-glmS sowie 3D7-Kontrollparasiten \pm Glc (0,1% Startparasitämie) über einen Zeitraum von vier Replikationszyklen. Die Parasitämie wurde alle 48 h mittels Durchflusszytometrie gemessen und als % der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Kultur wurde im dritten Zyklus verdünnt und anschließend eine kumulative Parasitämie berechnet. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten.

Wie in Abb.3.29 beschrieben sollte es nach der glmS-vermittelten Destabilisierung der mRNA folglich zu einem Knock-down von *PfGSK3β*-GFP kommen. Die Expression von *PfGSK3β*-GFP wurde fluoreszenzmikroskopisch in Glc-behandelten sowie PBS-behandelten Kontrollparasiten untersucht. Wie in Abb.3.30A beispielhaft dargestellt konnte sowohl in PBS-behandelten Kontrollparasiten als auch in Glc-behandelten Parasiten eine Expression *PfGSK3β*-GFP beobachtet werden. Folglich scheint es zu keinem erfolgreichen bzw. nur teilweise zu einem Knock-down des Zielgens gekommen zu sein.

Des Weiteren wurde der Knock-down auf Proteinebene mittels Westernblot untersucht. Hierbei wurden erneut synchrone Ringstadien mit Glc bzw. PBS behandelt und die Expression des *PfGSK3β*-GFP-Fusionsproteins anschließend in Proteinextrakten von Schizonten-Stadien des gleichen Zyklus (48 hpi) sowie Schizonten des darauffolgenden Zyklus (96 hpi) untersucht. Wie in Abb.3.30B ersichtlich konnte in Kontrollparasiten 48 hpi sowie 96 hpi *PfGSK3β* als GFP-Fusionsprotein mit dem erwarteten Molekulargewicht von ca.80 kDa detektiert werden. In Glc-behandelten Parasiten hingegen konnte zu beiden Zeitpunkten eine Reduktion der Expression von *PfGSK3β*-GFP detektiert werden.

Die Expression von *PfGSK3β*-GFP wurde zusätzlich anhand des Westernblots relativ zur verwendeten Ladekontrolle BiP quantifiziert (Abb.3.30C). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Expression von *PfGSK3β*-GFP zum Zeitpunkt von 48 hpi im Vergleich zur Kontrolle lediglich um ca. 40% reduziert war (59% der Kontrolle). Zum Zeitpunkt von 96 hpi betrug die Expression von *PfGSK3β*-GFP weiterhin 44% der Kontrolle (Abb.3.30C). Folglich konnte mit der beschriebenen Strategie nur teilweise ein Knock-down von *PfGSK3β*-GFP erreicht werden.

Letztlich wurde die Proliferation von Glc- bzw. PBS-behandelten *PfGSK3β*-glmS-Parasiten im Vergleich zu Glc- bzw. PBS-behandelten 3D7-Kontrollparasiten im Wachstumsassay untersucht. In 3D7-Wildtyp-Parasiten führte eine Behandlung mit Glc zu keiner Reduktion des Parasitenwachstums. In *PfGSK3β*-glmS-Parasiten führte eine Behandlung mit Glc zu einer Reduktion des Parasitenwachstums um maximal 30% im Vergleich zur PBS-behandelten Kontrolle (Abb.3.30D).

3.3.4 Knock sideways von *PfGSK3 β*

Ein weiteres System zur funktionellen Analyse von Proteinen stellt die Knock Sideways Strategie dar (Geda et al., 2008; Haruki et al., 2008; Patury et al., 2009; Robinson et al., 2010; Xu et al., 2010; Papanikou et al., 2015; Birnbaum et al., 2017). Diese erfolgt auf Proteinebene und ermöglicht eine induzierbare Relokalisierung der Zielproteins. Hierfür wurde *PfGSK3 β* zunächst C-terminal mittels *Selection Linked Integration* mit 2xFKBP-GFP-2xFKBP, einem Skip-Peptid, sowie einer Neomycin-Resistenz getaggt. Nach Integration des Konstrukts in den endogenen Locus wird folglich *PfGSK3 β* als Fusion mit zwei FKBP-Domänen, GFP sowie zwei weiteren FKBP-Domänen exprimiert, wobei Integrierten über die Neomycin-Resistenz selektioniert werden können (Abb.3.31A).

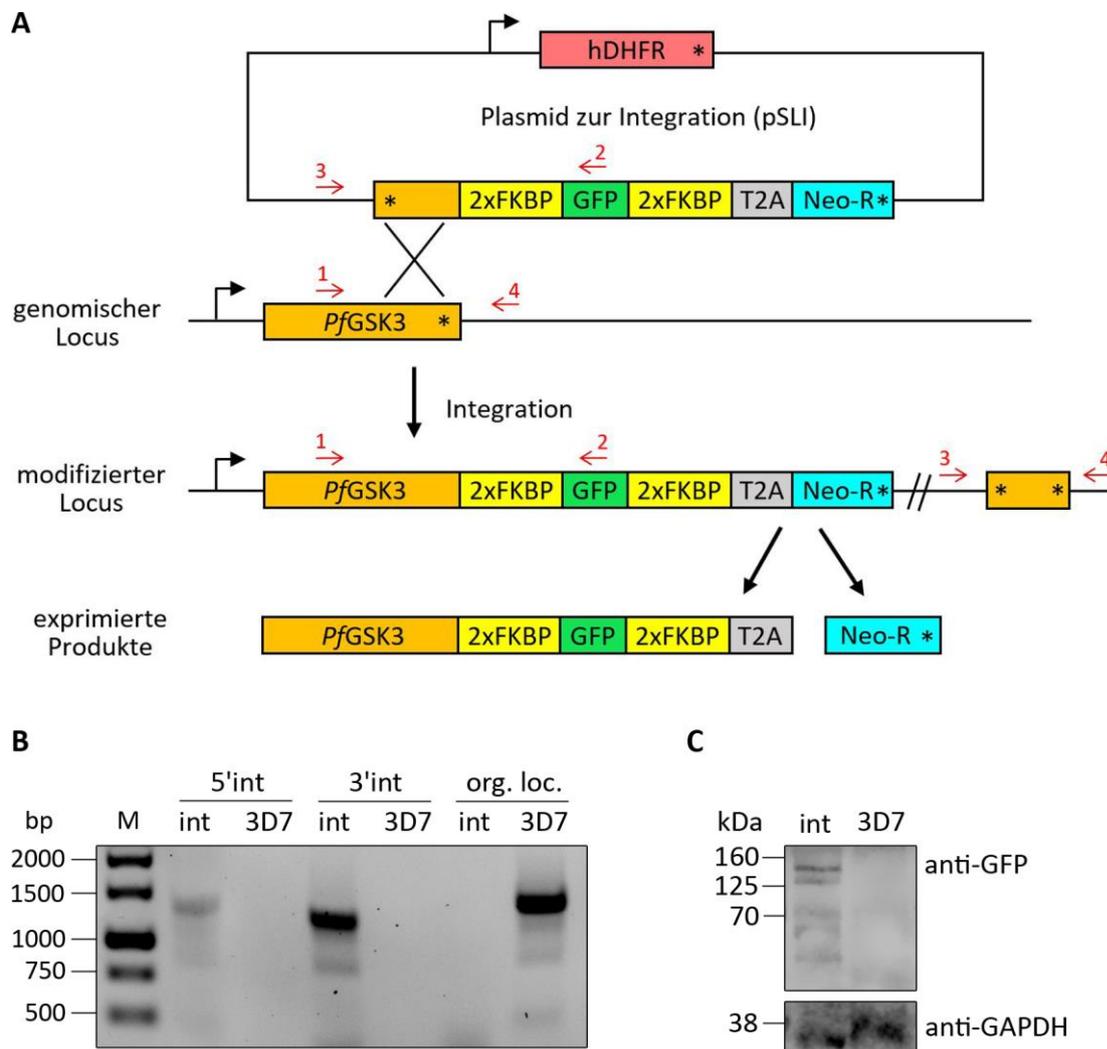


Abb.3.31: Endogenes Tagging von *pfgsk β* mit 2xFKBP-GFP-2xFKBP mittels *Selection Linked Integration*. (A) Eine C-terminale Homologie-Region (1013 Basenpaare ohne Stopp-Codon) wurden in das Plasmid pSLI kloniert. Nach C-terminaler Integration des Konstrukts in den endogenen Locus von *pfgsk3 β* werden das Zielgen als Fusion mit 2xFKBP-GFP-2xFKBP sowie eine Neomycin-Resistenz unter Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert. Durch das eingefügte Skip-Peptid (T2A) werden das markierte Zielgen und die Neomycin-Resistenz unabhängig voneinander exprimiert. *= Stopp-Codon; hDHFR= humane Dihydrofolatreduktase als Selektionsmarker des Episoms; rote Pfeile= Primer zur Überprüfung der korrekten genomischen Integration. (B) Integrations-PCR mit

genomischer DNA der Integrierte *PfGSK3 β -2xFKBP-GFP-2xFKBP* sowie genomischer DNA von Wildtyp-Parasiten (3D7). Die Primer 1+2 flankieren den 5' Bereich, Primerpaar 3+4 flankiert den 3' Bereich. Durch Kombination der Primer 1+4 konnte eventuell verbliebener Wildtyp-Locus detektiert werden. Erwartete Größen der PCR-Produkte: 1+2: 1332 bp; 3+4: 1234 bp; 1+4: 1344 bp. M = GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) (C) Westernblot mit Lysaten aus *PfGSK3 β -2xFKBP-GFP-2xFKBP* sowie 3D7-Wildtyp-Parasiten zur Detektion der markierten *PfGSK3 β* (ca. 135 kDa) mithilfe eines anti-GFP-Antikörpers. Als Ladekontrolle diente GAPDH (ca. 70kDa). M = Cameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder (LI-COR)

Nach Selektion von Integrierten mit Neomycin wurde die korrekte Integration des Konstrukts mittels PCR bestätigt. Zudem konnte kein verbliebener Wildtyp-Locus detektiert werden (Abb.3.31B). Die Expression von *PfGSK3 β* als Fusion mit 2xFKBP-GFP-2xFKBP wurde zudem mithilfe eines anti-GFP-Antikörpers im Westernblot analysiert. Hierbei konnte das 2xFKBP-GFP-2xFKBP-Fusionsprotein mit einem erwarteten Molekulargewicht von ca. 135 kDa detektiert werden (Abb.3.31C).

Die Integrierte wurde anschließend mit einem sogenannten Mislokalisierung-Plasmid transfiziert (Birnbauer et al., 2017). Hierfür wurden zwei verschiedene Konstrukte gewählt. Zum einen wurde ein Mislokalisierung-Plasmid gewählt, das die episomale Expression einer FRB-Domäne als Fusion mit mCherry sowie einem Kernlokalisierungssignal (NLS-FRB-mCherry) unter Kontrolle eines *nmd3*-Promotors ermöglicht. Zum anderen wurde der gleiche Mislokalisierung, jedoch mit einem Lokalisierungssignal für die parasitäre Plasmamembran (Lyn-FRB-mCherry) transfiziert. Durch Zugabe des Liganden Rapalog kann eine Dimerisierung der FKBP-Domäne der endogenen *PfGSK3 β* mit der FRB-Domäne des Mislokalisierungers induziert werden. Bedingt durch die Lokalisierungssignale (NLS oder Lyn) kann durch die Dimerisierung des getaggten Zielproteins mit dem Mislokalisierung eine Relokalisierung in den Zellkern oder an die Plasmamembran des Parasiten erzielt werden. Folglich kann das Zielprotein durch die Zugabe von Rapalog vom ursprünglichen Wirkort in der Zelle entfernt und in ein anderes Zellkompartiment verlagert werden.

Bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung konnte für beide Mislokalisierung-transfizierten Integrierten eine GSK3-typische Lokalisierung von *PfGSK3 β -2xFKBP-GFP-2xFKBP* beobachtet werden. Die Mislokalisierung-Konstrukte konnten erwartungsgemäß an der parasitären Plasmamembran (Lyn) bzw. im Zellkern (NLS) detektiert werden (Abb.3.32A). Zudem wurde das Vorhandensein eines Mislokalisierungers anhand des mCherry Signals quantifiziert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass 97% der Lyn-FRB-mCherry-transfizierten Integrierten ein Mislokalisierung-Signal aufweisen. Für NLS-FRB-mCherry konnten 79% aller untersuchten Parasiten als Mislokalisierung-positiv detektiert werden (Abb.3.32A, Säulendiagramme). Nach Zugabe von Rapalog konnte für beide Mislokalisierung eine Relokalisierung von *PfGSK3 β -2xFKBP-GFP-2xFKBP* beobachtet werden. Entsprechend konnte eine Co-Lokalisierung des GFP-Signals mit dem mCherry-Signal des Mislokalisierungers beobachtet werden. Somit konnte die Lokalisierung von *PfGSK3 β* mittels *Knock Sideways* erfolgreich modifiziert werden und mehrheitlich in den Zellkern bzw. an die Plasmamembran des Parasiten verlagert werden (Abb.3.32A).

Zudem wurde die Proliferation von Rapalog-behandelten *PfGSK3* β -2xFKBP-GFP-2xFKBP-Parasiten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollparasiten im Wachstumsassay untersucht. Jedoch konnte für beide Mislocalizer nach Zugabe von Rapalog keine Reduktion des Parasitenwachstums im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden (Abb.3.32B).

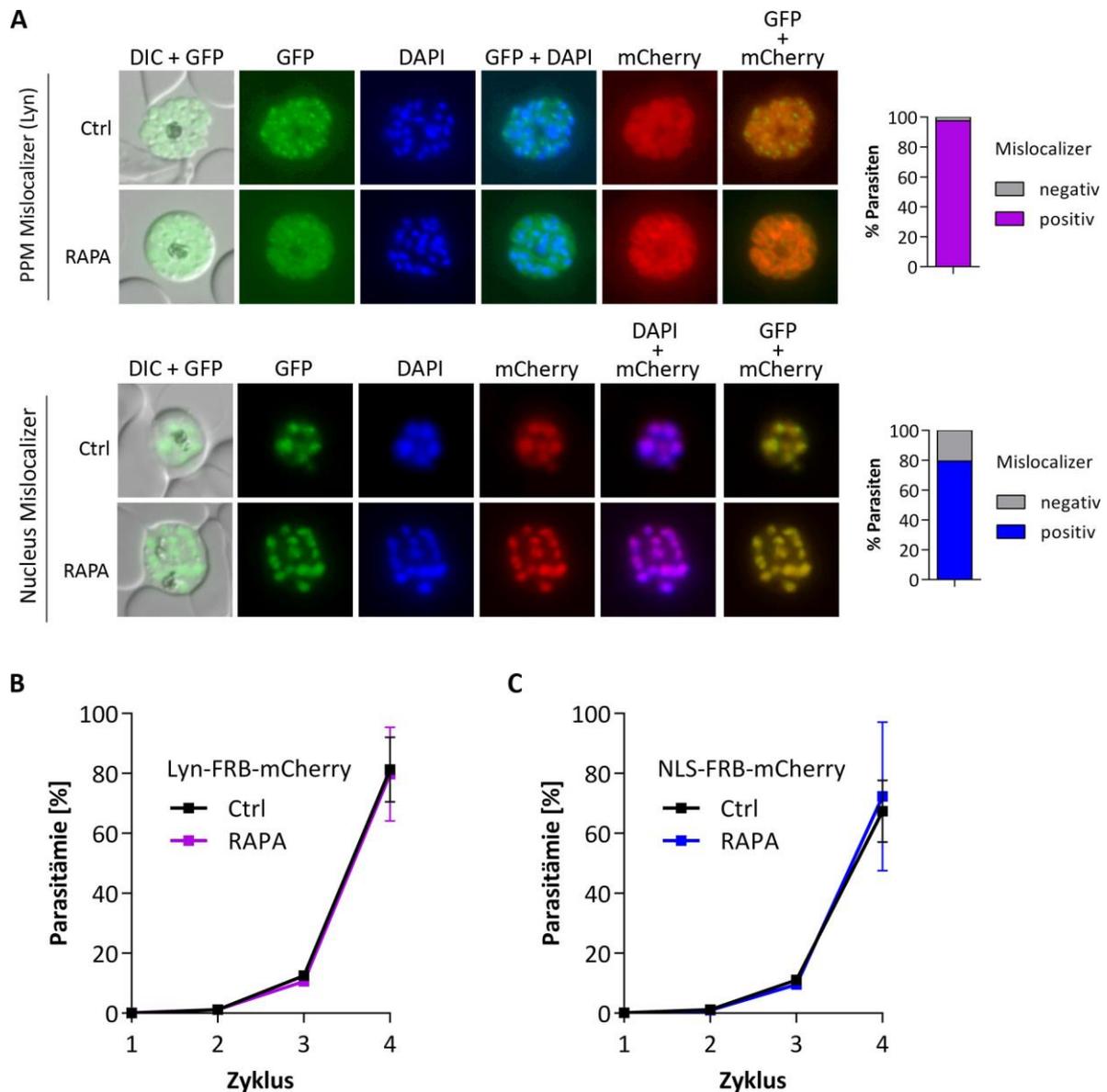


Abb.3.32: Phänotypisierung von *PfGSK3* β mittels *Knock Sideways*. (A) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Relokalisierung von *PfGSK3* β -2xFKBP-GFP-2xFKBP mit Lyn-FRB-mCherry (oben) oder NLS-FRB-mCherry (unten) mit Säulendiagrammen zur Quantifizierung Mislocalizer-positiver Parasiten ($n_{Lyn} = 1032$; $n_{NLS} = 987$). **(B+C)** Wachstumskurve mit *PfGSK3* β -2xFKBP-GFP-2xFKBP + **(B)** Lyn-FRB-mCherry oder **(C)** NLS-FRB-mCherry \pm Rapalog (0,1% Startparasitämie) über einen Zeitraum von vier Replikationszyklen. Die Parasitämie wurde alle 48 h mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Kultur wurde im dritten Zyklus verdünnt und anschließend eine kumulative Parasitämie berechnet. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten.

3.4 Charakterisierung von *PfGSK3 α*

3.4.1 Expression und Konservierung von *GSK3 α* in *Plasmodium falciparum*

Wie bereits in der Einleitung beschrieben sind im Menschen sowie vielen weiteren Organismen stets zwei Isoformen der GSK3 (*GSK3 α* und *GSK3 β*) zu finden (Woodgett, 1991; Mukai et al., 2002; Wood-Kaczmar et al., 2009; Castano et al., 2010; Soutar et al., 2010). Auch in *Plasmodium falciparum* konnte eine vermeintliche zweite Isoform der GSK3 identifiziert werden. Das Gen PF3D7_1316000 wurde in der Genomdatenbank PlasmoDB als putative Proteinkinase annotiert, die mit der GSK3 Familie clustert (Ward et al., 2004) und ein wahrscheinlich essentielles Gen in asexuellen Stadien des Parasiten darstellt (Solyakov et al., 2011). Aminosäure-Sequenzvergleiche zeigten zudem, dass essentielle Bereiche wie z.B. die ATP-Bindestelle von *HsGSK3 β* , *HsGSK3 α* sowie *PfGSK3 β* auch in dieser Isoform konserviert sind (Abb.5.7, siehe Anhang). Da die in der vorliegenden Arbeit bisher untersuchte Isoform der *PfGSK3* (PF3D7_0312400) eine größere Homologie zur humanen β -Isoform aufweist, wurde das Ortholog PF3D7_1316000 im Folgenden als *PfGSK3 α* bezeichnet.

Wie bereits in Abb.3.26 mittels qPCR gezeigt, sind nur Transkripte von *PfGSK3 β* , nicht jedoch von PF3D7_1316000 detektierbar. Dieses stimmt mit auf Mikroarray und RNA-Sequenzierung beruhenden Transkriptomanalysen überein (Bozdech et al., 2003; Le Roch et al., 2003; Llinás et al., 2006; Mok et al., 2007; Bartfai et al., 2010; Otto et al., 2010; Lopez-Barragan et al., 2011; Rovira-Grealls et al., 2012; Bunni et al., 2013; Siegel et al., 2014; Painter et al., 2018; Toenhake et al., 2018; Lee et al., 2018; Wichers et al., 2019). Entsprechend liegen keine massenspektrometrischen Daten vor, die ein Vorhandensein des entsprechenden Proteins in asexuellen Blutstadien nachweisen.

3.4.2 Expression und Aufreinigung rekombinanter *PfGSK3 α*

Aufgrund der in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Schwierigkeiten bei der Strukturaufklärung von *PfGSK3 β* wurde auch *PfGSK3 α* für eine heterologe Expression in *E. coli* mittels ligationsunabhängiger Klonierung in den Expressionsvektor pOPIN F kloniert, der eine Expression des Gens als Fusion mit einem His-Tag erlaubt. Die angeschlossenen rekombinanten Expressionsversuche erfolgten durch Samuel Pazicky (Arbeitsgruppe Dr. Christian Löw, EMBL/CSSB Hamburg). In einer Anzahl von verschiedenen *E. coli* Stämmen führte jedoch keiner der Versuche zu einer nachweislichen Expression.

3.4.3 Episomale Überexpression von *PfGSK3 α* in *P. falciparum* zur Lokalisation

Das minimale Expressionsniveau von *PfGSK3 α* macht ein endogenes Tagging mittels *Selection Linked Integration* vermutlich wenig aussichtsreich. Daher wurde eine episodale Expression von *PfGSK3 α* als mCherry-Fusion unter Kontrolle des *nmd3*-Promotors (Abb.3.33) bzw. GFP-Fusion unter Kontrolle des *AMA1*-Promotors (Abb.3.34) vorgenommen.

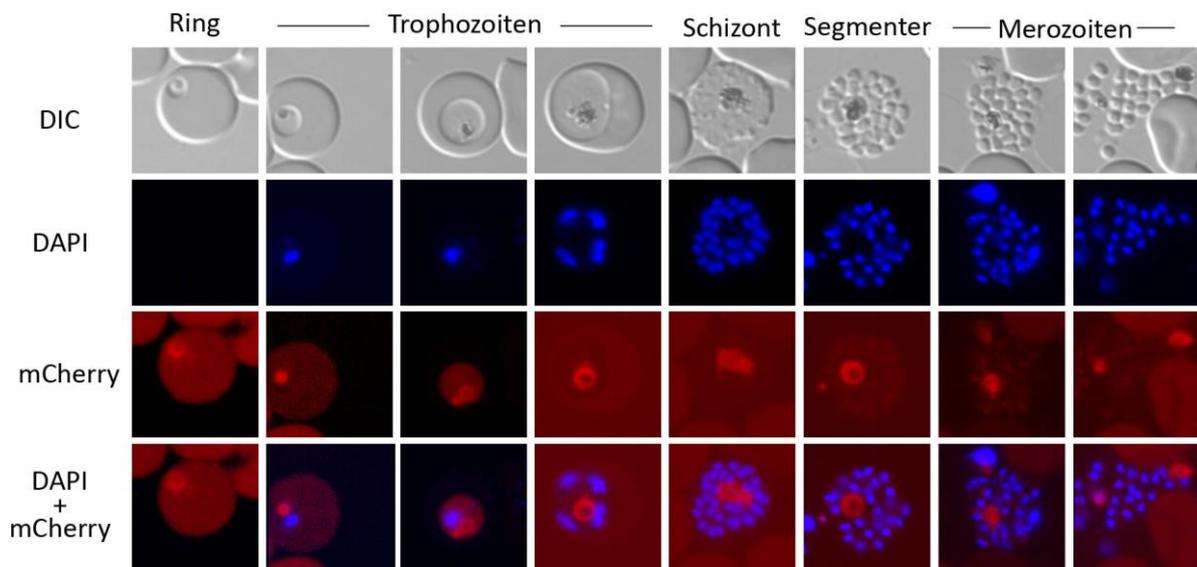


Abb.3.33: Fluoreszenzmikroskopie von *PfGSK3α*-mCherry mit *nmd3*-Promotor. *PfGSK3α* wurde als Fusion mit mCherry unter Kontrolle eines *nmd3*-Promotors episomal überexprimiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie in allen Stadien des asexuellen Entwicklungszyklus untersucht. Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung dargestellt.

Da der *nmd3*-Promotor in allen Stadien des asexuellen Entwicklungszyklus eine Genexpression vermittelt, wurden sämtliche Stadien des Parasiten zur Lokalisation von *PfGSK3α*-mCherry fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierbei konnte jedoch keine spezifische Lokalisation des Fusionsproteins beobachtet werden. *PfGSK3α*-mCherry zeigte in allen untersuchten Stadien stets eine Lokalisation nahe dem Hämazinkristall im Parasiten, woraus geschlossen werden kann, dass das Protein in der Nahrungsvakuole aggregiert (Abb.3.33).

Da der *AMA1*-Promotor ausschließlich im späten Verlauf des asexuellen Entwicklungszyklus aktiv ist, wurde *PfGSK3α*-GFP entsprechend in Schizonten-Stadien sowie Merozoiten fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Entgegen den Beobachtungen in Abb.3.33 konnte für *PfGSK3α*-GFP in Schizonten eine spezifische Lokalisation beobachtet werden (Abb.3.34). Diese entspricht der perinukleären Lokalisation mit cytosolischem Hintergrund (Prinz et al., 2016), welche zuvor ebenfalls für *PfGSK3β* beobachtet werden konnte (vgl. Abb.3.20). In freien Merozoiten konnte eine vergleichbare Lokalisation jedoch mit deutlich schwächerem GFP-Signal detektiert werden. Somit scheint für *PfGSK3α* zumindest unter Kontrolle des *AMA1*-Promotors eine GSK3-typische Lokalisation in Schizonten möglich zu sein.

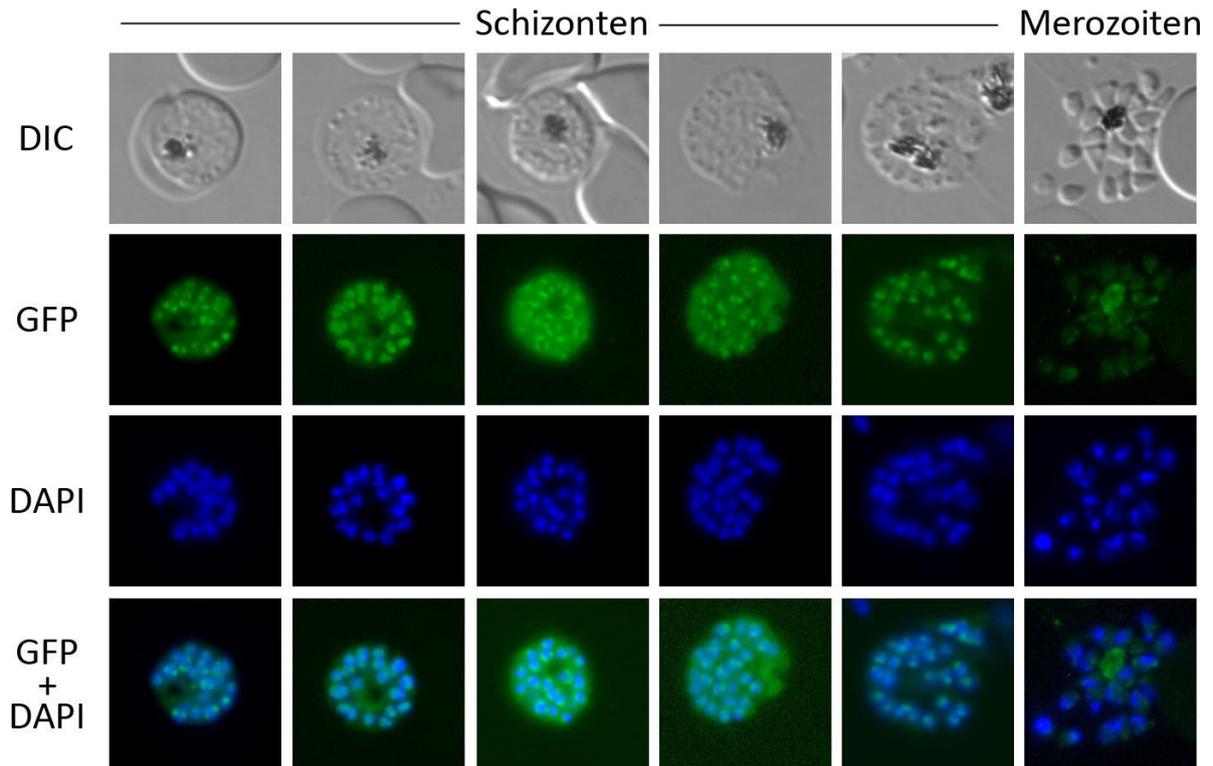


Abb.3.34: Fluoreszenzmikroskopie von *PfGSK3α*-GFP mit *AMA1*-Promotor. *PfGSK3α* wurde als Fusion mit GFP unter Kontrolle eines *AMA1*-Promotors episomal überexprimiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie in Schizonten-Stadien untersucht. Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung dargestellt.

3.5 Charakterisierung weiterer potentiell antiplasmodialer Verbindungen

Auf Grundlage der KuMas-Verbindungen (Masch et al., 2019, vgl. 3.2.1) wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Conrad Kunick (TU Braunschweig) eine weitere Reihe potentiell antiplasmodialer Verbindungen synthetisiert (KuSaSch-Reihe, synthetisiert von Sandra Schweda). Um die Grundstruktur der KuMas-Verbindungen zu erhalten, wurde eine Keto-Gruppe der KuMas-Verbindungen durch eine Carbonsäureamid-Struktur ersetzt, sodass es sich bei den Verbindungen der KuSaSch-Reihe um Thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carboxamide handelt (Abb.3.35). Anschließend wurden an mehreren Positionen der Grundstruktur verschiedene Seitenketten angefügt, sodass insgesamt 44 neue Verbindungen entstanden. Weitere Informationen sowie Referenzen zu den untersuchten Verbindungen können Abschnitt 2.1.8 entnommen werden. In Tabelle 5.1 sind die entsprechenden Verbindungen mit Strukturformel und Molekulargewicht dargestellt (siehe Anhang).

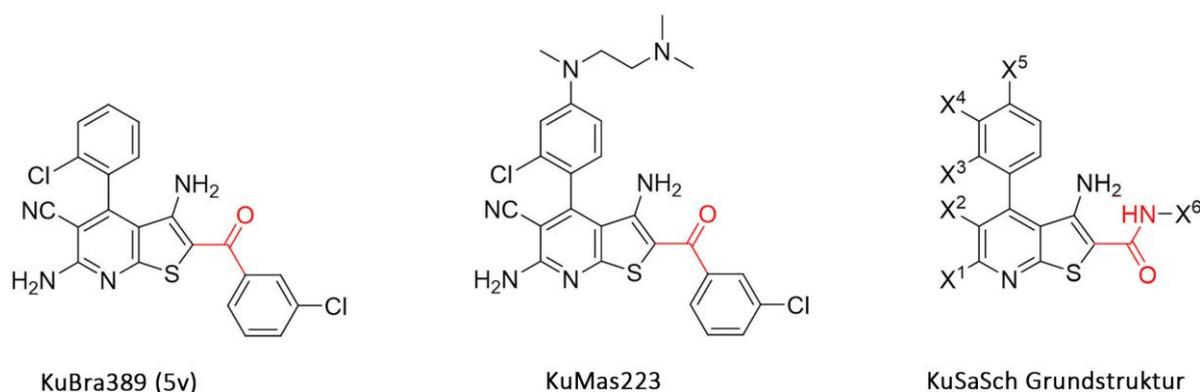


Abb.3.35: Thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carboxamide als KuMas-Derivate. Dargestellt sind die antiplasmodialen Verbindungen KuBra389 (5v) und KuMas223 sowie die daraus hervorgegangene Grundstruktur der KuSaSch Verbindungen. Die Keto-Gruppe der KuBra- und KuMas-Verbindungen (rot markiert) wurde in der KuSaSch-Grundstruktur durch eine Carbonsäureamid-Struktur ersetzt (Abbildung modifiziert nach Schweda et al., 2020, unveröffentlicht). Die mit X markierten Positionen dienen dem Anfügen von Seitenketten.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den Verbindungen ebenfalls um *Pf*GSK3 β -spezifische Inhibitoren handelt, wurden diese bei einer Konzentration von 10 μ M mittels KinaseGlo Plus gegen *rPf*GSK3 β getestet. Wie bereits für Abb.3.10 beschrieben, wurden Verbindungen, die bei dieser Konzentration mindestens 50% Inhibierung der Kinaseaktivität zeigen, als aktiv eingestuft. Im Test zeigten lediglich die Verbindungen KuSaSch127, KuSaSch134, KuSaSch135, sowie der als Kontrollverbindung mitgeführte Inhibitor KuMas223 eine Aktivität gegenüber *rPf*GSK3 β (Abb.3.36).

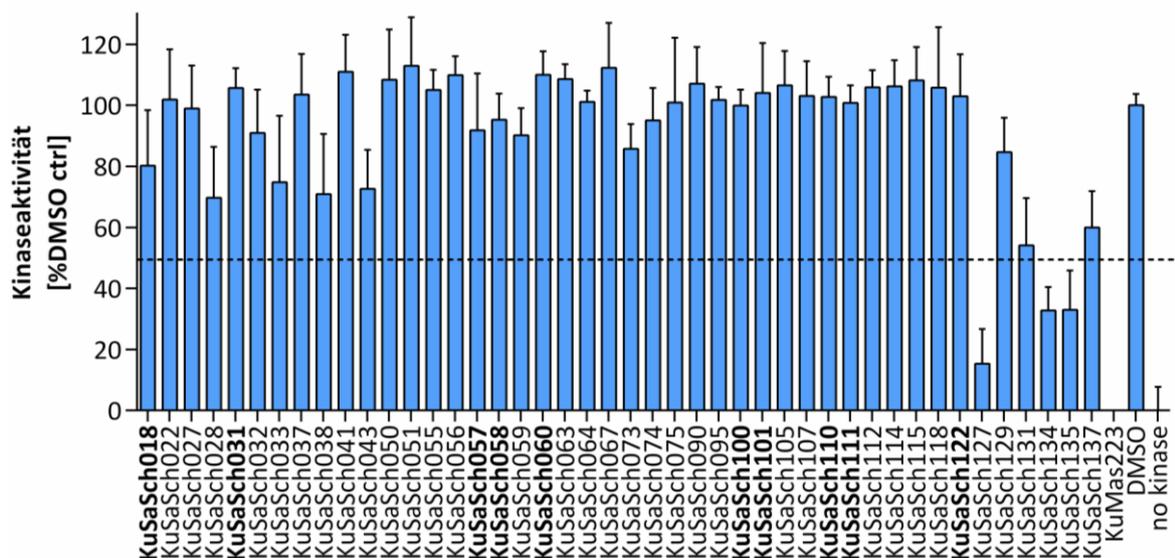


Abb.3.36: Testung der KuSaSch-Verbindungen gegen *rPfGSK3β*. Die zu testenden Verbindungen wurden mittels KinaseGlo Plus bei einer Konzentration von 10 μM unter Standard-Reaktionsbedingungen gegen rekombinante *PfGSK3β* getestet. Als Positivkontrolle diente der bereits identifizierte Inhibitor KuMas223. Alle Werte wurden zu einer Kontrollreaktion ohne Kinase normalisiert und als % der DMSO Kontrolle dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von Triplikaten aus drei Kinasereaktionen.

Um zu überprüfen, ob die Verbindungen trotz fehlender Inhibierung von *rPfGSK3β* eine antiplasmodiale Aktivität besitzen, wurden diese bei drei verschiedenen Konzentrationen (30 μM , 3 μM , 0.3 μM) im Proliferationsassay gegen *Pf3D7* Parasiten getestet (Abb.3.37).

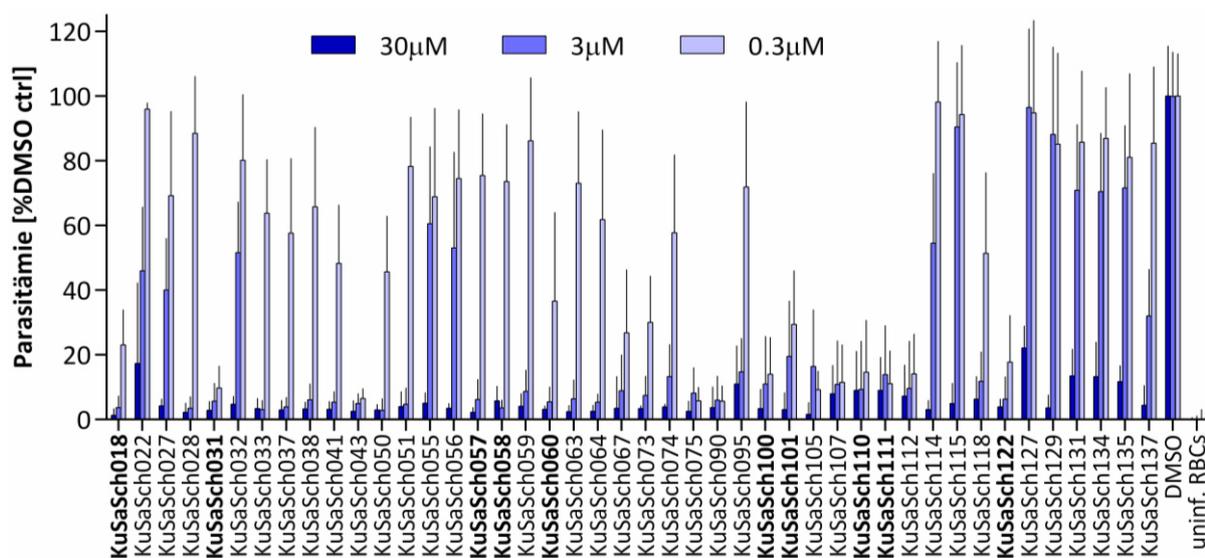


Abb.3.37: Antiplasmodiale Aktivität der KuSaSch-Verbindungen. Potentielle *PfGSK3β*-Inhibitoren wurden mittels Proliferationsassay gegen *Pf3D7*-Parasiten getestet. Eine synchrone Parasitenkultur wurde auf 0,1% Parasitämie eingestellt und für 96 h in Gegenwart von 30 μM , 3 μM oder 0,3 μM der

zu testenden Verbindung inkubiert. Sämtliche Verbindungen wurden in DMSO gelöst. Als Negativkontrolle diente DMSO ohne Verbindung. Die Parasitämie wurden anschließend mittels SYBR Gold-Färbung in einem EnVision Multilable Plate Reader (Perkin Elmer) quantifiziert. Sämtliche Messwerte wurden zu einer Kontrolle (uninfizierte Erythrozyten) normalisiert und als % der DMSO-Kontrolle dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von Triplikaten aus je drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 3.37 ersichtlich, zeigten alle Verbindungen bei einer Konzentration von 30 μ M mindestens 80% Inhibierung der Parasitenproliferation. Bei einer Konzentration von 3 μ M zeigten 31 der 44 getesteten Verbindungen weiterhin eine Inhibierung von mindestens 80%. Für 11 Verbindungen konnte selbst bei einer Konzentration von 0.3 μ M noch eine entsprechende Inhibierung der plasmodialen Proliferation beobachtet werden (Abb.3.37).

Um eine generelle Zytotoxizität der Verbindungen auszuschließen, wurden sämtliche KuSaSch-Verbindungen zudem bei einer Konzentration von 30 μ M gegen HEK293T-Zellen getestet. Im Viabilitätsassay zeigten lediglich die Verbindungen KuSaSch043, KuSaSch067, KuSaSch075 und KuSaSch090 eine stärkere Toxizität gegenüber HEK-Zellen (über 80% Inhibierung der Viabilität bei 30 μ M). Alle weiteren Verbindungen zeigten geringere oder keine Inhibierung der HEK293T-Zellviabilität bei der getesteten Konzentration (Abb.3.38).

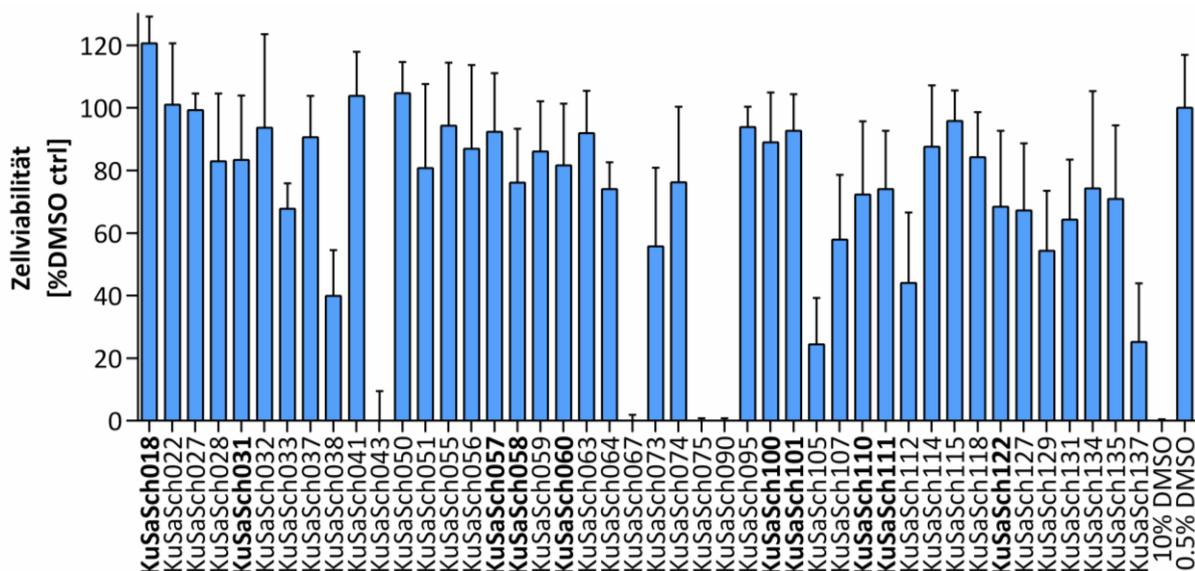


Abb.3.38: Zytotoxizität von KuSaSch-Verbindungen gegenüber HEK293T-Zellen. Die Zytotoxizität der KuSaSch-Verbindungen wurde mithilfe eines Viabilitätsassays an HEK293T-Zellen getestet. HEK293T-Zellen wurden für 48 h in Gegenwart von 30 μ M der zu testenden Verbindung kultiviert. Sämtliche Verbindungen wurden in DMSO gelöst. Als Negativkontrolle diente DMSO ohne Verbindung, als Positiv-Kontrolle wurden 10% DMSO eingesetzt. Die Viabilität der HEK-Zellen wurde anschließend mittels Presto Blue-Färbung in einem EnVision Multilable Plate Reader (Perkin Elmer) quantifiziert. Sämtliche Messwerte wurden zur 10% DMSO-Kontrolle normalisiert und als % der 0,5%-DMSO-Kontrolle dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von Duplikaten aus je drei unabhängigen Experimenten.

Anschließend wurden 10 der insgesamt 44 Verbindungen zur weiteren Charakterisierung anhand von Parasiten-spezifischen IC_{50} -Werten ausgewählt und im Proliferationsassay untersucht. Hierfür wurden Verbindungen ausgewählt, die strukturell möglichst unterschiedlich erscheinen und zudem eine vielversprechende antiplasmodiale Aktivität sowie eine möglichst geringe Zytotoxizität gegenüber HEK-Zellen zeigten. Zur weiteren Untersuchung wurden letztlich die Verbindungen KuSaSch018, KuSaSch031, KuSaSch057, KuSaSch058, KuSaSch060, KuSaSch100, KuSaSch101, KuSaSch110, KuSaSch111 und KuSaSch122 ausgewählt (In Abb.3.36 bis Abb.3.38 fett dargestellt). Der Großteil der ausgewählten Verbindungen zeigte IC_{50} -Werte im nanomolaren oder unteren mikromolaren Bereich. Für die Verbindungen KuSa101, KuSaSch110, KuSaSch111 und KuSaSch122 konnten IC_{50} -Werte im unteren nanomolaren Bereich detektiert werden (Abb.3.39).

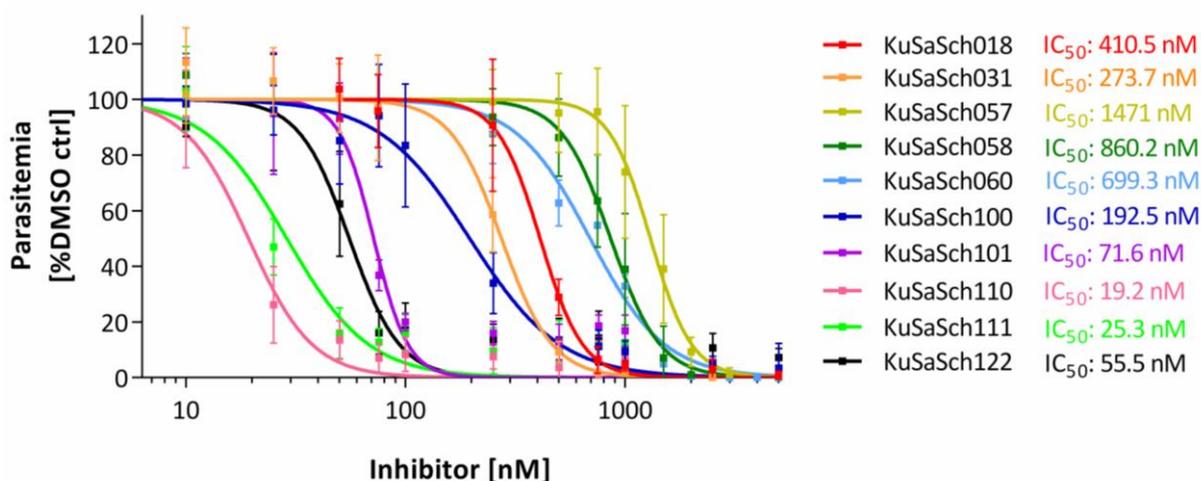


Abb.3.39: Plasmodium-spezifische IC_{50} -Werte für ausgewählte KuSaSch-Verbindungen. Verdünnungsreihen ausgewählter KuSaSch-Verbindungen wurden mittels Proliferationsassay gegen *Pf*3D7-Parasiten getestet. Eine synchrone Parasitenkultur wurde auf 0,1% Parasitämie eingestellt und für 96 h mit der zu testenden Verbindung inkubiert. Sämtliche Verbindungen wurden in DMSO gelöst. Als Negativkontrolle diente DMSO ohne Verbindung. Die Parasitämie wurden anschließend mittels SYBR Gold-Färbung in einem EnVision Multilable Plate Reader (Perkin Elmer) quantifiziert. Sämtliche Messwerte wurden zu einer Kontrolle (uninfizierte Erythrozyten) normalisiert und als % der DMSO-Kontrolle in Graphpad Prism geplottet. Die Berechnung von IC_{50} -Werten erfolgte anschließend mittels non-linearer Regression. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von Triplikaten aus je drei unabhängigen Experimenten.

Wie bereits beschrieben konnte für den Großteil der getesteten KuSaSch-Verbindungen keine Aktivität gegenüber rekombinanter *Pf*GSK3 β nachgewiesen werden. Dennoch wurden einige ausgewählte Verbindungen im KinaseGlo Plus Assay zusätzlich gegen humane rGSK3 β getestet. Hierbei wurden zum einen solche 10 Verbindungen getestet, die bereits zur Bestimmung Parasiten-spezifischer IC_{50} -Werte ausgewählt wurden. Zudem wurden die Verbindungen KuSaSch127, KuSaSch131, KuSaSch134, KuSaSch135 mit einbezogen, da diese im Test gegen *rPf*GSK3 β zu einer Inhibierung der Kinaseaktivität führten. Im Test konnte bei

einer Konzentration von 10 μM jedoch für keine der ausgewählten Verbindungen eine Aktivität gegenüber *rHsGSK3 β* detektiert werden (Abb.3.40).

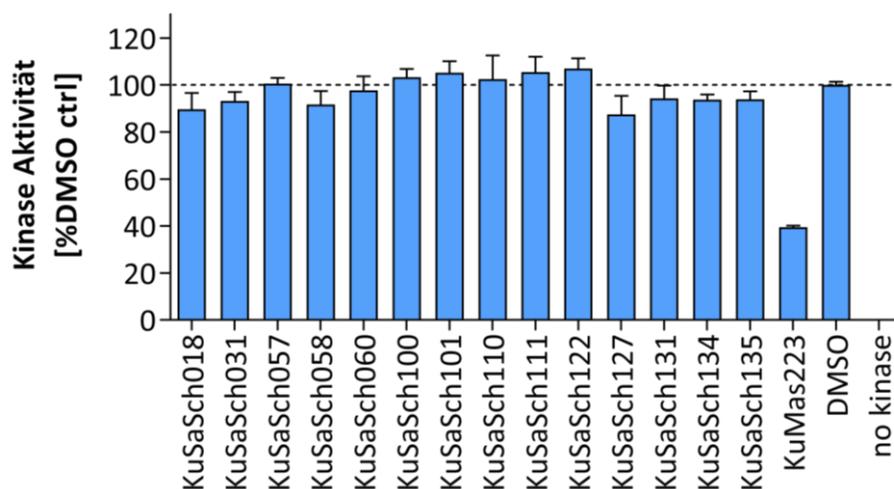


Abb.3.40: Testung ausgewählter KuSaSch Verbindungen gegen *rHsGSK3 β* . Ausgewählte KuSaSch-Verbindungen wurden mittels KinaseGlo Plus bei einer Konzentration von 10 μM unter Standard-Reaktionsbedingungen gegen rekombinante *HsGSK3 β* getestet. Als Positivkontrolle diente der bereits identifizierte Inhibitor KuMas223 [IC_{50}]. Alle Werte wurden zu einer Kontrollreaktion ohne Kinase normalisiert und als % der DMSO Kontrolle dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von Triplikaten aus drei Kinasereaktionen.

Folglich handelt es sich beim Großteil der KuSaSch-Verbindungen trotz struktureller Ähnlichkeit zu bereits untersuchten Inhibitoren um keine GSK3-Inhibitoren, jedoch weisen die Verbindungen eine antiplasmodiale Aktivität auf. Der antiplasmodiale Wirkmechanismus beruht folglich auf Inhibierung einer anderen Zielstruktur, die mit den beschriebenen Untersuchungen nicht ermittelt werden konnte.

3.6 Identifizierung eines antimalarialen Naturstoffs aus *Streptomyces sp.* 4114

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerry Wright an der McMaster University (Hamilton, Kanada) wurde von 2011 bis 2013 die *Wright Actinomycete Collection* (WAC) nach antiplasmodialen Verbindungen gescreent. Bei WAC handelt es sich um eine Sammlung mikrobieller Extrakte von rund 10.000 verschiedenen mikrobiellen Stämmen, die aus Bodenproben weltweiten Ursprungs gewonnen wurden (Thaker et al., 2013). Diese beinhalten zum Großteil Stämme der Actinomyceten, jedoch auch einige weitere Bakterien-Spezies sowie Pilzarten (Thaker et al., 2013).

Im Screen zeigten 6 mikrobielle Extrakte mindestens 90% Inhibierung von *Plasmodium falciparum* Parasiten, jedoch keine detektierbare Aktivität gegen HEK293T-Zellen.

Streptomyces sp. WAC04114 wurde zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Ziel war es, in Extrakten des Bakterien-Stammes den Wirkstoff zu identifizieren, welcher für den antiplasmodialen Effekt verantwortlich ist. Hierfür wurde der Überstand sowie die zelluläre Fraktion der Bakterienkultur in der Arbeitsgruppe Wright mithilfe verschiedener Chromatographie-Verfahren in mehrere Fraktionen aufgetrennt. Die entsprechenden Fraktionen wurden in der Arbeitsgruppe Gilberger auf antiplasmodiale Aktivität untersucht. Fraktionen die eine antiplasmodiale Aktivität zeigten, wurden behalten und erneut fraktioniert. Nach vier Subfraktionierungen der jeweils aktiven Fraktion konnte eine Substanz gewonnen werden, die vermutlich den beobachteten antiplasmodialen Effekt vermittelt.

Aus einem Kulturvolumen von 6 Litern konnten schließlich in der Arbeitsgruppe Wright 1,96 mg homogener Substanz gewonnen werden, die im Folgenden als PDE-I₂ bezeichnet wird, da strukturelle Vergleiche zeigten, dass die Verbindung einem Dimer eines Phosphodiesterase-Inhibitors (PDE-I) entsprechen, der bereits aus *Streptomyces* isoliert werden konnte (Enomoto et al., 1978). Mittels Massenspektrometrie und NMR-Spektralanalyse wurde die Molekülstruktur der Verbindung ermittelt (Abb.3.41).

Die ermittelte Molekülstruktur von PDE-I₂ weist eine strukturelle Verwandtschaft zu Verbindungen der Duocarmycine auf. Duocarmycine stellen Naturstoffe mit stark cytotoxischer Wirkung dar, die erstmalig aus Bakterien der Gattung *Streptomyces* isoliert wurden (Takahashi et al., 1988; Yasuzawa et al., 1988). Die cytotoxische Wirkung dieser Substanzklasse beruht auf einer irreversiblen Alkylierung der Nukleobase Adenin im DNA-Molekül, wodurch es zu Veränderungen der DNA-Struktur kommt (Boger et al., 1990; Boger, 1993). Die Alkylierung der DNA durch Duocarmycine wird hierbei durch eine im Molekül enthaltene Cyclopropan-Struktur vermittelt, die bei PDE-I₂ jedoch fehlt. Abbildung 3.41 zeigt die Molekülstruktur von PDE-I₂ sowie der Duocarmycin-Analoga Rachelmycin (Boger et al., 1994), Duocarmycin A (Takahashi et al., 1988; Yasuzawa et al., 1988) und Duocarmycin B2 (Ogawa et al., 1989).

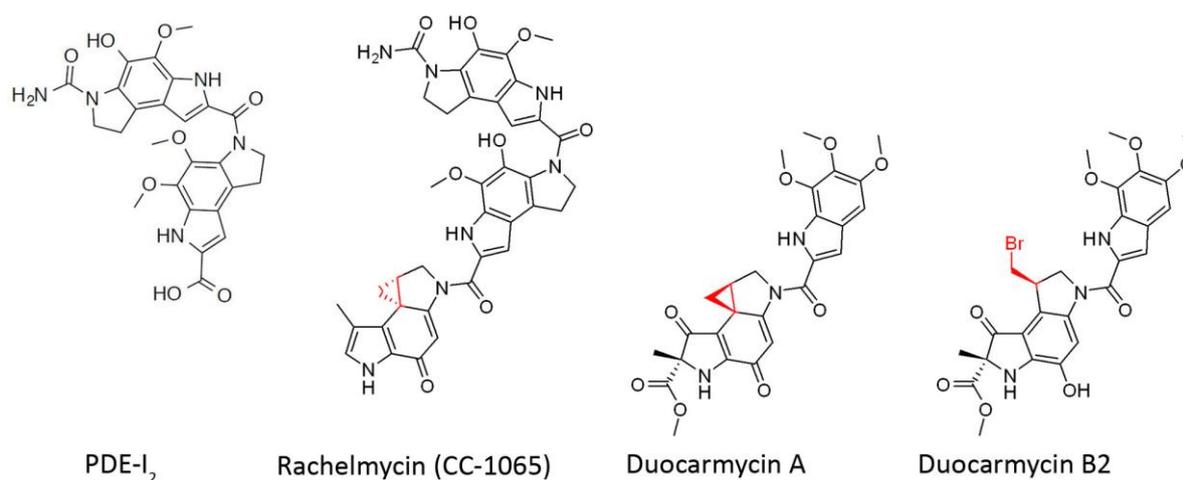


Abb.3.41: Molekülstruktur von PDE-I₂ und strukturell verwandter Duocarmycine. Vergleichend sind die Molekülstrukturen der Verbindungen Rachelmycin (CC-1065) sowie Duocarmycin A und Duocarmycin B2 dargestellt. Die Cyclopropan-Strukturen bzw. das entsprechende Syntheton im Bromo-Analog, welche die Alkylierung von DNA vermitteln, sind rot markiert.

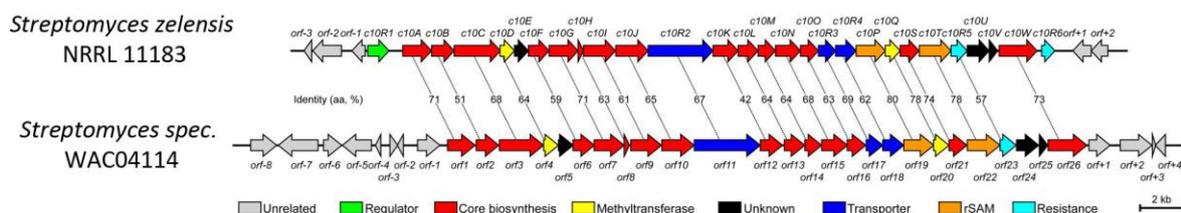
Um den biochemischen Syntheseweg von PDE-I₂ in *Streptomyces sp.* WAC04114 zu verstehen, wurde das Genom des Bakterienstammes in der Arbeitsgruppe Wright sequenziert. Sequenzvergleiche zeigten, dass der Stamm ein biosynthetisches Gencluster (BGC) aufweist, welches zuvor bereits in *Streptomyces zelensis* NRRL 11183 identifiziert werden konnte und dort für die Synthese der verwandten Verbindung CC-1065 (Rachelmycin) verantwortlich ist (Wu et al., 2017). Das biosynthetische Cluster in *Streptomyces sp.* WAC04114 erscheint nahezu identisch mit Ausnahme des Regulatorgens *c10R1* sowie dem Resistenzgen *c10R6* (Abb.3.42A).

Die Struktur von PDE-I₂ ähnelt sehr stark einem Zwischenprodukt welches bei der Synthese von CC-1065 in *Streptomyces zelensis* NRRL 11183 entsteht (Wu et al., 2017). Anschließend katalysiert das Enzym rSAM (Radikal S-Adenosyl-L-Methionin) die Synthese der DNA-alkylierenden Cyclopropan-Struktur, wodurch letztlich das Endprodukt CC-1065 entsteht. Der Syntheseschritt durch rSAM ist ebenfalls bei der Biosynthese anderer Duocarmycine wie Yatakemycin konserviert (Huang et al., 2012). Da bei *Streptomyces sp.* WAC4114 jedoch die Cyclopropan-Struktur im Molekül fehlt (Abb.3.41), wäre es möglich, dass PDE-I₂ das Produkt einer unvollständigen Duocarmycin-Synthese darstellt. Dies könnte auf eine fehlerhafte Expression des rSAM-Gens hindeuten.

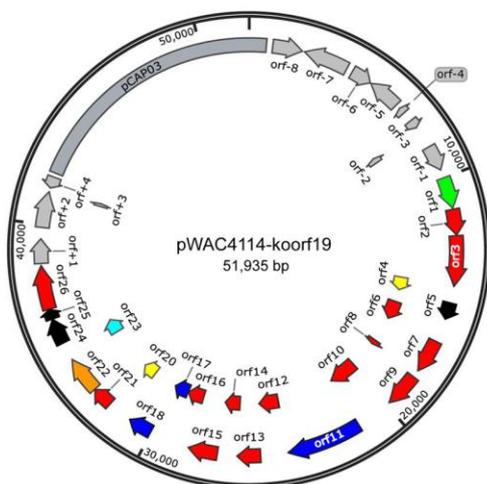
Die augenscheinlich unvollständige Duocarmycin-Synthese in *Streptomyces sp.* WAC04114 könnte möglicherweise eine notwendige Überlebensstrategie aufgrund fehlender Selbstresistenz gegen das Endprodukt CC-1065 darstellen. Wie beim Vergleich der biosynthetischen Gencluster bereits gezeigt wurde, fehlen dem Stamm *Streptomyces sp.* WAC04114 das Regulatorgens *c10R1* sowie das Resistenzgen *c10R6* (Abb.3.42A). Das Resistenzgen *c10R6* stellt ein *Gyrl-like*-Protein dar, welches bei der Synthese von CC-1065 sowie Yatakemycin eine entsprechende Selbstresistenz mittels Hydrolyse der DNA-

alkylierenden Cyclopropan-Struktur vermittelt (Yuan et. al., 2017). Da ein entsprechendes Homolog im biosynthetischen Cluster von *Streptomyces sp.* WAC04114 fehlt, weist dieser Stamm vermutlich keine Selbstresistenz gegenüber dem theoretischen Endprodukt auf. Somit stellt die unvollständige Synthese von CC-1065 in diesem Stamm möglicherweise einen Schutzmechanismus vor der Bildung des toxischen Endprodukts dar.

A



B



C

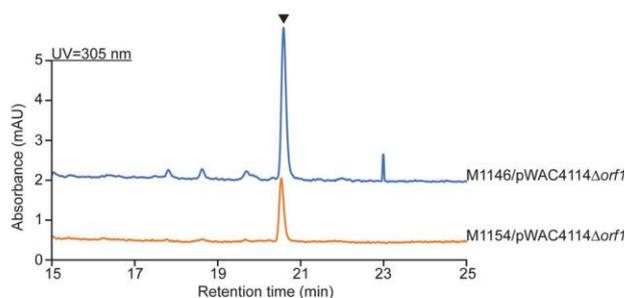


Abb. 3.42: Biosynthetisches Gencluster zur Produktion des Naturstoffs PDE-I₂. Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Min Xu (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gerry Wright, Mc Master University, Hamilton, Kanada) **(A)** CC-1065 aus *Streptomyces zelensis* NRRL 11183 sowie der Naturstoff PDE-I₂ aus *Streptomyces sp.* WAC04114. weisen ein nahezu identisches biosynthetisches Gencluster mit Ausnahme des Regulatorgens *c10R1* sowie dem Resistenzgen *c10R6* auf. rSAM = Radikal S-Adenosyl-L-Methionin **(B)** Das PDE-I₂ biosynthetische Gencluster wurde mittels *transformation-associated recombination* (TAR) in den Vektor pCAP03 kloniert. Der rSAM codierende *orf19* wurde mittels λ -red vermittelter Rekombination deletiert. **(C)** Heterologe Expression des Naturstoffs PDE-I₂ in *S. coelicolor* M1146 und M1154. Die mit dem schwarzen Pfeil markierten Peaks der Elution entsprechen der Verbindung PDE-I₂. Die in dieser Abbildung dargestellten Untersuchungen erfolgten durch Dr. Min Xu (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gerry Wright, Mc Master University, Hamilton, Kanada).

Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde in der Arbeitsgruppe Wright der Versuch unternommen, die Verbindung PDE-I₂ mithilfe des biosynthetischen Clusters heterolog in zwei weiteren Bakterienstämmen zu exprimieren. Hierfür wurde das gesamte biosynthetische Cluster in ein entsprechendes Episom kloniert (Abb. 3.42B) und anschließend in den Bakterienstämmen *Streptomyces coelicolor* M1146 und M1154 exprimiert. Es konnte jedoch in diesem Ansatz weder für PDE-I₂ noch für das theoretische Endprodukt CC-1065 eine

heterologe Expression beobachtet werden. Eine Erklärung hierfür könnte die fehlende Selbstresistenz gegenüber dem theoretischen Endprodukt CC-1065 sein. Aus diesem Grund wurde das Enzym rSAM, welches notwendig für eine vollständige Synthese von CC-1065 ist, aus dem Episom deletiert. Dies führte tatsächlich zu einer heterologen Expression von PDE-I₂ in *Streptomyces coelicolor* M1146 und M1154 und bestätigt, dass die Verbindung das Produkt einer unvollständigen Duocarmycin-Synthese ist.

Zur weiteren Charakterisierung des Naturstoffs PDE-I₂ wurde dieser im Vergleich zu DuocarmycinTM gegen *Pf3D7* sowie HEK-Zellen getestet. Zur Analyse der Spezifität beider Verbindungen wurden *Plasmodium*- sowie HEK293T-spezifische IC₅₀-Werte berechnet.

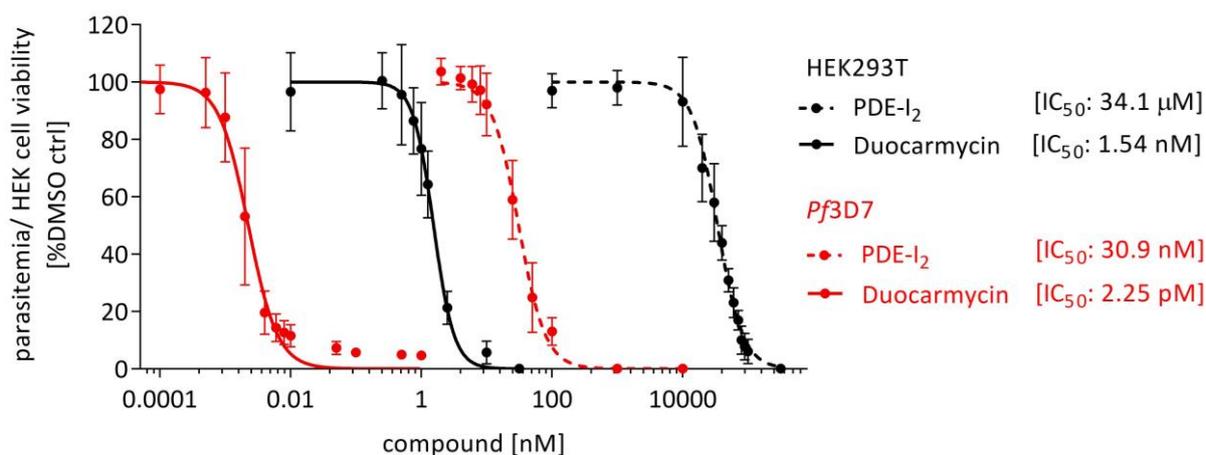


Abb.3.43: *Plasmodium*- und HEK293T-spezifische IC₅₀-Werte für PDE-I₂ und Duocarmycin. *Pf3D7* (rote Kurven): Verdünnungsreihen von PDE-I₂ (gestrichelte Kurven) und Duocarmycin (durchgängige Kurven) wurden mittels Proliferationsassay gegen *Pf3D7*-Parasiten (0,1% Startparasitämie) getestet. Als Negativkontrolle diente DMSO ohne Verbindung. Die Parasitämie wurden nach 96 h mittels SYBR Gold-Färbung in einem EnVision Multilable Plate Reader (Perkin Elmer) quantifiziert. Sämtliche Messwerte wurden zu einer Kontrolle (uninfizierte Erythrozyten) normalisiert und als % der DMSO-Kontrolle in Graphpad Prism geplottet. Die Berechnung von IC₅₀-Werten erfolgte anschließend mittels non-linearer Regression. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung von Triplikaten aus je drei unabhängigen Experimenten. HEK293T-Zellen (schwarze Kurven): Verdünnungsreihen von PDE-I₂ (gestrichelte Kurve) und Duocarmycin (durchgängige Kurve) wurden mittels Viabilitätsassay gegen HEK293T-Zellen getestet. Als Negativkontrolle diente DMSO ohne Verbindung, als Positiv-Kontrolle wurden 10% DMSO eingesetzt. Die Viabilität der HEK-Zellen wurden anschließend mittels Presto Blue-Färbung in einem EnVision Multilable Plate Reader (Perkin Elmer) quantifiziert. Sämtliche Messwerte wurden zur 10% DMSO-Kontrolle normalisiert und als % der 0,5% DMSO-Kontrolle dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung von Duplikaten aus je drei unabhängigen Experimenten.

Im Test zeigte DuocarmycinTM eine sehr stark antiplasmodiale Aktivität mit einem IC₅₀-Wert von 2,25 pM. Die Viabilität von HEK293T-Zellen wurde im Vergleich dazu durch Duocarmycin erst bei deutlich höheren Konzentrationen gehemmt, die sich dennoch im unteren nanomolaren Bereich bewegten (IC₅₀: 1,54 nM; Abb.3.43, durchgängige Kurven). Der

Naturstoff PDE-I₂ zeigte ebenso eine stark antiplasmodiale Aktivität mit einem IC₅₀-Wert von 30,9 nM für *Pf3D7*. Zudem zeigte die Verbindung mit einem 1100-fach höheren IC₅₀-Wert (34,1 µM) im Test gegen HEK293T-Zellen eine hohe Selektivität für *P. falciparum* Parasiten (Abb.3.43, gestrichelte Kurven). Vergleichbare IC₅₀-Werte konnten im Test gegen den bereits in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen multiresistenten Stamm *Pf7G8* ermittelt werden (Abb.5.4, siehe Anhang).

Um Hinweise auf einen möglichen Wirkmechanismus zu erlangen, wurde die Verbindung PDE-I₂ zudem auf eine Stadien-spezifische Inhibierung von *Pf3D7* hin untersucht. Hierfür wurde eine synchrone Ringkultur zum Zeitpunkt von 3 hpi mit der IC₅₀ sowie der IC₉₀ der Verbindung behandelt. Anschließend wurden die infizierten Erythrozyten alle acht Stunden anhand von Giemsa-gefärbten Blutausstrichen analysiert und die Parasitenstadien quantifiziert.

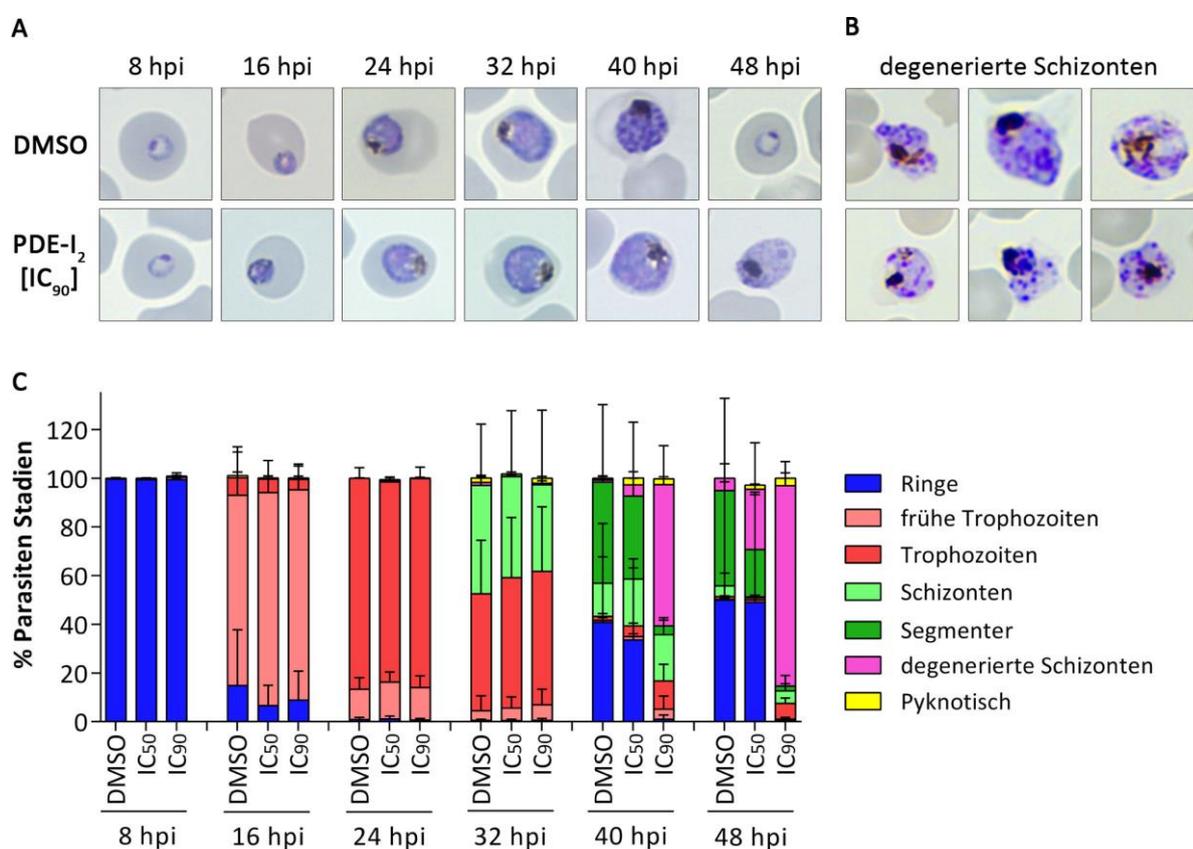


Abb.3.44: Stadien-spezifische Inhibierung von *Pf3D7* durch PDE-I₂. (A) Hochsynchrone *Pf3D7*-Parasiten wurden 3 hpi mit der IC₉₀ des Naturstoffs PDE-I₂ behandelt und anschließend alle acht Stunden anhand von Giemsa-gefärbten Blutausstrichen im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollparasiten analysiert. Dargestellt sind repräsentative Stadien für jeden untersuchten Zeitpunkt. (B) Beispielhafte Darstellung von Schizonten-Stadien mit degenerierter Morphologie in Giemsa-gefärbten Blutausstrichen. (C) Detektierte Parasiten für jeden untersuchten Zeitpunkt wurden in entsprechende Stadien unterteilt (siehe Legende in der Abbildung) und der Anteil der verschiedenen Stadien wurde als % aller detektierten Parasiten dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Pro untersuchten Zeitpunkt wurden insgesamt mindestens 1000 Parasiten quantifiziert.

In der Stadien-spezifischen Wachstumsanalyse konnte bis zum Zeitpunkt von ca. 32 hpi kein Unterschied in der Entwicklung zwischen PDE-I₂-behandelten sowie DMSO-Kontrollparasiten beobachtet werden (Abb.3.44A+C). Im Schizonten-Stadium (40-48 hpi) hingegen konnte eine spezifische Inhibierung der parasitären Entwicklung in PDE-I₂-behandelten Parasiten beobachtet werden, wobei Schizonten eine degenerierte Morphologie aufwiesen (Abb.3.44C). In Abb.3.44B sind beispielhaft Stadien dargestellt, die bei der Quantifizierung als degenerierte Schizonten eingestuft wurden. Derartige Stadien wiesen eine abnormale Form und/oder keine erkennbare Kernteilung sowie Ausbildung von Tochtermerozoiten auf. Bei Behandlung mit Duocarmycin konnte der in Abb.3.44 beobachtete Effekt reproduziert werden (vgl. Abb.5.10, siehe Anhang).

Da für die Substanz-Klasse der Duocarmycine bereits eine Destabilisierung der DNA-Architektur durch irreversible Alkylierung von Adeninresten beschrieben werden konnte (Boger et al., 1990; Boger,1993), wäre es denkbar, dass der beobachtete Effekt auf eine Beeinträchtigung der Kernteilung und/oder Replikation der Parasiten-DNA durch PDE-I₂ zurückzuführen ist. Zur weiteren Charakterisierung des PDE-I₂-induzierten Defekts in Schizonten-Stadien, wurde die Integrität der Zellkerne und/oder Parasiten-DNA in weiteren Untersuchungen analysiert.

Zunächst wurden PDE-I₂- und Duocarmycin-behandelte Parasiten im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle im Schizonten-Stadium mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Wie bereits in Abb.3.44 dargestellt, konnte in PDE-I₂-behandelten Parasiten keine Ausbildung von Tochtermerozoiten beobachtet werden. Der gleiche Effekt konnte bei Behandlung mit Duocarmycin detektiert werden (Abb.3.45A). Um zu überprüfen, ob dennoch intakte Zellkerne vorhanden sind, wurden diese mittels DAPI-Färbung untersucht. Sowohl in PDE-I₂- als auch in Duocarmycin-behandelten Parasiten konnte zwar ein DAPI-Signal detektiert werden, jedoch konnten keine Zellkern-typischen Strukturen beobachtet werden. Entgegen dieser Beobachtung konnte bei gleicher Belichtungsintensität in DMSO-behandelten Parasiten ein Zellkern-typisches DAPI-Signal beobachtet werden, welches auf die korrekte Ausbildung mehrerer Zellkerne hindeutet (Abb.3.45A).

Des Weiteren wurde der DNA-Gehalt in PDE-I₂-behandelten Schizonten im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollparasiten nach SYBR Green-Färbung mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass PDE-I₂ keine Auswirkungen auf den DNA-Gehalt im Parasiten hat (Abb.3.45B). Zudem wurde die Integrität der genomischen DNA anhand einer Schmelzkurve untersucht. Hierbei konnte bei PDE-I₂-Behandlung kein signifikanter Unterschied in der Schmelztemperatur der untersuchten gDNA beobachtet werden. Für gDNA, die aus Duocarmycin-behandelten Parasiten isoliert wurde, konnte jedoch bei der IC₉₀ eine signifikant niedrigere Schmelztemperatur im Vergleich zur DMSO-Kontrolle detektiert werden (Abb.3.45C). Dies könnte eventuell auf eine verminderte Stabilität der genomischen DNA zurückzuführen sein. Darüber hinaus wurden die isolierten gDNAs mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Für gDNAs aus PDE-I₂-behandelten Parasiten konnte

sowohl bei der IC_{50} als auch der IC_{90} eine gDNA-typische Bande im Agarosegel detektiert werden. Die detektierten Banden waren jedoch von deutlich schwächerer Intensität als die Bande der DMSO-Kontrolle. Bei gDNA aus Duocarmycin-behandelten Parasiten konnte für die IC_{50} ebenfalls eine deutlich schwächere Bande im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet werden, die bei der IC_{90} vollständig verschwindet (Abb.3.45D). Da für alle Proben die gleiche DNA-Menge (300 ng) aufgetragen wurde, könnte dies auf eine stärkere Fragmentierung der DNA durch Duocarmycin und PDE-I₂ hinweisen. Zudem könnte der Effekt auf eine geminderte Anfärbung der DNA zurückzuführen sein. Eventuell kann das Ethidiumbromid, welches zur Färbung der DNA im Agarosegel verwendet wird, nicht mehr in die DNA-Doppelhelix interkalieren, wenn bereits eine Interaktion mit Duocarmycin bzw. PDE-I₂ stattfindet.

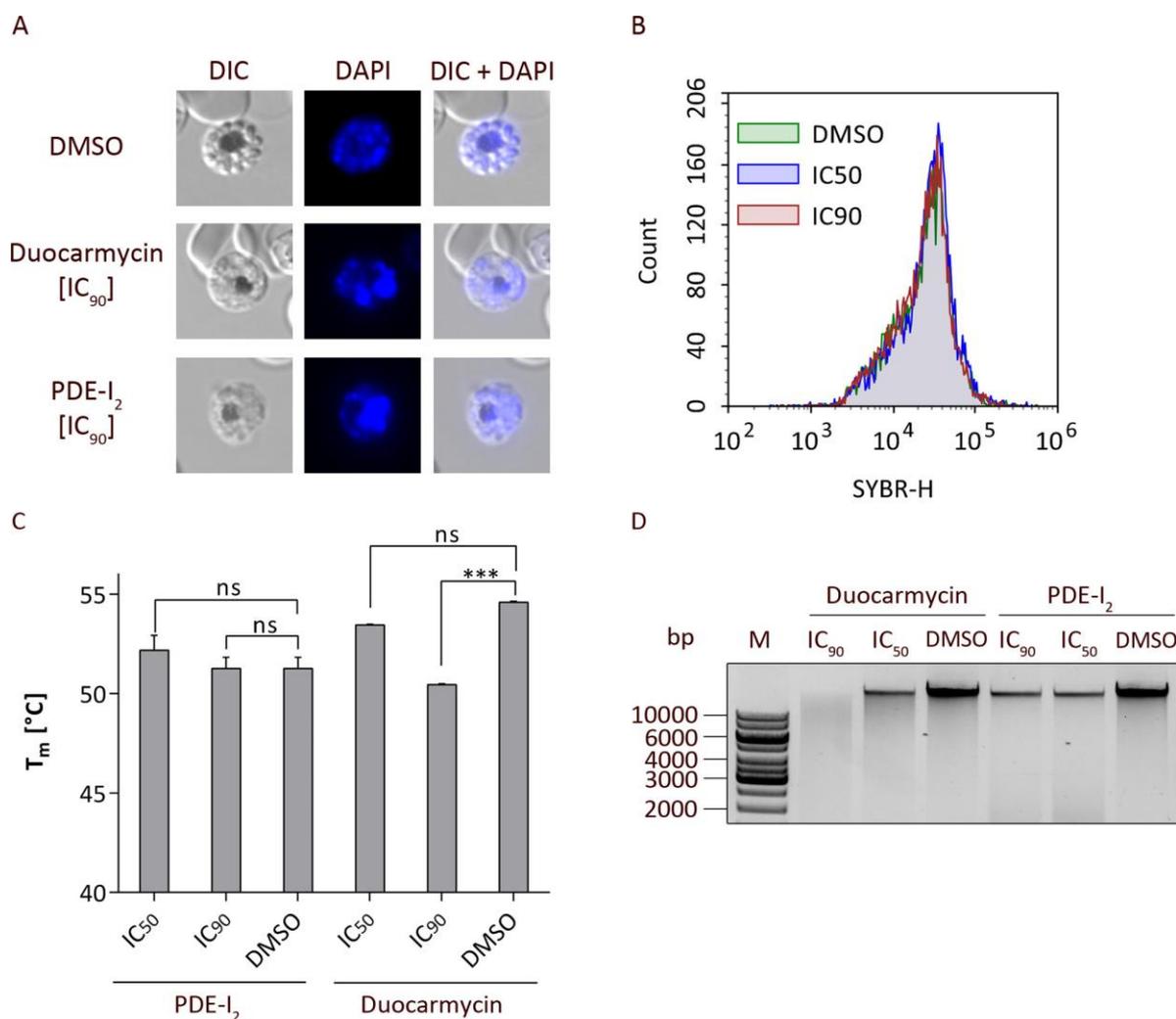


Abb.3.45: Zellkern- und gDNA-spezifische Defekte durch PDE-I₂ und Duocarmycin.

(A) Fluoreszenzmikroskopie von Schizonten nach Behandlung mit PDE-I₂ oder Duocarmycin [IC₉₀]. Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung dargestellt. **(B)** Messung des DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie in SYBR Green-gefärbten Schizonten nach Behandlung mit IC₅₀ (blau) oder IC₉₀ (rot) der Verbindung PDE-I₂ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (grün). **(C)** Schmelztemperaturen isolierter gDNA nach Behandlung mit PDE-I₂ oder Duocarmycin. Schmelzkurven wurden mit einem Light Cycler 480 (Roche) erstellt. Signifikanzanalyse erfolgte in Graphpad Prism mittels Anova **(D)** Agarosegelelektrophorese mit isolierter gDNA (300 ng) nach Behandlung mit PDE-I₂ oder Duocarmycin. M = GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

4. Diskussion

4.1 Kinase-Inhibitoren und ihre Anwendung

Durch die Entstehung und globale Verbreitung von Multi-Drug-resistenten Parasiten sowie das Fehlen einer effektiven Impfung stellt Malaria nach wie vor eine ernste Bedrohung der globalen Gesundheit dar, weshalb dringend neue antiplasmodiale Wirkstoffe benötigt werden (Shetty, 2012; WHO, 2019a). Der komplexe Lebenszyklus des Parasiten und die damit einhergehenden biochemischen Besonderheiten der einzelnen Stadien bieten eine Anzahl von experimentellen Angriffspunkten für eine prophylaktische oder therapeutische Medikamenten- und Impfstoffentwicklung.

Einer dieser Angriffspunkte ist das Merozoitenstadium des Parasiten, welches die Invasion von Erythrozyten während des asexuellen Vermehrungszyklus gewährleistet (siehe Einleitung, Abschnitt 1.2.2.3). Somit sind Merozoiten neben den Sporozoiten die einzigen Stadien des Erregers, die, zumindest für einen kurzen Zeitraum, extrazellulär und somit angreifbar für das Immunsystem vorliegen. Oberflächenproteine dieser Stadien stellen daher Zielstrukturen für spezifische Antikörper des Wirtsorganismus dar und können als Zielstruktur für Wirkstoffe (Teo et al., 2016) oder per se als Impfstoffkandidaten definiert werden (Beeson et al., 2016). Um den Immunangriff des Wirtes zu umgehen, weisen die Parasiten einen ausgeprägten Sequenzpolymorphismus innerhalb dieser Proteine auf, welcher den Erregerpopulationen im Wirt das Überleben sichert (Tanabe et al., 2013).

Eine elegante Strategie, um diesen Immunevasionsmechanismus des Parasiten experimentell zu umgehen, stellt sich jedoch dar, wenn nicht auf diese Oberflächenproteine der Parasiten als antiplasmodialer Angriffspunkt gezielt wird, sondern auf Regulationsprozesse, welche die Wirtszellinvasion des Erregers steuern. Die enzymatische Proteinphosphorylierung (Kato et al., 2008; Leykauf et al., 2010; Solyakov et al. 2011; Lasonder et al., 2012; Alam et al., 2015; Patel et al., 2019; Wilde et al., 2019) und auch Dephosphorylierung (Khalife et al., 2016) sind hier von besonderem Interesse.

Somit stellen Kinase- und auch Phosphatase-Inhibitoren vielversprechende Wirkstoffe zur Therapie einer Vielzahl von Erkrankungen wie Krebs (Ma & Adjei, 2009; Huang et al., 2014; Sun & Bernards, 2014), Herz-Kreislaufkrankungen (Kikuchi et al., 2014), neurodegenerative Störungen (Muth et al., 2015), Diabetes (Banks et al., 2015; Ezzat et al., 2018) oder entzündliche Erkrankungen (Barnes 2013; Clark et al., 2014;) dar (Rask-Andersen et al., 2014; Wu et al., 2015; Klaeger et al., 2017). Bisher werden Kinase-Inhibitoren vor allem zur Krebstherapie eingesetzt, wobei diese zytostatische, antiproliferative, antitumorale und antiangiogenetische Eigenschaften haben (Rask-Andersen et al., 2014; Wu et al., 2015). Kinase-Inhibitoren wie Lapatinip, Sunitinib und Sorafenib sind bereits zur Krebsbehandlung zugelassen (Cameron et al., 2008; Abdelgalil et al., 2019; Ferrari et al., 2019). Darüber hinaus befindet sich eine Vielzahl weiterer Wirkstoffe in der Phase klinischer Studien (Asghar et al., 2015; Tadesse et al., 2019).

Zudem sind Kinase- und Phosphatase-Inhibitoren auch bei der Bekämpfung von Krankheitserregern wie *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma* und *Plasmodium* von hohem Interesse (Khalife et al., 2016; Dichiara et al., 2017; van Voorhis et al., 2017; Yadav et al., 2019), wobei eine Vielzahl von spezifischen Kinase-Inhibitoren sich jedoch erst in der prä-klinischen Erprobung befindet (Sah et al., 2019; Choi et al., 2020).

Bei der Behandlung von Malaria erreichte bisher nur ein einziger Kinase-Inhibitor als potentielle antiplasmodiale Verbindung die Phase klinischer Studien. Hierbei handelt es sich um die Verbindung MMV390048, ein Inhibitor der plasmodialen Phosphatidylinositol-4-Kinase, der eine antiplasmodiale Aktivität gegen alle Stadien des Parasiten mit Ausnahme von Hypnozoiten vermittelt (Younis et al., 2012; McNamara et al., 2013; Paquet et al., 2018). Erste klinische Studien zeigten, dass es sich hierbei um einen vielversprechenden Partnerwirkstoff zur Malariatherapie oder Prophylaxe handelt (McCarthy et al., 2020; Sinxadi et al., 2020).

Zudem konnten bei einem phänotypischen Screen der Firma Novartis, aus dem das TCAM Set hervorging, für 48% der über 13.000 antiplasmodialen Hits Kinasen als potentielle Zielstrukturen identifiziert werden (Gamo et al., 2010). Dies verdeutlicht, dass Kinase-Inhibitoren auch bei der Therapie von Malaria ein enormes Potential besitzen. In aktuellen Studien wurden Kinasen wie CDPK1, CLK3, TMK und PKG als potentielle Zielstrukturen für neue antiplasmodiale Wirkstoffe untersucht (Alam et al., 2019; Byun et al., 2020; Chen et al., 2020; Jain et al., 2020; Vanaerschot et al., 2020).

4.2 Glykogen-Synthase-Kinase 3 Inhibitoren als vielseitiges Therapeutikum

Besonders die Glykogen Synthase Kinase 3, die im Menschen durch Phosphorylierung von mehr als 100 Substraten an einer Vielzahl zellbiologischer Prozesse beteiligt ist, stellt ein attraktives Target für die Behandlung verschiedenster Erkrankungen dar (Beurel et al., 2015; Wadhwa et al., 2020; vgl. auch Abschnitt 1.2.6). In zahlreichen Studien wurde GSK3 als potentielles therapeutisches Target für Erkrankungen wie Depressionen (Jope, 2011), Schizophrenie (Singh, 2013), Multiple Sklerose (De Sarno et al., 2008), Asthma (Bao et al., 2007), Arthritis (Cuzzocrea et al., 2007) und viele weitere Erkrankungen untersucht (Hostiuc et al., 2018). Im letzten Jahrzehnt wurden zahlreiche GSK3 β -Inhibitoren beschrieben, von denen sich einige in der Phase klinischer Studien befinden (Wadhwa et al., 2020).

Einen vielversprechenden Wirkstoff stellt der GSK3 β -Inhibitor Tideglusib dar (Domíguez et al., 2012), der sich derzeit in der klinischen Testung gegen verschiedene Erkrankungen befindet: Da GSK3 β durch die Phosphorylierung von Tau an Prozessen wie axonalem Transport, Acetylcholin-Synthese, Beta-Amyloid Produktion und Integrität von Synapsen beteiligt ist, (Hostiuc et al., 2018), wurde Tideglusib zunächst als potentieller Wirkstoff zur Behandlung von Alzheimer getestet (del Ser et al., 2013; Lovestone et al., 2015). Ebenso wurde der Wirkstoff in mehreren klinischen Studien zur Behandlung der degenerativen Gehirnerkrankung progressive supranukleäre Blickparese untersucht (Höglinger et al., 2014; Tolosa et al., 2014;

Höglinger et al., 2017). Aktuelle Untersuchungen lassen zudem darauf schließen, dass Tideglusib auch die Regeneration von Dentin stimulieren kann und somit zur Behandlung von Läsionen im Zahnschmelz eingesetzt werden könnte (Hostiuc et al., 2018; Lektemur et al., 2020; Zaugg et al., 2020).

In weiteren klinischen Studien wurde auch Lithium und der ATP-kompetitive GSK3 β -Inhibitor LY2090314 zur Behandlung der akut myeloischen Leukämie getestet und wurden als mögliche neue therapeutische Strategie für die Erkrankung angesehen (Rizzieri et al., 2016; Ueda et al., 2020). Die Sicherheit des Inhibitors LY2090314 wurde zudem in einer ersten klinischen Studie in Kombination mit den Zytostatika Carboplatin und Permetrexed zur Behandlung von Tumoren getestet und für sicher befunden (Gray et al., 2015).

In einer aktuellen Studie wurde zudem die Hypothese aufgestellt, dass der potentielle entzündungshemmende Effekt von Chloroquin bei der Behandlung von COVID-19 auf einer Inhibierung der humanen GSK3 β beruht (Embi et al., 2020).

Auch bei Infektionskrankheiten mit Parasiten wie *Leishmania* wurde eine Inhibierung der GSK3 als mögliche Strategie zur Therapie der Infektion untersucht. Hierbei dient jedoch die parasitäre GSK3 als Zielstruktur zur Behandlung der Infektion (Martínez de Iturrate et al., 2020).

Die Tatsache, dass auch die GSK3 aus *Plasmodium* bei phänotypischen Screens der Firmen Novartis und GlaxoSmithKline als potentielles Target für einige der antiplasmodialen Hits identifiziert wurde, verdeutlicht, dass die Kinase auch zur Therapie von Malaria eine mögliche Zielstruktur darstellt (Gamo et al., 2010; Guigumede et al., 2010).

4.3 Charakterisierung der rekombinanten *PfGSK3 β*

PfGSK3 β erscheint durch Phosphorylierung des essentiellen Invasionsliganden AMA1 eine wichtige regulatorische Rolle bei der Invasion von Erythrozyten zu spielen (Prinz et al., 2016). Die Mutation der GSK3-Phospho-Akzeptor Seitenkette in der cytoplasmatischen Domäne (Threonin 613) führt zu einer drastischen Reduktion der Wirtszellinvasion. Somit wurde die Kinase in der vorliegenden Arbeit als potentielle Zielstruktur für antiplasmodiale Wirkstoffe charakterisiert.

Hierfür wurde *PfGSK3 β* zunächst als rekombinantes Protein heterolog in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Anhand der rekombinanten *PfGSK3 β* erfolgte anschließend eine funktionelle Analyse der Kinase, wobei spezifische Charakteristika des Proteins, die Reaktionskinetik sowie die Regulation der Kinaseaktivität untersucht wurden. Hierfür wurde unter anderem ein Lumineszenz-basierter *in vitro* Kinase Assay (KinaseGlo Plus, Promega) für *rPfGSK3 β* etabliert, der neben einer Aktivitätsbestimmung und Reaktionskinetik auch die Identifizierung spezifischer Kinase-Inhibitoren ermöglicht.

In Vorversuchen wurde im Rahmen meiner Masterarbeit bereits ein Protokoll für die rekombinante Expression von *PfGSK3 β* in *E. coli* BL21(DE3-RIL) etabliert. Dieses ermöglichte zwar eine Darstellung von *rPfGSK3 β* in Reinform, jedoch konnte hierbei nur eine geringe Proteinausbeute von 250 μ g *rPfGSK3 β* pro drei Liter Bakterienkultur erreicht werden. Bei einer Studie zur heterologen Expression von plasmodialen Proteinen in *E. coli* konnten von 1000 getesteten Genen lediglich 337 in einer Bakterienkultur exprimiert werden. Davon konnten nur 63 in löslicher Form aufgereinigt werden, wobei die Ausbeute mit 0,9 bis 407 mg pro Liter Bakterienkultur stark schwankte (Mehlin et al., 2006). Somit scheint es generell nur für wenige plasmodiale Proteine möglich zu sein, diese in löslicher Form in *E. coli* zu exprimieren, wobei die Ausbeute stark vom entsprechenden Protein abhängig zu sein scheint. In Zusammenarbeit mit Dr. Christian Löw und Samuel Pažický (EMBL/CSSB Hamburg) konnte das Expressionsprotokoll optimiert werden, sodass 1,5 mg Protein aus einem Liter Bakterienkultur gewonnen werden konnten. Die gesteigerte Proteinausbeute lässt sich hierbei vor allem auf die Verwendung des *E. coli* Stammes C41 zurückführen, der scheinbar eine stärkere Expression von *rPfGSK3 β* ermöglicht. BL21 stellt einen gut etablierten *E. coli* Stamm dar, der weit verbreitet Anwendung bei der heterologen Expression von Proteinen findet (Jeong et al., 2015). Die starke Proteinexpression in BL21 ist hierbei auf eine T7 RNA Polymerase zurückzuführen, die im Vergleich zur zelleigenen RNA Polymerase eine deutlich höhere transkriptionelle Aktivität aufweist (Studier & Moffatt, 1986; Studier et al., 1990). Die gesteigerte transkriptionelle Aktivität kann jedoch auch zu einer Induktion von zellulärem Stress führen, der sich negativ auf die Proteinausbeute auswirkt (Studier et al., 1990; George et al., 1994; Schlegel et al., 2015). Studien konnten zeigen, dass der Stamm C41 (Miroux & Walker, 1996), der aus BL21 hervorgeht, bei einer Vielzahl von rekombinanten Proteinen generell eine verbesserte Proteinausbeute gewährleistet (Dumon-Seignovert et al., 2004). Dies ist vor allem auf Mutationen im Promotor *lacUV5* zurückzuführen, welche zu einer verringerten Aktivität der T7 RNA Polymerase führen (Wagner et al., 2008; Kwon et al., 2015). Somit sind die Bakterien weniger zellulärem Stress ausgesetzt, sodass die Proteinausbeute gesteigert werden kann (Wagner et al., 2008; Schlegel et al., 2015). Zudem wurde beim Zellaufschluss das Reduktionsmittel TCEP beigefügt, welches möglicherweise ebenfalls die Ausbeute löslichen Proteins erhöht. Bei TCEP handelt es sich um ein mildes Reduktionsmittel, welches die Ausbildung von Disulfidbrücken verhindern kann (Rüegg & Rudinger, 1977). Studien konnten zeigen, dass eine Reduktion von Disulfidbrücken die Ausbildung von Proteinaggregaten verhindern und somit die Ausbeute an löslichem Protein steigern kann (Chagas et al., 2018). Die Reinheit des rekombinanten Proteins konnte zudem durch zusätzliche Auftrennungen mittels Anionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie erreicht werden.

Das aufgereinigte *rPfGSK3 β* Protein, ein funktionelles Protein mit katalytischer Aktivität, folgt hierbei wie die humane GSK3 β (Godemann et al., 1999; Dajani et al., 2003; Danek et al., 2007) der Michaelis-Menten-Kinetik (siehe Ergebnisse, Abschnitt 3.1.4). Die Michaelis-Menten Konstante wurde mit dem verwendeten Peptid-Substrat der humanen Glykogen Synthase 1 (siehe Abschnitt 2.1.7) mit 0,41 μ M ermittelt und entspricht somit einem ähnlichen Wert im

Vergleich zur Reaktionskinetik der humanen GSK3 β : Diese zeigt bei Phosphorylierung des Substrates CdGAP (*cell division cycle 42 GTPase activating protein*) eine Michaelis-Menten-Konstante von 0,5 μM (Danek et al., 2007). Bei Phosphorylierung des Substrats Tau konnte für *HsGSK3 β* eine Michaelis-Menten Konstante von 12 μM beschrieben werden (Godemann et al., 1999). Die Wechselzahl K_{cat} wurde für *rPfGSK3 β* mit $9,5\text{s}^{-1}$ bestimmt und liegt somit ebenfalls in einem ähnlichen Bereich im Vergleich zur humanen GSK3 β , die bei Phosphorylierung der humanen Glykogen Synthase mit $3,7\text{s}^{-1}$ bestimmt wurde (Dajani et al., 2003). Für die humane GSK3 β scheint die Wechselzahl K_{cat} stark abhängig vom phosphorylierten Substrat zu sein. So konnte für *HsGSK3 β* bei Phosphorylierung des eukaryontischen Translations-Initiationsfaktors 2b (eIF2b) eine deutliche höhere Wechselzahl von 1560s^{-1} beschrieben werden (Stamos et al., 2014).

Für Reaktionskinetiken plasmodialer Proteinkinasen liegen derzeit nur für wenige Kinasen Daten vor. Bei Phosphorylierung eines Peptidsubstrats durch *PfFIKK8* konnte eine Wechselzahl von $0,51\text{s}^{-1}$ ermittelt werden. Das Substrat wurde hierbei jedoch auf Grundlage eines Peptid Scanning Arrays designt und stellt somit kein natives Substrat dar (Osman et al., 2015). Kinase Assays mit rekombinanter *PfPKG* resultierten bei Phosphorylierung eines Peptids der Protein Kinase A in einer Wechselzahl von $5,2\text{s}^{-1}$ (Penzo et al., 2019). Für die plasmodiale Casein Kinase 1 (*PfCK1*) konnte bei Phosphorylierung von α Casein eine Wechselzahl von $15,5\text{s}^{-1}$ bestimmt werden (Barik et al., 1997). Auch diese Daten verdeutlichen, dass sich für die katalytische Aktivität von Kinasen nur schwer ein genereller Wertebereich für die Rate der Substratphosphorylierung definieren lässt.

Die Proteinkristallisation von *rPfGSK3 β* war nicht erfolgreich (siehe Abschnitt 3.1.2). Eine naheliegende Ursache hierfür stellt die heterogene Phosphorylierung der rekombinanten *PfGSK3 β* dar, die bei massenspektrometrischer Analyse detektiert werden konnte (siehe Abschnitt 3.1.2). Die bereits beschriebene Autophosphorylierungs-Aktivität von *HsGSK3 β* und auch *rPfGSK3 β* stellt hierbei die wahrscheinlichste Quelle dieser Modifikation dar (Cole et al., 2004; Lochhead et al., 2006; Bui et al., 2019). Zur Erhöhung der Monodispersität der Probe für die Proteinkristallisation wurden verschiedene Mutationen in das Protein eingebracht: Zum einen weist das humane Homolog eine essentielle Aminosäure (Lys85) in der ATP-Bindetasche auf (Sun et al., 2008). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass auch die Phosphorylierung von Tyr216 in der Aktivierungsschleife von *HsGSK3 β* Einfluss auf die katalytische Aktivität der Kinase haben kann (Hughes et al., 1993; Dajani et al., 2001). Beide Motive sind in der plasmodialen GSK3 β als Lys96 bzw. Tyr229 konserviert (vgl. Abb.5.7, siehe Anhang). Massenspektrometrische Daten bestätigen zudem, dass Tyr229 und auch das nahe gelegene Ser226 in asexuellen Blutstadien des Parasiten phosphoryliert vorliegen (Solyakov et al., 2011; Treeck et al., 2011; Lasonder et al., 2012). Um eine nicht phosphorylierte Variante von *rPfGSK3 β* zu erhalten, wurden folglich Mutanten heterolog exprimiert, bei denen die genannten Motive zu Alanin mutiert wurden. Bei heterologer Expression und Aufreinigung dieser Mutanten formten diese jedoch stets *Inclusion Bodies*, sodass diese nicht in löslicher Form aufgereinigt werden konnten. Nach Isolation und massenspektrometrischer

Untersuchung der *Inclusion Bodies* konnte zudem gezeigt werden, dass diese *rPfGSK3 β* -Mutanten keinerlei Phosphorylierung aufwiesen (vgl. Abschnitt 3.1.2). Dies lässt ebenso darauf schließen, dass die detektierten Phosphorylierungen bei *rPfGSK3 β* durch eine Autophosphorylierung vermittelt werden und die Phosphorylierungen essentiell für die Löslichkeit des Proteins sind. Dies entspricht Versuchen, die mit der humanen GSK3 β durchgeführt wurden. Hierbei findet die Autophosphorylierung unmittelbar nach der Proteinbiosynthese innerhalb eines Chaperonkomplexes während der Proteinfaltung statt (Lochhead et al., 2006).

Weiterführende Untersuchungen mit *rPfGSK3 β* ergaben zudem Hinweise, dass nicht nur die Löslichkeit, sondern auch die enzymatische Aktivität vom Phosphorylierungsstatus abhängig ist. Die Auftrennung von Wildtyp-*rPfGSK3 β* mittels Anionenaustauschchromatographie (IEX) konnte *rPfGSK3 β* in vier Fraktionen auftrennen, die eine unterschiedlich starke Phosphorylierung des N-Terminus aufwiesen (siehe Abb.3.8). Eine Analyse der Fraktionen mittels KinaseGlo Plus zeigte, dass diese je nach Phosphorylierung des N-Terminus eine gesteigerte Kinaseaktivität aufwiesen. Falls es sich bei einer Autophosphorylierung um einen intrinsischen Prozess handelt, der nicht beeinflussbar ist, stellt sich hierbei jedoch die Frage, inwiefern die Phosphorylierung des N-Terminus in direktem Zusammenhang mit der Kinaseaktivität steht. Untersuchungen von Lochhead et al. (2006) zeigten, dass eine Autophosphorylierung von *HsGSK3 β* nur assoziiert mit HSP90 möglich ist. Auch die Autophosphorylierung der humanen Kinasen PKD und p38 sind durch assoziierte Co-Faktoren reguliert (DeNicola et al., 2013; Cobbaut et al., 2018). Ob ein entsprechender Co-Faktor von *PfGSK3 β* bei heterologer Expression in *E. coli* vorliegt, erscheint jedoch fraglich. Vermutlich ist die gesteigerte Aktivität im *in vitro* Assay auf die bessere Löslichkeit der stärker phosphorylierten Varianten der Kinase zurückzuführen. Somit bleibt jedoch weiterhin unklar, wie die Kinaseaktivität von *PfGSK3 β* im Parasiten spezifisch reguliert werden kann. Für die humane GSK3 β konnte beschrieben werden, dass die initiale Autophosphorylierung von Tyr216 in der Aktivierungsschleife die Kinase in eine aktive Konformation überführt (Dajani et al., 2001). Die Aktivität von *HsGSK3 β* kann anschließend durch Phosphorylierung von Ser9 des N-Terminus negativ reguliert werden. Somit vermittelt beispielsweise die humane Proteinkinase B (AKT) in Folge einer Insulinausschüttung die Phosphorylierung von Ser9, woraufhin dieses als Pseudosubstrat die Substratbindetasche im katalytischen Zentrum der Kinase blockiert. Diese Inaktivierung von *HsGSK3 β* führt wiederum zu einer Aktivierung der Glykogen Synthase und somit zum Aufbau von Glykogen (Sutherland et al., 1993; Welsh & Proud, 1993; Sutherland & Cohen, 1994; Cross et al., 1995). Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenzen wird jedoch deutlich, dass die plasmodiale GSK3 β und die beiden humanen Isoformen keinerlei nennenswerte Konservierung des N-Terminus aufweisen (Abb.5.7, siehe Anhang). Somit ist nicht auszuschließen, dass die N-Termini der Kinasen je nach Organismus unterschiedliche regulatorische Rollen spielen. Es erscheint zudem wahrscheinlich, dass die plasmodiale GSK3 β in Folge einer Phosphorylierung durch eine andere Kinase reguliert wird. Phosphoproteom-Analysen weisen zwei phosphorylierte Seitenketten (S226 & Y229) in asexuellen Stadien des Parasiten aus (Solyakov et al., 2011;

Treeck et al., 2011; Lasonder et al., 2012), wobei die rekombinante *PfGSK3 β* eine Anzahl weiterer Phosphorylierungsstellen aufweist (Abb.5.6, siehe Anhang). Interagierende Kinasen könnten im Parasiten mit Strategien wie der Markierung von Proteinen in unmittelbarer Nähe (*Proximity-dependent Labelling/BioID*; Roux et al., 2012) mit anschließendem Pulldown und massenspektrometrischer Analyse identifiziert werden. Da Interaktionen zwischen Kinasen und ihren Substraten nur von kurzer Dauer sind (siehe oben, Wechselzahlen/ K_{cat}), stellt sich jedoch die Frage, ob Strategien wie BioID geeignet sind, um entsprechende Substrate zu identifizieren. Untersuchungen in *Arabidopsis thaliana*, die zur Zeit als Preprint veröffentlicht sind, konnten jedoch zeigen, dass die GSK3-ähnliche Kinase BIN2 als Fusion mit TurboID in der Lage ist, bekannte Substrate zu biotinylieren (Kim et al., 2019; bioRxiv Pre-print). Alternativ können Kinase und Substrat mithilfe von Crosslinking-Strategien kovalent an einander gebunden und anschließend als Komplex isoliert werden (Suwal & Pflum, 2010; Garre et al., 2014; Dedigama-Arachchige et al., 2016; Garre et al., 2018).

4.4 Identifizierung spezifischer *PfGSK3 β* -Inhibitoren

Eine Schwierigkeit bei der Identifizierung spezifischer Inhibitoren ist die Tatsache, dass es sich bei der GSK3 um eine hochkonservierte Kinase mit Homologen in Säugern bis hin zu Einzellern handelt (Ojo et al., 2008; Wernimont et al., 2008; Xingi et al., 2009; Osolodkin et al., 2011). Basierend auf Strukturmodellen und bioinformatischen Analysen kamen verschiedene Studien jedoch zu dem Schluss, dass die plasmodiale und die humane GSK3 ausreichend strukturelle Unterschiede aufweisen und eine selektive Hemmung somit möglich wäre (Droucheau et al., 2004; Kruggel & Lemcke, 2009; Osolodkin et al., 2011). Erste Untersuchungen mit Kinase-Inhibitoren bestätigten dies. Verbindungen wie Alsterpaullon zeigten zu einem gewissen Grad eine selektive Hemmung der Enzyme (Schultz et al., 1999; Leost et al., 2000; Droucheau et al., 2004).

Schließlich wurden bei einem *High-Throughput Screening* Verbindungen mit einem 3-Amino-4-arylthieno[2,3-b]pyridin-Motiv als vielversprechende Leitstrukturen identifiziert (Fugel et al., 2013). Da bisher keine Kristallstruktur von *PfGSK3 β* zur Verfügung steht, wurden anhand eines *PfGSK3 β* -Homologiemodells (Kruggel & Lemcke, 2009) basierend auf der Leitstruktur verschiedene potentielle Inhibitoren gegen die ATP-Bindetasche der plasmodialen GSK3 β modelliert. Anschließend wurde unter anderem der Inhibitor 5v synthetisiert, der eine vielversprechende Aktivität und Selektivität ($IC_{50}[Pf]$: 480 nM vs. $IC_{50}[Hs]$: 3,3 μ M) aufweist (Fugel et al., 2013). Verschiedene 5v-Derivate, die zu den Thieno[2,3-b]pyridinen gehören, wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht (KuMas-Reihe, synthetisiert von Andreas Masch; vgl. Masch, 2016; Masch et al., 2019). Als weitere Inhibitor-Klasse wurden Verbindungen der KuHL-Reihe untersucht (synthetisiert von Hoang Lande, vgl. Lande, 2016), wobei es sich um Bisindolylcyclobutendione handelt.

Thieno[2,3-b]pyridine wurden bisher als ADP-Antagonisten zur Hemmung der Thrombozytenaggregation eingesetzt: Wirkstoffe wie Clopidogrel und Prasugrel stellen

zugelassene Therapeutika zur Vorbeugung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Blutgerinnseln dar (Wiviott et al., 2007; Pereira et al., 2019). Weitere Studien konnten Verbindungen mit einer Thieno[2,3-b]pyridin-Grundstruktur als potente Herbizid-Antidots beschreiben (Dotsenko et al., 2019). Darüber hinaus zeigen Thieno[2,3-b]pyridine antiproliferative Eigenschaften gegen verschiedene Tumorzelllinien (Feng et al., 2012; Arabshahi et al., 2014; Hung et al., 2014; Sirakanyan et al., 2019). Ebenso wurden Thieno[2,3-b]pyridin-Derivate als Inhibitoren der hepatischen Gluconeogenese beschrieben (Ma et al., 2018). Zudem konnten Thieno[2,3-b]pyridine als Inhibitoren des nichtstrukturellen Proteins 4B des Hepatitis C Virus beschreiben werden und stellen somit potentielle Wirkstoffe zur Behandlung chronischer Hepatitis dar (Xiao et al., 2019). Als Kinase-Inhibitoren wurde die Verbindungsklasse im Menschen bereits im Zusammenhang mit Proteinkinase C und der Rho-Kinase 1 (ROCK) beschrieben, deren physiologische Funktionen im Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen wie Asthma, Krebs, erektile Dysfunktion, Glaukom, Insulin-Resistenz, Nierenversagen, neurodegenerative Erkrankungen und Osteoporose stehen (Feng et al., 2016; Miao et al., 2020; Liu et al., 2020). Im Hinblick auf die Behandlung von Malaria wurden Verbindungen mit einer Thieno[2,3-b]pyridin-Grundstruktur bereits 1973 als potentielle Antifolate mit antiplasmodialer Aktivität diskutiert, der hierbei beobachtete antiplasmodiale Effekt konnte jedoch lediglich im Mausmodell beschrieben werden und bei anderen *Plasmodium*-Arten nicht reproduziert werden (Rosowsky et al., 1973). Ein Hauptproblem der Thieno[2,3-b]pyridin-Verbindungen stellt zudem deren geringe Wasserlöslichkeit dar (Zafar et al., 2018).

Strukturell gehen die Bisindolylcyclobutendion-Verbindungen auf den bereits etablierten Kinase-Inhibitor Staurosporin zurück, der erstmals 1977 aus *Streptomyces staurosporeus* isoliert werden konnte (Omura et al., 1977). Staurosporin selbst stellt einen promiskuen Kinase-Inhibitor dar, dessen unspezifische Aktivität sich problematisch bei der Behandlung von Erkrankungen erweist (Tanramluk et al., 2009). Als Multikinasehemmer zeigt die Verbindung jedoch auch eine vielversprechende Aktivität gegenüber Parasiten wie *Trypanosoma*, *Leishmania* und *Plasmodium* (Ward et al., 1994; Dluzewski & Garcia, 1996; Pimentel-Elardo et al., 2010). Eine antiplasmodiale Aktivität der Bisindolylcyclobutendion-Verbindungen KuHL101, KuHL047 und KuHL174 konnte bereits bestätigt werden (Lande, 2016). Es war bisher jedoch nicht klar, ob der antiplasmodiale Effekt auf einer Hemmung der *PfGSK3* beruht.

Um dies zu untersuchen, wurden analog zu Fugel et al. (2013) Verbindungen, die bei einer Konzentration von 10 μ M mindestens 50% Inhibierung der Kinaseaktivität von *rPfGSK3 β* zeigten, als aktiv definiert. Auf Grundlage dieser Definition lassen die gewonnenen Daten darauf schließen, dass es sich bei den untersuchten Bisindolylcyclobutendionen (KuHLs) um keine *PfGSK3 β* -Inhibitoren handelt, wo hingegen innerhalb der KuMas-Reihe drei neue *PfGSK3 β* -Inhibitoren (KuMas087, KuMas223 und KuMas220) identifiziert werden konnten (siehe Abschnitt 3.2.1). Im Vergleich zum bereits beschriebenen Inhibitor 5v weisen die Verbindungen eine vergleichbare Hemmung der *rPfGSK3 β* auf, zeigen jedoch eine deutlich gesteigerte Selektivität gegenüber dem humanen Ortholog. Zudem kann geschlossen werden,

dass die *para*-Position des Phenylsubstituten von 5v (Abb.3.9) zum Anfügen polarer Seitenketten und somit zur Erhöhung der Löslichkeit im wässrigen Milieu geeignet ist. Die Löslichkeit von Wirkstoffen in wässriger Lösung stellt eine entscheidende Eigenschaft dar, wenn diese letztlich zur oralen Verabreichung in Betracht gezogen werden (Fan & Lannoy, 2014). Obwohl die Verbindungen KuMas087 und KuMas223 im Vergleich zu Ausgangsverbindung 5v eine ähnliche Aktivität gegenüber rekombinanter *PfGSK3β* aufweisen, zeigen diese jedoch eine mehr als fünffach höhere antiplasmodiale Aktivität. Daraus kann geschlossen werden, dass die gesteigerte biologische Aktivität der Verbindungen auf pharmakokinetische Eigenschaften wie Löslichkeit und Membrangängigkeit zurückzuführen ist. Zudem konnte im Test gegen HEK-Zellen gezeigt werden, dass die untersuchten Verbindungen eine mindestens 5-fach höhere Aktivität gegen *P. falciparum* aufweisen, sodass es sich hierbei nicht um einen unspezifischen cytotoxischen Effekt handelt. Diese und weitere Resultate wurden in Masch et al. (2019) veröffentlicht.

Zudem lässt die Struktur der hier diskutierten Verbindungen darauf schließen, dass diese eine Form der axialen Chiralität aufweisen. Da der *ortho* Chlor-Substituent eine freie Rotation des Phenylrings (Position 4) verhindert, ergibt sich für die Verbindungen eine axiale Chiralität entlang der Biarylbindung an Position 4. (Abb. 3.12) Vor diesem Hintergrund wurde die Hypothese aufgestellt, dass eines der beiden Atropisomere eine stärkere biologische Aktivität aufweisen sollte. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass lediglich die Verbindung KuMas168.1 eine Hemmung der rekombinanten *PfGSK3β* vermittelt. Zudem weist KuMas168.1 eine 38-fach höhere antiplasmodiale Aktivität auf als das entsprechende Isomer KuMas168.2. Diese Daten bestätigen die aufgestellte Hypothese und verdeutlichen, dass KuMas168.1 sich als aktives Eutomer verhält, wo hingegen KuMas168.2 als inaktives Distomer keine Inhibierung der *rPfGSK3β* sowie eine deutlich geringere antiplasmodiale Aktivität aufweist. Die axiale Chiralität stellt eine interessante Eigenschaft dar, die bereits im Zusammenhang mit der Entwicklung neuer Wirkstoffe diskutiert und als mögliche Strategie zur Verbesserung der Aktivität und Selektivität von Kinase-Inhibitoren untersucht wurde (LaPlante et al., 2011a; LaPlante et al., 2011b; Smith et al., 2015; Masch et al., 2019). Die Bedeutung von Chiralität für die Aktivität von Wirkstoffen kann ebenso anhand der bereits zur Malariabehandlung zugelassenen antiplasmodialen Verbindung Mefloquin verdeutlicht werden. Mefloquin weist vier stereogene Zentren auf, sodass vier verschiedene Enantiomere unterschieden werden können. Das aktuell zur Malariabehandlung verwendete Präparat stellt eine Mischung der zwei aktiven Enantiomere (S,R- und R,S-Form) dar, die ähnliche antiplasmodiale Eigenschaften aufweisen, wo hingegen die übrigen Enantiomere (S,S- und R,R-Form) keine physiologische Aktivität vermitteln (Basco et al., 1992; Karle et al., 1993; Tansley et al., 2010). Zudem wird vermutet, dass das S,R-Enantiomer durch Bindung eines humanen Adenosinrezeptors für neurologische Nebenwirkungen verantwortlich ist, die teilweise im Zusammenhang mit einer Mefloquin-Behandlung auftreten. Somit kann eine Auftrennung in die entsprechenden Enantiomere nicht nur die Aktivität einer Verbindung verbessern, sondern auch genutzt werden, um etwaige Nebenwirkungen zu minimieren. Bei einer klinischen Studie konnte jedoch für Mefloquin kein Vorteil bei alleiniger Verabreichung

der R,S-Form im Vergleich zum R,S/S,R-Gemisch beobachtet werden (Tansley et al., 2010). Aktuelle Untersuchungen konnte schließlich zeigen, dass die neurologischen Nebenwirkungen von Mefloquin vermutlich durch eine Inaktivierung des humanen Acyl-CoA-Bindenden-Proteins (hACBP) und daraus folgendem Redox-Stress in Neuronen folgt (Kumar et al., 2020).

Die identifizierten *Pf*GSK3 β -spezifischen Kinase-Inhibitoren wurden zudem genutzt, um *Pf*GSK3 β als antiplasmodiales Drug Target zu charakterisieren. Wie bereits bei Fugel et al. (2013) beschrieben, wurden Verbindungen, die bei einer Konzentration von 15 μ M eine Inhibierung von mindestens 80% der Parasitenproliferation vermittelten, als antiplasmodial aktiv definiert. Auf Grundlage dieser Definition lassen die gewonnenen Daten darauf schließen, dass alle Verbindungen der KuHL-Reihe sowie fünf der sieben KuMas-Verbindungen antiplasmodiale Verbindungen darstellen. Interessanterweise zeigten somit auch solche Verbindungen eine antiplasmodiale Wirkung, für die zuvor jedoch keine Aktivität gegenüber *rPf*GSK3 β detektiert werden konnte. Somit scheint für zumindest einige der Verbindungen ein weiteres Target im Parasiten zu existieren, ein Effekt, der bereits bei der Entdeckung der Leitstruktur der KuMas- und KuBra-Verbindungen beobachtet werden konnte (Fugel et al., 2013). Ebenso scheint es sich bei allen untersuchten Bisindolylcyclobutendion-Verbindungen (KuHLs) um antiplasmodiale Verbindungen zu handeln, obwohl diese keine Aktivität gegenüber *rPf*GSK3 β zeigten. Somit scheint auch hier eine andere Zielstruktur im Parasiten zu existieren, deren Inhibierung den antiplasmodialen Effekt vermittelt. Für die Bisindolylcyclobutendion-Verbindungen KuHL101, KuHL047 und KuHL174 konnten bereits bekannte IC₅₀-Werte (0,64 μ M; 0,47 μ M und 0,38 μ M vgl. Lande, 2016) in einem ähnlichen Konzentrationsbereich reproduziert werden (1,04 μ M; 0,72 μ M; 0,42 μ M; vgl. Abb.3.14). Auch für den Thieno[2,3-b]pyridin-Inhibitor 5v konnte der bereits publizierte IC₅₀-Wert von 5,5 μ M (Fugel et al., 2013) mit 5,2 μ M reproduziert werden (Abb.3.14). Mit IC₅₀-Werten zwischen 0,2 und 9,4 μ M weisen die untersuchten Verbindungen jedoch generell eine geringere antiplasmodiale Aktivität als bereits etablierte Malaria-Therapeutika wie Chloroquin (13 nM), Artemisinin (11 nM) oder Pyrimethamin (10 nM) auf (Baniecki et al., 2007).

Da das Ziel der vorliegenden Arbeit jedoch die Validierung von *Pf*GSK3 β als potentielle antiplasmodiale Zielstruktur war, wurde lediglich der antiplasmodiale Effekt der zuvor identifizierten *Pf*GSK3 β -spezifischen Verbindungen (5v, KuMas087, KuMas223 und KuMas220) weiter charakterisiert. Hierbei konnte für jede der Verbindungen ein Defekt bei der Wirtszellinvasion beobachtet werden. Für die Verbindung 5v konnte dieser Effekt bereits von Prinz et al. (2016) beschrieben werden. Invasions-spezifische IC₅₀-Werte bewegten sich hierbei in einem Konzentrationsbereich zwischen 2,4 μ M und 32,3 μ M. Bei höheren Konzentrationen konnte auch eine Reduktion des Egress beobachtet werden. Auch dieser Effekt konnte für die Verbindung 5v bereits in Prinz et al. (2016) beschrieben werden. Der Defekt bei der Wirtszellinvasion konnte jedoch lediglich erreicht werden, wenn die *Pf*GSK3 β -inhibierenden Verbindungen ca. 12 Stunden vor dem Egress der Parasiten appliziert wurden. Erfolgte die Behandlung bereits in frühen Ringstadien, waren Parasiten im Falle von KuMas223 und KuMas087 nicht in der Lage den Zyklus zu vollenden und wurden bei ca. 40 hpi pyknotisch.

Somit scheinen zumindest die Verbindungen KuMas223 und KuMas087 gewisse *Off-Target*-Effekte im Parasiten zu vermitteln. Da es sich bei den hier untersuchten Verbindungen um ATP-Kompetitoren handelt, wäre es möglich, dass diese auch mit der ATP-Bindetasche anderer Enzyme interagieren und somit unspezifische Effekte hervorrufen. Da die katalytisch aktiven Domänen eukaryontischer Proteinkinasen einen hohen Grad an Konservierung aufweisen, scheint dies ein generelles Problem bei der Selektivität von Kinase-Inhibitoren darzustellen (Cohen, 2002). Eine Strategie um diese Problematik zu umgehen, könnte durch die Entwicklung allosterischer Inhibitoren erreicht werden, eine Strategie, die bereits bei der plasmodialen Protein Kinase G zum Einsatz kam (Byun et al., 2020).

4.5 Physiologische Untersuchung von *PfGSK3β* mithilfe von *Reverse Genetics*

Die veröffentlichten spezifischen *PfGSK3β*-Inhibitoren und die hier vorgestellten neuen Verbindungen sind ein deutlicher Hinweis auf die entscheidende physiologische Bedeutung dieses Enzyms für die asexuelle Proliferation, insbesondere für die Erythrozyteninvasion. Jedoch sind *Off-Target*-Effekte für alle Inhibitoren, die im zellulären oder systemischen Assay eingesetzt werden, zu berücksichtigen.

Genetische Untersuchungen bezüglich der physiologischen Funktion von *PfGSK3β* in *P. falciparum* sind nicht konsistent. So konnte die Kinase bei Untersuchungen des plasmodialen Kinoms nicht deletiert werden und zeigte sich auch im PiggyBac Transposon Screen als nicht mutierbar, weshalb das Gen als vermutlich essentielle Kinase annotiert wurde (Solyakov et al., 2011; Zhang et al., 2018b). Bei einem Screen im nahe verwandten Erreger *Plasmodium berghei* war eine *Targeted Gene Disruption* von *PfGSK3β* jedoch erfolgreich (Janse et al., 2011). Um die Essentialität von *PfGSK3β* in *P. falciparum* zu klären, wurden dieser daher mithilfe verschiedener *Reverse Genetics*-Strategien charakterisiert.

Um eine mögliche physiologische Redundanz von *PfGSK3β* in *P. falciparum* zu untersuchen, wurde der Versuch unternommen, das Gen mittels *Selection Linked Integration* (Birnbaum et al., 2017) zu deletieren. Eine Deletion von *pfgsk3β* war möglich, führte jedoch zu einer Reduktion des Parasitenwachstums von $82\% \pm 9,3$. Dies schien jedoch aufgrund bisheriger Untersuchungen in *P. falciparum* unerwartet:

1. Zum einen schlugen bisherige Versuche, das Gen zu deletieren, fehl (Solyakov et al., 2011) und *PfGSK3β* verhielt sich beim PiggyBac Transposon Screen als nicht mutierbar (Zhang et al., 2018b).
2. Auch der antiplasmodiale Effekt der in Abschnitt 4.4 diskutierten *PfGSK3β*-spezifischen Inhibitoren deutet daraufhin, dass es sich bei *PfGSK3β* um eine essentielle Kinase handelt.

3. Zudem lassen bisherige Untersuchungen darauf schließen, dass die Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von AMA1 essentiell für dessen Funktion und somit die Vermittlung der Wirtszellinvasion ist (Treeck et al., 2009; Leykauf et al., 2010; Prinz et al., 2016; Patel et al., 2019; Wilde et al., 2019). Demnach sollte auch *PfGSK3 β* essentiell für die Wirtszellinvasion und somit das Überleben der Parasiten sein.
4. Die humane GSK3 β ist an zahlreichen essentiellen Stoffwechselprozessen beteiligt (Beurel et al., 2015; Wadhwa et al., 2020 vgl. auch Abschnitt 1.2.6) und auch im Mausmodell nicht deletierbar, sodass ein Knock-out bereits während der Embryonalentwicklung letal wirkt (Hoeflich et al., 2000; Kerkela et al., 2008). Auch in Pilzen wie *Fusarium* und *Schizosaccharomyces* sind GSK3-Orthologe essentiell für Prozesse wie Sporulation und Keimung (Plyte et al., 1996; Quin et al., 2015).

Der Phänotyp der der *PfGSK3 β* Knock-out Zelllinie konnte durch die Komplementierung mit einer episomal exprimierten Wildtyp-Kopie der Kinase revertiert werden (Abb.3.25), woraus geschlossen werden kann, dass der beobachtete Defekt spezifisch ist. Der Wachstumsdefekt von $82\% \pm 9,3$ in Folge des *PfGSK3 β* Knock-outs ist erstaunlicherweise hauptsächlich auf den beobachteten Defekt bei der Wirtszellinvasion zurückzuführen. Des Weiteren ist ein leichter Defekt beim Egress der Parasiten detektiert worden, jedoch erwies sich dieser Effekt als statistisch nicht signifikant.

Die Tatsache, dass die Regulation der Wirtszellinvasion scheinbar die einzige physiologische Funktion der *PfGSK3 β* in asexuellen Stadien ist, erschien unerwartet: Da die Kinase bereits in frühen Trophozoiten exprimiert wird (vgl. Abb.1.15 & 3.20) und in der Zelle verschiedene Lokalisationen (Zellkern, Cytosol, perinukleäre Foci, vgl. Abb.3.20; Prinz et al., 2016) zeigt, lässt dies auf mehrere physiologische Funktionen schließen. Die Tatsache, dass die GSK3 im Menschen eine Vielzahl von Substraten besitzt und somit an der Regulation verschiedenster Stoffwechselprozesse beteiligt ist (Beurel et al., 2015), wäre ebenso ein Hinweis darauf, dass auch *PfGSK3 β* neben AMA1 weitere Substrate phosphoryliert. Aufgrund der oben beschriebenen Lokalisation der plasmodialen GSK3 β im Parasiten wären folgende weitere Funktionen zu erwarten gewesen: Die Lokalisation im Zellkern lässt sich möglicherweise auf eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren zurückzuführen, wie es für die humane GSK3 β bereits beschrieben werden konnte (Turenne & Price, 2001). Die perinukleären Foci der *PfGSK3 β* im Schizonten sind möglicherweise auf eine Lokalisation an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums zurückzuführen. Hier könnte beispielsweise eine Phosphorylierung von Translationsfaktoren durch *PfGSK3 β* stattfinden, wie es ebenfalls bereits für die humane GSK3 β beschrieben werden konnte (Welsh et al., 1998; Wang et al., 2001; Woods et al., 2001). Zudem konnte *HsGSK3 β* auch im Zusammenhang mit dem Zellzyklus und der Zellteilung beschrieben werden (Diehl et al., 1998; Ikeda et al., 1998; Yamamoto et al., 1999; Turenne & Price, 2001), sodass ein Knock-out von *PfGSK3 β* eventuell zu einem Defekt bei der Bildung von Tochtermerozoiten führen könnte. Da neben einer Beteiligung an der Wirtszellinvasion in der vorliegenden Arbeit jedoch keine weiteren

Funktionen der *PfGSK3 β* nachgewiesen werden konnten, bleibt die Ursache für die beschriebene Lokalisation und das Expressionsprofil unklar. Eine mögliche Ursache hierfür wäre die Tatsache, dass die potentiellen Funktionen der *PfGSK3 β* im Zellkern und den perinukleären Foci redundante physiologische Prozesse darstellen, weshalb sich der Knock-out alleinig auf die Wirtszellinvasion auswirkt.

Somit ist *PfGSK3 β* entgegen einer Vielzahl von experimentellen Ergebnissen nicht essentiell für die asexuelle Proliferation der Parasiten. Hierfür lassen sich mehrere Gründe diskutieren:

1. Die physiologische Funktion von *PfGSK3 β* wird im Parasiten kompensiert. Eine entsprechende Anpassung könnte während der Selektionsphase der *Targeted Gene Disruption* stattgefunden haben, wobei es zu einer Hochregulierung anderer Kinasen gekommen sein könnte, die anschließend die physiologische Funktion von *PfGSK3 β* kompensieren. Eine entsprechende Hochregulierung anderer Kinasen in Folge des *PfGSK3 β* Knock-outs könnten mittels Transkriptomanalysen wie RNA-Sequenzierung untersucht werden.
2. *PfGSK3 β* besitzt zwar eine wichtige Funktion für eine effiziente Proliferation des Parasiten, ist jedoch nicht unverzichtbar für ein Überleben des Erregers. In Bezug auf die *PfGSK3 β* -abhängige Phosphorylierung von AMA1 ist folgendes Szenario denkbar: Untersuchungen von Patel et al. (2019) zeigten, dass die Phosphorylierung von AMA1 durch Protein Kinase A zu einer Konformationsänderung der cytoplasmatischen Domäne von AMA1 führt, welches möglicherweise eine Art Aktivierung des Liganden darstellt. Eventuell reicht diese Phosphorylierung durch PKA bereits aus, um eine Funktionalität zu vermitteln, die jedoch durch eine zweite, *PfGSK3 β* -abhängige Phosphorylierung weiter gesteigert wird. Somit wäre eine Wirtszellinvasion auch ohne *PfGSK3 β* -abhängige Phosphorylierung von AMA1 möglich, jedoch weniger effizient. Die Phosphorylierung durch PKA ist jedoch nachweislich essentiell für die Wirtszellinvasion (Patel et al., 2019; Wilde et al., 2019).
3. Eine naheliegende Möglichkeit wäre eine Expression der potentiellen zweiten Isoform von *PfGSK3*, die in asexuellen Blutstadien des Parasiten gewöhnlich nicht exprimiert wird (vgl. Abschnitt 4.6). Ein ähnlicher Mechanismus konnte beispielsweise für die plasmodiale Kinase CDPK1 beschrieben werden, dessen Inaktivierung zu einer Hochregulierung von CDPK5 und CDPK6 führt (Bansal et al., 2016). Ein entsprechendes Phänomen konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Zudem erscheint es fraglich, ob die potentielle zweite Isoform der Kinase die Funktion von *PfGSK3 β* im Parasiten übernehmen kann.

Eine Strategie um die eventuelle Anpassung an den Knock-out zu umgehen, ist der Einsatz von induzierbaren Knock-down Systemen. Da der Zeitpunkt des Knock-downs hierbei zu einem

gewünschten Zeitpunkt gezielt induziert werden kann, steht dem Parasiten keine Zeit für eine etwaige Anpassung zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene induzierbare Systeme für *PfGSK3 β* untersucht, die auf verschiedenen Ebenen der Genexpression wirken. Das CreLox System erlaubt einen Knock-down auf DNA-Ebene durch gezielte Exzision des Zielgens mithilfe einer Cre-Rekombinase (Collins et al., 2013a; Jones et al., 2016). Zudem wurde das glmS-System verwendet, welches eine Degradation der mRNA des Zielgens mithilfe eines Glucosamin-aktivierten Ribozyms erlaubt (Prommana et al., 2013). Als drittes System kam die *Knock sideways* Strategie zum Einsatz, wobei auf Proteinebene eine Relokalisierung des Zielproteins induziert werden kann, sodass dieses vom ursprünglichen Wirkort in der Zelle entfernt wird (Geda et al., 2008; Haruki et al., 2008; Patury et al., 2009; Robinson et al., 2010; Xu et al., 2010; Papanikou et al., 2015; Birnbaum et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch mit keinem der Systeme ein Wachstumsdefekt erreicht werden (Cre/Lox: 15%; GlmS: 30%; Knock Sideways: Kein Wachstumsdefekt), der über den Defekt der *Targeted Gene Disruption* (82%) von *PfGSK3 β* hinausging.

Jedoch scheint die Effizienz des Knock-downs ein generelles Problem bei der funktionellen Analyse von Genen mit induzierbaren Systemen zu sein, sodass selten ein vollständiger Knock-down des Zielgens erreicht werden kann (de Koning-Ward et al., 2015). Ebenso kann nach Induktion des Knock-downs bereits vorhandene mRNA des Zielgens bzw. bereits vorhandenes Zielprotein in der Zelle verbleiben, und je nach Stabilität die entsprechende Funktion in der Zelle aufrecht erhalten. Sowohl mit dem CreLox- als auch dem glmS-System konnte kein vollständiger Knock-down von *PfGSK3 β* im Parasiten erreicht werden (CreLox: 97%, siehe Abb.3.28 und glmS: 56%, siehe Abb.3.30). Bei der *Knock sideways* Strategie lassen fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zwar darauf schließen, dass die *PfGSK3 β* erfolgreich relokalisiert werden konnte, jedoch kann nicht sicher bestätigt werden, dass Restmengen des Proteins am ursprünglichen Wirkort verblieben sind.

Es ist bekannt, dass geringste Restmengen des entsprechenden Proteins ausreichend sein können, um dessen Funktion im Parasiten aufrecht zu erhalten (Birnbaum et al., 2020). Somit kann bei einem fehlenden Phänotypen in Folge des Knock-downs eine Essentialität des Zielgens nicht automatisch ausgeschlossen werden.

Zudem weisen die Systeme weitere potentielle Fehlerquellen auf, die sich auf die Effizienz des Knock-downs auswirken können. So konnte in der vorliegenden Arbeit beim CreLox-System gezeigt werden, dass die DiCre-Rekombinase bereits vor Induktion des Knock-downs teilweise eine Aktivität aufweist. Sollte sich diese Aktivität bereits auf die Fitness der Parasiten auswirken, schmälert dies den detektierten Wachstumsdefekt beim direkten Vergleich von Parasiten mit und ohne Induktion des Knock-downs. Beim glmS System konnte bereits beschrieben werden, dass die Effizienz hierbei generell stark vom untersuchten Gen abhängt, sodass die Effizienz des Knock-downs bei diesem System zwischen 50% und 90 % schwankt (Prommana et al., 2013; de Koning-Ward et al., 2015). Zudem enthält das in der vorliegenden Arbeit verwendete Medium der Parasitenkultur bereits 6 mM Zucker. Eventuell hat eine

weitere Zugabe von Glucosamin daher keinen weiteren Effekt bei der Aktivierung des glmS-Ribozyms.

Beim *Knock sideways* konnte gezeigt werden, dass nach Transfektion des Mislocalizers nicht alle Parasiten eine Expression dieses Ankerproteins aufweisen, welches ebenfalls die Effizienz des Systems beeinträchtigt.

Folglich stellen induzierbare Knock-down Systeme eine attraktive Strategie zur funktionellen Charakterisierung von Proteinen dar, sofern der induzierte *Knock-down* zu einem Phänotypen im Parasiten führt. Ist nach dem induzierten *Knock-down* im Parasiten kein Wachstumsdefekt zu beobachten, kann jedoch nicht automatisch drauf geschlossen werden, dass das untersuchte Gen redundant ist.

Zusammenfassend wurde mittels *Reverse Genetics* ein wichtiger Hinweis geliefert, dass *PfGSK3 β* essentiell für eine effiziente Proliferation asexueller Blutstadien von *P. falciparum* ist und eine entscheidende Funktion bei der Invasion von Erythrozyten einnimmt. Somit konnten die genetischen Experimente den zuvor mithilfe von *PfGSK3 β* -spezifischen Inhibitoren induzierten Phänotypen reproduzieren (vgl. Abschnitt 4.4).

Somit kann *PfGSK3 β* als mögliches antiplasmodiales Drug Target angesehen werden. Eine optimale Zielstruktur wäre jedoch eine vollständig essentielle Kinase, dessen Hemmung vermutlich eine deutlich effizientere antiplasmodiale Wirkung hätte. Bei der Suche nach Zielstrukturen für Medikamente verschiedenster Art wird daher zum Großteil nach essentiellen Targets gesucht. Besonders im Zusammenhang mit Antibiotika-Resistenzen bei bakteriellen Infektionen wurde jedoch auch der Einsatz von Wirkstoffen diskutiert, die nicht vollständig essentielle Prozesse angreifen. Eine Strategie hierbei war, entsprechende Wirkstoffe gegen nicht essentielle Targets als eine Art Adjuvans in Kombination mit dem eigentlichen Wirkstoff zu verabreichen. Hierbei kann durch Angriff der nicht essentiellen Zielstruktur bereits eine Reduktion der Fitness des Erregers erreicht werden, sodass in Kombination mit dem eigentlichen Wirkstoff eine gesteigerte antimikrobielle Effizienz erreicht werden kann (Garland et al., 2017). Somit kann die Ausbildung von Resistenzen durch ineffiziente Behandlung minimiert werden (Wright, 2016; Annunziato, 2019). Zudem wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch die Targets selbst, die nicht per se essentiell für ein Überleben sind, mit geringerer Wahrscheinlichkeit Mutationen ausbilden, die zu einer Resistenz führen (Allen et al., 2014; Annunziato, 2019). Eine weitere Strategie im Zusammenhang mit Wirkstoffen gegen nicht essentielle Targets ist der Einsatz von sog. Antivirulenz-Inhibitoren zur Unterstützung des Wirts-Immunsystems. Hierbei wird ebenfalls ein nicht essentielles Target gehemmt, wodurch es jedoch zu einer verminderten Fitness des Erregers kommt, weshalb das Immunsystem des Wirtes diesen effizienter eliminieren kann (Rasko & Speradio, 2010; Fernebro, 2011; Allen et al., 2014; Annunziato, 2019). Möglicherweise lassen sich diese Strategien, auch im Hinblick auf die vermehrte Ausbildung von Wirkstoffresistenzen, auf die Behandlung von Malariaerkrankungen übertragen.

4.6 PF3D7_1316000 als potentielle *PfGSK3 α*

Das Gen PF3D7_1316000, stellt eine potentielle Isoform der GSK3 in *Plasmodium* dar, die in der vorliegenden Arbeit als *PfGSK3 α* bezeichnet wurde. Bei Untersuchungen des plasmodialen Kinoms wurde das Gen als Kinase der CMGC-Gruppe annotiert, welches mit der GSK3-Familie clustert (Ward et al., 2004). Darüber hinaus liegen bisher jedoch keine funktionellen Daten vor, die bestätigen, dass es sich hierbei tatsächlich um eine Isoform der GSK3 handelt. PF3D7_1316000 erscheint in Blutstadien nicht deletierbar bzw. nicht mutierbar (Solyakov et al., 2011; Zhang et al., 2018b). Interessanterweise ist das Gen in Blutstadien jedoch nicht transkribiert (Wichers et al., 2019) und es liegen keine Proteom-Daten vor, die eine Translation nachweisen. Dem gegenüber scheint PF3D7_1316000 jedoch laut Transkriptom-Analysen in Gametozyten-Stadien exprimiert zu sein (Young et al., 2005; López-Barragán et al., 2011; Pelle et al., 2015; Lasonder et al., 2016), welches auf eine Rolle bei der Gametozytogenese hindeutet.

Aminosäure-Sequenzvergleiche der plasmodialen Orthologe mit den beiden humanen GSK3-Isoformen zeigten, dass, wie zu erwarten, essentielle Bereiche wie die Substrat-Bindetasche, das katalytische Zentrum und eine Tyr-Phosphorylierungsstelle in der Aktivierungsschleife (Hughes et al., 1993; ter Haar et al., 2001) auch in PF3D7_1316000 konserviert sind (Abb.5.7, siehe Anhang).

Um weitere Hinweise darauf zu erlangen, ob es sich bei PF3D7_1316000 tatsächlich um eine weitere GSK3-Isoform des Parasiten handelt, sollte diese analog zu *PfGSK3 β* zunächst als rekombinantes Protein nach heterologer Expression in *Escherichia coli* untersucht werden. Eine heterologe Expression von PF3D7_1316000 konnte jedoch in keinem der verwendeten *E. coli* Stämme erreicht werden. Wie bereits in Abschnitt 4.3 diskutiert, scheint eine heterologe Expression in *E. coli* nur für einige plasmodiale Proteine problemlos möglich zu sein (Mehlin et al., 2006).

Obwohl es keinen Hinweis auf eine Expression der Isoform in asexuellen Blutstadien gibt, wurde diese episomal überexprimiert, um die Lokalisation mit *PfGSK3 β* zu vergleichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass diese Isoform im Gegensatz zu *PfGSK3 β* als mCherry-Fusionsprotein in der Nähe des Hämozoinkristalls lokalisiert, welches möglicherweise auf den nmd3-Promotor und die starke Überexpression zurückzuführen ist. Dies wird durch eine weitere Kontrolle betätigt, bei der die Expression unter Kontrolle des Schizonten-spezifischen AMA1-Promotors als GFP-Fusion erfolgte. Hier entspricht die Lokalisation nahe dem Zellkern und im Cytosol der Lokalisation von *PfGSK3 β* (Prinz et al., 2016).

Obwohl sich die humanen GSK3-Isoformen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg offenbar redundant zueinander verhalten, sind diese bei anderen essentiellen Stoffwechselfunktionen im Menschen nicht als äquivalent zu betrachten (Hoeflich et al., 2000; Doble et al., 2007; MacAulay et al., 2007; Kerkela et al., 2008; Force & Woodgett, 2009). Untersuchungen in *Trypanosoma brucei* und *Leishmania donovani* deuteten ebenfalls darauf hin, dass die beiden

Orthologe der Parasiten unterschiedliche Funktionen aufweisen und einander nicht komplementieren können (Ojo et al., 2008; Xingi et al., 2009).

4.7 Identifizierung weiterer synthetischer antiplasmodialer Verbindungen

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung neuer antiplasmodial-wirksamer, synthetischer Verbindungen. Auf Grundlage der KuMas-Verbindungen (Masch et al., 2019) wurde in der Arbeitsgruppe von Prof Dr. Conrad Kunick (TU Braunschweig) eine weitere Reihe potentiell antiplasmodialer Verbindungen synthetisiert (KuSaSch-Reihe, synthetisiert von Sandra Schweda vgl. Abschnitt 3.5).

Eine interessante Eigenschaft dieser neuen Verbindungen ist die Tatsache, dass keine der 44 Verbindungen eine nennenswerte Aktivität gegenüber *rPfGSK3 β* aufwies und auch gegenüber der humanen GSK3 durch ausgewählte Verbindungen der KuSaSch Reihe keine Aktivität detektiert werden konnte. Somit scheint das Ersetzen der Keto-Gruppe durch eine Carbonsäureamid-Struktur zu einem vollständigen Verlust der GSK3-inhibierenden Aktivität zu führen. Da alle KuSaSch-Verbindungen diese Carbonsäureamid-Struktur aufweisen und dies den einzigen generellen Unterschied zu den Verbindungen der KuMas-Reihe darstellt, scheint der Verlust der GSK3-inhibierenden Aktivität, wenn auch unerwartet, allein auf dieser Modifikation zu beruhen. Eine Erklärung dafür, weshalb diese Veränderung der Grundstruktur zu einem Verlust der GSK3-Hemmung führt, konnte bisher nicht gefunden werden.

Obwohl die KuSaSch-Verbindungen keine Aktivität gegenüber rekombinanter *PfGSK3 β* aufweisen, zeigten viele der Verbindungen eine vielversprechende antiplasmodiale Aktivität mit IC_{50} -Werten, die sich teilweise im zweistelligen nanomolaren Bereich bewegen (Abb.3.39) und einer teilweise mehr als 100-fachen Selektivität (Abb.3.38). Somit scheint die antiplasmodiale Aktivität dieser Verbindungen auf der Hemmung einer anderen Zielstruktur zu beruhen, die bisher nicht bekannt ist. Um Hinweise auf die Zielstruktur der Verbindungen zu erhalten, könnten diese in Gegenwart subletaler Dosen der Inhibitoren kultiviert werden, wodurch diese eventuell eine Resistenz gegenüber der Verbindung aufbauen. Anschließend könnte mittels Sequenzierung des parasitären Genoms nach Mutationen gesucht werden, die im Zusammenhang mit der Resistenz stehen und somit Hinweise auf ein potentielles Target geben. Hierbei stellt sich jedoch stets die Frage, ob das mutierte Gen dem direkten Drug Target entspricht oder lediglich mit der Resistenz assoziiert ist (Cowell & Winzeler, 2019). Im Falle des antiplasmodialen Protease-Inhibitors Bortezimib konnte diese Strategie jedoch bereits erfolgreich genutzt werden, um die $\beta 5$ -Untereinheit des Proteasoms als spezifisches Target dieser Verbindung zu identifizieren (Xie et al., 2018). Ebenso konnte das Target der Azetidin-Verbindung BRD3444 mit dieser Strategie in der α -Untereinheit der parasitären Phenylalanin-tRNA-Synthetase (PheRS) identifiziert werden (Kato et al., 2016).

In Bezug auf Struktur-Aktivitäts-Beziehungen lassen die gewonnenen Daten darauf schließen, dass die Keto-Gruppe der Vorläufer-Verbindungen der KuBra- und KuMas-Reihe durch eine

Carbonsäureamid-Struktur ersetzt werden kann, ohne dass ein Verlust der antiplasmodialen Aktivität gefürchtet werden muss. Jedoch scheint diese Modifikation zu einem generellen Verlust der GSK3-inhibierenden Aktivität der Verbindungen zu führen. In Bezug auf die antiplasmodiale Aktivität der Verbindungen wird deutlich, dass Vertreter wie KuSaSch101, KuSaSch110, KuSaSch111 und KuSaSch122, bei denen der 5-Cyano- und der 6-Amino-Substituent der heterozyklischen Grundstruktur durch andere Motive ersetzt wurde (siehe Abb.3.35), die höchste antiplasmodiale Aktivität aufweisen. Somit scheint, wie bereits in früheren Untersuchungen vermutet (Fugel et al., 2013; Masch et al., 2019), sowohl der 5-Cyano- als auch der 6-Amino-Substituent der heterozyklischen Grundstruktur kein essentielles Motiv in Bezug auf die antiplasmodiale Aktivität der Verbindungen darzustellen.

Somit konnte mit den KuSaSch-Verbindungen eine neue Reihe hoch potenter antiplasmodialer Verbindungen mit vielversprechender Selektivität identifiziert werden, deren Zielstruktur im Parasiten bisher jedoch unbekannt bleibt. Dennoch repräsentieren die hier identifizierten Verbindungen exzellente Ausgangsstrukturen die Entwicklung neuer antiplasmodialer Wirkstoffe.

4.8 Verbindung PDE-I₂ aus *Streptomyces* sp.

Viele der zugelassenen Malariatherapeutika wie der DHPS-Inhibitor Sulfadoxin, der DHFR-Inhibitor Pyrimethamin oder Chinin-Derivate wie Mefloquin und Chloroquin entsprechen synthetischen Verbindungen (Dieckmann & Jung, 1986a; Dieckmann & Jung, 1986b; Achan et al., 2011). Weitere hoch wirksame Malariamedikamente wie Chinin und Artemisinin sind jedoch nicht-synthetisch und stellen pflanzliche Naturstoffe dar (Achan et al., 2011; Tu, 2011). Ebenso konnten antiplasmodiale Verbindungen in Pilzen oder Bakterien identifiziert werden (Ahmad et al., 2017; Zhang et al., 2018c). Dies verdeutlicht, welches große Potential Naturstoffe bei der Entdeckung neuer antiplasmodialer Verbindungen bieten.

In der Arbeitsgruppe Gilberger (BNITM) wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerry Wright der McMaster University (Hamilton, Kanada) eine Sammlung mikrobieller Extrakte der McMaster University auf antiplasmodiale Verbindungen gescreent. Bei der Sammlung handelte es sich um die *Wright Actinomycete Collection* (WAC), die Extrakte von rund 10.000 verschiedenen mikrobiellen Stämmen enthält, die aus Bodenproben weltweiten Ursprungs gewonnen wurden (Thaker et al., 2013). Diese beinhalten zum Großteil Stämme der Actinomyceten, jedoch auch einige weitere Bakterien-Spezies sowie Pilzarten (Thaker et al., 2013). Hierbei konnte letztlich die Verbindung PDE-I₂ identifiziert werden, die in der vorliegenden Arbeit weiter charakterisiert wurde. Die gewonnenen Daten zeigen, dass es sich bei Verbindung PDE-I₂ um eine hoch potente und selektive antiplasmodiale Verbindung handelt, deren IC₅₀ sich gegen *P. falciparum* (3D7) mit 31 nM im unteren nanomolaren Bereich befindet, gegen HEK-Zellen (IC₅₀: 34 µM) jedoch 1100-fach höher ist. Somit weist PDE-I₂ eine vergleichbare Aktivität wie bereits etablierte Malaria-Therapeutika wie Chloroquin (13 nM), Artemisinin (11 nM) oder Pyrimethamin (10 nM) auf (Baniecki et al., 2007). Auch der

multiresistente Stamm *Pf7G8* zeigte keine geminderte Sensitivität gegenüber PDE-I₂, woraus geschlossen werden kann, dass die Verbindung einen neuen antiplasmodialen Wirkmechanismus vermittelt, der von bestehenden Resistenzen in der Erregerpopulation unbeeinflusst bleibt.

Der Wirkmechanismus von PDE-I₂ konnte in der vorliegenden Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden, jedoch lassen die gewonnenen Daten zum genetischen Ursprung der Verbindung sowie strukturelle Vergleiche mit ähnlichen Verbindungen Rückschlüsse auf eine mögliche Wirkweise zu:

Beim strukturellen Vergleich wird deutlich, dass die Verbindung PDE-I₂ einem Dimer eines Phosphodiesterase-Inhibitors (PDE-I) entspricht, der bereits aus *Streptomyces* isoliert werden konnte und je nach Substratkonzentration die cAMP-Phosphodiesterase im Rattenhirn mit moderater Aktivität (13 μ M bei 10 μ M Substrat) hemmt (Enomoto et al., 1978). Zudem besteht eine hohe Strukturähnlichkeit zur Duocarmycin-verwandten Verbindung CC-1065 (Rachelmycin). Verbindungen wie CC-1065 und andere Duocarmycine wie Yatakemycin stellen extrem zytotoxische Verbindungen dar, die ihre Zytotoxizität durch Alkylierung von DNA an der N3-Position der Adenine vermitteln (Boger et al., 1990; Boger, 1993). Die Alkylierung der DNA erfolgt hierbei mithilfe einer Cyclopropan-Struktur im Molekül. Untersuchungen mit einem Methylester-Derivat von PDE-I₂ konnten zwar zeigen, dass die Verbindung in der Lage ist mit AT-reichen DNA-Regionen zu interagieren (Boger et al., 1990), die alkylierende Cyclopropan-Struktur fehlt der PDE-I₂-Verbindung jedoch.

Hinsichtlich des genetischen Ursprungs konnte gezeigt werden, dass Verbindung PDE-I₂ das Produkt einer unvollständigen Duocarmycin-Synthese darstellt. Sequenzanalysen in der Arbeitsgruppe Wright konnten zeigen, dass der Stamm *Streptomyces sp.* WAC04114 ein biosynthetisches Gencluster aufweist, welches für die Synthese von PDE-I₂ verantwortlich ist. Ein nahezu identisches Gencluster konnte bereits in *Streptomyces zelensis* NRRL 11183 identifiziert werden (Abb.3.42) und vermittelt dort die Synthese des verwandten Duocarmycin-Vertreters CC-1065 (Wu et al., 2017).

Zudem ähnelt die Verbindung PDE-I₂ sehr stark einem Zwischenprodukt, welches bei der Synthese von CC-1065 entsteht (Wu et al., 2017). Durch das Enzym rSAM (Radikal S-Adenosyl-L-Methionin) wird dieses Zwischenprodukt letztlich mit der DNA-alkylierenden Cyclopropan-Struktur versehen, sodass das toxische Endprodukt CC-1065 entsteht. Auch bei der Biosynthese von Yatakemycin konnte dieser Mechanismus bereits beschrieben werden (Huang et al., 2012). Um sich selbst vor dem toxischen Endprodukt zu schützen, weist der Stamm *Streptomyces zelensis* NRRL 11183 im entsprechenden biosynthetischen Gencluster jedoch ein Resistenzgen auf. Das codierte *Gyrl-like*-Protein vermittelt eine Hydrolyse der DNA-alkylierenden Cyclopropan-Struktur und somit eine Selbstresistenz gegenüber dem toxischen Endprodukt (Yuan et al., 2017). Eine entsprechende Resistenzgen fehlt im biosynthetischen Gencluster von *Streptomyces sp.* WAC04114 jedoch. Somit stellt die unvollständige Biosynthese von CC-1065, aus der Verbindung PDE-I₂ resultiert, vermutlich einen

Schutzmechanismus aufgrund der fehlenden Selbstresistenz vor dem toxischen Endprodukt dar.

Generell handelt es sich bei natürlich vorkommenden Antibiotika wie Duocarmycinen um sekundäre Metabolite von Mikroorganismen, die teilweise in deutlich niedrigeren Konzentrationen produziert werden, als dies für eine therapeutische Wirkung erforderlich wäre (Sengupta et al., 2013). Aus diesem Grund wurde zunächst geschlossen, dass diese Metabolite nicht dazu dienen „lebende Prozesse“ zu beeinflussen (Waksman, 1961). Aktuellere Studien kamen jedoch zu einem gegenteiligen Schluss (Gullberg et al., 2011). So können entsprechende Metabolite dem Mikroorganismus in seinem natürlichen Lebensraum das Überleben sichern und sehr wohl dazu beitragen sich im Wettbewerb um Nährstoffe gegen konkurrierende Mikroorganismen durchzusetzen, sodass ein Selektionsvorteil in der ökologischen Nische erlangt werden kann (Davies, 1990). So kann beispielsweise der Antibiotika-produzierende Bakterienstamm *Streptomyces diastatochromogenes* das Wachstum des Bakterienstamms *Streptomyces scabies* kontrollieren, ein Bakterium, das bei Kartoffelpflanzen den sog. Kartoffelschorf hervorruft (Neeno-Eckwall et al., 2001). Damit cytotoxische Metabolite wie Duocarmycin nicht tödlich auf die eigene Zelle wirken, ist hierbei stets eine Selbstresistenz gegenüber dem produzierten Antibiotikum erforderlich (siehe oben; Yuan et al., 2017). Neben der antibiotischen Wirkung konnten sekundäre Metabolite in Mikroorganismen jedoch auch im Zusammenhang mit weiteren Funktionen beschrieben werden: So können entsprechende Metabolite in sub-letalen Dosen zelleigene Prozesse wie die Genexpression regulieren (Davies et al., 2006), bei symbiotisch oder gemeinschaftlich lebenden Mikroorganismen als Signalmoleküle dienen (Davies et al., 2006; Sengupta et al., 2013) oder bei pathogenen Mikroorganismen die Immunantwort des Wirts modifizieren (Melhus, 2001). Für therapeutische Zwecke im Menschen sind entsprechende Metabolite jedoch in erster Linie aufgrund ihrer antibiotischen Wirkung von Interesse (Mohr, 2016).

Für die antiplasmodiale Aktivität der Verbindung PDE-I₂ können mindestens zwei potentielle Wirkmechanismen diskutiert werden. Zum einen könnte PDE-I₂ als Dimer eines cAMP-Phosphodiesterase-Inhibitors eine Hemmung der plasmodialen Phosphodiesterasen vermitteln. Im plasmodialen Genom sind insgesamt vier Phosphodiesterasen codiert (PDE α , PDE β , PDE γ , PDE δ), von denen jedoch nur PDE β essentiell in asexuellen Blutstadien ist (Yuasa et al., 2005; Taylor et al., 2008; Wentzinger et al., 2008; Moon et al., 2009; Lakshmanan et al., 2015; Schwach et al., 2015; Zhang et al., 2018b). Zudem wurden Phosphodiesterasen bereits als potentielle Targets für antiplasmodiale Wirkstoffe untersucht (Howard et al., 2011; Howard et al., 2015). Aktuelle Untersuchungen zeigten jedoch, dass Parasiten nach einem induzierten Knock-out der plasmodialen PDE β eine normale Entwicklung bis hin zum Egress zeigen, anschließend jedoch einen Defekt bei der Wirtszellinvasion aufweisen (Flueck et al., 2019). Bei Behandlung mit PDE-I₂ kam es jedoch bereits vor der Segmentierung der Schizonten zu einem Stillstand der Entwicklung des Parasiten. Somit erscheint eine Hemmung der PfPDE β durch PDE-I₂ als alleiniger Wirkmechanismus unwahrscheinlich.

Eine wahrscheinlichere Erklärung für die antiplasmodiale Wirkung von PDE-I₂ ist die bereits beschriebene Interaktion mit AT-reichen Regionen der genomischen DNA, welche sich auf die strukturelle Integrität der DNA auswirkt (Boger et al., 1990; Boger, 1993). Hierbei kommt es bei Verbindung CC-1065 durch Alkylierung zur einer Hyperstabilisierung der DNA, welches zu einer Beeinträchtigung der Transkription und Replikation führt. Zudem verbleibt die Zelle in der G₂-Phase und tritt somit nicht in die Mitose ein (Tietze et al., 2009; Boyle et al., 2018). Für PDE-I₂ ist aufgrund der fehlenden Cyclopropan-Struktur jedoch keine alkylierende Aktivität zu erwarten, jedoch ist die phänotypische Manifestation (Arretierung im frühen Schizonten ohne Ausbildung von Tochtermerozoiten) eventuell mit einer späten Blockierung der Mitose vergleichbar. Möglicherweise reicht die Interkalation von PDE-I₂ in die DNA-Doppelhelix bereits aus, um die DNA-Funktionalität erheblich zu beeinträchtigen. Studien mit den DNA-interkalierenden Verbindungen DAPI und Pluramycin konnten bereits zeigen, dass die Interkalation dieser Verbindungen in die DNA-Doppelhelix einer Interaktion mit DNA-bindenden Proteinen wie Polymerasen oder Endonukleasen blockieren kann (Wilson et al., 1990; Henderson & Hurley, 1996). Somit könnte auch eine Interkalation von PDE-I₂ in die DNA-Doppelhelix bereits zu einem Replikationsblock im Parasiten führen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zudem einige experimentelle Hinweise geliefert, dass PDE-I₂ mit der genomischen DNA interagiert: i) Zellkerne PDE-I₂-behandelter Parasiten weisen keine DAPI-spezifische Färbung auf (siehe Abb.3.45). Bei DAPI handelt es sich um einen DNA-spezifischen Farbstoff, der vor allem mit AT-reichen Regionen der kleinen Furche der Doppelhelix interagiert (Kapuscinski, 1995). ii) Genomische DNA aus PDE-I₂-behandelten Parasiten lässt sich im Vergleich zu Kontroll-DNA deutlich schlechter mit Ethidiumbromid in der Agarosegelelektrophorese darstellen (Abb.3.45). Möglicherweise inhibiert eine Interkalation von PDE-I₂ in die DNA-Doppelhelix eine weitere Interkalation von DAPI oder Ethidiumbromid.

In Folge einer Behandlung mit Duocarmycin kam es sogar zu einem vollständigen Verschwinden der gDNA-Bande im Agarosegel. Somit könnte Duocarmycin generell eine stärkere Interaktion mit DNA aufweisen als PDE-I₂. Zudem kommt es wie oben beschrieben durch die Alkylierung zu einer Hyperstabilisierung der DNA, weshalb die Zelle nicht in die Mitose eintreten kann und es letztlich zur Induktion der Apoptose kommt (Tietze et al., 2009; Boyle et al., 2018). Während der Apoptose kommt es neben dem Abbau von nukleären Proteinen und dem Cytoskelett zu einer Fragmentierung der DNA durch aktivierte Endonukleasen (D'Arcy, 2019). Somit wäre es möglich, dass PDE-I₂ lediglich zu einem Replikationsblock im Parasiten führt, wobei Duocarmycin darüber hinaus zur Induktion der Apoptose und Degradation der genomischen DNA führt.

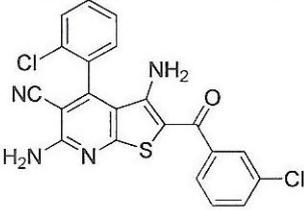
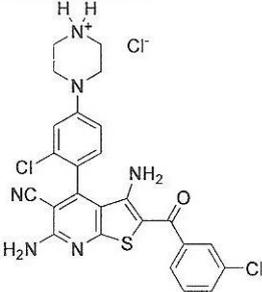
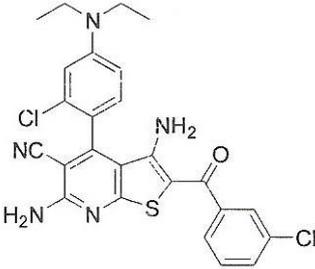
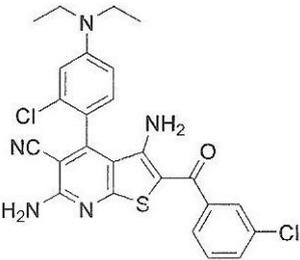
Bisher wurden Duocarmycine und entsprechende Derivate vor allem als anti-Tumor Wirkstoffe in Form von Antikörper-Konjugaten für die Behandlung spezifischer Krebsarten untersucht und befinden sich teilweise bereits in unterschiedlichen Phasen klinischer Studien (Tietze et al., 2009; Boyle et al., 2018; Banerji et al., 2019; Tong et al., 2019). Aktuelle Studien

zeigten zudem, dass Duocarmycin-Analoga auch als Inhibitoren der Aldehyd-Dehydrogenase 1 oder als Tyrosinkinase-Inhibitoren genutzt werden können und somit zytotoxisch gegenüber Krebszellen wirken, die diese Enzyme verstärkt exprimieren (de Ford et al., 2019).

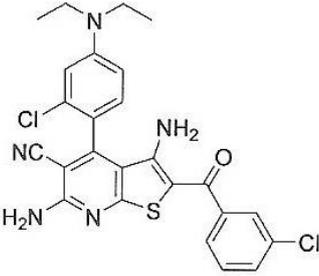
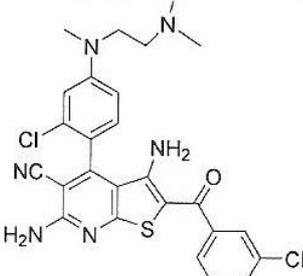
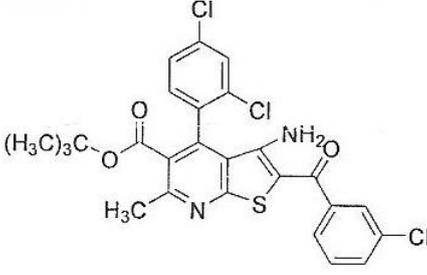
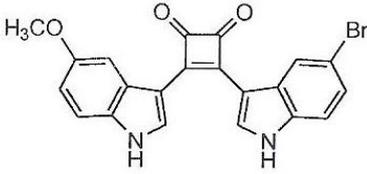
Die Tatsache, dass diese Verbindungen mit AT-reichen Regionen der DNA interagieren, stellt jedoch vor allem bei der Behandlung von Infektionen mit *Plasmodium* einen entscheidenden Vorteil dar. Da *Plasmodium* generell ein extrem AT-reiches Genom aufweist (ca. 82%; Weber, 1987), sind die Parasiten im Vergleich zu humanen Zellen vermutlich hypersensitiv gegenüber Duocarmycinen und Derivaten mit ähnlichem Wirkmechanismus. Dies wäre ebenso eine mögliche Erklärung für die hohe Selektivität von PDE-I₂. Die Vorgehensweise, das einzigartig AT-reiche Genom des Parasiten als Zielstruktur für DNA-alkylierende Wirkstoffe zu nutzen, wurde bereits für Verbindungen wie Luzozeptin, CC-1065, U71184, Tafuramycin, Adozelesin, Bezelesin und Centanamycin untersucht und stellte sich als vielversprechende Strategie zur Entwicklung neuer antiplasmodialer Wirkstoffe heraus (Lee & Inselburg, 1993; Woynarowski et al., 2000; Yanow et al., 2006; Yanow et al., 2007; Kiakos et al., 2018). Darüber hinaus ist die Zielstruktur dieser Wirkstoffe, im Gegensatz zu den meisten antimalarialen Wirkstoffen, kein Protein und stellt somit einen entscheidenden Vorteil im Hinblick auf die etwaige Entwicklung von Resistenzen im Parasiten dar. Resistenzen gegen diese Substanzklasse könnten demnach nur durch indirekte Mechanismen wie verminderte Aufnahme des Wirkstoffs oder einen verstärkten Efflux und Abbau vermittelt werden. Somit stellt auch PDE-I₂ eine exzellente Struktur für die Entwicklung neuer antiplasmodialer Wirkstoffe dar.

5. Anhang

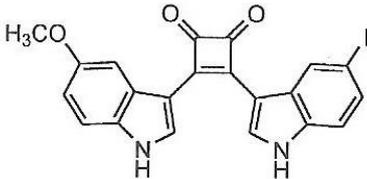
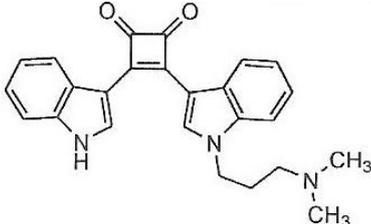
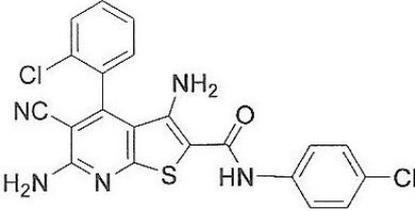
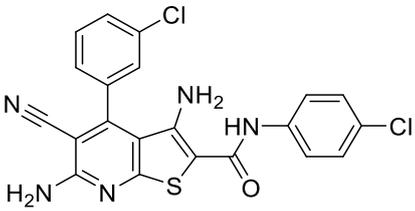
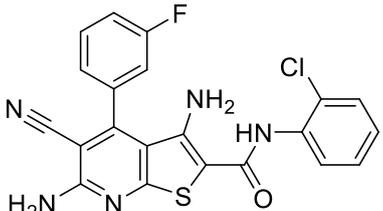
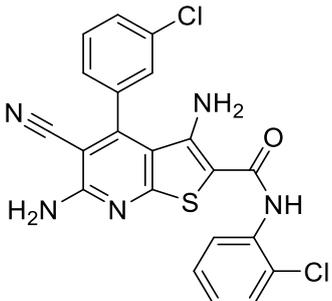
Tab.5.1: Potentielle *PfGSK3* Inhibitoren mit relativer Molekülmasse, Strukturformel sowie zugehöriger Summenformel. Für weitere Informationen zur Synthese sowie entsprechende Referenzen siehe Punkt 2.1.8.

Inhibitor	M_r	Strukturformel	Summenformel
KuBra389 (5v Positivkontrolle)	439.32		$C_{21}H_{12}Cl_2N_4OS$
KuMas087	559.89		$C_{25}H_{21}Cl_3N_6OS$
KuMas065 (Racemat)	510.44		$C_{25}H_{21}Cl_2N_5OS$
KuMas168_1 (Enantiomer 1)	510.44		$C_{25}H_{21}Cl_2N_5OS$

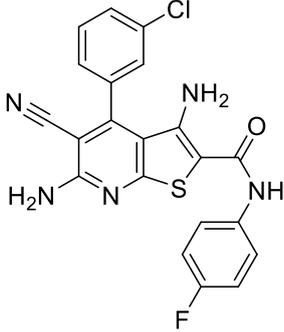
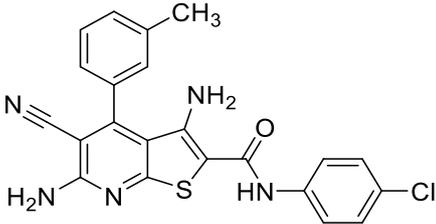
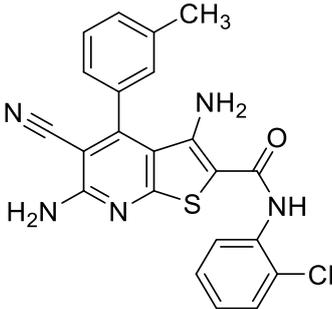
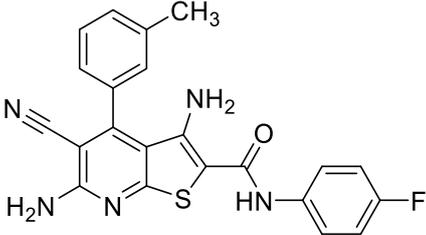
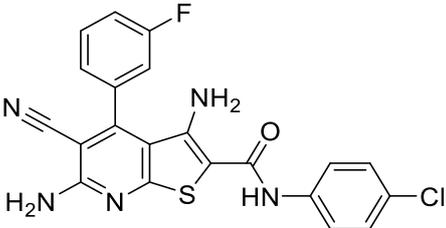
Anhang

KuMas168_2 (Enantiomer 2)	510.44		$C_{25}H_{21}Cl_2N_5OS$
KuMas223	539.48		$C_{26}H_{24}Cl_2N_6OS$
KuMas220	491.77		$C_{22}H_{13}Cl_3N_2O_3S$
KuMas217	547.88		$C_{26}H_{21}Cl_3N_2O_3S$
KuHL047	421.25		$C_{21}H_{13}BrN_2O_3$

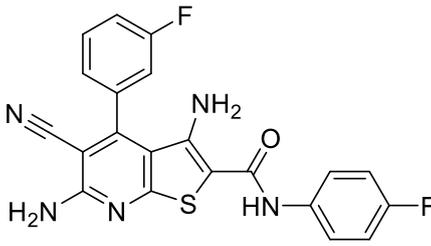
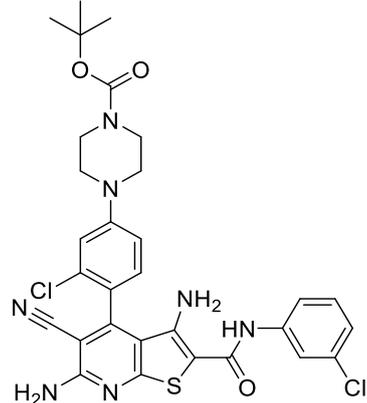
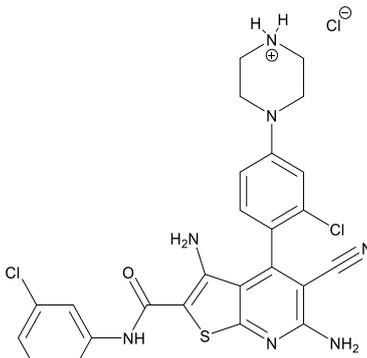
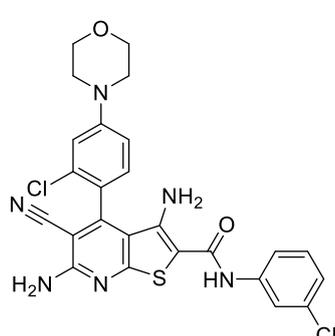
Anhang

KuHL101	468.25		$C_{21}H_{13}IN_2O_3$
KuHL174	397.48		$C_{25}H_{23}N_3O_2$
KuBra228 (6s Negativkontrolle)	454.33		$C_{21}H_{13}Cl_2N_5OS$
KuSaSch018	454.33		$C_{21}H_{13}Cl_2N_5OS$
KuSaSch022	437.88		$C_{21}H_{13}ClFN_5OS$
KuSaSch027	454.33		$C_{21}H_{13}Cl_2N_5OS$

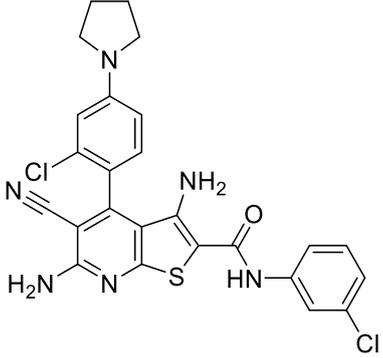
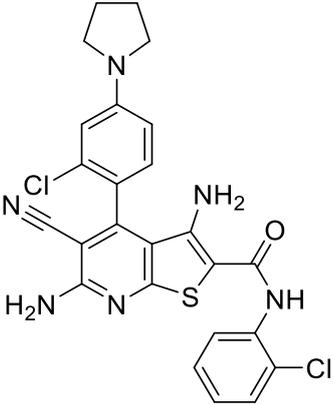
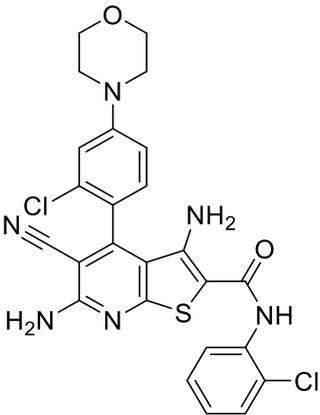
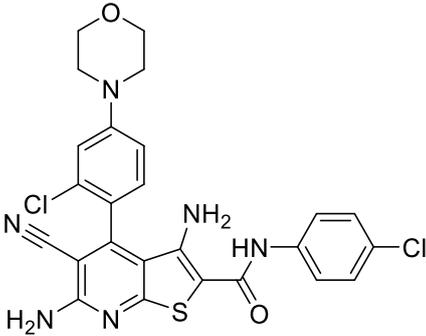
Anhang

KuSaSch028	437.88		$C_{21}H_{13}ClFN_5OS$
KuSaSch031	433.91		$C_{22}H_{16}ClN_5OS$
KuSaSch032	433.91		$C_{22}H_{16}ClN_5OS$
KuSaSch033	417.46		$C_{22}H_{16}FN_5OS$
KuSaSch037	437.88		$C_{21}H_{13}ClFN_5OS$

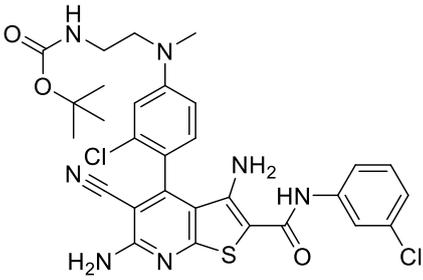
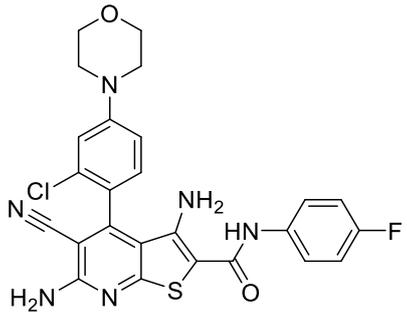
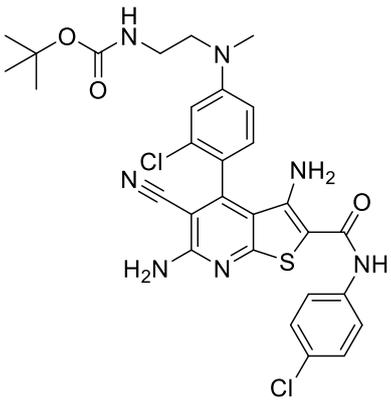
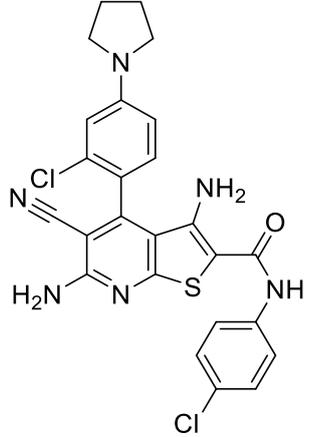
Anhang

KusaSch038	421.43		$C_{21}H_{13}F_2N_5OS$
KuSaSch041	638.57		$C_{30}H_{29}Cl_2N_7O_3S$
KuSaSch043	574.91		$C_{25}H_{22}Cl_3N_7OS$
KuSaSch050	539.44		$C_{25}H_{20}Cl_2N_6O_2S$

Anhang

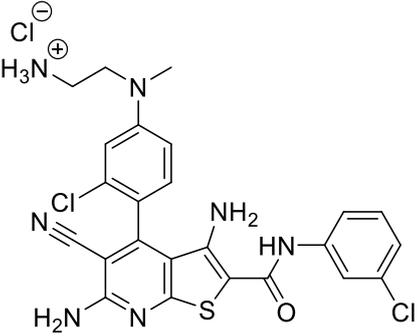
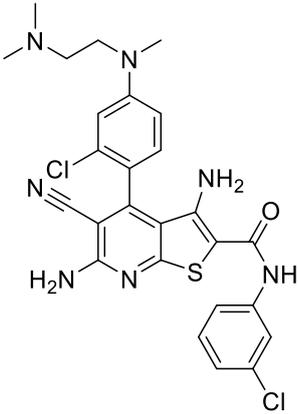
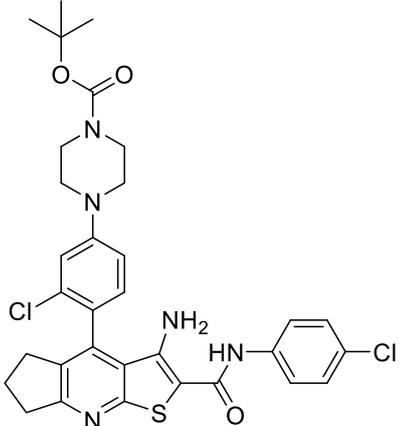
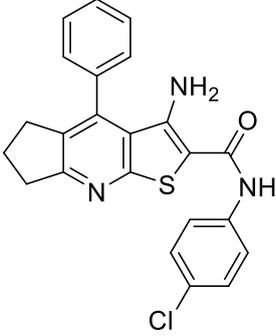
KuSaSch051	523.44		C ₂₅ H ₂₀ Cl ₂ N ₆ OS
KuSaSch055	523.44		C ₂₅ H ₂₀ Cl ₂ N ₆ OS
KuSaSch056	539.44		C ₂₅ H ₂₀ Cl ₂ N ₆ O ₂ S
KuSaSch057	539.44		C ₂₅ H ₂₀ Cl ₂ N ₆ O ₂ S

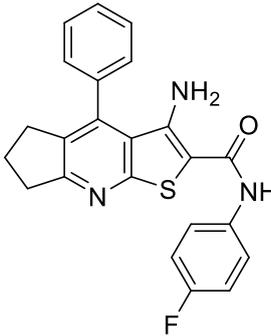
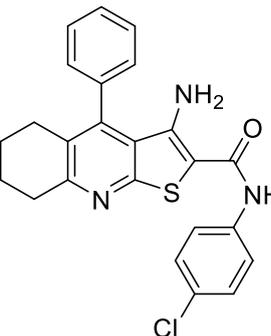
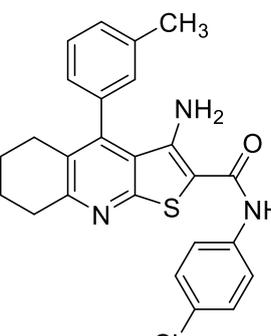
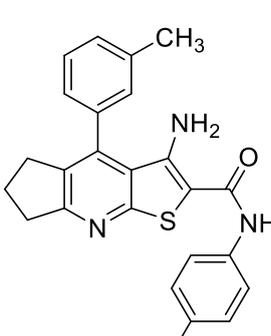
Anhang

KuSaSch058	626.56		$C_{29}H_{29}Cl_2N_7O_3S$
KuSaSch059	522.98		$C_{25}H_{20}ClFN_6O_2S$
KuSaSch060	626.56		$C_{29}H_{29}Cl_2N_7O_3S$
KuSaSch063	523.44		$C_{25}H_{20}Cl_2N_6OS$

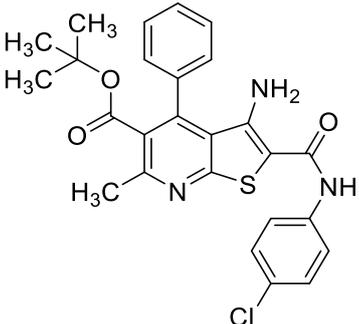
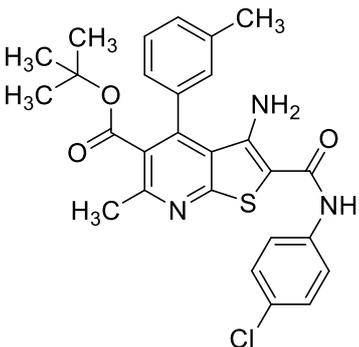
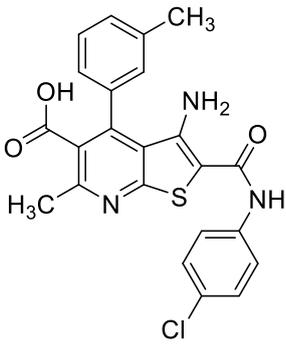
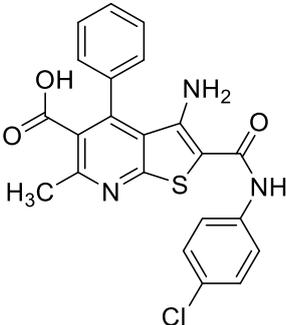
KuSaSch064	506.98		$C_{25}H_{20}ClFN_6OS$
KuSaSch067	538.04		$C_{26}H_{25}ClFN_7OS$
KuSaSch073	610.11		$C_{29}H_{29}ClFN_7O_3S$
KuSaSch074	626.56		$C_{29}H_{29}ClFN_7O_3S$

Anhang

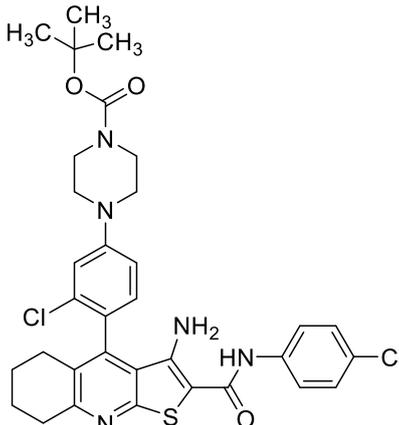
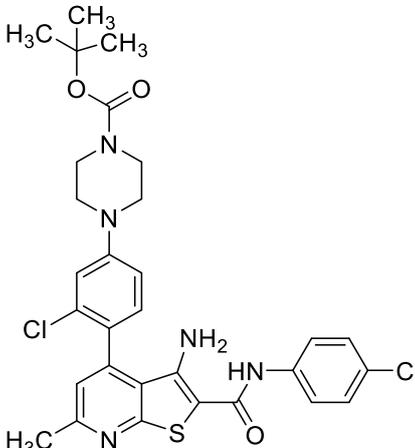
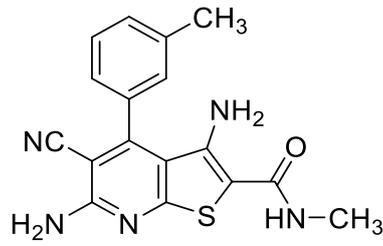
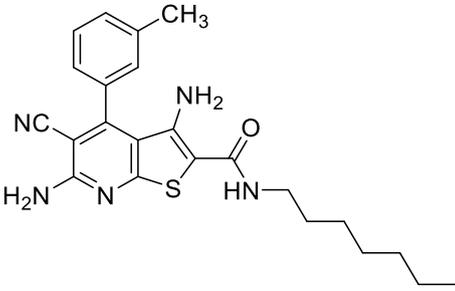
KuSaSch075	562.90		C ₂₄ H ₂₂ Cl ₃ N ₇ OS
KuSaSch090	554.49		C ₂₆ H ₂₅ Cl ₂ N ₇ OS
KuSaSch095	638.61		C ₃₂ H ₃₃ Cl ₂ N ₅ O ₃ S
KuSaSch100	419.93		C ₂₃ H ₁₈ ClN ₃ OS

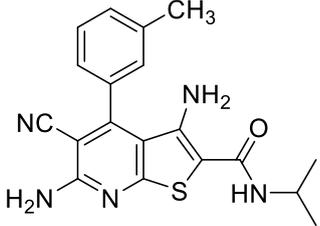
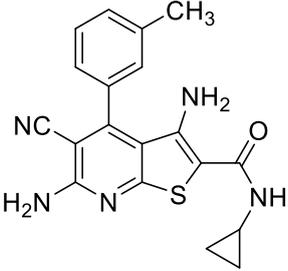
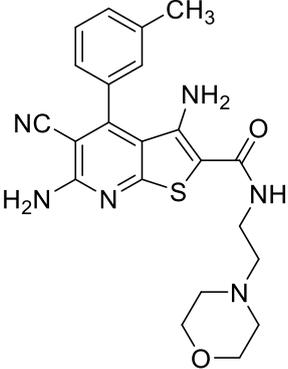
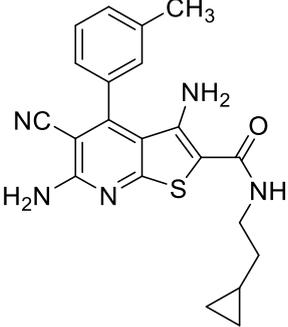
KuSaSch101	403.48		$C_{23}H_{18}FN_3OS$
KuSaSch105	433.95		$C_{24}H_{20}ClN_3OS$
KuSaSch107	447.98		$C_{25}H_{22}ClN_3OS$
KuSaSch110	435.97		$C_{24}H_{22}ClN_3OS$

Anhang

KuSaSch111	494.01		$C_{26}H_{24}ClN_3O_3S$
KuSaSch112	508.03		$C_{27}H_{26}ClN_3O_3S$
KuSaSch114	451.93		$C_{23}H_{18}ClN_3O_3S$
KuSaSch115	437.90		$C_{22}H_{16}ClN_3O_3S$

Anhang

<p>KuSaSch118</p>	<p>652.64</p>		<p>$C_{33}H_{35}Cl_2N_5O_3S$</p>
<p>KuSaSch122</p>	<p>612.57</p>		<p>$C_{30}H_{31}Cl_2N_5O_3S$</p>
<p>KuSaSch127</p>	<p>337.40</p>		<p>$C_{17}H_{15}N_5OS$</p>
<p>KuSaSch129</p>	<p>421.56</p>		<p>$C_{23}H_{27}N_5OS$</p>

KuSaSch131	365.46		$C_{19}H_{19}N_5OS$
KuSaSch134	363.44		$C_{19}H_{17}N_5OS$
KuSaSch135	436.53		$C_{22}H_{24}N_6O_2S$
KuSaSch137	391.49		$C_{21}H_{21}N_5OS$

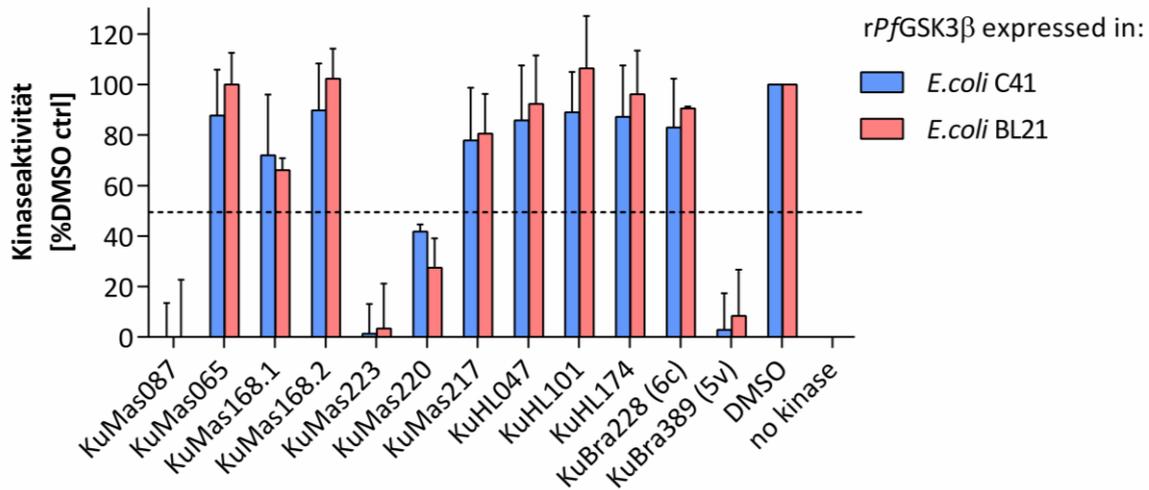


Abb.5.1: Identifizierung von *Pf*GSK3 β -Inhibitoren mit zweiter *rPf*GSK3 β -Aufreinigung. Potentielle *rPf*GSK3 β -Inhibitoren wurden mittels KinaseGlo Plus bei einer Konzentration von 10 μ M unter Standard-Reaktionsbedingungen gegen zwei unabhängige Aufreinigungen von *rPf*GSK3 β getestet. Alle Werte wurden zu einer Kontrollreaktion ohne Kinase normalisiert und als % der DMSO Kontrolle dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von Triplikaten aus zwei Kinasereaktionen.

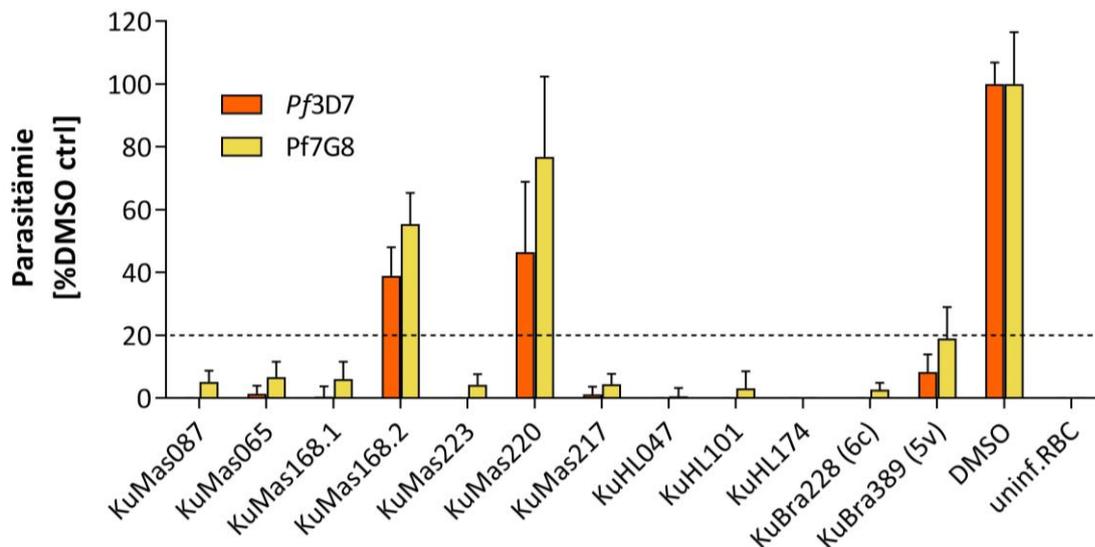


Abb.5.2: Test von KuBra-, KuMas- und KuHL-Verbindungen gegen *Pf*3D7 und *Pf*7G8. Potentielle *Pf*GSK3 β -Inhibitoren wurden mittels Proliferationsassay neben *Pf*3D7-Parasiten gegen den multiresistenten Stamm 7G8 getestet. Eine synchrone Parasitenkultur wurde auf 0,1% Parasitämie eingestellt und für 96 h in Gegenwart von 15 μ M der zu testenden Verbindung inkubiert. Sämtliche Verbindungen wurden in DMSO gelöst. Als Negativkontrolle diente DMSO ohne Verbindung. Die Parasitämie wurden anschließend mittels SYBR Gold-Färbung in einem EnVision Multilable Plate Reader (Perkin Elmer) quantifiziert. Sämtliche Messwerte wurden zu einer Kontrolle (uninfizierte Erythrozyten) normalisiert und als % der DMSO-Kontrolle dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von Triplikaten aus je zwei unabhängigen Experimenten. Verbindungen, die mind. 80% Inhibierung der Parasiten-Proliferation zeigten, wurden als aktiv eingestuft.

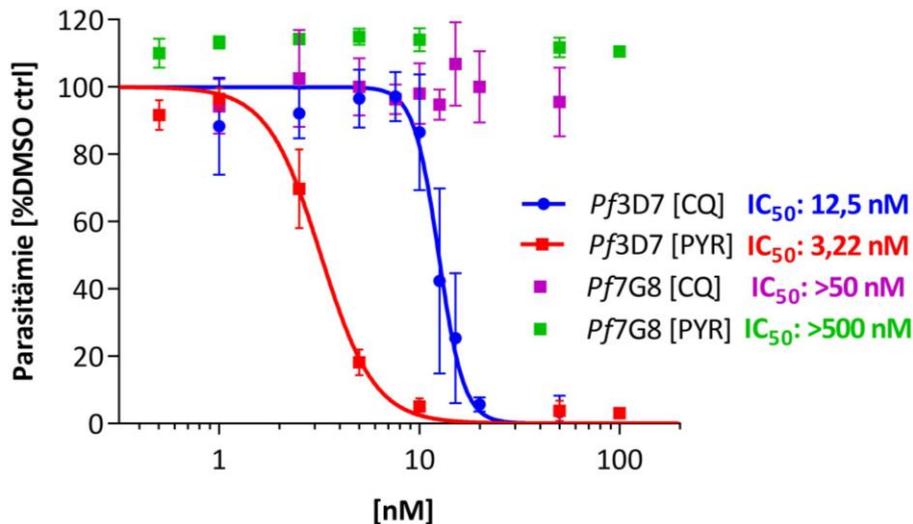


Abb.5.3: Chloroquin- und Pyrimethamin-Sensitivität von *Pf3D7* und *Pf7G8*. Die zu untersuchenden *P. falciparum* Stämme wurden im Proliferationsassay (0,1% Startparasitämie) gegen Verdünnungsreihen von Chloroquin und Pyrimethamin getestet. Als Negativkontrolle diente DMSO ohne Verbindung. Die Parasitämie wurden nach 96 h mittels SYBR Gold-Färbung in einem EnVision Multilable Plate Reader (Perkin Elmer) quantifiziert. Sämtliche Messwerte wurden zu einer Kontrolle (uninfizierte Erythrozyten) normalisiert und als % der Kontrolle in Graphpad Prism geplottet. Die Berechnung von IC₅₀-Werten erfolgte anschließend mittels non-linearer Regression. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von Triplikaten aus je zwei unabhängigen Experimenten.

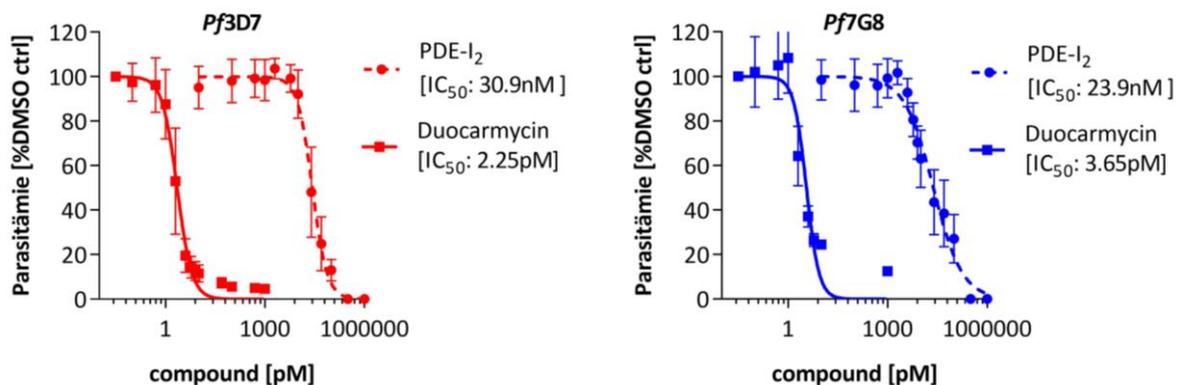


Abb.5.4: IC₅₀-Bestimmung für PDE-I₂ und Duocarmycin mit *Pf3D7* und *Pf7G8*. Verdünnungsreihen von PDE-I₂ (gestrichelte Kurven) und Duocarmycin (durchgehende Kurven) wurden mittels Proliferationsassay gegen verschiedene *Pf*-Stämme (0,1% Startparasitämie) getestet. Als Negativkontrolle diente DMSO ohne Verbindung. Die Parasitämie wurden nach 96 h mittels SYBR Gold-Färbung in einem EnVision Multilable Plate Reader (Perkin Elmer) quantifiziert. Sämtliche Messwerte wurden zu einer Kontrolle (uninfizierte Erythrozyten) normalisiert und als % der DMSO-Kontrolle in Graphpad Prism geplottet. Die Berechnung von IC₅₀-Werten erfolgte anschließend mittels non-linearer Regression. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von Triplikaten aus je drei unabhängigen Experimenten.

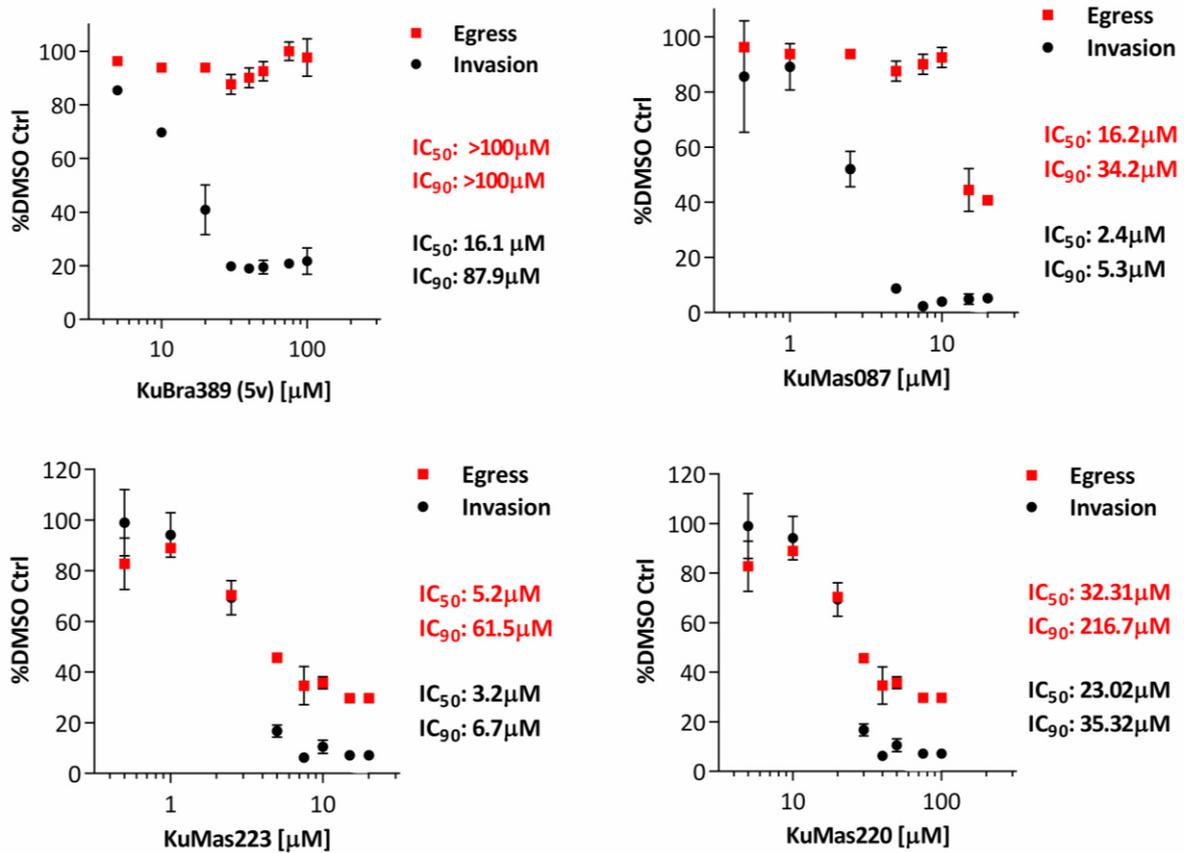


Abb.5.5: Egress- und Invasions-spezifische IC₅₀-Werte für PfGSK3β-Inhibitoren. Synchroner Parasiten (1% Parasitämie, ca. 40 hpi) wurden mit Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Verbindungen behandelt und die Schizonten- sowie Ringparasitämie 52 hpi mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Zur Quantifizierung des Egress wurde die Abnahme der Schizonten-Parasitämie im Vergleich zu Startparasitämie untersucht. Die Wirtszell-Invasion wurde als Anzahl der Ringstadien pro rupturierten Schizonten dargestellt. Sämtliche Werte wurden als % der DMSO-Kontrolle in Graphpad Prism geplottet und IC₅₀-Werte mittels non-linearer Regression berechnet. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung von zwei Replikaten.

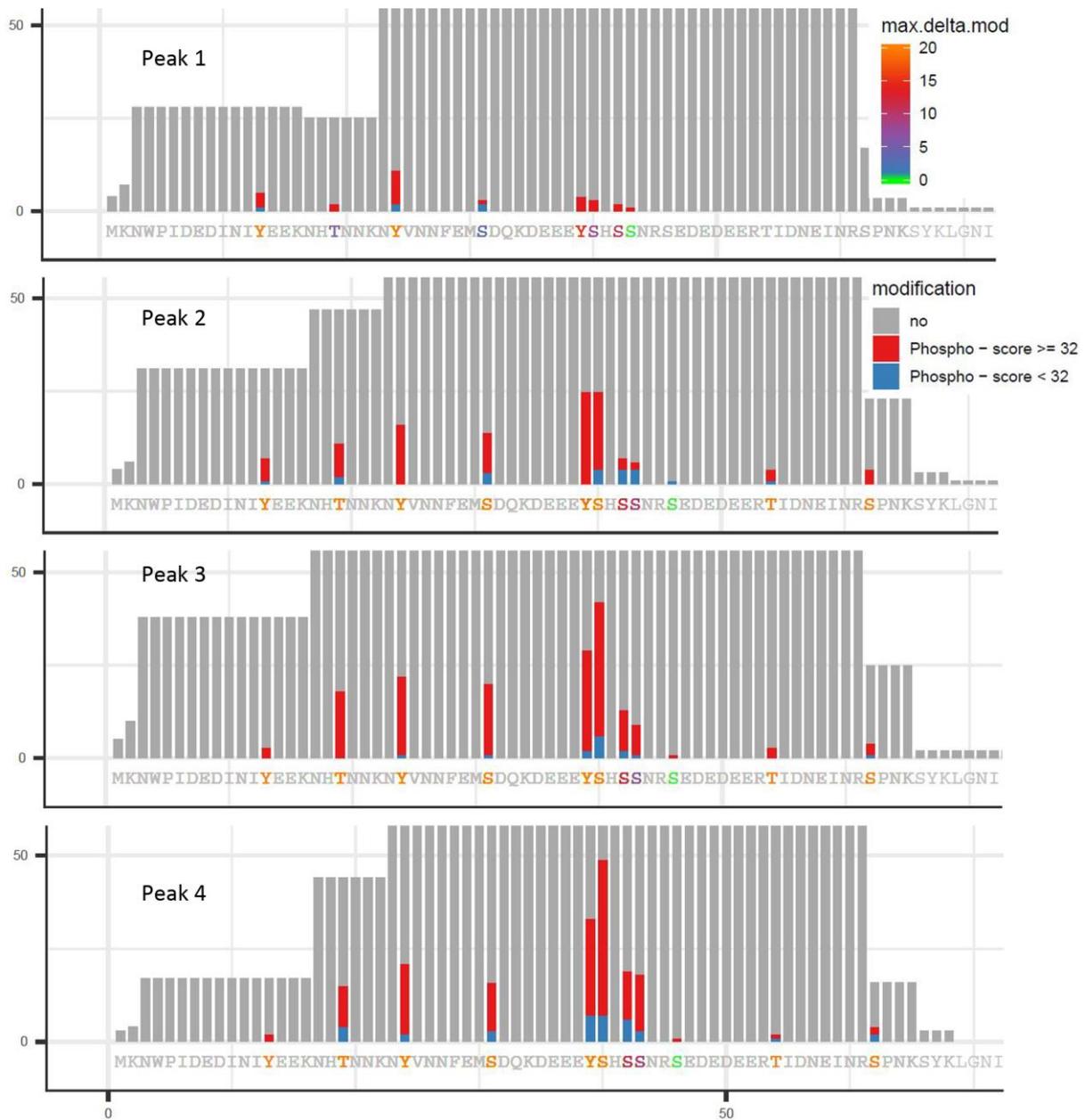


Abb.5.6: Phospho-Fingerprinting von rPfGSK3 β mittels Massenspektrometrie. Abbildung zur Verfügung gestellt von Samuel Pazicky (Arbeitsgruppe Dr. Christian Löw, EMBL/CSSB Hamburg). Rekombinante PfGSK3 β wurde mittels Ionenaustauschchromatographie analysiert und konnte in vier unterschiedlich stark phosphorylierte Varianten aufgetrennt werden (Peak 1-4). Zur Identifizierung von Phosphorylierungsstellen wurden die vier Peaks massenspektrometrisch untersucht. Unterschiede im Grad Phosphorylierung konnten lediglich im dargestellten N-Terminus von PfGSK3 β detektiert werden und sind anhand eines Farbcodes dargestellt.

Anhang

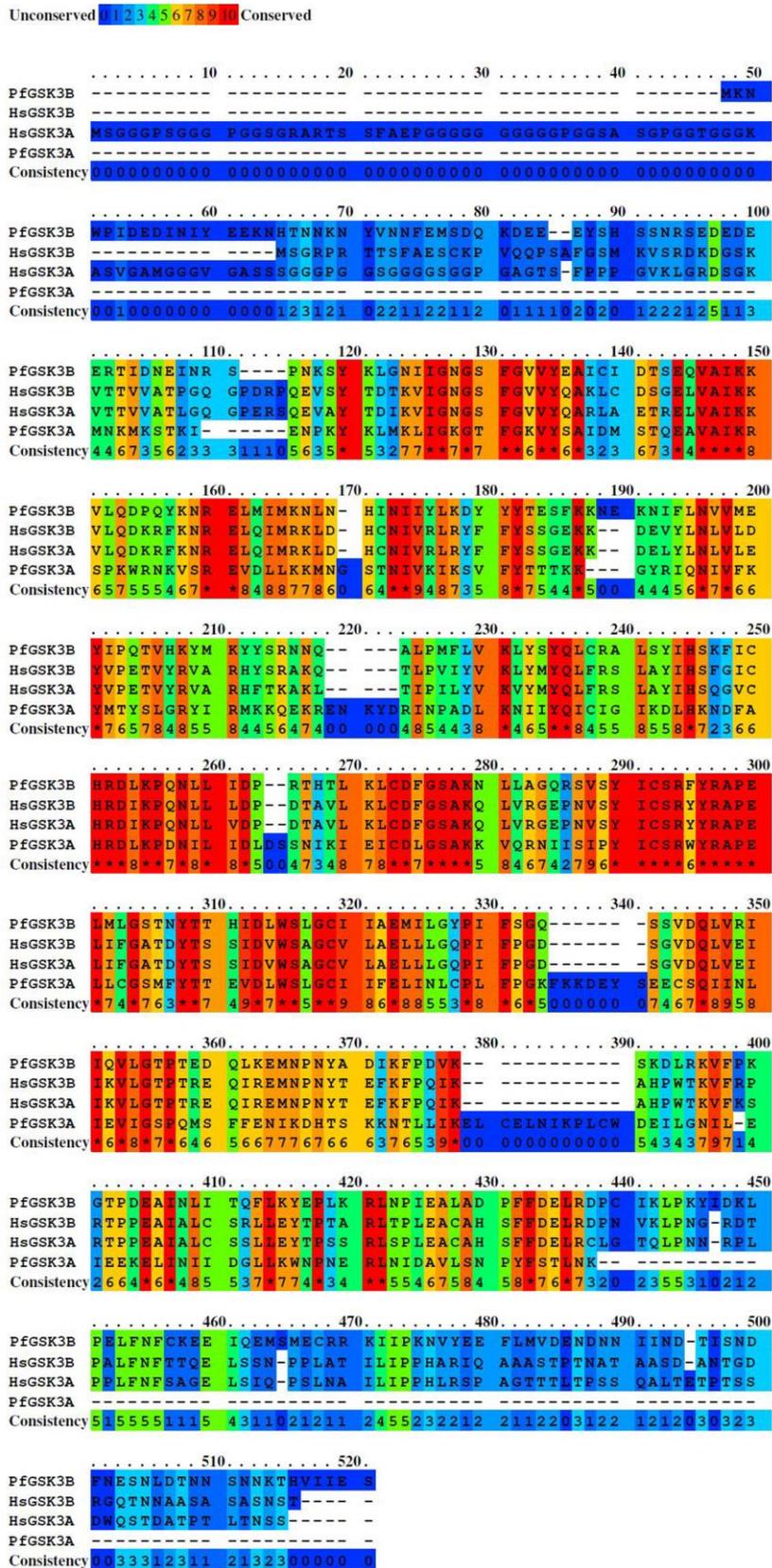


Abb.5.7: Aminosäuresequenzvergleich von PfGSK3 und HsGSK3 mit Grad der Konservierung. Analyse der Aminosäuresequenz mittels *Profile Alignment (PRALINE) multiple sequence alignment* (Simossis & Heringa, 2005) mit je beiden Isoformen von PfGSK3 sowie HsGSK3. Der Grad der Konservierung ist anhand des Farbcodes dargestellt.



Abb.5.8: Quantifizierung der Anzahl Merozoiten pro Schizont in *Pf3D7*. Die Anzahl von Tochtermerozoiten wurde in segmentierten Schizonten anhand von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen quantifiziert. Dargestellt sind die untersuchten Parasiten mit der jeweils ermittelten Anzahl Merozoiten. Die Parasiten stammen aus drei unabhängigen Blutzellkulturen.



Abb.5.9: Quantifizierung der Anzahl Merozoiten pro Schizont in *PfGSK3 β -TGD*. Die Anzahl von Tochtermerozoiten wurde in segmentierten Schizonten anhand von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen quantifiziert. Dargestellt sind die untersuchten Parasiten mit der jeweils ermittelten Anzahl Merozoiten. Die Parasiten stammen aus drei unabhängigen Blutzellkulturen.

Tab.5.2 cDNA von *PfGSK3β* bp 242-1320 (Wildtyp)

TATATGAGGCTATATGTATAGATACGTCAGAACAAGTTGCGATAAAAAAGGTTTTACAAGATCCAC
AATATAAAAATAGAGAATTAATGATTATGAAAAATTTAAATCATATAAATATAATATATTTAAAAG
ATTATTATTATACTGAATCTTTTTAAAAAAAATGAGAAAAATATATTTCTAAATGTAGTTATGGAATA
TATACCCAGACTGTACATAAATATATGAAATATTATTCTAGAAATAATCAAGCCTTGCCAATGTTT
CTAGTGAAATTATATTCATATCAACTATGCAGGGCTCTATCATATATTCATTCAAATTTATTTGTCA
TAGAGATCTTAAACCTCAAACCTTATTAATAGATCCTAGAACACATACACTTAAATTATGTGATTTT
GGTAGTGCCAAAAATCTATTAGCTGGGCAAAGAAGTGTCTCATATATTTGTTCAAGGTTTTATCGA
GCACCTGAACCTTATGTTGGGCTCAACAAATTACACAACACATATAGATTTATGGTCCCTAGGTTGT
ATCATAGCAGAAATGATATTGGGATATCCAATTTTTTCGGGACAGTCAAGTGTGGATCAGCTAGTT
AGAATAATTCAGGTGTTAGGTACCCCTACGGAAGATCAGCTGAAAGAAATGAACCTAATTATGC
AGATATCAAATTTCTGACGTTAAATCAAAGATCTAAGAAAGGTCTTTCAAAGGGTACACCAGA
TGAGGCCATTAATTTAATTACGCAATTTTTAAAATATGAACCATTGAAAAGATTAATCCAATCGAA
GCATTGGCTGACCCCTTTTTGATGAACTACGAGATCCATGCATAAAGCTACCTAAATATATAGATA
AGCTACCAGAGCTGTTCAACTTTTGTAAGAAGAAATACAAGAAATGTCCATGGAATGTAGAAGG
AAGATAATACCAAAAAATGTGTATGAGGAATTTTTGATGGTAGATGAAAATGATAATAATAAATT
AATGATACCATAAGCAACGATTTTAAATGAGTCTAATTTAGACACAAATAATTCAAATAATAAAACG
CACGTTATCATAGAAAAGT

Tab.5.3 cDNA von *PfGSK3β* bp 242-1320 (recodonisiert)

TATACGAAGCAATTTGCATTGACACAAGTGAGCAGGTAGCAATTAAGAAAGTACTTCAGGACCCT
CAGTACAAGAACCGTGAGCTTATGATAATGAAGAACCTTAACCACATTAACATTATTTACCTTAAG
GACTACTACTACACAGAGAGCTTCAAGAAGAACGAAAAGAACATTTTTCTGAACGTTGTAATGGA
GTACATTCCACAAACAGTTCACAAGTACATGAAGTACTACAGCCGTAACAACCAGGCACCTTCCTAT
GTTCTTGGTTAAGCTTTACAGTTACCAGTTGTGTGCGTGCAATTGAGTTACATACACAGTAAGTTCATA
TGCCACCGTGACTTAAAGCCACAGAATCTTCTTATTGACCCACGTAACACTTTAAAGCTTTGCG
ACTTCGGATCAGCAAAGAACTTGCTTGCAAGGACAGCGTTCAGTTAGTTACATATGCAGTCGTTTCT
ACAGGGCTCCAGAGTTAATGCTTGGAAGTACTAACTATACTACTCACATTGACCTTTGGAGTTTGG
GATGCATAATTGCTGAGATGATTCTTGGTTACCCTATATTCAGTGGTCAAAGTTCAGTTGACCAATT
GGTACGTATTATACAAGTTCCTTGAACACCAACAGAGGACCAATTAAGGAGATGAATCCAAACT
ACGCTGACATAAAGTTCCAGATGTAAAGAGTAAGGACTTGCCTAAAGTTTTCCCTAAAGGAACTC
CTGACGAAGCAATAAACCTTATAACACAGTTCCTTAAAGTACGAGCCTCTTAAGCGTCTTAACCCTAT
AGAGGCTCTTGCAGATCCATTCTTCGACGAGTTGAGGGACCCTTGATTAATTAAGTACAT
TGACAAATTGCCTGAATTATTTAATTTCTGCAAGGAGGAGATTCAGGAGATGAGTATGGAGTGCC
GTCGTAAAATTATTCCTAAGAAGCTTTACGAAGAGTTCCTTATGGTTGACGAGAACGACAACAACA
TTATAACGACACAATTTCAAATGACTTCAACGAAAGCAACCTTGATACTAACAACAGTAACAACA
AGACACATGTAATAATTGAGTCA

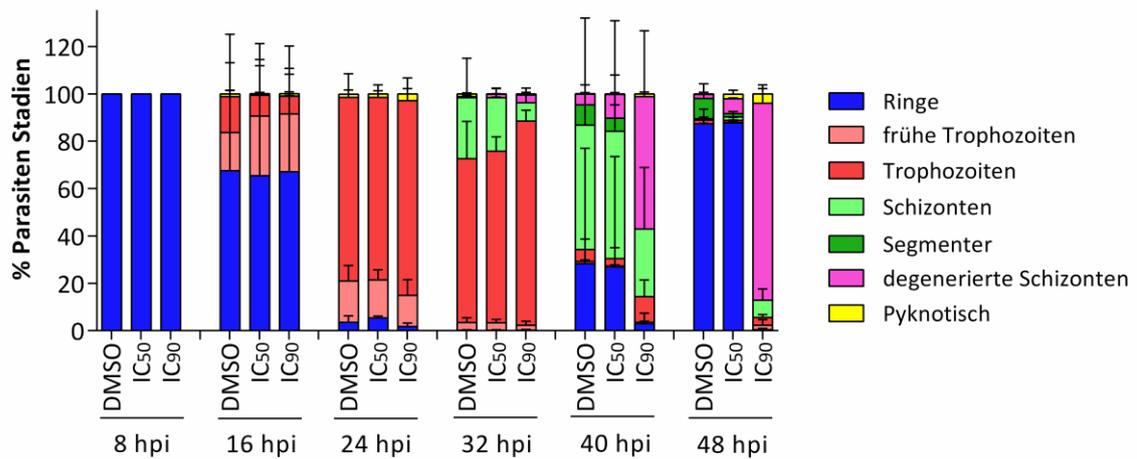


Abb.5.10: Stadien-spezifische Inhibierung von *Pf3D7* durch Duocarmycin. Hochsynchrone *Pf3D7*-Parasiten wurden 3 hpi mit der IC₉₀ von Duocarmycin behandelt und anschließend alle acht Stunden anhand von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollparasiten analysiert. Detektierte Parasiten für jeden untersuchten Zeitpunkt wurden in entsprechende Stadien unterteilt (siehe Legende in der Abbildung) und der Anteil der verschiedenen Stadien wurde als % aller detektierten Parasiten dargestellt. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Pro untersuchten Zeitpunkt wurden insgesamt mindestens 1000 Parasiten quantifiziert

Literaturverzeichnis

- Abdelgalil**, A. A., Alkahtani, H. M., Al-Jenoobi, F. I. Sorafenib. *Profiles of drug substances, excipients, and related methodology* 44: 239–266 (2019)
- Abdi**, A., Eschenlauer, S., Reininger, L., Doerig, C. SAM domain-dependent activity of PfTKL3, an essential tyrosine kinase-like kinase of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 67(19): 3355–3369 (2010)
- Absalon**, S., Blomqvist, K., Rudlaff, R. M., DeLano, T. J., Pollastri, M. P., Dvorin, J. D. Calcium-Dependent Protein Kinase 5 Is Required for Release of Egress-Specific Organelles in *Plasmodium falciparum*. *mBio* 9(1) (2018)
- Abu Bakar**, N., Klonis, N., Hanssen, E., Chan, C., Tilley, L. Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Journal of cell science* 123(Pt 3): 441–450 (2010)
- Achan**, J., Talisuna, A. O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J. K., Baliraine, F. N., Rosenthal, P. J., D'Alessandro, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria journal* 10: 144 (2011)
- Acosta**, A., Obi, E., Ato Selby, R., Ugot, I., Lynch, M., Maire, M., Belay, K., Okechukwu, A., Inyang, U., Kafuko, J., Greer, G., Gerberg, L., Fotheringham, M., Koenker, H., Kilian, A. Design, Implementation, and Evaluation of a School Insecticide-Treated Net Distribution Program in Cross River State, Nigeria. *Global health, science and practice* 6(2): 272–287 (2018)
- Adams**, J. H., Mueller, I. The Biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 7(9) (2017)
- Adl**, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A., Spiegel, F. W. The revised classification of eukaryotes. *The Journal of eukaryotic microbiology* 59(5): 429–493 (2012)
- Adu-Gyasi**, D., Adams, M., Amoako, S., Mahama, E., Nsoh, M., Amenga-Etego, S., Baiden, F., Asante, K. P., Newton, S., Owusu-Agyei, S. Estimating malaria parasite density: assumed white blood cell count of 10,000/ μ l of blood is appropriate measure in Central Ghana. *Malaria journal* 11: 238 (2012)
- Aguilar**, R., Magallon-Tejada, A., Achtman, A. H., Moraleda, C., Joice, R., Cisteró, P., Li Wai Suen, C. S. N., Nhabomba, A., Macete, E., Mueller, I., Marti, M., Alonso, P. L., Menéndez, C., Schofield, L., Mayor, A. Molecular evidence for the localization of *Plasmodium falciparum* immature gametocytes in bone marrow. *Blood* 123(7): 959–966 (2014)
- Ahmad**, S. J., Abdul Rahim, M. B. H., Baharum, S. N., Baba, M. S., Zin, N. M. Discovery of Antimalarial Drugs from Streptomycetes Metabolites Using a Metabolomic Approach. *Journal of tropical medicine* 2017: 2189814 (2017)
- Ahmed**, M. A., Cox-Singh, J. *Plasmodium knowlesi* - an emerging pathogen. *ISBT science series* 10(Suppl 1): 134–140 (2015)
- Aikawa**, M., Hepler, P. K., Huff, C. G., Sprinz, H. The feeding mechanism of avian malarial parasites. *The Journal of cell biology* 28(2): 355–373 (1966)
- Aikawa**, M., Miller, L. H., Rabbege, J. Caveola-vesicle complexes in the plasmalemma of erythrocytes infected by *Plasmodium vivax* and *P. cynomolgi*. Unique structures related to Schüffner's dots. *The American Journal of Pathology* 79(2): 285–300 (1975)
- Aikawa**, M., Miller, L. H., Johnson, J., Rabbege, J. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *The Journal of cell biology* 77(1): 72–82 (1978)
- Alam**, M. M., Sanchez-Azqueta, A., Janha, O., Flannery, E. L., Mahindra, A., Mapesa, K., Char, A. B., Sriranganadane, D., Brancucci, N. M. B., Antonova-Koch, Y., Crouch, K., Simwela, N. V., Millar, S. B., Akinwale, J., Mitcheson, D., Solyakov, L., Dudek, K., Jones, C., Zapatero, C., Doerig, C., Nwakanma, D. C., Vázquez, M. J., Colmenarejo, G., Lafuente-Monasterio, M. J., Leon, M. L., Godoi, P. H. C., Elkins, J. M., Waters, A. P., Jamieson, A. G., Álvaro, E. F., Ranford-Cartwright, L. C., Marti, M., Winzeler, E. A., Gamo, F. J., Tobin, A. B. Validation of the protein kinase PfCLK3 as a multistage cross-species malarial drug target. *Science (New York, N.Y.)* 365(6456) (2019)
- Alam**, M. M., Solyakov, L., Bottrill, A. R., Flueck, C., Siddiqui, F. A., Singh, S., Mistry, S., Viskaduraki, M., Lee, K., Hopp, C. S., Chitnis, C. E., Doerig, C., Moon, R. W., Green, J. L., Holder, A. A., Baker, D. A., Tobin, A. B. Phosphoproteomics reveals malaria parasite Protein Kinase G as a signalling hub regulating egress and invasion. *Nature communications* 6: 7285 (2015)
- Alam**, M. T., Vinayak, S., Congpuong, K., Wongsrichanalai, C., Satimai, W., Slutsker, L., Escalante, A. A., Barnwell, J. W., Udhayakumar, V. Tracking origins and spread of sulfadoxine-resistant *Plasmodium falciparum* dhps alleles in Thailand. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55(1): 155–164 (2011)
- Alexander**, D. L., Arastu-Kapur, S., Dubremetz, J.-F., Boothroyd, J. C. *Plasmodium falciparum* AMA1 binds a rhoptry neck protein homologous to TgRON4, a component of the moving junction in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic cell* 5(7): 1169–1173 (2006)
- Allen**, R. C., Popat, R., Diggle, S. P., Brown, S. P. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? *Nature reviews. Microbiology* 12(4): 300–308 (2014)
- Aly**, A. S. I., Matuschewski, K. A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium* sporozoite egress from oocysts. *The Journal of experimental medicine* 202(2): 225–230 (2005)

- Amato, R.,** Pearson, R. D., Almagro-Garcia, J., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., Drury, E., Stalker, J., Miotto, O., Fairhurst, R. M., Kwiatkowski, D. P. Origins of the current outbreak of multidrug-resistant malaria in southeast Asia: a retrospective genetic study. *The Lancet. Infectious diseases* 18(3): 337–345 (2018)
- Amino, R.,** Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., Ménard, R. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nature medicine* 12(2): 220–224 (2006)
- Amoah, L. E.,** Abankwa, J., Oppong, A. Plasmodium falciparum histidine rich protein-2 diversity and the implications for PfHRP 2: based malaria rapid diagnostic tests in Ghana. *Malaria journal* 15: 101 (2016)
- Anamika, Srinivasan, N.,** Krupa, A. A genomic perspective of protein kinases in Plasmodium falciparum. *Proteins* 58(1): 180–189 (2005)
- Antony, H. A.,** Parija, S. C. Antimalarial drug resistance: An overview. *Tropical parasitology* 6(1): 30–41 (2016)
- Aplin, A. E.,** Gibb, G. M., Jacobsen, J. S., Gallo, J. M., Anderton, B. H. In vitro phosphorylation of the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein by glycogen synthase kinase-3beta. *Journal of neurochemistry* 67(2): 699–707 (1996)
- Arabshahi, H. J.,** Leung, E., Barker, D., Reynisson, J. The development of thieno[2,3-b]pyridine analogues as anticancer agents applying in silico methods. *MedChemComm* 5(2): 186 (2014)
- Arav-Boger, R.,** Shapiro, T. A. Molecular mechanisms of resistance in antimalarial chemotherapy: the unmet challenge. *Annual review of pharmacology and toxicology* 45: 565–585 (2005)
- Arese, P.,** Schwarzer, E. Malarial pigment (haemozoin): a very active 'inert' substance. *Annals of tropical medicine and parasitology* 91(5): 501–516 (1997)
- Ariey, F.,** Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A.-C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., Lim, P., Leang, R., Duong, S., Sreng, S., Suon, S., Chuor, C. M., Bout, D. M., Ménard, S., Rogers, W. O., Genton, B., Fandeur, T., Miotto, O., Ringwald, P., Le Bras, J., Berry, A., Barale, J.-C., Fairhurst, R. M., Benoit-Vical, F., Mercereau-Puijalon, O., Ménard, D. A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria. *Nature* 505(7481): 50–55 (2014)
- Arredondo, S. A.,** Swearingen, K. E., Martinson, T., Steel, R., Dankwa, D. A., Harupa, A., Camargo, N., Betz, W., Vigdorovich, V., Oliver, B. G., Kangwanransan, N., Ishino, T., Sather, N., Mikolajczak, S., Vaughan, A. M., Torii, M., Moritz, R. L., Kappe, S. H. I. The Micronemal Plasmodium Proteins P36 and P52 Act in Concert to Establish the Replication-Permissive Compartment Within Infected Hepatocytes. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 8: 413 (2018)
- Arrow, K. J.,** Panosian, C., Gelband, H. Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance. *National Academies Press* (2004)
- Asgar, U.,** Witkiewicz, A. K., Turner, N. C., Knudsen, E. S. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery* 14(2): 130–146 (2015)
- Ashley, E. A.,** Dhorda, M., Fairhurst, R. M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., Anderson, J. M., Mao, S., Sam, B., Sopha, C., Chuor, C. M., Nguon, C., Sovannaroth, S., Pukrittayakamee, S., Jittamala, P., Chotivanich, K., Chutasmit, K., Suchatsoonthorn, C., Runchaoen, R., Hien, T. T., Thuy-Nhien, N. T., Thanh, N. V., Phu, N. H., Htut, Y., Han, K.-T., Aye, K. H., Mokuolu, O. A., Olaosebikan, R. R., Folaranmi, O. O., Mayxay, M., Khanthavong, M., Hongvanthong, B., Newton, P. N., Onyamboko, M. A., Fanello, C. I., Tshefu, A. K., Mishra, N., Valecha, N., Phyto, A. P., Nosten, F., Yi, P., Tripura, R., Borrmann, S., Bashraheil, M., Peshu, J., Faiz, M. A., Ghose, A., Hossain, M. A., Samad, R., Rahman, M. R., Hasan, M. M., Islam, A., Miotto, O., Amato, R., MacInnis, B., Stalker, J., Kwiatkowski, D. P., Bozdech, Z., Jeeyapant, A., Cheah, P. Y., Sakulthaew, T., Chalk, J., Intharabut, B., Silamut, K., Lee, S. J., Vihokhern, B., Kunasol, C., Imwong, M., Tarning, J., Taylor, W. J., Yeung, S., Woodrow, C. J., Flegg, J. A., Das, D., Smith, J., Venkatesan, M., Plowe, C. V., Stepniewska, K., Guerin, P. J., Dondorp, A. M., Day, N. P., White, N. J. Spread of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *The New England journal of medicine* 371(5): 411–423 (2014)
- Aurrecochea, C.,** Brestelli, J., Brunk, B. P., Dommer, J., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gingle, A., Grant, G., Harb, O. S., Heiges, M., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J. C., Kraemer, E., Li, W., Miller, J. A., Nayak, V., Pennington, C., Pinney, D. F., Roos, D. S., Ross, C., Stoeckert, C. J., Treatman, C., Wang, H. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic acids research* 37(Database issue): D539-43 (2009)
- Badejo, J. A.,** Abiodun, O. O., Akinola, O., Happi, C. T., Sowunmi, A., Gbotosho, G. O. Interaction between rifampicin, amodiaquine and artemether in mice infected with chloroquine resistant Plasmodium berghei. *Malaria journal* 13: 299 (2014)
- Baer, K.,** Klotz, C., Kappe, S. H. I., Schnieder, T., Frevert, U. Release of hepatic Plasmodium yoelii merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS pathogens* 3(11): e171 (2007)
- Baird, J. K.,** Hoffman, S. L. Primaquine therapy for malaria. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 39(9): 1336–1345 (2004)
- Baker, D. A.,** Stewart, L. B., Large, J. M., Bowyer, P. W., Ansell, K. H., Jiménez-Díaz, M. B., El Bakkouri, M., Birchall, K., Dechering, K. J., Boulou, N. S., Coombs, P. J., Whalley, D., Harding, D. J., Smiljanic-Hurley, E., Wheldon, M. C., Walker, E. M., Dessens, J. T., Lafuente, M. J., Sanz, L. M., Gamo, F.-J., Ferrer, S. B., Hui, R., Bousema, T., Angulo-Barturén, I., Merritt, A. T., Croft, S. L., Gutteridge, W. E., Kettleborough, C. A., Osborne, S. A. A potent series targeting the malarial cGMP-dependent protein kinase clears infection and blocks transmission. *Nature communications* 8(1): 430 (2017)
- Baker, R. P.,** Wijetilaka, R., Urban, S. Two Plasmodium rhomboid proteases preferentially cleave different adhesins implicated in all invasive stages of malaria. *PLoS pathogens* 2(10): e113 (2006)

- Baldwin**, M. R., Li, X., Hanada, T., Liu, S.-C., Chishti, A. H. Merozoite surface protein 1 recognition of host glycophorin A mediates malaria parasite invasion of red blood cells. *Blood* 125(17): 2704–2711 (2015)
- Bancells**, C., Llorà-Batlle, O., Poran, A., Nötzel, C., Rovira-Graells, N., Elemento, O., Kafsack, B. F. C., Cortés, A. Revisiting the initial steps of sexual development in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature microbiology* 4(1): 144–154 (2019)
- Banerji**, U., van Herpen, C. M. L., Saura, C., Thistlethwaite, F., Lord, S., Moreno, V., Macpherson, I. R., Boni, V., Rolfo, C., Vries, E. G. E. de, Rottey, S., Geenen, J., Eskens, F., Gil-Martin, M., Mommers, E. C., Koper, N. P., Aftimos, P. Trastuzumab duocarmazine in locally advanced and metastatic solid tumours and HER2-expressing breast cancer: a phase 1 dose-escalation and dose-expansion study. *The Lancet. Oncology* 20(8): 1124–1135 (2019)
- Baniecki**, M. L., Wirth, D. F., Clardy, J. High-throughput *Plasmodium falciparum* growth assay for malaria drug discovery. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51(2): 716–723 (2007)
- Banks**, A. S., McAllister, F. E., Camporez, J. P. G., Zushin, P.-J. H., Jurczak, M. J., Laznik-Bogoslavski, D., Shulman, G. I., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M. An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPAR γ . *Nature* 517(7534): 391–395 (2015)
- Bannister**, L. H., Mitchell, G. H. The fine structure of secretion by *Plasmodium knowlesi* merozoites during red cell invasion. *The Journal of protozoology* 36(4): 362–367 (1989)
- Bannister**, L. H., Mitchell, G. H., Butcher, G. A., Dennis, E. D., Cohen, S. Structure and development of the surface coat of erythrocytic merozoites of *Plasmodium knowlesi*. *Cell and tissue research* 245(2): 281–290 (1986)
- Bansal**, A., Ojo, K. K., Mu, J., Maly, D. J., van Voorhis, W. C., Miller, L. H. Reduced Activity of Mutant Calcium-Dependent Protein Kinase 1 Is Compensated in *Plasmodium falciparum* through the Action of Protein Kinase G. *mBio* 7(6) (2016)
- Bantuchai**, S., Nozaki, M., Thongkukiakul, A., Lorsuwannarat, N., Tachibana, M., Baba, M., Matsuoka, K., Tsuboi, T., Torii, M., Ishino, T. Rhoptry neck protein 11 has crucial roles during malaria parasite sporozoite invasion of salivary glands and hepatocytes. *International journal for parasitology* 49(9): 725–735 (2019)
- Bao**, Z., Lim, S., Liao, W., Lin, Y., Thiemermann, C., Leung, B. P., Wong, W. S. F. Glycogen synthase kinase-3 β inhibition attenuates asthma in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine* 176(5): 431–438 (2007)
- Barik**, S., Taylor, R. E., Chakrabarti, D. Identification, cloning, and mutational analysis of the casein kinase 1 cDNA of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. Stage-specific expression of the gene. *The Journal of biological chemistry* 272(42): 26132–26138 (1997)
- Barillas-Mury**, C., Kumar, S. *Plasmodium*-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cellular microbiology* 7(11): 1539–1545 (2005)
- Barnes**, P. J. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nature reviews. Drug discovery* 12(7): 543–559 (2013)
- Bártfai**, R., Hoeijmakers, W. A. M., Salcedo-Amaya, A. M., Smits, A. H., Janssen-Megens, E., Kaan, A., Treeck, M., Gilberger, T.-W., François, K.-J., Stunnenberg, H. G. H2A.Z demarcates intergenic regions of the *Plasmodium falciparum* epigenome that are dynamically marked by H3K9ac and H3K4me3. *PLoS pathogens* 6(12): e1001223 (2010)
- Basco**, L. K., Eldin de Pécoulas, P., Wilson, C. M., Le Bras, J., Mazabraud, A. Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 69(1): 135–138 (1995)
- Basco**, L. K., Gillotin, C., Gimenez, F., Farinotti, R., Le Bras, J. In vitro activity of the enantiomers of mefloquine, halofantrine and enpiroline against *Plasmodium falciparum*. *British journal of clinical pharmacology* 33(5): 517–520 (1992)
- Bastiaens**, G. J. H., van Meer, M. P. A., Scholzen, A., Obiero, J. M., Vatanshenassan, M., van Grinsven, T., Sim, B. K. L., Billingsley, P. F., James, E. R., Gunasekera, A., Bijker, E. M., van Gemert, G.-J., van de Vegte-Bolmer, M., Graumans, W., Hermsen, C. C., Mast, Q. de, van der Ven, A. J. A. M., Hoffman, S. L., Sauerwein, R. W. Safety, Immunogenicity, and Protective Efficacy of Intradermal Immunization with Aseptic, Purified, Cryopreserved *Plasmodium falciparum* Sporozoites in Volunteers Under Chloroquine Prophylaxis: A Randomized Controlled Trial. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 94(3): 663–673 (2016)
- Baum**, J., Chen, L., Healer, J., Lopaticki, S., Boyle, M., Triglia, T., Ehlgen, F., Ralph, S. A., Beeson, J. G., Cowman, A. F. Reticulocyte-binding protein homologue 5 - an essential adhesin involved in invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *International journal for parasitology* 39(3): 371–380 (2009)
- Baum**, J., Gilberger, T.-W., Frischknecht, F., Meissner, M. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Trends in parasitology* 24(12): 557–563 (2008)
- Bax**, B., Carter, P. S., Lewis, C., Guy, A. R., Bridges, A., Tanner, R., Pettman, G., Mannix, C., Culbert, A. A., Brown, M. J., Smith, D. G., Reith, A. D. The structure of phosphorylated GSK-3 β complexed with a peptide, FRATtide, that inhibits beta-catenin phosphorylation. *Structure (London, England: 1993)* 9(12): 1143–1152 (2001)
- Beadle**, C., Long, G. W., Weiss, W. R., McElroy, P. D., Maret, S. M., Oloo, A. J., Hoffman, S. L. Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. *Lancet (London, England)* 343(8897): 564–568 (1994)
- Beck**, J. R., Muralidharan, V., Oksman, A., Goldberg, D. E. PTEX component HSP101 mediates export of diverse malaria effectors into host erythrocytes. *Nature* 511(7511): 592–595 (2014)

- Bedu-Addo, G., Bates, I.** Causes of massive tropical splenomegaly in Ghana. *Lancet (London, England)* 360(9331): 449–454 (2002)
- Beeson, J. G., Drew, D. R., Boyle, M. J., Feng, G., Fowkes, F. J. I., Richards, J. S.** Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS microbiology reviews* 40(3): 343–372 (2016)
- Beg, M. A., Khan, R., Baig, S. M., Gulzar, Z., Hussain, R., Smego, R. A.** Cerebral involvement in benign tertian malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 67(3): 230–232 (2002)
- Bejon, P., Lusingu, J., Olotu, A., Leach, A., Lievens, M., Vekemans, J., Mshamu, S., Lang, T., Gould, J., Dubois, M.-C., Demoit  , M.-A., Stallaert, J.-F., Vansadia, P., Carter, T., Njuguna, P., Awuondo, K. O., Malabeja, A., Abdul, O., Gesase, S., Mturi, N., Drakeley, C. J., Savarese, B., Villafana, T., Ballou, W. R., Cohen, J., Riley, E. M., Lemnge, M. M., Marsh, K., Seidlein, L. von.** Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *The New England journal of medicine* 359(24): 2521–2532 (2008)
- Bennink, S., Kiesow, M. J., Pradel, G.** The development of malaria parasites in the mosquito midgut. *Cellular microbiology* 18(7): 905–918 (2016)
- Berhane, A., Anderson, K., Mihreteab, S., Gresty, K., Rogier, E., Mohamed, S., Hagos, F., Embaye, G., Chinorumba, A., Zehaie, A., Dowd, S., Waters, N. C., Gatton, M. L., Udhayakumar, V., Cheng, Q., Cunningham, J.** Major Threat to Malaria Control Programs by Plasmodium falciparum Lacking Histidine-Rich Protein 2, Eritrea. *Emerging infectious diseases* 24(3): 462–470 (2018)
- Berliner, R. W., Earle, D. P., Taggart, J. V., Zubrod, C. G., Welch, W. J., Conan, N. J., Bauman, E., Scudder, S. T., Shannon, J. A.** STUDIES ON THE CHEMOTHERAPY OF THE HUMAN MALARIAS. VI. THE PHYSIOLOGICAL DISPOSITION, ANTIMALARIAL ACTIVITY, AND TOXICITY OF SEVERAL DERIVATIVES OF 4-AMINOQUINOLINE. *The Journal of clinical investigation* 27(3 Pt 2): 98–107 (1948)
- Berrow, N. S., Alderton, D., Sainsbury, S., Nettleship, J., Assenberg, R., Rahman, N., Stuart, D. I., Owens, R. J.** A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic acids research* 35(6): e45 (2007)
- Berry, A., Senescau, A., Leli  vre, J., Benoit-Vical, F., Fabre, R., Marchou, B., Magnaval, J. F.** Prevalence of Plasmodium falciparum cytochrome b gene mutations in isolates imported from Africa, and implications for atovaquone resistance. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100(10): 986–988 (2006)
- Bertschi, N. L., Voorberg-van der Wel, A., Zeeman, A.-M., Schuierer, S., Nigsch, F., Carbone, W., Knehr, J., Gupta, D. K., Hofman, S. O., van der Werff, N., Nieuwenhuis, I., Klooster, E., Faber, B. W., Flannery, E. L., Mikolajczak, S. A., Chuenchob, V., Shrestha, B., Beibel, M., Bouwmeester, T., Kangwanransan, N., Sattabongkot, J., Diagana, T. T., Kocken, C. H., Roma, G.** Transcriptomic analysis reveals reduced transcriptional activity in the malaria parasite Plasmodium cynomolgi during progression into dormancy. *eLife* 7(2018)
- Beshir, K. B., Sep  lveda, N., Bharmal, J., Robinson, A., Mwanguzi, J., Busula, A. O., Boer, J. G. de, Sutherland, C., Cunningham, J., Hopkins, H.** Plasmodium falciparum parasites with histidine-rich protein 2 (pfrp2) and pfrp3 gene deletions in two endemic regions of Kenya. *Scientific reports* 7(1): 14718 (2017)
- Beurel, E., Grieco, S. F., Jope, R. S.** Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & therapeutics* 148: 114–131 (2015)
- Bharti, P. K., Chandel, H. S., Ahmad, A., Krishna, S., Udhayakumar, V., Singh, N.** Prevalence of pfrp2 and/or pfrp3 Gene Deletion in Plasmodium falciparum Population in Eight Highly Endemic States in India. *PLoS one* 11(8): e0157949 (2016)
- Bhatt, S., Weiss, D. J., Cameron, E., Bisanzio, D., Mappin, B., Dalrymple, U., Battle, K., Moyes, C. L., Henry, A., Eckhoff, P. A., Wenger, E. A., Bri  t, O., Penny, M. A., Smith, T. A., Bennett, A., Yukich, J., Eisele, T. P., Griffin, J. T., Fergus, C. A., Lynch, M., Lindgren, F., Cohen, J. M., Murray, C. L. J., Smith, D. L., Hay, S. I., Cibulskis, R. E., Gething, P. W.** The effect of malaria control on Plasmodium falciparum in Africa between 2000 and 2015. *Nature* 526(7572): 207–211 (2015)
- Bhattacharjee, S., Coppens, I., Mbengue, A., Suresh, N., Ghorbal, M., Slouka, Z., Safeukui, I., Tang, H.-Y., Speicher, D. W., Stahelin, R. V., Mohandas, N., Haldar, K.** Remodeling of the malaria parasite and host human red cell by vesicle amplification that induces artemisinin resistance. *Blood* 131(11): 1234–1247 (2018)
- Biagini, G. A., Viriyavejakul, P., O'Neill, P. M., Bray, P. G., Ward, S. A.** Functional characterization and target validation of alternative complex I of Plasmodium falciparum mitochondria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50(5): 1841–1851 (2006)
- Bienert, S., Waterhouse, A., Beer, T. A. P. de, Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., Schwede, T.** The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. *Nucleic acids research* 45(D1): D313–D319 (2017)
- Bijker, E. M., Bastiaens, G. J. H., Teirlinck, A. C., van Gemert, G.-J., Graumans, W., van de Vegte-Bolmer, M., Siebelink-Stoter, R., Arens, T., Teelen, K., Nahrendorf, W., Remarque, E. J., Roeffen, W., Jansens, A., Zimmerman, D., Vos, M., van Schaijk, B. C. L., Wiersma, J., van der Ven, A. J. A. M., Mast, Q. de, van Lieshout, L., Verweij, J. J., Hermsen, C. C., Scholzen, A., Sauerwein, R. W.** Protection against malaria after immunization by chloroquine prophylaxis and sporozoites is mediated by preerythrocytic immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(19): 7862–7867 (2013)
- Bijker, E. M., Schats, R., Obiero, J. M., Behet, M. C., van Gemert, G.-J., van de Vegte-Bolmer, M., Graumans, W., van Lieshout, L., Bastiaens, G. J. H., Teelen, K., Hermsen, C. C., Scholzen, A., Visser, L. G., Sauerwein, R. W.** 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 (2014)
- Bijker, E. M.,** Teirlinck, A. C., Schats, R., van Gemert, G.-J., van de Vegte-Bolmer, M., van Lieshout, L., Int'Hout, J., Hermsen, C. C., Scholzen, A., Visser, L. G., Sauerwein, R. W. Cytotoxic markers associate with protection against malaria in human volunteers immunized with *Plasmodium falciparum* sporozoites. *The Journal of infectious diseases* 210(10): 1605–1615 (2014)
- Bijur, G. N.,** Jope, R. S. Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* 14(18): 2415–2419 (2003)
- Billker, O.,** Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B., Brinkmann, V. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* 117(4): 503–514 (2004)
- Billker, O.,** Lindo, V., Panico, M., Etienne, A. E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R. E., Morris, H. R. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* 392(6673): 289–292 (1998)
- Billker, O.,** Shaw, M. K., Margos, G., Sinden, R. E. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro. *Parasitology* 115 (Pt 1): 1–7 (1997)
- Birnbaum, J.,** Flemming, S., Reichard, N., Soares, A. B., Mesén-Ramírez, P., Jonscher, E., Bergmann, B., Spielmann, T. A genetic system to study *Plasmodium falciparum* protein function. *Nature methods* 14(4): 450–456 (2017)
- Birnbaum, J.,** Scharf, S., Schmidt, S., Jonscher, E., Hoeijmakers, W. A. M., Flemming, S., Toenhake, C. G., Schmitt, M., Sabitzki, R., Bergmann, B., Fröhlike, U., Mesén-Ramírez, P., Blancke Soares, A., Herrmann, H., Bártfai, R., Spielmann, T. A Kelch13-defined endocytosis pathway mediates artemisinin resistance in malaria parasites. *Science (New York, N.Y.)* 367(6473): 51–59 (2020)
- Blackman, M. J.,** Fujioaka, H., Stafford, W. H., Sajid, M., Clough, B., Fleck, S. L., Aikawa, M., Grainger, M., Hackett, F. A subtilisin-like protein in secretory organelles of *Plasmodium falciparum* merozoites. *The Journal of biological chemistry* 273(36): 23398–23409 (1998)
- Blackman, M. J.,** Holder, A. A. Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by a calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP133 as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSP1. *Molecular and biochemical parasitology* 50(2): 307–315 (1992)
- Blair, P. L.,** Kappe, S. H. I., Maciel, J. E., Balu, B., Adams, J. H. *Plasmodium falciparum* MAEBL is a unique member of the ebl family. *Molecular and biochemical parasitology* 122(1): 35–44 (2002)
- Blank, A.,** Fürle, K., Jäschke, A., Mikus, G., Lehmann, M., Hüsing, J., Heiss, K., Giese, T., Carter, D., Böhnlein, E., Lanzer, M., Haefeli, W. E., Bujard, H. Immunization with full-length *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 is safe and elicits functional cytophilic antibodies in a randomized first-in-human trial. *NPJ vaccines* 5: 10 (2020)
- Bockarie, M. J.,** Gbakima, A. A., Barnish, G. It all began with Ronald Ross: 100 years of malaria research and control in Sierra Leone (1899-1999). *Annals of tropical medicine and parasitology* 93(3): 213–224 (1999)
- Boger, D.** Duocarmycins: a new class of sequence selective DNA minor groove alkylating agents. *Chemtracts: Organic Chemistry* 4(5): 329–349 (1991)
- Boger, D. L.** Design, synthesis, and evaluation of DNA minor groove binding agents. *Pure and Applied Chemistry* 65(6): 1123–1132 (1993)
- Boger, D. L.,** Ishizaki, T., Zarrinmayeh, H., Munk, S. A., Kitos, P. A., Suntornwat, O. Duocarmycin-pyrindamycin DNA alkylation properties and identification, synthesis, and evaluation of agents incorporating the pharmacophore of the duocarmycin-pyrindamycin alkylation subunit. Identification of the CC-1065 duocarmycin common pharmacophore. *Journal of the American Chemical Society* 112(24): 8961–8971 (1990)
- Boger, D. L.,** Johnson, D. S. CC-1065 and the duocarmycins: unraveling the keys to a new class of naturally derived DNA alkylating agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(9): 3642–3649 (1995)
- Boger, D. L.,** Johnson, D. S., Palanki, M. S., Kitos, P. A., Chang, J., Dowell, P. Evaluation of functional analogs of CC-1065 and the duocarmycins incorporating the cross-linking 9a-chloromethyl-1,2,9,9a-tetrahydrocyclopropacbenzeindol-4-on e (C2BI) alkylation subunit. *Bioorganic & medicinal chemistry* 1(1): 27–38 (1993)
- Boger, D. L.,** Santillán, A., Searcey, M., Jin, Q. Critical Role of the Linking Amide in CC-1065 and the Duocarmycins: Implications on the Source of DNA Alkylation Catalysis. *Journal of the American Chemical Society* 120(45): 11554–11557 (1998)
- Bowen, D. G.,** Walker, C. M. Mutational escape from CD8+ T cell immunity: HCV evolution, from chimpanzees to man. *The Journal of experimental medicine* 201(11): 1709–1714 (2005)
- Boyle, K. E.,** Boger, D. L., Wroe, A., Vazquez, M. Duocarmycin SA, a potent antitumor antibiotic, sensitizes glioblastoma cells to proton radiation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 28(16): 2688–2692 (2018)
- Bozdech, Z.,** Llinás, M., Pulliam, B. L., Wong, E. D., Zhu, J., DeRisi, J. L. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS biology* 1(1): E5 (2003)
- Brancucci, N. M. B.,** Bertschi, N. L., Zhu, L., Niederwieser, I., Chin, W. H., Wampfler, R., Freymond, C., Rottmann, M., Felger, I., Bozdech, Z., Voss, T. S. Heterochromatin protein 1 secures survival and transmission of malaria parasites. *Cell host & microbe* 16(2): 165–176 (2014)

- Brancucci, N. M. B., Gerdt, J. P., Wang, C., Niz, M. de, Philip, N., Adapa, S. R., Zhang, M., Hitz, E., Niederwieser, I., Boltryk, S. D., Laffitte, M.-C., Clark, M. A., Grüning, C., Ravel, D., Blancke Soares, A., Demas, A., Bopp, S., Rubio-Ruiz, B., Conejo-García, A., Wirth, D. F., Gendaszewska-Darmach, E., Duraisingh, M. T., Adams, J. H., Voss, T. S., Waters, A. P., Jiang, R. H. Y., Clardy, J., Marti, M.** Lysophosphatidylcholine Regulates Sexual Stage Differentiation in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell* 171(7): 1532-1544.e15 (2017)
- Brandt, W.** Neue Inhibitoren der Proteinkinasen PfGSK-3 und RET. *Dissertation* (2009)
- Brenk, R., Schipani, A., James, D., Krasowski, A., Gilbert, I. H., Frearson, J., Wyatt, P. G.** Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. *ChemMedChem* 3(3): 435-444 (2008)
- Bridgford, J. L., Xie, S. C., Cobbold, S. A., Pasaje, C. F. A., Herrmann, S., Yang, T., Gillett, D. L., Dick, L. R., Ralph, S. A., Dogovski, C., Spillman, N. J., Tilley, L.** Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nature communications* 9(1): 3801 (2018)
- Brochet, M., Billker, O.** Calcium signalling in malaria parasites. *Molecular microbiology* 100(3): 397-408 (2016)
- Brochet, M., Collins, M. O., Smith, T. K., Thompson, E., Sebastian, S., Volkmann, K., Schwach, F., Chappell, L., Gomes, A. R., Berriman, M., Rayner, J. C., Baker, D. A., Choudhary, J., Billker, O.** Phosphoinositide metabolism links cGMP-dependent protein kinase G to essential Ca²⁺ signals at key decision points in the life cycle of malaria parasites. *PLoS biology* 12(3): e1001806 (2014)
- Brooks, D. R., Wang, P., Read, M., Watkins, W. M., Sims, P. F., Hyde, J. E.** Sequence variation of the hydroxymethylidihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *European journal of biochemistry* 224(2): 397-405 (1994)
- Bruce, M. C., Alano, P., Duthie, S., Carter, R.** Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology* 100 Pt 2: 191-200 (1990)
- Brunschwig, C., Lawrence, N., Taylor, D., Abay, E., Njoroge, M., Basarab, G. S., Le Manach, C., Paquet, T., Cabrera, D. G., Nchinda, A. T., Kock, C. de, Wiesner, L., Denti, P., Waterson, D., Blasco, B., Leroy, D., Witty, M. J., Donini, C., Duffy, J., Wittlin, S., White, K. L., Charman, S. A., Jiménez-Díaz, M. B., Angulo-Barturen, I., Herreros, E., Gamo, F. J., Rochford, R., Mancama, D., Coetzer, T. L., van der Watt, M. E., Reader, J., Birkholtz, L.-M., Marsh, K. C., Solapure, S. M., Burke, J. E., McPhail, J. A., Vanaerschot, M., Fidock, D. A., Fish, P. V., Siegl, P., Smith, D. A., Wirjanata, G., Noviyanti, R., Price, R. N., Marfurt, J., Silue, K. D., Street, L. J., Chibale, K.** UCT943, a Next-Generation *Plasmodium falciparum* PI4K Inhibitor Preclinical Candidate for the Treatment of Malaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62(9) (2018)
- Budimulja, A. S., Syafruddin, Tapchaisri, P., Wilairat, P., Marzuki, S.** The sensitivity of *Plasmodium* protein synthesis to prokaryotic ribosomal inhibitors. *Molecular and biochemical parasitology* 84(1): 137-141 (1997)
- Bui, H. T. N., Niederwieser, I., Bird, M. J., Dai, W., Brancucci, N. M. B., Moes, S., Jenoe, P., Lucet, I. S., Doerig, C., Voss, T. S.** Mapping and functional analysis of heterochromatin protein 1 phosphorylation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Scientific reports* 9(1): 16720 (2019)
- Bunnik, E. M., Chung, D.-W. D., Hamilton, M., Pons, N., Saraf, A., Prudhomme, J., Florens, L., Le Roch, K. G.** Polysome profiling reveals translational control of gene expression in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome biology* 14(11): R128 (2013)
- Burda, P.-C., Caldelari, R., Heussler, V. T.** Manipulation of the Host Cell Membrane during *Plasmodium* Liver Stage Egress. *mBio* 8(2) (2017)
- Burkot, T. R., Williams, J. L., Schneider, I.** Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium falciparum* clones grown in vitro from the same isolate. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78(3): 339-341 (1984)
- Byun, J. A., Van, K., Huang, J., Henning, P., Franz, E., Akimoto, M., Herberg, F. W., Kim, C., Melacini, G.** Mechanism of allosteric inhibition in the *Plasmodium falciparum* cGMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* (2020)
- Camarda, G., Jirawatcharadech, P., Priestley, R. S., Saif, A., March, S., Wong, M. H. L., Leung, S., Miller, A. B., Baker, D. A., Alano, P., Paine, M. J. I., Bhatia, S. N., O'Neill, P. M., Ward, S. A., Biagini, G. A.** Antimalarial activity of primaquine operates via a two-step biochemical relay. *Nature communications* 10(1): 3226 (2019)
- Cameron, D., Casey, M., Press, M., Lindquist, D., Pienkowski, T., Romieu, C. G., Chan, S., Jagiello-Gruszfeld, A., Kaufman, B., Crown, J., Chan, A., Campone, M., Viens, P., Davidson, N., Gorbounova, V., Raats, J. I., Skarlos, D., Newstat, B., Roychowdhury, D., Paoletti, P., Oliva, C., Rubin, S., Stein, S., Geyer, C. E.** A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. *Breast cancer research and treatment* 112(3): 533-543 (2008)
- Camus, D., Hadley, T. J.** A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science (New York, N.Y.)* 230(4725): 553-556 (1985)
- Carson, R. L.** Silent Spring. *Penguin Classics* (1962)
- Castaño, Z., Gordon-Weeks, P. R., Kypta, R. M.** The neuron-specific isoform of glycogen synthase kinase-3beta is required for axon growth. *Journal of neurochemistry* 113(1): 117-130 (2010)
- Cavalier-Smith, T.** Archamoebae: the ancestral eukaryotes? *Bio Systems* 25(1-2): 25-38 (1991)
- Cavalier-Smith, T.** Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological reviews* 57(4): 953-994 (1993)

- Cha, S.-J., Kim, M.-S., Pandey, A., Jacobs-Lorena, M.** Identification of GAPDH on the surface of Plasmodium sporozoites as a new candidate for targeting malaria liver invasion. *The Journal of experimental medicine* 213(10): 2099–2112 (2016)
- Chagas, R., Laia, C. A. T., Ferreira, R. B., Ferreira, L. M.** Sulfur dioxide induced aggregation of wine thaumatin-like proteins: Role of disulfide bonds. *Food chemistry* 259: 166–174 (2018)
- Chandramohanadas, R., Davis, P. H., Beiting, D. P., Harbut, M. B., Darling, C., Velmourougane, G., Lee, M. Y., Greer, P. A., Roos, D. S., Greenbaum, D. C.** Apicomplexan parasites co-opt host calpains to facilitate their escape from infected cells. *Science (New York, N.Y.)* 324(5928): 794–797 (2009)
- Chatterjee, A. K., Yeung, B. K. S.** Back to the future: lessons learned in modern target-based and whole-cell lead optimization of antimalarials. *Current topics in medicinal chemistry* 12(5): 473–483 (2012)
- Chen, M. D., Fucci, I. J., Sinha, K., Rule, G. S.** dGMP Binding to Thymidylate Kinase from Plasmodium falciparum Shows Half-Site Binding and Induces Protein Dynamics at the Dimer Interface. *Biochemistry* 59(5): 694–703 (2020)
- Chen, L., Lopaticki, S., Riglar, D. T., Dekiwadia, C., Uboldi, A. D., Tham, W.-H., O'Neill, M. T., Richard, D., Baum, J., Ralph, S. A., Cowman, A. F.** An EGF-like protein forms a complex with PfRh5 and is required for invasion of human erythrocytes by Plasmodium falciparum. *PLoS pathogens* 7(9): e1002199 (2011)
- Chen, L., Qu, F. Y., Zhou, Y. C.** Field observations on the antimalarial piperazine. *Chinese medical journal* 95(4): 281–286 (1982)
- CHIN, W., CONTACOS, P. G., COATNEY, G. R., KIMBALL, H. R.** A NATURALLY ACQUIRED QUOTIDIAN-TYPE MALARIA IN MAN TRANSFERABLE TO MONKEYS. *Science (New York, N.Y.)* 149(3686): 865 (1965)
- Choi, R., Hulverson, M. A., Huang, W., Vidadala, R. S. R., Whitman, G. R., Barrett, L. K., Schaefer, D. A., Betzer, D. P., Riggs, M. W., Doggett, J. S., Hemphill, A., Ortega-Mora, L. M., McCloskey, M. C., Arnold, S. L. M., Hackman, R. C., Marsh, K. C., Lynch, J. J., Freiberg, G. M., Leroy, B. E., Kempf, D. J., Choy, R. K. M., Hostos, E. L. de, Maly, D. J., Fan, E., Ojo, K. K., van Voorhis, W. C.** Bumped Kinase Inhibitors as therapy for apicomplexan parasitic diseases: lessons learned. *International journal for parasitology* (2020)
- Chou, A. C., Chevli, R., Fitch, C. D.** Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites. *Biochemistry* 19(8): 1543–1549 (1980)
- Chouhan, D. K., Sharon, A., Bal, C.** Molecular and structural insight into plasmodium falciparum RIO2 kinase. *Journal of molecular modeling* 19(2): 485–496 (2013)
- Clark, J. D., Flanagan, M. E., Telliez, J.-B.** Discovery and development of Janus kinase (JAK) inhibitors for inflammatory diseases. *Journal of medicinal chemistry* 57(12): 5023–5038 (2014)
- Clyde, D. F., Most, H., McCarthy, V. C., Vanderberg, J. P.** Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria. *The American journal of the medical sciences* 266(3): 169–177 (1973)
- Cobbaut, M., Derua, R., Parker, P. J., Waelkens, E., Janssens, V., van Lint, J.** Protein kinase D displays intrinsic Tyr autophosphorylation activity: insights into mechanism and regulation. *FEBS letters* 592(14): 2432–2443 (2018)
- Cogswell, F. B.** The hypnozoite and relapse in primate malaria. *Clinical microbiology reviews* 5(1): 26–35 (1992)
- Cohen, P.** The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *European journal of biochemistry* 268(19): 5001–5010 (2001)
- Cohen, P.** Protein kinases — the major drug targets of the twenty-first century? *Nature reviews. Drug discovery* 1(4): 309–315 (2002)
- Cole, A., Frame, S., Cohen, P.** Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *The Biochemical journal* 377(Pt 1): 249–255 (2004)
- Coleman, B. I., Skillman, K. M., Jiang, R. H. Y., Childs, L. M., Altenhofen, L. M., Ganter, M., Leung, Y., Goldowitz, I., Kafsack, B. F. C., Marti, M., Llinás, M., Buckee, C. O., Duraisingh, M. T.** A Plasmodium falciparum histone deacetylase regulates antigenic variation and gametocyte conversion. *Cell host & microbe* 16(2): 177–186 (2014)
- Coley, A. M., Parisi, K., Masciantonio, R., Hoeck, J., Casey, J. L., Murphy, V. J., Harris, K. S., Batchelor, A. H., Anders, R. F., Foley, M.** The most polymorphic residue on Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 determines binding of an invasion-inhibitory antibody. *Infection and immunity* 74(5): 2628–2636 (2006)
- Collins, C. R., Das, S., Wong, E. H., Andenmatten, N., Stallmach, R., Hackett, F., Herman, J.-P., Müller, S., Meissner, M., Blackman, M. J.** Robust inducible Cre recombinase activity in the human malaria parasite Plasmodium falciparum enables efficient gene deletion within a single asexual erythrocytic growth cycle. *Molecular microbiology* 88(4): 687–701 (2013a)
- Collins, C. R., Hackett, F., Strath, M., Penzo, M., Withers-Martinez, C., Baker, D. A., Blackman, M. J.** Malaria parasite cGMP-dependent protein kinase regulates blood stage merozoite secretory organelle discharge and egress. *PLoS pathogens* 9(5): e1003344 (2013b)
- Collins, C. R., Hackett, F., Atid, J., Tan, M. S. Y., Blackman, M. J.** The Plasmodium falciparum pseudoprotease SERA5 regulates the kinetics and efficiency of malaria parasite egress from host erythrocytes. *PLoS pathogens* 13(7): e1006453 (2017)
- Collins, W. E., Jeffery, G. M.** Plasmodium ovale: parasite and disease. *Clinical microbiology reviews* 18(3): 570–581 (2005)

- Collins, W. E., Jeffery, G. M.** Plasmodium malariae: parasite and disease. *Clinical microbiology reviews* 20(4): 579–592 (2007)
- Collins, C. R., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Blackman, M. J.** An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. *PLoS pathogens* 5(1): e1000273 (2009)
- Combrinck, J. M., Mabothe, T. E., Ncokazi, K. K., Ambele, M. A., Taylor, D., Smith, P. J., Hoppe, H. C., Egan, T. J.** Insights into the role of heme in the mechanism of action of antimalarials. *ACS chemical biology* 8(1): 133–137 (2013)
- Cook, G., C., Zumla, A., I., Manson's tropical diseases.** Elsevier Ltd 22nd Edition (2008)
- Coppi, A., Tewari, R., Bishop, J. R., Bennett, B. L., Lawrence, R., Esko, J. D., Billker, O., Sinnis, P.** Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to Plasmodium sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell host & microbe* 2(5): 316–327 (2007)
- Cowell, A. N., Winzeler, E. A.** Advances in omics-based methods to identify novel targets for malaria and other parasitic protozoan infections. *Genome medicine* 11(1): 63 (2019)
- Cowman, A. F., Berry, D., Baum, J.** The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *The Journal of cell biology* 198(6): 961–971 (2012)
- Cowman, A. F., Crabb, B. S.** Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 124(4): 755–766 (2006)
- Cowman, A. F., Tonkin, C. J., Tham, W.-H., Duraisingh, M. T.** The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell host & microbe* 22(2): 232–245 (2017)
- Cox, F. E.** History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & vectors* 3(1): 5 (2010)
- Cox-Singh, J., Hiu, J., Lucas, S. B., Divis, P. C., Zulkarnaen, M., Chandran, P., Wong, K. T., Adem, P., Zaki, S. R., Singh, B., Krishna, S.** Severe malaria - a case of fatal Plasmodium knowlesi infection with post-mortem findings: a case report. *Malaria journal* 9: 10 (2010)
- Crane, G.** Recent studies of hyperreactive malarious splenomegaly (tropical splenomegaly syndrome) in Papua New Guinea. *Papua and New Guinea medical journal* 29(1): 35–40 (1986)
- Crosnier, C., Bustamante, L. Y., Bartholdson, S. J., Bei, A. K., Theron, M., Uchikawa, M., Mboup, S., Ndir, O., Kwiatkowski, D. P., Duraisingh, M. T., Rayner, J. C., Wright, G. J.** Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. *Nature* 480(7378): 534–537 (2011)
- Cui, L., Su, X.-z.** Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert review of anti-infective therapy* 7(8): 999–1013 (2009)
- Currà, C., Gessmann, R., Pace, T., Picci, L., Peruzzi, G., Varamogianni-Mamatsi, V., Spanos, L., Garcia, C. R. S., Spaccapelo, R., Ponzi, M., Siden-Kiamos, I.** Release of Plasmodium sporozoites requires proteins with histone-fold dimerization domains. *Nature communications* 7: 13846 (2016)
- Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Di Paola, R., Muià, C., Crisafulli, C., Dugo, L., Collin, M., Britti, D., Caputi, A. P., Thiemermann, C.** Glycogen synthase kinase-3beta inhibition attenuates the degree of arthritis caused by type II collagen in the mouse. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 120(1): 57–67 (2006)
- Dajani, R., Fraser, E., Roe, S. M., Young, N., Good, V., Dale, T. C., Pearl, L. H.** Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* 105(6): 721–732 (2001)
- Dajani, R., Fraser, E., Roe, S. M., Yeo, M., Good, V. M., Thompson, V., Dale, T. C., Pearl, L. H.** Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3beta to the axin-APC scaffold complex. *The EMBO journal* 22(3): 494–501 (2003)
- Dandekar, M. P., Valvassori, S. S., Dal-Pont, G. C., Quevedo, J.** Glycogen Synthase Kinase-3β as a Putative Therapeutic Target for Bipolar Disorder. *Current drug metabolism* 19(8): 663–673 (2018)
- Danek, E. I., Tcherkezian, J., Triki, I., Meriane, M., Lamarche-Vane, N.** Glycogen synthase kinase-3 phosphorylates CdGAP at a consensus ERK 1 regulatory site. *The Journal of biological chemistry* 282(6): 3624–3631 (2007)
- Daneshvar, C., Davis, T. M. E., Cox-Singh, J., Rafa'ee, M. Z., Zakaria, S. K., Divis, P. C. S., Singh, B.** Clinical and laboratory features of human Plasmodium knowlesi infection. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 49(6): 852–860 (2009)
- D'Arcy, M. S.** Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international* 43(6): 582–592 (2019)
- Daubenberg, C. A., Pörtl-Frank, F., Jiang, G., Lipp, J., Certa, U., Pluschke, G.** Identification and recombinant expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Plasmodium falciparum. *Gene* 246(1-2): 255–264 (2000)
- Davies, J.** What are antibiotics? Archaic functions for modern activities. *Molecular microbiology* 4(8): 1227–1232 (1990)
- Davies, H., Belda, H., Broncel, M., Ye, X., Bisson, C., Introini, V., Dorin-Semlat, D., Semlat, J.-P., Tibúrcio, M., Gamain, B., Kaforou, M., Treeck, M.** An exported kinase family mediates species-specific erythrocyte remodelling and virulence in human malaria. *Nature microbiology* (2020)
- Davies, J., Spiegelman, G. B., Yim, G.** The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current opinion in microbiology* 9(5): 445–453 (2006)

- Dawn, A., Singh, S., More, K. R., Siddiqui, F. A., Pachikara, N., Ramdani, G., Langsley, G., Chitnis, C. E.** The central role of cAMP in regulating *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of human erythrocytes. *PLoS pathogens* 10(12): e1004520 (2014)
- de Ford, C., Penchalaiah, K., Kreft, A., Humar, M., Heydenreuter, W., Kangani, M., Sieber, S. A., Tietze, L. F., Merfort, I.** Bifunctional Duocarmycin Analogues as Inhibitors of Protein Tyrosine Kinases. *Journal of natural products* 82(1): 16–26 (2019)
- de Koning-Ward, T. F. de, Gilson, P. R., Boddey, J. A., Rug, M., Smith, B. J., Papenfuss, A. T., Sanders, P. R., Lundie, R. J., Maier, A. G., Cowman, A. F., Crabb, B. S.** A newly discovered protein export machine in malaria parasites. *Nature* 459(7249): 945–949 (2009)
- de Koning-Ward, T. F., Dixon, M. W. A., Tilley, L., Gilson, P. R.** *Plasmodium* species: master renovators of their host cells. *Nature reviews. Microbiology* 14(8): 494–507 (2016)
- de Koning-Ward, T. F., Gilson, P. R., Crabb, B. S.** Advances in molecular genetic systems in malaria. *Nature reviews. Microbiology* 13(6): 373–387 (2015)
- Deane, L. M.** Simian malaria in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 87 Suppl 3: 1–20 (1992)
- Dedigama-Arachchige, P. M., Pflum, M. K. H. K-CLASP: A Tool to Identify Phosphosite Specific Kinases and Interacting Proteins.** *ACS chemical biology* 11(12): 3251–3255 (2016)
- del Ser, T., Steinwachs, K. C., Gertz, H. J., Andrés, M. V., Gómez-Carrillo, B., Medina, M., Vericat, J. A., Redondo, P., Fleet, D., León, T.** Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: a pilot study. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 33(1): 205–215 (2013)
- Deligianni, E., Morgan, R. N., Bertuccini, L., Wirth, C. C., Silmon de Monerri, N. C., Spanos, L., Blackman, M. J., Louis, C., Pradel, G., Siden-Kiamos, I.** A perforin-like protein mediates disruption of the erythrocyte membrane during egress of *Plasmodium berghei* male gametocytes. *Cellular microbiology* 15(8): 1438–1455 (2013)
- Deligianni, E., Silmon de Monerri, N. C., McMillan, P. J., Bertuccini, L., Superti, F., Manola, M., Spanos, L., Louis, C., Blackman, M. J., Tilley, L., Siden-Kiamos, I.** Essential role of *Plasmodium* perforin-like protein 4 in ookinete midgut passage. *PLoS one* 13(8): e0201651 (2018)
- DeNicola, G. F., Martin, E. D., Chaikuad, A., Bassi, R., Clark, J., Martino, L., Verma, S., Sicard, P., Tata, R., Atkinson, R. A., Knapp, S., Conte, M. R., Marber, M. S.** Mechanism and consequence of the autoactivation of p38 α mitogen-activated protein kinase promoted by TAB1. *Nature structural & molecular biology* 20(10): 1182–1190 (2013)
- Dennis, A. S. M., Lehane, A. M., Ridgway, M. C., Holleran, J. P., Kirk, K.** Cell Swelling Induced by the Antimalarial KAE609 (Cipargamin) and Other PfATP4-Associated Antimalarials. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62(6) (2018)
- Desai, S. A., Krogstad, D. J., McCleskey, E. W.** A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. *Nature* 362(6421): 643–646 (1993)
- DeSimone, T. M., Jennings, C. V., Bei, A. K., Comeaux, C., Coleman, B. I., Refour, P., Triglia, T., Stubbs, J., Cowman, A. F., Duraisingh, M. T.** Cooperativity between *Plasmodium falciparum* adhesive proteins for invasion into erythrocytes. *Molecular microbiology* 72(3): 578–589 (2009)
- Dhingra, S. K., Small-Saunders, J. L., Ménard, D., Fidock, D. A.** *Plasmodium falciparum* resistance to piperazine driven by PfCRT. *The Lancet. Infectious diseases* 19(11): 1168–1169 (2019)
- Dichiara, M., Marrazzo, A., Prezzavento, O., Collina, S., Rescifina, A., Amata, E.** Repurposing of Human Kinase Inhibitors in Neglected Protozoan Diseases. *ChemMedChem* 12(16): 1235–1253 (2017)
- Didierlaurent, A. M., Laupèze, B., Di Pasquale, A., Hergli, N., Collignon, C., Garçon, N.** Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Expert review of vaccines* 16(1): 55–63 (2017)
- Dieckmann, A., Jung, A.** Mechanisms of sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 19(2): 143–147 (1986a)
- Dieckmann, A., Jung, A.** The mechanism of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 93 (Pt 2): 275–278 (1986b)
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., Sherr, C. J.** Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & development* 12(22): 3499–3511 (1998)
- Dietze, R., Perkins, M., Boulos, M., Luz, F., Reller, B., Corey, G. R.** The diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection using a new antigen detection system. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 52(1): 45–49 (1995)
- Dluzewski, A. R., Garcia, C. R.** Inhibition of invasion and intraerythrocytic development of *Plasmodium falciparum* by kinase inhibitors. *Experientia* 52(6): 621–623 (1996)
- Doble, B. W., Patel, S., Wood, G. A., Kockeritz, L. K., Woodgett, J. R.** Functional redundancy of GSK-3 α and GSK-3 β in Wnt/ β -catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. *Developmental cell* 12(6): 957–971 (2007)
- Doble, B. W., Woodgett, J. R.** GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of cell science* 116(Pt 7): 1175–1186 (2003)

- Doerig, C., Billker, O., Haystead, T., Sharma, P., Tobin, A. B., Waters, N. C. Protein kinases of malaria parasites: an update. *Trends in parasitology* 24(12): 570–577 (2008)
- Doerig, C., Meijer, L. Antimalarial drug discovery: targeting protein kinases. *Expert opinion on therapeutic targets* 11(3): 279–290 (2007)
- Dolan, S. A., Proctor, J. L., Alling, D. W., Okubo, Y., Wellem, T. E., Miller, L. H. Glycophorin B as an EBA-175 independent Plasmodium falciparum receptor of human erythrocytes. *Molecular and biochemical parasitology* 64(1): 55–63 (1994)
- Domínguez, J. M., Fuertes, A., Orozco, L., del Monte-Millán, M., Delgado, E., Medina, M. Evidence for irreversible inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by tideglusib. *The Journal of biological chemistry* 287(2): 893–904 (2012)
- Donald, R. G. K., Allocco, J., Singh, S. B., Nare, B., Salowe, S. P., Wiltsie, J., Liberator, P. A. Toxoplasma gondii cyclic GMP-dependent kinase: chemotherapeutic targeting of an essential parasite protein kinase. *Eukaryotic cell* 1(3): 317–328 (2002)
- Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A. P., Tarning, J., Lwin, K. M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., Lee, S. J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S. S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N. P. J., Lindegardh, N., Socheat, D., White, N. J. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *The New England journal of medicine* 361(5): 455–467 (2009)
- Doolan, D. L., Dobaño, C., Baird, J. K. Acquired immunity to malaria. *Clinical microbiology reviews* 22(1): 13-36, Table of Contents (2009)
- Dorin, D., Le Roch, K., Sallicandro, P., Alano, P., Parzy, D., Poulet, P., Meijer, L., Doerig, C. Pfnek-1, a NIMA-related kinase from the human malaria parasite Plasmodium falciparum Biochemical properties and possible involvement in MAPK regulation. *European journal of biochemistry* 268(9): 2600–2608 (2001)
- Dorin-Semblat, D., Demarta-Gatsi, C., Hamelin, R., Armand, F., Carvalho, T. G., Moniatte, M., Doerig, C. Malaria Parasite-Infected Erythrocytes Secrete PfCK1, the Plasmodium Homologue of the Pleiotropic Protein Kinase Casein Kinase 1. *PLoS one* 10(12): e0139591 (2015)
- Dorin-Semblat, D., Schmitt, S., Semblat, J.-P., Sicard, A., Reininger, L., Goldring, D., Patterson, S., Quashie, N., Chakrabarti, D., Meijer, L., Doerig, C. Plasmodium falciparum NIMA-related kinase Pfnek-1: sex specificity and assessment of essentiality for the erythrocytic asexual cycle. *Microbiology (Reading, England)* 157(Pt 10): 2785–2794 (2011)
- Dorn, A., Vippagunta, S. R., Matile, H., Jaquet, C., Vennerstrom, J. L., Ridley, R. G. An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. *Biochemical pharmacology* 55(6): 727–736 (1998)
- Dotsenko, V. V., Buryi, D. S., Lukina, D. Y., Stolyarova, A. N., Aksenov, N. A., Aksenova, I. V., Strelkov, V. D., Dyadyuchenko, L. V. Substituted N-(thieno[2,3-b]pyridine-3-yl)acetamides: synthesis, reactions, and biological activity. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* 150(11): 1973–1985 (2019)
- Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic acids research* 16(13): 6127–6145 (1988)
- Draper, S. J., Sack, B. K., King, C. R., Nielsen, C. M., Rayner, J. C., Higgins, M. K., Long, C. A., Seder, R. A. Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. *Cell host & microbe* 24(1): 43–56 (2018)
- Droucheau, E., Primot, A., Thomas, V., Mattei, D., Knockaert, M., Richardson, C., Sallicandro, P., Alano, P., Jafarshad, A., Baratte, B., Kunick, C., Parzy, D., Pearl, L., Doerig, C., Meijer, L. Plasmodium falciparum glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors. *Biochimica et biophysica acta* 1697(1-2): 181–196 (2004)
- Dumon-Seignover, L., Cariot, G., Vuillard, L. The toxicity of recombinant proteins in Escherichia coli: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein expression and purification* 37(1): 203–206 (2004)
- Duraisingh, M. T., Cowman, A. F. Contribution of the pfmdr1 gene to antimalarial drug-resistance. *Acta tropica* 94(3): 181–190 (2005)
- Duraisingh, M. T., Maier, A. G., Triglia, T., Cowman, A. F. Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in Plasmodium falciparum utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(8): 4796–4801 (2003a)
- Duraisingh, M. T., Triglia, T., Ralph, S. A., Rayner, J. C., Barnwell, J. W., McFadden, G. I., Cowman, A. F. Phenotypic variation of Plasmodium falciparum merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *The EMBO journal* 22(5): 1047–1057 (2003b)
- Dutta, H. M., Dutt, A. K. Malarial ecology: a global perspective. *Social science & medicine* 12(2D): 69–84 (1978)
- Dvorak, J. A., Miller, L. H., Whitehouse, W. C., Shiroishi, T. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science (New York, N.Y.)* 187(4178): 748–750 (1975)
- Dvorin, J. D., Martyn, D. C., Patel, S. D., Grimley, J. S., Collins, C. R., Hopp, C. S., Bright, A. T., Westenberger, S., Winzler, E., Blackman, M. J., Baker, D. A., Wandless, T. J., Duraisingh, M. T. A plant-like kinase in Plasmodium falciparum regulates parasite egress from erythrocytes. *Science (New York, N.Y.)* 328(5980): 910–912 (2010)

- Echeverry**, D. F., Holmgren, G., Murillo, C., Higuera, J. C., Björkman, A., Gil, J. P., Osorio, L. Short report: polymorphisms in the *pfCRT* and *pfmdr1* genes of *Plasmodium falciparum* and in vitro susceptibility to amodiaquine and desethylamodiaquine. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 77(6): 1034–1038 (2007)
- Ecker**, A., Pinto, S. B., Baker, K. W., Kafatos, F. C., Sinden, R. E. *Plasmodium berghei*: plasmodium perforin-like protein 5 is required for mosquito midgut invasion in *Anopheles stephensi*. *Experimental parasitology* 116(4): 504–508 (2007)
- Egan**, T. J., Ncokazi, K. K. Quinoline antimalarials decrease the rate of beta-hematin formation. *Journal of inorganic biochemistry* 99(7): 1532–1539 (2005)
- Egan**, T. J., Ross, D. C., Adams, P. A. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment). *FEBS letters* 352(1): 54–57 (1994)
- Ejigiri**, I., Ragheb, D. R. T., Pino, P., Coppi, A., Bennett, B. L., Soldati-Favre, D., Sinnis, P. Shedding of TRAP by a rhomboid protease from the malaria sporozoite surface is essential for gliding motility and sporozoite infectivity. *PLoS pathogens* 8(7): e1002725 (2012)
- Eksi**, S., Morahan, B. J., Haile, Y., Furuya, T., Jiang, H., Ali, O., Xu, H., Kiattibutr, K., Suri, A., Czesny, B., Adeyemo, A., Myers, T. G., Sattabongkot, J., Su, X.-z., Williamson, K. C. *Plasmodium falciparum* gametocyte development 1 (*Pfgdv1*) and gametocytogenesis early gene identification and commitment to sexual development. *PLoS pathogens* 8(10): e1002964 (2012)
- Elliott**, D. A., McIntosh, M. T., Hosgood, H. D., Chen, S., Zhang, G., Baevova, P., Joiner, K. A. Four distinct pathways of hemoglobin uptake in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(7): 2463–2468 (2008)
- Elsworth**, B., Matthews, K., Nie, C. Q., Kalanon, M., Charnaud, S. C., Sanders, P. R., Chisholm, S. A., Counihan, N. A., Shaw, P. J., Pino, P., Chan, J.-A., Azevedo, M. F., Rogerson, S. J., Beeson, J. G., Crabb, B. S., Gilson, P. R., Koning-Ward, T. F. de. PTEX is an essential nexus for protein export in malaria parasites. *Nature* 511(7511): 587–591 (2014)
- Embi**, M. N., Ganesan, N., Sidek, H. M. Is GSK3 β a molecular target of chloroquine treatment against COVID-19? *Drug discoveries & therapeutics* 14(2): 107–108 (2020)
- Embi**, N., Rylatt, D. B., Cohen, P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *European journal of biochemistry* 107(2): 519–527 (1980)
- Engelmann**, S., Silvie, O., Matuschewski, K. Disruption of *Plasmodium* sporozoite transmission by depletion of sporozoite invasion-associated protein 1. *Eukaryotic cell* 8(4): 640–648 (2009)
- Enomoto**, Y., Furutani, Y., Naganawa, H., Hamada, M., Takeuchi, T., Umezawa, H. Isolation and Characterization of PDE-I and II, the Inhibitors of Cyclic Adenosine-3',5'-monophosphate Phosphodiesterase. *Agricultural and Biological Chemistry* 42(7): 1331–1336 (1978)
- Eskenazi**, B., Chevrier, J., Rosas, L. G., Anderson, H. A., Bornman, M. S., Bouwman, H., Chen, A., Cohn, B. A., Jager, C. de, Henshel, D. S., Leipzig, F., Leipzig, J. S., Lorenz, E. C., Snedeker, S. M., Stapleton, D. The Pine River statement: human health consequences of DDT use. *Environmental health perspectives* 117(9): 1359–1367 (2009)
- Eubanks**, A. L., Perkins, M. M., Sylvester, K., Ganley, J. G., Posfai, D., Sanschargin, P. C., Hong, J., Sliz, P., Derbyshire, E. R. In silico Screening and Evaluation of *Plasmodium falciparum* Protein Kinase 5 (PK5) Inhibitors. *ChemMedChem* 13(23): 2479–2483 (2018)
- Ezzat**, S. M., Bishbishy, M. H. E., Habtemariam, S., Salehi, B., Sharifi-Rad, M., Martins, N., Sharifi-Rad, J. Looking at Marine-Derived Bioactive Molecules as Upcoming Anti-Diabetic Agents: A Special Emphasis on PTP1B Inhibitors. *Molecules (Basel, Switzerland)* 23(12) (2018)
- Fan**, J., Lannoy, I. A. M. de. Pharmacokinetics. *Biochemical pharmacology* 87(1): 93–120 (2014)
- Fang**, H., Gomes, A. R., Klages, N., Pino, P., Maco, B., Walker, E. M., Zenonos, Z. A., Angrisano, F., Baum, J., Doerig, C., Baker, D. A., Billker, O., Brochet, M. Epistasis studies reveal redundancy among calcium-dependent protein kinases in motility and invasion of malaria parasites. *Nature communications* 9(1): 4248 (2018)
- Farajollahi**, A., Fonseca, D. M., Kramer, L. D., Marm Kilpatrick, A. "Bird biting" mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 11(7): 1577–1585 (2011)
- Farcas**, G. A., Zhong, K. J. Y., Lovegrove, F. E., Graham, C. M., Kain, K. C. Evaluation of the Binax NOW ICT test versus polymerase chain reaction and microscopy for the detection of malaria in returned travelers. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 69(6): 589–592 (2003)
- Feng**, Y., LoGrasso, P. V., Defert, O., Li, R. Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential. *Journal of medicinal chemistry* 59(6): 2269–2300 (2016)
- Feng**, L., Reynisdóttir, I., Reynisson, J. The effect of PLC- γ 2 inhibitors on the growth of human tumour cells. *European journal of medicinal chemistry* 54: 463–469 (2012)
- Ferguson**, D. J. P., Sahoo, N., Pinches, R. A., Bumstead, J. M., Tomley, F. M., Gubbels, M.-J. MORN1 has a conserved role in asexual and sexual development across the apicomplexa. *Eukaryotic cell* 7(4): 698–711 (2008)

- Fernebro, J.** Fighting bacterial infections-future treatment options. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 14(2): 125–139 (2011)
- Ferrari, S. M., Centanni, M., Virili, C., Miccoli, M., Ferrari, P., Ruffilli, I., Ragusa, F., Antonelli, A., Fallahi, P.** Sunitinib in the Treatment of Thyroid Cancer. *Current medicinal chemistry* 26(6): 963–972 (2019)
- Fidock, D. A., Nomura, T., Talley, A. K., Cooper, R. A., Dzekunov, S. M., Ferdig, M. T., Ursos, L. M., Sidhu, A. B., Naudé, B., Deitsch, K. W., Su, X. Z., Wootton, J. C., Roepe, P. D., Wellems, T. E.** Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular cell* 6(4): 861–871 (2000)
- Filarsky, M., Fraschka, S. A., Niederwieser, I., Brancucci, N. M. B., Carrington, E., Carrió, E., Moes, S., Jenoe, P., Bártfai, R., Voss, T. S.** GDV1 induces sexual commitment of malaria parasites by antagonizing HP1-dependent gene silencing. *Science (New York, N.Y.)* 359(6381): 1259–1263 (2018)
- Fiol, C. J., Mahrenholz, A. M., Wang, Y., Roeske, R. W., Roach, P. J.** Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *The Journal of biological chemistry* 262(29): 14042–14048 (1987)
- Fivelman, Q. L., Butcher, G. A., Adagu, I. S., Warhurst, D. C., Pasvol, G.** Malarone treatment failure and in vitro confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malaria journal* 1: 1 (2002)
- Fleischer, B.** Editorial: 100 years ago: Giemsa's solution for staining of plasmodia. *Tropical medicine & international health: TM & IH* 9(7): 755–756 (2004)
- Flueck, C., Drought, L. G., Jones, A., Patel, A., Perrin, A. J., Walker, E. M., Nofal, S. D., Snijders, A. P., Blackman, M. J., Baker, D. A.** Phosphodiesterase beta is the master regulator of cAMP signalling during malaria parasite invasion. *PLoS biology* 17(2): e3000154 (2019)
- Foote, S. J., Thompson, J. K., Cowman, A. F., Kemp, D. J.** Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell* 57(6): 921–930 (1989)
- Force, T., Woodgett, J. R.** Unique and overlapping functions of GSK-3 isoforms in cell differentiation and proliferation and cardiovascular development. *The Journal of biological chemistry* 284(15): 9643–9647 (2009)
- Francia, M. E., Striepen, B.** Cell division in apicomplexan parasites. *Nature reviews. Microbiology* 12(2): 125–136 (2014)
- Francis, S. E., Sullivan, D. J., Goldberg, D. E.** Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annual review of microbiology* 51: 97–123 (1997)
- Franke-Fayard, B., Fonager, J., Braks, A., Khan, S. M., Janse, C. J.** Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria? *PLoS pathogens* 6(9): e1001032 (2010)
- Frénal, K., Dubremetz, J.-F., Lebrun, M., Soldati-Favre, D.** Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. *Nature reviews. Microbiology* 15(11): 645–660 (2017)
- Frénal, K., Polonais, V., Marq, J.-B., Stratmann, R., Limenitakis, J., Soldati-Favre, D.** Functional dissection of the apicomplexan glideosome molecular architecture. *Cell host & microbe* 8(4): 343–357 (2010)
- Fricke, J. M., Vardo-Zalik, A. M., Schall, J. J.** Geographic genetic differentiation of a malaria parasite, *Plasmodium mexicanum*, and its lizard host, *Sceloporus occidentalis*. *The Journal of parasitology* 96(2): 308–313 (2010)
- Fry, M., Pudney, M.** Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochemical pharmacology* 43(7): 1545–1553 (1992)
- Fugel, W., Oberholzer, A. E., Gschloessl, B., Dzikowski, R., Pressburger, N., Preu, L., Pearl, L. H., Baratte, B., Ratin, M., Okun, I., Doerig, C., Kruggel, S., Lemcke, T., Meijer, L., Kunick, C.** 3,6-Diamino-4-(2-halophenyl)-2-benzoylthieno[2,3-b]pyridine-5-carbonitriles are selective inhibitors of *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3. *Journal of medicinal chemistry* 56(1): 264–275 (2013)
- Furuya, T., Mu, J., Hayton, K., Liu, A., Duan, J., Nkrumah, L., Joy, D. A., Fidock, D. A., Fujioka, H., Vaidya, A. B., Wellems, T. E., Su, X.-z.** Disruption of a *Plasmodium falciparum* gene linked to male sexual development causes early arrest in gametocytogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(46): 16813–16818 (2005)
- Gaillard, T., Boxberger, M., Madamet, M., Pradines, B.** Has doxycycline, in combination with anti-malarial drugs, a role to play in intermittent preventive treatment of *Plasmodium falciparum* malaria infection in pregnant women in Africa? *Malaria journal* 17(1): 469 (2018)
- Galaway, F., Drought, L. G., Fala, M., Cross, N., Kemp, A. C., Rayner, J. C., Wright, G. J.** P113 is a merozoite surface protein that binds the N terminus of *Plasmodium falciparum* RH5. *Nature communications* 8: 14333 (2017)
- Galaway, F., Yu, R., Constantinou, A., Prugnolle, F., Wright, G. J.** Resurrection of the ancestral RH5 invasion ligand provides a molecular explanation for the origin of *P. falciparum* malaria in humans. *PLoS biology* 17(10): e3000490 (2019)
- Gallup, J. L., Sachs, J. D.** The economic burden of malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 64(1-2 Suppl): 85–96 (2001)

- Gamboa, D., Ho, M.-F., Bendezu, J., Torres, K., Chiodini, P. L., Barnwell, J. W., Incardona, S., Perkins, M., Bell, D., McCarthy, J., Cheng, Q.** A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack pfrp2 and pfrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests. *PLoS one* 5(1): e8091 (2010)
- Gamo, F.-J., Sanz, L. M., Vidal, J., Cozar, C. de, Alvarez, E., Lavandera, J.-L., Vanderwall, D. E., Green, D. V. S., Kumar, V., Hasan, S., Brown, J. R., Peishoff, C. E., Cardon, L. R., Garcia-Bustos, J. F.** Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* 465(7296): 305–310 (2010)
- Garcia, L. S.** Malaria. *Clinics in laboratory medicine* 30(1): 93–129 (2010)
- Garcia, G. E., Wirtz, R. A., Barr, J. R., Woolfitt, A., Rosenberg, R.** Xanthurenic acid induces gametogenesis in Plasmodium, the malaria parasite. *The Journal of biological chemistry* 273(20): 12003–12005 (1998)
- Garçon, N., Heppner, D. G., Cohen, J.** Development of RTS,S/AS02: a purified subunit-based malaria vaccine candidate formulated with a novel adjuvant. *Expert review of vaccines* 2(2): 231–238 (2003)
- Garland, M., Loscher, S., Bogyo, M.** Chemical Strategies To Target Bacterial Virulence. *Chemical reviews* 117(5): 4422–4461 (2017)
- Garnham, P. C. C.** Malaria Parasites and Other Haemosporidia. *Blackwell Science Ltd* (1966)
- Garnham, P. C., Kuttler, K. L.** A malaria parasite of the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) and its relation with known species of Plasmodium in other ungulates. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 206(1165): 395–402 (1980)
- Garoff, H., Ansorge, W.** Improvements of DNA sequencing gels. *Analytical biochemistry* 115(2): 450–457 (1981)
- Garre, S., Gamage, A. K., Faner, T. R., Dedigama-Arachchige, P., Pflum, M. K. H.** Identification of Kinases and Interactors of p53 Using Kinase-Catalyzed Cross-Linking and Immunoprecipitation. *Journal of the American Chemical Society* 140(47): 16299–16310 (2018)
- Garre, S., Senevirathne, C., Pflum, M. K. H.** A comparative study of ATP analogs for phosphorylation-dependent kinase-substrate crosslinking. *Bioorganic & medicinal chemistry* 22(5): 1620–1625 (2014)
- Garten, M., Nasamu, A. S., Niles, J. C., Zimmerberg, J., Goldberg, D. E., Beck, J. R.** EXP2 is a nutrient-permeable channel in the vacuolar membrane of Plasmodium and is essential for protein export via PTEX. *Nature microbiology* 3(10): 1090–1098 (2018)
- Gaskins, E., Gilk, S., DeVore, N., Mann, T., Ward, G., Beckers, C.** Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of cell biology* 165(3): 383–393 (2004)
- Geda, P., Patury, S., Ma, J., Bharucha, N., Dobry, C. J., Lawson, S. K., Gestwicki, J. E., Kumar, A.** A small molecule-directed approach to control protein localization and function. *Yeast (Chichester, England)* 25(8): 577–594 (2008)
- Genton, B., D'Acremont, V., Rare, L., Baea, K., Reeder, J. C., Alpers, M. P., Müller, I.** Plasmodium vivax and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS medicine* 5(6): e127 (2008)
- George, J. W., Brosh, R. M., Matson, S. W.** A dominant negative allele of the Escherichia coli uvrD gene encoding DNA helicase II. A biochemical and genetic characterization. *Journal of molecular biology* 235(2): 424–435 (1994)
- Gerstl, S., Dunkley, S., Mukhtar, A., Smet, M. de, Baker, S., Maikere, J.** Assessment of two malaria rapid diagnostic tests in children under five years of age, with follow-up of false-positive pLDH test results, in a hyperendemic falciparum malaria area, Sierra Leone. *Malaria journal* 9: 28 (2010)
- Gething, P. W., Elyazar, I. R. F., Moyes, C. L., Smith, D. L., Battle, K. E., Guerra, C. A., Patil, A. P., Tatem, A. J., Howes, R. E., Myers, M. F., George, D. B., Horby, P., Wertheim, H. F. L., Price, R. N., Müller, I., Baird, J. K., Hay, S. I.** A long neglected world malaria map: Plasmodium vivax endemicity in 2010. *PLoS neglected tropical diseases* 6(9): e1814 (2012)
- Ghartey-Kwansah, G., Yin, Q., Li, Z., Gumpfer, K., Sun, Y., Yang, R., Wang, D., Jones, O., Zhou, X., Wang, L., Bryant, J., Ma, J., Boampong, J. N., Xu, X.** Calcium-dependent Protein Kinases in Malaria Parasite Development and Infection. *Cell transplantation* 29: 963689719884888 (2020)
- Gibhard, L., Njoroge, M., Paquet, T., Brunschwig, C., Taylor, D., Lawrence, N., Abay, E., Wittlin, S., Wiesner, L., Street, L. J., Chibale, K., Basarab, G. S.** Investigating Sulfoxide-to-Sulfone Conversion as a Prodrug Strategy for a Phosphatidylinositol 4-Kinase Inhibitor in a Humanized Mouse Model of Malaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62(12) (2018)
- Giemsa, G.** Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung. *Centralblatt für Bakteriologie Abteilung 32*: 307–313 (1904)
- Gilberger, T.-W., Thompson, J. K., Triglia, T., Good, R. T., Duraisingh, M. T., Cowman, A. F.** A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from Plasmodium falciparum defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. *The Journal of biological chemistry* 278(16): 14480–14486 (2003a)
- Gilberger, T.-W., Thompson, J. K., Reed, M. B., Good, R. T., Cowman, A. F.** The cytoplasmic domain of the Plasmodium falciparum ligand EBA-175 is essential for invasion but not protein trafficking. *The Journal of cell biology* 162(2): 317–327 (2003b)
- Gilson, P. R., Crabb, B. S.** Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by Plasmodium falciparum merozoites. *International journal for parasitology* 39(1): 91–96 (2009)

- Glison, P. R., Nebl, T., Vukcevic, D., Moritz, R. L., Sargeant, T., Speed, T. P., Schofield, L., Crabb, B. S.** Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 5(7): 1286–1299 (2006)
- Godemann, R., Biernat, J., Mandelkow, E., Mandelkow, E.-M.** Phosphorylation of tau protein by recombinant GSK-3 β : pronounced phosphorylation at select Ser/Thr-Pro motifs but no phosphorylation at Ser262 in the repeat domain. *FEBS letters* 454(1-2): 157–164 (1999)
- Goel, V. K., Li, X., Chen, H., Liu, S.-C., Chishti, A. H., Oh, S. S.** Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(9): 5164–5169 (2003)
- Goldgof, G. M., Durrant, J. D., Otilie, S., Vigil, E., Allen, K. E., Gunawan, F., Kostylev, M., Henderson, K. A., Yang, J., Schenken, J., LaMonte, G. M., Manary, M. J., Murao, A., Nachon, M., Stanhope, R., Prescott, M., McNamara, C. W., Slayman, C. W., Amaro, R. E., Suzuki, Y., Winzeler, E. A.** Comparative chemical genomics reveal that the spiroindolone antimalarial KAE609 (Cipargamin) is a P-type ATPase inhibitor. *Scientific reports* 6: 27806 (2016)
- Gómez-Pérez, G. P., Legarda, A., Muñoz, J., Sim, B. K. L., Ballester, M. R., Dobaño, C., Moncunill, G., Campo, J. J., Cisteró, P., Jimenez, A., Barrios, D., Mordmüller, B., Pardos, J., Navarro, M., Zita, C. J., Nhamuave, C. A., García-Basteiro, A. L., Sanz, A., Aldea, M., Manoj, A., Gunasekera, A., Billingsley, P. F., Aponte, J. J., James, E. R., Guinovart, C., Antonijoan, R. M., Kremsner, P. G., Hoffman, S. L., Alonso, P. L.** Controlled human malaria infection by intramuscular and direct venous inoculation of cryopreserved *Plasmodium falciparum* sporozoites in malaria-naïve volunteers: effect of injection volume and dose on infectivity rates. *Malaria journal* 14: 306 (2015)
- Goodman, C. D., Siregar, J. E., Mollard, V., Vega-Rodríguez, J., Syafruddin, D., Matsuoka, H., Matsuzaki, M., Toyama, T., Sturm, A., Cozijnsen, A., Jacobs-Lorena, M., Kita, K., Marzuki, S., McFadden, G. I.** Parasites resistant to the antimalarial atovaquone fail to transmit by mosquitoes. *Science (New York, N.Y.)* 352(6283): 349–353 (2016)
- Gray, J. E., Infante, J. R., Brail, L. H., Simon, G. R., Cooksey, J. F., Jones, S. F., Farrington, D. L., Yeo, A., Jackson, K. A., Chow, K. H., Zamek-Gliszczynski, M. J., Burris, H. A.** A first-in-human phase I dose-escalation, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation of intravenous LY2090314, a glycogen synthase kinase 3 inhibitor, administered in combination with pemetrexed and carboplatin. *Investigational new drugs* 33(6): 1187–1196 (2015)
- Greenwood, B.** The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369(1645): 20130433 (2014)
- Greenwood, B. M., Bradley, A. K., Greenwood, A. M., Byass, P., Jammeh, K., Marsh, K., Tulloch, S., Oldfield, F. S., Hayes, R.** Mortality and morbidity from malaria among children in a rural area of The Gambia, West Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81(3): 478–486 (1987)
- Guiguemde, W. A., Shelat, A. A., Bouck, D., Duffy, S., Crowther, G. J., Davis, P. H., Smithson, D. C., Connelly, M., Clark, J., Zhu, F., Jiménez-Díaz, M. B., Martínez, M. S., Wilson, E. B., Tripathi, A. K., Gut, J., Sharlow, E. R., Bathurst, I., El Mazouni, F., Fowble, J. W., Forquer, I., McGinley, P. L., Castro, S., Angulo-Barturen, I., Ferrer, S., Rosenthal, P. J., DeRisi, J. L., Sullivan, D. J., Lazo, J. S., Roos, D. S., Riscoe, M. K., Phillips, M. A., Rathod, P. K., van Voorhis, W. C., Avery, V. M., Guy, R. K.** Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 465(7296): 311–315 (2010)
- Guiguemde, W. A., Shelat, A. A., Garcia-Bustos, J. F., Diagana, T. T., Gamo, F.-J., Guy, R. K.** Global phenotypic screening for antimalarials. *Chemistry & biology* 19(1): 116–129 (2012)
- Guinet, F., Dvorak, J. A., Fujioka, H., Keister, D. B., Muratova, O., Kaslow, D. C., Aikawa, M., Vaidya, A. B., Wellem, T. E. A.** A developmental defect in *Plasmodium falciparum* male gametogenesis. *The Journal of cell biology* 135(1): 269–278 (1996)
- Gulati, S., Ekland, E. H., Ruggles, K. V., Chan, R. B., Jayabalasingham, B., Zhou, B., Mantel, P.-Y., Lee, M. C. S., Spottiswoode, N., Coburn-Flynn, O., Hjelmqvist, D., Worgall, T. S., Marti, M., Di Paolo, G., Fidock, D. A.** Profiling the Essential Nature of Lipid Metabolism in Asexual Blood and Gametocyte Stages of *Plasmodium falciparum*. *Cell host & microbe* 18(3): 371–381 (2015)
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D. I.** Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS pathogens* 7(7): e1002158 (2011)
- Gunalan, K., Gao, X., Liew, K. J. L., Preiser, P. R.** Differences in erythrocyte receptor specificity of different parts of the *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homologue 2a. *Infection and immunity* 79(8): 3421–3430 (2011)
- Gural, N., Mancio-Silva, L., Miller, A. B., Galstian, A., Butty, V. L., Levine, S. S., Patrapuvich, R., Desai, S. P., Mikolajczak, S. A., Kappe, S. H. I., Fleming, H. E., March, S., Sattabongkot, J., Bhatia, S. N.** In Vitro Culture, Drug Sensitivity, and Transcriptome of *Plasmodium Vivax* Hypnozoites. *Cell host & microbe* 23(3): 395-406.e4 (2018)
- Guttery, D. S., Ferguson, D. J. P., Poulin, B., Xu, Z., Straschil, U., Klop, O., Solyakov, L., Sandrini, S. M., Brady, D., Nieduszynski, C. A., Janse, C. J., Holder, A. A., Tobin, A. B., Tewari, R.** A putative homologue of CDC20/CDH1 in the malaria parasite is essential for male gamete development. *PLoS pathogens* 8(2): e1002554 (2012)
- Guttery, D. S., Poulin, B., Ramaprasad, A., Wall, R. J., Ferguson, D. J. P., Brady, D., Patzewitz, E.-M., Whipple, S., Straschil, U., Wright, M. H., Mohamed, A. M. A. H., Radhakrishnan, A., Arold, S. T., Tate, E. W., Holder, A. A., Wickstead, B., Pain, A., Tewari, R.** Genome-wide functional analysis of *Plasmodium* protein phosphatases reveals key regulators of parasite development and differentiation. *Cell host & microbe* 16(1): 128–140 (2014)
- Hale, V. L., Watermeyer, J. M., Hackett, F., Vizcay-Barrena, G., van Ooij, C., Thomas, J. A., Spink, M. C., Harkiolaki, M., Duke, E., Fleck, R. A., Blackman, M. J., Saibil, H. R.** Parasitophorous vacuole poration precedes its rupture and rapid host erythrocyte

cytoskeleton collapse in *Plasmodium falciparum* egress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(13): 3439–3444 (2017)

Hallyburton, I., Grimaldi, R., Woodland, A., Baragaña, B., Luksch, T., Spinks, D., James, D., Leroy, D., Waterson, D., Fairlamb, A. H., Wyatt, P. G., Gilbert, I. H., Frearson, J. A. Screening a protein kinase inhibitor library against *Plasmodium falciparum*. *Malaria journal* 16(1): 446 (2017)

Hamid, M. M. A., Remarque, E. J., El Hassan, I. M., Hussain, A. A., Narum, D. L., Thomas, A. W., Kocken, C. H. M., Weiss, W. R., Faber, B. W. Malaria infection by sporozoite challenge induces high functional antibody titres against blood stage antigens after a DNA prime, poxvirus boost vaccination strategy in Rhesus macaques. *Malaria journal* 10: 29 (2011)

Hanger, D. P., Hughes, K., Woodgett, J. R., Brion, J. P., Anderton, B. H. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neuroscience letters* 147(1): 58–62 (1992)

Hanks, S. K. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome biology* 4(5): 111 (2003)

Hanssen, E., Knoechel, C., Dearnley, M., Dixon, M. W. A., Le Gros, M., Larabell, C., Tilley, L. Soft X-ray microscopy analysis of cell volume and hemoglobin content in erythrocytes infected with asexual and sexual stages of *Plasmodium falciparum*. *Journal of structural biology* 177(2): 224–232 (2012)

Hanssen, E., Sougrat, R., Frankland, S., Deed, S., Klonis, N., Lippincott-Schwartz, J., Tilley, L. Electron tomography of the Maurer's cleft organelles of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes reveals novel structural features. *Molecular microbiology* 67(4): 703–718 (2008)

Happel, N., Stoldt, S., Schmidt, B., Doenecke, D. M phase-specific phosphorylation of histone H1.5 at threonine 10 by GSK-3. *Journal of molecular biology* 386(2): 339–350 (2009)

Harding, C. R., Egarter, S., Gow, M., Jiménez-Ruiz, E., Ferguson, D. J. P., Meissner, M. Gliding Associated Proteins Play Essential Roles during the Formation of the Inner Membrane Complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens* 12(2): e1005403 (2016)

Harper, J. F., Harmon, A. Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6(7): 555–566 (2005)

Haruki, H., Nishikawa, J., Laemmli, U. K. The anchor-away technique: rapid, conditional establishment of yeast mutant phenotypes. *Molecular cell* 31(6): 925–932 (2008)

Hawley, S. R., Bray, P. G., Mungthin, M., Atkinson, J. D., O'Neill, P. M., Ward, S. A. Relationship between Antimalarial Drug Activity, Accumulation, and Inhibition of Heme Polymerization in *Plasmodium falciparum* In Vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42(3): 682–686 (1998)

Hayakawa, T., Culleton, R., Otani, H., Horii, T., Tanabe, K. Big bang in the evolution of extant malaria parasites. *Molecular biology and evolution* 25(10): 2233–2239 (2008)

Healer, J., Wong, W., Thompson, J. K., He, W., Birkinshaw, R. W., Miura, K., Long, C. A., Soroka, V., Søggaard, T. M. M., Jørgensen, T., Jongh, W. A. de, Weir, C., Svahn, E., Czabotar, P. E., Tham, W.-H., Mueller, I., Barlow, P. N., Cowman, A. F. Neutralising antibodies block the function of Rh5/Ripr/CyRPA complex during invasion of *Plasmodium falciparum* into human erythrocytes. *Cellular microbiology* 21(7): e13030 (2019)

Henderson, D., Hurley, L. H. Specific targeting of protein-DNA complexes by DNA-reactive drugs (+)-CC-1065 and pluramycins. *Journal of molecular recognition: JMR* 9(2): 75–87 (1996)

Henrici, R. C., Edwards, R. L., Zoltner, M., van Schalkwyk, D. A., Hart, M. N., Mohring, F., Moon, R. W., Nofal, S. D., Patel, A., Flueck, C., Baker, D. A., Odom John, A. R., Field, M. C., Sutherland, C. J. The *Plasmodium falciparum* Artemisinin Susceptibility-Associated AP-2 Adaptin μ Subunit is Clathrin Independent and Essential for Schizont Maturation. *mBio* 11(1) (2020)

Heringa, J. Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Computers & chemistry* 23(3-4): 341–364 (1999)

Higuchi, R., Krummel, B., Saiki, R. K. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic acids research* 16(15): 7351–7367 (1988)

Hirai, M., Arai, M., Mori, T., Miyagishima, S.-Y., Kawai, S., Kita, K., Kuroiwa, T., Terenius, O., Matsuoka, H. Male fertility of malaria parasites is determined by GCS1, a plant-type reproduction factor. *Current biology: CB* 18(8): 607–613 (2008)

Ho, C.-M., Beck, J. R., Lai, M., Cui, Y., Goldberg, D. E., Egea, P. F., Zhou, Z. H. Malaria parasite translocon structure and mechanism of effector export. *Nature* 561(7721): 70–75 (2018)

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., Pease, L. R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77(1): 51–59 (1989)

Hodder, A. N., Crewther, P. E., Matthew, M. L., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Anders, R. F. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *The Journal of biological chemistry* 271(46): 29446–29452 (1996)

Hoeflich, K. P., Luo, J., Rubie, E. A., Tsao, M. S., Jin, O., Woodgett, J. R. Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature* 406(6791): 86–90 (2000)

Hoffman, S. L., Goh, L. M. L., Luke, T. C., Schneider, I., Le, T. P., Doolan, D. L., Sacci, J., La Vega, P. de, Dowler, M., Paul, C., Gordon, D. M., Stoute, J. A., Church, L. W. P., Sedegah, M., Heppner, D. G., Ballou, W. R., Richie, T. L. Protection of humans

- against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *The Journal of infectious diseases* 185(8): 1155–1164 (2002)
- Höglinger**, G. U., Huppertz, H.-J., Wagenpfeil, S., Andrés, M. V., Belloch, V., León, T., del Ser, T. Tideglusib reduces progression of brain atrophy in progressive supranuclear palsy in a randomized trial. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 29(4): 479–487 (2014)
- Höglinger**, G. U., Schöpe, J., Stamelou, M., Kassubek, J., del Ser, T., Boxer, A. L., Wagenpfeil, S., Huppertz, H.-J. Longitudinal magnetic resonance imaging in progressive supranuclear palsy: A new combined score for clinical trials. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 32(6): 842–852 (2017)
- Holder**, A. A., Blackman, M. J., Burghaus, P. A., Chappel, J. A., Ling, I. T., McCallum-Deighton, N., Shai, S. A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 87 Suppl 3: 37–42 (1992)
- Hopp**, C. S., Chiou, K., Ragheb, D. R. T., Salman, A. M., Khan, S. M., Liu, A. J., Sinnis, P. Longitudinal analysis of *Plasmodium* sporozoite motility in the dermis reveals component of blood vessel recognition. *eLife* 4(2015)
- Hostiuc**, S., Perlea, P., Marinescu, M., Dogaroiu, C., Drima, E. GSK-3 Inhibitors and Tooth Repair: An Ethical Analysis. *Frontiers in pharmacology* 9: 1495 (2018)
- Howard**, B. L., Harvey, K. L., Stewart, R. J., Azevedo, M. F., Crabb, B. S., Jennings, I. G., Sanders, P. R., Manallack, D. T., Thompson, P. E., Tonkin, C. J., Gilson, P. R. Identification of potent phosphodiesterase inhibitors that demonstrate cyclic nucleotide-dependent functions in apicomplexan parasites. *ACS chemical biology* 10(4): 1145–1154 (2015)
- Howard**, B. L., Thompson, P. E., Manallack, D. T. Active site similarity between human and *Plasmodium falciparum* phosphodiesterases: considerations for antimalarial drug design. *Journal of computer-aided molecular design* 25(8): 753–762 (2011)
- Hu**, K. Organizational changes of the daughter basal complex during the parasite replication of *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens* 4(1): e10 (2008a)
- Hu**, G., Cabrera, A., Kono, M., Mok, S., Chaal, B. K., Haase, S., Engelberg, K., Cheemadan, S., Spielmann, T., Preiser, P. R., Gilberger, T.-W., Bozdech, Z. Transcriptional profiling of growth perturbations of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature biotechnology* 28(1): 91–98 (2010)
- Hu**, J., Chen, Z., Gu, J., Wan, M., Shen, Q., Kiemy, M.-P., He, J., Li, Z., Zhang, Q., Reed, Z. H., Zhu, Y., Li, W., Cao, Y., Qu, L., Cao, Z., Wang, Q., Liu, H., Pan, X., Huang, X., Zhang, D., Xue, X., Pan, W. Safety and immunogenicity of a malaria vaccine, *Plasmodium falciparum* AMA-1/MSP-1 chimeric protein formulated in montanide ISA 720 in healthy adults. *PLoS one* 3(4): e1952 (2008b)
- Hu**, K., Mann, T., Striepen, B., Beckers, C. J. M., Roos, D. S., Murray, J. M. Daughter cell assembly in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Molecular biology of the cell* 13(2): 593–606 (2002)
- Huang**, M., Shen, A., Ding, J., Geng, M. Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. *Trends in pharmacological sciences* 35(1): 41–50 (2014)
- Huang**, W., Xu, H., Li, Y., Zhang, F., Chen, X.-Y., He, Q.-L., Igarashi, Y., Tang, G.-L. Characterization of yatakemycin gene cluster revealing a radical S-adenosylmethionine dependent methyltransferase and highlighting spirocyclopropane biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* 134(21): 8831–8840 (2012)
- Hubbard**, S. R., Wei, L., Ellis, L., Hendrickson, W. A. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372(6508): 746–754 (1994)
- Hughes**, K., Nikolakaki, E., Plyte, S. E., Totty, N. F., Woodgett, J. R. Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *The EMBO journal* 12(2): 803–808 (1993)
- Hung**, J. M., Arabshahi, H. J., Leung, E., Reynisson, J., Barker, D. Synthesis and cytotoxicity of thieno2,3-bpyridine and furo2,3-bpyridine derivatives. *European journal of medicinal chemistry* 86: 420–437 (2014)
- Hyde**, J. E. Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Acta tropica* 94(3): 191–206 (2005)
- Ibrahim**, M. A. A., Abdelrahman, A. H. M., Hassan, A. M. A. Identification of novel *Plasmodium falciparum* PI4KB inhibitors as potential anti-malarial drugs: Homology modeling, molecular docking and molecular dynamics simulations. *Computational biology and chemistry* 80: 79–89 (2019)
- Ikeda**, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., Kikuchi, A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. *The EMBO journal* 17(5): 1371–1384 (1998)
- Inoue**, H., Nojima, H., Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1): 23–28 (1990)
- Iqbal**, J., Siddique, A., Jameel, M., Hira, P. R. Persistent histidine-rich protein 2, parasite lactate dehydrogenase, and panmalarial antigen reactivity after clearance of *Plasmodium falciparum* mono-infection. *Journal of clinical microbiology* 42(9): 4237–4241 (2004)
- Ishino**, T., Chinzei, Y., Yuda, M. Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte. *Molecular microbiology* 58(5): 1264–1275 (2005)

- Ishino, T.,** Murata, E., Tokunaga, N., Baba, M., Tachibana, M., Thongkuiatkul, A., Tsuboi, T., Torii, M. Rhoptry neck protein 2 expressed in Plasmodium sporozoites plays a crucial role during invasion of mosquito salivary glands. *Cellular microbiology* 21(1): e12964 (2019)
- Ishizuka, A. S.,** Lyke, K. E., DeZure, A., Berry, A. A., Richie, T. L., Mendoza, F. H., Enama, M. E., Gordon, I. J., Chang, L.-J., Sarwar, U. N., Zephir, K. L., Holman, L. A., James, E. R., Billingsley, P. F., Gunasekera, A., Chakravarty, S., Manoj, A., Li, M., Ruben, A. J., Li, T., Eappen, A. G., Stafford, R. E., K C, N., Murshedkar, T., DeCederfelt, H., Plummer, S. H., Hendel, C. S., Novik, L., Costner, P. J. M., Saunders, J. G., Laurens, M. B., Plowe, C. V., Flynn, B., Whalen, W. R., Todd, J. P., Noor, J., Rao, S., Sierra-Davidson, K., Lynn, G. M., Epstein, J. E., Kemp, M. A., Fahle, G. A., Mikolajczak, S. A., Fishbaugher, M., Sack, B. K., Kappe, S. H. I., Davidson, S. A., Garver, L. S., Björkström, N. K., Nason, M. C., Graham, B. S., Roederer, M., Sim, B. K. L., Hoffman, S. L., Ledgerwood, J. E., Seder, R. A. Protection against malaria at 1 year and immune correlates following PfSPZ vaccination. *Nature medicine* 22(6): 614–623 (2016)
- Ismail, H. M.,** Barton, V. E., Panchana, M., Charoensutthivarakul, S., Biagini, G. A., Ward, S. A., O'Neill, P. M. A Click Chemistry-Based Proteomic Approach Reveals that 1,2,4-Trioxolane and Artemisinin Antimalarials Share a Common Protein Alkylation Profile. *Angewandte Chemie (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 128(22): 6511–6515 (2016)
- Iyer, G. R.,** Singh, S., Kaur, I., Agarwal, S., Siddiqui, M. A., Bansal, A., Kumar, G., Saini, E., Paul, G., Mohammed, A., Chitnis, C. E., Malhotra, P. Calcium-dependent phosphorylation of Plasmodium falciparum serine repeat antigen 5 triggers merozoite egress. *The Journal of biological chemistry* 293(25): 9736–9746 (2018)
- Jacot, D.,** Tosetti, N., Pires, I., Stock, J., Graindorge, A., Hung, Y.-F., Han, H., Tewari, R., Kursula, I., Soldati-Favre, D. An Apicomplexan Actin-Binding Protein Serves as a Connector and Lipid Sensor to Coordinate Motility and Invasion. *Cell host & microbe* 20(6): 731–743 (2016)
- Jain, R.,** Gupta, S., Munde, M., Pati, S., Singh, S. Development of novel anti-malarial from structurally diverse library of molecules, targeting plant-like CDPK1, a multistage growth regulator of P. falciparum. *The Biochemical journal* 477(10): 1951–1970 (2020)
- James, S. P.** A note on the shute technique for staining malaria parasites with Leishman's stain and on the stippling in infected red blood corpuscles which it reveals. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 23(3): 269–278 (1929)
- Janouskovec, J.,** Horák, A., Oborník, M., Lukes, J., Keeling, P. J. A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(24): 10949–10954 (2010)
- Janse, C. J.,** Kroeze, H., van Wigcheren, A., Mededovic, S., Fonager, J., Franke-Fayard, B., Waters, A. P., Khan, S. M. A genotype and phenotype database of genetically modified malaria-parasites. *Trends in parasitology* 27(1): 31–39 (2011)
- Janse, C. J.,** Ponnudurai, T., Lensen, A. H., Meuwissen, J. H., Ramesar, J., van der Ploeg, M., Overdulve, J. P. DNA synthesis in gametocytes of Plasmodium falciparum. *Parasitology* 96 (Pt 1): 1–7 (1988)
- Janse, C. J.,** van der Klooster, P. F., van der Kaay, H. J., van der Ploeg, M., Overdulve, J. P. DNA synthesis in Plasmodium berghei during asexual and sexual development. *Molecular and biochemical parasitology* 20(2): 173–182 (1986)
- Jeong, H.,** Kim, H. J., Lee, S. J. Complete Genome Sequence of Escherichia coli Strain BL21. *Genome announcements* 3(2) (2015)
- Jetten, M. S.,** Gubler, M. E., Lee, S. H., Sinskey, A. J. Structural and functional analysis of pyruvate kinase from Corynebacterium glutamicum. *Applied and environmental microbiology* 60(7): 2501–2507 (1994)
- Jewett, T. J.,** Sibley, L. D. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Molecular cell* 11(4): 885–894 (2003)
- Johnson, J. D.,** Denuall, R. A., Gerena, L., Lopez-Sanchez, M., Roncal, N. E., Waters, N. C. Assessment and continued validation of the malaria SYBR green I-based fluorescence assay for use in malaria drug screening. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51(6): 1926–1933 (2007)
- Johnson, L. N.,** Lewis, R. J. Structural basis for control by phosphorylation. *Chemical reviews* 101(8): 2209–2242 (2001)
- Joice, R.,** Nilsson, S. K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., Seydel, K. B., Bertuccini, L., Alano, P., Williamson, K. C., Duraisingh, M. T., Taylor, T. E., Milner, D. A., Marti, M. Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Science translational medicine* 6(244): 244re5 (2014)
- Jomaa, H.,** Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Türbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H. K., Soldati, D., Beck, E. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science (New York, N.Y.)* 285(5433): 1573–1576 (1999)
- Jones, M. L.,** Das, S., Belda, H., Collins, C. R., Blackman, M. J., Treeck, M. A versatile strategy for rapid conditional genome engineering using loxP sites in a small synthetic intron in Plasmodium falciparum. *Scientific reports* 6: 21800 (2016)
- Jongwutiwes, S.,** Putaporntip, C., Iwasaki, T., Sata, T., Kanbara, H. Naturally acquired Plasmodium knowlesi malaria in human, Thailand. *Emerging infectious diseases* 10(12): 2211–2213 (2004)
- Jonscher, E.,** Flemming, S., Schmitt, M., Sabitzki, R., Reichard, N., Birnbaum, J., Bergmann, B., Höhn, K., Spielmann, T. PfVPS45 Is Required for Host Cell Cytosol Uptake by Malaria Blood Stage Parasites. *Cell host & microbe* 25(1): 166–173.e5 (2019)

- Jope, R. S.** Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders. *Frontiers in molecular neuroscience* 4: 16 (2011)
- Josling, G. A., Llinás, M.** Sexual development in Plasmodium parasites: knowing when it's time to commit. *Nature reviews. Microbiology* 13(9): 573–587 (2015)
- Josling, G. A., Russell, T. J., Venezia, J., Orchard, L., van Biljon, R., Painter, H. J., Llinás, M.** Dissecting the role of PfAP2-G in malaria gametocytogenesis. *Nature communications* 11(1): 1503 (2020)
- Josling, G. A., Williamson, K. C., Llinás, M.** Regulation of Sexual Commitment and Gametocytogenesis in Malaria Parasites. *Annual review of microbiology* 72: 501–519 (2018)
- Juge, N., Moriyama, S., Miyaji, T., Kawakami, M., Iwai, H., Fukui, T., Nelson, N., Omote, H., Moriyama, Y.** Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter is a H⁺-coupled polyspecific nutrient and drug exporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(11): 3356–3361 (2015)
- Kadota, K., Ishino, T., Matsuyama, T., Chinzei, Y., Yuda, M.** Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(46): 16310–16315 (2004)
- Kafsack, B. F. C., Pena, J. D. O., Coppens, I., Ravindran, S., Boothroyd, J. C., Carruthers, V. B.** Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science (New York, N.Y.)* 323(5913): 530–533 (2009)
- Kafsack, B. F. C., Rovira-Graells, N., Clark, T. G., Bancells, C., Crowley, V. M., Campino, S. G., Williams, A. E., Drought, L. G., Kwiatkowski, D. P., Baker, D. A., Cortés, A., Llinás, M.** A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature* 507(7491): 248–252 (2014)
- Kapuscinski, J.** DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission* 70(5): 220–233 (1995)
- Kariu, T., Yuda, M., Yano, K., Chinzei, Y.** MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. *The Journal of experimental medicine* 195(10): 1317–1323 (2002)
- Karle, J. M., Olmeda, R., Gerena, L., Milhous, W. K.** Plasmodium falciparum: role of absolute stereochemistry in the antimalarial activity of synthetic amino alcohol antimalarial agents. *Experimental parasitology* 76(4): 345–351 (1993)
- Kato, N., Comer, E., Sakata-Kato, T., Sharma, A., Sharma, M., Maetani, M., Bastien, J., Brancucci, N. M., Bittker, J. A., Corey, V., Clarke, D., Derbyshire, E. R., Dornan, G. L., Duffy, S., Eckley, S., Itoe, M. A., Koolen, K. M. J., Lewis, T. A., Lui, P. S., Lukens, A. K., Lund, E., March, S., Meibalan, E., Meier, B. C., McPhail, J. A., Mitasev, B., Moss, E. L., Sayes, M., van Gessel, Y., Wawer, M. J., Yoshinaga, T., Zeeman, A.-M., Avery, V. M., Bhatia, S. N., Burke, J. E., Catteruccia, F., Clardy, J. C., Clemons, P. A., Dechering, K. J., Duvall, J. R., Foley, M. A., Gusovsky, F., Kocken, C. H. M., Marti, M., Morningstar, M. L., Munoz, B., Neafsey, D. E., Sharma, A., Winzeler, E. A., Wirth, D. F., Scherer, C. A., Schreiber, S. L.** Diversity-oriented synthesis yields novel multistage antimalarial inhibitors. *Nature* 538(7625): 344–349 (2016)
- Kato, N., Sakata, T., Breton, G., Le Roch, K. G., Nagle, A., Andersen, C., Bursulaya, B., Henson, K., Johnson, J., Kumar, K. A., Marr, F., Mason, D., McNamara, C., Plouffe, D., Ramachandran, V., Spooner, M., Tuntland, T., Zhou, Y., Peters, E. C., Chatterjee, A., Schultz, P. G., Ward, G. E., Gray, N., Harper, J., Winzeler, E. A.** Gene expression signatures and small-molecule compounds link a protein kinase to Plasmodium falciparum motility. *Nature chemical biology* 4(6): 347–356 (2008)
- Kaushansky, A., Douglass, A. N., Arang, N., Vigdorovich, V., Dambrauskas, N., Kain, H. S., Austin, L. S., Sather, D. N., Kappe, S. H. I.** Malaria parasites target the hepatocyte receptor EphA2 for successful host infection. *Science (New York, N.Y.)* 350(6264): 1089–1092 (2015)
- Kawamoto, F., Alejo-Blanco, R., Fleck, S. L., Sinden, R. E.** Plasmodium berghei: ionic regulation and the induction of gametogenesis. *Experimental parasitology* 72(1): 33–42 (1991)
- Peters, W., Pasvol, G.** Tropical medicine and parasitology. *Mosby* 5th (2001)
- Keating, J., Locatelli, A., Gebremichael, A., Ghebremeskil, T., Mufunda, J., Mihreteab, S., Berhane, D., Carneiro, P.** Evaluating indoor residual spray for reducing malaria infection prevalence in Eritrea: results from a community randomized control trial. *Acta tropica* 119(2-3): 107–113 (2011)
- Kent, R. S., Modrzynska, K. K., Cameron, R., Philip, N., Billker, O., Waters, A. P.** Inducible developmental reprogramming redefines commitment to sexual development in the malaria parasite Plasmodium berghei. *Nature microbiology* 3(11): 1206–1213 (2018)
- Kerkela, R., Kockeritz, L., Macaulay, K., Zhou, J., Doble, B. W., Beahm, C., Greytak, S., Woulfe, K., Trivedi, C. M., Woodgett, J. R., Epstein, J. A., Force, T., Huggins, G. S.** Deletion of GSK-3 β in mice leads to hypertrophic cardiomyopathy secondary to cardiomyoblast hyperproliferation. *The Journal of clinical investigation* 118(11): 3609–3618 (2008)
- Khalife, J., Pierrot, C.** Phosphatases are emerging as novel druggable targets in Plasmodium. *Future microbiology* 11: 603–606 (2016)
- Kiakos, K., Englinger, B., Yanow, S. K., Wernitznig, D., Jakupec, M. A., Berger, W., Keppler, B. K., Hartley, J. A., Lee, M., Patil, P. C.** Design, synthesis, nuclear localization, and biological activity of a fluorescent duocarmycin analog, HxTfA. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 28(8): 1342–1347 (2018)

- Kikuchi**, R., Nakamura, K., MacLauchlan, S., Ngo, D. T.-M., Shimizu, I., Fuster, J. J., Katanasaka, Y., Yoshida, S., Qiu, Y., Yamaguchi, T. P., Matsushita, T., Murohara, T., Gokce, N., Bates, D. O., Hamburg, N. M., Walsh, K. An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nature medicine* 20(12): 1464–1471 (2014)
- Kilian**, A. H., Mughusu, E. B., Kabagambe, G., Sonnenburg, F. von. Comparison of two rapid, HRP2-based diagnostic tests for *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 91(6): 666–667 (1997)
- Killeen**, G. F., Fillinger, U., Kiche, I., Gouagna, L. C., Knols, B. G. J. Eradication of *Anopheles gambiae* from Brazil: lessons for malaria control in Africa? *The Lancet. Infectious diseases* 2(10): 618–627 (2002)
- Kim**, T.-W., Park, C., H., Hsu, C.-C., Zhu, J.-Y., Hsiao, Y., Branon, T., Xu, S., L., Ting, A., Y., Wang, Z.-Y. Application of TurboID-mediated proximity labeling for mapping a GSK3 kinase signaling network in *Arabidopsis*. *BioRxiv* 636324 (2019)
- Kitron**, U., Spielman, A. Suppression of transmission of malaria through source reduction: antianopheline measures applied in Israel, the United States, and Italy. *Reviews of infectious diseases* 11(3): 391–406 (1989)
- Klaeger**, S., Heinzlmeir, S., Wilhelm, M., Polzer, H., Vick, B., Koenig, P.-A., Reinecke, M., Ruprecht, B., Petzoldt, S., Meng, C., Zecha, J., Reiter, K., Qiao, H., Helm, D., Koch, H., Schoof, M., Canevari, G., Casale, E., Depaolini, S. R., Feuchtlinger, A., Wu, Z., Schmidt, T., Rueckert, L., Becker, W., Huenges, J., Garz, A.-K., Gohlke, B.-O., Zolg, D. P., Kayser, G., Vooder, T., Preissner, R., Hahne, H., Tönisson, N., Kramer, K., Götze, K., Bassermann, F., Schlegl, J., Ehrlich, H.-C., Aiche, S., Walch, A., Greif, P. A., Schneider, S., Felder, E. R., Ruland, J., Médard, G., Jeremias, I., Spiekermann, K., Kuster, B. The target landscape of clinical kinase drugs. *Science (New York, N.Y.)* 358(6367) (2017)
- Klokouzas**, A., Tiffert, T., van Schalkwyk, D., Wu, C.-P., van Veen, H. W., Barrand, M. A., Hladky, S. B. *Plasmodium falciparum* expresses a multidrug resistance-associated protein. *Biochemical and biophysical research communications* 321(1): 197–201 (2004)
- Klonis**, N., Creek, D. J., Tilley, L. Iron and heme metabolism in *Plasmodium falciparum* and the mechanism of action of artemisinins. *Current opinion in microbiology* 16(6): 722–727 (2013)
- Klonis**, N., Crespo-Ortiz, M. P., Bottova, I., Abu-Bakar, N., Kenny, S., Rosenthal, P. J., Tilley, L. Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(28): 11405–11410 (2011)
- Kochar**, D. K., Das, A., Kochar, S. K., Saxena, V., Sirohi, P., Garg, S., Kochar, A., Khatri, M. P., Gupta, V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 80(2): 194–198 (2009)
- Kochar**, D. K., Saxena, V., Singh, N., Kochar, S. K., Kumar, S. V., Das, A. *Plasmodium vivax* malaria. *Emerging infectious diseases* 11(1): 132–134 (2005)
- Kodisinghe**, H. M., Perera, K. L., Premawansa, S., Naotunne, T., Wickramasinghe, A. R., Mendis, K. N. The ParaSight-F dipstick test as a routine diagnostic tool for malaria in Sri Lanka. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 91(4): 398–402 (1997)
- Kono**, M., Heincke, D., Wilcke, L., Wong, T. W. Y., Bruns, C., Herrmann, S., Spielmann, T., Gilberger, T. W. Pellicle formation in the malaria parasite. *Journal of cell science* 129(4): 673–680 (2016)
- Kono**, M., Prusty, D., Parkinson, J., Gilberger, T. W. The apicomplexan inner membrane complex. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 18: 982–992 (2013)
- Korsinczky**, M., Chen, N., Kotecka, B., Saul, A., Rieckmann, K., Cheng, Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44(8): 2100–2108 (2000)
- Kostich**, M., English, J., Madison, V., Gheyas, F., Wang, L., Qiu, P., Greene, J., Laz, T. M. Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome biology* 3(9): RESEARCH0043 (2002)
- Koussis**, K., Withers-Martinez, C., Baker, D. A., Blackman, M. J. Simultaneous multiple allelic replacement in the malaria parasite enables dissection of PKG function. *Life science alliance* 3(4)(2020)
- Krotoski**, W. A. The hypnozoite and malarial relapse. *Progress in clinical parasitology* 1: 1–19 (1989)
- Kruggel**, S., Lemcke, T. Comparative Investigation of the ATP-Binding Site of Human and Plasmodial Glycogen Synthase Kinase-3. *QSAR & Combinatorial Science* 28(8): 885–890 (2009)
- Kumar**, N. Target antigens of malaria transmission blocking immunity exist as a stable membrane bound complex. *Parasite immunology* 9(3): 321–335 (1987)
- Kumar**, S., R., Garg, S., Dangi, P., Ponnusamy, K., Singh, S. Phosphatidic acid homeostasis regulated by a type-2 phosphatidic acid phosphatase represents a novel druggable target in malaria intervention. *Cell death discovery* 5: 107 (2019)
- Kumar**, A., Ghosh, D. K., Ranjan, A. Mefloquine binding to human acyl-CoA binding protein leads to redox stress-mediated apoptotic death of human neuroblastoma cells. *Neurotoxicology* 77: 169–180 (2020)
- Kumar**, N., Koski, G., Harada, M., Aikawa, M., Zheng, H. Induction and localization of *Plasmodium falciparum* stress proteins related to the heat shock protein 70 family. *Molecular and biochemical parasitology* 48(1): 47–58 (1991)

- Kumar, S., Kumar, M., Ekka, R., Dvorin, J. D., Paul, A. S., Madugundu, A. K., Gilberger, T., Gowda, H., Duraisingh, M. T., Keshava Prasad, T. S., Sharma, P.** PfCDPK1 mediated signaling in erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Nature communications* 8(1): 63 (2017)
- Kumar, N., Singh, J. P., Pande, V., Mishra, N., Srivastava, B., Kapoor, R., Valecha, N., Anvikar, A. R.** Genetic variation in histidine rich proteins among Indian *Plasmodium falciparum* population: possible cause of variable sensitivity of malaria rapid diagnostic tests. *Malaria journal* 11: 298 (2012)
- Kumar, N., Wizel, B.** Further characterization of interactions between gamete surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 53(1-2): 113–120 (1992)
- Kuret, J., Woodgett, J. R., Cohen, P.** Multisite phosphorylation of glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Identification of the sites phosphorylated by casein kinase-I. *European journal of biochemistry* 151(1): 39–48 (1985)
- Kwon, S.-K., Kim, S. K., Lee, D.-H., Kim, J. F.** Comparative genomics and experimental evolution of *Escherichia coli* BL21(DE3) strains reveal the landscape of toxicity escape from membrane protein overproduction. *Scientific reports* 5: 16076 (2015)
- Kyhse-Andersen, J.** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods* 10(3-4): 203–209 (1984)
- Labaid, M., Harupa, A., Dumpit, R. F., Coppens, I., Mikolajczak, S. A., Kappe, S. H. I.** *Plasmodium yoelii* sporozoites with simultaneous deletion of P52 and P36 are completely attenuated and confer sterile immunity against infection. *Infection and immunity* 75(8): 3758–3768 (2007)
- Lachish, S., Knowles, S. C. L., Alves, R., Wood, M. J., Sheldon, B. C.** Infection dynamics of endemic malaria in a wild bird population: parasite species-dependent drivers of spatial and temporal variation in transmission rates. *The Journal of animal ecology* 80(6): 1207–1216 (2011)
- Laemmli, U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680–685 (1970)
- Lakshmanan, V., Fishbaugher, M. E., Morrison, B., Baldwin, M., Macarulay, M., Vaughan, A. M., Mikolajczak, S. A., Kappe, S. H. I.** Cyclic GMP balance is critical for malaria parasite transmission from the mosquito to the mammalian host. *mBio* 6(2): e02330 (2015)
- Lakshmanan, V., Rhee, K. Y., Wang, W., Yu, Y., Khafizov, K., Fiser, A., Wu, P., Ndir, O., Mboup, S., Ndiaye, D., Daily, J. P.** Metabolomic analysis of patient plasma yields evidence of plant-like α -linolenic acid metabolism in *Plasmodium falciparum*. *The Journal of infectious diseases* 206(2): 238–248 (2012)
- Laloo, D. G., Hill, D. R.** Preventing malaria in travellers. *BMJ (Clinical research ed.)* 336(7657): 1362–1366 (2008)
- Lambros, C., Vanderberg, J. P.** Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *The Journal of parasitology* 65(3): 418–420 (1979)
- Lamikanra, A. A., Brown, D., Potocnik, A., Casals-Pascual, C., Langhorne, J., Roberts, D. J.** Malarial anemia: of mice and men. *Blood* 110(1): 18–28 (2007)
- Lande, D. H.** Neuartige Bisindolylcyclobutendione als potentielle Antimalaria-Wirkstoffe. *Dissertation* (2016)
- Lanfrancotti, A., Bertuccini, L., Silvestrini, F., Alano, P.** *Plasmodium falciparum*: mRNA co-expression and protein co-localisation of two gene products upregulated in early gametocytes. *Experimental parasitology* 116(4): 497–503 (2007)
- Lanzillotti, R., Coetzer, T. L.** The 10 kDa domain of human erythrocyte protein 4.1 binds the *Plasmodium falciparum* EBA-181 protein. *Malaria journal* 5: 100 (2006)
- Laplante, S. R., D Fader, L., Fandrick, K. R., Fandrick, D. R., Hucce, O., Kemper, R., Miller, S. P. F., Edwards, P. J.** Assessing atropisomer axial chirality in drug discovery and development. *Journal of medicinal chemistry* 54(20): 7005–7022 (2011a)
- Laplante, S. R., Edwards, P. J., Fader, L. D., Jakalian, A., Hucce, O.** Revealing atropisomer axial chirality in drug discovery. *ChemMedChem* 6(3): 505–513 (2011b)
- Lasonder, E., Rijpmma, S. R., van Schaijk, B. C. L., Hoeijmakers, W. A. M., Kensche, P. R., Gresnigt, M. S., Italiaander, A., Vos, M. W., Woestenenk, R., Bousema, T., Mair, G. R., Khan, S. M., Janse, C. J., Bártfai, R., Sauerwein, R. W.** Integrated transcriptomic and proteomic analyses of *P. falciparum* gametocytes: molecular insight into sex-specific processes and translational repression. *Nucleic acids research* 44(13): 6087–6101 (2016)
- Lasonder, E., Treeck, M., Alam, M., Tobin, A. B.** Insights into the *Plasmodium falciparum* schizont phospho-proteome. *Microbes and infection* 14(10): 811–819 (2012)
- Laurentino, E. C., Taylor, S., Mair, G. R., Lasonder, E., Bartfai, R., Stunnenberg, H. G., Kroeze, H., Ramesar, J., Franke-Fayard, B., Khan, S. M., Janse, C. J., Waters, A. P.** Experimentally controlled downregulation of the histone chaperone FACT in *Plasmodium berghei* reveals that it is critical to male gamete fertility. *Cellular microbiology* 13(12): 1956–1974 (2011)
- Laveran, C. L.** Classics in infectious diseases: A newly discovered parasite in the blood of patients suffering from malaria. Parasitic etiology of attacks of malaria: Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922). *Reviews of infectious diseases* 4(4): 908–911 (1982)
- Lazarus, M. D., Schneider, T. G., Taraschi, T. F.** A new model for hemoglobin ingestion and transport by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of cell science* 121(11): 1937–1949 (2008)

- Le Roch, K. G., Zhou, Y., Blair, P. L., Grainger, M., Moch, J. K., Haynes, J. D., La Vega, P. de, Holder, A. A., Batalov, S., Carucci, D. J., Winzeler, E. A.** Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science (New York, N.Y.)* 301(5639): 1503–1508 (2003)
- Lee, N., Baker, J., Andrews, K. T., Gatton, M. L., Bell, D., Cheng, Q., McCarthy, J.** Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine- rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. *Journal of clinical microbiology* 44(8): 2773–2778 (2006)
- Lee, K.-S., Cox-Singh, J., Singh, B.** Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. *Malaria journal* 8: 73 (2009)
- Lee, H. J., Georgiadou, A., Walther, M., Nwakanma, D., Stewart, L. B., Levin, M., Otto, T. D., Conway, D. J., Coin, L. J., Cunnington, A. J.** Integrated pathogen load and dual transcriptome analysis of systemic host-pathogen interactions in severe malaria. *Science translational medicine* 10(447) (2018)
- Lee, S., Inselburg, J.** In vitro sensitivity of *Plasmodium falciparum* to drugs that bind DNA or inhibit its synthesis. *The Journal of parasitology* 79(5): 780–782 (1993)
- Lehane, A. M., Ridgway, M. C., Baker, E., Kirk, K.** Diverse chemotypes disrupt ion homeostasis in the Malaria parasite. *Molecular microbiology* 94(2): 327–339 (2014)
- Lektemur Alpan, A., Çalişir, M., Kizildağ, A., Özdede, M., Özmen, Ö.** Effects of a Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitor Tideglusib on Bone Regeneration With Calvarial Defects. *The Journal of craniofacial surgery* (2020)
- Leost, M., Schultz, C., Link, A., Wu, Y. Z., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Kunick, C., Meijer, L.** Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β and cyclin-dependent kinase 5/p25. *European journal of biochemistry* 267(19): 5983–5994 (2000)
- Lew, V. L., Tiffert, T., Ginsburg, H.** Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood* 101(10): 4189–4194 (2003)
- Lewis, J., Gregorian, T., Portillo, I., Goad, J.** Drug interactions with antimalarial medications in older travelers: a clinical guide. *Journal of travel medicine* 27(1) (2020)
- Leykauf, K., Treeck, M., Gilson, P. R., Nebl, T., Bräulke, T., Cowman, A. F., Gilberger, T. W., Crabb, B. S.** Protein kinase a dependent phosphorylation of apical membrane antigen 1 plays an important role in erythrocyte invasion by the malaria parasite. *PLoS pathogens* 6(6): e1000941 (2010)
- Liang, X., Jiang, Z., Huang, Z., Li, F., Chen, C., Hu, C., Wang, W., Hu, Z., Liu, Q., Wang, B., Wang, L., Qi, Z., Liu, J., Jiang, L., Liu, Q.** Discovery of 6'-chloro-N-methyl-5'-(phenylsulfonamido)-3,3'-bipyridine-5-carboxamide (CHMFL-PI4K-127) as a novel *Plasmodium falciparum* PI(4)K inhibitor with potent antimalarial activity against both blood and liver stages of *Plasmodium*. *European journal of medicinal chemistry* 188: 112012 (2020)
- Lim, L., McFadden, G. I.** The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 365(1541): 749–763 (2010)
- Lima, M. N. N., Cassiano, G. C., Tomaz, K. C. P., Silva, A. C., Sousa, B. K. P., Ferreira, L. T., Tavella, T. A., Calit, J., Bargieri, D. Y., Neves, B. J., Costa, F. T. M., Andrade, C. H.** Integrative Multi-Kinase Approach for the Identification of Potent Antiplasmodial Hits. *Frontiers in chemistry* 7: 773 (2019)
- Lin, B. C., Harris, D. R., Kirkman, L. M. D., Perez, A. M., Qian, Y., Schermerhorn, J. T., Hong, M. Y., Winston, D. S., Xu, L., Lieber, A. M., Hamilton, M., Brandt, G. S.** The anthraquinone emodin inhibits the non-exported FIKK kinase from *Plasmodium falciparum*. *Bioorganic chemistry* 75: 217–223 (2017)
- Liu, J., Istvan, E. S., Gluzman, I. Y., Gross, J., Goldberg, D. E.** *Plasmodium falciparum* ensures its amino acid supply with multiple acquisition pathways and redundant proteolytic enzyme systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(23): 8840–8845 (2006a)
- Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Rudicell, R. S., Robertson, J. D., Keele, B. F., Ndjanga, J.-B. N., Sanz, C. M., Morgan, D. B., Locatelli, S., Gonder, M. K., Kranzusch, P. J., Walsh, P. D., Delaporte, E., Mpoudi-Ngole, E., Georgiev, A. V., Muller, M. N., Shaw, G. M., Peeters, M., Sharp, P. M., Rayner, J. C., Hahn, B. H.** Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature* 467(7314): 420–425 (2010)
- Liu, F., Liang, Z., Shi, J., Yin, D., El-Akkad, E., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C.-X.** PKA modulates GSK-3 β and cdk5-catalyzed phosphorylation of tau in site- and kinase-specific manners. *FEBS letters* 580(26): 6269–6274 (2006b)
- Liu, Y., Tewari, R., Ning, J., Blagborough, A. M., Garbom, S., Pei, J., Grishin, N. V., Steele, R. E., Sinden, R. E., Snell, W. J., Billker, O.** The conserved plant sterility gene HAP2 functions after attachment of fusogenic membranes in *Chlamydomonas* and *Plasmodium* gametes. *Genes & development* 22(8): 1051–1068 (2008)
- Liu, X., Wilson, M. W., Liu, K., Lee, P., Yeomans, L., Hagen, S. E., Lin, C.-M., Wen, B., Sun, D., White, A. D., Showalter, H. D., Antonetti, D. A.** Synthesis and structure-activity relationships of thieno2,3-dpyrimidines as atypical protein kinase C inhibitors to control retinal vascular permeability and cytokine-induced edema. *Bioorganic & medicinal chemistry* 28(11): 115480 (2020)
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25(4): 402–408 (2001)

- Llinás, M.,** Bozdech, Z., Wong, E. D., Adai, A. T., DeRisi, J. L. Comparative whole genome transcriptome analysis of three *Plasmodium falciparum* strains. *Nucleic acids research* 34(4): 1166–1173 (2006)
- Lobo, C.-A.,** Rodriguez, M., Reid, M., Lustigman, S. Glycophorin C is the receptor for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding ligand PfEBP-2 (baebl). *Blood* 101(11): 4628–4631 (2003)
- Lochhead, P. A.,** Kinstrie, R., Sibbet, G., Rawjee, T., Morrice, N., Cleghon, V. A chaperone-dependent GSK3beta transitional intermediate mediates activation-loop autophosphorylation. *Molecular cell* 24(4): 627–633 (2006)
- Loiseau, C.,** Harrigan, R. J., Cornel, A. J., Guers, S. L., Dodge, M., Marzec, T., Carlson, J. S., Seppi, B., Sehgal, R. N. M. First evidence and predictions of *Plasmodium* transmission in Alaskan bird populations. *PLoS one* 7(9): e44729 (2012)
- Longnecker, M. P.** Invited Commentary: Why DDT matters now. *American journal of epidemiology* 162(8): 726–728 (2005)
- Looker, O.,** Blanch, A. J., Liu, B., Nunez-Iglesias, J., McMillan, P. J., Tilley, L., Dixon, M. W. A. The knob protein KAHRP assembles into a ring-shaped structure that underpins virulence complex assembly. *PLoS pathogens* 15(5): e1007761 (2019)
- López-Barragán, M. J.,** Lemieux, J., Quiñones, M., Williamson, K. C., Molina-Cruz, A., Cui, K., Barillas-Mury, C., Zhao, K., Su, X.-z. Directional gene expression and antisense transcripts in sexual and asexual stages of *Plasmodium falciparum*. *BMC genomics* 12: 587 (2011)
- Lopez-Rubio, J.-J.,** Mancio-Silva, L., Scherf, A. Genome-wide analysis of heterochromatin associates clonally variant gene regulation with perinuclear repressive centers in malaria parasites. *Cell host & microbe* 5(2): 179–190 (2009)
- Lorestani, A.,** Sheiner, L., Yang, K., Robertson, S. D., Sahoo, N., Brooks, C. F., Ferguson, D. J. P., Striepen, B., Gubbels, M.-J. A *Toxoplasma* MORN1 null mutant undergoes repeated divisions but is defective in basal assembly, apicoplast division and cytokinesis. *PLoS one* 5(8): e12302 (2010)
- Lovestone, S.,** Boada, M., Dubois, B., Hüll, M., Rinne, J. O., Huppertz, H.-J., Calero, M., Andrés, M. V., Gómez-Carrillo, B., León, T., del Ser, T. A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 45(1): 75–88 (2015)
- Lu, F.,** Culleton, R., Zhang, M., Ramaprasad, A., Seidlein, L. von, Zhou, H., Zhu, G., Tang, J., Liu, Y., Wang, W., Cao, Y., Xu, S., Gu, Y., Li, J., Zhang, C., Gao, Q., Menard, D., Pain, A., Yang, H., Zhang, Q., Cao, J. Emergence of Indigenous Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* in Africa. *The New England journal of medicine* 376(10): 991–993 (2017)
- Lu, F.,** He, X.-L., Richard, C., Cao, J. A brief history of artemisinin: Modes of action and mechanisms of resistance. *Chinese journal of natural medicines* 17(5): 331–336 (2019)
- Lucas, F. R.,** Goold, R. G., Gordon-Weeks, P. R., Salinas, P. C. Inhibition of GSK-3beta leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium. *Journal of cell science* 111 (Pt 10): 1351–1361 (1998)
- Lysenko, A. J.,** Beljaev, A. E. An analysis of the geographical distribution of *Plasmodium ovale*. *Bulletin of the World Health Organization* 40(3): 383–394 (1969)
- Ma, W. W.,** Adjei, A. A. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians* 59(2): 111–137 (2009)
- Ma, F.,** Liu, J., Zhou, T., Lei, M., Chen, J., Wang, X., Zhang, Y., Shen, X., Hu, L. Discovery and structure-activity relationships study of thieno2,3-bpyridine analogues as hepatic gluconeogenesis inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* 152: 307–317 (2018)
- Macaulay, K.,** Doble, B. W., Patel, S., Hansotia, T., Sinclair, E. M., Drucker, D. J., Nagy, A., Woodgett, J. R. Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell metabolism* 6(4): 329–337 (2007)
- Madeira, F.,** Madhusoodanan, N., Lee, J., Tivey, A. R. N., Lopez, R. Using EMBL-EBI Services via Web Interface and Programmatically via Web Services. *Current protocols in bioinformatics* 66(1): e74 (2019)
- Maier, A. G.,** Duraisingh, M. T., Reeder, J. C., Patel, S. S., Kazura, J. W., Zimmerman, P. A., Cowman, A. F. *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. *Nature medicine* 9(1): 87–92 (2003)
- Majambere, S.,** Pinder, M., Fillinger, U., Ameh, D., Conway, D. J., Green, C., Jeffries, D., Jawara, M., Milligan, P. J., Hutchinson, R., Lindsay, S. W. Is mosquito larval source management appropriate for reducing malaria in areas of extensive flooding in The Gambia? A cross-over intervention trial. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 82(2): 176–184 (2010)
- Malkin, E.,** Hu, J., Li, Z., Chen, Z., Bi, X., Reed, Z., Dubovsky, F., Liu, J., Wang, Q., Pan, X., Chen, T., Giersing, B., Xu, Y., Kang, X., Gu, J., Shen, Q., Tucker, K., Tierney, E., Pan, W., Long, C., Cao, Z. A phase 1 trial of PfCP2.9: an AMA1/MSP1 chimeric recombinant protein vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. *Vaccine* 26(52): 6864–6873 (2008)
- Malleret, B.,** Claser, C., Ong, A. S. M., Suwanarusk, R., Sriprawat, K., Howland, S. W., Russell, B., Nosten, F., Rénia, L. A rapid and robust tri-color flow cytometry assay for monitoring malaria parasite development. *Scientific reports* 1: 118 (2011)
- Manning, G.,** Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, N.Y.)* 298(5600): 1912–1934 (2002)
- Manzoni, G.,** Marinach, C., Topçu, S., Briquet, S., Grand, M., Tolle, M., Gransagne, M., Lescar, J., Andolina, C., Franetich, J.-F., Zeisel, M. B., Huby, T., Rubinstein, E., Snounou, G., Mazier, D., Nosten, F., Baumert, T. F., Silvie, O. *Plasmodium* P36 determines host cell receptor usage during sporozoite invasion. *eLife* 6(2017)

- Maqbool, M., Hoda, N.** GSK3 Inhibitors in the Therapeutic Development of Diabetes, Cancer and Neurodegeneration: Past, Present and Future. *Current pharmaceutical design* 23(29): 4332–4350 (2017)
- Marques, S. R., Ramakrishnan, C., Carzaniga, R., Blagborough, A. M., Delves, M. J., Talman, A. M., Sinden, R. E.** An essential role of the basal body protein SAS-6 in Plasmodium male gamete development and malaria transmission. *Cellular microbiology* 17(2): 191–206 (2015)
- Marti, M., Good, R. T., Rug, M., Knuepfer, E., Cowman, A. F.** Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science (New York, N.Y.)* 306(5703): 1930–1933 (2004)
- Martin, D. G., Biles, C., Gerpheide, S. A., Hanka, L. J., Krueger, W. C., McGovren, J. P., Mizzsak, S. A., Neil, G. L., Stewart, J. C., Visser, J.** CC-1065 (NSC 298223), a potent new antitumor agent improved production and isolation, characterization and antitumor activity. *The Journal of antibiotics* 34(9): 1119–1125 (1981)
- Martin, R. E., Kirk, K.** The malaria parasite's chloroquine resistance transporter is a member of the drug/metabolite transporter superfamily. *Molecular biology and evolution* 21(10): 1938–1949 (2004)
- Martin, R. E., Marchetti, R. V., Cowan, A. I., Howitt, S. M., Bröer, S., Kirk, K.** Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science (New York, N.Y.)* 325(5948): 1680–1682 (2009)
- Martínez de Iturrate, P., Sebastián-Pérez, V., Náchter-Vázquez, M., Tremper, C. S., Smirlis, D., Martín, J., Martínez, A., Campillo, N. E., Rivas, L., Gil, C.** Towards discovery of new leishmanicidal scaffolds able to inhibit Leishmania GSK-3. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 35(1): 199–210 (2020)
- Masch, A.** Neue Thieno[2,3-b]pyridine als Hemmstoffe des Malaria-Erregers Plasmodium falciparum. *Dissertation* (2016)
- Masch, A., Kunick, C.** Selective inhibitors of Plasmodium falciparum glycogen synthase-3 (PfGSK-3): New antimalarial agents? *Biochimica et biophysica acta* 1854(10 Pt B): 1644–1649 (2015)
- Masch, A., Nasereddin, A., Alder, A., Bird, M. J., Schweda, S. I., Preu, L., Doerig, C., Dzikowski, R., Gilberger, T. W., Kunick, C.** Structure-activity relationships in a series of antiplasmodial thieno2,3-bpyridines. *Malaria journal* 18(1): 89 (2019)
- Maurer, G.** Die Tüpfelung des Tertianarparasiten. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* 28: 114–125 (1900)
- Mayer, D. C. G., Cofie, J., Jiang, L., Hartl, D. L., Tracy, E., Kabat, J., Mendoza, L. H., Miller, L. H.** Glycophorin B is the erythrocyte receptor of Plasmodium falciparum erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(13): 5348–5352 (2009)
- Mayer, D. C., Kaneko, O., Hudson-Taylor, D. E., Reid, M. E., Miller, L. H.** Characterization of a Plasmodium falciparum erythrocyte-binding protein paralogous to EBA-175. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(9): 5222–5227 (2001)
- Mbengue, A., Bhattacharjee, S., Pandharkar, T., Liu, H., Estiu, G., Stahelin, R. V., Rizk, S. S., Njimoh, D. L., Ryan, Y., Chotivanich, K., Nguon, C., Ghorbal, M., Lopez-Rubio, J.-J., Pfrender, M., Emrich, S., Mohandas, N., Dondorp, A. M., Wiest, O., Haldar, K. A.** A molecular mechanism of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *Nature* 520(7549): 683–687 (2015)
- McCarthy, J. S., Donini, C., Chalon, S., Woodford, J., Marquart, L., Collins, K. A., Rozenberg, F. D., Fidock, D. A., Cherkaoui-Rbati, M. H., Gobeau, N., Möhrle, J. J.** A phase 1, placebo controlled, randomised, single ascending dose study and a volunteer infection study to characterize the safety, pharmacokinetics and antimalarial activity of the Plasmodium phosphatidylinositol 4-kinase inhibitor MMV390048. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* (2020)
- McFadden, G. I., Reith, M. E., Munholland, J., Lang-Unnasch, N.** Plastid in human parasites. *Nature* 381(6582): 482 (1996)
- McHugh, E., Carmo, O. M. S., Blanch, A., Looker, O., Liu, B., Tiash, S., Andrew, D., Batinovic, S., Low, A. J. Y., Cho, H.-J., McMillan, P., Tilley, L., Dixon, M. W. A.** Role of Plasmodium falciparum Protein GEXP07 in Maurer's Cleft Morphology, Knob Architecture, and P. falciparum EMP1 Trafficking. *mBio* 11(2) (2020)
- McKenzie, F. E., Bossert, W. H.** Multispecies Plasmodium infections of humans. *The Journal of parasitology* 85(1): 12–18 (1999)
- McMillan, P. J., Millet, C., Batinovic, S., Maiorca, M., Hanssen, E., Kenny, S., Muhle, R. A., Melcher, M., Fidock, D. A., Smith, J. D., Dixon, M. W. A., Tilley, L.** Spatial and temporal mapping of the PfEMP1 export pathway in Plasmodium falciparum. *Cellular microbiology* 15(8): 1401–1418 (2013)
- McNamara, C. W., Lee, M. C., Lim, C. S., Lim, S. H., Roland, J., Simon, O., Yeung, B. K., Chatterjee, A. K., McCormack, S. L., Manary, M. J., Zeeman, A.-M., Dechering, K. J., Kumar, T. S., Henrich, P. P., Gagaring, K., Ibanez, M., Kato, N., Kuhen, K. L., Fischli, C., Nagle, A., Rottmann, M., Plouffe, D. M., Bursulaya, B., Meister, S., Rameh, L., Trappe, J., Haasen, D., Timmerman, M., Sauerwein, R. W., Suwanarusk, R., Russell, B., Renia, L., Nosten, F., Tully, D. C., Kocken, C. H., Glynn, R. J., Bodenreider, C., Fidock, D. A., Diagana, T. T., Winzeler, E. A.** Targeting Plasmodium P1(4)K to eliminate malaria. *Nature* 504(7479): 248–253 (2013)
- McRobert, L., Taylor, C. J., Deng, W., Fivelman, Q. L., Cummings, R. M., Polley, S. D., Billker, O., Baker, D. A.** Gametogenesis in malaria parasites is mediated by the cGMP-dependent protein kinase. *PLoS biology* 6(6): e139 (2008)
- Meissner, M., Schlüter, D., Soldati, D.** Role of Toxoplasma gondii myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science (New York, N.Y.)* 298(5594): 837–840 (2002)

- Melhus, A.** Effects of amoxicillin on the expression of cytokines during experimental acute otitis media caused by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 48(3): 397–402 (2001)
- Menard, D., Yapou, F., Manirakiza, A., Djalle, D., Matsika-Claquin, M. D., Talarmin, A.** Polymorphisms in *pfcr*, *pfmdr1*, *dhfr* genes and in vitro responses to antimalarials in *Plasmodium falciparum* isolates from Bangui, Central African Republic. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 75(3): 381–387 (2006)
- Mendis, K., Sina, B. J., Marchesini, P., Carter, R.** The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 64(1-2 Suppl): 97–106 (2001)
- Merrick, C. J., Huttenhower, C., Buckee, C., Amambua-Ngwa, A., Gomez-Escobar, N., Walther, M., Conway, D. J., Duraisingh, M. T.** Epigenetic dysregulation of virulence gene expression in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *The Journal of infectious diseases* 205(10): 1593–1600 (2012)
- Mesén-Ramírez, P., Bergmann, B., Tran, T. T., Garten, M., Stäcker, J., Naranjo-Prado, I., Höhn, K., Zimmerberg, J., Spielmann, T.** EXP1 is critical for nutrient uptake across the parasitophorous vacuole membrane of malaria parasites. *PLoS biology* 17(9): e3000473 (2019)
- Mesén-Ramírez, P., Reinsch, F., Blancke Soares, A., Bergmann, B., Ullrich, A.-K., Tenzer, S., Spielmann, T.** Stable Translocation Intermediates Jam Global Protein Export in *Plasmodium falciparum* Parasites and Link the PTEX Component EXP2 with Translocation Activity. *PLoS pathogens* 12(5): e1005618 (2016)
- Meunier, B., Robert, A.** Heme as trigger and target for trioxane-containing antimalarial drugs. *Accounts of chemical research* 43(11): 1444–1451 (2010)
- Miao, Z., Sun, Y.-M., Zhao, L.-Y., Li, Y.-S., Wang, Y.-F., Nan, J.-S., Qiao, Z.-E., Li, L.-L., Yang, S.-Y.** Discovery of thieno2,3-dpyrimidin-4(3H)-one derivatives as a new class of ROCK inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 30(6): 126966 (2020)
- Milani, K. J., Schneider, T. G., Taraschi, T. F.** Defining the morphology and mechanism of the hemoglobin transport pathway in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Eukaryotic cell* 14(4): 415–426 (2015)
- Miller, R. L., Ikram, S., Armelagos, G. J., Walker, R., Harer, W. B., Shiff, C. J., Baggett, D., Carrigan, M., Maret, S. M.** Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections in mummies using the rapid manual ParaSight™-F test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88(1): 31–32 (1994)
- Mitcheson, D. F., Bottrill, A. R., Carr, K., Coxon, C. R., Cano, C., Golding, B. T., Griffin, R. J., Fry, A. M., Doerig, C., Bayliss, R., Tobin, A. B.** A new tool for the chemical genetic investigation of the *Plasmodium falciparum* Pfnek-2 NIMA-related kinase. *Malaria journal* 15(1): 535 (2016)
- Modrzynska, K., Pfander, C., Chappell, L., Yu, L., Suarez, C., Dundas, K., Gomes, A. R., Goulding, D., Rayner, J. C., Choudhary, J., Billker, O.** A Knockout Screen of ApiAP2 Genes Reveals Networks of Interacting Transcriptional Regulators Controlling the *Plasmodium* Life Cycle. *Cell host & microbe* 21(1): 11–22 (2017)
- Mohr, K. I.** History of Antibiotics Research. *Current topics in microbiology and immunology* 398: 237–272 (2016)
- Mok, S., Ashley, E. A., Ferreira, P. E., Zhu, L., Lin, Z., Yeo, T., Chotivanich, K., Imwong, M., Pukrittayakamee, S., Dhorda, M., Nguon, C., Lim, P., Amaratunga, C., Suon, S., Hien, T. T., Htut, Y., Faiz, M. A., Onyamboko, M. A., Mayxay, M., Newton, P. N., Tripura, R., Woodrow, C. J., Miotto, O., Kwiatkowski, D. P., Nosten, F., Day, N. P. J., Preiser, P. R., White, N. J., Dondorp, A. M., Fairhurst, R. M., Bozdech, Z.** Drug resistance. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science (New York, N.Y.)* 347(6220): 431–435 (2015)
- Mok, B. W., Ribacke, U., Winter, G., Yip, B. H., Tan, C.-S., Fernandez, V., Chen, Q., Nilsson, P., Wahlgren, M.** Comparative transcriptomic analysis of isogenic *Plasmodium falciparum* clones of distinct antigenic and adhesive phenotypes. *Molecular and biochemical parasitology* 151(2): 184–192 (2007)
- Mombo-Ngoma, G., Remppis, J., Sievers, M., Zoleko Manego, R., Endamne, L., Kabwende, L., Veletzky, L., Nguyen, T. T., Groger, M., Lötsch, F., Mischlinger, J., Flohr, L., Kim, J., Cattaneo, C., Hutchinson, D., Duparc, S., Moehrl, J., Velavan, T. P., Lell, B., Ramharther, M., Adegnika, A. A., Mordmüller, B., Kreamsner, P. G.** Efficacy and Safety of Fosmidomycin-Piperaquine as Nonartemisinin-Based Combination Therapy for Uncomplicated *Falciparum* Malaria: A Single-Arm, Age De-escalation Proof-of-Concept Study in Gabon. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 66(12): 1823–1830 (2018)
- Moon, R. W., Hall, J., Rangkuti, F., Ho, Y. S., Almond, N., Mitchell, G. H., Pain, A., Holder, A. A., Blackman, M. J.** Adaptation of the genetically tractable malaria pathogen *Plasmodium knowlesi* to continuous culture in human erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(2): 531–536 (2013)
- Moon, R. W., Taylor, C. J., Bex, C., Schepers, R., Goulding, D., Janse, C. J., Waters, A. P., Baker, D. A., Billker, O.** A cyclic GMP signalling module that regulates gliding motility in a malaria parasite. *PLoS pathogens* 5(9): e1000599 (2009)
- Moore, R. B., Oborník, M., Janouskovec, J., Chrudimský, T., Vancová, M., Green, D. H., Wright, S. W., Davies, N. W., Bolch, C. J. S., Heimann, K., Slapeta, J., Hoegh-Guldberg, O., Logsdon, J. M., Carter, D. A.** A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature* 451(7181): 959–963 (2008)
- Mordmüller, B., Supan, C., Sim, K. L., Gómez-Pérez, G. P., Ospina Salazar, C. L., Held, J., Bolte, S., Esen, M., Tschan, S., Joanny, F., Lamsfus Calle, C., Löhr, S. J. Z., Lalremruata, A., Gunasekera, A., James, E. R., Billingsley, P. F., Richman, A., Chakravarty, S., Legarda, A., Muñoz, J., Antonijoan, R. M., Ballester, M. R., Hoffman, S. L., Alonso, P. L., Kreamsner, P. G.** Direct venous

inoculation of *Plasmodium falciparum* sporozoites for controlled human malaria infection: a dose-finding trial in two centres. *Malaria journal* 14: 117 (2015)

Mordmüller, B., Surat, G., Lagler, H., Chakravarty, S., Ishizuka, A. S., Lalremruata, A., Gmeiner, M., Campo, J. J., Esen, M., Ruben, A. J., Held, J., Calle, C. L., Mengue, J. B., Gebru, T., Ibáñez, J., Sulyok, M., James, E. R., Billingsley, P. F., Natasha, K. C., Manoj, A., Murshedkar, T., Gunasekera, A., Eappen, A. G., Li, T., Stafford, R. E., Li, M., Felgner, P. L., Seder, R. A., Richie, T. L., Sim, B. K. L., Hoffman, S. L., Kremsner, P. G. Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. *Nature* 542(7642): 445–449 (2017)

Mu, J., Ferdig, M. T., Feng, X., Joy, D. A., Duan, J., Furuya, T., Subramanian, G., Aravind, L., Cooper, R. A., Wootton, J. C., Xiong, M., Su, X.-z. Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Molecular microbiology* 49(4): 977–989 (2003)

Muangnoicharoen, S., Johnson, D. J., Loareesuwan, S., Krudsood, S., Ward, S. A. Role of known molecular markers of resistance in the antimalarial potency of piperazine and dihydroartemisinin in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53(4): 1362–1366 (2009)

Mueller, I., Zimmerman, P. A., Reeder, J. C. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*—the "bashful" malaria parasites. *Trends in parasitology* 23(6): 278–283 (2007)

Muhia, D. K., Swales, C. A., Deng, W., Kelly, J. M., Baker, D. A. The gametocyte-activating factor xanthurenic acid stimulates an increase in membrane-associated guanylyl cyclase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology* 42(2): 553–560 (2001)

Mukai, F., Ishiguro, K., Sano, Y., Fujita, S. C. Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *Journal of neurochemistry* 81(5): 1073–1083 (2002)

Mullis, K. B., Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 155: 335–350 (1987)

Murphy, R. C., Ojo, K. K., Larson, E. T., Castellanos-Gonzalez, A., Perera, B. G. K., Keyloun, K. R., Kim, J. E., Bhandari, J. G., Muller, N. R., Verlinde, C. L. M. J., White, A. C., Merritt, E. A., van Voorhis, W. C., Maly, D. J. Discovery of Potent and Selective Inhibitors of Calcium-Dependent Protein Kinase 1 (CDPK1) from *C. parvum* and *T. gondii*. *ACS medicinal chemistry letters* 1(7): 331–335 (2010)

Musset, L., Bouchaud, O., Matheron, S., Massias, L., Le Bras, J. Clinical atovaquone-proguanil resistance of *Plasmodium falciparum* associated with cytochrome b codon 268 mutations. *Microbes and infection* 8(11): 2599–2604 (2006)

Muth, F., Günther, M., Bauer, S. M., Döring, E., Fischer, S., Maier, J., Drückes, P., Köppler, J., Trappe, J., Rothbauer, U., Koch, P., Laufer, S. A. Tetra-substituted pyridinylimidazoles as dual inhibitors of p38 α mitogen-activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase 3 for potential treatment of neurodegenerative diseases. *Journal of medicinal chemistry* 58(1): 443–456 (2015)

Nag, S., Prasad, K., Bhowmick, A., Deshmukh, R., Trivedi, V. PfRIO-2 kinase is a potential therapeutic target of antimalarial protein kinase inhibitors. *Current drug discovery technologies* 10(1): 85–91 (2013)

Narum, D. L., Thomas, A. W. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Molecular and biochemical parasitology* 67(1): 59–68 (1994)

Nasamu, A. S., Glushakova, S., Russo, I., Vaupel, B., Oksman, A., Kim, A. S., Fremont, D. H., Tolia, N., Beck, J. R., Meyers, M. J., Niles, J. C., Zimmerberg, J., Goldberg, D. E. Plasmepsins IX and X are essential and druggable mediators of malaria parasite egress and invasion. *Science (New York, N.Y.)* 358(6362): 518–522 (2017)

Nascimbeni, A. C., Codogno, P., Morel, E. Phosphatidylinositol-3-phosphate in the regulation of autophagy membrane dynamics. *The FEBS journal* 284(9): 1267–1278 (2017)

Neeno-Eckwall, E. C., Kinkel, L. L., Schottel, J. L. Competition and antibiosis in the biological control of potato scab. *Canadian journal of microbiology* 47(4): 332–340 (2001)

Nicola, G., Smith, C. A., Lucumi, E., Kuo, M. R., Karagoyozov, L., Fidock, D. A., Sacchettini, J. C., Abagyan, R. Discovery of novel inhibitors targeting enoyl-acyl carrier protein reductase in *Plasmodium falciparum* by structure-based virtual screening. *Biochemical and biophysical research communications* 358(3): 686–691 (2007)

Nixon, G. L., Moss, D. M., Shone, A. E., Laloo, D. G., Fisher, N., O'Neill, P. M., Ward, S. A., Biagini, G. A. Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 68(5): 977–985 (2013)

Niz, M. de, Burda, P.-C., Kaiser, G., Del Portillo, H. A., Spielmann, T., Frischknecht, F., Heussler, V. T. Progress in imaging methods: insights gained into *Plasmodium* biology. *Nature reviews. Microbiology* 15(1): 37–54 (2017)

Noedl, H., Se, Y., Schaefer, K., Smith, B. L., Socheat, D., Fukuda, M. M. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *The New England journal of medicine* 359(24): 2619–2620 (2008)

Nussenzweig, V., Nussenzweig, R. S. Circumsporozoite proteins of malaria parasites. *Cell* 42(2): 401–403 (1985)

Nussenzweig, R. S., Vanderberg, J., Most, H., Orton, C. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* 216(5111): 160–162 (1967)

- Nussenzweig, R. S., Vanderberg, J. P., Most, H., Orton, C.** Specificity of protective immunity produced by x-irradiated *Plasmodium berghei* sporozoites. *Nature* 222(5192): 488–489 (1969)
- Oakley, M. S., Gerald, N., McCutchan, T. F., Aravind, L., Kumar, S.** Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends in parasitology* 27(10): 442–449 (2011)
- O'Donnell, R. A., Hackett, F., Howell, S. A., Treeck, M., Struck, N., Krnajska, Z., Withers-Martinez, C., Gilberger, T. W., Blackman, M. J.** Intramembrane proteolysis mediates shedding of a key adhesin during erythrocyte invasion by the malaria parasite. *The Journal of cell biology* 174(7): 1023–1033 (2006)
- Oduola, A. M., Milhous, W. K., Weatherly, N. F., Bowdre, J. H., Desjardins, R. E.** *Plasmodium falciparum*: induction of resistance to mefloquine in cloned strains by continuous drug exposure in vitro. *Experimental parasitology* 67(2): 354–360 (1988)
- O'Flaherty, L., Shnyder, S. D., Cooper, P. A., Cross, S. J., Wakefield, J. G., Pardo, O. E., Seckl, M. J., Tavaré, J. M.** Tumor growth suppression using a combination of taxol-based therapy and GSK3 inhibition in non-small cell lung cancer. *PLoS one* 14(4): e0214610 (2019)
- Ogawa, T., Ichimura, M., Katsumata, S., Morimoto, M., Takahashi, K.** New antitumor antibiotics, duocarmycins B1 and B2. *The Journal of antibiotics* 42(8): 1299–1301 (1989)
- Ojo, K. K., Arakaki, T. L., Napuli, A. J., Inampudi, K. K., Keyloun, K. R., Zhang, L., Hol, W. G. J., Verlinde, C. L. M. J., Merritt, E. A., van Voorhis, W. C.** Structure determination of glycogen synthase kinase-3 from *Leishmania major* and comparative inhibitor structure-activity relationships with *Trypanosoma brucei* GSK-3. *Molecular and biochemical parasitology* 176(2): 98–108 (2011)
- Ojo, K. K., Eastman, R. T., Vidadala, R., Zhang, Z., Rivas, K. L., Choi, R., Lutz, J. D., Reid, M. C., Fox, A. M. W., Hulverson, M. A., Kennedy, M., Isoherranen, N., Kim, L. M., Comess, K. M., Kempf, D. J., Verlinde, C. L. M. J., Su, X.-z., Kappe, S. H. I., Maly, D. J., Fan, E., van Voorhis, W. C.** A specific inhibitor of PfCDPK4 blocks malaria transmission: chemical-genetic validation. *The Journal of infectious diseases* 209(2): 275–284 (2014)
- Ojo, K. K., Gillespie, J. R., Riechers, A. J., Napuli, A. J., Verlinde, C. L. M. J., Buckner, F. S., Gelb, M. H., Domostoj, M. M., Wells, S. J., Scheer, A., Wells, T. N. C., van Voorhis, W. C.** Glycogen synthase kinase 3 is a potential drug target for African trypanosomiasis therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52(10): 3710–3717 (2008)
- Ojo, K. K., Pfander, C., Mueller, N. R., Burstroem, C., Larson, E. T., Bryan, C. M., Fox, A. M. W., Reid, M. C., Johnson, S. M., Murphy, R. C., Kennedy, M., Mann, H., Leibly, D. J., Hewitt, S. N., Verlinde, C. L. M. J., Kappe, S., Merritt, E. A., Maly, D. J., Billker, O., van Voorhis, W. C.** Transmission of malaria to mosquitoes blocked by bumped kinase inhibitors. *The Journal of clinical investigation* 122(6): 2301–2305 (2012)
- Olotu, A., Fegan, G., Wambua, J., Nyangweso, G., Awuondo, K. O., Leach, A., Lievens, M., Lebouilleux, D., Njuguna, P., Peshu, N., Marsh, K., Bejon, P.** Four-year efficacy of RTS,S/AS01E and its interaction with malaria exposure. *The New England journal of medicine* 368(12): 1111–1120 (2013)
- Olotu, A., Fegan, G., Wambua, J., Nyangweso, G., Leach, A., Lievens, M., Kaslow, D. C., Njuguna, P., Marsh, K., Bejon, P.** Seven-Year Efficacy of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine among Young African Children. *The New England journal of medicine* 374(26): 2519–2529 (2016)
- Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y., Masuma, R.** A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *The Journal of antibiotics* 30(4): 275–282 (1977)
- Orikiiriza, J., Surowiec, I., Lindquist, E., Bonde, M., Magambo, J., Muhinda, C., Bergström, S., Trygg, J., Normark, J.** Lipid response patterns in acute phase paediatric *Plasmodium falciparum* malaria. *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society* 13(4): 41 (2017)
- Orlandi, P. A., Klotz, F. W., Haynes, J. D.** A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac(α-2-3)Gal- sequences of glycophorin A. *The Journal of cell biology* 116(4): 901–909 (1992)
- Osei-Akoto, A., Orton, L., Owusu-Ofori, S. P. O.** Atovaquone-proguanil for treating uncomplicated malaria. *The Cochrane database of systematic reviews* (4): CD004529 (2005)
- Osman, K. T., Lou, H. J., Qiu, W., Brand, V., Edwards, A. M., Turk, B. E., Hui, R.** Biochemical characterization of FIKK8--A unique protein kinase from the malaria parasite *Plasmodium falciparum* and other apicomplexans. *Molecular and biochemical parasitology* 201(2): 85–89 (2015)
- Osolodkin, D. I., Zakharevich, N. V., Palyulin, V. A., Danilenko, V. N., Zefirov, N. S.** Bioinformatic analysis of glycogen synthase kinase 3: human versus parasite kinases. *Parasitology* 138(6): 725–735 (2011)
- Otto, T. D., Wilinski, D., Assefa, S., Keane, T. M., Sarry, L. R., Böhme, U., Lemieux, J., Barrell, B., Pain, A., Berriman, M., Newbold, C., Llinás, M.** New insights into the blood-stage transcriptome of *Plasmodium falciparum* using RNA-Seq. *Molecular microbiology* 76(1): 12–24 (2010)
- Pain, A., Böhme, U., Berry, A. E., Mungall, K., Finn, R. D., Jackson, A. P., Mourier, T., Mistry, J., Pasini, E. M., Aslett, M. A., Balasubramaniam, S., Borgwardt, K., Brooks, K., Carret, C., Carver, T. J., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clark, T. G., Galinski, M. R., Hall, N., Harper, D., Harris, D., Hauser, H., Ivans, A., Janssen, C. S., Keane, T., Larke, N., Lapp, S., Marti, M., Moule, S., Meyer, I. M., Ormond, D., Peters, N., Sanders, M., Sanders, S., Sargeant, T. J., Simmonds, M., Smith, F., Squares, R., Thurston,**

- S., Tivey, A. R., Walker, D., White, B., Zuiderwijk, E., Churcher, C., Quail, M. A., Cowman, A. F., Turner, C. M. R., Rajandream, M. A., Kocken, C. H. M., Thomas, A. W., Newbold, C. I., Barrell, B. G., Berriman, M. The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature* 455(7214): 799–803 (2008)
- Painter, H. J., Chung, N. C., Sebastian, A., Albert, I., Storey, J. D., Llinás, M. Genome-wide real-time in vivo transcriptional dynamics during *Plasmodium falciparum* blood-stage development. *Nature communications* 9(1): 2656 (2018)
- Pan, W., Huang, D., Zhang, Q., Qu, L., Zhang, D., Zhang, X., Xue, X., Qian, F. Fusion of two malaria vaccine candidate antigens enhances product yield, immunogenicity, and antibody-mediated inhibition of parasite growth in vitro. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172(10): 6167–6174 (2004)
- Papanikou, E., Day, K. J., Austin, J., Glick, B. S. COPI selectively drives maturation of the early Golgi. *eLife* 4(2015)
- Paquet, T., Le Manach, C., Cabrera, D. G., Younis, Y., Henrich, P. P., Abraham, T. S., Lee, M. C. S., Basak, R., Ghidelli-Disse, S., Lafuente-Monasterio, M. J., Bantscheff, M., Ruecker, A., Blagborough, A. M., Zakutansky, S. E., Zeeman, A.-M., White, K. L., Shackelford, D. M., Mannila, J., Morizzi, J., Scheurer, C., Angulo-Barturen, I., Martínez, M. S., Ferrer, S., Sanz, L. M., Gamo, F. J., Reader, J., Botha, M., Dechering, K. J., Sauerwein, R. W., Tungtaeng, A., Vanachayangkul, P., Lim, C. S., Burrows, J., Witty, M. J., Marsh, K. C., Bodenreider, C., Rochford, R., Solapure, S. M., Jiménez-Díaz, M. B., Wittlin, S., Charman, S. A., Donini, C., Campo, B., Birkholtz, L.-M., Hanson, K. K., Drewes, G., Kocken, C. H. M., Delves, M. J., Leroy, D., Fidock, D. A., Waterson, D., Street, L. J., Chibale, K. Antimalarial efficacy of MMV390048, an inhibitor of *Plasmodium* phosphatidylinositol 4-kinase. *Science translational medicine* 9(387) (2017)
- Parker, P. J., Caudwell, F. B., Cohen, P. Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle; effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues in vivo. *European journal of biochemistry* 130(1): 227–234 (1983)
- Parr, J. B., Verity, R., Doctor, S. M., Janko, M., Carey-Ewend, K., Turman, B. J., Keeler, C., Slater, H. C., Whitesell, A. N., Mwandagaliwa, K., Ghani, A. C., Likwela, J. L., Tshetu, A. K., Emch, M., Juliano, J. J., Meshnick, S. R. Pfrp2-Deleted *Plasmodium falciparum* Parasites in the Democratic Republic of the Congo: A National Cross-sectional Survey. *The Journal of infectious diseases* 216(1): 36–44 (2017)
- Parveen, A., Chakraborty, A., Konreddy, A. K., Chakravarty, H., Sharon, A., Trivedi, V., Bal, C. Skeletal hybridization and PfPRIO-2 kinase modeling for synthesis of α -pyrone analogs as anti-malarial agent. *European journal of medicinal chemistry* 70: 607–612 (2013)
- Patel, A., Perrin, A. J., Flynn, H. R., Bisson, C., Withers-Martinez, C., Treeck, M., Flueck, C., Nicastro, G., Martin, S. R., Ramos, A., Gilberger, T. W., Snijders, A. P., Blackman, M. J., Baker, D. A. Cyclic AMP signalling controls key components of malaria parasite host cell invasion machinery. *PLoS biology* 17(5): e3000264 (2019)
- Patsoula, E., Spanakos, G., Sofianatou, D., Parara, M., Vakalis, N. C. A single-step, PCR-based method for the detection and differentiation of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*. *Annals of tropical medicine and parasitology* 97(1): 15–21 (2003)
- Patory, S., Geda, P., Dobry, C. J., Kumar, A., Gestwicki, J. E. Conditional nuclear import and export of yeast proteins using a chemical inducer of dimerization. *Cell biochemistry and biophysics* 53(3): 127–134 (2009)
- Payne, D. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology today (Personal ed.)* 3(8): 241–246 (1987)
- Payne, R. O., Silk, S. E., Elias, S. C., Miura, K., Diouf, A., Galaway, F., Graaf, H. de, Brendish, N. J., Poulton, I. D., Griffiths, O. J., Edwards, N. J., Jin, J., Labbé, G. M., Alanine, D. G., Siani, L., Di Marco, S., Roberts, R., Green, N., Berrie, E., Ishizuka, A. S., Nielsen, C. M., Bardelli, M., Partey, F. D., Ofori, M. F., Barfod, L., Wambua, J., Murungi, L. M., Osier, F. H., Biswas, S., McCarthy, J. S., Minassian, A. M., Ashfield, R., Viebig, N. K., Nugent, F. L., Douglas, A. D., Vekemans, J., Wright, G. J., Faust, S. N., Hill, A. V., Long, C. A., Lawrie, A. M., Draper, S. J. Human vaccination against RH5 induces neutralizing antimalarial antibodies that inhibit RH5 invasion complex interactions. *JCI insight* 2(21) (2017)
- Pelle, K. G., Oh, K., Buchholz, K., Narasimhan, V., Joice, R., Milner, D. A., Brancucci, N. M., Ma, S., Voss, T. S., Ketman, K., Seydel, K. B., Taylor, T. E., Barteneva, N. S., Huttenhower, C., Marti, M. Transcriptional profiling defines dynamics of parasite tissue sequestration during malaria infection. *Genome medicine* 7(1): 19 (2015)
- Pelleau, S., Moss, E. L., Dhingra, S. K., Volney, B., Casteras, J., Gabryszewski, S. J., Volkman, S. K., Wirth, D. F., Legrand, E., Fidock, D. A., Neafsey, D. E., Musset, L. Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: Reversal of chloroquine resistance by acquisition of a mutation in pfprt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(37): 11672–11677 (2015)
- Penna-Coutinho, J., Cortopassi, W. A., Oliveira, A. A., França, T. C. C., Krettli, A. U. Antimalarial activity of potential inhibitors of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase enzyme selected by docking studies. *PLoS one* 6(7): e21237 (2011)
- Penzo, M., Las Heras-Dueña, L. de, Mata-Cantero, L., Diaz-Hernandez, B., Vazquez-Muñoz, M.-J., Ghidelli-Disse, S., Drewes, G., Fernandez-Alvaro, E., Baker, D. A. High-throughput screening of the *Plasmodium falciparum* cGMP-dependent protein kinase identified a thiazole scaffold which kills erythrocytic and sexual stage parasites. *Scientific reports* 9(1): 7005 (2019)
- Pereira, N. L., Rihal, C. S., So, D. Y. F., Rosenberg, Y., Lennon, R. J., Mathew, V., Goodman, S. G., Weinsilboun, R. M., Wang, L., Baudhuin, L. M., Lerman, A., Hasan, A., Iturriaga, E., Fu, Y.-P., Geller, N., Bailey, K., Farkouh, M. E. Clopidogrel Pharmacogenetics. *Circulation. Cardiovascular interventions* 12(4): e007811 (2019)
- Persson, K. E. M., Fowkes, F. J. I., McCallum, F. J., Gicheru, N., Reiling, L., Richards, J. S., Wilson, D. W., Lopaticki, S., Cowman, A. F., Marsh, K., Beeson, J. G. Erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* are targets of human inhibitory antibodies and function to evade naturally acquired immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191(2): 785–794 (2013)

- Pertoft**, H., Laurent, T. C., Låås, T., Kågedal, L. Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Analytical biochemistry* 88(1): 271–282 (1978)
- Peterson**, D. S., Wellems, T. E. EBL-1, a putative erythrocyte binding protein of *Plasmodium falciparum*, maps within a favored linkage group in two genetic crosses. *Molecular and biochemical parasitology* 105(1): 105–113 (2000)
- Philip**, N., Waters, A. P. Conditional Degradation of *Plasmodium* Calcineurin Reveals Functions in Parasite Colonization of both Host and Vector. *Cell host & microbe* 18(1): 122–131 (2015)
- Pickard**, A. L., Wongsrichanalai, C., Purfield, A., Kamwendo, D., Emery, K., Zalewski, C., Kawamoto, F., Miller, R. S., Meshnick, S. R. Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in *pfdmr1*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47(8): 2418–2423 (2003)
- Pimentel-Elardo**, S. M., Kozytska, S., Bugni, T. S., Ireland, C. M., Moll, H., Hentschel, U. Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. *Marine drugs* 8(2): 373–380 (2010)
- Pinder**, M., Jawara, M., Jarju, L. B. S., Salami, K., Jeffries, D., Adiamoh, M., Bojang, K., Correa, S., Kandeh, B., Kaur, H., Conway, D. J., D'Alessandro, U., Lindsay, S. W. Efficacy of indoor residual spraying with dichlorodiphenyltrichloroethane against malaria in Gambian communities with high usage of long-lasting insecticidal mosquito nets: a cluster-randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 385(9976): 1436–1446 (2015)
- Pino**, P., Caldelari, R., Mukherjee, B., Vahokoski, J., Klages, N., Maco, B., Collins, C. R., Blackman, M. J., Kursula, I., Heussler, V., Brochet, M., Soldati-Favre, D. A multistage antimalarial targets the plasmepsins IX and X essential for invasion and egress. *Science (New York, N.Y.)* 358(6362): 522–528 (2017)
- Plouffe**, D., Brinker, A., McNamara, C., Henson, K., Kato, N., Kuhnen, K., Nagle, A., Adrián, F., Matzen, J. T., Anderson, P., Nam, T.-G., Gray, N. S., Chatterjee, A., Janes, J., Yan, S. F., Trager, R., Caldwell, J. S., Schultz, P. G., Zhou, Y., Winzeler, E. A. In silico activity profiling reveals the mechanism of action of antimalarials discovered in a high-throughput screen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(26): 9059–9064 (2008)
- Plowe**, C. V., Cortese, J. F., Djimde, A., Nwanyanwu, O. C., Watkins, W. M., Winstanley, P. A., Estrada-Franco, J. G., Mollinedo, R. E., Avila, J. C., Cespedes, J. L., Carter, D., Doumbo, O. K. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *The Journal of infectious diseases* 176(6): 1590–1596 (1997)
- Plyte**, S. E., Feoktistova, A., Burke, J. D., Woodgett, J. R., Gould, K. L. *Schizosaccharomyces pombe* *skp1+* encodes a protein kinase related to mammalian glycogen synthase kinase 3 and complements a *cdc14* cytokinesis mutant. *Molecular and cellular biology* 16(1): 179–191 (1996)
- Ponzi**, M., Sidén-Kiamos, I., Bertuccini, L., Currà, C., Kroeze, H., Camarda, G., Pace, T., Franke-Fayard, B., Laurentino, E. C., Louis, C., Waters, A. P., Janse, C. J., Alano, P. Egress of *Plasmodium berghei* gametes from their host erythrocyte is mediated by the MDV-1/PEG3 protein. *Cellular microbiology* 11(8): 1272–1288 (2009)
- Poser**, C. M., Bruyn, G. W. An illustrated history of malaria Informa Healthcare (1999)
- Poulin**, B., Patzewitz, E.-M., Brady, D., Silvie, O., Wright, M. H., Ferguson, D. J. P., Wall, R. J., Whipple, S., Guttery, D. S., Tate, E. W., Wickstead, B., Holder, A. A., Tewari, R. Unique apicomplexan IMC sub-compartment proteins are early markers for apical polarity in the malaria parasite. *Biology open* 2(11): 1160–1170 (2013)
- Pradel**, G. Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies. *Parasitology* 134(Pt.14): 1911–1929 (2007)
- Pradel**, G., Wagner, C., Mejia, C., Templeton, T. J. *Plasmodium falciparum*: Co-dependent expression and co-localization of the PfCCp multi-adhesion domain proteins. *Experimental parasitology* 112(4): 263–268 (2006)
- Premji**, Z., Minjas, J. N., Shiff, C. J. Laboratory diagnosis of malaria by village health workers using the rapid manual ParaSight-F test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88(4): 418 (1994)
- Prinz**, B., Harvey, K. L., Wilcke, L., Ruch, U., Engelberg, K., Biller, L., Lucet, I., Erkelenz, S., Heincke, D., Spielmann, T., Doerig, C., Kunick, C., Crabb, B. S., Gilson, P. R., Gilberger, T. W. Hierarchical phosphorylation of apical membrane antigen 1 is required for efficient red blood cell invasion by malaria parasites. *Scientific reports* 6: 34479 (2016)
- Prommana**, P., Uthaiipull, C., Wongsombat, C., Kamchonwongpaisan, S., Yuthavong, Y., Knuepfer, E., Holder, A. A., Shaw, P. J. Inducible knockdown of *Plasmodium* gene expression using the *glmS* ribozyme. *PloS one* 8(8): e73783 (2013)
- Proto**, W. R., Siegel, S. V., Dankwa, S., Liu, W., Kemp, A., Marsden, S., Zenonos, Z. A., Unwin, S., Sharp, P. M., Wright, G. J., Hahn, B. H., Duraisingh, M. T., Rayner, J. C. Adaptation of *Plasmodium falciparum* to humans involved the loss of an ape-specific erythrocyte invasion ligand. *Nature communications* 10(1): 4512 (2019)
- Pukrittayakamee**, S., Viravan, C., Charoenlarp, P., Yeamput, C., Wilson, R. J., White, N. J. Antimalarial effects of rifampin in *Plasmodium vivax* malaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 38(3): 511–514 (1994)
- Putrianti**, E. D., Schmidt-Christensen, A., Arnold, I., Heussler, V. T., Matuschewski, K., Silvie, O. The *Plasmodium* serine-type SERA proteases display distinct expression patterns and non-essential in vivo roles during life cycle progression of the malaria parasite. *Cellular microbiology* 12(6): 725–739 (2010)
- Qin**, J., Wang, G., Jiang, C., Xu, J.-R., Wang, C. Fgk3 glycogen synthase kinase is important for development, pathogenesis, and stress responses in *Fusarium graminearum*. *Scientific reports* 5: 8504 (2015)

- Raj, D. K., Mu, J., Jiang, H., Kabat, J., Singh, S., Sullivan, M., Fay, M. P., McCutchan, T. F., Su, X.-z.** Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. *The Journal of biological chemistry* 284(12): 7687–7696 (2009)
- Rangarajan, R., Bei, A. K., Jethwaney, D., Maldonado, P., Dorin, D., Sultan, A. A., Doerig, C.** A mitogen-activated protein kinase regulates male gametogenesis and transmission of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO reports* 6(5): 464–469 (2005)
- Rask-Andersen, M., Zhang, J., Fabbro, D., Schiöth, H. B.** Advances in kinase targeting: current clinical use and clinical trials. *Trends in pharmacological sciences* 35(11): 604–620 (2014)
- Rasko, D. A., Sperandio, V.** Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature reviews. Drug discovery* 9(2): 117–128 (2010)
- Rasmussen, C., Nyunt, M. M., Ringwald, P.** Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* in Africa. *The New England journal of medicine* 377(3): 305–306 (2017)
- Rayner, J. C., Vargas-Serrato, E., Huber, C. S., Galinski, M. R., Barnwell, J. W.** A *Plasmodium falciparum* homologue of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein (PvRBP1) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway. *The Journal of experimental medicine* 194(11): 1571–1581 (2001)
- Reddy, K. S., Amlabu, E., Pandey, A. K., Mitra, P., Chauhan, V. S., Gaur, D.** Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr is crucial for *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(4): 1179–1184 (2015)
- Reed, M. B., Saliba, K. J., Caruana, S. R., Kirk, K., Cowman, A. F.** Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 403(6772): 906–909 (2000)
- Rees-Channer, R. R., Martin, S. R., Green, J. L., Bowyer, P. W., Grainger, M., Molloy, J. E., Holder, A. A.** Dual acylation of the 45 kDa gliding-associated protein (GAP45) in *Plasmodium falciparum* merozoites. *Molecular and biochemical parasitology* 149(1): 113–116 (2006)
- Reininger, L., Billker, O., Tewari, R., Mukhopadhyay, A., Fennell, C., Dorin-Semlat, D., Doerig, C., Goldring, D., Harmse, L., Ranford-Cartwright, L., Packer, J., Doerig, C.** A NIMA-related protein kinase is essential for completion of the sexual cycle of malaria parasites. *The Journal of biological chemistry* 280(36): 31957–31964 (2005)
- Reininger, L., Garcia, M., Tomlins, A., Müller, S., Doerig, C.** The *Plasmodium falciparum*, Nima-related kinase Pfnek-4: a marker for asexual parasites committed to sexual differentiation. *Malaria journal* 11: 250 (2012)
- Reininger, L., Tewari, R., Fennell, C., Holland, Z., Goldring, D., Ranford-Cartwright, L., Billker, O., Doerig, C.** An essential role for the *Plasmodium* Nek-2 Nima-related protein kinase in the sexual development of malaria parasites. *The Journal of biological chemistry* 284(31): 20858–20868 (2009)
- Reininger, L., Wilkes, J. M., Bourgade, H., Miranda-Saavedra, D., Doerig, C.** An essential Aurora-related kinase transiently associates with spindle pole bodies during *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizogony. *Molecular microbiology* 79(1): 205–221 (2011)
- Richard, D., MacRaid, C. A., Riglar, D. T., Chan, J.-A., Foley, M., Baum, J., Ralph, S. A., Norton, R. S., Cowman, A. F.** Interaction between *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. *The Journal of biological chemistry* 285(19): 14815–14822 (2010)
- Rieckmann, K. H., Carson, P. E., Beaudoin, R. L., Cassells, J. S., Sell, K. W.** Sporozoite induced immunity in man against an ethiopian strain of *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 68(3): 258–259 (1974)
- Rivadeneira, E. M., Wasserman, M., Espinal, C. T.** Separation and concentration of schizonts of *Plasmodium falciparum* by Percoll gradients. *The Journal of protozoology* 30(2): 367–370 (1983)
- Rizzieri, D. A., Cooley, S., Odenike, O., Moonan, L., Chow, K. H., Jackson, K., Wang, X., Brail, L., Borthakur, G.** An open-label phase 2 study of glycogen synthase kinase-3 inhibitor LY2090314 in patients with acute leukemia. *Leukemia & lymphoma* 57(8): 1800–1806 (2016)
- Robinson, M. S., Sahlender, D. A., Foster, S. D.** Rapid inactivation of proteins by rapamycin-induced rerouting to mitochondria. *Developmental cell* 18(2): 324–331 (2010)
- Roestenberg, M., McCall, M., Hopman, J., Wiersma, J., Luty, A. J. F., van Gemert, G. J., van de Vegte-Bolmer, M., van Schaijk, B., Teelen, K., Arens, T., Spaarman, L., Mast, Q. de, Roeffen, W., Snounou, G., Rénia, L., van der Ven, A., Hermesen, C. C., Sauerwein, R.** Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. *The New England journal of medicine* 361(5): 468–477 (2009)
- Roestenberg, M., Teirlinck, A. C., McCall, M. B. B., Teelen, K., Makamdop, K. N., Wiersma, J., Arens, T., Beckers, P., van Gemert, G., van de Vegte-Bolmer, M., van der Ven, A. J., Luty, A. J. F., Hermesen, C. C., Sauerwein, R. W.** Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. *Lancet (London, England)* 377(9779): 1770–1776 (2011)
- Rosowsky, A., Chen, K. K., Lin, M.** 2,4-Diaminothieno(2,3-d)pyrimidines as antifolates and antimalarials. 3. Synthesis of 5,6-disubstituted derivatives and related tetracyclic analogs. *Journal of medicinal chemistry* 16(3): 191–194 (1973)

- Ross, L. S., Dhingra, S. K., Mok, S., Yeo, T., Wicht, K. J., Kumpornsin, K., Takala-Harrison, S., Witkowski, B., Fairhurst, R. M., Arley, F., Menard, D., Fidock, D. A. Emerging Southeast Asian PfCRT mutations confer Plasmodium falciparum resistance to the first-line antimalarial piperazine. *Nature communications* 9(1): 3314 (2018)
- Rottmann, M., McNamara, C., Yeung, B. K. S., Lee, M. C. S., Zou, B., Russell, B., Seitz, P., Plouffe, D. M., Dharia, N. V., Tan, J., Cohen, S. B., Spencer, K. R., González-Páez, G. E., Lakshminarayana, S. B., Goh, A., Suwanarusk, R., Jegla, T., Schmitt, E. K., Beck, H.-P., Brun, R., Nosten, F., Renia, L., Dartois, V., Keller, T. H., Fidock, D. A., Winzeler, E. A., Diagana, T. T. Spiroindolones, a potent compound class for the treatment of malaria. *Science (New York, N.Y.)* 329(5996): 1175–1180 (2010)
- Roucher, C., Rogier, C., Sokhna, C., Tall, A., Trape, J.-F. A 20-year longitudinal study of Plasmodium ovale and Plasmodium malariae prevalence and morbidity in a West African population. *PLoS one* 9(2): e87169 (2014)
- Rougemont, M., van Saanen, M., Sahli, R., Hinrikson, H. P., Bille, J., Jatou, K. Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *Journal of clinical microbiology* 42(12): 5636–5643 (2004)
- Roux, K. J., Kim, D., in, Raida, M., Burke, B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 196(6): 801–810 (2012)
- Rovira-Graells, N., Gupta, A. P., Planet, E., Crowley, V. M., Mok, S., Ribas de Pouplana, L., Preiser, P. R., Bozdech, Z., Cortés, A. Transcriptional variation in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Genome research* 22(5): 925–938 (2012)
- Rowe, J. A., Claessens, A., Corrigan, R. A., Arman, M. Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert reviews in molecular medicine* 11: e16 (2009)
- Rowe, J. A., Obiero, J., Marsh, K., Raza, A. Short report: Positive correlation between rosetting and parasitemia in Plasmodium falciparum clinical isolates. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 66(5): 458–460 (2002)
- Rüegg, U. T., Rüdiger, J. Reductive cleavage of cystine *Methods Enzymol.* 41: 111-116 (1977)
- Rush, M. A., Baniecki, M. L., Mazitschek, R., Cortese, J. F., Wiegand, R., Clardy, J., Wirth, D. F. Colorimetric high-throughput screen for detection of heme crystallization inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53(6): 2564–2568 (2009)
- Russo, G., L'Episcopia, M., Menegon, M., Souza, S. S., Dongho, B. G. D., Vullo, V., Lucchi, N. W., Severini, C. Dihydroartemisinin-piperazine treatment failure in uncomplicated Plasmodium falciparum malaria case imported from Ethiopia. *Infection* 46(6): 867–870 (2018)
- Ryder, J., Su, Y., Liu, F., Li, B., Zhou, Y., Ni, B. Divergent roles of GSK3 and CDK5 in APP processing. *Biochemical and biophysical research communications* 312(4): 922–929 (2003)
- Rylatt, D. B., Aitken, A., Bilham, T., Condon, G. D., Embi, N., Cohen, P. Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase. *European journal of biochemistry* 107(2): 529–537 (1980)
- Sá, J. M., Twu, O., Hayton, K., Reyes, S., Fay, M. P., Ringwald, P., Wellems, T. E. Geographic patterns of Plasmodium falciparum drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(45): 18883–18889 (2009)
- Sabbatani, S., Fiorino, S., Manfredi, R. The emerging of the fifth malaria parasite (Plasmodium knowlesi): a public health concern? *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 14(3): 299–309 (2010)
- Saenz, F. E., Balu, B., Smith, J., Mendonca, S. R., Adams, J. H. The transmembrane isoform of Plasmodium falciparum MAEBL is essential for the invasion of Anopheles salivary glands. *PLoS one* 3(5): e2287 (2008)
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)* 239(4839): 487–491 (1988)
- Sajid, M., Withers-Martinez, C., Blackman, M. J. Maturation and specificity of Plasmodium falciparum subtilisin-like protease-1, a malaria merozoite subtilisin-like serine protease. *The Journal of biological chemistry* 275(1): 631–641 (2000)
- Salanti, A., Staalsoe, T., Lavstsen, T., Jensen, A. T. R., Sowa, M. P. K., Arnot, D. E., Hviid, L., Theander, T. G. Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering Plasmodium falciparum involved in pregnancy-associated malaria. *Molecular microbiology* 49(1): 179–191 (2003)
- Salazar, C., Höfer, T. Multisite protein phosphorylation—from molecular mechanisms to kinetic models. *The FEBS journal* 276(12): 3177–3198 (2009)
- Sambrook, J. Molecular Cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press 3rd* (2001)
- Sanchez, C. P., McLean, J. E., Rohrbach, P., Fidock, D. A., Stein, W. D., Lanzer, M. Evidence for a pfCRT-associated chloroquine efflux system in the human malarial parasite Plasmodium falciparum. *Biochemistry* 44(29): 9862–9870 (2005)
- Sanchez, C. P., Rohrbach, P., McLean, J. E., Fidock, D. A., Stein, W. D., Lanzer, M. Differences in trans-stimulated chloroquine efflux kinetics are linked to PfCRT in Plasmodium falciparum. *Molecular microbiology* 64(2): 407–420 (2007)
- Sanders, P. R., Gilson, P. R., Cantin, G. T., Greenbaum, D. C., Nebl, T., Carucci, D. J., McConville, M. J., Schofield, L., Hodder, A. N., Yates, J. R., Crabb, B. S. Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in Raft-like membranes of Plasmodium falciparum. *The Journal of biological chemistry* 280(48): 40169–40176 (2005)

- Sandlin**, R. D., Carter, M. D., Lee, P. J., Auschwitz, J. M., Leed, S. E., Johnson, J. D., Wright, D. W. Use of the NP-40 detergent-mediated assay in discovery of inhibitors of beta-hematin crystallization. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55(7): 3363–3369 (2011)
- Santiago-Alarcon**, D., Palinauskas, V., Schaefer, H. M. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 87(4): 928–964 (2012)
- Santos**, S. F., Tasiaux, B., Sindic, C., Octave, J.-N. Inhibition of neuronal calcium oscillations by cell surface APP phosphorylated on T668. *Neurobiology of aging* 32(12): 2308–2313 (2011)
- Sarno**, P. de, Axtell, R. C., Raman, C., Roth, K. A., Alessi, D. R., Jope, R. S. Lithium prevents and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 181(1): 338–345 (2008)
- Saul**, A. The role of variant surface antigens on malaria-infected red blood cells. *Parasitology today (Personal ed.)* 15(11): 455–457 (1999)
- Scales**, T. M. E., Lin, S., Kraus, M., Goold, R. G., Gordon-Weeks, P. R. Nonprimed and DYRK1A-primed GSK3 beta-phosphorylation sites on MAP1B regulate microtubule dynamics in growing axons. *Journal of cell science* 122(Pt 14): 2424–2435 (2009)
- Schlegel**, S., Genevaux, P., Gier, J.-W. de. De-convoluting the Genetic Adaptations of *E. coli* C41(DE3) in Real Time Reveals How Alleviating Protein Production Stress Improves Yields. *Cell reports* 10(10): 1758–1766 (2015)
- Schneider**, A. G., Mercereau-Puijalon, O. A new Apicomplexa-specific protein kinase family: multiple members in *Plasmodium falciparum*, all with an export signature. *BMC genomics* 6: 30 (2005)
- Schofield**, L., Hewitt, M. C., Evans, K., Siomos, M.-A., Seeberger, P. H. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature* 418(6899): 785–789 (2002)
- Scholz**, S. M., Simon, N., Lavazec, C., Dude, M.-A., Templeton, T. J., Pradel, G. PfCCp proteins of *Plasmodium falciparum*: gametocyte-specific expression and role in complement-mediated inhibition of exflagellation. *International journal for parasitology* 38(3-4): 327–340 (2008)
- Schottelius**, J., Gilberger, T., Ehrhardt, S., Burchard, G. *Plasmodium knowlesi*: ein neuer Malariaerreger des Menschen. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 135(7): 297–300 (2010)
- Schüffner**, W. Beitrag zur Kenntnis der Malaria. *Deutsch. Arch. f. klin. Med.* (64): 428 (1899)
- Schultz**, C., Link, A., Leost, M., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Sausville, E. A., Meijer, L., Kunick, C. Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis, evaluation of CDK1/cyclin B inhibition, and in vitro antitumor activity. *Journal of medicinal chemistry* 42(15): 2909–2919 (1999)
- Schwach**, F., Bushell, E., Gomes, A. R., Anar, B., Girling, G., Herd, C., Rayner, J. C., Billker, O. PlasmoGEM, a database supporting a community resource for large-scale experimental genetics in malaria parasites. *Nucleic acids research* 43(Database issue): D1176-82 (2015)
- Schwartz**, E., Bujanover, S., Kain, K. C. Genetic confirmation of atovaquone-proguanil-resistant *Plasmodium falciparum* malaria acquired by a nonimmune traveler to East Africa. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 37(3): 450–451 (2003)
- Sebastian**, S., Brochet, M., Collins, M. O., Schwach, F., Jones, M. L., Goulding, D., Rayner, J. C., Choudhary, J. S., Billker, O. A *Plasmodium* calcium-dependent protein kinase controls zygote development and transmission by translationally activating repressed mRNAs. *Cell host & microbe* 12(1): 9–19 (2012)
- Seder**, R. A., Chang, L.-J., Enama, M. E., Zephir, K. L., Sarwar, U. N., Gordon, I. J., Holman, L. A., James, E. R., Billingsley, P. F., Gunasekera, A., Richman, A., Chakravarty, S., Manoj, A., Velmurugan, S., Li, M., Ruben, A. J., Li, T., Eappen, A. G., Stafford, R. E., Plummer, S. H., Hendel, C. S., Novik, L., Costner, P. J. M., Mendoza, F. H., Saunders, J. G., Nason, M. C., Richardson, J. H., Murphy, J., Davidson, S. A., Richie, T. L., Sedegah, M., Sutamihardja, A., Fahle, G. A., Lyke, K. E., Laurens, M. B., Roederer, M., Tewari, K., Epstein, J. E., Sim, B. K. L., Ledgerwood, J. E., Graham, B. S., Hoffman, S. L. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science (New York, N.Y.)* 341(6152): 1359–1365 (2013)
- Senanayake**, S. D., Brian, D. A. Precise large deletions by the PCR-based overlap extension method. *Molecular biotechnology* 4(1): 13–15 (1995)
- Sengupta**, S., Chattopadhyay, M. K., Grossart, H.-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in microbiology* 4: 47 (2013)
- Sherman**, I. W. Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites. *Bulletin of the World Health Organization* 55(2-3): 265–276 (1977)
- Sherry**, B. A., Alava, G., Tracey, K. J., Martiney, J., Cerami, A., Slater, A. F. Malaria-specific metabolite hemozoin mediates the release of several potent endogenous pyrogens (TNF, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta) in vitro, and altered thermoregulation in vivo. *Journal of inflammation* 45(2): 85–96 (1995)
- Shetty**, P. The numbers game. *Nature* 484(7395): S14-5 (2012)

- Sibley, C. H., Hyde, J. E., Sims, P. F., Plowe, C. V., Kublin, J. G., Mberu, E. K., Cowman, A. F., Winstanley, P. A., Watkins, W. M., Nzila, A. M.** Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends in parasitology* 17(12): 582–588 (2001)
- Sicheri, F., Moarefi, I., Kuriyan, J.** Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385(6617): 602–609 (1997)
- Siden-Kiamos, I., Pace, T., Klonizakis, A., Nardini, M., Garcia, C. R. S., Currà, C.** Identification of *Plasmodium berghei* Oocyst Rupture Protein 2 (ORP2) domains involved in sporozoite egress from the oocyst. *International journal for parasitology* 48(14): 1127–1136 (2018)
- Sidhu, A. B. S., Uhlemann, A.-C., Valderramos, S. G., Valderramos, J.-C., Krishna, S., Fidock, D. A.** Decreasing pfmdr1 copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *The Journal of infectious diseases* 194(4): 528–535 (2006)
- Sidhu, A. B. S., Valderramos, S. G., Fidock, D. A.** pfmdr1 mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology* 57(4): 913–926 (2005)
- Siegel, T. N., Hon, C.-C., Zhang, Q., Lopez-Rubio, J.-J., Scheidig-Benatar, C., Martins, R. M., Sismeiro, O., Coppée, J.-Y., Scherf, A.** Strand-specific RNA-Seq reveals widespread and developmentally regulated transcription of natural antisense transcripts in *Plasmodium falciparum*. *BMC genomics* 15: 150 (2014)
- Silvestrini, F., Bozdech, Z., Lanfrancotti, A., Di Giulio, E., Bultrini, E., Picci, L., DeRisi, J. L., Pizzi, E., Alano, P.** Genome-wide identification of genes upregulated at the onset of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 143(1): 100–110 (2005)
- Silvestrini, F., Lasonder, E., Olivieri, A., Camarda, G., van Schaijk, B., Sanchez, M., Younis Younis, S., Sauerwein, R., Alano, P.** Protein export marks the early phase of gametocytogenesis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 9(7): 1437–1448 (2010)
- Sim, B. K., Chitnis, C. E., Wasniowska, K., Hadley, T. J., Miller, L. H.** Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science (New York, N.Y.)* 264(5167): 1941–1944 (1994)
- Simon, N., Kuehn, A., Williamson, K. C., Pradel, G.** Adhesion protein complexes of malaria gametocytes assemble following parasite transmission to the mosquito. *Parasitology international* 65(1): 27–30 (2016)
- Simon, N., Scholz, S. M., Moreira, C. K., Templeton, T. J., Kuehn, A., Dude, M.-A., Pradel, G.** Sexual stage adhesion proteins form multi-protein complexes in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The Journal of biological chemistry* 284(21): 14537–14546 (2009)
- Singh, K. K.** An emerging role for Wnt and GSK3 signaling pathways in schizophrenia. *Clinical genetics* 83(6): 511–517 (2013)
- Singh, S., Alam, M. M., Pal-Bhowmick, I., Brzostowski, J. A., Chitnis, C. E.** Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. *PLoS pathogens* 6(2): e1000746 (2010)
- Singh, B., Daneshvar, C.** Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clinical microbiology reviews* 26(2): 165–184 (2013)
- Sinha, A., Hughes, K. R., Modrzynska, K. K., Otto, T. D., Pfander, C., Dickens, N. J., Religa, A. A., Bushell, E., Graham, A. L., Cameron, R., Kafsack, B. F. C., Williams, A. E., Llinas, M., Berriman, M., Billker, O., Waters, A. P.** A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in *Plasmodium*. *Nature* 507(7491): 253–257 (2014)
- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C. M., Hemingway, J., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Kabaria, C. W., Okara, R. M., van Boeckel, T., Godfray, H. C. J., Harbach, R. E., Hay, S. I.** The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & vectors* 3: 117 (2010a)
- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Chareonviriyaphap, T., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Elyazar, I. R. F., Kabaria, C. W., Harbach, R. E., Hay, S. I.** The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & vectors* 4: 89 (2011)
- Sinka, M. E., Rubio-Palis, Y., Manguin, S., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., van Boeckel, T., Kabaria, C. W., Harbach, R. E., Hay, S. I.** The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & vectors* 3: 72 (2010b)
- Sinxadi, P., Donini, C., Johnstone, H., Langdon, G., Wiesner, L., Allen, E., Duparc, S., Chalon, S., McCarthy, J. S., Lorch, U., Chibale, K., Möhrle, J., Barnes, K. I.** Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Antimalarial Activity of the Novel *Plasmodium* Phosphatidylinositol 4-Kinase Inhibitor MMV390048 in Healthy Volunteers. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 64(4) (2020)
- Sirakanyan, S. N., Spinelli, D., Geronikaki, A., Hakobyan, E. K., Sahakyan, H., Arabyan, E., Zakaryan, H., Nersesyan, L. E., Aharonyan, A. S., Danielyan, I. S., Muradyan, R. E., Hovakimyan, A. A.** Synthesis, Antitumor Activity, and Docking Analysis of New Pyrdo3',2':4,5furo(thieno)3,2-dpyrimidin-8-amines. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24(21) (2019)
- Sisowath, C., Petersen, I., Veiga, M. I., Mårtensson, A., Premji, Z., Björkman, A., Fidock, D. A., Gil, J. P.** In vivo selection of *Plasmodium falciparum* parasites carrying the chloroquine-susceptible pfcr1 K76 allele after treatment with artemether-lumefantrine in Africa. *The Journal of infectious diseases* 199(5): 750–757 (2009)

- Sisowath, C., Strömberg, J., Mårtensson, A., Msellem, M., Obondo, C., Björkman, A., Gil, J. P.** In vivo selection of *Plasmodium falciparum* pfm-dr1 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem). *The Journal of infectious diseases* 191(6): 1014–1017 (2005)
- Slater, A. F., Cerami, A.** Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* 355(6356): 167–169 (1992)
- Sluydts, V., Durnez, L., Heng, S., Gryseels, C., Canier, L., Kim, S., van Roey, K., Kerkhof, K., Khim, N., Mao, S., Uk, S., Sovannarothe, S., Grietens, K. P., Sochantha, T., Menard, D., Coosemans, M.** Efficacy of topical mosquito repellent (picaridin) plus long-lasting insecticidal nets versus long-lasting insecticidal nets alone for control of malaria: a cluster randomised controlled trial. *The Lancet. Infectious diseases* 16(10): 1169–1177 (2016)
- Smilkstein, M., Sriwilaijaroen, N., Kelly, J. X., Wilairat, P., Riscoe, M.** Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48(5): 1803–1806 (2004)
- Smith, D. B., Johnson, K. S.** Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67(1): 31–40 (1988)
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150(1): 76–85 (1985)
- Smith, D. E., Marquez, I., Lokensgard, M. E., Rheingold, A. L., Hecht, D. A., Gustafson, J. L.** Exploiting Atropisomerism to Increase the Target Selectivity of Kinase Inhibitors. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 54(40): 11754–11759 (2015)
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X. P., Jarra, W., Pinheiro, L., do Rosario, V. E., Thaitong, S., Brown, K. N.** High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and biochemical parasitology* 61(2): 315–320 (1993)
- Sologub, L., Kuehn, A., Kern, S., Przyborski, J., Schillig, R., Pradel, G.** Malaria proteases mediate inside-out egress of gametocytes from red blood cells following parasite transmission to the mosquito. *Cellular microbiology* 13(6): 897–912 (2011)
- Solyakov, L., Halbert, J., Alam, M. M., Semblat, J.-P., Dorin-Semblat, D., Reiningger, L., Bottrill, A. R., Mistry, S., Abdi, A., Fennell, C., Holland, Z., Demarta, C., Bouza, Y., Sicard, A., Nivez, M.-P., Eschenlauer, S., Lama, T., Thomas, D. C., Sharma, P., Agarwal, S., Kern, S., Pradel, G., Graciotti, M., Tobin, A. B., Doerig, C.** Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature communications* 2: 565 (2011)
- Sondén, K., Wyss, K., Jovel, I., Vieira da Silva, A., Pohanka, A., Asghar, M., Homann, M. V., Gustafsson, L. L., Hellgren, U., Färnert, A.** High Rate of Treatment Failures in Nonimmune Travelers Treated With Artemether-Lumefantrine for Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Sweden: Retrospective Comparative Analysis of Effectiveness and Case Series. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 64(2): 199–206 (2017)
- Soutar, M. P. M., Kim, W.-Y., Williamson, R., Pegg, M., Hastie, C. J., McLaughlan, H., Snider, W. D., Gordon-Weeks, P. R., Sutherland, C.** Evidence that glycogen synthase kinase-3 isoforms have distinct substrate preference in the brain. *Journal of neurochemistry* 115(4): 974–983 (2010)
- Spangenberg, T., Burrows, J. N., Kowalczyk, P., McDonald, S., Wells, T. N. C., Willis, P.** The open access malaria box: a drug discovery catalyst for neglected diseases. *PLoS one* 8(6): e62906 (2013)
- Speers, D. J., Ryan, S., Harnett, G., Chidlow, G.** Diagnosis of malaria aided by polymerase chain reaction in two cases with low-level parasitaemia. *Internal medicine journal* 33(12): 613–615 (2003)
- Spielmann, T., Gilberger, T.-W.** Protein export in malaria parasites: do multiple export motifs add up to multiple export pathways? *Trends in parasitology* 26(1): 6–10 (2010)
- Sridaran, S., McClintock, S. K., Syphard, L. M., Herman, K. M., Barnwell, J. W., Udhayakumar, V.** Anti-folate drug resistance in Africa: meta-analysis of reported dihydrofolate reductase (dhfr) and dihydropteroate synthase (dhps) mutant genotype frequencies in African *Plasmodium falciparum* parasite populations. *Malaria journal* 9: 247 (2010)
- Srinivasan, P., Beatty, W. L., Diouf, A., Herrera, R., Ambroggio, X., Moch, J. K., Tyler, J. S., Narum, D. L., Pierce, S. K., Boothroyd, J. C., Haynes, J. D., Miller, L. H.** Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(32): 13275–13280 (2011)
- Srinivasan, P., Yasgar, A., Luci, D. K., Beatty, W. L., Hu, X., Andersen, J., Narum, D. L., Moch, J. K., Sun, H., Haynes, J. D., Maloney, D. J., Jadhav, A., Simeonov, A., Miller, L. H.** Disrupting malaria parasite AMA1-RON2 interaction with a small molecule prevents erythrocyte invasion. *Nature communications* 4: 2261 (2013)
- Srivastava, I. K., Rottenberg, H., Vaidya, A. B.** Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *The Journal of biological chemistry* 272(7): 3961–3966 (1997)
- Stallmach, R., Kavishwar, M., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Collins, C. R., Howell, S. A., Yeoh, S., Knuepfer, E., Atid, A. J., Holder, A. A., Blackman, M. J.** *Plasmodium falciparum* SERA5 plays a non-enzymatic role in the malarial asexual blood-stage lifecycle. *Molecular microbiology* 96(2): 368–387 (2015)
- Stamos, J. L., Chu, M. L.-H., Enos, M. D., Shah, N., Weis, W. I.** Structural basis of GSK-3 inhibition by N-terminal phosphorylation and by the Wnt receptor LRP6. *eLife* 3: e01998 (2014)

- Stockholmer Konvention.** Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (2001)
- Storch, V.,** Welsch, U. Systematische Zoologie. *Spektrum Akademischer Verlag* 5. Auflage (1999)
- Straschil, U.,** Talman, A. M., Ferguson, D. J. P., Bunting, K. A., Xu, Z., Bailes, E., Sinden, R. E., Holder, A. A., Smith, E. F., Coates, J. C., Rita, T. The Armadillo repeat protein PF16 is essential for flagellar structure and function in Plasmodium male gametes. *PLoS one* 5(9): e12901 (2010)
- Strath, M.,** Scott-Finnigan, T., Gardner, M., Williamson, D., Wilson, I. Antimalarial activity of rifampicin in vitro and in rodent models. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 87(2): 211–216 (1993)
- Striepen, B.,** Jordan, C. N., Reiff, S., van Dooren, G. G. Building the perfect parasite: cell division in apicomplexa. *PLoS pathogens* 3(6): e78 (2007)
- Struck, N. S.,** Souza Dias, S. de, Langer, C., Marti, M., Pearce, J. A., Cowman, A. F., Gilberger, T. W. Re-defining the Golgi complex in Plasmodium falciparum using the novel Golgi marker PfGRASP. *Journal of cell science* 118(Pt 23): 5603–5613 (2005)
- Struik, S. S.,** Riley, E. M. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunological reviews* 201: 268–290 (2004)
- Stubbs, J.,** Simpson, K. M., Triglia, T., Plouffe, D., Tonkin, C. J., Duraisingh, M. T., Maier, A. G., Winzeler, E. A., Cowman, A. F. Molecular mechanism for switching of P. falciparum invasion pathways into human erythrocytes. *Science (New York, N.Y.)* 309(5739): 1384–1387 (2005)
- Studier, F.W.,** Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* 189(1): 113–130 (1986)
- Sturm, A.,** Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.-M., Menard, R., Heussler, V. T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science (New York, N.Y.)* 313(5791): 1287–1290 (2006)
- Sullivan, D. J.** Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *International journal for parasitology* 32(13): 1645–1653 (2002)
- Sullivan, D. J.** Quinolines block every step of malaria heme crystal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(29): 7483–7485 (2017)
- Sullivan, D. J.,** Gluzman, I. Y., Russell, D. G., Goldberg, D. E. On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(21): 11865–11870 (1996)
- Sultan, A. A.,** Thathy, V., Frevert, U., Robson, K. J., Crisanti, A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R. S., Ménard, R. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. *Cell* 90(3): 511–522 (1997)
- Summers, W. C.,** Fickel, T., Skare, J., Summers, W. P., Wagner, M. Use of restriction endonucleases to analyse the DNA of herpesviruses. *IARC scientific publications* (11 Pt 1): 139–143 (1975)
- Sun, C.,** Bernards, R. Feedback and redundancy in receptor tyrosine kinase signaling: relevance to cancer therapies. *Trends in biochemical sciences* 39(10): 465–474 (2014)
- Sun, H.,** Jiang, Y.-j., Yu, Q.-s., Luo, C.-c., Zou, J.-w. Effect of mutation K85R on GSK-3 β : Molecular dynamics simulation. *Biochemical and biophysical research communications* 377(3): 962–965 (2008)
- Suresh, N.,** Haldar, K. Mechanisms of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *Current opinion in pharmacology* 42: 46–54 (2018)
- Sutherland, C.** What Are the bona fide GSK3 Substrates? *International journal of Alzheimer's disease* 2011: 505607 (2011)
- Sutherland, C. J.,** Lansdell, P., Sanders, M., Muwanguzi, J., van Schalkwyk, D. A., Kaur, H., Nolder, D., Tucker, J., Bennett, H. M., Otto, T. D., Berriman, M., Patel, T. A., Lynn, R., Gkrania-Klotsas, E., Chiodini, P. L. pfk13-Independent Treatment Failure in Four Imported Cases of Plasmodium falciparum Malaria Treated with Artemether-Lumefantrine in the United Kingdom. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61(3) (2017)
- Suwal, S.,** Pflum, M. K. H. Phosphorylation-dependent kinase-substrate cross-linking. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 49(9): 1627–1630 (2010)
- Swinney, D. C.,** Anthony, J. How were new medicines discovered? *Nature reviews. Drug discovery* 10(7): 507–519 (2011)
- Tadesse, S.,** Caldon, E. C., Tilley, W., Wang, S. Cyclin-Dependent Kinase 2 Inhibitors in Cancer Therapy: An Update. *Journal of medicinal chemistry* 62(9): 4233–4251 (2019)
- Takahashi, I.,** Takahashi, K., Ichimura, M., Morimoto, M., Asano, K., Kawamoto, I., Tomita, F., Nakano, H. Duocarmycin A, a new antitumor antibiotic from Streptomyces. *The Journal of antibiotics* 41(12): 1915–1917 (1988)
- Taketo, A.** Properties of electroporation-mediated DNA transfer in Escherichia coli. *Journal of biochemistry* 105(5): 813–817 (1989)
- Takken, W.,** Lindsay, S. Increased Threat of Urban Malaria from Anopheles stephensi Mosquitoes, Africa. *Emerging infectious diseases* 25(7): 1431–1433 (2019)

- Talman, A. M., Lacroix, C., Marques, S. R., Blagborough, A. M., Carzaniga, R., Ménard, R., Sinden, R. E.** PbGEST mediates malaria transmission to both mosquito and vertebrate host. *Molecular microbiology* 82(2): 462–474 (2011)
- Tanabe, K., Mita, T., Palacpac, N. M. Q., Arisue, N., Tougan, T., Kawai, S., Jombart, T., Kobayashi, F., Horii, T.** Within-population genetic diversity of *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens reveals geographic distance from a Central sub-Saharan African origin. *Vaccine* 31(9): 1334–1339 (2013)
- Tanramluk, D., Schreyer, A., Pitt, W. R., Blundell, T. L.** On the origins of enzyme inhibitor selectivity and promiscuity: a case study of protein kinase binding to staurosporine. *Chemical biology & drug design* 74(1): 16–24 (2009)
- Tansley, R., Lotharius, J., Priestley, A., Bull, F., Duparc, S., Möhrle, J.** A randomized, double-blind, placebo-controlled study to investigate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of single enantiomer (+)-mefloquine compared with racemic mefloquine in healthy persons. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 83(6): 1195–1201 (2010)
- Tarun, A. S., Baer, K., Dumpit, R. F., Gray, S., Lejarcegui, N., Frevert, U., Kappe, S. H. I.** Quantitative isolation and in vivo imaging of malaria parasite liver stages. *International journal for parasitology* 36(12): 1283–1293 (2006)
- Tawk, L., Lacroix, C., Gueirard, P., Kent, R., Gorgette, O., Thiberge, S., Mercereau-Puijalon, O., Ménard, R., Barale, J.-C.** A key role for *Plasmodium* subtilisin-like SUB1 protease in egress of malaria parasites from host hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 288(46): 33336–33346 (2013)
- Taylor, C. J., McRobert, L., Baker, D. A.** Disruption of a *Plasmodium falciparum* cyclic nucleotide phosphodiesterase gene causes aberrant gametogenesis. *Molecular microbiology* 69(1): 110–118 (2008)
- Taylor, H. M., McRobert, L., Grainger, M., Sicard, A., Dluzewski, A. R., Hopp, C. S., Holder, A. A., Baker, D. A.** The malaria parasite cyclic GMP-dependent protein kinase plays a central role in blood-stage schizogony. *Eukaryotic cell* 9(1): 37–45 (2010)
- Taylor, T. E., Molyneux, M. E.** The pathogenesis of pediatric cerebral malaria: eye exams, autopsies, and neuroimaging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1342: 44–52 (2015)
- Taylor, H. M., Triglia, T., Thompson, J., Sajid, M., Fowler, R., Wickham, M. E., Cowman, A. F., Holder, A. A.** *Plasmodium falciparum* homologue of the genes for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii* adhesive proteins, which is transcribed but not translated. *Infection and immunity* 69(6): 3635–3645 (2001)
- Teklehaimanot, A., Mejjia, P.** Malaria and poverty. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1136: 32–37 (2008)
- Teo, A., Feng, G., Brown, G. V., Beeson, J. G., Rogerson, S. J.** Functional Antibodies and Protection against Blood-stage Malaria. *Trends in parasitology* 32(11): 887–898 (2016)
- ter Haar, E., Coll, J. T., Austen, D. A., Hsiao, H. M., Swenson, L., Jain, J.** Structure of GSK3 β reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nature structural biology* 8(7): 593–596 (2001)
- Tewari, R., Dorin, D., Moon, R., Doerig, C., Billker, O.** An atypical mitogen-activated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite. *Molecular microbiology* 58(5): 1253–1263 (2005)
- Tewari, R., Straschil, U., Bateman, A., Böhme, U., Cherevach, I., Gong, P., Pain, A., Billker, O.** The systematic functional analysis of *Plasmodium* protein kinases identifies essential regulators of mosquito transmission. *Cell host & microbe* 8(4): 377–387 (2010)
- Thaker, M. N., Wang, W., Spanogiannopoulos, P., Waglechner, N., King, A. M., Medina, R., Wright, G. D.** Identifying producers of antibacterial compounds by screening for antibiotic resistance. *Nature biotechnology* 31(10): 922–927 (2013)
- Tham, W.-H., Wilson, D. W., Lopaticki, S., Schmidt, C. Q., Tetteh-Quarcoo, P. B., Barlow, P. N., Richard, D., Corbin, J. E., Beeson, J. G., Cowman, A. F.** Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for *Plasmodium falciparum* PfRh4 invasion ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(40): 17327–17332 (2010)
- The RTS,S Clinical Trials Partnership.** 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 medicine* 11(7): e1001685 (2014)
- Thomas, D. C., Ahmed, A., Gilberger, T. W., Sharma, P.** Regulation of *Plasmodium falciparum* glideosome associated protein 45 (PfGAP45) phosphorylation. *PLoS one* 7(4): e35855 (2012)
- Thomas, G. M., Frame, S., Goedert, M., Nathke, I., Polakis, P., Cohen, P.** A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of Axin and β -catenin. *FEBS letters* 458(2): 247–251 (1999)
- Thompson, J. K., Triglia, T., Reed, M. B., Cowman, A. F.** A novel ligand from *Plasmodium falciparum* that binds to a sialic acid-containing receptor on the surface of human erythrocytes. *Molecular microbiology* 41(1): 47–58 (2001)
- Tietze, L. F., Krewer, B., Hof, J. M. von, Frauendorf, H., Schubert, I.** Determination of the biological activity and structure activity relationships of drugs based on the highly cytotoxic duocarmycins and CC-1065. *Toxins* 1(2): 134–150 (2009)
- Tjitra, E., Anstey, N. M., Sugiarto, P., Warikar, N., Kenangalem, E., Karyana, M., Lampah, D. A., Price, R. N.** Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS medicine* 5(6): e128 (2008)

- Toenhake, C. G., Fraschka, S. A.-K., Vijayabaskar, M. S., Westhead, D. R., van Heeringen, S. J., Bártfai, R.** Chromatin Accessibility-Based Characterization of the Gene Regulatory Network Underlying Plasmodium falciparum Blood-Stage Development. *Cell host & microbe* 23(4): 557-569.e9 (2018)
- Tolosa, E., Litvan, I., Höglinger, G. U., Burn, D., Lees, A., Andrés, M. V., Gómez-Carrillo, B., León, T., del Ser, T.** A phase 2 trial of the GSK-3 inhibitor tideglusib in progressive supranuclear palsy. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 29(4): 470-478 (2014)
- Tong, X.-M., Feng, L., Suthé, S. R., Weng, T.-H., Hu, C.-Y., Liu, Y.-Z., Wu, Z.-G., Wang, M.-H., Yao, H.-P.** Therapeutic efficacy of a novel humanized antibody-drug conjugate recognizing plexin-semaphorin-integrin domain in the RON receptor for targeted cancer therapy. *Journal for immunotherapy of cancer* 7(1): 250 (2019)
- Tonkin, M. L., Roques, M., Lamarque, M. H., Pugnière, M., Douguet, D., Crawford, J., Lebrun, M., Boulanger, M. J.** Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. *Science (New York, N.Y.)* 333(6041): 463-467 (2011)
- Trager, W., Jensen, J. B.** Human malaria parasites in continuous culture. 1976. *The Journal of parasitology* 91(3): 484-486 (2005)
- Trape, J. F.** The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 64(1-2 Suppl): 12-17 (2001)
- Trape, J. F., Rogier, C., Konate, L., Diagne, N., Bouganali, H., Canque, B., Legros, F., Badji, A., Ndiaye, G., Ndiaye, P.** The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 51(2): 123-137 (1994)
- Trecek, M., Sanders, J. L., Elias, J. E., Boothroyd, J. C.** The phosphoproteomes of Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries. *Cell host & microbe* 10(4): 410-419 (2011)
- Trecek, M., Zacherl, S., Herrmann, S., Cabrera, A., Kono, M., Struck, N. S., Engelberg, K., Haase, S., Frischknecht, F., Miura, K., Spielmann, T., Gilberger, T. W.** Functional analysis of the leading malaria vaccine candidate AMA-1 reveals an essential role for the cytoplasmic domain in the invasion process. *PLoS pathogens* 5(3): e1000322 (2009)
- Trenholme, C. M., Williams, R. L., Desjardins, R. E., Frischer, H., Carson, P. E., Rieckmann, K. H., Canfield, C. J.** Mefloquine (WR 142,490) in the treatment of human malaria. *Science (New York, N.Y.)* 190(4216): 792-794 (1975)
- Triglia, T., Cowman, A. F.** The mechanism of resistance to sulfa drugs in Plasmodium falciparum. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2(1): 15-19 (1999)
- Triglia, T., Duraisingh, M. T., Good, R. T., Cowman, A. F.** Reticulocyte-binding protein homologue 1 is required for sialic acid-dependent invasion into human erythrocytes by Plasmodium falciparum. *Molecular microbiology* 55(1): 162-174 (2005)
- Triglia, T., Healer, J., Caruana, S. R., Hodder, A. N., Anders, R. F., Crabb, B. S., Cowman, A. F.** Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by Plasmodium species. *Molecular microbiology* 38(4): 706-718 (2000)
- Triglia, T., Menting, J. G., Wilson, C., Cowman, A. F.** Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in Plasmodium falciparum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(25): 13944-13949 (1997)
- Triglia, T., Thompson, J. K., Cowman, A. F.** An EBA175 homologue which is transcribed but not translated in erythrocytic stages of Plasmodium falciparum. *Molecular and biochemical parasitology* 116(1): 55-63 (2001a)
- Triglia, T., Thompson, J., Caruana, S. R., Delorenzi, M., Speed, T., Cowman, A. F.** Identification of proteins from Plasmodium falciparum that are homologous to reticulocyte binding proteins in Plasmodium vivax. *Infection and immunity* 69(2): 1084-1092 (2001b)
- Trivedi, N., Marsh, P., Goold, R. G., Wood-Kaczmar, A., Gordon-Weeks, P. R.** Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation of MAP1B at Ser1260 and Thr1265 is spatially restricted to growing axons. *Journal of cell science* 118(Pt 5): 993-1005 (2005)
- Tse, E. G., Korsik, M., Todd, M. H.** The past, present and future of anti-malarial medicines. *Malaria journal* 18(1): 93 (2019)
- Tu, Y.** The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature medicine* 17(10): 1217-1220 (2011)
- Tu, Y. Y., Ni, M. Y., Zhong, Y. R., Li, L. N., Cui, S. L., Zhang, M. Q., Wang, X. Z., Liang, X. T.** Studies on the constituents of Artemisia annua L. (author's transl). *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 16(5): 366-370 (1981)
- Turenne, G. A., Price, B. D.** Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity. *BMC cell biology* 2: 12 (2001)
- Turner, L., Lavstsen, T., Berger, S. S., Wang, C. W., Petersen, J. E. V., Avril, M., Brazier, A. J., Freeth, J., Jespersen, J. S., Nielsen, M. A., Magistrado, P., Lusingu, J., Smith, J. D., Higgins, M. K., Theander, T. G.** Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature* 498(7455): 502-505 (2013)
- Tusting, L. S., Thwing, J., Sinclair, D., Fillinger, U., Gimnig, J., Bonner, K. E., Bottomley, C., Lindsay, S. W.** Mosquito larval source management for controlling malaria. *The Cochrane database of systematic reviews* (8): CD008923 (2013)
- Ubulom, P. M. E., Udobi, C. E., Madu, M. I.** Amodiaquine and Ciprofloxacin Combination in Plasmodiasis Therapy. *Journal of tropical medicine* 2015: 947390 (2015)

- Udagama, P. V., Atkinson, C. T., Peiris, J. S., David, P. H., Mendis, K. N., Aikawa, M.** Immunoelectron microscopy of Schüffner's dots in Plasmodium vivax-infected human erythrocytes. *The American Journal of Pathology* 131(1): 48–52 (1988)
- Udeinya, I. J., Schmidt, J. A., Aikawa, M., Miller, L. H., Green, I.** Falciparum malaria-infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells. *Science (New York, N.Y.)* 213(4507): 555–557 (1981)
- Ueda, M., Stefan, T., Stetson, L., Ignatz-Hoover, J. J., Tomlinson, B., Creger, R. J., Cooper, B., Lazarus, H. M., Lima, M. de, Wald, D. N., Caimi, P. F.** Phase I Trial of Lithium and Tretinoin for Treatment of Relapsed and Refractory Non-promyelocytic Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in oncology* 10: 327 (2020)
- Umlas, J., Fallon, J. N.** New thick-film technique for malaria diagnosis. Use of saponin stromatolytic solution for lysis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 20(4): 527–529 (1971)
- UniProt Consortium, T.** UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research* 46(5): 2699 (2018)
- Usui, M., Prajapati, S. K., Ayanful-Torgby, R., Acquah, F. K., Cudjoe, E., Kakane, C., Amponsah, J. A., Obboh, E. K., Reddy, D. K., Barbeau, M. C., Simons, L. M., Czesny, B., Raiciulescu, S., Olsen, C., Abuaku, B. K., Amoah, L. E., Williamson, K. C.** Plasmodium falciparum sexual differentiation in malaria patients is associated with host factors and GdV1-dependent genes. *Nature communications* 10(1): 2140 (2019)
- Vaid, A., Sharma, P.** PfPKB, a protein kinase B-like enzyme from Plasmodium falciparum: II. Identification of calcium/calmodulin as its upstream activator and dissection of a novel signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 281(37): 27126–27133 (2006)
- Vaid, A., Thomas, D. C., Sharma, P.** Role of Ca²⁺/calmodulin-PfPKB signaling pathway in erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. *The Journal of biological chemistry* 283(9): 5589–5597 (2008)
- van Hong, N., Amambua-Ngwa, A., Tuan, N. Q., Cuong, D. D., Giang, N. T. H., van Dung, N., Tinh, T. T., van Tien, N., Phuc, B. Q., Duong, T. T., Rosanas-Urgell, A., van Geertruyden, J.-P., D'Alessandro, U., Erhart, A.** Severe Malaria Not Responsive to Artemisinin Derivatives in Man Returning from Angola to Vietnam. *Emerging infectious diseases* 21(7): 1265 (2015)
- van Voorhis, W. C., Adams, J. H., Adelfio, R., Ah Yong, V., Akabas, M. H., Alano, P., Alday, A., Alemán Resto, Y., Alsibae, A., Alzualde, A., Andrews, K. T., Avery, S. V., Avery, V. M., Ayong, L., Baker, M., Baker, S., Ben Mamoun, C., Bhatia, S., Bickle, Q., Bounaadja, L., Bowling, T., Bosch, J., Boucher, L. E., Boyom, F. F., Brea, J., Brennan, M., Burton, A., Caffrey, C. R., Camarda, G., Carrasquilla, M., Carter, D., Belen Cassera, M., Chih-Chien Cheng, K., Chindaoudomsate, W., Chubb, A., Colon, B. L., Colón-López, D. D., Corbett, Y., Crowther, G. J., Cowan, N., D'Alessandro, S., Le Dang, N., Delves, M., DeRisi, J. L., Du, A. Y., Duffy, S., Abd El-Salam El-Sayed, S., Ferdig, M. T., Fernández Robledo, J. A., Fidock, D. A., Florent, I., Fokou, P. V. T., Galstian, A., Gambo, F. J., Gokool, S., Gold, B., Golub, T., Goldgof, G. M., Guha, R., Guiguemde, W. A., Gural, N., Guy, R. K., Hansen, M. A. E., Hanson, K. K., Hemphill, A., van Hooft Huijsduijnen, R., Horii, T., Horrocks, P., Hughes, T. B., Huston, C., Igarashi, I., Ingram-Sieber, K., Itoe, M. A., Jadhav, A., Naranuntarat Jensen, A., Jensen, L. T., Jiang, R. H. Y., Kaiser, A., Keiser, J., Ketas, T., Kicka, S., Kim, S., Kirk, K., Kumar, V. P., Kyle, D. E., Lafuente, M. J., Landfear, S., Lee, N., Lee, S., Lehane, A. M., Li, F., Little, D., Liu, L., Llinás, M., Loza, M. I., Lubar, A., Lucantoni, L., Lucet, I., Maes, L., Mancama, D., Mansour, N. R., March, S., McGowan, S., Medina Vera, I., Meister, S., Mercer, L., Mestres, J., Mfopa, A. N., Misra, R. N., Moon, S., Moore, J. P., Morais Rodrigues da Costa, F., Müller, J., Muriana, A., Nakazawa Hewitt, S., Nare, B., Nathan, C., Narraido, N., Nawaratna, S., Ojo, K. K., Ortiz, D., Panic, G., Papadatos, G., Parapini, S., Patra, K., Pham, N., Prats, S., Plouffe, D. M., Poulsen, S.-A., Pradhan, A., Quevedo, C., Quinn, R. J., Rice, C. A., Abdo Rizk, M., Ruecker, A., St Onge, R., Salgado Ferreira, R., Samra, J., Robinett, N. G., Schlecht, U., Schmitt, M., Silva Villela, F., Silvestrini, F., Sinden, R., Smith, D. A., Soldati, T., Spitzmüller, A., Stamm, S. M., Sullivan, D. J., Sullivan, W., Suresh, S., Suzuki, B. M., Suzuki, Y., Swamidass, S. J., Taramelli, D., Tchokouaha, L. R. Y., Theron, A., Thomas, D., Tonissen, K. F., Townson, S., Tripathi, A. K., Trofimov, V., Udenze, K. O., Ullah, I., Vallieres, C., Vigil, E., Vinetz, J. M., Voong Vinh, P., Vu, H., Watanabe, N.-A., Weatherby, K., White, P. M., Wilks, A. F., Winzeler, E. A., Wojcik, E., Wree, M., Wu, W., Yokoyama, N., Zollo, P. H. A., Abla, N., Blasco, B., Burrows, J., Laleu, B., Leroy, D., Spangenberg, T., Wells, T., Willis, P. A.** Open Source Drug Discovery with the Malaria Box Compound Collection for Neglected Diseases and Beyond. *PLoS pathogens* 12(7): e1005763 (2016)
- van Voorhis, W. C., Doggett, J. S., Parsons, M., Hulverson, M. A., Choi, R., Arnold, S. L. M., Riggs, M. W., Hemphill, A., Howe, D. K., Mealey, R. H., Lau, A. O. T., Merritt, E. A., Maly, D. J., Fan, E., Ojo, K. K.** Extended-spectrum antiprotozoal bumped kinase inhibitors: A review. *Experimental parasitology* 180: 71–83 (2017)
- Vanaerschot, M., Murithi, J. M., Pasaje, C. F. A., Ghidelli-Disse, S., Dwomoh, L., Bird, M., Spottiswoode, N., Mittal, N., Arendse, L. B., Owen, E. S., Wicht, K. J., Siciliano, G., Bösche, M., Yeo, T., Kumar, T. R. S., Mok, S., Carpenter, E. F., Giddins, M. J., Sanz, O., Ottilie, S., Alano, P., Chibale, K., Llinás, M., Uhlemann, A.-C., Delves, M., Tobin, A. B., Doerig, C., Winzeler, E. A., Lee, M. C. S., Niles, J. C., Fidock, D. A.** Inhibition of Resistance-Refractory P. falciparum Kinase PKG Delivers Prophylactic, Blood Stage, and Transmission-Blocking Antiplasmodial Activity. *Cell chemical biology* (2020)
- VanBuskirk, K. M., O'Neill, M. T., La Vega, P. de, Maier, A. G., Krzych, U., Williams, J., Dowler, M. G., Sacchi, J. B., Kangwanrangsan, N., Tsuboi, T., Kneteman, N. M., Heppner, D. G., Murdock, B. A., Mikolajczak, S. A., Aly, A. S. I., Cowman, A. F., Kappe, S. H. I.** Preerythrocytic, live-attenuated Plasmodium falciparum vaccine candidates by design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(31): 13004–13009 (2009)
- Vetter, V., Denizer, G., Friedland, L. R., Krishnan, J., Shapiro, M.** Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Annals of medicine* 50(2): 110–120 (2018)
- Vincensini, L., Richert, S., Blisnick, T., van Dorselaer, A., Leize-Wagner, E., Rabilloud, T., Braun Breton, C.** Proteomic analysis identifies novel proteins of the Maurer's clefts, a secretory compartment delivering Plasmodium falciparum proteins to the surface of its host cell. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 4(4): 582–593 (2005)

- Volz, J. C., Yap, A., Sisquella, X., Thompson, J. K., Lim, N. T. Y., Whitehead, L. W., Chen, L., Lampe, M., Tham, W.-H., Wilson, D., Nebel, T., Marapana, D., Triglia, T., Wong, W., Rogers, K. L., Cowman, A. F.** Essential Role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA Complex during Plasmodium falciparum Invasion of Erythrocytes. *Cell host & microbe* 20(1): 60–71 (2016)
- Wadhwa, P., Jain, P., Jadhav, H. R.** Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3): Its Role and Inhibitors. *Current topics in medicinal chemistry* (2020)
- Wagman, A. S., Johnson, K. W., Bussiere, D. E.** Discovery and development of GSK3 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Current pharmaceutical design* 10(10): 1105–1137 (2004)
- Wagner, S., Klepsch, M. M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Högbom, M., van Wijk, K. J., Slotboom, D. J., Persson, J. O., Gier, J.-W. de.** Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(38): 14371–14376 (2008)
- Wahlgren, M., Carlson, J., Udomsangpetch, R., Perlmann, P.** Why do Plasmodium falciparum-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes? *Parasitology today (Personal ed.)* 5(6): 183–185 (1989)
- Wahlgren, M., Goel, S., Akhouri, R. R.** Variant surface antigens of Plasmodium falciparum and their roles in severe malaria. *Nature reviews. Microbiology* 15(8): 479–491 (2017)
- Waksman, S. A.** The Role of Antibiotics in Nature. *Perspectives in Biology and Medicine* 4(3): 271–287 (1961)
- Walliker, D., Quakyi, I. A., Wellem, T. E., McCutchan, T. F., Szarfman, A., London, W. T., Corcoran, L. M., Burkot, T. R., Carter, R.** Genetic analysis of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Science (New York, N.Y.)* 236(4809): 1661–1666 (1987)
- Wang, Q., Fujioka, H., Nussenzweig, V.** Exit of Plasmodium sporozoites from oocysts is an active process that involves the circumsporozoite protein. *PLoS pathogens* 1(1): e9 (2005)
- Wang, Z., Harkins, P. C., Ulevitch, R. J., Han, J., Cobb, M. H., Goldsmith, E. J.** The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(6): 2327–2332 (1997)
- Wang, X., Paulin, F. E., Campbell, L. E., Gomez, E., O'Brien, K., Morrice, N., Proud, C. G.** Eukaryotic initiation factor 2B: identification of multiple phosphorylation sites in the epsilon-subunit and their functions in vivo. *The EMBO journal* 20(16): 4349–4359 (2001)
- Wang, P., Read, M., Sims, P. F., Hyde, J. E.** Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite Plasmodium falciparum is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Molecular microbiology* 23(5): 979–986 (1997)
- Wang, J., Zhang, C.-J., Chia, W. N., Loh, C. C. Y., Li, Z., Lee, Y. M., He, Y., Yuan, L.-X., Lim, T. K., Liu, M., Liew, C. X., Lee, Y. Q., Zhang, J., Lu, N., Lim, C. T., Hua, Z.-C., Liu, B., Shen, H.-M., Tan, K. S. W., Lin, Q.** Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in Plasmodium falciparum. *Nature communications* 6: 10111 (2015)
- Ward, P., Equinet, L., Packer, J., Doerig, C.** Protein kinases of the human malaria parasite Plasmodium falciparum: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC genomics* 5: 79 (2004)
- Ward, G. E., Fujioka, H., Aikawa, M., Miller, L. H.** Staurosporine inhibits invasion of erythrocytes by malarial merozoites. *Experimental parasitology* 79(3): 480–487 (1994)
- Warhurst, D. C., Williams, J. E.** ACP Broadsheet no 148. July 1996. Laboratory diagnosis of malaria. *Journal of clinical pathology* 49(7): 533–538 (1996)
- Gilles, H. M., Warrell, D. A.** Essential Malariology. *Hodder Arnold* (2002)
- Wataya, Y., Kubochi, F., Mizukoshi, C., Ohya, Y., Watanabe, K., Arai, M., Ishii, A., Nakagami, S., Yamane, A.** DNA diagnosis of falciparum malaria. *Nucleic acids symposium series*(25): 155–156 (1991)
- Waters, A. P.** The ribosomal RNA genes of Plasmodium. *Advances in parasitology* 34: 33–79 (1994)
- Weber, J. L.** Analysis of sequences from the extremely A + T-rich genome of Plasmodium falciparum. *Gene* 52(1): 103–109 (1987)
- Weber, K., Osborn, M.** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of biological chemistry* 244(16): 4406–4412 (1969)
- Weissig, V., Vetro-Widenhouse, T. S., Rowe, T. C.** Topoisomerase II inhibitors induce cleavage of nuclear and 35-kb plastid DNAs in the malarial parasite Plasmodium falciparum. *DNA and cell biology* 16(12): 1483–1492 (1997)
- Wells, T. N. C., van Hooft Huijsduijnen, R., van Voorhis, W. C.** Malaria medicines: a glass half full? *Nature reviews. Drug discovery* 14(6): 424–442 (2015)
- Welsh, G. I., Miller, C. M., Loughlin, A. J., Price, N. T., Proud, C. G.** Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS letters* 421(2): 125–130 (1998)

- Wentzinger, L., Bopp, S., Tenor, H., Klar, J., Brun, R., Beck, H. P., Seebeck, T.** Cyclic nucleotide-specific phosphodiesterases of *Plasmodium falciparum*: PfPDEalpha, a non-essential cGMP-specific PDE that is an integral membrane protein. *International journal for parasitology* 38(14): 1625–1637 (2008)
- Wernimont, A.K., Fedorov, O., Lam, A., Ali, A., Zhao, Y., Lew, J., Wasney, G., Vedadi, M., Kozieradzki, I., Schapira, M., Bochkarev, A., Wilstrom, M., Bountra, C., Arrowsmith, C.H., Edwards, A.M., Hui, R., Lin, Y.H.** Crystal Structure of cgd4_240 from *Cryptosporidium Parvum* in complex with indirubin E804. Structural Genomics Consortium (2008)
- West, P. A., Protopopoff, N., Wright, A., Kivaju, Z., Tigererwa, R., Mosha, F. W., Kisinza, W., Rowland, M., Kleinschmidt, I.** Indoor residual spraying in combination with insecticide-treated nets compared to insecticide-treated nets alone for protection against malaria: a cluster randomised trial in Tanzania. *PLoS medicine* 11(4): e1001630 (2014)
- West, P. A., Protopopoff, N., Wright, A., Kivaju, Z., Tigererwa, R., Mosha, F. W., Kisinza, W., Rowland, M., Kleinschmidt, I.** Enhanced protection against malaria by indoor residual spraying in addition to insecticide treated nets: is it dependent on transmission intensity or net usage? *PLoS one* 10(3): e0115661 (2015)
- White, N. J.** *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46(2): 172–173 (2008)
- White, N. J.** Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science (New York, N.Y.)* 320(5874): 330–334 (2008)
- White, N. J., & Cook, G. C.** Manson's tropical diseases. *Malaria*: 1124–1130 (1996)
- White, N. J., Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. A., Dondorp, A. M.** Malaria. *Lancet (London, England)* 383(9918): 723–735 (2014)
- Wilde, M.-L., Triglia, T., Marapana, D., Thompson, J. K., Kouzmitchev, A. A., Bullen, H. E., Gilson, P. R., Cowman, A. F., Tonkin, C. J.** Protein Kinase A Is Essential for Invasion of *Plasmodium falciparum* into Human Erythrocytes. *mBio* 10(5) (2019)
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W.** Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89 (1990)
- William, T., Menon, J., Rajahram, G., Chan, L., Ma, G., Donaldson, S., Khoo, S., Frederick, C., Jelip, J., Anstey, N. M., Yeo, T. W.** Severe *Plasmodium knowlesi* malaria in a tertiary care hospital, Sabah, Malaysia. *Emerging infectious diseases* 17(7): 1248–1255 (2011)
- Wilson, W. D., Tanius, F. A., Barton, H. J., Jones, R. L., Fox, K., Wydra, R. L., Strekowski, L.** DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry* 29(36): 8452–8461 (1990)
- Wirth, C. C., Bennink, S., Scheuermayer, M., Fischer, R., Pradel, G.** Perforin-like protein PPLP4 is crucial for mosquito midgut infection by *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology* 201(2): 90–99 (2015)
- Wirth, C. C., Glushakova, S., Scheuermayer, M., Repnik, U., Garg, S., Schaack, D., Kachman, M. M., Weißbach, T., Zimmerberg, J., Dandekar, T., Griffiths, G., Chitnis, C. E., Singh, S., Fischer, R., Pradel, G.** Perforin-like protein PPLP2 permeabilizes the red blood cell membrane during egress of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Cellular microbiology* 16(5): 709–733 (2014)
- Wiviott, S. D., Braunwald, E., McCabe, C. H., Montalescot, G., Ruzyllo, W., Gottlieb, S., Neumann, F.-J., Ardissino, D., Servi, S. de, Murphy, S. A., Riesmeyer, J., Weerakkody, G., Gibson, C. M., Antman, E. M.** Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine* 357(20): 2001–2015 (2007)
- Wolff, M. S., Zeleniuch-Jacquotte, A., Dubin, N., Toniolo, P.** Risk of breast cancer and organochlorine exposure. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 9(3): 271–277 (2000)
- Wong, W., Huang, R., Menant, S., Hong, C., Sandow, J. J., Birkinshaw, R. W., Healer, J., Hodder, A. N., Kanjee, U., Tonkin, C. J., Heckmann, D., Soroka, V., Sogaard, T. M. M., Jørgensen, T., Duraisingh, M. T., Czabotar, P. E., Jongh, W. A. de, Tham, W.-H., Webb, A. I., Yu, Z., Cowman, A. F.** Structure of *Plasmodium falciparum* Rh5-CyRPA-Ripr invasion complex. *Nature* 565(7737): 118–121 (2019)
- Woodgett, J. R.** Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *The EMBO journal* 9(8): 2431–2438 (1990)
- Woodgett, J. R.** cDNA cloning and properties of glycogen synthase kinase-3. *Methods in enzymology* 200: 564–577 (1991)
- Woodgett, J. R., Cohen, P.** Multisite phosphorylation of glycogen synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 788(3): 339–347 (1984)
- Wood-Kaczmar, A., Kraus, M., Ishiguro, K., Philpott, K. L., Gordon-Weeks, P. R.** An alternatively spliced form of glycogen synthase kinase-3beta is targeted to growing neurites and growth cones. *Molecular and cellular neurosciences* 42(3): 184–194 (2009)
- Woods, Y. L., Cohen, P., Becker, W., Jakes, R., Goedert, M., Wang, X., Proud, C. G.** The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *The Biochemical journal* 355(Pt 3): 609–615 (2001)
- Woodward, R. B., Doering, W. E.** The Total Synthesis of Quinine. *Journal of the American Chemical Society* 67(5): 860–874 (1945)

- World Health Organisation.** Seasonal malaria chemoprevention with sulfadoxine-pyrimethamine plus amodiaquine in children: a field guide. (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85726/9789241504737_eng.pdf?sequence=1, accessed 15 October 2018) (2013)
- World Health Organisation.** Intermittent preventive treatment in infants (updated 1 May 2017) [website]. (https://www.who.int/malaria/areas/preventive_therapies/infants/en/, accessed 15 October 2018) (2017)
- World Health Organisation.** Intermittent preventive treatment in pregnancy (IPTp) (updated 21 June 2018) [website]. (https://www.who.int/malaria/areas/preventive_therapies/pregnancy/en/, accessed 15 October 2018). (2018)
- World Health Organisation.** Malaria Rapid Diagnostic Test Performance. Summary results of WHO product testing of malaria RDTs: round 1-8 (2008–2018) (2018)
- World Health Organisation.** Guidelines for malaria vector control (2019a) kann nicht dargestellt werden. Die Vorlage "Literaturverzeichnis - Buch (Monographie) - (Standardvorlage)" enthält keine Informationen.]
- World Health Organisation.** World Malaria Report 2019 (2019b)
- Wojnarowski, J. M., Napier, C., Trevino, A. V., Arnett, B.** Region-specific DNA damage by AT-specific DNA-reactive drugs is predicted by drug binding specificity. *Biochemistry* 39(32): 9917–9927 (2000)
- Wright, G. D.** Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends in microbiology* 24(11): 862–871 (2016)
- Wu, S., Jian, X.-H., Yuan, H., Jin, W.-B., Yin, Y., Wang, L.-Y., Zhao, J., Tang, G.-L.** Unified Biosynthetic Origin of the Benzodipyrrole Subunits in CC-1065. *ACS chemical biology* 12(6): 1603–1610 (2017)
- Wu, P., Nielsen, T. E., Clausen, M. H.** FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in pharmacological sciences* 36(7): 422–439 (2015)
- Wurtz, N., Fall, B., Bui, K., Pascual, A., Fall, M., Camara, C., Diatta, B., Fall, K. B., Mbaye, P. S., Diémé, Y., Bercion, R., Wade, B., Briolant, S., Pradines, B.** Pfhpr2 and pfhrp3 polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal: impact on rapid malaria diagnostic tests. *Malaria journal* 12: 34 (2013)
- Xiao, K.-J., Zuo, W.-Q., Xu, Y., Tao, X., Yu, L.-T., Wang, N.-Y.** Discovery and Structure-Resistance Relationship Study of New Thieno2,3-b Pyridine HCV NS4B Inhibitors. *Die Pharmazie* 74(6): 321–325 (2019)
- Xie, S. C., Dogovski, C., Hanssen, E., Chiu, F., Yang, T., Crespo, M. P., Stafford, C., Batinovic, S., Teguh, S., Charman, S., Klonis, N., Tilley, L.** Haemoglobin degradation underpins the sensitivity of early ring stage *Plasmodium falciparum* to artemisinins. *Journal of cell science* 129(2): 406–416 (2016)
- Xie, S. C., Gillett, D. L., Spillman, N. J., Tsu, C., Luth, M. R., Otilie, S., Duffy, S., Gould, A. E., Hales, P., Seager, B. A., Charron, C. L., Bruzzese, F., Yang, X., Zhao, X., Huang, S.-C., Hutton, C. A., Burrows, J. N., Winzeler, E. A., Avery, V. M., Dick, L. R., Tilley, L.** Target Validation and Identification of Novel Boronate Inhibitors of the *Plasmodium falciparum* Proteasome. *Journal of medicinal chemistry* 61(22): 10053–10066 (2018)
- Xingi, E., Smirlis, D., Myrianthopoulos, V., Magiatis, P., Grant, K. M., Meijer, L., Mikros, E., Skaltsounis, A.-L., Soteriadou, K.** 6-Br-5-methylindirubin-3'-oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis. *International journal for parasitology* 39(12): 1289–1303 (2009)
- Xu, W., Harrison, S. C., Eck, M. J.** Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385(6617): 595–602 (1997)
- Xu, T., Johnson, C. A., Gestwicki, J. E., Kumar, A.** Conditionally controlling nuclear trafficking in yeast by chemical-induced protein dimerization. *Nature protocols* 5(11): 1831–1843 (2010)
- Yadav, D. K., Kumar, S., Teli, M. K., Yadav, R., Chaudhary, S.** Molecular Targets for Malarial Chemotherapy: A Review. *Current topics in medicinal chemistry* 19(10): 861–873 (2019)
- Yahata, K., Treeck, M., Culleton, R., Gilberger, T.-W., Kaneko, O.** Time-lapse imaging of red blood cell invasion by the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *PloS one* 7(12): e50780 (2012)
- Yamamoto, H., Kishida, S., Kishida, M., Ikeda, S., Takada, S., Kikuchi, A.** Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability. *The Journal of biological chemistry* 274(16): 10681–10684 (1999)
- Yamamoto, K., Sugiyama, H., Kawanishi, S.** Concerted DNA recognition and novel site-specific alkylation by duocarmycin A with distamycin A. *Biochemistry* 32(4): 1059–1066 (1993)
- Yang, A. S. P., Lopaticki, S., O'Neill, M. T., Erickson, S. M., Douglas, D. N., Kneteman, N. M., Boddey, J. A.** AMA1 and MAEBL are important for *Plasmodium falciparum* sporozoite infection of the liver. *Cellular microbiology* 19(9) (2017a)
- Yang, A. S. P., O'Neill, M. T., Jennison, C., Lopaticki, S., Allison, C. C., Armistead, J. S., Erickson, S. M., Rogers, K. L., Ellisdon, A. M., Whisstock, J. C., Tweedell, R. E., Dinglasan, R. R., Douglas, D. N., Kneteman, N. M., Boddey, J. A.** Cell Traversal Activity Is Important for *Plasmodium falciparum* Liver Infection in Humanized Mice. *Cell reports* 18(13): 3105–3116 (2017b)
- Yang, S. D., Song, J. S., Yu, J. S., Shiah, S. G.** Protein kinase FA/GSK-3 phosphorylates tau on Ser235-Pro and Ser404-Pro that are abnormally phosphorylated in Alzheimer's disease brain. *Journal of neurochemistry* 61(5): 1742–1747 (1993)

- Yanow, S. K., Purcell, L. A., Spithill, T. W.** The A/T-specific DNA alkylating agent adozelesin inhibits *Plasmodium falciparum* growth in vitro and protects mice against *Plasmodium chabaudi* adami infection. *Molecular and biochemical parasitology* 148(1): 52–59 (2006)
- Yanow, S. K., Purcell, L. A., Lee, M., Spithill, T. W.** Genomics-based drug design targets the AT-rich malaria parasite: implications for antiparasite chemotherapy. *Pharmacogenomics* 8(9): 1267–1272 (2007)
- Yasuzawa, T., Iida, T., Muroi, K., Ichimura, M., Takahashi, K., Sano, H.** Structures of duocarmycins, novel antitumor antibiotics produced by *Streptomyces* sp. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 36(9): 3728–3731 (1988)
- Yeoh, S., O'Donnell, R. A., Koussis, K., Dluzewski, A. R., Ansell, K. H., Osborne, S. A., Hackett, F., Withers-Martinez, C., Mitchell, G. H., Bannister, L. H., Bryans, J. S., Kettleborough, C. A., Blackman, M. J.** Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes. *Cell* 131(6): 1072–1083 (2007)
- Young, J. A., Fivelman, Q. L., Blair, P. L., La Vega, P. de, Le Roch, K. G., Zhou, Y., Carucci, D. J., Baker, D. A., Winzeler, E. A.** The *Plasmodium falciparum* sexual development transcriptome: a microarray analysis using ontology-based pattern identification. *Molecular and biochemical parasitology* 143(1): 67–79 (2005)
- Younis, Y., Douelle, F., Feng, T.-S., González Cabrera, D., Le Manach, C., Nchinda, A. T., Duffy, S., White, K. L., Shackleford, D. M., Morizzi, J., Mannila, J., Katneni, K., Bhamidipati, R., Zabiulla, K. M., Joseph, J. T., Bashyam, S., Waterson, D., Witty, M. J., Hardick, D., Wittlin, S., Avery, V., Charman, S. A., Chibale, K.** 3,5-Diaryl-2-aminopyridines as a novel class of orally active antimalarials demonstrating single dose cure in mice and clinical candidate potential. *Journal of medicinal chemistry* 55(7): 3479–3487 (2012)
- Yuan, H., Zhang, J., Cai, Y., Wu, S., Yang, K., Chan, H. C. S., Huang, W., Jin, W.-B., Li, Y., Yin, Y., Igarashi, Y., Yuan, S., Zhou, J., Tang, G.-L.** Gyrl-like proteins catalyze cyclopropanoid hydrolysis to confer cellular protection. *Nature communications* 8(1): 1485 (2017)
- Yuasa, K., Mi-ichi, F., Kobayashi, T., Yamanouchi, M., Kotera, J., Kita, K., Omori, K.** PfPDE1, a novel cGMP-specific phosphodiesterase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The Biochemical journal* 392(Pt 1): 221–229 (2005)
- Zafar, A., Pilkington, L. I., Haverkate, N. A., van Rensburg, M., Leung, E., Kumara, S., Denny, W. A., Barker, D., Alsuraifi, A., Hoskins, C., Reynisson, J.** Investigation into Improving the Aqueous Solubility of the Thieno2,3-bpyridine Anti-Proliferative Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)* 23(1) (2018)
- Zaugg, L. K., Banu, A., Walther, A. R., Chandrasekaran, D., Babb, R. C., Salzlechner, C., Hedegaard, M. A. B., Gentleman, E., Sharpe, P. T.** Translation Approach for Dentine Regeneration Using GSK-3 Antagonists. *Journal of dental research* 99(5): 544–551 (2020)
- Zhang, X. S., Choi, J. H.** Molecular evolution of calmodulin-like domain protein kinases (CDPKs) in plants and protists. *Journal of molecular evolution* 53(3): 214–224 (2001)
- Zhang, Y., Huang, N.-Q., Yan, F., Jin, H., Zhou, S.-Y., Shi, J.-S., Jin, F.** Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: GSK-3 β as a potential link. *Behavioural brain research* 339: 57–65 (2018a)
- Zhang, J., Krugliak, M., Ginsburg, H.** The fate of ferriprotophyrin IX in malaria infected erythrocytes in conjunction with the mode of action of antimalarial drugs. *Molecular and biochemical parasitology* 99(1): 129–141 (1999)
- Zhang, C., Li, Z., Cui, H., Jiang, Y., Yang, Z., Wang, X., Gao, H., Liu, C., Zhang, S., Su, X.-z., Yuan, J.** Systematic CRISPR-Cas9-Mediated Modifications of *Plasmodium yoelii* ApiAP2 Genes Reveal Functional Insights into Parasite Development. *mBio* 8(6) (2017)
- Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M. H., Goldsmith, E. J.** Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* 367(6465): 704–711 (1994)
- Zhang, M., Wang, C., Otto, T. D., Oberstaller, J., Liao, X., Adapa, S. R., Udenze, K., Bronner, I. F., Casandra, D., Mayho, M., Brown, J., Li, S., Swanson, J., Rayner, J. C., Jiang, R. H. Y., Adams, J. H.** Uncovering the essential genes of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by saturation mutagenesis. *Science (New York, N.Y.)* 360(6388) (2018b)
- Zhang, S., Zhu, J., Zechel, D. L., Jessen-Trefzer, C., Eastman, R. T., Paululat, T., Bechthold, A.** New WS9326A Derivatives and One New Annimycin Derivative with Antimalarial Activity are Produced by *Streptomyces asterosporus* DSM 41452 and Its Mutant. *Chembiochem: a European journal of chemical biology* 19(3): 272–279 (2018c)
- Zhu, H.-m., Li, J., Zheng, H.** Human natural infection of *Plasmodium knowlesi*. *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi = Chinese journal of parasitology & parasitic diseases* 24(1): 70–71 (2006)
- Ziemann, H.** Über eigenartige Malariaparasitenformen. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, Abt. Originale* 76(5): 384–391 (1915)

Publikationen

Bormann, J., Heinze, C., Blum, C., Mentges, M., Brockmann, A., **Alder, A.**, Landt, S. K., Josephson, B., Indenbirken, D., Spohn, M., Plitzko, B., Loesgen, S., Freitag, M., & Schäfer, W. Expression of a Structural Protein of the Mycovirus FgV-ch9 Negatively Affects the Transcript Level of a Novel Symptom Alleviation Factor and Causes Virus Infection-Like Symptoms in *Fusarium graminearum*. *Journal of virology*, 92(17): e00326-18 (2018)

Masch, A., Nasereddin, A., **Alder, A.**, Bird, M. J., Schweda, S. I., Preu, L., Doerig, C., Dzikowski, R., Gilberger, T. W., Kunick, C. Structure-activity relationships in a series of antiplasmodial thieno2,3-bpyridines. *Malaria journal* 18(1): 89 (2019)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt der Jürgen Manchot Stiftung für die Finanzierung dieses Projekts.

Prof. Dr. Tim Gilberger danke ich für die Unterstützung während des gesamten Projekts, für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe an diesem Thema arbeiten zu können und die stets kompetente Betreuung.

Dr. Tobias Spielmann danke ich ebenfalls für die kompetente Betreuung, die Übernahme des Zweitgutachtens und die tolle Zusammenarbeit mit seiner Arbeitsgruppe.

Ganz besonders möchte ich mich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Gilberger, der Arbeitsgruppe Spielmann sowie der AG Filarsky für die Zusammenarbeit und tolle Arbeitsatmosphäre am BNITM und CSSB bedanken. Ein besonderer Dank gilt hier auch Dr. Louisa Wilcke für das Anlernen im Labor und den Einstieg in die Welt der Malaria Erreger. Vielen Dank auch an Bärbel Bergmann dafür, dass Du mich auf die Bewerbung bei der Manchot Stiftung gebracht hast.

Prof Dr. Conrad Kunick und Sandra Schweda von der Technischen Universität Braunschweig danke ich für die großartige Kooperation während dieses Projekts und die kompetente Unterstützung bei chemischen Fragen. Conrad Kunick danke ich zudem für die Unterstützung bei der Stipendiums-Bewerbung.

Dr. Christian Löw und Samuel Pažický vom EMBL und CSSB in Hamburg danke ich für die Bereitstellung rekombinanter PfgSK3 und die gute Kooperation während des gesamten Projekts. Christian Löw danke ich zudem für die Unterstützung bei der Stipendiums-Bewerbung.

Prof. Dr. Gerry Wright und Mitarbeitern von der McMaster University in Kanada danke ich für die Zusammenarbeit beim 4114 Projekt.

Dr. Sophia Reindl vom BNITM danke ich für die sehr hilfreiche Beratung zur Aufreinigung rekombinanter Proteine.

Vielen Dank auch an Dr. Oliver Vesper der Arbeitsgruppe Marlovits am CSSB Hamburg dafür, dass meine HEK-Zellen bei euch im Labor wohnen durften.

Dr. Cornelia Heinze vom Biozentrum Klein Flottbek in Hamburg danke ich für die Unterstützung bei der Stipendiums-Bewerbung sowie die Möglichkeit erste Messungen des Kinase Assays in ihrem Labor durchführen zu können.

Schließlich gilt der größte Dank natürlich meiner Familie und meinen (sternförmig zusammengehenden ☺) Freunden, die mir während der gesamten Zeit immer zur Seite gestanden haben! Ganz besonders möchte ich mich, in Gedenken an meinen Vater, bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium und damit auch diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben!