

**Charakterisierung des Inneren
Membrankomplexes im Malariaerreger
Plasmodium falciparum (Welch, 1897)**

Dissertation

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

vorgelegt von

Dorothee Heincke

Hamburg, 2020

Dissertationsgutachter:

Prof. Dr. Tim-Wolf Gilberger

Dr. Tobias Spielmann

Tag der Disputation:

02.10.2020

Eidesstattliche Versicherung

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

Hamburg, den 5.6.2020

Dorothee Heincke

Zusammenfassung

Malaria stellt für viele Länder der Welt eine ernste Gesundheitsbedrohung dar. Diese Infektionskrankheit wird durch einzellige Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursacht, die von *Anopheles*-Mücken auf den Menschen übertragen werden. Als direkte Folge der Infektion mit dem tödlichsten Malariaerreger *Plasmodium falciparum* sterben jährlich 435000 Menschen, insbesondere Kinder unter fünf Jahren. Bis heute steht kein effektiver Impfstoff zur Verfügung und weltweit treten Resistenzen gegen alle geläufigen Substanzen zur Malariabekämpfung auf.

Alle Symptome der Malariaerkrankung resultieren aus der exponentiellen, asexuellen Vermehrung des Parasiten im Blut. Unter anderem während dieser Blutphase der Infektion kommt dem Inneren Membrankomplex (IMC) eine herausragende Rolle während der Invasion in die roten Blutzellen, der Segregation der Tochtermerozoiten und der Gametozytogenese zu. Der IMC besteht aus einer mit dem Zytoskelett assoziierten Doppelmembranstruktur unterhalb der Plasmamembran der Merozoiten. Dieses zelluläre Alleinstellungsmerkmal findet man lediglich bei Einzellern des phylogenetischen Stammes der Alveolata, zu denen neben den Apikomplexa auch die Dinoflagellata und Ciliophora zählen. In Plasmodien sind ca. 35 IMC-Proteine identifiziert und z. T. charakterisiert. Einige spezifische Proteine definieren hierbei einen distinkten Bereich innerhalb des IMC – den Basalkomplex. Diese dynamische Ringstruktur ist essentiell für die Biogenese der Tochterzellen. Die Bedeutung dieser Struktur steht allerdings im klaren Gegensatz zur begrenzten Kenntnis die wir über sie besitzen.

Zur Identifizierung neuer Basalkomplex-Proteine wurde eine induzierbare *proximity-dependent biotin identification*-Methode (DIQ-BioID) angewendet. Hierbei vermittelt ein FKBP-FRB-Heterodimerisierungssystem die Lokalisation der Ligase BirA* am Basalkomplex-Markerprotein Morn1 und ermöglicht damit die Biotinylierung benachbarter Interaktionspartner, die dann aufgereinigt und mit Hilfe der Massenspektrometrie bestimmt wurden.

Dabei wurden als potentielle Basalkomplex-Kandidaten ein bislang uncharakterisiertes Protein (PF3D7_1019100), eine HAD-Protein (PF3D7_1118400), MyoJ sowie u. a. Vertreter der Kinesin-Familie identifiziert. Im Anschluss wurden fünf Vertreter der Kinesine in *P. falciparum* charakterisiert. Koloalisations-Studien zeigen, dass die Kinesine 5 und 8.2 im Mikrotubuli-organisierendem Zentrum (MTOC) lokalisieren. Mislokalisierung der individuellen Kinesine in den Kern, bzw. an die Plasmamembran hat

keinen Einfluss auf die Proliferation der Parasiten bzw. auf die Ausbildung des IMC. Dies deutet auf ihre redundante Funktion unter den gewählten Versuchsbedingungen hin.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Analyse des Abbaus des IMC nach erfolgreicher Invasion in die rote Blutzelle initiiert. Hierbei ergab eine proteinbiochemische Analyse, dass der Abbau der IMC-Proteine wahrscheinlich über das Ubiquitin-Proteasom-System erfolgt.

Die Visualisierung der GFP-markierten IMC-Proteine *in vivo* nach Zusammenbruch der Doppelmembran, zeigt eine unterschiedliche Lokalisation der Proteine, bzw. Proteinfragmente abhängig von ihrem Membranassoziationsmechanismus im IMC. Hochauflösende FIB-SEM-Mikroskopie zur Darstellung der IMC-Membranen in 3D verdeutlicht, dass der IMC innerhalb von weniger als 15 Minuten nach erfolgreicher Invasion in die rote Blutzelle nicht mehr unter der Plasmamembran nachweisbar ist und sich der Abbau in *P. falciparum* grundlegend vom Abbau des IMC in verwandten Organismen unterscheidet.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung	I
Zusammenfassung	II
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XIII
Abbildungsverzeichnis	XIV
Kapitel 1 Einleitung	1
1.1 Malaria – eine der weltweit bedeutendsten Infektionskrankheiten	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Klinik und Pathophysiologie der Malaria	3
1.1.3 Kontrolle der Malaria	5
1.2 Biologie des Malariaerregers <i>P. falciparum</i>	8
1.2.1 Der Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	8
1.2.2 Der unkonventionelle Zellzyklus von <i>P. falciparum</i>	12
1.3 Der Merozoit – invasives Stadium von <i>P. falciparum</i>	14
1.3.1 Der Merozoit	14
1.3.2 Invasion der Merozoiten in die rote Blutzelle	16
1.3.3 Der Innere Membrankomplex (<i>Inner Membrane Complex - IMC</i>)	18
1.3.4 Der Basalkomplex	20
1.3.5 Transportprozesse in <i>P. falciparum</i> – Mikrotubuli und Kinesine als Motor der IMC-Migration?	22
1.4 Ziel der Arbeit	23
Kapitel 2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 <i>Plasmodien</i> - und Bakterien-Stämme	24
2.1.2 Chemikalien und Lösungen	24
2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte	26
2.1.4 Größenstandards, Enzyme und Oligonukleotide	28
2.1.5 Fertige Versuchsansätze	28
2.1.6 Antikörper	29
2.1.7 Software	29
2.1.8 Puffer, Lösungen und Medien	30
2.1.9 Vektoren und Oligonukleotide	32
2.2 Methoden	34
	IV

2.2.1 Mikrobiologische Methoden	34
2.2.1.1 Sterilisation von Lösungen und Geräten	34
2.2.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	35
2.2.1.3 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i>	35
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	36
2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.2.2.2 PCR-Produktaufreinigung	37
2.2.2.3 Restriktionsverdau und Ligation von PCR-Produkt und Vektor	37
2.2.2.4 Transformation von DNA in <i>E. coli</i>	37
2.2.2.5 Plasmidisolierung (Mini- und Midipräparation)	38
2.2.2.6 Sequenzierung der Plasmide	38
2.2.2.7 Isolierung genomischer DNA	38
2.2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese	39
2.2.3 Zellbiologische Methoden	39
2.2.3.1 Kultivierung von <i>P. falciparum</i>	39
2.2.3.2 Giemsa-Färbung von Blutausstrichen	40
2.2.3.3 Langzeit-Lagerung von Parasiten (Einfrieren und Auftauen)	40
2.2.3.4 Synchronisation von Parasitenkulturen mit Percoll und/oder Sorbitol	40
2.2.3.5 Transfektion von <i>P. falciparum</i>	41
2.2.3.6 Selektionierung transgener Parasiten mittels der selektionsgekoppelten Integration (SLI)	42
2.2.3.7 Parasitenaufreinigung aus einer Erythrozytenkultur	42
2.2.3.8 Anreicherung von <i>P. falciparum</i> über eine magnetische Säule (<i>Variomacs</i>)	43
2.2.3.9 Mislokalisierung von Proteinen in <i>P. falciparum</i>	43
2.2.3.10 Wachstumskurve mittels Durchflusszytometrie (FACs)	44
2.2.3.11 Biotinylierung von Proteinen in <i>P. falciparum</i>	44
2.2.3.12 Fixierung von Parasiten für die Immunfluoreszenz-Analyse (IFA) mittels Formaldehyd/Glutaraldehyd-Fixierung	45
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	46
2.2.4.1 Aufreinigung biotinylierter Proteine für die Massenspektrometrie	46
2.2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.2.4.3 Westernblot	48
2.2.5 Mikroskopie	48
2.2.5.1 Fluoreszenz-Mikroskopie von Lebendpräparaten	48
2.2.5.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie (IFA)	48
2.2.4.3 Konfokale Mikroskopie	49

Kapitel 3 Ergebnisse	50
3.1 Versuch der funktionellen Charakterisierung des Basalkomplexes	50
3.1.1 Untersuchung der Redundanz bekannter Basalkomplex-Proteine	50
3.1.2 Funktionelle Inaktivierung von Morn1 und BTP1 mittels Mislokalisierung	51
3.1.3 <i>GlmS</i> -Riboswitch-basierende RNA-Degradation von Morn1 zur Funktionsbestimmung	56
3.2 Identifikation des Morn1-Interaktoms mittels <i>proximity based biotinylation</i> (BioID)	58
3.3 Charakterisierung potenzieller Basalkomplex-Proteine	61
3.3.1 PF3D7_1019100/PF10_0184 - ein putatives Basalkomplex-Protein	61
3.3.2 Kinesine in <i>P. falciparum</i> – potenzielle Basalkomplex-Proteine?	62
3.3.2.1 In <i>P. falciparum</i> sind 5 Kinesine spät transkribiert	62
3.3.2.2 Charakterisierung von Kinesin 5 und Kinesin 8.2	63
3.3.2.3 Kinesin 5 ist weder essentiell für das Wachstum von <i>P. falciparum</i> während der Blutphase noch für die Ausbildung des IMC	67
3.4 Abbau des Inneren Membrankomplexes nach der Invasion in den Erythrozyten	69
3.4.1 Analyse von Proteinen des IMC in jungen Ringstadien von <i>P. falciparum</i>	69
3.4.2 Mikroskopische Analyse des IMC in jungen Ringstadien von <i>P. falciparum</i>	70
Kapitel 4 Diskussion	74
4.1 BTP2 und Pf13_0225, nicht aber Morn1, HAD2 und BTP1, können pSLI-abhängig deletiert werden	75
4.2 Identifikation neuer Proteine des Basalkomplexes mittels DIQ-BioID	79
4.2.1 Kinesine als Bestandteile des Basalkomplexes?	80
4.3 Der Abbau des IMC als Angriffspunkt für Therapeutika?	84
Anhang	90
Literaturverzeichnis	93
Publikationen	113
Danksagung	114

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
α	alpha, anti
β	beta
A	Alanin, Adenin
Abb.	Abbildung
ad.	auffüllen bis
AMA-1	<i>apical membrane antigen-1</i>
AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ACT	<i>artemisinin based combination therapie</i>
ATG	Startcodon (Methionin)
AP2-G	<i>activating protein 2</i>
BTP	<i>basal complex transmembrane protein</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
BioID	<i>proximity based biotinylation</i>
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cam	Promotor des Calmodulin Gens
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
crt	Promotor des Chloroquin Resistenz Transporters
CSP	<i>circumsporozoite protein</i>
D	Asparaginsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
d. h.	das heißt

DHFR	Dihydrofolatreduktase
DIC	Differentialinterferenzkontrast
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	4,4'-(2,2,2-trichloroethane-1,1-diyl)bis(chlorobenzene)
E	Glutaminsäure
EBA	<i>erythrocyte binding protein</i>
EBL	<i>erythrocyte binding ligand</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemilumineszenz</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
et al.	et alteri (lat. und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Phenylalanin
FKPB	<i>FK506 binding protein</i>
FRB	<i>FKBP12-rapamycin binding</i>
GAP	<i>glideosome associated protein</i>
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
GlmS	<i>glucosamine-6-phosphate riboswitch</i>
GlcN	α -D-Glucosamin
GRASP	<i>golgi-reassembly stacking protein</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
H	Histidin
HCl	Salzsäure
hdhfr	humane Dihydrofolatreduktase
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
h. p. i.	<i>hours post invasion</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)

HP	<i>heterochromatin protein</i>
HAD	<i>histone deacetylase</i>
IFA	Immunfluoreszenz-Assay
ital.	italienisch
IL	Interleukin
IMC	<i>Inner Membrane Complex</i>
<i>in vitro</i>	ausserhalb eines Organismus
<i>in vivo</i>	innerhalb eines Organismus
ITNs	<i>insecticide treated bed nets</i>
<i>per se</i>	an sich
K	Lysin
kDa	Kilodalton
K ₂ HPO ₄	Di-Kaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LB	Luria Bertani
LSA	<i>liverstage antigen</i>
M	molar (Mol pro Liter); Methionin
m	Meter
MetOH	Methanol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
MC	Maurer's Clefts
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MIS	<i>mutagenesis index score</i>
MnCl ₂	Manganchlorid
MSP	<i>merozoite surface protein</i>
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
MTIP	<i>myoA tail-interacting protein</i>

MyoA	Myosin A
Morn	<i>membrane occupation and recognition nexus</i>
N	Asparagin
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaH ₂ CO ₃	Natriumdihydrogencarbonat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ori	Startpunkt der DNA-Replikation
P.	<i>Plasmodium</i>
PbDT	Terminator des <i>P. berghei</i> Dihydrofolatreduktase-Thymidin-Synthase-Gens
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEXEL	<i>plasmodium export element</i>
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfSPZ	durch Bestrahlung attenuierten Sporozoiten
pH	pH-Wert (lat. potentia hydroxii)
Phusion	<i>Pyrococcus</i> -ähnliches Enzym
PlasmoDB	<i>Plasmodien</i> -Datenbank
Pro	Prolin
PV	parasitophore Vakuole
PVM	parasitophore Vakuolenmembran
<i>PfEMP</i>	<i>Pf erythrocyte membrane protein</i>
PI ₄ K	Phosphatidylinositol 4-Kinase
Rab	<i>Ras-like isolated from rat brain</i>
RBC	rote Blutzelle
Rh	<i>reticulocyte-binding homologue</i>
rER	raues ER

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RTS,S/ASO2	Mosquix®/Impfstoff
S	Serin
S.	<i>Saccharomyces</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
Ser	Serin
sog.	sogenannt
SP	Signalpeptid
SPM	subpellikuläre Mikrotubuli
SPN	subpellikuläres Netzwerk
ssp.	Unterart (lat. subspecies)
T.	Trypanosoma, Toxoplasma
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat
TE	Tris-EDTA Puffer
tER	transitorisches ER
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin
Temp.	Temperatur
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Trp	Tryptophan
U	enzymatische Einheit (Unit)
UIS	<i>upregulated in infectious sporozoites</i>
u. a.	unter anderem
ü/N	über Nacht
UTR	untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
UN	Vereinte Nationen
v. Chr.	Vor Christus
V	Volt

(v/v)	Volumen/Volumen
Vol.	Volumen
(w/v)	Gewicht/Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)
z. B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien	24
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 3: Geräte	27
Tabelle 4: Größenstandards, Enzyme, Oligonukleotide	28
Tabelle 5: Kits	28
Tabelle 6: Primärantikörper	29
Tabelle 7: Sekundärantikörper	29
Tabelle 8: Software und Datenbanken	29
Tabelle 9: Medien für mikrobiologische Methoden	30
Tabelle 10: Medien für molekularbiologische Methoden	30
Tabelle 11: Medien für zellbiologische Methoden	31
Tabelle 12: Medien für biochemische Methoden	32
Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide	33
Tabelle 14: Standardisierte Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die präparative sowie für die analytische PCR	36
Tabelle 15: PCR-Programm	36
Tabelle 16: Ergebnisse der pSLI-basierten Gendeletionsversuchsreihen im Vergleich zu ihrem <i>essentiality score</i> (Zhang et al., 2018), MIS: <i>mutagenesis index score</i>	51
Tabelle 17: Als Kinesine annotierte Proteine in <i>P. falciparum</i> .	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abnahme der Gebiete mit einem Malaria-Transmissionsrisiko (2000–2015) auf dem afrikanischen Kontinent (Bhatt et al., 2015).....	2
Abbildung 2: Örtliche Gegebenheiten im ländlichen Afrika (hier Fougamou, Gabun) erleichtern eine Malariatransmission.	3
Abbildung 3: Der Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	8
Abbildung 4: Intraerythrozytäre Entwicklung von <i>P. falciparum</i>	9
Abbildung 5: Schematische Abbildung der Gametozyten.	11
Abbildung 6: Morphologie des Merozoiten.....	14
Abbildung 7: Hochauflösende Mikroskopie der Rhoptrien.	15
Abbildung 8: Der Aktin-Myosin-Motor von <i>P. falciparum</i>	16
Abbildung 9: Modell der Invasion eines <i>P. falciparum</i> Merozoiten in einen humanen Erythrozyten.	16
Abbildung 10: Struktur des Inneren Membrankomplexes.....	18
Abbildung 11: Struktur des Basalkomplexes.	20
Abbildung 12: <i>Das knock-sideways</i> -System.	52
Abbildung 13: Mislokalisierung von Alveolin 5 und Mal13P1.228.	53
Abbildung 14: Mislokalisierung von Morn1 und BTP1.	55
Abbildung 15: <i>GlmS</i> -Riboswitch-vermittelte Kontrolle der Morn1 Expression.	56
Abbildung 16: Einfluss der <i>glmS</i> -Riboswitch vermittelten RNA-Degradation von Morn1 auf die Schizontenbildung.....	57
Abbildung 17: Biotinylierung von Morn1 durch BirA*.	59
Abbildung 18: Interaktionspartner von Morn1 infiziert über Massenspektrometrie.....	60
Abbildung 19: RNA-Expressionsdaten der in <i>P. falciparum</i> exprimierten Kinesine während der 48-stündigen Blutphase.....	62
Abbildung 20: Lokalisation von Kinesin 5.	64
Abbildung 21: Lokalisation von Kinesin 8.2.....	65
Abbildung 22: Kolokalisation des Kinesin5_2xFKBP_GFP-Fusionsprotein mit α -Tubulin in fixierten Parasiten.	66
Abbildung 23: Kolokalisation des Kinesin 5_2xFKBP_GFP Fusionsproteins mit überexprimiertem Centrin 3 sowie GAPM2 in fixierten Parasiten.....	67
Abbildung 24: Mislokalisierung von Kinesin 5 in den Kern und an die Plasmamembran hat keinen Effekt auf das Wachstum der Parasiten.....	68
Abbildung 25: Die Mislokalisierung von Kinesin 5 hat keine Auswirkung auf die Bildung des Inneren Membrankomplexes.	69

Abbildung 26: Proteinbiochemische Analyse von GAPM2 in Ringstadien von <i>P. falciparum</i>	70
Abbildung 27: Lokalisation von Proteinen des IMC in jungen Ringstadien.	71
Abbildung 28: Lokalisation von GAPM2_GFP in jungen, fixierten Ringstadien.....	72
Abbildung 29: Kollokalisierung von GAPM2 und Rex1.....	72
Abbildung 30: FIB-SEM junger, gefrierfixierter Ringstadien in <i>P. falciparum</i>	73

Kapitel 1 Einleitung

1.1 Malaria – eine der weltweit bedeutendsten Infektionskrankheiten

1.1.1 Epidemiologie

„In den tropischen und subtropischen Regionen ist die endemische Malaria Hauptursache für Morbidität und Mortalität.“

C. Laveran (1845–1922)

An dieser Aussage des französischen Arztes Charles Laveran, der 1880 als Erster den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*; Welch, 1987) im menschlichen Blut nachweisen konnte, hat sich bis heute kaum etwas geändert. Die Hälfte der Weltbevölkerung ist einem ständigen Malaria-Infektionsrisiko ausgesetzt – hauptsächlich in den Gebieten südlich der Sahara sowie in Südostasien, Lateinamerika und dem Nahen Osten (WHO, 2018). Aktuell zählt Malaria mit 219 Millionen Krankheitsfällen und ca. 435000 Malaria-bedingten Todesfällen jährlich zu einer der weltweit größten Gesundheitsbedrohungen (WHO, 2018). Hauptsächlich betroffen von dieser parasitären Infektionskrankheit sind Kinder unter fünf, die ca. 70 % der Todesfälle ausmachen, sowie Schwangere und HIV-infizierte Patienten.

Malaria wird durch parasitäre Einzeller der Gattung *Plasmodium* verursacht. Von den mehr als 200 bekannten Arten sind bis heute fünf Spezies als humanpathogen beschrieben: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und *P. knowlesi* (Singh et al., 2004). Für die Transmission der *Plasmodien* sind über 30 verschiedene Arten der *Anopheles*-Mücke, dem Vektor und Endwirt des Parasiten, verantwortlich (Sinka et al., 2011). Die geographischen Verbreitungsgebiete der *Plasmodien* sind auf unterschiedliche Temperaturoptima zurückzuführen, die der Parasit für die Entwicklung in der *Anopheles*-Mücke benötigt.

P. falciparum ist die am häufigsten auftretende *Plasmodien*-Spezies in Afrika (Roucher et al., 2014) und für 98 % aller Todesfälle verantwortlich. *P. vivax* hingegen zeigt eine weitere Verbreitung und tritt auch in Gebieten mit mildereren Temperaturen, häufig in Asien, Ozeanien und Süd- und Zentralamerika, auf. Dort trägt *P. vivax* in erster Linie zur

Morbidität bei (White, 2014). Die durch *P. knowlesi* verursachte Malaria ist lediglich in Südostasien verbreitet. Erst 2004 wurde bekannt, dass eine Übertragung von ihrem Hauptwirt, den Makaken-Affen, auch auf den Menschen erfolgt (Singh et al., 2004). In Deutschland wird heute zunehmend die durch *P. knowlesi* verursachte Malaria bei Reiserückkehrern aus Südostasien diagnostiziert (Froeschl et al., 2018).

P. ovale und *P. malariae* zeigen ein ähnliches Verbreitungsgebiet wie *P. falciparum*: in Subsahara-Afrika, Südostasien und der Westpazifik Region (Collins und Jeffery, 2005). Aufgrund ihrer milden Krankheitsverläufe sind sie jedoch von geringerer Bedeutung in Forschung und Klinik. Insbesondere *P. ovale* grassierte bis Anfang des letzten Jahrhunderts, neben anderen europäischen Ländern, auch in Deutschland. Zahlreiche Faktoren führten jedoch dazu, dass eine erfolgreiche Übertragung des Parasiten nicht mehr gewährleistet war. Dies zeigt, dass durch bestimmte Maßnahmen dem Parasiten seine Lebensgrundlage genommen werden kann.

Erfreulicherweise sank innerhalb der letzten 16 Jahre auch die Zahl der endemischen Länder auf dem afrikanischen Kontinent von 108 auf 91 (Health Organization, 2016). Des Weiteren zeigen Studien, dass zwischen 2000 und 2015 die Anzahl der Malariafälle in Afrika um 40 % gesunken ist (Abb. 1, Bhatt et al., 2015).

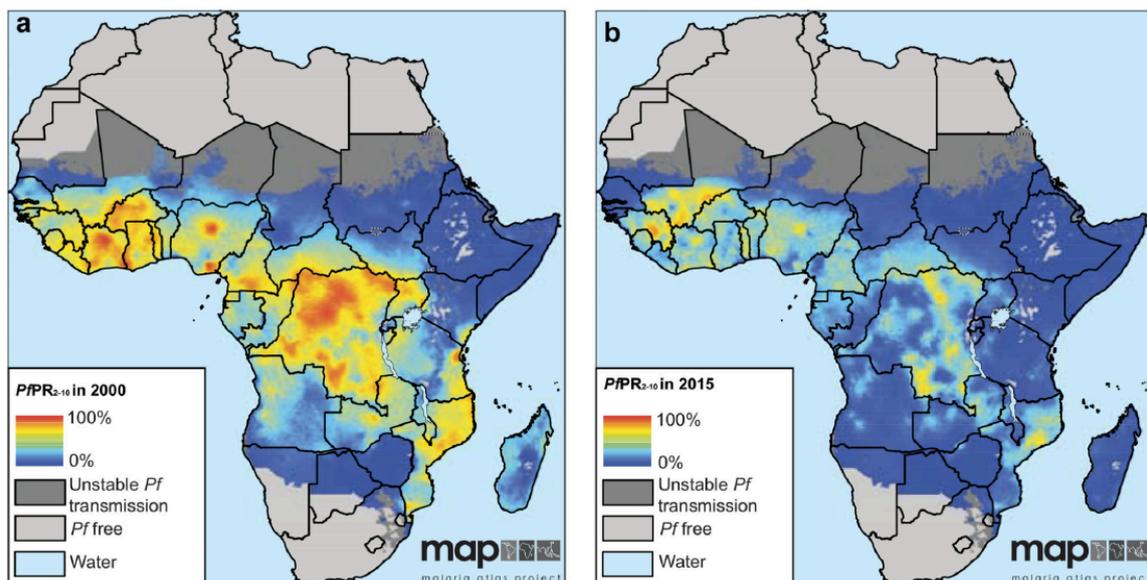


Abbildung 1: Abnahme der Gebiete mit einem Malaria-Transmissionsrisiko (2000–2015) auf dem afrikanischen Kontinent (Bhatt et al., 2015).

Diese Abnahme ist jedoch von großen örtlichen und zeitlichen Schwankungen begleitet (zusammengefasst in Nkumama et al., 2017) und die Vergangenheit zeigt, dass die Herausforderung darin besteht, diese Fortschritte langfristig zu erhalten (Cohen et al., 2012). Denn noch heute leben in vielen tropischen, ruralen Gebieten große Teile der Bevölkerung unter einfachen Bedingungen, die den Schutz vor Mücken erschweren bzw. die diesen menschnahen Lebensraum gewähren (Abb. 2).



Abbildung 2: Örtliche Gegebenheiten im ländlichen Afrika (hier Fougamou, Gabun) erleichtern eine Malariatransmission.

Links: Einfache Hütten bieten kaum Schutz vor Insekten. Rechts: Wohnraumnahe Waschplätze bieten Brutstätten für Mücken.

Eine Eindämmung der parasitären Infektionskrankheit Malaria ist somit insbesondere erstrebenswert, da sie in sich sowohl Ursache als auch Konsequenz für Armut und Ungleichheit vereint und einen starken negativen Einfluss auf die sozioökonomische Entwicklung der betroffenen Länder nimmt (Sachs und Malaney, 2002).

1.1.2 Klinik und Pathophysiologie der Malaria

Bereits 500 v. Chr. erfolgte die erste Beschreibung der klinischen Symptome der Malaria durch Hippokrates, jedoch ging man bis zur Beschreibung des Malariaerregers im Blut durch Laveran von „schlechter Luft“ als Ursache der Malaria aus (schlechte Luft – *ital. mal aria*). Heute ist bekannt, dass alle klinischen Symptome der Malaria aus der asexuellen Vermehrung des Parasiten im Blut des Wirtes resultieren. Hierbei bestimmt die Malariaspezies Krankheitsbild und -verlauf.

Speziesabhängig sind Inkubationszeiten zwischen 10 und 14 Tagen (*P. falciparum* und *P. knowlesi*) und mehreren Wochen (*P. ovale*, *P. malariae* und *P. vivax*) beschrieben. Wird eine bestimmte Parasitämie im Blut des Patienten erreicht (ca. 100 Parasiten/ μ l Blut), kommt es zur Ausbildung der Symptome: Im Prodromalstadium treten unspezifische, grippeähnliche Symptome wie Kopf- und Gliederschmerzen, Schüttelfrost, Schweißausbrüche und Beschwerden des Magen-Darm-Traktes auf. Mit der Manifestation der Krankheit setzen rezidivierende Fieberschübe ein.

P. falciparum verursacht die gefährlichste Form der Malaria, die *Malaria tropica*. Hier treten die Fieberschübe unregelmäßig auf, während sich die von *P. vivax* und *P. ovale* verursachte *Malaria tertiana* durch Fieberschübe auszeichnet, die im 48-Stunden-Zyklus auftreten. Kommt es zu asynchronen Mehrfachinfektionen mit *Plasmodien*, kann das typische Wechselfieber auch ausbleiben und in ein konstantes Fieber übergehen (Knobloch, 2003; White et al., 2014).

Das charakteristische hohe Fieber resultiert aus der gemeinsamen Freisetzung von Parasiten und parasitären Toxinen (z. B. Hämözoïn und Glycosylphosphatidylinositol) aus den Erythrozyten in das Blut. Diese binden an Rezeptoren von Zellen des Immunsystems und induzieren die Bildung von pyrogenen Zytokinen wie z. B. TNF- α oder IL-1 β .

Neben dem Fieber ist die Anämie ein weiteres charakteristisches Krankheitsbild der Malaria. Sie beruht einerseits auf einer durch Zytokine bedingten Herabsetzung der Erythropoese im Knochenmark, andererseits auf dem Platzen von Erythrozyten und dem Abbau infizierter Erythrozyten in der Milz (Miller et al., 2002).

Die besondere Gefahr der *Malaria tropica* beruht auf der Rosettenbildung von infizierten und nicht infizierten Erythrozyten sowie der Anheftung von infizierten Erythrozyten an das Endothel der Blutgefäße. Dieses Anheften basiert auf Proteinen der Parasiten, wie beispielsweise *PfEMP1* (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1), die auf die Plasmamembran von Erythrozyten sekretiert werden (Marti et al., 2005) und zu Durchblutungsstörungen führen können. Die folgende Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen wirkt sich besonders drastisch in sensiblen Geweben des Gehirns aus (zerebrale Malaria) und kann über Koordinationsstörungen, Krämpfe, Verwirrtheit und Bewusstlosigkeit zum Koma des Patienten führen (Miller et al., 2002). Weitere auftretende Komplikationen der Infektion mit *P. falciparum* sind unter anderem Azidose, Milzruptur, Hypoglykämie sowie Leber- und Nierenschäden. Bleiben die Symptome unbehandelt, können die Komplikationen der *Malaria tropica* innerhalb weniger Tage zum Tod führen (Knobloch, 2003).

Die unspezifischen Symptome sowie das breite klinische Erscheinungsbild von leichten asymptomatischen Infektionen über Fieberschübe bis hin zur schweren, tödlichen Malaria stellen ein großes Problem bei der Diagnose und Behandlung in endemischen und insbesondere ruralen Gebieten Afrikas dar. Häufig werden alle fieberhaften Infekte als Malaria behandelt, dies wiederum fördert die Ausbildung von Resistenzen gegen geläufige Malariamedikamente (Gosling et al., 2008).

1.1.3 Kontrolle der Malaria

Vektorkontrolle

Zahlreiche Kontrollprogramme und Initiativen der letzten Jahrzehnte zeugen von dem Versuch der Eliminierung bzw. Kontrolle der Malaria (z. B. *Global Malaria Eradication Programme* (Lepes, 1974), *United Nations Millennium Declaration* (UN, 2000) usw.).

Ein erfolgreiches Werkzeug hierbei war in der Vergangenheit der Einsatz von Insektiziden zur Eliminierung der Malaria-übertragenden Mücke (Enayati and Hemingway, 2010), wobei Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) eine herausragende Rolle spielte. Es hat maßgeblich zu einer Reduktion der Malariafälle in der Mitte des letzten Jahrhunderts beigetragen (Van Den Berg, 2009; Zucker, 1996). Aufgrund der schädlichen Wirkung von DDT auf Mensch und Umwelt wird DDT heute jedoch nur noch vereinzelt genutzt. Hinzu kommt das Auftreten von Resistenzen gegen DDT (Hemingway und Ranson, 2000).

Heute stehen alternative Insektizide wie z. B. Pyrethroide zur Verfügung. Pyrethroide werden häufig zum Imprägnieren von Bettnetzen (*insecticide treated bed nets* - ITNs) genutzt, welche sich in der nahen Vergangenheit als eines der effizientesten Werkzeuge zur Malariareduktion herausgestellt haben und insbesondere Kinder schützen (Bhatt et al., 2015). Allerdings ist auch die Wirksamkeit dieses Mittels der Wahl durch Resistenzbildungen in Gefahr.

Neuartige Vektorkontrollen sehen die Einbringungen von genetischen Veränderungen in die Mückenpopulation vor, die entweder eine Resistenz gegen *Plasmodien* vermitteln (Gantz et al., 2015) oder deren Fruchtbarkeit einschränken (Hammond et al., 2016). Aufgrund von unvorhersehbaren Folgen für das gesamte Ökosystem wird der Einsatz dieser Methoden allerdings kontrovers diskutiert (Pennisi, 2015).

Prophylaxe und Behandlung von Malaria

Neben den oben genannten Punkten zur Kontrolle des Überträgers der *Plasmodien* spielt die Prophylaxe bzw. die zügige und korrekte Behandlung des Patienten eine entscheidende Rolle bei der Eindämmung von Malaria.

Traditionell wurde Malaria mit Chinin, einem Extrakt aus der Rinde des Chinarindenbaums (*Cinchona pubescens*), behandelt. Es wurde von den Jesuiten aus Peru, wo dessen fiebersenkende und schmerzstillende Wirkung bereits zu Zeiten vor Christus bekannt war, nach Europa importiert (Rocco, 2004).

Als Standardtherapie wird aktuell eine Artemisinin-basierte Kombinationstherapie (*artemisinin based combination therapy* – ACT) empfohlen (Health Organization, 2017). Hierbei wird das aktuell am schnellsten wirkende Therapeutikum Artemisinin oder eines seiner Derivate mit einem Medikament einer zweiten Substanzklasse kombiniert (z. B.

Lumefantin, Mefloquin oder Sulfadoxin/Pyrimethamin) (Health Organization, 2017). Diese Therapie bietet den Vorteil, dass die kurze Eliminierungszeit von Artemisinin mit Wirkstoffen kombiniert wird, die über eine lange Halbwertszeit verfügen. Ebenso wie Chinin haben die Artemisinine bei der Behandlung von fieberigen Erkrankungen eine lange Geschichte. Ursprünglich wurde es aus Extrakten des Beifußes (*Artemisia annua*) gewonnen (Klayman et al., 1984), heute jedoch halbsynthetisch hergestellt. Dr. Youyou Tu erhielt für die Entdeckung der Wirkung 2015 den Nobelpreis. Sie war Mitglied einer großangelegten chinesischen Initiative, gegründet nach verheerenden Malaria-bedingten Verlusten im Vietnamkrieg mit dem Ziel, auf der Basis des Wissens der Traditionellen Chinesischen Medizin ein neues Malariamedikament zu entwickeln. Allein im Jahr 2013 wurden fast 400 Millionen Dosen Artemisinin ausgeliefert.

Allerdings sind bereits erste Resistenzen gegen Artemisinin in Südostasien aufgetreten (Dondorp et al., 2009), einem bekannten Ursprungsort für resistente Malarieregner in der Vergangenheit (zusammengefasst in Blasco et al., 2017). Forschungsergebnisse zeigen, dass die Resistenz gegen Artemisinin mit Mutationen in der Gen-Sequenz verknüpft ist, welche die β -Propeller-Domäne des Kelch-Proteins K13 kodiert (Ariey et al., 2016; Straimer et al., 2015). Hierdurch kommt es zur Aktivierung der ungefalteten Proteinantwort und zur proteostatischen Fehlregulation der parasitären Phosphatidylinositol-3-Kinase (Suresh et al., 2018).

Wie oben bereits beispielhaft gezeigt, wird durch Selektion von *Plasmodium*-Mutanten die Wirksamkeit aller Malariamedikamente eingeschränkt. Die Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung und Prophylaxe hat daher hohe Priorität.

Auch wenn in den letzten Jahrzehnten wenig große Durchbrüche erzielt wurden, gibt es einige vielversprechende Medikament-Kandidaten. Zur Identifizierung dieser wurden hauptsächlich zellbasierte Versuchsansätze in Kombination mit optimierten Hochdurchsatz-Verfahren genutzt (zusammengefasst in Pérez-Moreno et al., 2016). Hierdurch wurden beispielsweise die Imidazopyrazine als wirksame Substanz gegen *Plasmodien* identifiziert (Mcnamara et al., 2014), eine Substanzklasse, welche die Phosphatidylinositol 4-Kinase (PI₄K) inhibiert. Diese Lipidkinase ist u. a. essentiell für die Biogenese des Inneren Membrankomplexes (*Inner Membrane Complex, IMC*), einer parasitären Membranstruktur, die aufgrund ihrer Einzigartigkeit *per se* ein interessanter Angriffspunkt für Medikamente ist.

Des Weiteren wurde beispielsweise MMV666693, eine Komponente der *Malaria Box* (eine Substanzsammlung zusammengestellt vom *Medicines for Malaria Venture*; Spangenberg et al., 2013) als spezifischer Inhibitor eines *Plasmodien*-Kinesins identifiziert (Liu et al., 2014).

Impfstoffentwicklung

Ein weiterer Versuch zur Eindämmung der Malaria, der eine langjährige Forschungsgeschichte aufweist, ist die Suche nach einem wirksamen Impfstoff. Die Hoffnung auf Erfolg wird unter anderem dadurch genährt, dass Bewohner von Hochendemie-Gebieten nach wiederholter Infektion mit *P. falciparum* im Kindesalter eine Semi-Immunität entwickeln (Greenwood, 1987). Dieses Phänomen führt zu einem milden oder sogar asymptomatischen Krankheitsverlauf im Alter, ist jedoch gleichzeitig mit der hohen Kindersterblichkeit durch Malaria verbunden. Als Probleme bei der Impfstoffentwicklung erweisen sich unter anderem die kurze Präsentation des Parasiten gegenüber dem Immunsystem sowie seine Antigenvielfalt, welche keine Kreuzimmunität aufkommen lässt (Leffler et al., 2017).

Der von der Wirkung vielversprechendste, jedoch auch in der logistischen Umsetzung impraktikabelste Ansatz (diskutiert in Richie et al., 2015) ist die Impfung mit durch Bestrahlung attenuierten Sporozoiten, genannt PfSPZ (Clyde et al., 1973; Nussenzweig et al., 1967; Seder et al., 2013). Als *proof-of-principle* dient hierfür eine Studie aus dem Jahr 1967, in der die Doktorin Nussenzweig einen Aktivimpfstoff herstellten (Nussenzweig et al., 1967). Dieser Ansatz wird heute durch die Firma Sanaria vorangetrieben, allerdings ist wahrscheinlich, dass dieser Impfstoff nicht im großen Maßstab eingesetzt wird.

Die Attenuierung kann bei diesem Impfstoffansatz neben der Bestrahlung auch durch genetische Manipulation oder medikamentös erfolgen. Allen gemein ist jedoch ein Durchlaufen der präerythrozytären Stadien, welches für den Aufbau einer Immunität ausreichend ist (zusammengefasst in Friesen und Matuschewski, 2011). Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Mordmüller und Kollegen zeigt, dass unter Chemoprophylaxe mit Malaria infizierte Probanden eine mehrwöchige Immunität gegen präerythrozytäre Stadien aufbauen (Mordmüller et al., 2017).

Der in Hinsicht auf die Zulassung am weitesten entwickelte Impfstoff ist der rekombinante Impfstoff RTS,S/ASO2 (Handelsname Mosquix®/GSK). Hierbei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus einem Hepatitis-B-Oberflächenprotein sowie dem *Plasmodien*-Protein CSP (*circumsporozoite protein*). Obwohl die Studienergebnisse zur klinischen Phase III in Subsahara-Afrika nur unbefriedigende Ergebnisse lieferten (Reduktion der Malaria-Fälle abhängig vom Alter zwischen 15 und 46 %; Agnandji et al., 2014), steht eine Zulassung kurz bevor. Hierbei besteht allerdings die Gefahr, dass es zu einer Zunahme der Malaria-Fälle durch Auftreten des Rebound-Effektes in endemischen Malaria-Gebieten kommt (Olotu et al., 2016).

Zusammengefasst kann man sagen, dass trotz weitreichender Forschung, vielfältiger Impfstoffansätze und einer vielversprechenden Reduktion von Malaria-Fallzahlen ein Durchbruch bei der Bekämpfung der Malaria noch aussteht. Weiterführende, innovative

Forschung zur Aufklärung der Biologie des Malariaparasiten *P. falciparum* ist daher unabdingbar.

1.2 Biologie des Malariaerregers *P. falciparum*

1.2.1 Der Lebenszyklus von *P. falciparum*

Plasmodien durchlaufen einen komplexen Lebenszyklus, der einen obligaten Wirtswechsel zwischen der schwangeren *Anopheles*-Mücke und ihrem vertebraten Wirt umfasst. Die Mücke bildet hierbei den Endwirt, in welchem die sexuelle Fortpflanzung (Gametogenese) stattfindet, während im Zwischenwirt die asexuelle Vermehrung (Schizogonie) abläuft.

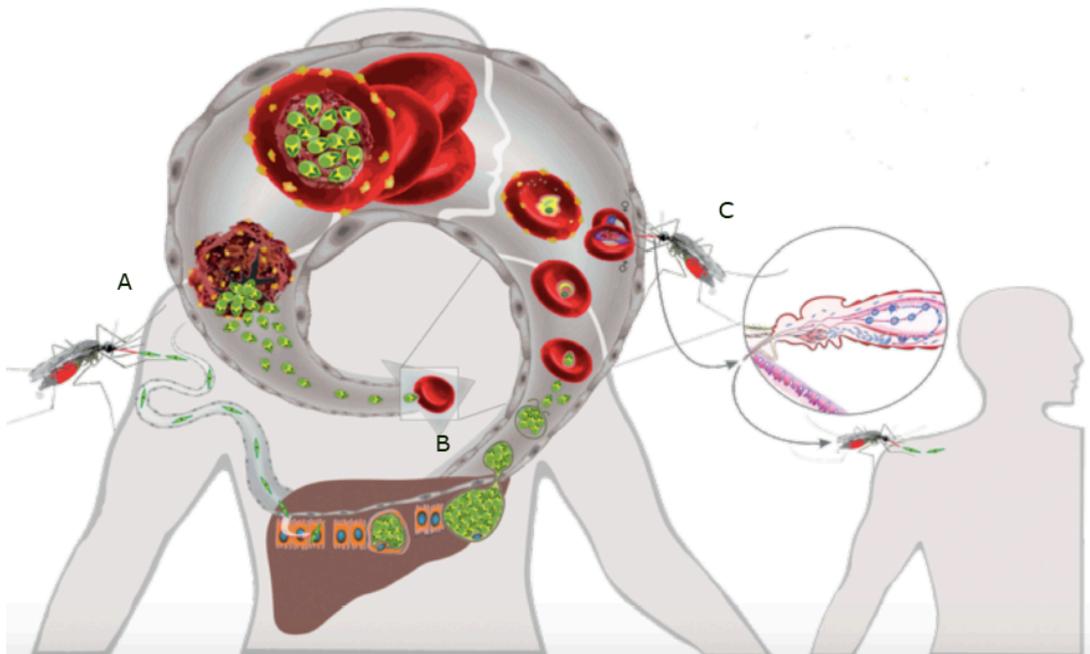


Abbildung 3: Der Lebenszyklus von *P. falciparum*.

Der Lebenszyklus von *P. falciparum* lässt sich in drei Stadien gliedern: A) Nach der Übertragung durch eine weibliche *Anopheles*-Mücke auf den Menschen wandern die Sporozoiten in die Leber und replizieren in den Hepatozyten (Exoerythrozytäre Entwicklung). B) Nach dem Entlassen des Parasiten ins Blut invadieren diese Erythrozyten und vermehren sich (Intraerythrozytäre Entwicklung). C) Mit der Blutmahlzeit einer Mücke werden u.a. geschlechtliche Stadien (Gametozyten) aufgenommen und vermehren sich hier. Der Kreislauf schließt sich mit der Bildung invasionsfähiger Sporozoiten in der Mücke. (K. Jürriis, BNI, unveröffentlicht)

In Abbildung 3 ist der Lebenszyklus dargestellt und wird im Folgendem näher beschrieben, wobei der Fokus auf der asexuellen und der sexuellen Vermehrung im Blut des Menschen liegt, da diese für die vorliegende Arbeit relevant sind.

Die Infektion des Menschen beginnt mit der Übertragung von weniger als hundert Sporozoiten, dem infektiösen Stadium des Parasiten, mit der Speichelflüssigkeit der infizierten Mücke während deren Blutmahlzeit. Die Sporozoiten migrieren ungerichtet durch das Gewebe und einige Parasiten gelangen mit dem Blutstrom in die Leber (Prudêncio und Mota, 2007). Dort entwickeln sie sich in den Hepatozyten innerhalb einer parasitären Vakuole in Leberschizonten. Diese bestehen aus mehreren tausend Merozoiten, der invasiven Form des Parasiten. Mit Ablauf der ersten rapiden Vermehrung induziert der Parasit den Tod seiner Wirtszelle und es bilden sich parasitengefüllte Vesikel, die sogenannten Merosome, aus (Sturm et al., 2009), welche über die Lungenkapillare in den Blutstrom gelangen (Baer et al., 2007). Diese Phase des Lebenszyklus dauert bei *P. falciparum* ca. fünf Tage und ist, obwohl klinisch unauffällig, für die Ausbildung einer Immunität gegenüber dem Parasiten von Bedeutung (Friesen et al., 2010).

In die Blutbahn entlassen, invadieren die Merozoiten ausschließlich Erythrozyten und entwickeln sich in diesen in 48 h-Intervallen über das Ring-, Trophozoiten- und Schizontenstadium in 16–32 Tochtermerozoiten (Abb. 4).

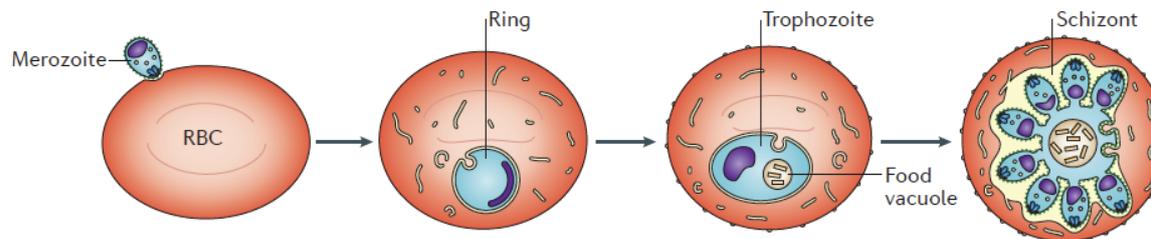


Abbildung 4: Intraerythrozytäre Entwicklung von *P. falciparum*.

Schematische Darstellung des 48 h-Entwicklungszyklus in der roten Blutzelle. Nach Invasion des Merozoiten erfolgt die Reifung über das Ring- und das Trophozoitenstadium. Im Schizontenstadium erfolgt die Bildung der Tochtermerozoiten. (De Niz et al., 2017)

Die Invasion der Merozoiten (die detaillierte Beschreibung erfolgt in Abschnitt 1.3.2) in die Erythrozyten ist hierbei ein überlebenswichtiger und hervorhebenswerterweise wirtszellunabhängiger Schritt des asexuellen Replikationszyklus. Die Wahl des Erythrozyten als Wirtszelle hat hierbei den Vorteil, dass diese in großer Anzahl im menschlichen Körper auftritt, Hämoglobin besitzt (welches der Parasit als Nährstoffquelle nutzt) und immundefizient ist.

Mit dem Eindringen des Parasiten in den Erythrozyten etabliert dieser sich in der parasitophoren Vakuole (PV), die während der Invasion aus der parasitophoren Vakuolenmembran und der Plasmamembran des Parasiten gebildet wird (Lingelbach, 1993). Durch den Einbau spezifischer Proteine (De Koning-Ward et al., 2016; Khosh-Naucke et al., 2018) kontrolliert sie Nährstoffaufnahme, Entsorgung von Metaboliten und den Proteinexport.

Während des verhältnismäßig langen Ringstadiums (ca. 18 h) etabliert sich der Parasit im Erythrozyten und modifiziert seine Wirtszelle. Hierbei kommt es 1,5 – 3 h nach der Invasion (Grüring et al., 2011) zur Bildung von sogenannten Maurerschen Spalten, membranösen Strukturen im Zytosol des Erythrozyten, die vermutlich für den Export von Virulenzfaktoren in die Membran der Wirtszelle (Mundwiler-Pachlatko und Beck, 2013) während des Trophozoitenstadiums wichtig sind. Zu diesen Proteinen zählen Stevors, Rifins und PfEMPs die die Adhäsion der infizierten Erythrozyten in den Kapillaren verschiedener Organe vermitteln und dafür verantwortlich sind, dass im Blut des Malaria-Patienten lediglich Ringstadien detektierbar sind.

Das Trophozoitenstadium ist geprägt durch einen erhöhten Metabolismus, was durch eine Vermehrung der Ribosomen und einer Ausweitung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) (Bannister et al., 2000) sowie den Abbau des erythrozytären Hämoglobins deutlich wird.

Ca. 36 h nach Invasion der Merozoiten beginnt das Schizontenstadium, währenddessen es zur Bildung der Tochterzellen kommt. Diese induzieren in einem streng regulierten, Kalzium-abhängigen Prozess die Ruptur ihrer Wirtszelle (Glushakova et al., 2018; Salmon et al., 2001; Thomas et al., 2018) und werden dann in den Blutstrom entlassen.

Die klinische Malaria (siehe Abschnitt 1.1.2) manifestiert sich in der oben beschriebenen Blutphase, während sich der Parasit erheblich vermehrt. Für die Übertragung des Parasiten ist allerdings eine Induzierung der Gametogenese notwendig. Während der Gametogenese entwickelt sich eine geringe Population der Parasiten, während der oben beschriebenen asexuellen Vermehrung im Blut, in die geschlechtlichen Stadien, die sogenannten Gametozyten.

Die Entscheidung, ob ein Parasit zum Gametozyt differenziert, wird wahrscheinlich während der Trophozoitenphase getroffen, da alle Merozoiten eines Schizonten in Gametozyten differenzieren und gleichen Geschlechts sind (Bruce et al., 1989; Silvestrini et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor AP2-G (*activating protein 2*) als Hauptregulator der Gametogenese hierbei durch epigenetische Faktoren wie HP1 (*heterochromatin protein 1*) und HDA2 (*histone deacetylase 2*) reguliert wird (Brancucci et al., 2014; Flueck et al., 2009) und eine wichtige Rolle bei der Induktion der Gametozytogenese spielt (Kafsack et al., 2014; Sinha et al., 2014).

Des Weiteren konnten Filarsky und Kollegen kürzlich zeigen, dass HP1 durch GDV1 (*gametocyte development 1*) reguliert wird (Filarsky et al., 2018). GDV1 wurde bereits 2012 (Eksi et al., 2012) mit der Bildung von Gametozyten in Verbindung gebracht. Es wird vermutet, dass GDV1 wiederum durch Umweltfaktoren beeinflusst wird, wie bspw. durch Moleküle im Blut (Brancucci et al., 2017). Brancucci und Kollegen konnten *in vitro* zeigen, dass das Absinken von im Blut vorhandenen Lysophosphatidylcholin-Molekülen, die

Bildung von Gametozyten induziert. Dies geschieht ebenfalls im Patienten im Verlauf einer akuten Malariainfektion.

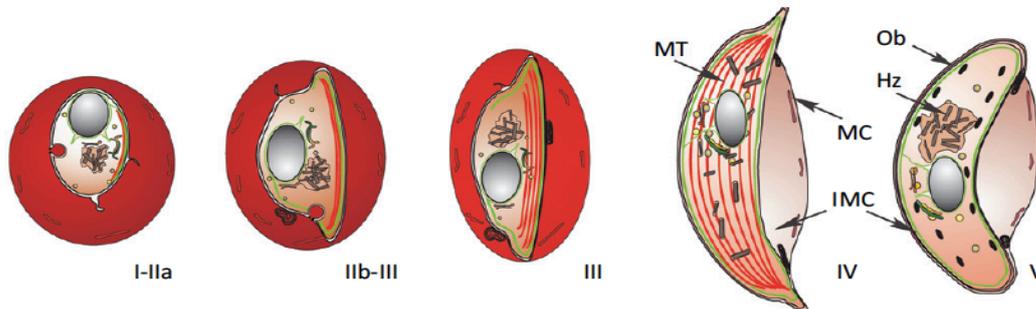


Abbildung 5: Schematische Abbildung der Gametozyten.

Frühe Stadien (I-IIa) ähneln asexuellen Parasiten. In Stadium II schwillt ein Bereich des Gametozyten an und im weiteren Verlauf der Gametogenese elongiert der Parasit, bis er schließlich die Form eines Bumerangs (Stadium V) annimmt. MT: Mikrotubuli, Ob: Hz: Hämoglobin, IMC: Innerer Membrankomplex, MC: Maurer-Spalten. (Dixon et al., 2012)

Die Entwicklung von weiblichen und männlichen Gametozyten benötigt *in vivo* ebenso wie *in vitro* zehn bis zwölf Tage (Jensen, 1978; Williams, 1999). Sie umfasst fünf charakteristische Stadien (Hawking et al., 1971), die sich durch eine spezifische Morphologie (Abb. 5) sowie molekulare Marker auszeichnen. Frühe Stadien ähneln asexuellen Parasiten, im weiteren Verlauf der Gametogenese elongieren diese und nehmen schließlich eine Bumerang-ähnliche Form an. Im Blutkreislauf des Patienten lassen sich lediglich die Stadien I und V der Parasiten detektieren, da unreife Stadien in Milz und Knochenmark sequestrieren (Joice et al., 2014). Es wird davon ausgegangen, dass die Sequestrierung auf morphologische und biophysikalische Veränderungen der infizierten Erythrozyten zurückzuführen ist, da die Parasiten während der Gametozyten-Reifung sehr rigide werden. Jüngere Studien zeigen, dass dies auf eine Polymerisation von Aktin während eines frühen Stadiums der Gametogenese zurückzuführen ist (Hanssen et al., 2012; Hliscs et al., 2014). Diese Struktur des Zytoskeletts bietet einen Ausgangspunkt für die Positionierung von subpellikularen Mikrotubuli und des IMC, dessen Biogenese in dem Stadium III der Gametozyten initiiert wird (Kono et al., 2012). Markerproteine dieser membranösen Struktur direkt unter der Plasmamembran erscheinen im Mikroskop als distinkte Struktur in der Peripherie des Parasiten. Diese dehnt sich im weiteren Verlauf aus und umrundet schließlich den Gametozyten. Der Innere Membrankomplex scheint hier während der Morphogenese eine strukturgebende Funktion zu übernehmen (Dixon et al., 2012). Ein Wechsel in der Morphologie führt schließlich dazu, dass Gametozyten in der Peripherie zirkulieren können und die männlichen und weiblichen Gametozyten mit der Blutmahlzeit der Mücke aufgenommen werden; dort findet die geschlechtliche Fortpflanzung von *P. falciparum* statt. Im Darm der Mücke reifen die Gametozyten aufgrund des Temperaturabfalls, des Anstiegs des pH-Wertes und der Anwesenheit von

Xanthurensäure (Billker et al., 1999) zu Mikro- und Makrogameten heran. Diese befruchten sich und es entstehen motile Zygoten, welche sich zu Oozysten entwickeln, aus welchen wiederum infektiöse Sporozoitstadien entlassen werden. Mit deren Übertragung auf einen weiteren menschlichen Zwischenwirt schließt sich der Kreislauf.

1.2.2 Der unkonventionelle Zellzyklus von *P. falciparum*

Während des komplexen Lebenszyklus von *P. falciparum* findet an vier Punkten eine massive Vergrößerung der Parasitenpopulation statt, die mit einer erheblichen DNA-Synthese einhergeht: (1) bei der Entwicklung von männlichen Gameten (2) bei der Bildung von Sporozoiten (3) in der Leberphase und (4) während der erythrozytären Schizogonie. Allen vier Phasen ist gemein, dass sie mit mehreren Runden der Mitose einhergehen, während der es zur Replikation des Genoms, zur Zellteilung und zur Bildung multinukleärer Zellen sowie als Endpunkt zur Bildung invasiver Stadien kommt. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der erythrozytären Schizogonie, die sich deutlich von bekannten Mustern in anderen Organismen unterscheidet. Somit stellt der Zellzyklus der *Plasmodien*, ebenso wie der Invasionsprozess, einen kritischen und Parasiten-spezifischen Vorgang der *Plasmodien* bzw. der Apikomplexa dar, der jedoch auf zellulärer und molekularer Ebene nur in Grundzügen verstanden ist.

Die „traditionelle“ eukaryotische Zellteilung erfolgt in vier Phasen: In der Interphase findet das Zellwachstum statt, während der S-Phase kommt es zur Replikation der Chromosomen und der Duplikation des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums (MTOC), dem folgt die M-Phase, die Phase der Zellteilung (Mitose) und der Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen. G-Phasen flankieren die S-Phase. Die Kontrolle des komplexen Ablaufs erfolgt über fixe Kontrollpunkte sowie kontrollierte Zyklen von Proteinphosphorylierung und Proteinabbau (zusammengefasst in Alberts et al., 2012).

Im Gegensatz zur binären Zellteilung der eukaryotischen Zellen werden während der Blutphase des plasmodialen Lebenszyklus eine Vielzahl von Nachkommen pro Zelle generiert. Während dieser Schizogonie wird ein multinukleäres Synzytium gebildet, erst nachfolgend findet die Bildung der Tochterzellen und die Zytokinese statt (= Schizogonie; synzytiale und asynchrone Form der Replikation und Zellteilung).

Während der erythrozytären Schizogonie entwickelt sich nach der Invasion eines haploiden Merozoiten in den Erythrozyten dieser in einen Trophozoiten ($1n$ zu $2n$). Während der ersten 24 h der Blutphase liegt ein haploider Nukleus vor und im Vergleich zu Säugerzellen findet während dieser „Interphase“ keine Kondensation des Chromatins statt. Nachfolgend, etwa 24 h.p.i., finden drei bis vier Runden der DNA-Synthese, Mitose und nukleären Teilung statt, es bildet sich ein synzytialer Schizont mit 16–22 Zellkernen.

Während dessen teilt und lagert sich das MTOC (auch zentriolarer Plaue oder Zentrosom genannt) an die Kernmembran an, hierbei kommt es nicht zum Zerfall der Membran, die Spindelmikrotubuli lagern sich an die nukleare Seite des MTOC an und es kommt zur Teilung der Chromosomen. Zwei Modelle werden für den folgenden Verlauf herangezogen: (1) es kommt zur kontinuierlichen Chromosomen-Replikation und einer abschließenden Runde der Segregation, Zellteilung und Tochterzellbildung oder (2) es erfolgt ein wiederholter Zyklus von Replikation, Segregation und Teilung der nukleären Kernmembran.

Die Arbeiten von Striepen und seinen Kollegen (Francia und Striepen, 2014; Striepen et al., 2007) schlagen des Weiteren vor, dass lokale und globale Kontrollmechanismen (d. h. frei diffundierende Transkriptionsfaktoren, Kinasen und Cykline) zusammenspielen und ein remanentes Flagellum das Bilden der Tochterzellen, das sogenannte *budding*, koordiniert. Als Masterregulator der Zellteilung dient hierbei das Zentrosom. Es bietet räumliche und zeitliche Kontrolle und dient als Aufhängung der zellulären Komponenten. Arbeiten aus unserem Labor und andere Arbeiten zeigen einen engen Zusammenhang zwischen Zellteilung und der Bildung des IMC, der parallel mit der Bildung von Tochterzellen, der Merozoiten, abläuft. Mit der Bildung dieser Merozoiten („Segmenter“) wird die Schizogonie allgemeingültig als abgeschlossen betrachtet.

1.3 Der Merozoit – invasives Stadium von *P. falciparum*

1.3.1 Der Merozoit

Der Merozoit ist trotz seiner geringen Länge von 2 μm mit den meisten, für eukaryotische Zellen typischen Organellen ausgestattet, namentlich dem Zellkern mit angrenzendem Endoplasmatisches Retikulum (ER), dem Mitochondrium und dem Golgi Apparat, wobei dieser eine für *Plasmodien* charakteristische Form aufweist (Abb. 6, Bannister et al., 2004; van Dooren et al., 2005; Struck et al., 2005).

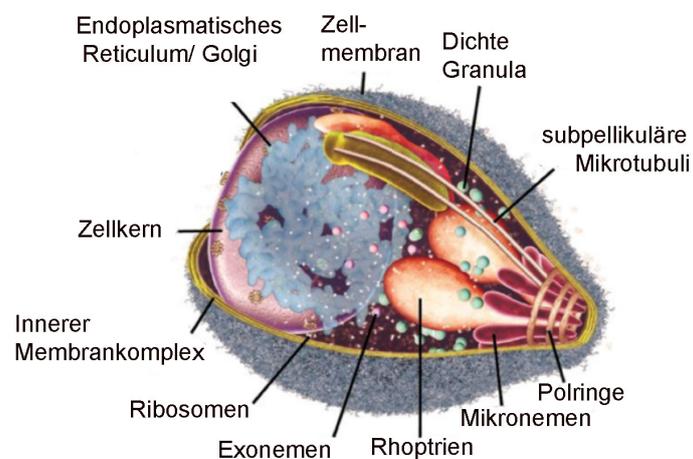


Abbildung 6: Morphologie des Merozoiten.

Schematische Darstellung eines Merozoiten und seiner Zellorganellen (angepasst, Cowman et al., 2012).

Zusätzlich, als evolutionäre Anpassung an seine parasitäre, intrazelluläre Lebensweise, hat der Parasit, ähnlich wie andere Apikomplexa, spezifische Organellen ausgebildet. Hierzu zählt der namensgebende apikale Pol des Merozoiten und der sogenannte Apikalkomplex, bestehend aus Rhoptrien, Mikronemen und dichten Granula. Diese sekretieren während der Invasion spezifische Proteine auf die Oberfläche des Parasiten.

Die paarig angeordneten Rhoptrien sind dreiteilig, bestehend aus Bulbus, Rhoptrienhals und einem Ductus, durch den die Sekretion spezifischer Proteine erfolgt (Bannister et al., 2000). Eine für Vorarbeiten im Rahmen dieser Arbeit angefertigte hochauflösende Mikroskopie (Abb. 7) zeigt deutlich die Austrittsstelle des Ductus am apikalen Ende des Parasiten durch eine Öffnung des IMC.

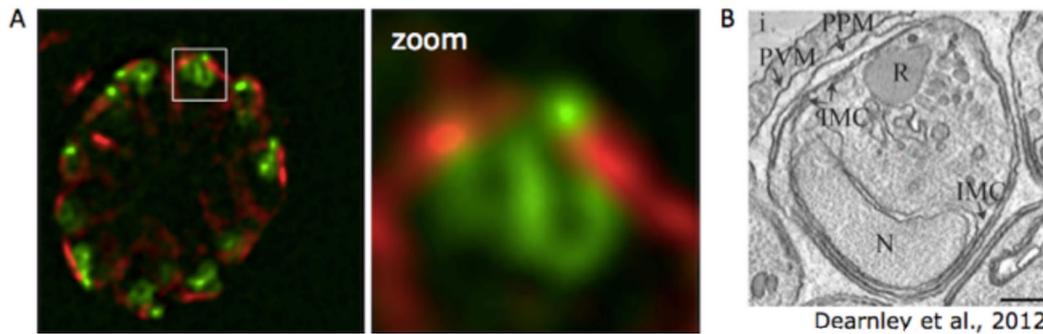


Abbildung 7: Hochoauflösende Mikroskopie der Rhoptrien.

A: Kolokalisation von GAPM2 (*glideosome associated protein with multiple membrane spans 2*) (rot/Innerer Membrankomplex) sowie ARO (grün/Rhoptrien) zeigt die dreiteilige Morphologie (Geiger et al., 2020). B: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Merozoiten (Dearnley et al., 2012).

In dem IMC ist der Aktin-Myosin-Motor verankert. Der Zusammenschluss von hochspezialisierten Proteinen bewerkstelligt, gemeinsam mit den sekretierten Proteinen des Apikalkomplexes, aktiv den komplizierten Invasionsvorgang des Parasiten in den Erythrozyten.

Bestandteile dieses molekularen Motors sind Typ-I Transmembranproteine, wie das *merozoite thrombospondin related anonymous protein homolog* (MTRAP), Adapterproteine, wie die Aldolase, F-Aktin, Myosin A (MyoA), das *myoA tail-interacting protein* (MTIP) sowie die Glideosom-assoziierten Proteine GAP45 und GAP50 (Baum et al., 2008). Die Typ-I Transmembranproteine übernehmen mit ihrer extrazellulären Domäne die Bindung an Rezeptoren des Erythrozyten, während die C-terminale Domäne z. B. über Adapterproteine mit dem F-Aktin verbunden ist. F-Aktin interagiert mit einem Komplex aus MyoA, GAP45, GAP50 und MTIP. GAP45 und GAP50 bilden die Verbindung zu dem IMC, welcher über Alveoline an das Zytoskelett des Parasiten gebunden sind. Die Bewegung entsteht im Aktin-Myosin-Motor über eine sich wiederholende ATP-abhängige Bewegung des Myosin-A-Kopfes, Poly- und Depolymerisation des F-Aktins und Liganden-Rezeptor-Bindungen. Ein eng koordiniertes Zusammenspiel der Proteine führt zur erfolgreichen Invasion des Merozoiten in den Erythrozyten (Abb. 8).

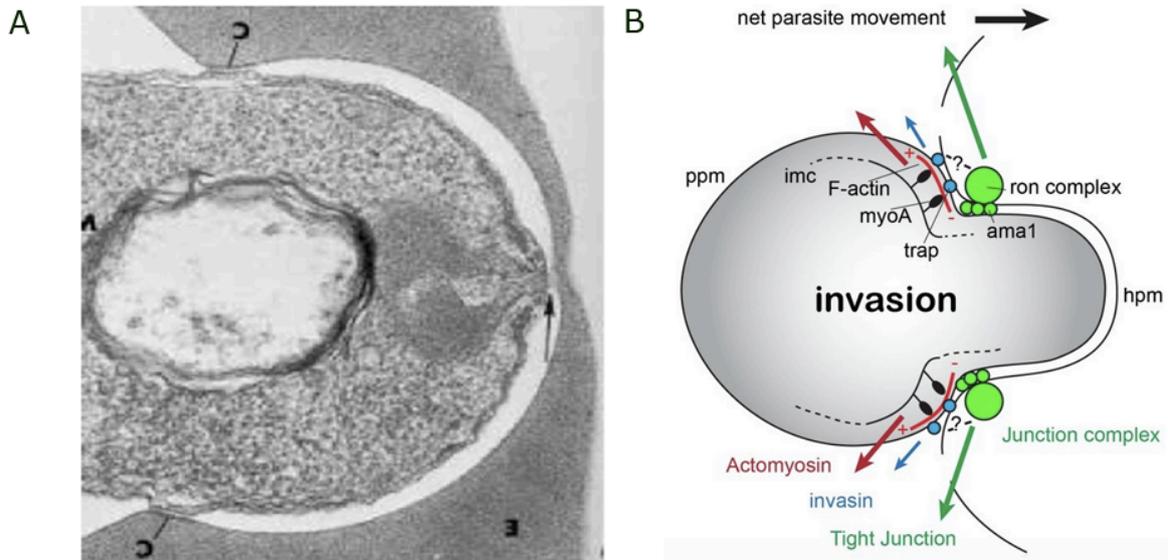


Abbildung 8: Der Aktin-Myosin-Motor von *P. falciparum*.

(A) Elektronenmikroskopie zeigt die Invasion eines Merozoiten in die rote Blutzelle und die Herausbildung einer *tight junction*. (B) Schematische Darstellung des Motorkomplexes und seiner assoziierten Strukturen. (Baum et al., 2008)

1.3.2 Invasion der Merozoiten in die rote Blutzelle

Die Invasion umfasst eine genau definierte Interaktionskaskade und ist innerhalb von 20 Sekunden abgeschlossen (Weiss et al., 2015). Dieser in Abbildung 9 dargestellte Vorgang lässt sich in vier Phasen gliedern: (1) initiale Bindung, (2) Reorientierung des Parasiten, (3) aktive Invasion in den Erythrozyten sowie (4) Etablierung des Parasiten im Erythrozyten (Übersicht: Weiss et al., 2016).

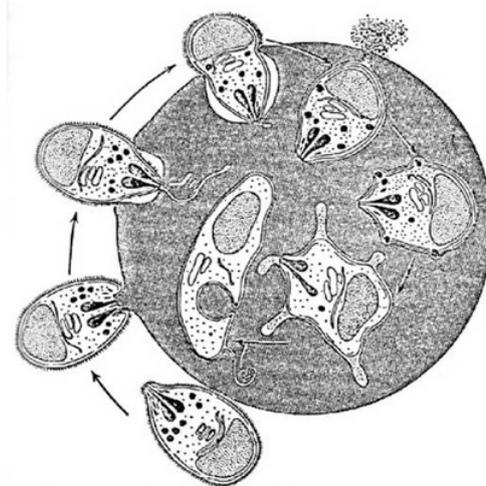


Abbildung 9: Modell der Invasion eines *P. falciparum* Merozoiten in einen humanen Erythrozyten.

Der Prozess der Invasion lässt sich in vier Phasen gliedern: initiale Bindung, Reorientierung des Parasiten, Invasion in den Erythrozyten sowie Etablierung des Parasiten im Erythrozyten. (Weiss et al., 2016)

(1) Eine erste, noch wenig affine Bindung von Merozoit und Erythrozyt erfolgt zufällig und wird vermutlich über Glykosylphosphatidylinositol-verankerte Oberflächenproteine in der Plasmamembran des Merozoiten vermittelt. Von diesen Proteinen sind neun beschrieben, wobei das *merozoite surface protein 1* (MSP-1) als dominantes Antigen bisher am besten charakterisiert ist (Holder et al., 1988; Sanders et al., 2005).

(2) Nach Erkennung der Wirtszelle reorientiert sich der Parasit, sodass sich sein apikaler Pol auf den Erythrozyten richtet. Dieser bildet die Ausgangsstelle der apikalen Organellen (Mikronemen und Rhoptrien), durch die, stimuliert durch die veränderten Ionenkonzentrationen im Blut (Singh et al., 2010), parasitäre Proteine sezerniert werden, die spezifisch an Rezeptoren auf der Oberfläche der Erythrozyten binden.

(3) Diese Invasionsliganden binden irreversibel spezifisch Rezeptoren auf der Erythrozytenoberfläche (Boyle et al., 2013; Duraisingh et al., 2003; Cowman und Crabb, 2006) und stabilisieren dadurch Bindung und Interaktion (Cowman et al., 2012; Sim et al., 1992; Rayner et al., 2000; Triglia et al., 2001). Zu diesen Liganden zählen Proteine der EBL- und *PfRh*-Familien. Beschriebene Interaktionen mit Rezeptoren der Erythrozytenoberfläche sind z. B. *PfRh5*/Basigin (Crosnier et al., 2012), *PfRh4*/Komplementrezeptor 1 (Tham et al., 2010) und *EBA175*/Glykophorin A (Salinas et al., 2014). Experimentelle Daten von Stubbs und Kollegen, Lopaticki und Kollegen (Stubbs et al., 2005; Lopaticki et al., 2011) sowie Patientendaten (Nery et al., 2010) zeigen, dass sich diese Rezeptor-Liganden-Interaktionen überlappen, wahrscheinlich aufgrund von evolutionären Adaptionen.

Ein folgender, signifikanter Schritt ist die Injektion von Proteinen (den sogenannten RON-Proteinen) in die Membran des Erythrozyten, die als Rezeptoren für den parasiteneigenen Liganden AMA-1 dienen (Mital et al., 2005; Alexander et al., 2006; Richard et al., 2010; Lamarque et al., 2011; Taylor et al., 2011). Diese Proteine, mit einer unbekannt Anzahl von anderen Proteinen, bilden die *tight junction*, eine ringförmige Struktur, über die der Parasit fest an seine Wirtszelle gebunden ist und die das Beginnen der Invasion ermöglicht (Cowman et al., 2012). Während des aktiven Invasionsprozesses wandert die *tight junction* zum posterioren Ende des Parasiten. Diese Bewegung wird über den Aktin-Myosin-Motor des Parasiten vermittelt, welcher in dem IMC verankert ist. Die nähere Beschreibung erfolgte bereits in Abschnitt 1.3.1.

Stabile Liganden-Rezeptorbindungen zwischen Wirt und Parasit werden im Verlauf der Invasion u. a. durch Rhomboid-Proteasen proteolytisch gespalten, um die Mobilität des Parasiten zu gewährleisten (Forth et al., 2004).

(4) Bei der Invasion wird die Plasmamembran des Erythrozyten nicht durchdrungen. Stattdessen bildet sich eine parasitäre Vakuole (PV), die unter anderem durch sekretierte Proteine und Lipide des Rhoptrienbulbus modifiziert wird, und die den sich teilenden

Parasiten bis zum Platzen des Erythrozyten umgibt. Nach erfolgreicher Invasion schließt sich die Invasionspore in der Plasmamembran des Erythrozyten und der Parasit etabliert sich in der Zelle. Im Anschluss daran erfolgt eine metabolisch sehr aktive Phase, in deren Anschluss die Kernteilung sowie die Bildung der Tochterzellen stattfinden.

1.3.3 Der Innere Membrankomplex (*Inner Membrane Complex - IMC*)

Die Ausbildung des IMC definiert eine Gruppe von Organismen, die Alveolata. Zu dieser Gruppe von einzelligen Eukaryoten zählen die Ziliaten, die aquatisch lebenden Dinoflagellaten und die parasitär lebenden Apikomplexa, zu denen wiederum die *Plasmodien*, aber auch die *Toxoplasmen* zählen (Cavalier-Smith, 1993). Es wird vermutet, dass sich der IMC früh in der Evolution herausgebildet hat und im Laufe der Zeit zusätzliche, Art-spezifische Proteine rekrutiert wurden.

Der IMC ist essentiell für Invasion und Replikation des Parasiten und gleichzeitig wichtiges formgebendes Organell (siehe Abschnitt 1.3.1 und 1.3.2). Er besteht aus einem oder mehreren membranumgrenzten Säckchen, den sogenannten Alveoli. Deren Doppelmembran liegt unmittelbar unter der Plasmamembran des Parasiten und bildet zusammen mit dieser eine dreischichtige Pellicula (Bannister et al., 2000; Morrissette und Sibley, 2002a; Santos et al., 2009). Die Pellicula ist eng mit Elementen des Zytoskeletts verbunden (Aktin, Myosin, Mikrotubuli und ein Netzwerk von intermediärfilamentartigen Proteinen; Abb. 10). Unterhalb dieser Pellicula liegen auf der zytoplasmatischen Seite drei bis vier subpellikuläre Mikrotubuli (fMAST – *falciparum merozoite-associated assemblage of subpelliculare microtubules*), die vom apikalen Pol aus in Richtung Kern wachsen, auf

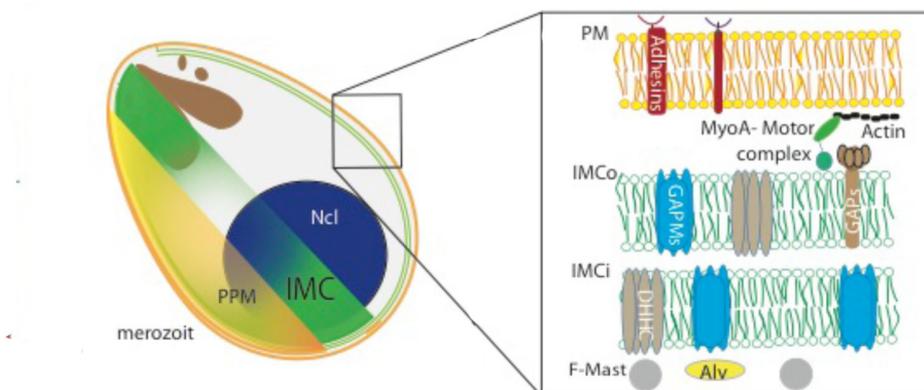


Abbildung 10: Struktur des Inneren Membrankomplexes.
(Heincke, unveröffentlicht)

dessen Höhe sie enden. Des Weiteren findet man auf der zytosolischen Seite des IMC das subpelliculare Netzwerk (SPN), gebildet aus Intermediärfilamenten. Dieses unterstützt die Membranen und vermittelt der Zelle Stabilität (Kudryashev et al., 2010; Mann und Beckers, 2001). Proteine des SPN sind die Alveoline, welche durch ein gemeinsames Sequenzmotiv gekennzeichnet sind (Gould et al., 2008). Eine weitere Gruppe von IMC-assoziierten Proteinen sind die ISPs (*IMC subcompartment proteins*; Kono et al., 2012; Wetzel et al., 2015). In *Plasmodium*-Sporozoiten wurde weiterhin gezeigt, dass Linkermoleküle, vom SPN ausgehend, Organellen wie den Apicoplasten, Mitochondrien und den ER binden. Somit mag dem SPN auch eine strukturierende Rolle innerhalb der Zelle zukommen (Kudryashev et al., 2010).

Gefrierbruch-Mikroskopie hat weiterhin gezeigt, dass 22 parallel angeordnete, intramembranöse Partikel (IMP) den IMC durchziehen und die Verbindung zwischen IMC und SPN bilden, sodass diese den IMC stützen können (Morrissette et al., 1997). Da GAPM-Proteine (GAPM1-3) sowohl mit den Alveolinen als auch mit Komponenten des Aktin-Myosin Motors zu interagieren scheinen (Bullen et al., 2009), ist es möglich, dass diese das Anpassungsglied zwischen Membran und SPN bilden.

Der IMC im Merozoiten wird aus einem membranösen Vesikel gebildet, der die komplette Tochterzelle umschließt. Dies steht im Gegensatz zum IMC im Gametozyten und in anderen Apikomplexa, wie z. B. *Eimeria* und *T. gondii*, bei denen der IMC aus 10–15 alveolaren Platten besteht, welche über Nähte verbunden sind (Dubremetz und Torpier, 1978). In *Plasmodien* wurde exklusiv das Protein Mal13P1.228 in den Nähten der Gametozyten lokalisiert.

Bis heute sind über 30 Proteine des IMC beschrieben (Kono et al., 2012). Dazu zählen neben den oben genannten Alveolinen und GAPM-Proteinen, weitere Proteine mit Transmembran-Domänen, alveolin-ähnliche Proteine und Proteine des Basalkomplexes (auf die im Folgendem näher eingegangen wird, siehe Abschnitt 1.3.4).

Die eng terminierte Biogenese des IMC verläuft während der Schizogonie parallel zur letzten Runde der Zellteilung (siehe Abschnitt 1.2.2) und der Bildung der Tochterzellen und beginnt etwa sechs Stunden vor Ruptur des Erythrozyten.

Die Biogenese des IMC erfolgt über Vesikel, die dem ER-/Golgi-Komplex entspringen (Bannister et al., 2000; Pieperhoff et al., 2015; Yeoman et al., 2011). Der Vesikeltransport ist hierbei abhängig von der kleinen GTPase Rab11b (Agop-Nersesian et al., 2009).

In *Toxoplasma* wurde gezeigt, dass die Knospung des IMC unmittelbar nach der Teilung der Zentrosome einsetzt (Hu et al., 2002). Mikroskopische Beobachtungen verschiedener IMC-Markerproteine in *P. falciparum* zeigen, dass zu Beginn der Biogenese des IMC zarte, krampfen-ähnliche, paarige Strukturen in enger räumlicher Nähe zum Zellkerns

Apikomplexe identifiziert werden, während BTP1, PF13_0225 und PF3D7_0704300 als *Plasmodium*-spezifisch gelten (Kono et al., 2016; Scharf, 2017; Winkelman, 2016). Hingegen wurden DLC (Hu et al., 2006), Centrin 2 (Hu, 2008), die Alveoline IMC 5, 8, 9 und 13 (Anderson-White et al., 2012), MSC1 und 14-3-3 (Lorestani et al., 2012) exklusiv im Basalkomplex von *T. gondii* lokalisiert.

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die bekannten Basalkomplex-Proteine in *P. falciparum* gegeben:

Morn1 (PF3D7_1031200)

Morn1 (*membrane occupation and recognition nexus 1*) ist ein innerhalb der Apikomplexe stark konserviertes Protein. Die charakterisierende Morn-Sequenz ist ein verbreitetes eukaryotisches Proteinmotiv, welches funktionell mit Membran-Membran- und Membran-Zytoskelett-Interaktionen in Zusammenhang steht (Ma et al., 2006). Die direkte Interaktion mit Phospholipiden zur Vermittlung von Membranassoziationen wird ebenfalls diskutiert (Takeshima et al., 2000).

Morn1 markiert in *Toxoplasma gondii* und *P. falciparum* den Basalkomplex (Ferguson et al., 2008; Gubbels et al., 2006; Kono et al., 2016; Lorestani et al., 2010). Gleichzeitig ist es mit dem Spindelpol sowie dem MTOCs assoziiert (Hu et al. 2006). Während der Zellteilung wandert es als Bestandteil des Basalkomplexes als dynamische Ringstruktur über den Zellkern. Des Weiteren wurde gezeigt, dass es mit dem zytoskeletalen Motorprotein Myosin C interagiert (Gubbels et al., 2006).

Funktionelle Untersuchungen von Morn1 in *T. gondii* zeigen, dass eine Überexpression des Proteins zu Defekten bei der Zellteilung und bei der Tochterzellbildung führt (Ferguson et al., 2008; Lorestani et al., 2010). Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine konditionelle Deletion des Gens zu Defekten bei der Teilung des Apicoplasten sowie unvollständig geteilten Tochterparasiten führt, während die Kernteilung nicht betroffen ist (Gubbels et al., 2006).

Die diverse Lokalisation von Morn1 sowie die konservierte Funktion des Morn-Motivs in anderen Systemen qualifizieren Morn1 als wichtiges Gerüstprotein bei der Tochterzellbildung.

PfBTP1 (PF3D7_0611600)

BTP1 wurde im Rahmen eines Screens nach Invasions-relevanten *P. falciparum*-Proteinen identifiziert (Hu et al., 2010). Das *Plasmodien*-spezifische Protein kolokalisiert teilweise mit Morn1, zeigt eine basalkomplextypische Dynamik sowie eine Lokalisation in der „Wachstumszone“ des IMC (Konto et al., 2016). Es besitzt vier Transmembrandomänen

und einen stark phosphorylierten N-Terminus, der die Interaktion mit anderen Proteinen bzw. Membranen vermitteln könnte.

HAD2 (PF3D7_1205200)

Das Basalkomplex-Protein HAD2 (*haloacid dehalogenase*) wurde als Homolog zu TgHAD2 identifiziert (Engelberg et al., 2016). Es zeigt ebenfalls eine Basalkomplex-typische Dynamik. Proteine der HAD-Familie sind stark konserviert und wichtig für u. a. die Regulation des Zytoskeletts.

BTP2 (PF3D7_0704300)

BTP2 wurde im Rahmen einer Transkriptionsanalyse identifiziert (Gilberger Labor, nicht publizierte Daten). Es besitzt drei N-terminale Transmembrandomänen und zeigt eine Basalkomplex-typische Dynamik. Ebenso wie BTP1 ist es *Plasmodien*-spezifisch.

PF13_0225 (PF3D7_1341500)

Bei PF13_0225 handelt es sich um das Homolog eines in *T. gondii* beschriebenen Proteins, welches dort bemerkenswerterweise in den Nähten benachbarter IMC-Platten lokalisiert ist (Chen et al., 2015). PF13_0225 zeigt eine typische Lokalisation im Basalkomplex während der Schizogonie. Allerdings konnte gezeigt werden, dass das Protein nicht essentiell für die Proliferation von *P. falciparum* ist (Winkelman, 2016).

1.3.5 Transportprozesse in *P. falciparum* – Mikrotubuli und Kinesine als Motor der IMC-Migration?

Auf zellulärer Ebene sind am Transport von Cargo, Organellen und Vesikeln verschiedene Bestandteile des Zytoskeletts beteiligt, wie z. B. Aktin, Intermediärfilamente und Mikrotubuli und die mit ihnen assoziierten Motorproteine: Myosine, Kinesine und Dyneine. Welche dieser Zytoskelettbestandteile die IMC-Migration in *Plasmodien* vermitteln, ist unbekannt.

Aktin vermittelt in *Plasmodien* u.a. die Invasion in die Wirtszellen (Miller et al., 1979) und ist weiterhin in endozytotische Prozesse involviert (Römer et al., 2010). Den Transport entlang dieser Aktinfilamente vermitteln klassischerweise die Myosine als Motorproteine. Klassische Intermediärfilamente finden sich nicht in *Plasmodien* (Morrisette und Sibley, 2002a).

Mikrotubuli bilden sich in *Plasmodien* im Schizontenstadium aus. Hier liegen zwei Formen von Mikrotubuli vor: die Spindelmikrotubuli, verantwortlich für Prozesse während der Zellteilung (siehe Abschnitt 1.2.2), und die subpellikularen Mikrotubuli (siehe Abschnitt 1.3.3). Die subpellikularen Mikrotubuli folgen dabei der birnenförmigen Form des Merozoiten und geben dem Parasiten Form und Polarität (Taraschi et al., 1998). Die Bedeutung der Mikrotubuli für die Tochterzellformierung und IMC-Biogenese wird

durch die Beobachtung gestützt, dass in mit Oryzalin behandelten Parasiten ohne subpellikuläre Mikrotubuli der IMC zwar ausgebildet wird, diese jedoch als Fragment im Zytoplasma vorliegt (Taraschi et al., 1998).

Die polaren Mikrotubuli entstehen durch Polymerisation von $\alpha\beta$ -Tubulin-Dimeren um einen Polymerisationskern aus γ -Tubulin, dem MTOC. Hier entspringt ein dynamisches Netzwerk von Mikrotubuli-Filamenten. Typischerweise sind diese mit ihrem (-)-Pol im MTOC verankert (Morrisette und Sibley, 2002b). Mikrotubuli sind intrazelluläre Tracks für zwei Klassen von Motorproteinen, den Kinesinen (Transport in (+)-Richtung) und den Dyneinen (Transport in (-)-Richtung/retrograder Transport). Diese Motorproteine binden die Mikrotubuli und transportieren verschiedenen Zellbestandteile (Stokkermans et al., 1996).

Während eine Studie von Daher und Kollegen gezeigt hat, dass Dyneine in erster Linie Aktin und Myosin binden (Daher et al., 2010), hat eine Studie von Fowler Dynein am apikalen Pol des Merozoiten detektiert (Fowler et al., 2001), was einen Hinweis auf eine Transportfunktion zu den apikalen Organellen gibt.

In Säugerzellen sind ca. 45 Kinesine beschrieben, die in 14 Superfamilien eingeteilt sind (Wickstead et al., 2010), hingegen sind im Genom von *P. falciparum* lediglich neun Kinesine kodiert, die zu den Familien 5, 8 und 13 gehören. Diese sind allerdings kaum untersucht. Lediglich eine Publikation zeigt Kinesin 5 als mögliche Zielstruktur eines antiplasmodialen Wirkstoffs auf (Liu et al., 2014).

1.4 Ziel der Arbeit

Der IMC von *P. falciparum* ist essentiell für die Invasion, Replikation und Struktur des Parasiten und somit ein Schlüsselfaktor für dessen erfolgreiche Vermehrung im Blut des Menschen und für die Übertragung auf die Mücke.

Ziel dieser Arbeit ist die:

- funktionelle Charakterisierung des Basalkomplexes
- Untersuchung des Abbaus des IMC nach erfolgreicher Invasion

Kapitel 2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Plasmodien- und Bakterien-Stämme

<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	Klon eines NF54 Isolates (MR4-1000) isoliert aus einem Malaria Patienten wohnhaft in der Nähe von Schipol (Amsterdam/Niederlande) (Walliker et al., 1987)
<i>Escherichia coli</i> XL-10 Gold	Tetr Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMRmrr) 173endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte[F'proAB lacIq Z Δ M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller/Vertrieb
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid/Bislösung (40 %)	Roth, Karlsruhe
Agar LB (Lennox)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Albumax II	Gibco, Life Technologies, USA
Ampicillin	Roche, Mannheim
Ammonium Persulfat (APS)	Applichem, Darmstadt
Bacto™ Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto™ Pepton	Becton Dickinson, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Biotin	Sigma, Steinheim
Blasticidin S	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenol Blau	Merck, Darmstadt
Concanavalin A G-250	Sigma-Aldrich, Steinheim

Desoxynukleotide (dNTPs)	Thermo Scientific
Dako Fluoreszenz Abdeckmedium	DAKO, Hamburg
Dihydroethidium (DHE)	Cayman, Ann Arbor, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Pan Biotech, Aidenbach
DSM1	BEI resources
4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)	Roche, Mannheim
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
1,4,-Dithiothreitol (DTT)	Roche, Mannheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid-Lösung 0.025 %	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Merck, Darmstadt
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Biomol, Hamburg
Gentamycin	Ratiopharm, Ulm
Glutardialdehyd (25 %)	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roche, Mannheim
Hypoxantin	Biomol, Hamburg
Hoechst33342	Cheomdex, Switzerland
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
MG-132	Sigma-Aldrich, Steinheim
b-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (Temed)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Natrimdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Neomycin, G418	Sigma-Aldrich, Steinheim

Percoll	GE Healthcare, Sweden
RPMI (Roswell Park Memorial Institute)- Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Pyr-41	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rapalog (A/C Heterodimerizer AP21967)	Clontech, Mountain View, USA
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sorbitol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Trisbase	Roth, Karlsruhe
Tris-EDTA (TE)	Invitrogen, Karlsruhe
Triton X-100	Biomol, Hamburg
Tween 20	Merck, Darmstadt
WR99210	Jacobus Pharmaceuticals, Maryland, USA
Wasser (Ampuwa)	Fresenius Kabi, Bad Homburg

2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller/Vertrieb
Deckgläschen, 13 mm	Engelbrecht, Furth
Einwegkanülen	Braun, Melsungen
Einwegspritzen	Braun, Melsungen
Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Falcon Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht-Rommelsdorf
Glasobjektträger	Roth, Karlsruhe
Glasperlen	Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nürmbrecht-Rommelsdorf
Kunststoffpipetten (5,10 und 25 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht-Rommelsdorf
Kulturflaschen (50 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht-Rommelsdorf
Latexhandschuhe	Shield Scientific, ND Bennekom, NL
Nitrilhandschuhe	Kimberly Clark, Koblenz-Rheinhafen
Nitrocellulose Blotting Membran Protean	GE Healthcare
Parafilm® M 4 in. X 125 ft	Sigma-Aldrich, Steinheim

Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg-Rommelsdorf
Reaktionsgefäße für Flow Cytometry	Sarstedt, Nürnberg-Rommelsdorf
Petrischalen (5 und 10 ml)	Sarstedt, Nürnberg-Rommelsdorf
Pipettenspitzen (20, 200, 1000 µl)	Sarstedt, Nürnberg-Rommelsdorf
Pipettenspitzen (10 µl)	Greiner, Solingen-Wald
Skalpell	Braun, Tuttlingen
Sterilfilter (0,22 µm)	Sarstedt, Nürnberg-Rommelsdorf
Transfektionsküvetten	Bio Rad, München
Whatman Filterpapier	GE Healthcare Life Science, Amersham

Tabelle 3: Geräte

Gerät/Spezifikation	Hersteller/Vertrieb
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Eismaschine AF-10	Scotsman, Vernon Hills, USA
Elektroblotter	Biorad, München
Elektroporator Nucleofector II AD-1001N	Amaxa Biosystems, Germany
Entwickler Chemidoc XRS+	Bio-Rad, München
Feinwaage SBA 32	Scaltec, Göttingen
Fluoreszenz-Mikroskop Axio Imager. M1,	Zeiss, Jena
Flieszytometer LSRll	BD Instruments, USA
Gelelektrophorese und SDS-PAGE	Biorad, München
Zubehör	
Hamatsu-Digitalkamera C4742-95	Hamamatsu Photonics K.K., Japan
Inkubatoren:	
Bakterien Inkubator (CO-150, CO ₂	
Inkubator)	New Brunswick Scientific
<i>Plasmodien</i> Inkubator	Heratherm IGS400, Thermo Scientific,
	Langenselbold
Magnetrührer RSM-10HP	PHOENIX Instrumente
Mikrowelle Micromaxx MM41568	Medion, Mülheim
Milli-Q Reinstwasseranlage	Millipore, Bedford, USA
Mikroskope:	
Konfokales Mikroskop Olympus FV1000	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Axioscope 1	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop Axio Lab A1	Zeiss, Jena
N-SIM	Nikon

Netzspannungsgerät	Consort, Deisenhofen
PCR Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
pH 211 Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Kehl
Schüttelinkubator GFL 1083	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank Sterile Gard III Advance	Baker Company, USA
Sterilbank Save 2020	Thermo Scientific
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia NY, USA
VarioMACs	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifugen:	
Eppendorf 5415 D	Eppendorf, Hamburg
J2-MI Ultrazentrifuge	Beckman, München
Megafuge 1,0R, Rotor 2705	Heraeus, Hanau
Sorvall Evolution, SS34-Rotor	Du Pont Instruments, Bad Homburg

2.1.4 Größenstandards, Enzyme und Oligonukleotide

Tabelle 4: Größenstandards, Enzyme, Oligonukleotide

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
1 kb DNA-Längsstandard GeneRuler™	Thermo Scientific, Schwerte
Protein-Längenstandard PageRuler™ prestained	Thermo Scientific, Schwerte
FirePol DNA Polymerase [5 U/μl]	Solis Biodyne, Taipei, Taiwan
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase [2 U/μl]	NEB, Ipswich, USA
T4 DNA-Ligase [3 U/μl]	NEB, Ipswich, USA
Restriktionsenzyme	NEB, Ipswich, USA.
Oligonukleotide	Sigma Aldrich, Steinheim

2.1.5 Fertige Versuchsansätze

Tabelle 5: Kits

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden

Western Blot ECL-Clarity Detektions Kit	Bio-Rad, USA
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren

2.1.6 Antikörper

Tabelle 6: Primärantikörper

Antigen	Organismus	Verdünnung	Anwendung	Quelle
GFP	Maus	1:1000	Westernblot/ IFA	Roche, Mannheim
GFP	Kaninchen	1:1000	IFA	Thermo Scientific
GAPM2	Maus	1:2000	IFA	Dr. Kono, BNITM, Hamburg
α -Tubulin	Maus	1:1000	IFA	Roche, Mannheim
Rex1	Kaninchen	1:5000	IFA	Hawthorne et al., 2004

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Antigen	Organismus/ Konjugat	Verdünnung	Anwendung	Quelle
Maus	Kaninchen/HRP	1:3000	Westernblot	Dianova
Maus	Ziege/Alexa 488	1:2000	IFA	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Kaninchen	Ziege/Alexa 594	1:2000	IFA	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Maus	Esel/Alexa 647	1:2000	IFA	Life Technologies, USA

2.1.7 Software

Tabelle 8: Software und Datenbanken

Software	Hersteller/Vertrieb
Adobe®Photoshop®	Adobe Systems, San Jose, USA

Adobe®Illustrator®	Adobe Systems, San Jose, USA
AxioVision 40 V 4.7.0.0	Zeiss
ApE plasmid editor	http://biologylabs.utah.edu/orgensen/wayned/ape/
Image Lab v 5.2.1	BioRad Laboratories
FACS Diva v 6.1.3	BD Bioscience
BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
MS Office	Microsoft
PlasmodDB	Frei verfügbar
ImageJ/Jacob	Frei verfügbar

2.1.8 Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 9: Medien für mikrobiologische Methoden

Lösung	Zusammensetzung
Antibiotika	Ampicillin 100 mg/ml in 70 % Ethanol
LB-Medium	10 g NaCl, 5 g Pepton, 10 g Hefeextrakt; ad 1 l dH ₂ O
LB-Platten	7,5 g Agar; ad 1 l LB-Medium
LB _{AMP} -Medium/LB _{AMP} -Agar	LB-Medium bzw. Agar wird nach dem Autokalvieren mit Ampicillin versetzt (Endkonzentration 100 µg/ml)
Glycerinstabilat	50 % (v/v) Glycerin in dH ₂ O
Lösung I: TFB I	4,08 g NaAc, 9,89 g MnCl ₂ , 5,84 g NaCl, 1,47 g CaCl ₂ , 15 % (v/v) Glycerin; ad 1 l dH ₂ O
Lösung II: TFB II	2,1 g MOPS, 11,03 g CaCl ₂ , 0,58 g NaCl, 15 (v/v) Glycerin; ad 1 l dH ₂ O

Tabelle 10: Medien für molekularbiologische Methoden

Lösung	Zusammensetzung
Natriumacetat	13,6 g NaAc, pH 4,6; ad 100 ml dH ₂ O
TE-Puffer	1,21 g Tris-HCl pH 8,0, 0,37 g EDTA pH 8,0; ad 1 l dH ₂ O
50xTAE-Puffer	242 g Trisbase, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5M

6xDNA-Probenpuffer	EDTA; ad 1 l dH ₂ O 2,5 % Bromphenolblau, 2,5 % Xylencyanol, 40 % (v/v) Glycerin; ad 1 l dH ₂ O
--------------------	---

Tabelle 11: Medien für zellbiologische Methoden

Lösung	Zusammensetzung
RPMI-Komplett Medium	15,87 g RPMI1640, 0,218 g Glukose, 10 g AlbumaxII, 27,2 mg Hypoxanthin, 0,5 ml Gentamycin (40 mg/ml), pH 7,4; ad 1 l ddH ₂ O
Amaxa Transfektionspuffer	90 mM NaPO ₄ , 5 mM KCl, 0.15 mM CaCl ₂ , 50 mM HEPES, pH7.3 in dH ₂ O, sterile filtered
Giemsa-Lösung (10 %)	10 ml Giemsa + 90 ml H ₂ O
Synchronisations-Lösung	200 g D-Sorbitol; ad 1 l dH ₂ O
Kryo-Stabilisierungs-Lösung	37,8 g D-Sorbitol, 8,1 g NaCl, 35 % Glycerin; ad 1 l dH ₂ O
Auftau-Lösung	35 g NaCl; ad 1 l dH ₂ O
Selektiver Lysispuffer	0,3 % (w/v) Saponin in 1xPBS
Blutkonserve	humanes Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe o+ (Blutbank Eppendorf, Hamburg)
WR99210 Stock-Lösung	7,89 mg (20 mM) in 1 ml DMSO
Blasticidin S (BSD) Gebrauchs-Lösung	5 mg/ml BSD in RPMI Medium steril filtriert
G418 Gebrauchs-Lösung	50 mg/ml in RPMI Medium steril filtriert
DSM1 Stock-Lösung (50x)	187,5 mM DSM1 in DMSO
Fixier-Lösung	2 ml 10 % Formaldehyd, 1,5 µl 25 % Glutaraldehyd, 500 µl 10xPBS; ad 5,0 ml dH ₂ O
Permeabilisierungs-Lösung	0,1 % (v/v) Triton in 1xPBS
Blockierungs-Lösung	1,5 g BSA; ad 50 ml 1xPBS
Percoll-Lösung	90 % (v/v) Percoll, 10 % (v/v) 10x PBS
Rapalog (AP21967)-Lösung	500 mM in Ethanol
FAC Stop-Lösung	0.5 µl Glutaraldehyde (25 %) in 40ml RPMI Medium

Tabelle 12: Medien für biochemische Methoden

Lösung	Zusammensetzung
Elektrophoresepuffer	250 mM Tris base, 1,92 M Glycine, 1 % (w/v) SDS in dH ₂ O
Trenngelpuffer	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 in dH ₂ O
Sammelgelpuffer	1 M Tris-HCl, pH 6.8 in dH ₂ O
Ammonium persulfate (APS)	10 % (w/v) in dH ₂ O
6 x SDS sample buffer	375 mM tris HCl pH 6.8, 12 % (w/v) SDS, 60 % (v/v) Glycerol, 0.6 M DTT, 0.06 % (w/v) Bromophenolblau
Westernblot-Transferpuffer (10X)	250 mM Tris-Base, 1,92 M Glycerol, 0.1 % (w/v) SDS in dH ₂ O
Westernblot-Transferpuffer (1X)	10 % 10xWesterblot-Transferpuffer, 20 % Methanol in dH ₂ O

2.1.9 Vektoren und Oligonukleotide

SLI-Vektor (Birnbaum et al., 2017)

Dieses Plasmid beruht ursprünglich auf dem pARL 1a-GFP-Vektor (Crabb et al., 2004a) und wurde genutzt, um ein *gene of interest* (GOI) über homologe Rekombination schnell und effizient endogen mit GFP zu fusionieren. Die zu integrierende Gensequenz wird über die Restriktionsschnittstellen *notI/mluI* in den Vektor kloniert.

Der Vektor kann zunächst in *E. coli* transformiert werden, wo das β -Laktamase Resistenzgen die Selektion der transformierten Zellen mithilfe des Antibiotikums Ampicillin ermöglicht. Auf dem Plasmid kodieren weiterhin die beiden Selektionsmarker humane Dehydrofolat Reduktase (hDHFR) und die Neomycin Phosphotransferase II. Nach Transfektion in *P. falciparum* erfolgt die Expression der hDHFR, die Resistenz gegen WR99210 vermittelt. Die Neomycin Phosphotransferase II wird erst nach der korrekten Integration des GOI und dessen Expression unter dem endogenem Promoter exprimiert. Vermittelt wird dies über ein sogenanntes Skip-Peptid. Die Selektion von Parasiten mit integriertem Plasmid wird durch Zugabe von Neomycin (G418) erreicht.

In dieser Arbeit werden ebenfalls zwei modifizierte Plasmide verwendet. Der SLI_2xFKBP_GFP Vektor besitzt zusätzlich zwei FKBP-Domänen zwischen GOI und GFP, der 8.pSLI_1406300_GFP_glmS_m9 Vektor kodiert zusätzlich das *glmS*-Ribozym. Bei diesen beiden Vektoren wird das GOI über die *notI* und *avrII* Schnittstelle in den Vektor eingebracht.

Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
pA55sense	GGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGG
pA_as	CAGTTATAAATACAATCAATTGG
GFP272as	CCTTCGGGCATGGCACTC
Kinesin 5 s 933 bp Not	GCGCGCGGCCGCATGGATCAAGGTCATGATC
K5 TGD ll Mlul 1239 bp	GCGCACGCGTGATACATATCATTATTCCTATTTT TATCTAC
kin5 TGD as mlul	GCGCACGCGTCTCATCTACTATTTGGTAAATATAATTA TTG
Kinesin5 inte check 1226	ATGAATTTTATCTAAATATAAAGGATG
Kinesin 7 as avrll	GCGCCCTAGGATGTAACATTTGATTAC
Kinesin 7 s 999 bp Not	GCGCGCGGCCGCTTAGAAAATGAGGGAAACAG
Kinesin 7 intecheck 1285	GGAATTAGTAGAATCCATATCTG
Kinesin-8 as avrll	GCGCCCTAGGTTTCTTTGAAGTGATCGGAAC
Kinesin 8 intecheck 976	TATTATATCACAAATTTGGTG
Kinesin 8.2 as avr	GCGCCCTAGGCATTTTCTTTTTAATTTTTTTTTTC TTTACATATAAAG
Kinesin 8.2. 1052 bp notl	GCGCGCGGCCGCATAAGGTCGGATTATCTGCCG AAGG
Kinesin8.2 intecheck 1612 bp	ACAAGATATTACTATGTATGATCAACTTGTC
Kinesin 8.2 TGD notl	GCGCGCGGCCGCTAAATGTATGTATGTATACATA TGAGCAC
Kinesin 8.2 TGD 346 bp	GCGCACGCGTTTATATTATTATTTATATATTTTG TG
Kinesin 13 as avrll	GCGCCCTAGGTTTTTTGTGTATATTGTTG
Kinesin 13 s 1033 bp Not	GCGCGCGGCCGCTGATTATTGTCACAATG
Kinesin 13 intecheck 1330	TATTATTCAAATAGGAACGATTTTG
Kinesin 13 TGD s avrll	GCGCGCGGCCGCUAATTTAAGAAAACGATGCAG CAG
Kinesin 13 TGD as mlul	GCGCACGCGTACCGTATCATCAAAAACTTTATC
Kinesin-19 s 1071bp notl	GCGCGCGGCCGCTATATAATAAAGAAATAG
Kinesin-19 as avr ll	GCGCCCTAGGTTCAAACCTCCTAATGGATC
Kinesin 19 inte check 1369	TATTGAATTTGATAAATATAACAG
Morn1 notl s	GCGCGCGGCCGCGATGTATATATAGGAG
Morn1 avrll k-s as	GCGCCCTAGGCAAGTCGGGGTTCGTTCC

Mal13P1.228 as Avrll	GCGCCCTAGGTATCAATACTGTATTATCCTTAAC
Mal13P1.228 s notl	GCGCGGTACCATGGAGAAAATAGAGAAAAATTT TG
PfBTP1 notl s ksidew	GCGCCCTAGGTTTAGTTGATACTGAT
BTP1 s not 1071bp	GCGCgcgccgcTAAGAAAATGAAAAGGAAACACA AAACATG
BTP1 as avrll	GCGCccctaggTTTAGTTGATACTGATTTTTTTATAT TTTTTTC
BTP2 s 1074 notl	GCGCgcgccgcTAAGGTGTAAAAAATGATGGTGT AAAAAATG
BTP2 as avrll	GCGCccctaggTTTTTTTTTATTTTTTTTTCTGTTATT TTTTTTGTGCTTTTATTCTT
HAD2 s notl 285bp	GCGCgcgccgcTAAGTTCAAGGTATACCGAATCGT GCAGTG
HAD2 as avrll	GCGCccctaggTACATTCTTAATAGAATTATAATTTT TATAC
Morn not s 852 bp	GCGCgcgccgcTAATGGGAGAATGGGAAGATAAA TGGATTTGG
Morn as avr	GCGCccctaggTAACAAGTCGGGGTCGTTCCAGGGG GAAG
Morn1 TGD not s	GCGCgcgccgcTAAACTGAAGTAACACACTGCTAC AATGG
Morn1 TGD mlul as	GCGCcacggtTTCATATTTATCACCATTATTATAAC
HAD2 TGD not s	GCGCgcgccgcTAAGATAGAATGAAATGTGTCTAC
HAD2 TGD mlul as	GCGCcacggtAGGTTTATTGTATAATAAATTGTTAT TAC

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Die in den folgenden Versuchen verwendeten Lösungen und Gebrauchsgegenstände wurden bei 12 °C und 1,5 bar Dampfdruck sterilisiert. Zum Sterilisieren von hitzelabilen

Flüssigkeiten wurden diese unter Verwendung einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert.

2.2.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

(Hanahan, 1983)

Zur Herstellung sogenannter „chemisch kompetenter“ *Escherichia coli*-Bakterien, die zur Aufnahme und Vervielfältigung von Plasmid-DNA fähig sind, wurde ein Protokoll von Hanahan verwendet. Hierbei wird durch die Calcium-Chlorid-Methode die Plasmamembran und Zellwand der Bakterien destabilisiert, um die Effizienz der Aufnahme von Fremd-DNA zu steigern.

Hierfür wurden 10 ml einer 20 ml *E. coli* XL10 Gold-Übernachtskultur in 200 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5–0,6 kultiviert. Im Anschluss wurden die Bakterien bei 2400 g für 20 min bei 4 °C geerntet und das entstandene Bakterienpellet in 60 ml eiskalter TFB1-Lösung resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt und Resuspension in 8 ml TFB2-Lösung. Abschließend wurden die Bakterien aliquotiert (100 µl/1,5 ml Eppendorf-Gefäß) und bei –80 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.2.1.3 Anzucht und Lagerung von *E. coli*

E. coli werden auf LB-Agarplatten bzw. in LB-Medium kultiviert. Zur Selektion von Bakterien mit aufgenommenem Plasmid wurde das Antibiotikum Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml im Medium verwendet.

Die Isolation von Einzelkolonien erfolgte durch Ausstreichen einer Flüssigkultur auf LB_{Amp}-Agarplatten und Inkubation bei 37 °C über Nacht. Zur Vervielfältigung der Plasmide wurden die vereinzelt Bakterien dieser Kultur in entsprechende Mengen LB_{Amp}-Medium gegeben (2 ml für eine Mini-Präparation und 200 ml für eine Midi-Präparation) und bei 37 °C und 1000 rpm im Schüttler über Nacht kultiviert.

Zur dauerhaften Lagerung von *E. coli* wurden 500 µl einer Übernachtskultur in 500 µl 50%iges Glycerol gegeben und bei –80 °C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Mullis und Faloona, 1987)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten von genomischer Parasiten-DNA wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt. Hierfür wurden spezifische Oligonukleotid-Paare verwendet, welche in Tabelle 13 (Abschnitt 2.1.9) aufgelistet sind. Für eine präparative PCR, mit dem Ziel einer nachfolgenden Klonierung, wurde die Phusion®-Polymerase (NEB) verwendet, da diese eine Korrekturlesefunktion besitzt. Für analytische PCRs, zum Nachweis von spezifischen DNA-Fragmenten, wurde hingegen eine Firepol®-Polymerase (Solis Biodyne) genutzt.

Die Zusammensetzung des standardisierten Reaktionsmixes für die präparative sowie für die analytische PCR ist in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Standardisierte Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die präparative sowie für die analytische PCR

	Präparative PCR	Analytische PCR
Reaktionspuffer (5x)	10 µl	2 µl
MgCl ²⁺	-	1 µl
dNTPs (10 mM)	5 µl	1 µl
Oligonukleotid (10 µM)	je 2 µl	Je 0,2 µl
Polymerase (2 U/µl)	0,2 µl (2 U/µl)	0,05 (5 U/µl)
Ausgangs-DNA	50 ng	1/4 Kolonie
ddH ₂ O	Ad 50 µl	Ad 10 µl

Die Spezifikationen der PCR, d. h. die Dauer und Anzahl der verwendeten Zyklen sowie die verwendeten Temperaturen wurden an die Primer, die verwendete Polymerase und das zu amplifizierende Fragment angepasst. Ein beispielhaftes Programm ist in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: PCR-Programm

	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing (25-30 Zyklen)	42 – 60 °C	30 sec
Elongation	52 – 72 °C	x min (1 min/1 kbp)

Nachfolgend wurden die PCR-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.2.8) auf ihre korrekte Größe hin untersucht

2.2.2.2 PCR-Produktaufreinigung

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten, aber auch von verdauten PCR-Fragmenten und Vektoren wurde das NucleoSpin Gel and PCR clean up® Kit von Marcherey-Nagel benutzt. Hierfür wurde nach Anweisung des Herstellers gearbeitet und anschließend das DNA-Fragment in der entsprechenden Menge Wasser eluiert.

2.2.2.3 Restriktionsverdau und Ligation von PCR-Produkt und Vektor

DNA-Rekombinationstechniken nutzen verschiedene Enzyme um PCR-Produkt und Vektor miteinander zu rekombinieren. Restriktionsenzyme werden genutzt, um einzelsträngige DNA-Überhänge zu erzeugen. Diese können mithilfe von Ligasen in Vektoren ligiert werden. Des Weiteren wurden analytische Verdaue genutzt, um die korrekte Zusammensetzung von Vektoren zu testen.

Für einen Verdau wurde ein Reaktionsansatz von 50 µl gewählt. Hierzu wurden jeweils 1 µl des gewünschten Restriktionsenzym sowie 5 µl des jeweils optimalen 10xNEB Puffers verwendet. Basis bildete jeweils das in Wasser eluierte PCR-Produkt, bzw. der Vektor. Nach einem 1-stündigen Verdau bei 37 °C wurden die DNA-Fragmente aufgereinigt und in die Ligation eingesetzt. Für analytische Verdaue erfolgte die Kontrolle der Restriktionsfragmente mithilfe eines Agarosegels.

Die Ligation erfolgte mithilfe der T4 Ligase. Plasmid und PCR-Fragment wurden im Verhältnis von 1:10 eingesetzt und unter Zugabe von 1 µl 10xPuffer und 1 µl Ligase für 20 min bei RT ligiert.

Die genutzten Vektoren sind in Abschnitt 2.1.9 aufgelistet.

2.2.2.4 Transformation von DNA in *E. coli*

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

Die Vervielfältigung von Plasmiden erfolgte in *E. coli* vom Stamm XL-Gold. Hierfür werden die Plasmide zuerst durch Transformation in kompetente *E. coli* übertragen und dann mithilfe eines Selektionsmarkers selektioniert.

Die Transformation erfolgte über die Hitzeschock-Methode. Hierfür wurde der

Ligationsansatz aus Abschnitt 2.2.1.7 mit 100 µl kompetenten *E. coli* für eine Minute auf Eis inkubiert und dann durch einen 45-sekündigen Hitzeschock (42 °C) die Aufnahme der Plasmide durch die Bakterien induziert. Nach einer 1-minütigen Regenerationsphase auf Eis wurden die Bakterien für 30 min in LB-Medium ohne Selektionsmarker bei 37 °C geschüttelt, um sie dann auf LB-Amp-Platten auszuplatieren und über Nacht im Inkubator bei 37° C zu inkubieren.

2.2.2.5 Plasmidisolierung (Mini- und Midipräparation)

Nach der Überprüfung einer korrekten Ligation von PCR-Fragment und Vektor mittels analytischer PCR (Abschnitt 2.2.1.5) bzw. Sequenzierung (Abschnitt 2.2.1.10) wurden die Plasmide vervielfältigt und dann mittels Mini- bzw. Midipräparation aufgereinigt. Hierfür wurden das Nucleo Spin Plasmid Kit® (2 ml Kulturansatz) bzw. das QIAfilter Plasmid Kit® (200 µl Kulturansatz) von Qiagen verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.2.6 Sequenzierung der Plasmide

Zur Überprüfung der korrekten Sequenz und Klonierung des Inserts in den Vektor wurde das Plasmid durch das SeqLab Labor in Göttingen sequenziert. Ausgelesen wurden jeweils ca. 1000 Basenpaare nach einer Fluoreszenzfarbstoff-basierten Methode. Hierfür wurden 3 µl einer Plasmidpräparation und jeweils 2 µl entsprechender Sequenzierungsprimer in einem Gesamtansatz von 15 µl eingeschickt.

2.2.2.7 Isolierung genomischer DNA

Um bei der Generierung von stabil integrierten Zelllinien die korrekte Integration des Plasmids in den genomischen Lokus von *P. falciparum* zu bestätigen wurde genomische DNA isoliert. Hierfür wurden 5 ml Parasitenkultur geerntet und für 3 min bei 1800 g zentrifugiert. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit® nach Gebrauchsanweisung.

2.2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

(Garoff und Ansorge, 1981)

Der Erfolg von PCR und Restriktionsverdau wurde über eine analytische Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes erfolgt hierbei die Auftrennung der doppelsträngigen DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgrund von unterschiedlichen Wandergeschwindigkeiten im Gel.

Für ein 1%iges Agarosegel wurde 1 g Agarose in 1xTAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Zu der Lösung wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µg/ml gegeben und in eine Agarose-Gelkammer mit entsprechenden Kämmen gegossen. Nach vollständigem Aushärten des Gels wurde dieses in eine mit 1xTAE-Puffer gefüllte Agarosekammer gegeben und mit den mit 6xLaufpuffer versetzten Proben beladen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte für 30 min bei einer Spannung von 100 V. Das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid wurde nach Anregung durch UV-Licht sichtbar gemacht und die Größe der Fragmente durch einen mitgelaufenen GeneRuler™1kb DNA-Größenstandard bestimmt.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von *P. falciparum*

(W. Trager und J. B. Jensen, 1976)

Die *P. falciparum* (Stamm 3D7) Blutzellkultur wurde in Petrischalen mit einer Größe von 15x60 mm (5 ml Volumen) oder 14x90 (10 ml Volumen) in RPMI-Komplettmedium unter Zugabe von 5 % humanen Erythrozyten der Blutgruppe o+ bei 37 °C kultiviert. Um die Gegebenheiten im menschlichen Körper nachzuempfinden, wurden in den Anzuchtboxen ein hohes Kohlenstoffdioxidlevel und ein niedriges Sauerstofflevel hergestellt (5 % O₂, 5 % CO₂, 90 % N₂).

Die Selektion transgener Parasiten erfolgte über Antifolat WR99210 (3 nM), Blasticidin S (2 µg/ml) bzw. DSM1 (0,9 µM) oder G418 (400 µg/ml).

Unter den genannten Kulturbedingungen wurden Parasitämien von 1 % eingestellt und jeden zweiten Tag verdünnt. Unter Versuchsbedingungen wurden die benötigten Parasitämien entsprechend angeglichen.

2.2.3.2 Giemsa-Färbung von Blutausstrichen

(Giemsa, 1904)

Zur Beurteilung von Parasitämie und Gesamtzustand der Kultur wurden Blutausstriche angefertigt und mit Giemsa angefärbt. Hierfür wurden etwa 0,5 µl der sedimentierten roten Blutzellen aus der Kultur auf einen Objektträger gegeben und mit einem zweiten Objektträger ausgestrichen, sodass eine einfache Lage von roten Blutzellen entstand. Dieser Objektträger wurde getrocknet, für 30 sec mit Methanol fixiert und dann für mindestens 10 min in 10%iger Giemsa-Färbelösung inkubiert. Zur Entfernung der Färbelösung wurden die Objektträger mit Leitungswasser abgespült und dann die Parasitenkultur lichtmikroskopisch beurteilt.

2.2.3.3 Langzeit-Lagerung von Parasiten (Einfrieren und Auftauen)

(Lambros und Vanderbert, 1979)

In flüssigem Stickstoff ist die Lagerung von Parasiten über Jahre möglich. Die mittelfristige Lagerung erfolgte bei -80 °C .

Für das Einfrieren der Parasiten wurde eine Parasitenkultur mit 5–8 % Ringstadien zentrifugiert (1800 g/3 min) und das Pellet in dem doppelten Volumen Kryo-Stabilatlösung resuspendiert. Das Einfrieren erfolgte in Kryogefäßen.

Zum Auftauen wurden diese Kryogefäße in ein Wasserbad gegeben (37 °C) und dann die infizierten Erythrozyten mit Kryo-Stabilatlösung in ein 15 ml Tube überführt. Durch Zentrifugation (3 min/1800 g) erfolgte die Trennung der Erythrozyten und der Stabilatlösung und nach Verwerfung des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml Auftau-Lösung aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet einmal mit Medium gewaschen und dann die Parasiten wieder in Kultur genommen und ein Hämatokrit von 5 % eingestellt. Bei Bedarf erfolgte die Zugabe des Selektionsmediums nach 24 h.

2.2.3.4 Synchronisation von Parasitenkulturen mit Percoll und/oder Sorbitol

(Kutner et al., 1985; Lambros und Vanderberg, 1979)

Um synchronisierte Parasitenkulturen zu erhalten, werden aus gemischten Kulturen bestimmte Entwicklungsstadien eliminiert bzw. selektioniert.

Über die Percoll-Methode werden Schizonten selektioniert. Hierfür wurden 500 µl infizierte Erythrozyten in 4 ml Medium resuspendiert und in einem 15 ml Falcon vorsichtig auf eine 60%ige Percoll-Lösung geschichtet. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm befanden sich die Schizonten auf der Percoll-Lösung, während uninfizierte rote Blutzellen sowie Ring- und Trophozoitenstadien sich am Boden des Falcons absetzten. Die Schizonten wurden mithilfe einer 10 ml Pipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einmal mit Medium gewaschen, bevor sie wieder in Kultur genommen wurden.

Hingegen werden durch die Synchronisierung mit 5%iges D-Sorbitol Parasiten des Trophozoiten- und Schizontenstadiums abgetötet. Ursache hierfür ist die Induzierung eines osmotischen Schocks. Lediglich die Ringstadien (0–18 h nach Invasion in den Erythrozyten) überleben. Hierfür wurden die infizierten Erythrozyten pelletiert (1800 g/3 min) und pro 500 µl Erythrozyten 2,5 ml 5%iges D-Sorbitol hinzugegeben. Nach 7minütiger Inkubation bei 37 °C folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt und die Parasiten wurden unter Standardbedingungen wieder in Kultur genommen.

Um unter Versuchsbedingungen ein möglichst enges Zeitfenster in der Entwicklung der Parasiten zu erhalten, wurden diese beiden Methoden kombiniert. Hierfür wurden aus 10 ml einer Parasitenkultur über einen 60%igen Percoll-Gradienten die späten Schizontenstadien gewonnen. Die Reinvasion dieser erfolgte bei 37 °C auf dem Schüttler (600 rpm). Hierfür wurden die Schizonten in 900 µl Medium aufgenommen und 80 µl frisches Blut hinzugegeben. Nach 30 min auf dem Schüttler wurden die Parasiten wieder in Kultur genommen (4 ml Medium/2 % Hämatokrit/15 mm Petrischale).

Nach 2–4 h wurde die Kultur mit 5 %igem D-Sorbitol synchronisiert, um das Zeifenster der Reinvasion auf den genannten Zeitraum zu beschränken.

2.2.3.5 Transfektion von *P. falciparum*

(Crabb und Cowman, 1996; Deitsch et al., 2001; Moon et al., 2013; Wu et al., 1995)

Für die Transfektion von Parasiten wurde das Amaxa System benutzt. Hierfür wurden 50 µg DNA einer Plasmid-Midi-Präparation präzipitiert indem zu einer entsprechenden Menge Midi-Präparation 1/10 Volumen Natriumacetat und 3 Volumen 100%iges Ethanol hinzugegeben wurden. Dann wurde das Reaktionsgefäß bei 16000 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Daraufhin wurde wiederum zentrifugiert (5 min bei 16000 g) und nach Verwerfen des Überstandes das Pellet an der Luft getrocknet. Dieses wurde dann in 10 µl sterilem TE resuspendiert und stand zur Transfektion zur Verfügung.

Für die Transfektion wurden späte, bereits segmentierte Schizonten mittels der Percoll-

Methode (siehe Abschnitt 2.2.3.3) geerntet. Nachfolgend wurden 10 µl der Schizonten in 90 µl vorgewärmtes Amaxa-Transfektionspuffer aufgenommen und mit der DNA-Lösung in eine Elektroporationsküvette überführt. Für die Elektroporation wurden der Nucleofaktor II AAD-1001N und das Programm U-033 genutzt. Nach der Elektroporation wurden die Parasiten in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 200 µl Medium und 300 µl uninifizierte rote Blutzellen vorgewärmt wurden. Dieses wurde bei 37 °C unter Schütteln für 30 min inkubiert. Abschließend wurden die Parasiten in eine 5 ml Petrischale überführt und in 5 ml Kulturmedium kultiviert. Einen Tag später wurde die entsprechende Selektionsdroge dazugegeben und für fünf Tage täglich das Medium gewechselt, danach, bis zum Erscheinen der ersten Parasiten, jeden zweiten Tag.

2.2.3.6 Selektionierung transgener Parasiten mittels der selektionsgekoppelten Integration (SLI)

(Birnbaum & Flemming et al., 2017)

Zur endogenen Integration von Genen wurde die selektionsgekoppelte Integrations-Methode (*selection linked integration*, SLI) genutzt.

Hierfür wurden Kulturen verwendet, die ein episomales Plasmid tragen und bereits über WR99210 selektiert wurden. In diesen Kulturen wurde eine Parasitämie von 2–5 % eingestellt und G418 in einer finalen Konzentration von 500 µg/ml hinzugegeben. Dann wurde für 7 Tage täglich das Medium gewechselt, danach im zweitägigen Wechsel. Wenn keine Parasiten in der Kultur gewachsen sind, wurde diese nach 60 Tagen verworfen.

Wurde das Erscheinen von Parasiten in der Kultur beobachtet wurde diese geerntet und gDNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit isoliert und die korrekte Integration des Plasmids in das Genom des Parasiten über eine PCR bestätigt.

Wurde dann noch das Wildtyp-Gen in der Kultur nachgewiesen wurde wiederum für 2 Zyklen mit WR99210 selektioniert und die PCR wiederholt.

Um die Essentialität von Proteinen zu testen wurde die SLI *targeted gene disruption*(SLI-TGD)-Methode verwendet. Hierfür wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils zwei Kulturen unter G418 Selektion gesetzt. Wurde kein korrekt integriertes Plasmid erhalten, wurde die Kultur nach 60 Tagen verworfen und das Gen als essentiell deklariert.

2.2.3.7 Parasitenaufreinigung aus einer Erythrozytenkultur

(Umlas und Fallon, 1971)

Zur Aufreinigung von Parasiten wird das Glycosid Saponin verwendet. Dieses zeigt eine

hämolytische Aktivität, indem es die Membranpermeabilität beeinflusst und so die Lyse der Erythrozyten verursacht. Da ebenfalls die parasitophore Vakuole lysiert wird, erhält man ein reines Parasitenpellet.

Zur Aufreinigung wurden 10 ml Blutkultur bei 1500 g für 5 min abzentrifugiert und das entstehende Erythrozytensediment in 1 ml 0,03%iges Saponin pro 500 µl Erythrozyten aufgenommen. Nach 10minütiger Inkubation auf Eis wurden die freigesetzten Parasiten pelletiert (5 min, 10000 g) und nachfolgend 3x mit eiskaltem 1xPBS gewaschen. Das Pellet wurde für die Westernblot-Analysen in der entsprechenden Menge reduzierendem 4xProbenpuffer aufgenommen und 5 min gekocht und das Pellet bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.3.8 Anreicherung von *P. falciparum* über eine magnetische Säule (*Variomacs*)

Aufgrund der magnetischen Eigenschaften des Hämozoins, ein Abbauprodukt welches bei der Verstoffwechslung des Wirtszell-Hämoglobins entsteht und sich im Verlauf der Entwicklung des Parasiten sammelt, lassen sich reife Parasitenstadien über eine magnetische Säule anreichern.

Zu Beginn wurde die Säule (CS, Milteny) in die Apparatur (*Variomacs*TM) eingespannt und mit PBS und Kulturmedium (ca. 50 ml) äquilibriert. Währenddessen wurde die Parasitenkultur pelletiert (10 min, 1500 rpm, ohne Bremse). Das Pellet wurde 1:2 mit Kulturmedium verdünnt und auf die Säule gegeben. Hierbei wurde die Laufgeschwindigkeit gering eingestellt, sodass ein langsamer Fluss durch die Säule gewährleistet war. Im Anschluss wurde die Säule mit Kulturmedium gewaschen, bis alle uninfizierten Erythrozyten aus der Säule entfernt waren und die Säule wurde aus der Apparatur entfernt. Die Schizonten wurden in 5 ml Medium eluiert und bei 1500 rpm 10 min ohne Bremse pelletiert und weiterverwendet.

2.2.3.9 Mislokalisierung von Proteinen in *P. falciparum*

(Birnbaum & Flemming et al., 2017)

Für die funktionelle Inaktivierung von Proteinen wurden diese im Parasiten mislokalisiert. Hierfür wurden Parasiten genutzt, welche das zu untersuchende Protein gekoppelt an eine 2xFKBP-Domäne (11kDa) sowie GFP endogen exprimieren. In diese Parasiten wurde ein episomales Plasmid transfiziert, welches eine Lokalisationsdomäne sowie FRB-Domänen und mCherry exprimiert. Als Lokalisationsdomäne wurde entweder 3xNLS (Nukleäres

Lokalisationssignal = Zellkern) bzw. der N-Terminus der Lyn Kinase (= Parasitenplasmamembran) verwendet. Die Plasmide wurde mit 2 µg/ml Blasticidin S oder 0,9 µM DSM1 selektioniert. Im Falle von Blasticidin wurde die Konzentration auf 9–18 µM angehoben (Epp et al., 2008).

Die Mislokalisierung von Proteinen wurde über die Zugabe von Rapalog (AP21967, Clontech) in einer finalen Konzentration von 250 nM induziert. Als Folge dimerisieren die FRB- und die FKBP-Domäne und das zu untersuchende Protein wird von seinem Wirkort mislokalisiert.

Die Mislokalisierung des Proteins wurde mikroskopisch bestätigt und die Auswirkung auf das Wachstum des Parasiten mittels einer Wachstumskurve über 96 h bestimmt (Abschnitt 2.2.3.10). Hierfür wurde eine Parasitenkultur auf zwei Schalen aufgeteilt. Während eine mit Rapalog behandelt wurde, diente eine unbehandelte Schale als Kontrolle.

2.2.3.10 Wachstumskurve mittels Durchflusszytometrie (FACs)

(Malleret et al., 2011)

Zur Bestimmung der Proliferation einer Parasitenkultur über einen bestimmten Zeitraum wurden Wachstumskurven mittels Durchflusszytometrie erstellt.

Hierfür wurde die Kultur auf eine Anfangsparasitämie von 0,1 % eingestellt. Diese wurde dann unter Standardbedingungen kultiviert und alle 24 h an 5 aufeinanderfolgenden Tagen die Parasitämie der Kultur mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurde der homogenisierten Kultur 20 µl Probe entnommen und mit 80 µl Medium, welches zuvor mit 1 µl DHE und 1 µl HO33341 versetzt wurde, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 400 µl FACs-Stopplösung hinzugegeben und die Parasitämie der Probe mit einem LSRII bestimmt. Das Gating ist in Malleret et al., (2011) beschrieben.

2.2.3.11 Biotinylierung von Proteinen in *P. falciparum*

Für die Identifikation von Protein-Interaktionspartnern über die BioID (*proximity based biotinylation*) werden große Mengen an Parasitenkultur geerntet und über Massenspektrometrie die Biotin-markierten Proteine analysiert.

Hierfür wurde das Zielprotein im Parasiten mit GFP sowie einer 2xFKBP-Domäne fusioniert. In diesen Parasiten wurde ebenfalls die Biotinligase BirA*_{2xFRB}_mCherry überexprimiert.

Für die Biotinylierung wurden streng synchronisierte Parasiten (siehe Abschnitt 2.2.3.4) in drei 50 ml Zellkulturflaschen kultiviert. Im Trophozoitenstadium, 24 h vor der Ernte der Parasiten, wurden diese jeweils gesplittet und mit Biotin in einer Endkonzentration von 50 mM behandelt. Gleichzeitig wurde in 3 Zellkulturflaschen („+ Rapalog“) im Parasiten die Dimerization von BirA*_2xFRBmCherry und der 2xFKBP_GFP-Domäne durch Zugabe von Rapalog in einer Endkonzentration von 250 nM induziert.

Im späten Schizontenstadium erfolgte die Ernte der Parasiten. Hierfür wurden die Schizonten mithilfe des Variomacs angereichert, lysiert, die biotinylierten Proteine isoliert und massenspektrometrisch analysiert.

2.2.3.12 Fixierung von Parasiten für die Immunfluoreszenz-Analyse (IFA) mittels Formaldehyd/Glutaraldehyd-Fixierung

(Tonkin et al., 2004)

Die Validierung der Lokalisation von Proteinen im Parasiten erfolgt fluoreszenzmikroskopisch nach deren Fixierung.

Hierfür wurden 5 ml einer Parasitenkultur geerntet (1500 rpm/3 min) und in 1 ml einer Fixierlösung (siehe Tabelle 11) aufgenommen und für 30 min inkubiert. Die Fixierlösung wurde über drei Waschschrte mit 1 x PBS (2 min/3400 rpm) ausgewaschen. Dann erfolgte die Permeabilisierung der Membran mit 0,1 % Triton. Nach 10 min wurden die Parasiten wiederum pelletiert, 3x mit PBS gewaschen und 1 h mit 3%iger BSA-Lösung blockiert. Direkt im Anschluss erfolgte die Inkubation des Primärantiköpers (Tabelle 6) für 1 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht. Nachdem wiederum 3x mit PBS gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation des sekundären Antiköpers (Tabelle 7) für 30 min. Bei dem letzten der darauffolgenden drei Waschschrte wurde DAPI in einer Konzentration von 1:1000 hinzugegeben, um den Zellkern der Parasiten zu markieren. Das Parasitenpellet wurde dann in 40 µl PBS aufgenommen und bis zur mikroskopischen Analyse (siehe 2.2.5.2) bei 4 °C gelagert.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Aufreinigung biotinylierter Proteine für die Massenspektrometrie

Zur Aufreinigung wurden ausschließlich Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf bzw. Falcon genutzt. Weiterhin wurde zur Herstellung der Puffer Ampuwa dH₂O genutzt. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die biotinylierte Parasitenkultur (beschrieben in Abschnitt 2.2.3.11) wurde geerntet und mithilfe von Saponin lysiert. Das entstandene Parasitenpellet wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und wiederholt mit DPBS gewaschen (16000 g/3 min). Die anschließende Lyse erfolgte in 2 ml Puffer (Lysis Puffer: 50 mM Tris-HCl/pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 % Triton + frisch hinzugefügtes 1 mM DDT, 2xProteaseinhibitor-Cocktail und 1 mM PMSF). Die Lysate wurden bei -80 °C bis zur finalen Aufbereitung gelagert.

Um eine effiziente Aufreinigung zu erreichen, wurden beim Auftauen insgesamt zwei sogenannte Frost-Tau-Zyklen durchgeführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (16000 g/10 min) wurde der Überstand in ein 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt und 1:2 mit 50 nM Tris-HCl pH 7,5, 2xProteaseinhibitor-Cocktail, 1 mM PMSF verdünnt. Anschließend wurden 50 µl gewaschene und in 50 nM Tris-HCl, pH 7,5 equilibrierte Sterptavidin-Sepharose-*beads* (Kügelchen aus Sepharose) hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Hierfür wurde das Falcon langsam rotiert.

Nach 16 h wurden die *beads* gewaschen. Hierfür wurden diese erst für 5 min/1600 rpm zentrifugiert, dann die *beads* in Eppendorf-Gefäße überführt. Es folgten acht weitere Waschschrte, zwischen denen die *beads* jeweils für zwei Minuten rollend inkubiert und dann für 1 min/16000 rpm herunter zentrifugiert wurden. Gewaschen wurde dabei 2x mit Lysis-Puffer, 1x Wasser, 2x Tris-HCl/pH 7.5, 3x TEAB/pH 7.5.

Nachfolgend wurde in einem neuen Reaktionsgefäß eine Markierung in der Höhe von 200 µl angebracht, die *beads* in 300 µl AmBic resuspendiert und in das neue Reaktionsgefäß transferiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und dazwischen jeweils 5 min bei 2000 g zentrifugiert. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand bis zur 200 µl Markierung entfernt.

Nachfolgend wurde ein Trypsin-Verdau durchgeführt. Hierfür wurde 1 g Trypsin hinzugegeben und für 16 h bei 37 °C und 500 rpm auf dem Heizblock inkubiert. Nach Ablauf der 16 h wurden weitere 0,5 g Trypsin hinzugegeben und nochmals für 2 h inkubiert, dann wurde das Gemisch 5 min bei RT und 2000 g zentrifugiert.

Zur Elution wurden *beads* und Überstand in 150 µl AmBic resuspendiert, auf eine Säule gegeben und mit einem behandschuhten Finger, durch Aufbau von Druck,

hindurchgepresst. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Dann wurden die *beads* in 150 µl CAN/TFA resuspendiert, das Gemisch 5-mal auf und ab pipettiert und in einem separaten Reaktionsgefäß gesammelt. Auch dieser Schritt wurde wiederholt.

Zum Trocknen der Probe wurde ein SpeedVac genutzt (2–3 Stunden) und diese anschließend bei –20 °C gelagert.

Die Massenspektrometrie erfolgte durch Mendy Rettel (EMBL Labor; Heidelberg).

2.2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Der Nachweis von Proteinen erfolgte nach ihrer Größe über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf einer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine, aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe, im elektrischen Feld. Hierbei bindet das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) die Proteine, entfaltet sie und verleiht ihnen eine negative Ladung, sodass sie zur positiv geladenen Anode wandern. Zur Auftrennung wurden 12%ige Gele verwendet, die nach folgendem Rezept hergestellt wurden:

		Trenngel (12 %)	Sammelgel (4 %)
Trenngel,	bzw.	1,5 ml	1 ml
Sammelgelpuffer			
H ₂ O		1,2 ml	1 ml
40 % Acrylamid		2,5 ml	534 µl
TEMED		5 µl	5 µl
10 % SDS		60 µl	40 µl
10 % APS		25 µl	20 µl

Die Proben wurden mit einer entsprechenden Menge an 4xSDS-Probenpuffer für 5 min gekocht und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte für 1,5 h bei 150 V. Ein Protein-Größenstandard (PAGERuler™ Prestained) wurde als Referenz zur Ermittlung der Proteingrößen mitlaufen gelassen.

2.2.4.3 Westernblot

Um die in Abschnitt 2.2.4.2 aufgetrennten Proteine zu identifizieren, wurde ein Westernblot mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Hierbei werden die Proteine mittels eines Wet-Blots auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dies erfolgte mittels eines Elektrobloppers bei 100 mA für 45 min. Danach wurden ungesättigte Bindungsstellen auf der Membran durch einstündiges Blockieren mit 5%igem Milchpulver aufgefüllt und anschließend der Primärantikörper (siehe Tabelle 13) für eine 1 h inkubiert oder alternativ bei 4 °C über Nacht. Die Visualisierung des spezifischen, an das gesuchte Protein gebundenen Primärantikörpers erfolgt über einen Sekundärantikörper, welcher das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) gebunden hat. Die Antikörper-Protein-Interaktion wurde über ein ECL-Kit, welches die Aktivität der HRP über die Umsetzung von Luminol und dessen Derivate in die oxidierte Form nachweist, gezeigt. Die dabei entstehende Chemilumineszenz wurde über den Chemidoc XRS+ detektiert.

2.2.5 Mikroskopie

2.2.5.1 Fluoreszenz-Mikroskopie von Lebendpräparaten

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von Parasiten wird genutzt, um die Lokalisation von Proteinen zu bestimmen. Hierfür wurde eine Zeiss AxioImager M1 genutzt, welche mit einer hochauflösenden Hamamatsu Orca C4742-895 Kamera und einer Axiovision Software (v 4.7) ausgestattet ist.

Zur Analyse der Parasiten wurden 500 µl Kultur geerntet, mit DAPI versetzt (Endkonzentration 1 µg/ml) und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Parasiten wurden dann pelletiert (6000 g/1 min) und der Überstand zum größten Teil verworfen. Das Pellet wurde anschließend im verbleibenden Überstand verdünnt und 4 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckgläschen abgedeckt und mikroskopiert.

2.2.5.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie (IFA)

Fixierte Parasiten (Abschnitt 2.2.3.12) wurden für indirekte fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen genutzt. Hierbei wurde ein Primärantikörper verwendet, der spezifisch an das zu analysierende Protein bindet, und ein Sekundärantikörper, der an einen

Fluorophor (Alexa-488, Alexa-594 oder Alexa-647) gekoppelt ist. Die Analyse mit dem Mikroskop erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben.

Für Kolokalisations-Studien wurde das *Just another Colocalization Plugin* (JaCoP) für ImageJ (Bolte und Cordelieres, 2006) genutzt. Die Schwelle wurde so gesetzt, dass sie der Fluoreszenz in den Originalbildern entspricht. Die daraus resultierenden Daten wurden in Excel importiert und Scatter Plots erstellt.

2.2.4.3 Konfokale Mikroskopie

Bei der konfokalen Mikroskopie wird, im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie, lediglich ein kleiner Bereich der Probe durch einen Laserstrahl angeregt. Dieser bewegt sich dabei über das Präparat. Die Konstruktion des Bildes erfolgt nachträglich. Da fast nur Licht aus einer schmalen Schicht um die jeweilige Fokusebene enthalten ist, wird ein hoher Kontrast erzeugt.

Für die 3D Rekonstruktion der Zellen wurden 20–32 Ebenen (sogenannten *stacks*) mit einem Abstand von (0.36 μm) aufgenommen, Die Bilder wurden mit dem Programm Imaris 6.2.0 analysiert und bearbeitet.

Kapitel 3 Ergebnisse

3.1 Versuch der funktionellen Charakterisierung des Basalkomplexes

3.1.1 Untersuchung der Redundanz bekannter Basalkomplex-Proteine

Der Basalkomplex ist, wie in der Einleitung beschrieben, eine dynamische Ringstruktur, die bei der Bildung der Merozoiten vom apikalen zum basalen Pol der sich bildenden Tochterzellen wandert. Er stellt die äußere Begrenzung des reifenden Inneren Membrankomplexes dar und ihm wird eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung sowie der Invagination der Plasmamembran während der Bildung der Tochterzellen zugesprochen. Allerdings sind bis heute lediglich fünf Proteine, welche in dieser Membrandomäne lokalisieren, näher beschrieben und in *P. falciparum* nicht funktionell charakterisiert. Diese Proteine – Morn1 (Ferguson et al., 2008, PF3D7_1031200), HAD2 (Engelberg et al., 2016, PF3D7_1205200), BTP1 (Kono et al., 2016, PF3D7_0611600), BTP2 (Scharf, 2016, PF3D7_0704300) und PF13_0225 (Winkelmann, 2016, PF3D7_1341500) – sind in Tabelle 3.1 aufgelistet (Tab. 3.1).

Um die Essentialität bzw. Redundanz dieser Proteine zu testen, wurden die entsprechenden Gene durch eine gezielte Gendelektionsstrategie, die mithilfe des pSLI-Vektorsystems durchgeführt wurde, verkürzt (Birnbaum et al., 2017). Hierfür wurde versucht ca. 300 Basenpaare der 5'-kodierenden Region des Zielgens, gekoppelt mit GFP, durch homologe Rekombination in den endogenen Locus des Gens in das Genom zu integrieren. Bei erfolgreicher Integration kommt es zu einer erheblichen Verkürzung des Ursprungsgens und zur Expression eines stark verkürzten Proteins, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit damit seine Funktion verliert.

In jeweils sechs unabhängigen Versuchen wurden für sechs Wochen unter Neomycin-Beigabe Parasiten selektiert, die das Plasmid integriert hatten. Konnte in diesem Zeitraum keine Integration beobachtet werden, wurde das Gen als „höchst wahrscheinlich essentiell“ beziehungsweise nicht redundant eingestuft.

Während vorhergehende Arbeiten zeigen, dass die Basalkomplex-Proteine PF13_0225 (Winkelmann, 2016) sowie PF3D7_0704300 (Scharf, 2017) für die Blutphase von *P. falciparum* redundant sind, konnten für Morn1, HAD2 und BTP1 über sechs Wochen keine transgenen Parasiten mit Gendelektionen generiert werden. Damit sind diese drei

Basalkomplex-Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Merozoitenbildung von essentieller Bedeutung. Die Daten werden unterstützt durch eine kürzlich veröffentlichte Transposon-basierte, genomweite Mutagenese-Daten, welche HAD2, Morn1 und BTP1 als essentiell klassifiziert (Zhang et al., 2018). In dieser Studie wurde auch Pf13_0225 als essentiell eingestuft, welches jedoch durch homologe Rekombination deletiert werden kann (Winkelmann, 2016).

Tabelle 16: Ergebnisse der pSLI-basierten Gendeletionsversuchsreihen im Vergleich zu ihrem *essentiality score* (Zhang et al., 2018), MIS: *mutagenesis index score*

Gen ID	Name	Proteingröße	Strukturmerkmale	Gen-deletion	MIS
PF3D7_1031200	Morn1	356 aa	Morn-Sequenzen	×	0.36
PF3D7_1205200	HAD2	338 aa	HAD – Domäne	×	0.134
PF3D7_0611600	BTP1	650 aa	4 TMD	×	0.171
PF3D7_0704300	BTP2	1852 aa	4 TMD SP	✓ (Wilcke, 2017)	1
PF3D7_1341500	Pf13_0225	508 aa	1 put. TMD	✓ (Winkelmann, 2016)	0.239

Um die höchstwahrscheinlich essentiellen Proteine des Basalkomplexes funktionell zu charakterisieren, wurden für die weitere funktionelle Charakterisierung der Proteine verschiedene konditionelle Strategien genutzt.

3.1.2 Funktionelle Inaktivierung von Morn1 und BTP1 mittels Mislokalisierung

Das *knock-sideways* (Haruki et al., 2008; Robinson et al., 2010) oder auch *anchor-away* System beruht auf der induzierbaren Mislokalisierung des Zielproteins, welches dadurch funktionell inaktiviert wird. In der vorliegenden Arbeit wird das FKBP-FRB-Heterodimerisierungs-System verwendet, welches durch Zugabe des Liganden Rapalog gesteuert wird. Hierfür werden die zu untersuchenden Proteine endogen mit einer 2xFKPB-Domäne gekoppelt exprimiert. Als *anchor* wird die FRB-Domäne in dieser Arbeit mit einer *nucleus targeting sequence* (3xNLS) episomal exprimiert, welche die FRB-Domäne in den Kern lokalisiert. Durch Zugabe von Rapalog wird eine Dimerisierung der FRB- und der FKBP-Domäne induziert und das zu untersuchende Protein in den Kern mislokalisiert und dadurch funktionell inaktiviert (Abb. 12). Das *knock-sideways*-System

ist in *P. falciparum* gut etabliert für Proteine des Zytosols (Birnbaum et al. 2017), jedoch nicht für Membranproteine.

Zunächst sollte daher getestet werden, ob dieses System mit einem im Kern lokalisierten Mislokalisierer effizient funktioniert.

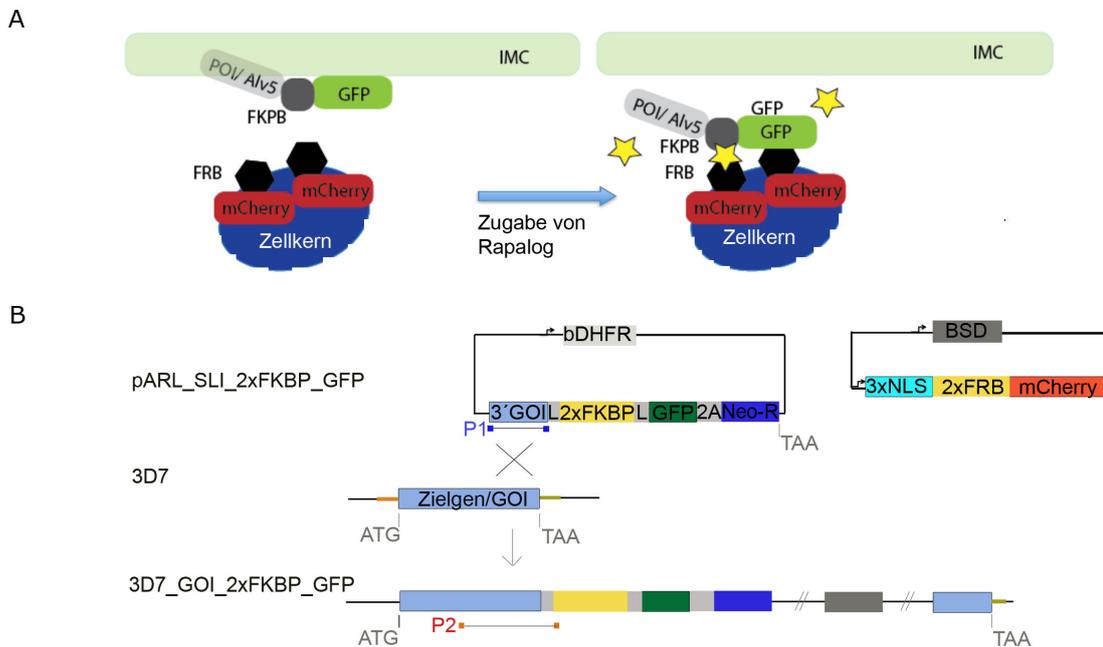


Abbildung 12: Das knock-sideways-System.

Das zu untersuchende Protein wird mit einer FKBP-Domäne (graues Quadrat) sowie GFP gekoppelt. Parallel wird im Zellkern eine FRB-Domäne (schwarzes Hexagon) lokalisiert. Zugabe von Rapalog (gelber Stern) mislokalisieret das zu untersuchende Protein in den Kern. B: verwendet Klonierungsstrategie; die letzten 300–1000 bp des zu untersuchenden Gens werden, als homologe Region für die Integration in den genomischen Locus, in das pARL_SLI_2xFKBP_GFP Plasmid kloniert. Nach erfolgreicher Integration wird der Resistenzmarker unter dem endogenen Promotor des Gens exprimiert. hDHFR: humane Dehydrofolat Reduktase 2A: T2A Skip-Peptid, Neo-R: Neomycin Phosphotransferase II Gen, 3xNLS: Kernlokalisierungssequenz

Zur Etablierung der Methode wurden zwei Proteine des IMC gewählt, bei denen es sich um periphere Membranproteine handelt: Alveolin 5 (Gould et al., 2008) und Mal13P1.228 (Kono et al., 2012). Die korrekte Integration des pSLI_Alveolin 5_2xFKBP_GFP Vektors in den Alveolin 5 Locus wurde mithilfe der PCR bestätigt (Abb. 13 B). Lokalisationsstudien zeigen Alveolin 5_2xFKBP_GFP, das auch als Fusionsprotein korrekt am IMC lokalisiert (Fig. 13 A). Wie in Abbildung 13 ersichtlich, konnte Alveolin 5 nach Inkubation mit Rapalog für 24 h in den Kern effizient mislokalisiert werden. Der Pearson-Korrelationskoeffizient zur Quantifikation der Kolo-kalisation betätigt dies (Abb. 13 A unten).

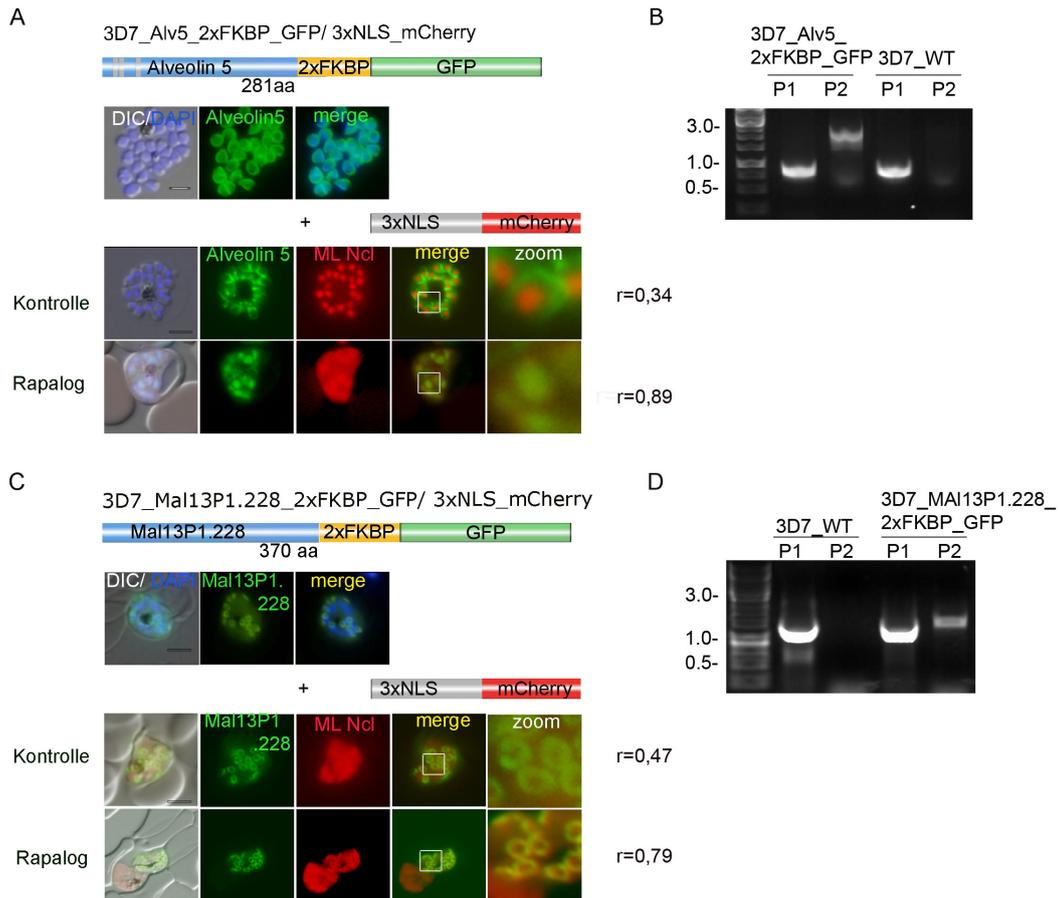


Abbildung 13: Mislokalisierung von Alveolin 5 und Mal13P1.228.

A: Lebendzellmikroskopie von Parasiten, in denen das Protein Alveolin 5 mit einer 2xFKBP_GFP_Domäne fusioniert wurde. Alveolin 5 lokalisiert in der Peripherie der reifen Merozoiten. Nach Zugabe von Rapalog (+ Rapalog) wird das Protein an den episomal im Kern exprimierten Mislokalisierer (ML Ncl) gezogen. Der Pearson-Korrelationskoeffizient zur Quantifikation der Kolo-kalisation (r) ist im Diagramm angegeben. B: Eine PCR bestätigt die korrekte Integration von Alv5_2xFKBP_GFP in das Genom. C: Lebendzellmikroskopie von Parasiten in denen das Protein Mal13P1.228 mit einer 2xFKBP_GFP_Domäne fusioniert wurde. Mal13P1.228 lokalisiert in der Peripherie der reifen Merozoiten. Nach Zugabe von Rapalog (+ Rapalog) wird der Mislokalisierer aus dem Kern an den IMC gezogen. Der Pearson-Korrelationskoeffizient zur Quantifikation der Kolo-kalisation (r) ist im Diagramm angegeben. D: eine PCR bestätigt die korrekte Integration von Mal13P1.228_2xFKBP_GFP in das Genom. Messbalken: 2 μ m.

Als zweites Protein wurde Mal13P1.228 gewählt. Das periphere Transmembranprotein Mal13P1.228 besitzt wie die Alveoline keine Transmembrandomänen. Auch hier wurde zunächst die korrekte Integration des pSLI_Mal13P1.228_2xFKBP_GFP Vektors in den Mal13P1.228 Locus mithilfe der PCR bestätigt (Abb. 13 D). Lokalisationsstudien zeigten auch hier, dass die Fusion von 2xFKBP_GFP an dieses IMC-Protein keinen störenden Einfluss auf seine Lokalisation hat (Abb. 13 C oben). Interessanterweise lässt sich jedoch Mal13P1.228_2xFKBP_GFP nicht in den Zellkern lokalisieren; im Gegenteil wird der Mislokalisierer an den IMC gezogen (Abb. 13 D).

Eine Wachstumskurve über fünf Tage, mit täglicher Bestimmung der Parasitämie mittels Durchflusszytometrie, zeigt keinen negativen Einfluss der Alveolin 5-Mislokalisierung auf das Wachstum der Parasiten (siehe Anhang).

Trotz dieses Ergebnisses, welches die Anwendung des *knock-sideways*-Systems für Membranproteine nur bedingt unterstützt, wurde das System für zwei Basalkomplex-Proteine verwendet: für MORN1 und für das integrale Transmembran Protein BTP1. Letzteres wurde als eine Art „Negativkontrolle“ verwendet, da es durch seine Membranintegration nicht in den Zellkern gelangen sollte.

Die korrekte Integration des pSLI_Morn1_2xFKBP_GFP Vektors in den *morn1*-Lokus wurde mithilfe der PCR bestätigt (Abb. 14 B). Lokalisationsstudien zeigten auch hier, dass die Fusion von 2xFKBP_GFP an das Basalkomplex-Protein keinen störenden Einfluss auf seine Lokalisation hat. Eine Zugabe von Rapalog während des Ringstadiums führt jedoch nur zu einer teilweisen Lokalisation von Morn1 in den Zellkern (Abb. 14 A unten). Eine Subpopulation von Morn1 verbleibt im Basalkomplex und ist nicht mislokalisierbar (Abb. 14 A). Der Pearson Koeffizient, welcher bei kompletter Mislokalisierung 0,89 beträgt, liegt hier bei 0,66 (Abb. 14 A). Um zu analysieren, ob diese partielle Mislokalisierung von Morn1 eine Auswirkung auf die Proliferation der transgenen Parasiten hatte, wurde das Wachstum der Parasiten über zwei Zyklen verfolgt. Es stellte sich heraus, dass die partielle Mislokalisierung keinen Einfluss auf die Proliferation der Parasiten hat (Abb. 14 C).

Hingegen ist BTP1_2xFKBP_GFP, dessen korrekte Integration ebenfalls über eine PCR bestätigt wurde (Abb. 14 E), nicht mislokalisierbar (Abb. 14 D unten). Dies ist vermutlich auf die feste Verankerung des Proteins in der Membran über vier Transmembrandomänen zurückzuführen. Da sich das *knock-sideways*-System, aufgrund seiner Struktur und Lokalisation nicht als geeignetes System für die Mislokalisierung von Proteinen des Basalkomplexes herausstellte, wurde im Folgenden ein alternatives System, das *glmS*-Riboswitch-System, getestet.

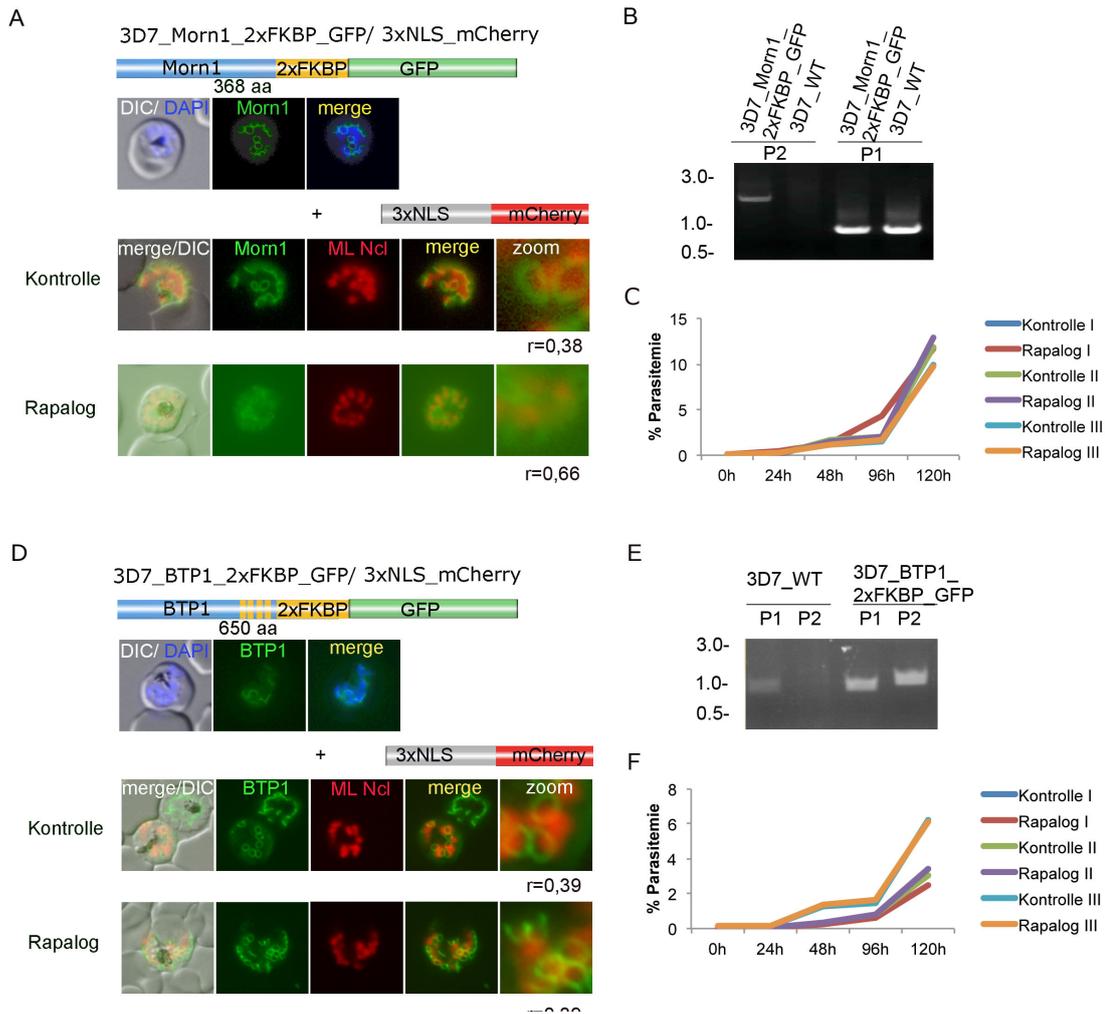


Abbildung 14: Mislokalisierung von Morn1 und BTP1.

A: Lebendzellmikroskopie von Parasiten, in denen das Protein Morn1 mit einer 2xFKBP_GFP_Domäne fusioniert wurde. Morn1 lokalisiert im Basalkomplex der reifenden Tochtermerozoiten. Nach Zugabe von Rapalog (+ Rapalog) wird das Protein an den episomal im Kern exprimierten Mislokalisierer (ML Ncl) gezogen. Der Pearson-Korrelationskoeffizient zur Quantifikation der Kolo-kalisation (r) ist angegeben. B: Eine PCR bestätigt die korrekte Integration von Morn1_2xFKBP_GFP in das Genom. C: Eine Wachstumskurve zeigt, dass die Proliferation der Parasiten über fünf Tage nicht beeinträchtigt ist (Drei Replikate I-III). D: Lebendzellmikroskopie von Parasiten, in denen das Protein BTP1 mit einer 2xFKBP_GFP_Domäne fusioniert wurde. BTP1 lokalisiert im Basalkomplex der reifenden Tochtermerozoiten. Nach Zugabe von Rapalog (+ Rapalog) wird das Protein an den episomal im Kern exprimierten Mislokalisierer (ML Ncl) gezogen. Der Pearson-Korrelationskoeffizient zur Quantifikation der Kolo-kalisation (r) ist angegeben. E: eine PCR bestätigt die korrekte Integration von BTP1_2xFKBP_GFP in das Genom. F: Die Proliferation der Parasiten ist über einen Zeitraum von 120 h nicht beeinträchtigt (Drei Replikate I-III). Messbalken: 2 µm.

3.1.3 *GlmS*-Riboswitch-basierende RNA-Degradation von *Morn1* zur Funktionsbestimmung

Das *glmS*-Riboswitch-System bietet die Möglichkeit, den Abbau der Zielgen-mRNA durch Zugabe eines Zuckers zu induzieren und damit die Menge des Zielproteins in der Zelle zu regulieren (Prommana et al., 2013a; Winkler et al., 2004).

Bei dem Riboswitch handelt es sich um ein nicht kodierendes, die Translation regulierendes Element in der 3'-UTR der mRNA, welches katalytische Aktivität besitzt (das Ribozym) und eine Hydrolyse der RNA vermittelt. Durch Bindung von Glucosamin-6-Phosphat kommt es zur Konformationsänderung des katalytisch aktiven Riboswiches, einer Selbstspaltung und schließlich zum Abbau der Ziel-mRNA.

In diesem System wurde die Ribozym Sequenz in die Gensequenz des Basalkomplex-Gens *morn1* inseriert, was zur Expression von chimärer RNA führte. Nach der Zugabe von Zucker kommt es zum Abbau der 3'-UTR, einer folgenden Degradation der kompletten mRNA und damit zur Reduktion der Expression des Basalkomplex-Proteins. Hierbei wurden in vorangegangenen Studien Reduktionen der Proteinexpression von z. B. PTEX150 um bis zu 80 % erreicht (Elsworth et al., 2014).

Lokalisationsstudien zeigen *Morn1_glmS_GFP*, das auch als Fusionsprotein korrekt am Basalkomplex lokalisiert. Eine 48 h-Inkubation von Zucker hat keinen sichtbaren Einfluss auf die Lokalisation des Proteins am Basalkomplex (Abb. 15 A unten).

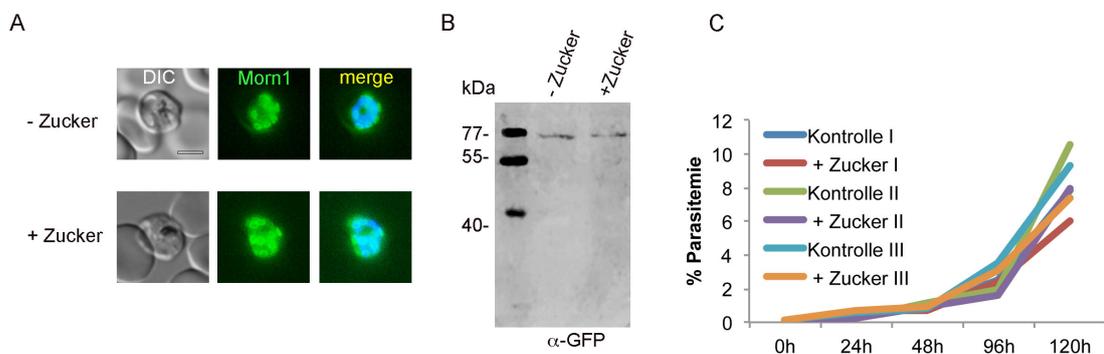


Abbildung 15: *GlmS*-Riboswitch-vermittelte Kontrolle der *Morn1* Expression.

A: Lebendzellmikroskopie von Parasiten, in denen *morn1* endogen mit *glmS_GFP* gekoppelt wurde, vor und nach Zugabe von Zucker. B: Ein Westernblot zeigt die Expression von *Morn1_GFP* vor und nach Zugabe von Zucker (geerntet 48 h nach Zugabe). C: Die Proliferation der Parasiten gemessen über einen Zeitraum von 120 h (Drei Replikate I-III). Messbalken: 2 μ m.

Ein Westernblot zeigt die Expression des Fusionsproteins *Morn_glmS_GFP* in der korrekten Größe (Abb. 15 B). Zugabe von Zucker zur Parasitenkultur über einen Zeitraum von 48 h hat keine Auswirkung auf die Expression des Proteins (Abb. 15 B, + Zucker). Die Proliferation der Parasiten wurde über einen Zeitraum von zwei Zyklen verfolgt, um zu kontrollieren, ob die RNA-Degradation von *Morn1* einen Einfluss auf das Wachstum hat.

Während nach einem Zyklus (48 h) kein Unterschied erkennbar ist, ist nach 2 Zyklen (120 h) eine Reduktion um 20 % zu sehen (Abb. 15 C). Um zu untersuchen, ob eine verminderte Anzahl an gebildeten Merozoiten für die Reduktion der Proliferation verantwortlich ist, wurde die Parasitenkultur nach 48 h ausgestrichen und in 20 Schizonten die Anzahl der Merozoiten ausgezählt. Hier zeigt sich keine Differenz zwischen behandelten und unbehandelten Parasiten (Abb. 16).

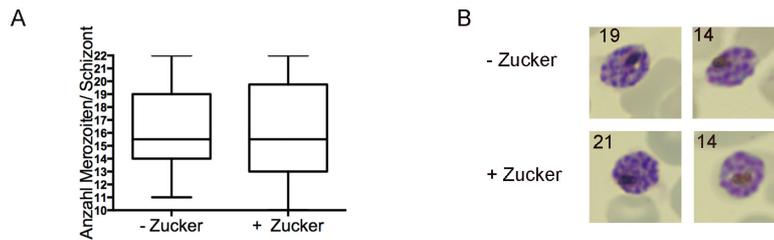


Abbildung 16: Einfluss der *glmS*-Riboswitch vermittelten RNA-Degradation von *Morn1* auf die Schizontenbildung.

A: Anzahl der Merozoiten pro Schizont (jeweils 20 Schizonten ausgezählt). B: Mit Giemsa angefärbte Parasiten nach (+ Zucker) Behandlung mit GlcNc sowie unbehandelte Parasiten (-Zucker).

3.2 Identifikation des Morn1-Interaktoms mittels *proximity based biotinylation* (BioID)

Aktuell sind lediglich fünf Basalkomplex-Proteine bekannt (siehe Abschnitt 1.3.4). Die Identifikation weiterer Komponenten dieses Komplexes und deren funktionelle Charakterisierung sollen zur Aufklärung der Funktion und Struktur dieses Subkompartimentes des Inneren Membrankomplexes beitragen.

Morn1 ist ein gut etabliertes Basalkomplex-Protein; jedoch sind keine direkten Interaktionspartner in *P. falciparum* beschrieben. Deswegen wurde es hier in einer modifizierten BioID Technik (Biotin Identifikationstechnik; Roux et al., 2012; Schopp et al., 2017; Birnbaum et al., 2017) verwendet, die mit einem FRB-FKBP-basierten Dimerisierungsansatz gekoppelt wurde – DIQ-BioID (Birnbaum et al., 2020).

Die DIQ-BioID Technik beruht auf dem Prinzip, dass die Ligase BirA* bei Zugabe von Biotin die Lysine der Proteine in direkter Umgebung, d. h. in einem Radius von 10 nm, biotinyliert. Biotinylierte Proteine können dann affinitätschromographisch mithilfe von Streptavidin-Sepharose-*beads* aufgereinigt und über Massenspektrometrie identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Biotinligase BirA* N-terminal mit einer 2xFRB-mCherry-Domäne fusioniert (Plasmid freundlicherweise bereitgestellt von Ernst Jonscher) und zytosolisch in Parasiten überexprimiert, in denen das zu untersuchende Protein endogen mit einer 2xFKBP-Domäne sowie GFP gekoppelt wurde. Zugabe von Rapalog induziert die Dimerisierung der FKBP und der FRB-Domäne, lokalisiert damit BirA* am Basalkomplex (Schopp, 2017) und ermöglicht die Identifikation von Morn1-Interaktionspartnern.

Dazu wurden die transgenen Parasiten aus Kapitel 3.1.2 verwendet, in denen die korrekte Integration bereits über eine PCR und die Lokalisation von Morn1_2xFKBP_GFP nachgewiesen wurde (Abb. 17 B). Die Ligase BirA* wird als FRB_mCherry-Fusionsprotein in dieser Zelllinie episomal überexprimiert. Während Morn1_2xFKBP_GFP ausschließlich im Basalkomplex der Schizonten lokalisiert, ist BirA*_2xFRB_mCherry konstitutiv unter dem *ef3a2*-Promotor exprimiert und lokalisiert im gesamten Zytosol (Abb. 17 A).

Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurde die eng synchronisierte (Abschnitt 2.2.3.4) Zelllinie in zwei Hälften geteilt („+ Rapalog“ vs. „Kontrolle“) und im Trophozitenstadium mit Biotin in einer Endkonzentration von 50 mM behandelt. Gleichzeitig wurde in einem Teil der Parasiten („+Rapalog“) die Lokalisation von BirA* an den Basalkomplex durch Zugabe von Rapalog in einer Endkonzentration von 250 nM induziert. Im späten Schizontenstadium wurde die Lokalisierung von BirA am Basalkomplex mikroskopisch bestätigt (Abb. 17 unten), die Kultur abgeerntet, reife

Schizonten über eine magnetische Säule aufgereinigt und Parasitenlysate hergestellt. Der zur Kontrolle durchgeführte Westernblot (Abb. 17 C) zeigt auf der einen Seite die erfolgreiche Biotinylierung der Parasiten und auf der anderen Seite eine spezifischere Biotinylierung in der induzierten Probe („+ Rapalog“).

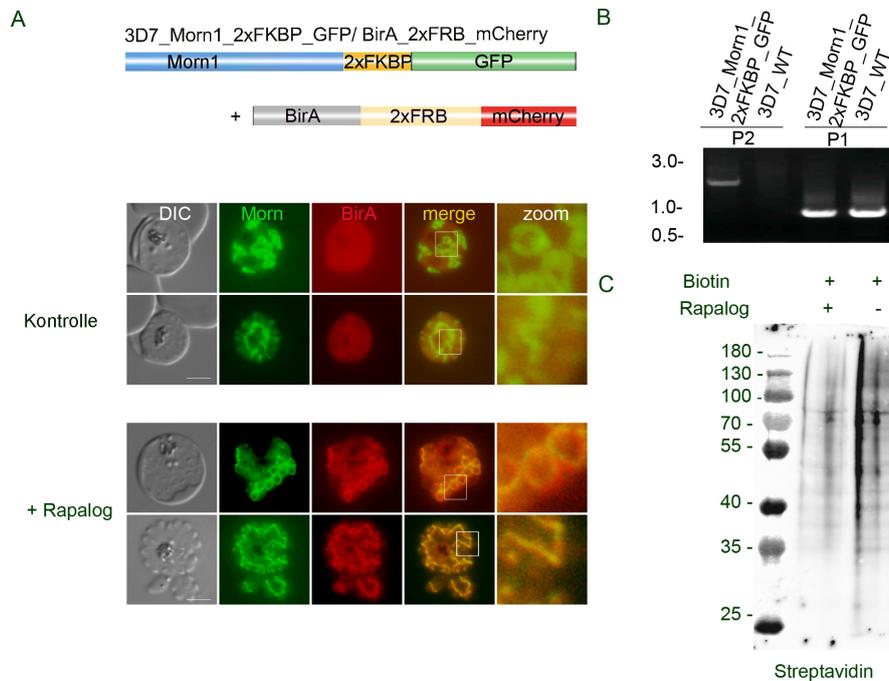


Abbildung 17: Biotinylierung von Morn1 durch BirA*.

A: Oben: Konstrukt, welches für den induzierbaren Biotinylierungsversuch verwendet wurde. Unten: Lebendzellmikroskopie, welche Morn1_2xFKBP_GFP-Parasiten zeigt, die episomal zytosolisches BirA* exprimieren. Durch Zugaben von Rapalog (+Rapalog) wird das Enzym an den Basalkomplex gezogen. B: Eine PCR bestätigt die korrekte Integration der 2xFKBP_GFP-Domäne ins Genom. C: Westernblot der Kontrollparasiten (+ Biotin/- Rapalog) sowie der induzierten Parasitenkultur (+ Biotin/+ Rapalog). Die Parasiten wurden für 24 h mit Biotin behandelt, die induzierte Kultur zusätzlich mit Rapalog. Der Westernblot wurde mit Streptavidin-HRP inkubiert. Größenbalken: 2 μ m.

Identifizierung von biotinylierten Proteinen durch Massenspektrometrie

Zur Identifikation von Morn1-Interaktionspartnern wurden die biotinylierten Proteine der induzierten und der uninduzierten Parasitenkulturen über Streptavidin-Sepharose-*beads* aufgereinigt und via Massenspektrometrie (MS) analysiert. Die Massenspektrometrie wurde vom EMBL, Heidelberg durchgeführt.

Die Analyse der aufgereinigten Proteine zeigt, dass Morn1 in den induzierten Parasiten am stärksten angereichert ist, und weist somit eine erfolgreiche Biotinylierung auf.

Die Analyse der identifizierten Proteine ergab eine Anreicherung von 712 Proteinen in

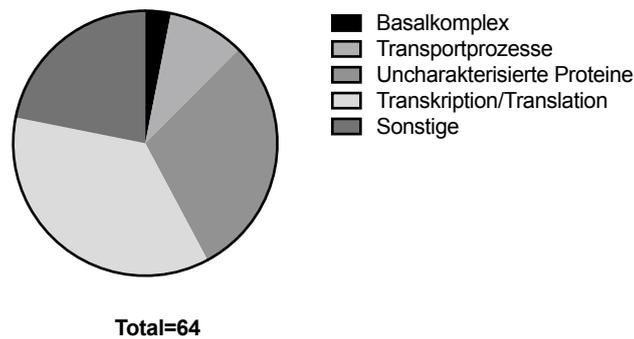


Abbildung 18: Interaktionspartner von Morn1 infiziert über Massenspektrometrie.

Insgesamt wurden 64 Proteine exklusiv in der induzierten Parasitenkultur angereichert. Unter diesen finden sich ein Basalkomplex-Protein, 6 in Transportprozesse, 19 bislang uncharakterisierte Proteine, 14 sonstige Proteine und 23 involviert in Transkription und Translation.

der induzierten Fraktion und eine exklusive Anreicherung von 64 Proteinen in dieser. Die exklusiv angereicherten Proteine sind, sortiert nach Funktionsbereichen, in Abbildung 18 dargestellt – eine vollständige Liste ist im Anhang zu finden. Von den exklusiv angereicherten 64 Proteinen sind 23 in Transkription und Translation involviert, 6 in Transportprozesse, 19 sind bisher nicht charakterisiert, 14 besitzen eine alternative Funktion bzw. Lokalisation und eins (Morn1) lokalisiert im Basalkomplex. Unter diesen Proteinen finden sich MyoJ (PF3D7_1229800), welches ebenfalls im Basalkomplex von *T. gondii* lokalisiert (Frénalet al., 2017a) und eine HAD-Protein (PF3D7_1118400; *haloacid dehydrogenase*). Eine Analyse der unbekannt Proteine ergab, dass ein Kandidat (PF3D7_1019100) ein für Basalkomplex-Proteine typisches Expressionsprofil aufweist. Weiterhin wurden innerhalb der 712 angereicherten Proteine drei unterschiedliche Kinesine identifiziert: PF3D7_0317500, PF3D7_0319400 und PF3D7_1245100.

Lediglich ein bekanntes Basalkomplex-Protein wurde identifiziert (BTP1), weitere bekannte Basalkomplex-Proteine konnten nicht aufgereinigt werden.

Im Folgenden wurden daher das Protein PF3D7_1019100 sowie die Kinesine auf ihre Involvierung in die Biogenese des IMC hin analysiert.

3.3 Charakterisierung potenzieller Basalkomplex-Proteine

3.3.1 PF3D7_1019100/PF10_0184 - ein putatives Basalkomplex-Protein

PF3D7_1019100 wurde als potenzielles neues Protein des Basalkomplexes identifiziert. Es weist ein für Proteine dieser Domäne typisches Expressionsprofil auf.

Im Vergleich zu den bereits bekannten Vertretern ist es ungewöhnlich groß (1928 Aminosäuren). Des Weiteren ist es stark phosphoryliert und besitzt keine Transmembrandomäne. Die Auswertung von kürzlich veröffentlichten Transposon-Mutagenesis-Daten der Arbeitsgruppe um Zhang und Kollegen (Zhang et al., 2018) hat ergeben, dass dieses Protein während der Blutphase von *Plasmodium falciparum* höchstwahrscheinlich nicht essentiell ist. Allerdings ist dieses Protein in weiblichen Gametozyten stark hochreguliert (Lasonder et al., 2016).

Es konnte keine erfolgreiche Integration eines GFP-Fusionsproteins für Lokalisationsstudien erzielt werden. Aufgrund seiner Größe ist dieses Protein für eine Überexpression im Parasiten nicht geeignet. Eine Charakterisierung dieses durchaus interessanten Kandidaten steht daher noch aus.

3.3.2 Kinesine in *P. falciparum* – potenzielle Basalkomplex-Proteine?

3.3.2.1 In *P. falciparum* sind 5 Kinesine spät transkribiert

Kinesin 5, 8.2 und 13 wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Massenspektrometrie als mögliche Interaktionspartner von Morn1 identifiziert. Wie in der Einleitung beschrieben, gehören Kinesine zu den Motorproteinen in eukaryotischen Zellen und bewegen sich entlang der Mikrotubuli.

Im Genom von *P. falciparum* sind neun Kinesine in *PlasmoDB* annotiert, von denen sechs einen Anstieg der Expression ab 32 h nach Invasion in die rote Blutzelle aufweisen (Abb. 19) und sich daher im Auftreten mit dem Beginn der Zellteilung überschneiden. Ein transkriptioneller Vergleich mit den BC Proteinen BTP1, BTP2 und MORN1 zeigt ein ähnliches Transkriptionsprofil. Um einen funktionellen Zusammenhang zwischen den fünf spät transkribierten Kinesinen, insbesondere von Kinesin 5, 8.2 und 13, mit dem BC zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit diese zunächst als 2xFKBP_GFP_Fusionsproteine lokalisiert, funktionell inaktiviert und anschließend phänotypisiert.

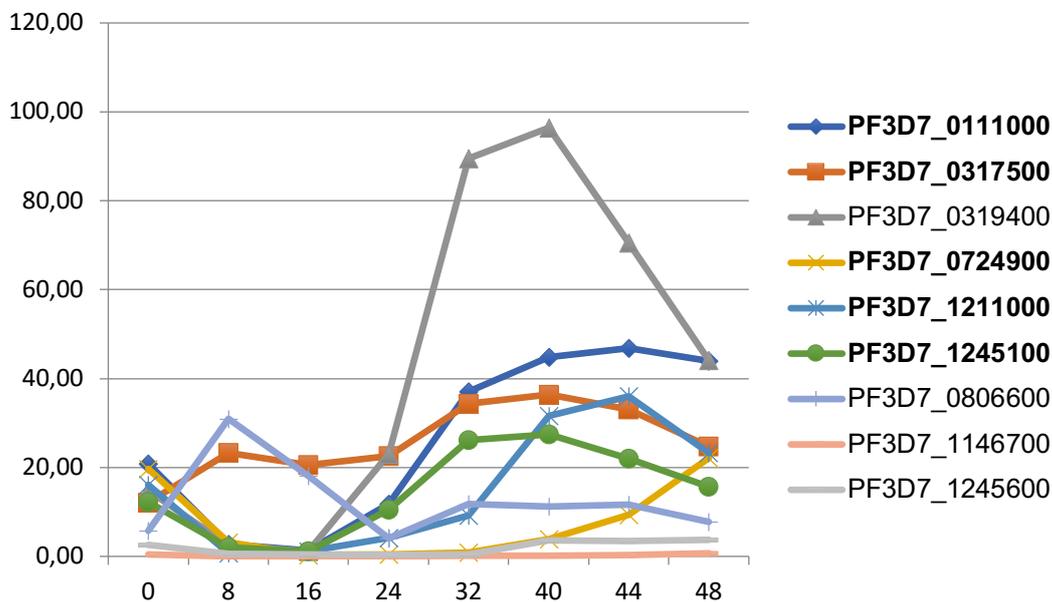


Abbildung 19: RNA-Expressionsdaten der in *P. falciparum* exprimierten Kinesine während der 48-stündigen Blutphase.

Von den neun in *P. falciparum* exprimierten Kinesinen zeigen sechs einen starken Expressionsanstieg mit Beginn des Trophozoitenstadiums (Wichers et al., 2019).

Eine zielgerichtete Insertion entsprechender pSLI-basierter Plasmide in das Genom von *P. falciparum* (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.2.3.6) wurde zunächst mit einer

PCR nachgewiesen (siehe Anhang) und nachfolgend die 2xFKBP_GFP-Fusionsproteine im Parasiten mikroskopisch lokalisiert.

Zwei Kinesine (PF3D7_011100 und PF3D71211000) zeigten ein nicht detektierbares GFP Signal, PF3D7_0724900_2xFKBP_GFP ist in allen asexuellen Stadien zytosolisch lokalisiert, zwei Kinesine (PF3D7_0317500 und PF3D7_0319400) zeigten distinkte, perinukleäre Foci. Der genetische Locus von PF3D7_1245100 konnte trotz sechs unabhängiger Versuche nicht durch das verwendete Vektorsystem modifiziert werden. (Tabelle 17).

Tabelle 17: Als Kinesine annotierte Proteine in *P. falciparum*.

Trivial-name	Gen ID	Kondierende Sequenz (bp)	Molekulargewicht (kDa)	Lokalisation
Kinesin 5	PF3D7_0317500	5694	1619 aa	Perinukleäre Foci
Kinesin 7	PF3D7_1211000	5838	1844 aa	Schwaches Signal
Kinesin 8	PF3D7_0111000	5800	1664 aa	Schwaches Signal
Kinesin 13	PF3D7_1245100	4213	1326 aa	Keine Integration
Kinesin 19	PF3D7_0724900	5694	1897 aa	Zytosolisches Signal
Kinesin 8.2	PF3D7_0319400	4092	1363 aa	Perinukleäre Foci

3.3.2.2 Charakterisierung von Kinesin 5 und Kinesin 8.2

Kinesin 5 ist ein ca. 191 kDa großes Protein, welches eine Motordomäne am N-Terminus aufweist (21–482 aa) sowie eine ATP-Bindestelle und eine Loop-Loop-Struktur am C-Terminus (Abb. 20 C). Die korrekte Integration von Kinesin 5 in das Genom wurde über eine PCR nachgewiesen (Abb. 20 B). Lokalisationsstudien mit Kinesin 5_2xFKBP_GFP zeigen, dass sich im Laufe der Kernteilung jeweils ein distinkter Foci in unmittelbarer Nähe zum Zellkern bildet. Mit fortlaufender Teilung bilden sich zusätzliche perinukleäre Kinesin 5 Foci (Abb. 20).

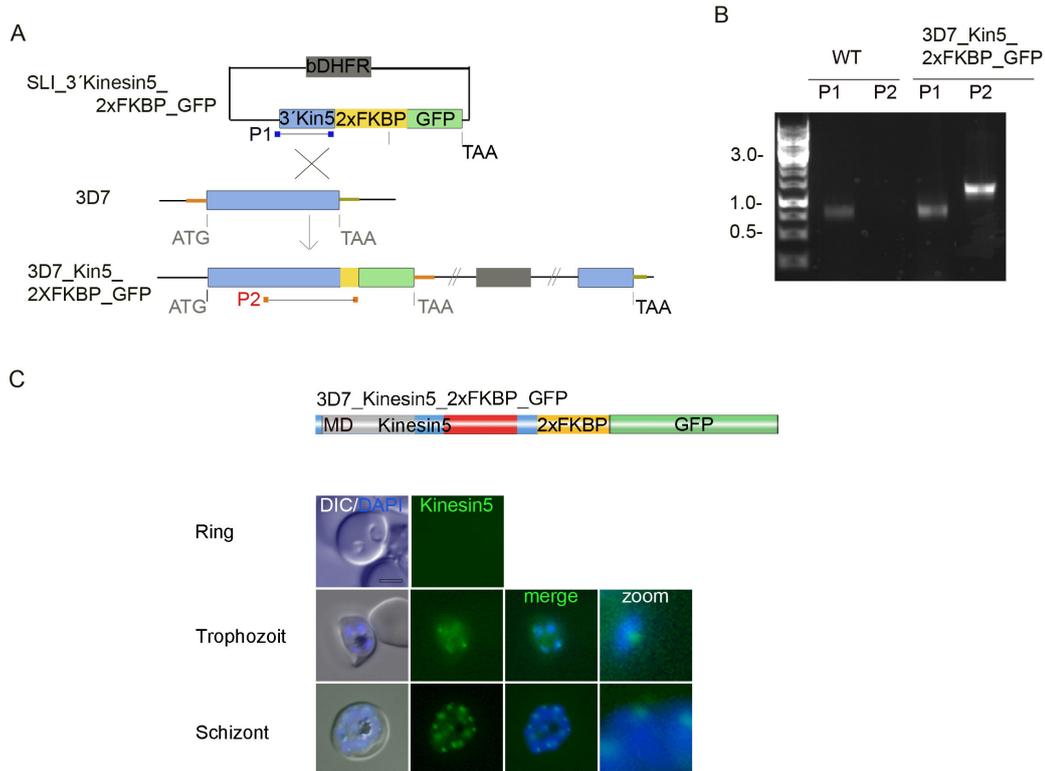


Abbildung 20: Lokalisation von Kinesin 5.

Kinesin 5 wurde endogen mit GFP sowie einer 2xFKBP-Domäne zur Mislokalisierung des Proteins markiert. Das Klonierungsschema ist in A dargestellt. B: PCR zur Kontrolle der korrekten Integration von Kinesin 5 in das Genom. C: Kinesin 5 lokalisiert in distinkten perinukleären Foci. Messbalken: 2 µm.

Kinesin 8.2 ist ein etwas kleineres Kinesin (157 kDa) mit einer Motordomäne in der Mitte des Proteins (426-750 aa). Die korrekte Integration von Kinesin 8.2 in das Genom wurde über eine PCR nachgewiesen (Abb. 21). Lokalisationsstudien mit Kinesin 8.2_2xFKBP_GFP zeigen, dass sich im Laufe der Kernteilung, ähnlich wie bei Kinesin 5, jeweils ein distinkter Foci in unmittelbarer Nähe zum Zellkern bildet. Mit fortlaufender Teilung bilden sich zusätzliche perinukleäre Kinesin 8.2 Foci. Im Gegensatz zu Kinesin 5 ist Kinesin 8.2 allerdings nur schwach exprimiert (Abb. 21).

Es wurde gezeigt, dass es zu Beginn der Biogenese des IMC zu einer engen räumlichen Nähe der MTOCs und der sich bildenden IMC kommt (Kono et al., 2012). Kinesin 5 und Kinesin 8.2 weisen aufgrund ihrer Lokalisation in perinukleären Foci eine für die Zellteilung und Tochterzellbildung interessante Lokalisation auf und wurden im Folgenden näher untersucht.

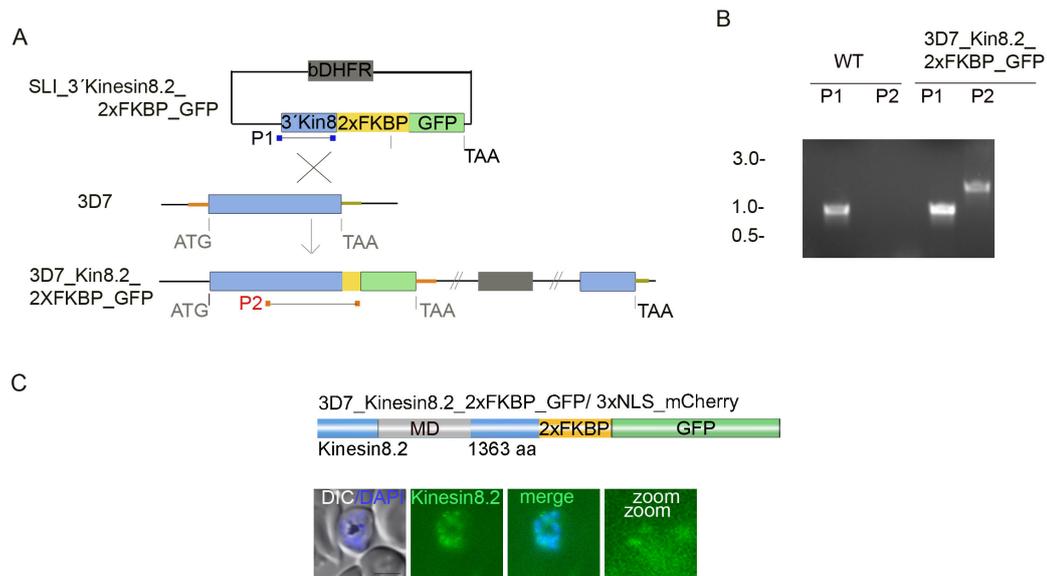


Abbildung 21: Lokalisation von Kinesin 8.2..

Kinesin 8.2 wurde endogen mit GFP, sowie einer 2xFKBP-Domäne zur Mislokalisierung des Proteins, markiert. Das Klonierungsschema ist in A dargestellt. B: PCR zur Kontrolle der korrekten Integration von Kinesin 8.2 in das Genom. C: Kinesin 8.2 lokalisiert in distinkten perinukleären Foci. Messbalken: 2 µm.

Um die Lokalisation von Kinesin 5 näher einzugrenzen, wurde ein Immunfluoreszenz-Assay mit Antikörpern gegen α-Tubulin (markiert den mitotischen Spindelapparat während der Zellteilung, an deren Ende lediglich das MTOC angefärbt wird; Kono et al., 2012) sowie GAPM2 (*glideosome associated protein with multiple membrane spans 2*, Markerprotein des IMC, Bullen et al., 2009) und Centrin 3 (Mahajan et al., 2008) durchgeführt.

Die Kolokalisation von Kinesin 5 mit α-Tubulin zeigt eine enge benachbarte Lokalisation der beiden Proteine im MTOC (Abb. 22). Die Quantifikation dieser Kolokalisation bestätigt die Nähe der Signale. Hierbei scheint die Kolokalisation mit einer zunehmenden Anzahl an Zellkernen zuzunehmen.

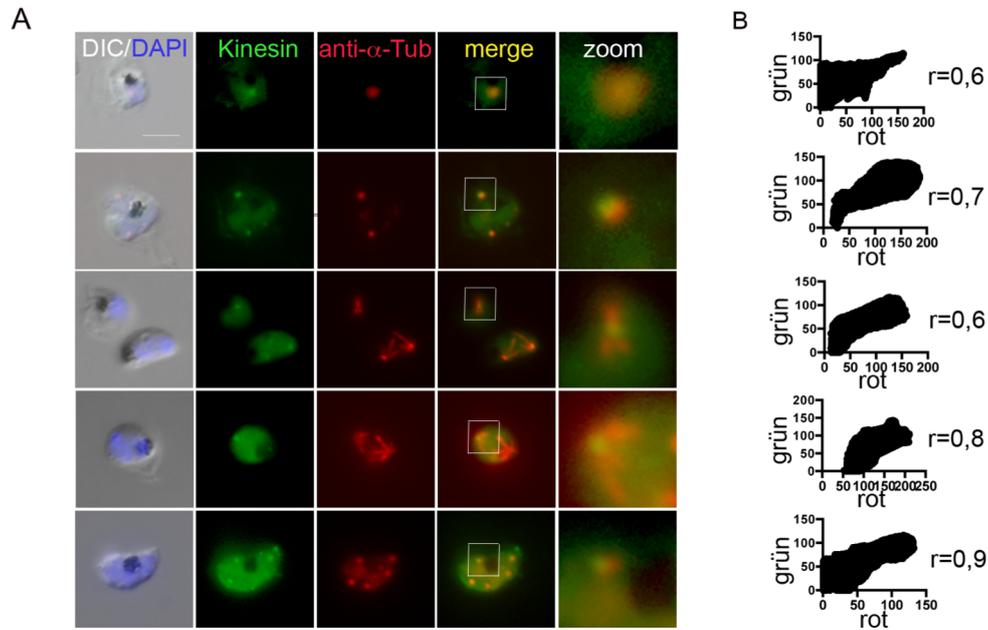


Abbildung 22: Kolokalisation des Kinesin5_2xFKBP_GFP-Fusionsprotein mit α -Tubulin in fixierten Parasiten.

A: α -Tubulin visualisiert den mitotischen Spindelapparat während der Mitose. Vom frühen Trophozoitenstadium bis zum reifen Schizontenstadium lokalisiert Kinesin5_2xFKBP_GFP in unmittelbarer Nähe des Mikrotubuli-Organisierendem Zentrums. B: Quantifikation der Kolokalisation eines ausgewählten Bereiches (zoom – 4fache Vergrößerung) durch Berechnung der Korrelation der Intensitäten der roten und grünen Signale. Der Pearson-Korrelationskoeffizient zur Quantifikation der Kolokalisation (r) ist angegeben. Messbalken: 2 μ m.

Zur näheren Eingrenzung der Lokalisation wurde Kinesin 5 auch mit GAPM2 und Centrin 3 kolokalisiert. Centrin 3 ist ebenfalls ein MTOC-Marker und eng mit diesem verknüpft (Mahajan et al., 2008). Kinesin 5 bildet hierbei eine Brücke zwischen zwei benachbarten Zentrosomen.

Eine zusätzliche Kolokalisation mit GAPM2, als Marker des IMC und der Anlage für den sich neu bildenden Tochtermerozoiten, zeigt eine räumlich unabhängige, allerdings in Beziehung zueinander stehende Lokalisation des sich bildenden IMC und Kinesin 5 (Abb. 23).

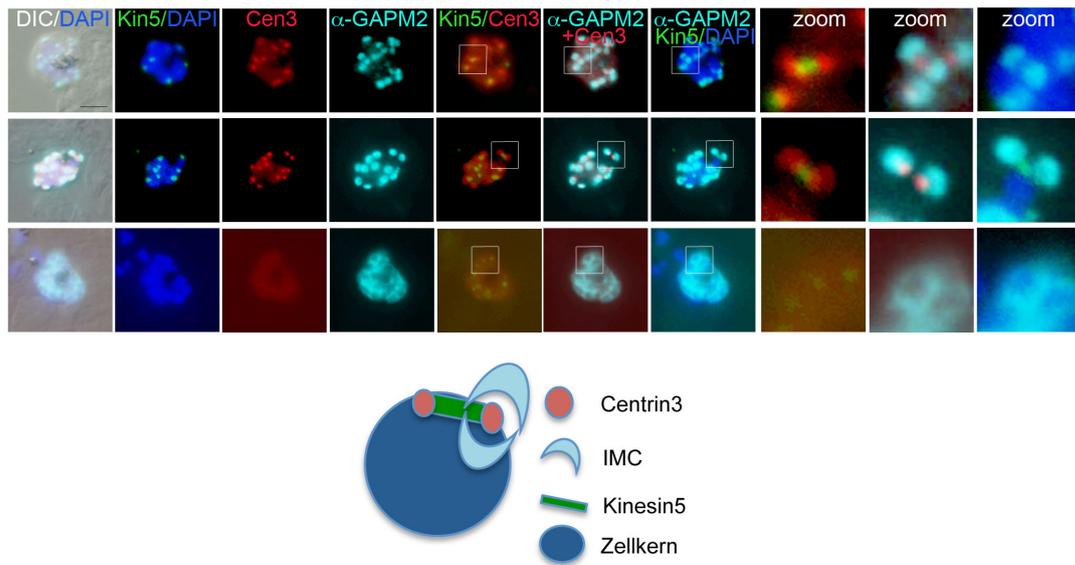


Abbildung 23: Kolokalisation des Kinesin 5_2xFKBP_GFP Fusionsproteins mit überexprimiertem Centrin 3 sowie GAPM2 in fixierten Parasiten.

A: Centrin 3 markiert das Zentrosom in sich teilenden Parasiten und bildet das Zentrum der Anlage des IMC (GAPM2). Kinesin 5 bildet eine Brücke zwischen zwei benachbarten Zentrosomen. Messbalken: 2 μ m.

3.3.2.3 Kinesin 5 ist weder essentiell für das Wachstum von *P. falciparum* während der Blutphase noch für die Ausbildung des IMC

Zur funktionellen Analyse von Kinesin 5 wurde das *knock-sideways*-System (Birnbaum & Flemming et al., 2017) verwendet und das exprimierte Protein mislokalisiert. Dazu wurde, wie bereits in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, als Mislokalisierer ein FRB-mCherry-Fusionsprotein genutzt. Dieses wurde im Zellkern (3xNLS_FRB_mCherry) bzw. an der Plasmamembran (Lyn_FRB_mCherry) überexprimiert.

Zugabe von Rapalog in einer Endkonzentration von 50 nM induziert die Lokalisation von Kinesin5_2xFKBP_GFP von einem distinkten, perinukleären Foci über die gesamte Fläche des Zellkerns (Abb. 24 A) bzw. an die Plasmamembran des Parasiten (Abb. 24 C). Dies ist als diffuses, schwaches GFP-Signal erkennbar.

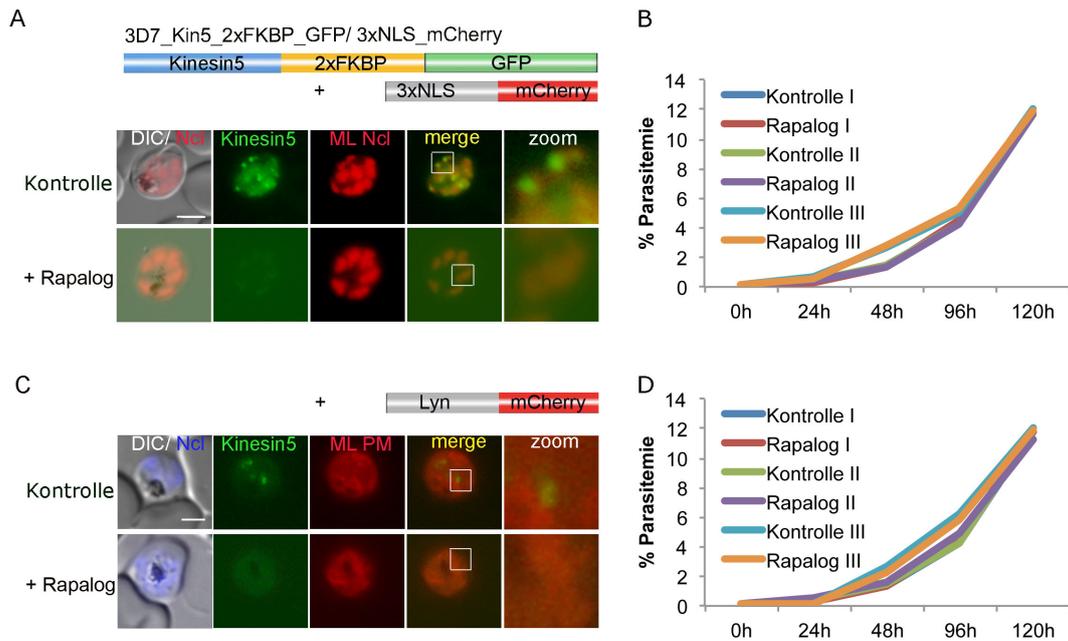


Abbildung 24: Mislokalisierung von Kinesin 5 in den Kern und an die Plasmamembran hat keinen Effekt auf das Wachstum der Parasiten.

Lebendzellmikroskopie von Parasiten in denen das Protein Kinesin 5 mit einer 2xFKBP_GFP_Domäne fusioniert wurde. Nach Zugabe von Rapalog (+ Rapalog) wird das Protein A: An den episomal im Kern exprimierten Mislokalisierer (ML Ncl) gezogen. B: Die Mislokalisierung hat keinen Effekt auf das Wachstum der Parasiten (Drei Replikate I-III). C: Nach Zugabe von Rapalog (+ Rapalog) wird das Protein an den episomal an der Plasmamembran exprimierten Mislokalisierer (ML PM) gezogen. D: Die Mislokalisierung hat keinen Effekt auf das Wachstum der Parasiten (Drei Replikate I-III). Messbalken: 2 μ m.

Beide Mislokalisierungen von Kinesin 5 zeigen keinen negativen Effekt auf das Wachstum der Parasiten über einen Zeitraum von fünf Tagen. Die mit Rapalog behandelten Kulturen wachsen vergleichbar mit den Kontrollkulturen (Abb. 24 D).

Die Mislokalisierung an die Plasmamembran wurde ebenfalls für die Kinesine 7, 8 und 19 durchgeführt. Auch hier zeigt sich kein negativer Effekt auf das Wachstum der Parasiten (Daten hier nicht gezeigt).

Um zur Ausgangshypothese zurückzukommen – dass Kinesine wichtig für die Biogenese des Inneren Membrankomplexes sind – wurde in den Parasiten mit mislokalisiertem Kinesin 5 der IMC visualisiert, um eine Änderung im Phänotyp des IMC ohne Auswirkung auf das Wachstum der Parasiten auszuschließen. Ein Immunfluoreszenz-Assay mit einem Antikörper gegen GAPM2, als Markerprotein des IMC, zeigt jedoch keine Änderung von dessen Morphologie (Abb. 25).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Kinesin 5 und Kinesin 8.2 während der Blutphase von *P. falciparum* in enger räumlicher Nähe zum MTOC lokalisieren. Die Mislokalisierung von Kinesin 5 an eine alternative Lokalisation im Zellkern bzw. an die Plasmamembran hat keine Auswirkung auf die Proliferation während der Blutphase und auf die IMC-Biogenese.

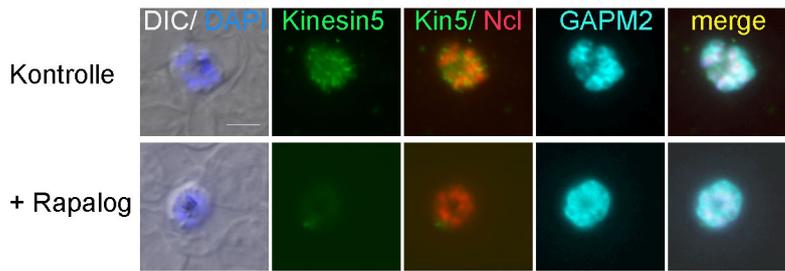


Abbildung 25: Die Mislokalisierung von Kinesin 5 hat keine Auswirkung auf die Bildung des Inneren Membrankomplexes.

Nach Mislokalisierung von Kinesin 5 an den Zellkern, induziert durch die Zugabe von Rapalog, wurden Parasiten fixiert und der IMC über einen Antikörper gegen GAPM2 visualisiert. Messbalken: 2 μm .

3.4 Abbau des Inneren Membrankomplexes nach der Invasion in den Erythrozyten

3.4.1 Analyse von Proteinen des IMC in jungen Ringstadien von *P. falciparum*

Nachdem im ersten Teil der Arbeit die Biogenese des IMC näher beleuchtet wurde, folgte im zweiten Teil die Untersuchung des Schicksals dieser Membranstruktur und der dort lokalisierten Proteine, wenn diese – nach Invasion in den Erythrozyten – nicht mehr benötigt wird und aufgelöst werden muss. Dieser Vorgang wurde bisher in *P. falciparum* nicht näher untersucht.

Um die Untersuchung zur Auflösung des IMC nach der Invasion in den Erythrozyten zu initiieren, wurde GAPM2 endogen mit GFP markiert. GAPM2 ist über sechs Transmembrandomänen fest im IMC verankert.

Die Westernblot-Analyse zeigt den proteolytischen Abbau von GAPM2 in jungen Ringstadien, wo lediglich ein C-terminales, ca. 15 kDa großes Proteinfragment detektiert werden kann. Dies entspricht einer C-terminalen Transmembrandomäne sowie dem C-Terminus, im Vergleich zum vollständigen Protein (ca. 42,4 kDa) in Schizonten (Abb. 26 A). Diese Degradation kann durch die Inkubation von Pyr-41, welches E1 (ein Enzym des Ubiquitin-Systems) inhibiert, komplett verhindert werden. Inkubation von MG-132 (einem Inhibitor des Proteasoms) verhindert dagegen die Degradation lediglich teilweise (Abb. 26 B).

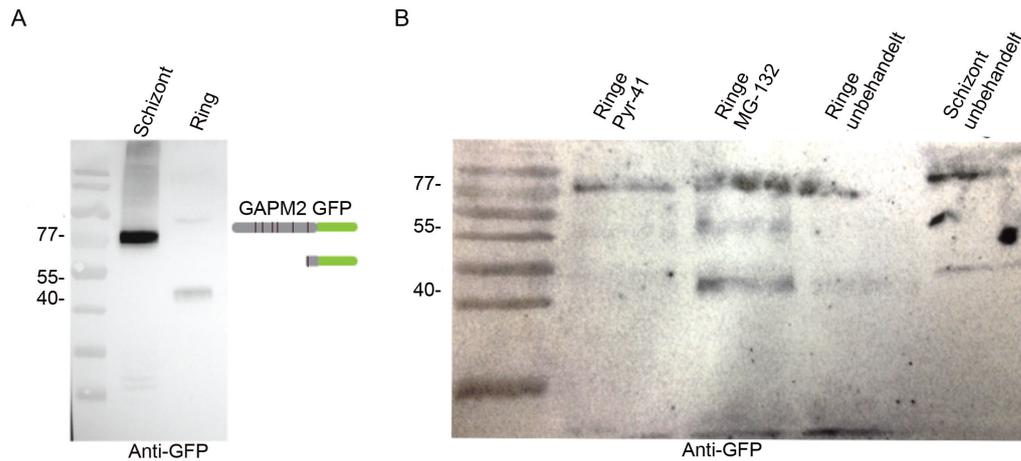


Abbildung 26: Proteinbiochemische Analyse von GAPM2 in Ringstadien von *P. falciparum*.

A: Westernblot mit Lysaten aus reifen Schizonten (Schizont) und jungen Ringen (Ring, 0–4 h nach der Invasion) in denen GAPM2 endogen mit GFP markiert ist. Verwendet wurde ein Antikörper gegen GFP. B: Junge Ringkulturen wurden während des Invasionsprozesses und bis zur Ernte der Parasiten mit Pyr-41, bzw. MG-132 behandelt. Im Vergleich dazu wurden unbehandelte Ringstadien-Lysate und Schizonten-Lysate aufgetragen.

3.4.2 Mikroskopische Analyse des IMC in jungen Ringstadien von *P. falciparum*

Zur Visualisierung des Schicksals des IMC nach erfolgreicher Invasion wurden im ersten Schritt in unfixierten, frisch invadierten Parasiten endogen GFP-markierte Proteine des IMC lokalisiert. Die Zelllinien GAPM2_GFP, Alveolin 5_GFP und Mal13P1.228_GFP wurden freundlicherweise von Dr. Maya Kono zur Verfügung gestellt. Die markierten Proteine des IMC sind über unterschiedliche Mechanismen in der Membran verankert bzw. mit ihr assoziiert. Während der IMC in freien Merozoiten diesen komplett bedeckt, lokalisiert GAPM2_GFP in jungen Ringen in der Peripherie und akkumuliert in punktförmigen Strukturen. Diese finden sich hauptsächlich in fingerartigen Ausstülpungen, die junge Ringen charakteristischerweise ausbilden, während sich diese im Erythrozyten einrichten (Abb. 27).

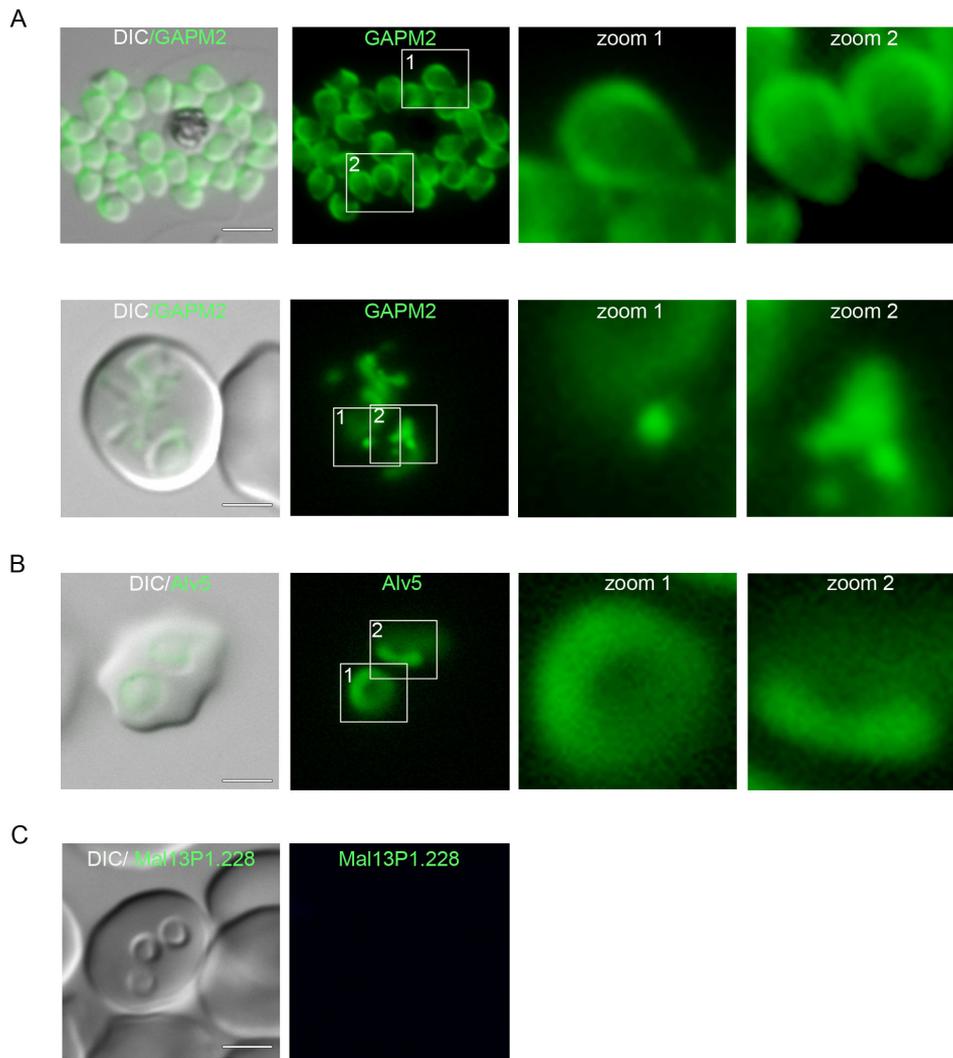


Abbildung 27: Lokalisation von Proteinen des IMC in jungen Ringstadien.

Lebendzellmikroskopie von Parasiten mit endogenen GFP-markiertem GAPM2 (A), Alveolin 5 (B) und Mal13P1.228 (C). Analysiert wurden jeweils frisch invadierte Ringstadien. In A sind exemplarisch freie Merozoiten mit komplett ausgebildeter IMC dargestellt. Diese wird durch GAPM2 visualisiert. Messbalken: 2 μ m.

Alveolin5_GFP lokalisiert in jungen Ringen gleichmäßig im Zytosol; vereinzelt akkumuliert das GFP-Signal in der Peripherie (Abb. 27 B). Im Gegensatz dazu ist Mal13P1.228 nicht in frisch invadierten Parasiten lokalisierbar (Abb. 27 C).

Aufgrund von schnellen Bewegungen der Ringe bzw. der punkartigen GFP-positiven Strukturen ist eine mikroskopische Analyse schwer möglich und es wurden ebenfalls fixierte Parasiten analysiert (Abb. 28). Mikroskopie fixierter, GAPM2_GFP-Parasiten zeigt ebenfalls die Lokalisation von GAPM2 in punkartigen Strukturen (Abb. 28 A). Konfokale Mikroskopie dieser Strukturen zeigt, dass diese teilweise zusammenhängende Vesikel unterschiedlicher Größe bilden (Abb. 28 B).

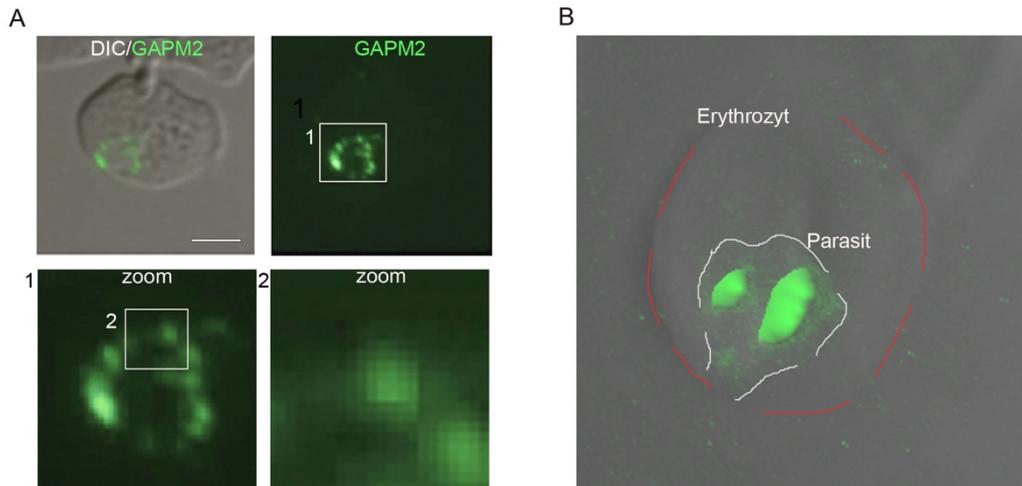


Abbildung 28: Lokalisation von GAPM2_GFP in jungen, fixierten Ringstadien.

A: GAPM2_GFP lokalisiert in punktförmigen Strukturen. B: Konfokale Mikroskopie dieser Parasiten zeigt, dass diese Vesikel unterschiedlicher Größe bilden. Messbalken 2 μm .

Da aufgrund der Sensibilität der Merozoiten deren gezielte, zeitlich kontrollierte Reinvansion in Erythrozyten schwer zu bewerkstelligen ist, wurden zur groben Eingrenzung des zeitlichen Rahmens des Abbaus des IMC frisch invadierte Parasiten fixiert und als sogenannte „Innere Uhr“ ein Antikörper gegen das exportierte Protein Rex1 verwendet. Die Expression, der Export und die Lokalisation von Rex 1 im Zytosol der roten Blutzellen 2–4 Stunden nach Invasion wurden bereits beschrieben (Gruering et al., 2011). Hierbei zeigt sich, dass die oben beschriebenen vesikulären, GAPM2-positiven Strukturen sichtbar sind, bevor es zur Expression von Rex1 kommt, während mit dem Export von Rex1 das GAPM2_GFP-Signal nicht mehr sichtbar ist (Abb. 29).

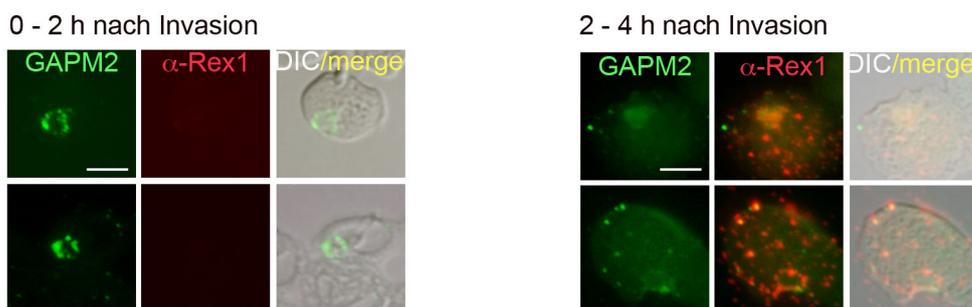


Abbildung 29: Kolokalisation von GAPM2 und Rex1.

Parasiten wurden mit Aceton fixiert und ein Antikörper gegen Rex1 verwendet. Rex 1 (rot) wird 2–4 h nach Invasion von Merozoiten in das Zytosol der roten Blutzelle exportiert. Messbalken: 2 μm .

Zur Visualisierung der Membranen des IMC wurden junge Ringe geerntet und mittels FIB-SEM-Mikroskopie (Rasterelektronenmikroskopie mit fokussiertem Ionenstrahl – *focused ion beam*) analysiert. Die Fixierung und Mikroskopie wurde freundlicherweise von Valerie Mordhorst und Dr. Kai Grunewald durchgeführt. Hierfür wurden reife Schizonten aufgereinigt und auf frische Erythrozyten gegeben. Nach 15 min wurde die Kultur abgeerntet und mittels Kryofixierung (*Plunge freezing*) fixiert. Hierdurch wurde bewerkstelligt, dass die jungen Parasiten höchstens 15 min alt sind. In Abbildung 30 ist ein Querschnitt durch einen jungen Ring dargestellt. Deutlich erkennbar sind der Zellkern mit innerer und äußerer Kernmembran übergehend in den Golgi-Apparat, das Zytosol gefüllt mit Ribosomen sowie Plastid und Mitochondrien. Beeindruckenderweise sind die äußeren Membranen des Parasiten – die Plasmamembran und die parasitophoren Vakuolenmembran mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Netzwerk – sichtbar und in einem scheinbar nativen Zustand erhalten. Jedoch ist in der gesamten 3D-Rekonstruktion von zwei Ringstadien-Parasiten keine komplette oder auch fragmentierte Doppelmembran des IMC sichtbar. Dies spricht für einen schnellen Abbau der Membran des IMC, genauere Analysen müssen folgen.

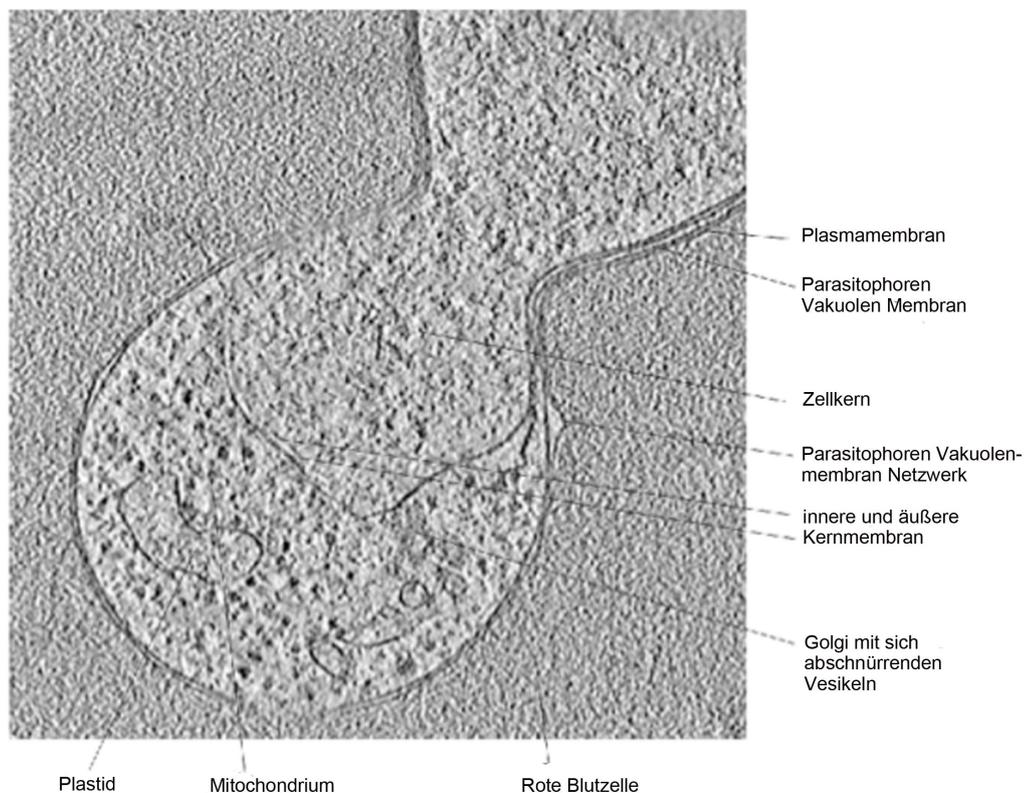


Abbildung 30: FIB-SEM junger, gefrierfixierter Ringstadien in *P. falciparum*.

Kapitel 4 Diskussion

Während einer Malariaerkrankung vermehrt sich der Erreger *Plasmodium falciparum* im menschlichen Körper exponentiell (Arnot et al., 2011; Francia und Striepen, 2014). Voraussetzung hierfür ist die erfolgreiche Invasion eines Merozoiten in die rote Blutzelle (Baum et al., 2008) und die Entwicklung dieses Merozoiten in einen vielkernigen Schizonten (Absalon et al., 2016). Dieser Prozess, die sogenannte Schizogonie, ist mit der Herausbildung von bis zu 32 Tochtermerozoiten abgeschlossen. Essentiell hierfür ist der IMC (Absalon et al., 2016; Rudlaff et al., 2019; Saini et al., 2017), der durch seine exklusive Proteinkomposition in der Lage ist unterschiedliche Funktionen während der Invasion, der Zytokinese und der Gametozytogenese des Parasiten zu erfüllen (Gaskins et al., 2004; Hu et al., 2010; Kono et al., 2012, 2016). Bis heute sind ca. 35 der dort lokalisierten Proteine identifiziert (Absalon et al., 2016; Kono et al., 2012; Kono et al., 2016), jedoch ist das Proteom des IMC noch nicht vollständig bestimmt und nur für die wenigsten IMC-Proteine liegen funktionelle Daten vor (Absalon et al., 2016; Rudlaff et al., 2019; Saini et al., 2017). Dies gilt auch für den Basalkomplex als komplexe, distinkte Struktur innerhalb des IMC (Kono et al., 2016; Rudlaff et al., 2019). Diese dynamische Ringstruktur, die nur während der Zytokinese der Tochterzellen vorhanden ist, spielt möglicherweise bei der Invagination der Plasmamembran und bei der Migration des IMC eine entscheidende Rolle (Kono et al., 2016).

In *Toxoplasma gondii*, ebenfalls zu den Apikomplexa gehörend, wurde der Basalkomplex als kontraktile Ringstruktur des Zytoskeletts, welcher die Separierung der Tochterzellen vermittelt, als Erstes beschrieben (Hu et al. 2006). Dieser Komplex wird durch zahlreiche Proteine definiert: Morn1 (Hu et al., 2006), DLC (Hu et al., 2006), Centrin2 (Hu, 2008), die Alveoline IMC5, 8, 9, 13 und 15 (Anderson-White et al., 2012), MSC1 und 14-3-3 (Lorestani et al., 2012), HAD2 (Engelberg et al., 2016), das Zinkfingerprotein ZFP2 (Semenovskaya et al., 2020) sowie die Myosine C und J (Delbac et al., 2001; Frénel et al., 2017). Von diesen Proteinen sind interessanterweise lediglich Morn1 und HAD2 im Basalkomplex von *P. falciparum* lokalisiert. Allerdings wurden in *P. falciparum* zusätzliche Proteine rekrutiert: das *Plasmodien*-spezifische Protein BTP1 (Kono et al., 2016) und PF13_0225 (Winkelmann, 2016). Pf13_0225 kommt in *T. gondii* eine alternative Lokalisation in den Nähten der IMC-Platten zu (Chen et al., 2015). Diese Variation in der Proteinkomposition ist möglicherweise auf die alternativen Formen der Zellteilung – Schizogonie in *Plasmodien* und Endodyogenie in *Toxoplasmen* – zurückzuführen. Während in *Toxoplasma* zahlreiche Proteine charakterisiert und als essentiell beschrieben sind (Engelberg et al., 2016; Lorestani et al., 2010; Frenal et al.,

2017), ist in *Plasmodien* lediglich das Protein PfCINCH (Rudlaff et al., 2019), das erst kürzlich charakterisiert wurde, funktionell beschrieben.

Da der Basalkomplex, ebenso wie der IMC, keine homologe Membranstruktur in Säugerzellen besitzt, ist er *per se* ein interessanter experimenteller Angriffspunkt für Medikamente.

4.1 BTP2 und Pf13_0225, nicht aber Morn1, HAD2 und BTP1, können pSLI-abhängig deletiert werden

Kürzlich veröffentlichte Studien (Absalon et al., 2016; Rudlaff et al., 2019; Saini et al., 2017) zeigten erstmals, dass die konditionelle Deletion von einzelnen Proteinen des IMC und des Basalkomplexes dazu führt, dass sich der Parasit während der asexuellen Blutphase nicht weiterentwickeln kann. Diese Versuche unterstreichen die essentielle Bedeutung des IMC und des Basalkomplexes in der Biologie der *Plasmodien*.

Zur Identifikation essentieller Gene in Apikomplexa wurden genomweite Deletionsstudien entwickelt, die sogenannten *high-throughput loss-of-function screens*. i) In *P. berghei* erfolgte im Rahmen des *Plasmodium Genetic Modification Projects (PlasmoGem)* des Sanger Instituts eine homologe Rekombination mit Deletionsvektoren (Gomes et al., 2015). ii) In *P. falciparum* wurden mittels *piggyBac* in AT-reiche Genomabschnitte Transposons inseriert, dadurch Mutationen generiert und diese durch Sequenzierung identifiziert (Zhang et al., 2018). iii) In *T. gondii* wurde das CRISPR/CAS9-System verwendet (Sidik et al., 2016). Die Ergebnisse dieser Studien verschaffen einen ersten Überblick über die Redundanz der zu analysierenden Gene bzw. Proteine. Allerdings gibt es Limitierungen: i) In *PlasmoGem* sind nur etwa die Hälfte der *P. berghei*-Gene hinterlegt, des Weiteren wurden in der Vergangenheit Unterschiede in der Redundanz für *P. berghei*- und *P. falciparum*-Proteine gezeigt. ii) Ergebnisse aus *T. gondii* lassen sich aufgrund einer limitierten Homologie der Gene nur begrenzt auf Plasmodien übertragen.

In Plasmodien war eine zeitsparende Methode zur zielgerichteten, stabilen Modifikation des Genoms bis vor kurzem nicht verfügbar. Erst ein 2017 publiziertes System, die selektionsgekoppelte Integration (SLI), basierend auf der positiven Selektion seltener Integrationsereignisse, führte dazu, dass die funktionelle Analyse und Lokalisation von Proteinen stark vereinfacht wurde (Birnbaum et al., 2017). Die Kombination dieser Technik mit geläufigen konditionellen Methoden zur Inaktivierung von Genen, RNA und Proteinen, z. B. die Verwendung von Zinkfinger Nukleasen (Straimer et al., 2015), des

CRISPR-Cas9-Systems (Ghorbal et al., 2014), des DiCre-Systems (O'Neill et al., 2011) bzw. des *glmS*-Riboswitch-Systems (Prommana et al., 2013b) oder des DD-Systems (Armstrong und Goldberg, 2007), erleichterte die Grundlagenforschung in der jüngsten Vergangenheit enorm und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt.

Um eine erste Aussage über möglicherweise essentielle Proteine des Basalkomplexes zu treffen, wurde die SLI-TGD Methode (Birnbaum et al., 2017), eine Kombination der oben genannten SLI-Methode (Birnbaum et al., 2017) mit einer gezielten Gendelektionsmethode (Crabb et al., 1997), angewendet. Die Kombination dieser Methoden hat den Vorteil, dass innerhalb von sechs Wochen eine erste Aussage darüber getroffen werden kann, ob ein Gen in *P. falciparum* redundant ist. Ein Vergleich mit Daten der oben genannten genomweiten Deletionsstudien ermöglicht verlässliche Aussagen über die Redundanz der zu analysierenden Proteine.

In *Plasmodium falciparum* sind heute sechs Basalkomplex-Proteine bekannt: Morn1, HAD2, BTP1, BTP2 und PF13_0225 (siehe Abschnitt 1.3.4) sowie ein nach Abschluss dieser Arbeit veröffentlichtes Protein PfCINCH (Rudlaff et al., 2019).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass drei der *bis dato* fünf bekannten Basalkomplex-Proteine – Morn1, HAD1 und BTP1 – mit der SLI-TGD Methode nicht deletiert werden können. Dies deutet darauf hin, dass sie eine wichtige Funktion für die asexuelle Blutphase von *P. falciparum* besitzen.

Während in *T. gondii* bereits gezeigt wurde, dass Morn1 und HAD2 für die Tochterzellbildung essentiell sind (Gubbels et al., 2006, Engelberg et al., 2016), was ebenfalls durch Daten des genomweiten CRISPR/CAS9-Screens in *T. gondii* unterstützt wird (Sidik et al., 2016), deuten die Ergebnisse dieser Arbeit daraufhin, dass Morn1, HAD2 und BTP1 in *P. falciparum* ebenfalls eine entscheidende Funktion erfüllen.

Die Daten werden durch die Transposon-basierten, genomweiten Mutagenese-Daten aus *P. falciparum* unterstützt, welche BTP1, und auch Morn1 und HAD2, als essentiell klassifiziert (Zhang et al., 2018). Hingegen wurden die Proteine Morn1, HAD2a und PF13_0225 in *P. berghei* als redundant klassifiziert (Gomes et al., 2017). Dies erscheint widersprüchlich, allerdings wurde in *P. berghei* gezeigt, dass diese auf der einen Seite im Vergleich zu anderen Apikomplexa ein reduziertes Repertoire an IMC-Proteinen exprimieren, und auf der anderen Seite stadienabhängig variierende Funktionen erfüllen (Dubey et al., 2017; Tremp et al., 2014).

Interessanterweise ist Pf13_0225 in der Transposon-basierten Studie von Zhang und Kollegen mit einem *MIS score* von 0,329 in *P. falciparum* als essentiell eingestuft, welches jedoch hier durch homologe Rekombination deletiert werden kann (Winkelmann, 2016).

Dieses könnte durch eine Vielzahl von Gründen erklärt werden. Zum Beispiel: i) in der Transposon-basierten Studie von Zhang und Kollegen (Zhang et al., 2016) wurde nicht für alle Gene eine Mutationssättigung erreicht, sodass es möglicherweise nicht zur funktionellen Inaktivierung kommt. ii) Die pSLI-basierte Studie selektioniert eine kompensatorische Parasitenpopulation. iii) In der pSLI-basierten Studie ist das verkürzt exprimierte Protein ausreichend zur Erfüllung seiner Funktion.

Um die physiologische Bedeutung der anscheinend essentiellen Proteine näher zu untersuchen, wurden hier zwei konditionelle Methoden, zum einen das *knock-sideways*-System zur Inaktivierung von Proteinen (beschrieben in Abschnitt 3.1.2), zum anderen das *glmS*-Riboswitch System zur RNA-Degradation, genutzt (beschrieben in Abschnitt 3.1.3.).

In *P. falciparum* wurde das *knock-sideways*-System bisher lediglich für zytosolische oder im Kern lokalisierte Proteine erfolgreich beschrieben (Birnbaum et al., 2017). Allerdings wurde gezeigt, dass in *P. berghei* das Protein GAP50, welches IMC-lokalisiert ist, erfolgreich an die Plasmamembran mislokalisiert werden konnte (Hughes und Waters, 2017). Aufgrund der engen räumlichen Nähe von IMC und Plasmamembran ist es allerdings nicht möglich zu sagen, ob lediglich das Protein GAP50 oder der komplette IMC an die Plasmamembran gezogen wurde, und ob auch eigentlich redundante Proteine einen letalen Phänotyp erzielen würden.

Daher sollte in einem Vorversuch mit zwei Proteinen des Inneren Membrankomplexes zunächst getestet werden, ob diese in den Kern mislokalisiert werden können und sich das *knock-sideways*-System somit auch als erfolgreich für membranlokalisierte Proteine erweist. Es konnte gezeigt werden, dass eine Mislokalisierung von Alveolin 5 erfolgreich war (Abb. 13). Interessanterweise führte aber der gleiche Ansatz mit dem Protein Mal13P1.228, welches ebenfalls nicht über Transmembran-Domänen oder längere hydrophobe Bereiche verfügt, zu keiner Mislokalisierung: Hier wurde der im Kern exprimierte Mislokalisierer an den IMC gezogen. Dies spricht für einen relativ stabilen Membranassoziationsmechanismus des Proteins, und zeigt in weiterer Folge, dass das *knock-sideways*-System nur teilweise geeignet ist, um Proteine des Inneren Membrankomplexes durch Mislokalisierung zu inaktivieren.

Knock-sideways-Versuche mit den Basalkomplex-Proteinen Morn1 und BTP1 zeigten eine erfolgreiche Mislokalisierung von Morn1 (Abb. 14). Mislokalisierung von BTP1 war nicht möglich. Während der zweite Befund keine Überraschung darstellt, da BTP1 über vier Transmembrandomänen stabil in der Membran verankert ist, steht der Befund des Proteins Morn1 (das Fehlen eines Phänotyps bei Mislokalisierung des Proteins in den Kern) im augenscheinlichen Widerspruch zu den negativen Ergebnissen des SLI-Ansatzes (Tab.

16), der Studie von Zhang und Kollegen (Zhang et al., 2018) sowie den funktionellen Daten aus *Toxoplasma gondii* (Lorestani et al., 2010). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Mislokalisierung des Zielproteins nicht 100%ig erfolgte und ein gewisser Anteil des Zielproteins am Wirkort verbleibt. Im Falle von Morn1 könnte dieser submikroskopische Anteil für die Funktion des Proteins unter den gegebenen Versuchsbedingungen genug sein, um die Abwesenheit von Morn1 funktionell zu kompensieren.

Für beide Proteine stellt der *glmS*- oder der *diCre*-basierte Versuchsansatz eine vielversprechende Alternative dar. Für Morn1 wurde das *glmS*-System bereits in dieser Arbeit etabliert, jedoch konnte hier keine verminderte Expression bei Zucker-induzierter RNA-Degradation festgestellt werden, wodurch es effektiv zu keinem Morn1 *knock-down* gekommen ist (Abb. 16). Eine wahrscheinliche Ursache für diese funktionelle Ineffektivität des Ribozymes könnte der hohe Gehalt an Glucose im verwendeten Kulturmedium sein. Dieser ist höher als im Medium der Originalarbeit (W. Trager and J. B. Jensen, 1976) und es ist bekannt, dass ein hoher Glucose-Gehalt die Ribozym-Aktivität hemmt. Deswegen soll zunächst die MORN1-*glmS* Zelllinie an Glucose-ärmeres Medium adaptiert werden und dann die Versuche wiederholt werden.

Die Verwendung eines *DiCre*-basierten Systems hätte hingegen in erster Linie den Vorteil, dass keine Hintergrundexpression des Proteins erfolgt (da das komplette Ursprungsgen deletiert wird), Rückmutation des Gens nicht möglich ist, sowie die *off-target*-Effekte selten sind. Weiterhin hat sich das System als sehr effektiv erwiesen.

Allerdings zeigte sich in der Vergangenheit, und auch in dieser Arbeit, dass eine Vorhersage, welches System für welches Protein geeignet erscheint, schwer zu treffen ist (De Koning-Ward et al., 2015; Webster and McFadden, 2014).

Ein weiterer praktischer Aspekt für die Wahl des *knock-sideways*-Systems war, dass transgene Parasiten, die das zu untersuchende Protein gekoppelt mit einer FKBP-Domäne exprimierten, lediglich durch episodale Expression eines BirA* Proteins gleichzeitig zur Identifikation neuer Interaktionspartner genutzt werden können – dies mittels DIQ-BioID.

4.2 Identifikation neuer Proteine des Basalkomplexes mittels DIQ-BioID

Die BioID-Methode wird angewendet, um in *in vivo* interagierende oder eng benachbarte Proteine durch eine aktive BirA*-Ligase mit Biotin zu markieren und mittels Massenspektrometrie zu identifizieren (Roux et al., 2012). BioID ist in *P. falciparum* etabliert und wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um neue Proteine der parasitären Vakuole (Khosh-Naucke et al., 2018) oder der Rhoptrien (Geiger et al., 2020) zu identifizieren. Auch in *T. gondii* wird diese Methode genutzt (Tosetti et al., 2020; Engelberg et al., 2019), auch u. a. zur Identifizierung neuer IMC-Proteine (Chen et al., 2015).

Eine modifizierte Methode, die sogenannte DIQ-BioID (Birnbaum et al., 2020), die die Anzahl falsch positiver Proteine verringert, wurde in dieser Arbeit angewandt, um weitere Proteine des Basalkomplexes zu identifizieren und um diesen näher zu definieren. DIQ-BioID beruht auf der konditionellen, Rapalog-induzierten Dimerisierung des zytosolisch, episomal exprimierten Fusionsproteins 2xFRB_BirA*_mCherry und dem endogen markierten Morn1_2xFKPB_GFP.

In der vorliegenden Arbeit wurde DIQ-BioID für Morn1 angewendet. Hierfür wurde durch Zugabe von Rapalog die Biotinligase BirA* an den Basalkomplex lokalisiert und die induzierte (+ Rapalog/+ Biotin) mit der nicht-induzierten Fraktion (- Rapalog/+ Biotin) verglichen. Eine Analyse der massenspektrometrischen Daten ergab, dass insgesamt 64 Proteine in der induzierten Fraktion angereichert wurden, wobei Morn1 am stärksten angereichert ist, was eine erfolgreiche Biotinylierung bestätigt. Die Analyse zeigt, dass 23 der identifizierten Proteine als Proteine annotiert sind, welche in Transkriptions- und Translationsprozesse involviert sind. Dies ist naheliegend, da Morn1 ebenfalls im Mikrotubuli-organisierenden Zentrum lokalisiert. Aus diesem Grund ist es nötig eine weitere BioID, mit alternativen Proteinen des Basalkomplexes durchzuführen. Des Weiteren wurden sechs Proteine involviert in Transportprozesse, 14 Proteine mit sonstigen Funktionen und 19 bis heute unbekannte Proteine identifiziert. Unter diesen Proteinen findet sich auch MyoJ, welches ebenfalls im Basalkomplex von *T. gondii* lokalisiert (Fréchal et al., 2017), sowie ein weiteres HAD-Phosphatase (PF3D7_1118400).

Insgesamt fällt auf, dass die Zahl der positiv identifizierten Proteine sehr gering ist. Weitere Versuche sollten daher mit einer verbesserten Enzymvariante durchgeführt werden, der sogenannten Turbo-BioID (Branon et al., 2018). Diese biotinyliert umliegende Proteine in lediglich zehn Minuten, während die hier verwendete Ligase ca. 12 h benötigt, ein Zeitfenster, das die Präsenz des Basalkomplexes im Parasiten von ca. 6 h weit überschreitet. Vermutlich wurden hauptsächlich Interaktionspartner von Morn1 im

MTOC (einer alternativen Lokalisation von Morn1; Kono et al., 2016) identifiziert. Das MTOC bildet sich während jeder Kernteilung aus, während der Basalkomplex lediglich während der Tochterzellbildung, d. h. der letzten Runde der Kernteilung, im Parasiten ausgebildet wird.

Daher ist es möglich, dass die identifizierten, putativen Basalkomplex-Proteine frühe Marker-Proteine des Basalkomplexes darstellen. Die geringe Anzahl der identifizierten Basalkomplex-Proteine, im Gegensatz zu einer großen Anzahl an Proteinen involviert in anderen Prozessen, kann allerdings auch auf eine weitere Sub-Kompartimentierung des Basalkomplexes hindeuten. Kollokalisationsstudien von Morn1 mit dem Basalkomplex-Protein PF13_0225 zeigten, dass diese eng benachbart im Basalkomplex vorliegen und nicht vollständig koloalisieren (Scharf, Gilberger, 2017).

Ein Vergleich der Expressionsprofile (verfügbar auf *PlasmoDB*) der identifizierten, noch nicht annotierten Proteine ergab, dass eines dieser Proteine ein Basalkomplex-typisches Expressionsprofil aufweist – PF3D7_1019100. Dieses sollte in nachfolgender Arbeit weiter charakterisiert werden.

Allerdings wurden in der Gruppe der Proteine, welche in der induzierten Fraktion angereichert sind, wenn auch nicht exklusiv, drei Vertreter einer Gruppe in *P. falciparum in vitro* noch nicht charakterisierter Proteine identifiziert – die Kinesine. Hierbei handelt es sich um Kinesin 5 (PF3D7_0317500), Kinesin 8.2 (PF3D7_0319400) und Kinesin 13 (PF3D7_1245100). Es ist naheliegend zu vermuten, dass Kinesine als Motorproteine möglicherweise an der aktiven, Basalkomplex-vermittelten Migration des IMC beteiligt sein könnten.

4.2.1 Kinesine als Bestandteile des Basalkomplexes?

Kinesine bilden eine Superfamilie Mikrotubuli-basierter Motorproteine, welche in allen eukaryotischen Zellen vorkommen (Wickstead et al., 2010). Sie erfüllen für den Organismus essentielle Funktionen wie unter anderem den Transport von Vesikeln und Organellen, Chromosomen und Proteinkomplexen innerhalb der Zelle.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe von BioID drei Kinesine identifiziert - Kinesin 5 (PF3D7_0317500), Kinesin 8.2 (PF3D7_0319400) und Kinesin 13 (PF3D7_1245100), die über Morn1 anscheinend mit dem Basalkomplex assoziiert sind. Homologe dieser drei Kinesine stehen in anderen Eukaryoten mit Zellteilungsprozessen in Verbindung (Alberts, 2020, Moores and Milligan, 2006). Studien von Wickstead und Kollegen (Wickstead et al., 2010), Zeeshan und Kollegen (Zeeshan et al., 2019a) und Leung und Kollegen (Leung et

al., 2017) zeigen allerdings, dass im Kinesin-Repertoire der Eukaryoten, und insbesondere auch der Apikomplexa, eine hohe Divergenz vorliegt und diese möglicherweise ein Hinweis auf eine mögliche Plastizität der Funktion von Kinesine sind. Da der IMC, aber auch der apikale Komplex, Alveolata-spezifisch sind wurden während der Evolution möglicherweise alternative Funktionen der Kinesine etabliert und bspw. für den Prozess der IMC-Migration Kinesine rekrutiert, die in anderen eukaryotischen Zellen alternative Funktionen einnehmen.

Die Studie von Leung (Leung et al., 2017) zeigt beispielsweise, dass in dem ebenfalls der Gruppe der Apikomplexa zugehörigen Parasiten *Toxoplasma gondii* die Deletion von Kinesin A (TgGT1_267370), welches im Konoid lokalisiert ist, zur Auflösung des Apikalen Rings und zur Ablösung der daran aufgehängten Mikrotubuli führt. Dieses hat drastische Auswirkungen auf Form, Beweglichkeit und Invasionsverhalten von *T. gondii*. Der Phänotyp beruht unter anderem auf einer Reduktion der Adhesin-Sekretion aus den Mikronemen (Leung et al., 2017). Ein weiteres Kinesin (Kinesin B – TGGT1-273560; Hu et al., 2006; Homolog in Plasmodien: PF3D7_1211000) wurde ebenfalls an den kortikalen Mikrotubuli lokalisiert, allerdings in einem distinkten Bereich (Leung et al., 2017).

Die Überlegung, dass Kinesine die Migration des IMC während der Tochterzellbildung vermitteln könnten, ist motiviert durch Forschungsergebnisse an Kinesin-Rezeptorproteinen, den sogenannten Kinektinen (Burkhardt, 1996), die in der Membran von Bakterien und Säugerzellen nachgewiesen wurden. Diese Kinektine sind über eine N-terminale hydrophobe Aminosäuresequenz in der Membran verankert. Der C-terminale Bereich des Proteins bindet wahrscheinlich das Kinesin-Molekül, welches wiederum über eine Motordomäne mit den Mikrotubuli verbunden ist. Denkbar wäre, dass die identifizierten Kinesine als mikrotubuli-basierte Motoren eine Verbindung zwischen IMC Vesikeln und den subpellikulären Mikrotubuli (fMast) direkt unter der Plasmamembran, entweder direkt oder über weitere Adapterproteine herstellen und damit Bewegung vermitteln bzw. bewerkstelligen.

Alternativ, falls keine Kinesin-basierte "Migration" im klassischen Sinne vorliegt, sondern die laufende IMC-Elongation während der Entstehung der Merozoiten durch die kontinuierliche Vesikelfusion vom Golgi gewährleistet wird, ist ebenfalls eine Involvierung von Kinesinen vorstellbar. In *Toxoplasma* wurde gezeigt, dass das Rabkinesin-6 als Effektorprotein von Rab6 eine wichtige Rolle bei Zellteilung und Bildung von Tochterzellen spielt (Stedman et al., 2003). In diesem Szenario würden die plasmodialen Kinesine die Verbindung bilden zwischen Mikrotubuli und vom Golgi-kommenden, rab-positiven Vesikeln mit Ziel IMC einnehmen.

Um die Funktion der Kinesine und deren mögliche Assoziation und funktionelle Verknüpfung mit dem Basalkomplex im Malariaparasiten zu untersuchen, wurden die fünf während der Blutphase spät transkribierten Kinesine (Abb. 19; Wichers et al., 2019): PF3D7_0317500, PF3D7_1211000, PF3D7_0111000, PF3D7_1245100, PF3D7_0724900 und PF3D7_0319400 lokalisiert und funktionell inaktiviert. Die Nomenklatur in der vorliegenden Arbeit folgt dabei der Nomenklatur in Wickstead et al. (Wickstead et al., 2010).

Die Lokalisationsstudien der GFP-markierten Kinesine in *Plasmodium falciparum* ergaben, dass keines der Proteine am Basalkomplex lokalisiert:

- Kinesin 5 und Kinesin 8.2 wurden im MTOC lokalisiert. Dies wurde durch Kolo-kalisation mit den bekannten Markerproteinen α -Tubulin und Centrin 3 bestätigt.
- Kinesin 19 lokalisiert im Zytosol; Kinesin 7 und 8 zeigten lediglich ein schwaches Signal und konnten nicht genauer lokalisiert werden.
- Kinesin 13 konnte durch den gewählten pSLI-basierten Versuchsansatz nicht mit GFP markiert werden.

Die MTOC-Assoziation von Kinesine 5 und 8.2 während der Blutphase von *P. falciparum* legt eine "klassische" Funktion dieser Kinesine während der Mitose (ev. Kontrolle von Mikrotubuli-Dynamik und Alignment von Chromosomen während der Metaphase) nahe. Funktionell wurden die Kinesine durch das *knock-sideways*-System (Birnbaum et al., 2017) untersucht. Hierfür wurden die Proteine vom Ort ihres Wirkens mislokalisiert. Weder eine Lokalisation der Kinesine an einen alternativen Ort im Zellkern noch an die Plasmamembran zeigte einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Parasiten. Für die Kinesine 8 und 8.2 wurde dies in *P. berghei* durch zwei kürzlich veröffentlichte Studie von Zeeshan und Kollegen (Zeeshan et al., 2019b, 2019a) bestätigt.

Es ist möglich, dass die Kinesine aufgrund ihrer großen Homologie untereinander (Vicente and Wordeman, 2015) eine hohe Redundanz aufweisen und während der Blutphase die Funktion von Kinesin 5 durch ein ebenfalls im MTOC lokalisiertes Protein, wie Kinesin 8.2, übernommen wird. Hierfür spricht, dass trotz einer verhältnismäßig geringen Anzahl an Kinesinen diese zum größten Teil während der Tochterzellbildung der *Plasmodien* exprimiert werden. Konditionelle Doppel-*Knock-outs* dieser beiden Kinesine könnten hierfür experimentelle Daten liefern.

Die Ergebnisse der Mislokalisation mittels *knock-sideways* unterstützen die Feststellung, dass die Kinesine zumindest eine gewisse Redundanz in der asexuellen Proliferation aufweisen. Studien von Lasonder und Kollegen und Tao und Kollegen zeigen, dass in *P.*

berghei (Tao et al., 2014) und *P. falciparum* (Lasonder et al., 2016) Kinesin 8 explizit bei der pre-sexuellen Differenzierung männlicher Gametozyten hochreguliert ist.

Zwei kürzlich veröffentlichte Studien liefern hierbei eine detaillierte Charakterisierung von zwei Proteinen der Kinesin-8-Familie (Zeeshan et al., 2019b, 2019a) in *P. berghei*. Spannenderweise wurde eine Lokalisation von Kinesin 8B im sich bildenden Flagellum gezeigt. Flagellen, konservierte und mikrotubuli-basierte Organellen, welche Zellbewegung vermitteln, sind in *Plasmodien* lediglich in männlichen Gameten vorhanden (Sinden et al., 1976 und Frenal et al., 2017). Dies erklärt, warum das Protein während der Blutphase von *Plasmodium* nicht als GFP-Fusionsprotein lokalisiert werden konnte, auch wenn RNA-Expressionsdaten einen starken Anstieg zu Beginn des Trophozoitenstadiums im Blut zeigen (Abb. 20). Die Studie verdeutlicht, dass dieses Kinesin in *P. berghei* eine alternative Funktion jenseits der Zellteilung ausübt.

Lokalisationsstudien mit Kinesin 8X in Gametozyten von *P. berghei* (das Homolog zu Kinesin 8.2 in dieser Arbeit) bestätigen die hier gezeigte Assoziation (Abb. 21) mit dem Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) und eine zusätzliche Lokalisation mit dem mitotischen und meiotischen Spindelapparat (Zeeshan et al., 2019b). In dieser Studie wird gezeigt, dass Kinesin 8X essentiell für die Entwicklung der Oozyste in der Mücke und während der Sporogenie ist und somit für die Transmission auf den vertebraten Wirt eine wichtige Rolle spielt. Im Gegensatz zu *P. falciparum* konnte während der asexuellen Blutphase in *P. berghei* kein Kinesin-8-GFP-Signal detektiert werden. Allerdings muss hinzugefügt werden, dass Kinesin 8.2 in der vorliegenden Arbeit lediglich schwach exprimiert ist (siehe Abb. 21).

Jenseits ihrer zellbiologischen Funktion haben Kinesine Potential bei der experimentellen Wirkstoffsuche. Im Rahmen eines *small molecule screens* mit Substanzen aus der Kollektion der Medicines of Malaria Venture wurde MMV666693 als spezifischer Inhibitor von Kinesin 5 in *P. falciparum* und *P. vivax* mit einem IC₅₀ Wert unter 100 nM identifiziert (Liu et al., 2014). Es ist hervorzuheben, dass hierbei ein *Plasmodien*-spezifisches, allosterisches Zentrum in der Motordomäne inhibiert wird und die Substanz somit eine hohe Spezifität ohne Kreuzreaktivität mit humanen Kinesinen aufweist (Liu et al., 2014)

Dieses Ergebnis steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu den vorliegenden Daten dieser Arbeit, die zeigen, dass die Mislokalisierung von Kinesin 5 aus dem Zellkern keinen messbaren Einfluss auf das Wachstum der Parasiten während der Blutphase hat. Allerdings könnte es möglich sein, dass aufgrund der Ähnlichkeit der Struktur der Kinesine untereinander, MMV666693 ebenfalls auf ein weiteres plasmodiales Kinesin

einwirkt. Hierfür würde auch sprechen, dass Transposon-basierte Mutagenese-Daten aus *P. falciparum* alle Kinesine als redundant klassifizieren.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Hypothese, dass Kinesine als Motoren der IMC-Migration dienen, nicht durch die hier erzielten Ergebnisse unterstützt wird. Die Kinesine 5 und 8.2 kolokalisieren mit bekannten Proteinen des Kernteilungsapparates in *P. falciparum* und sind damit vermutlich an der Mitose beteiligt.

4.3 Der Abbau des IMC als Angriffspunkt für Therapeutika?

Ebenso wie die Biogenese stellt der Abbau des Inneren Membrankomplexes einen essentiellen Schritt zur Aufrechterhaltung der für eukaryotische Zellen extrem schnellen Zellproliferation von *P. falciparum* dar.

Als Schlüsselinstrument bei der Zytogenese und Invasion wird der IMC nach erfolgreicher Invasion nicht nur nicht mehr benötigt, sondern stellt für die Etablierung und das Wachstum des Parasiten in seiner neuen Wirtszelle ein Hindernis dar. Wie der Abbau dieser komplexen Struktur, bestehend aus einem doppelschichtigen Membransäckchen und einer Vielzahl in Struktur und Funktion variierenden Proteine, erfolgt und wodurch dieser Abbau initiiert wird, ist bis heute weder in *P. falciparum* noch in irgendeiner anderen Gruppe der Alveolata zugehörigen Organismen untersucht. Lediglich in *Toxoplasma gondii* wurde gezeigt, dass der IMC der Mutterzelle in den IMC der Tochterzellen übergeht (Ouologuem and Roos, 2014). Dies scheint für die Blutphase von *Plasmodium falciparum* nicht plausibel, insbesondere mit Hinblick auf die erst 36 h nach Invasion beginnende Tochterzellbildung, in welcher der IMC *de novo* synthetisiert wird.

In *P. falciparum* erscheint der Abbau des IMC zügig nach erfolgreicher Invasion zu erfolgen. In 4D-mikroskopischen Untersuchungen können amöboide Bewegungen des Parasiten im Erythrozyten schon 10 min nach der Invasion dargestellt werden (Grüning et al., 2011). Weiterhin zeigt eine elektronenmikroskopische Untersuchung von einem frisch invadierten Ring (< 10 min nach Invasion) ein ca. 200 nm langes Membranfragment, das einen Teil einer sich auflösenden IMC-Membran darstellen könnte (Riglar et al., 2013).

Dies zeigt allerdings auch die Schwierigkeiten bei der Untersuchung dieses Prozesses auf: zum einen ist der Parasit in diesem Lebensstadium sehr klein (1,5 μm), zum anderen scheint der Abbau des IMC in einem sehr kurzen Zeitfenster stattzufinden.

In dieser Arbeit wurde die dynamische Lokalisation von drei IMC-Proteinen mit unterschiedlichen Membranassoziationsmechanismen lichtmikroskopisch nach der Invasion eines Erythrozyten analysiert. Während das über einen bis heute unbekanntem Mechanismus mit der IMC-Membran assoziierte Protein Mal13P1.228 zu keinem Zeitpunkt im jungen Ring zu detektieren ist, ist das über eine Alveolindomäne membranassoziierte Protein Alveolin 5 gleichmäßig im Zytosol verteilt detektierbar. Hingegen ist das Protein GAPM2, welches fest in der Membran verankert ist, in vesikelartigen Strukturen detektierbar, welche sich in der Zelle zu bewegen scheinen.

Keines der drei untersuchten Proteine ist in der Peripherie des Ringes lokalisiert, was auf einen Abbau des IMC hindeutet. Einschränkend muss gesagt werden, dass auch hier keine präparierten Merozoiten verwendet wurden. Nur dieses ermöglicht eine genaue zeitliche Untersuchung der IMC-Dynamik nach Invasion. Jedoch konnte durch die Kolo-kalisation mit Rex 1, einem Protein, welches zwei bis drei Stunden nach erfolgreicher Invasion in das Zytosol der Zelle exportiert wird, bestätigt werden, dass die abgebildeten Parasiten relativ junge Ringstadien darstellen.

Es kann nur spekuliert werden, dass der Zerfall des IMC-Doppelmembran-Komplexes für die Freisetzung der IMC-Proteine ursächlich verantwortlich ist und diese Proteine auf Grund ihrer unterschiedlichen Mechanismen der Membranassoziation dann an unterschiedlichen Lokalisationen zu finden sind. Dieses ist zum Beispiel für Nukleoporeine beim Zerfall der Kernmembran dokumentiert. Hier wurde gezeigt, dass nach Zerfall der Kernmembran während der Mitose beispielsweise Lamin A/C in das Zytosol entlassen wird, während Lamin B in die Membran des rauen ER lokalisiert (Daigle et al., 2001; Yang et al., 1997).

In eukaryotischen Zellen ist neben dem lysosomalen System das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), für dessen Beschreibung 2004 der Nobelpreis an Ciechanover, Hershko und Rose verliehen wurde, zuständig für den Abbau oder das Recycling von Proteinen (Glickman and Ciechanover, 2002). Dieses System dient der Qualitätskontrolle von Proteinen und reguliert in eukaryotischen Zellen Prozesse wie beispielsweise die Signaltransduktion, den Zellzyklus und die Transportprozesse (zusammengefasst in Alberts et al., 2012). Auch in *Plasmodien* ist das Proteasom essentiell (Wang et al., 2015). Um Proteine dem UPS zuzuführen, werden diese enzymatisch durch Anhängen einer Polyubiquitinkette modifiziert und dann im 26S Proteasom degradiert. Studien zeigen, dass eine Inhibierung des Proteasoms die Entwicklung des Parasiten in unterschiedlichen Lebensstadien, wie beispielsweise den Gametozyten (Czesny et al., 2009), während der

Leberphase von *P. berghei* zu Beginn der Schizogonie und im Erythrozyten in jungen *P. falciparum* Ringstadien inhibiert (Lindenthal et al., 2005).

Um zu untersuchen, ob das UPS in den Abbau der IMC-Proteine involviert ist, wurden zwei etablierte Inhibitoren eingesetzt, MG-132 (Kreidenweiss et al., 2008; Prasad et al., 2013) und Pyr-41 (Yang et al., 2007), welche im UPS unterschiedliche Zielstrukturen besitzen. MG-132 inhibiert hierbei direkt das Proteasom, während Pyr-41 das Enzym Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 des Ubiquitin-Systems hemmt. Hierbei zeigt sich, dass das Transmembranprotein GAPM2, welches in unbehandelten Ringstadien lediglich als verkürztes GFP-gebundenes Fragment vorliegt, nach Behandlung von Parasiten mit MG-132 und Pyr-41 während der Invasion als vollständiges Protein im Westernblot nachweisbar ist. Dies lässt vermuten, dass die IMC-Proteine mit Ubiquitin markiert werden und so dem Proteasom für die Proteolyse zugeführt werden. Ob dieses mit der IMC-Membranauflösung einher geht, oder eine Voraussetzung ist, bleibt zu klären.

Diese Beobachtung geht mit dem Ergebnis einer kürzlich veröffentlichten Publikation einher, die zeigt, dass neben anderen invasionsrelevanten Proteinen, insbesondere IMC-Proteine im freien Merozoiten bzw. während des Übergangs vom Schizont zum freien Merozoit stark ubiquitiniert sind (Wu et al., 2019) und, dass diese Ubiquitinierung essentiell für die fortlaufende Entwicklung des Parasiten ist. Hingegen lassen sich kurz nach erfolgreicher Invasion nur wenige ubiquitinierte IMC-Proteine identifizieren (Wu et al., 2019).

Die Ubiquitin-abhängige, sogenannte regulierte Proteolyse ist in anderen eukaryotischen Zellen gleichzeitig wichtiges Kontroll- und Regulationswerkzeug für den unidirektionalen Ablauf zellulärer Prozesse (Borg and Dixit, 2017; Glotzer et al., 1991) und wird hauptsächlich durch streng regulierte Expressionslevel der beteiligten Enzyme kontrolliert. Inwieweit hier ein Zusammenspiel zwischen Signaltransduktion während der Invasion, Expressionsregulation invasionsrelevanter Proteine und einer regulierenden Signalkaskade des IMC-Abbaus besteht, darüber kann nur spekuliert werden, wäre allerdings ein interessanter Ansatzpunkt für nachfolgende Forschung.

Alternativ zum UPS-System wäre ein Abbau des IMC über autophagische Prozesse möglich. Autophagie bezeichnet den Abbau zellulären Materials im Lysosom (Alberts, 2012). Es wurde von verschiedenen Gruppen gezeigt, dass Autophagie in *Plasmodien* in den unterschiedlichen Stadien des Lebenszyklus stattfindet (u.a. Cervantes et al., 2014). Kolokalisations-Studien mit dem Autophagie-Marker ATG8 mit GAPM2 in jungen Ringen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, zeigte allerdings keine Kolokalisation (Daten nicht gezeigt). Gegen einen Abbau des IMC über Autophagie spricht auch, dass das

plasmodiale Pendant zum Lysosom, die Fressvakulole, erst zu Beginn des Trophozitenstadiums ca. 20h nach Invasion gebildet wird (Rosenthal, 2005).

Wünschenswert wäre eine differenzierte lichtmikroskopische Darstellung von Membranlipiden, insbesondere benachbarter Membranen wie IMC und Plasmamembran, die die Darstellung des Umbaus und Zerfalls des IMC ermöglichen würde. Während dieses in *Toxoplasma* durch die Verwendung der Plasmamembran und IMC-spezifischen BODIPY-CE bzw. BODIPY-cholesteryl anscheinend möglich ist, (Johnson et al., 2007), konnte dieses für *Plasmodium* im Rahmen dieser Arbeit nicht reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Dies spricht möglicherweise für eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung des Organells in *Plasmodium* und *Toxoplasma*.

Da fluoreszenzmikroskopisch lediglich Proteine, keine Membranen, visualisiert werden konnten, wurde zusätzlich hochauflösende FIB-SEM-Mikroskopie in Kombination mit Kryofixierung durchgeführt. Diese Technik umgeht die zahlreichen, notwendigen Schritte in der klassischen EM, die durch Fixierung, Dehydrierung und Einbettung zu Artefakten wie Membranperturbation führen kann. Die FIB-Technik (*focussed ion beam milling*; Schaffer et al., 2017), bei der mittels des fokussierten Ionenstrahls in 250 nm Schritten Zelllamellen hergestellt werden, ermöglicht die 3D-Untersuchung von zellulären Strukturen mit elektronenmikroskopischer Auflösung.

Mit dieser Technik wurden zwei frisch invadierte Erythrozyten untersucht. Hierfür wurden die Parasitenkulturen 15 min nach Zugabe von aufgereinigten Schizonten zu uninfizierten Erythrozyten mittels Kryofixierung konserviert (Abb. 30). Beide Parasiten weisen kein Membransystem auf, das dem IMC ähnelt, jedoch ist eine Vielzahl von membranösen Strukturen wie die Plasmamembran, die Membran der parasitophoren Vakuolen mit dem parasitophoren Vakuolenmembrannetzwerk, die Kernmembran sowie der Golgi-Apparat mit sich abschnürenden Vesikeln sehr gut darstellbar.

Eine Arbeit in *Plasmodium berghei*, die die morphologischen Veränderungen während der Transformation von Sporozoiten zu Trophozoiten (ein allerdings Stunden andauernder Prozess) untersucht, zeigt elektronenmikroskopisch ausgedehnte Membranstapel, die als Überreste des IMC interpretiert werden (Jayabalasingham et al., 2010). Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM) mit geeigneten Markerzelllinien erscheint unerlässlich, um hier genauere Aussagen treffen zu können. Diese Membranstapel sind interessanterweise in Blutstadien von *P. falciparum* in der vorliegenden Arbeit nicht detektierbar.

Es ist interessant zu spekulieren, was mit den Phospholipiden der IMC passiert, die eine fast 50% größere Membranstruktur als die eigentliche Plasmamembran darstellt.

Eine Möglichkeit wäre der Export von Membranmaterial in das Zytosol des infizierten Erythrozyten oder die Inkorporation des IMC-Materials in die Plasmamembran des Parasiten. Für den Export spricht, dass im Zytosol des Erythrozyten bereits relativ früh nach Invasion (spätestens zwei bis drei Stunden, wie durch das membranlokalisierte Protein Rex1 gezeigt, möglicherweise früher) membranöse Strukturen wie z.B. die Maurerschen Spalten zu finden sind.

Neben einer Studie aus dem Jahr 2013, in der ein Transferprotein für Phospholipide gefunden wurde (van Ooij et al., 2013), gibt es bisher allerdings keinen Hinweis auf ein Transportsystem für Phospholipide in der Plasmamembran von *P. falciparum* während der erythrozytären Blutphase, welche einen Export von Phospholipiden in das Zytosol der roten Blutzelle vermitteln würden.

Naheliegender mag allerdings eine streng organisierte Umorganisation der Membranen und des Zytoskeletts innerhalb des Parasiten sein. D. h. ein Recycling in die sich stark ausdehnende, über der IMC liegende Plasmamembran, da sich die Größe des Parasiten von 2 µm Länge im Tochtermerozoiten während der Ringphase mindestens verdoppelt und auch hierfür eine umfassende Plasmamembranexpansion nötig ist.

In eukaryotischen Zellen ist bekannt, dass Lipide über spezielle Kontaktstellen zwischen den Membranen ausgetauscht werden können (Scorrano et al., 2019). Eine Veränderung der Lipidzusammensetzung mag eventuell zur Verschmelzung der Membranen führen, Einfluss auf Lipid-Protein-Interaktionen nehmen und auch auf Eigenschaften der Membran. Auch in *Plasmodium* wurden kürzlich Proteine (RASP – *rho*ptry apical surface proteins und PfCERLI - *exposed rho*ptry leaflet interacting protein 1) identifiziert, welche während des Invasionsprozesses Lipide binden und die Verschmelzung der Rhoptrienmembran mit der Plasmamembran vermittelt (Suarez et al., 2019; Liffner et al., 2020). Hiermit einhergehend zeigen umfangreiche elektronenmikroskopische Studien in drei Dimensionen an jungen Ringstadien aus dem Jahr 2004 (Bannister et al., 2004) den Export von Vesikeln mit Doppelmembranen in die Plasmamembran, die Membran der Parasitären Vakuole und in das Zytosol des Erythrozyten durch Exocytose (*double-membraned vesicle-based*).

Im Gegensatz zu anderen Zellen, die bei Prozessen der Membranexpansion, wie beispielsweise der Zellteilung, ebenso auf Strategien wie Exozytose oder endozytisches Recycling zurückgreifen (Boucrot and Kirchhausen, 2007), sollte hier erwähnt werden, dass der eigentlich stark konservierte ESCRT-Komplex (*endosomal sorting complex*

required for transport), eine in Membranumbau involvierte Maschinerie, im Genom von *Plasmodium falciparum* nicht kodiert ist (Leung et al., 2008).

Prozesse erheblicher Membranumwälzung finden auch während der Zellteilung in anderen eukaryotischen Zellen statt. Hier werden unter anderem die Kernmembran, das Endoplasmatische Reticulum und der Golgi-Apparat mit Beginn der Mitose aufgelöst und in der Tochterzelle neu aufgebaut. Wie diese Prozesse ablaufen, wird allerdings auch in Säugerzellen erst ansatzweise verstanden (zusammengefasst u.a. in Carlton et al., 2020). Darüber hinaus ist auch hier der Verbleib der Membran unbekannt. Bekannt ist allerdings, dass durch die Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen durch CDC2, CDK1 und PKC zu Beginn der Mitose die Kernmembran von der darunterliegenden Lamina gelöst wird, Kernmembranproteine in das Endoplasmatische Retikulum übergehen und beide Membranen somit ihre Identität verlieren (Walczak et al., 2010).

In diesem Zusammenhang stellt sich auch die Frage: was gibt das ausschlaggebende Signal für den Abbau des Membrankomplexes? - ein im Rahmen dieser Arbeit nicht beleuchteter, aber hoch interessanter Schritt während des Abbaus des Inneren Membrankomplexes. Hierbei muss es sich um einen streng regulierten Prozess handeln, da der IMC den für den Invasionsprozess essentiellen Aktin-Myosin-Motor verankert. Ein zu frühes Zusammenbrechen würde die Invasion somit unmöglich machen.

Das enge Zusammenspiel zahlreicher invasionsrelevanter Proteine und insbesondere der Ausschüttung von Rhoptrien- und Mikronemenproteinen während des Invasionsprozesses wird durch streng regulierte Signalkaskaden bestehend aus Kinasen, Phosphatasen und anderen Effektoren gesteuert (u. a. zusammengefasst in Frénalet al., 2017). Bilden die Ubiquitinierung und der Abbau der IMC-Proteine den Abschluss bzw. die Fortsetzung einer streng regulierten Signalkaskade, welche während der Invasion aktiviert wurde?

Anhang

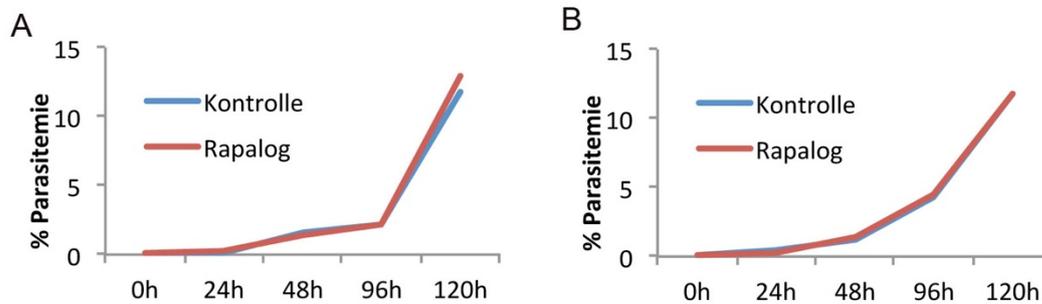


Abbildung S1: Eine Wachstumskurve über fünf Tage mit täglicher Bestimmung der Parasitämie mittels Durchflusszytometrie zeigt keinen negativen Einfluss der Alveolin 5 Mislokalisierung auf das Wachstum der Parasiten.

Tabelle S1:

	Gen-ID	Annotierung in PlasmoDB	log₂FC + vs-
1	PF3D7_0106200	Uncharacterized protein	24,3280755
2	PF3D7_1031200	MORN repeat-containing protein 1	21,0761247
3	PF3D7_0921500	Uncharacterized protein	20,5778243
4	PF3D7_0600700	Rifin	19,8998746
5	PF3D7_1033900	Ubiquitin-conjugating enzyme	19,452943
6	PF3D7_0303900	Phosphatidylethanolamine-binding protein, putative	18,2523005
7	PF3D7_1358100	Small subunit rRNA processing factor, putative	17,9373876
8	PF3D7_1143400	Translation initiation factor eIF-1A, putative	17,8210951
9	PF3D7_0721400	Uncharacterized protein.	17,7940541
10	PF3D7_1118400	Haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative.	17,4795198
11	PF3D7_1229800	Myosin J	17,2477699
12	PF3D7_1418200	Uncharacterized protein	17,2431275
13	PF3D7_0410600	Uncharacterized protein.	16,9607147
14	PF3D7_0602200	MYND finger protein, putative	16,7656616
15	PF3D7_1030000	Transcription elongation factor SPT4, putative	16,3059139

16	PF3D7_0322100	RNA triphosphatase	16,117286
17	PF3D7_0716000	RNA-binding protein, putative	16,0038297
18	PF3D7_1306800	RED-like protein, putative	15,4386229
19	PF3D7_1006900	PPPDE peptidase, putative.	15,4344002
20	PF3D7_1328500	Alpha/beta-hydrolase, putative	15,326584
21	PF3D7_0512300	CDK-activating kinase assembly factor	15,1397672
22	PF3D7_1146000	Ribosome assembly protein 4, putative	14,4350842
23	PF3D7_0528100	AP complex subunit beta	13,9302106
24	PF3D7_1414100	Uncharacterized protein	13,8827959
25	PF3D7_0215800	Origin recognition complex subunit 5	13,7841645
26	PF3D7_0103100	Vacuolar protein sorting-associated protein 51, putative	13,730364
27	PF3D7_0213900	Uncharacterized protein	13,6449941
28	PF3D7_1126300.1	DnaJ protein, putative PF3D7_1126300.1	13,4308707
29	PF3D7_0413900	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	13,2843181
30	PF3D7_0718500	Prefoldin subunit 3	12,9887202
31	PF3D7_1353800	Proteasome subunit alpha type	12,9346492
32	PF3D7_1432900	SF-assemblin, putative	12,7556387
33	PF3D7_1333600	U3 small nucleolar RNA-associated protein 4, putative	12,7122196
34	PF3D7_0802500	Inositol 5-phosphatase, putative	12,57643
35	PF3D7_1123100	Calcium-dependent protein kinase 7	12,1809659
36	PF3D7_1468800	Splicing factor U2AF large subunit, putative	12,1709891
37	PF3D7_1030100	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP22, putative	12,101549
38	PF3D7_1428900	Uncharacterized protein	11,8092858
39	PF3D7_0819500	Uncharacterized protein.	11,725068
40	PF3D7_0811000	Cullin-1, putative	11,6647584
41	F3D7_0806300	Ferlin, putative P	11,4694383
42	PF3D7_0516700	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2, putative	11,4345761
43	PF3D7_0203700	MAK16, putative	11,4245862
44	PF3D7_0802600	Adenylyl cyclase beta	11,3075993
45	PF3D7_1405100	GTPase-activating protein, putative	11,3065744
46	PF3D7_0418500	Trafficking protein particle complex subunit	11,1023038

47	PF3D7_1244200	RNA polymerase II transcription factor B subunit 2, putative	11,099808
48	PF3D7_0308900	Splicing factor 3B subunit 1, putative	11,0856716
49	PF3D7_0924400	Uncharacterized protein	10,8788939
50	PF3D7_1145200	Serine/threonine protein kinase, putative	10,7042495
51	PF3D7_1225800	Ubiquitin-activating enzyme E1	10,5627194
52	PF3D7_0310900	Uncharacterized protein	10,4910514
53	PF3D7_1140800	Uncharacterized protein OS=Plasmodium falciparum	10,443876
54	PF3D7_1127800	Uncharacterized protein	10,3053778
55	PF3D7_1331100	DNA polymerase theta, putative	10,1715521
56	PF3D7_0727000	Vacuolar protein sorting-associated protein 53, putative	9,40458811
57	PF3D7_1335700	Uncharacterized protein	9,39482707
58	PF3D7_0514100	ATP-dependent DNA helicase UvrD	8,94392133
59	PF3D7_1013500	Phosphoinositide phospholipase C	8,93572492
60	PF3D7_1019100	Uncharacterized protein	8,61154127
61	PF3D7_0619800	Uncharacterized protein	8,56403514
62	PF3D7_0806700	Uncharacterized protein	8,51052683
63	PF3D7_1326500	Uncharacterized protein	8,38115357
64	PF3D7_0506500	Uncharacterized protein	8,29232163

Literaturverzeichnis

Absalon, S., Robbins, J.A., and Dvorin, J.D. (2016a). An essential malaria protein defines the architecture of blood-stage and transmission-stage parasites. *Nat. Commun.* *7*, 11449.

Absalon, S., Robbins, J.A., and Dvorin, J.D. (2016b). An essential malaria protein defines the architecture of blood-stage and transmission-stage parasites. *Nat. Commun.* *7*, 11449.

Agnandji, S.T., Lell, B., Fernandes, J.F., Abossolo, B.P., Kabwende, A.L., Adegnika, A.A., Mordmüller, B., Issifou, S., Kremsner, P.G., Loembe, M.M., et al. (2014). Efficacy and Safety of the RTS,S/ASo1 Malaria Vaccine during 18 Months after Vaccination: A Phase 3 Randomized, Controlled Trial in Children and Young Infants at 11 African Sites. *PLoS Med.* *11*.

Agop-Nersesian, C., Naissant, B., Rached, F. Ben, Rauch, M., Kretzschmar, A., Thiberge, S., Menard, R., Ferguson, D.J.P., Meissner, M., and Langsley, G. (2009). Rab11A-controlled assembly of the inner membrane complex is required for completion of apicomplexan cytokinesis. *PLoS Pathog.* *5*.

Alberts Molecular Biology of the Cell.

Anderson-white, B.R., Ivey, F.D., Cheng, K., Szatanek, T., Lorestani, A., Beckers, C.J., Ferguson, D.J.P., Sahoo, N., and Gubbels, J. (2012). *NIH Public Access.* *13*, 18–31.

Armstrong, C.M., and Goldberg, D.E. (2007). An FKBP destabilization domain modulates protein levels in *Plasmodium falciparum*. *Nat. Methods* *4*, 1007–1009.

Arnot, D.E., Ronander, E., and Bengtsson, D.C. (2011). The progression of the intra-erythrocytic cell cycle of *Plasmodium falciparum* and the role of the centriolar plaques in asynchronous mitotic division during schizogony. *Int. J. Parasitol.* *41*, 71–80.

Baer, K., Klotz, C., Kappe, S.H.I., Schnieder, T., and Frevert, U. (2007). Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog.* *3*, 1651–1668.

Baker, R. P., Wijetilaka, R., and Urban, S. (1971). Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Trop. Med.* *65*, 549–559.

Bannister, L.H., Hopkins, J.M., Fowler, R.E., Krishna, S., and Mitchell, G.H. (2000). A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol. Today* *16*, 427–433.

- Bannister, L.H., Hopkins, J.M., Margos, G., Dluzewski, A.R., and Mitchell, G.H. (2004). Microscopy Microanalysis Three-Dimensional Ultrastructure of the Ring Stage of *Plasmodium falciparum* : Evidence for Export Pathways. 551–562.
- Baum, J., Gilberger, T.-W., Frischknecht, F., and Meissner, M. (2008). Host-cell invasion by malaria parasites: insights from *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Trends Parasitol.* *24*, 557–563.
- Van Den Berg, H. (2009). Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Environ. Health Perspect.* *117*, 1656–1663.
- Bhatt, S., Weiss, D.J., Cameron, E., Bisanzio, D., Mappin, B., Dalrymple, U., Battle, K.E., Moyes, C.L., Henry, A., Eckhoff, P.A., et al. (2015). The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* *526*, 207–211.
- Birnbaum, J., Flemming, S., Reichard, N., Soares, A.B., Mesén-Ramírez, P., Jonscher, E., Bergmann, B., and Spielmann, T. (2017). A genetic system to study *Plasmodium falciparum* protein function. *Nat. Methods* *14*, 450–456.
- Birnbaum, J., Scharf, S., Schmidt, S., Jonscher, E., Maria Hoeijmakers, W.A., Flemming, S., Toenhake, C.G., Schmitt, M., Sabitzki, R., Bergmann, B., et al. (2020). A Kelch13-defined endocytosis pathway mediates artemisinin resistance in malaria parasites. *Science* (80-.). *367*, 51–59.
- Blasco, B., Leroy, Di., and Fidock, D.A. (2017). Antimalarial drug resistance: Linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. *Nat. Med.* *23*, 917–928.
- Bolte, Stefanie Cordelieres, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* *224*, 213–232.
- Borg, N.A., and Dixit, V.M. (2017). Ubiquitin in Cell-Cycle Regulation and Dysregulation in Cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.* *1*, 59–77.
- Boucrot, E., and Kirchhausen, T. (2007). Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 7939–7944.
- Boyle, M.J., Wilson, D.W., and Beeson, J.G. (2013). New approaches to studying *Plasmodium falciparum* merozoite invasion and insights into invasion biology. *Int. J. Parasitol.* *43*, 1–10.
- Brancucci, N.M.B., Bertschi, N.L., Zhu, L., Niederwieser, I., Chin, W.H., Wampfler, R., Freymond, C., Rottmann, M., Felger, I., Bozdech, Z., et al. (2014). Heterochromatin protein 1 secures survival and transmission of malaria parasites. *Cell Host Microbe* *16*, 165–176.

- Brancucci, N.M.B., Gerdt, J.P., Wang, C.Q., De Niz, M., Philip, N., Adapa, S.R., Zhang, M., Hitz, E., Niederwieser, I., Boltryk, S.D., et al. (2017). Lysophosphatidylcholine Regulates Sexual Stage Differentiation in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell* *171*, 1532-1544.e15.
- Branon, T.C., Bosch, J.A., Sanchez, A.D., Udeshi, N.D., Svinkina, T., Carr, S.A., Feldman, J.L., Perrimon, N., Ting, A.Y., and Author, N.B. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID HHS Public Access Author manuscript. *Nat Biotechnol* *36*, 880–887.
- Bruce, M.C., Alano, P., Duthie, S., and Carter, R. (1989). Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. 191–200.
- Burkhardt, J.K. (1996). In search of membrane receptors for microtubule-based motors - Is kinectin a kinesin receptor? *Trends Cell Biol.* *6*, 127–131.
- Carlton, J.G., Jones, H., and Eggert, U.S. (2020). Membrane and organelle dynamics during cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *21*, 151–166.
- Cavalier-Smith, T. (1993). Kingdom protozoa and its 18 phyla.
- Cecile Crosnier (2012). Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion. *Nature* *480*, 534–537.
- Cervantes, S., Bunnik, E.M., Saraf, A., Conner, C.M., Escalante, A., Sardu, M.E., Ponts, N., Prudhomme, J., Florens, L., and Le Roch, K.G. (2014). The multifunctional autophagy pathway in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Autophagy* *10*, 80–92.
- Chen, A.L., Kim, E.W., Toh, J.Y., Vashisht, A.A., Rashoff, A.Q., Van, C., Huang, A.S., Moon, A.S., Bell, H.N., Bentolila, L.A., et al. (2015). Novel components of the toxoplasma inner membrane complex revealed by BioID. *MBio* *6*, 1–12.
- Clyde, D.F., Most, H., McCarthy, V.C., and Vanderberg, J.P. (1973). Immunization of man against sporozoite induced *falciparum* malaria. *Am. J. Med. Sci.* *266*, 169–177.
- Cohen, J.M., Smith, D.L., Cotter, C., Ward, A., Yamey, G., Sabot, O.J., and Moonen, B. (2012). Malaria resurgence: a systematic review and assessment of its causes. *Malar. J.* *11*, 122.
- Collins, W.E., and Jeffery, G.M. (2005). *Plasmodium ovale*: Parasite and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* *18*, 570–581.
- Cowman, A.F., Berry, D., and Baum, J. (2012). The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J. Cell Biol.* *198*, 961–971.

Crabb, B.S., and Cowman, A.F. (1996). Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 7289–7294.

Crabb, B.S., Cooke, B.M., Reeder, J.C., Waller, R.F., Caruana, S.R., Davern, K.M., Wickham, M.E., Brown, G. V., Coppel, R.L., and Cowman, A.F. (1997). Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell* *89*, 287–296.

Czesny, B., Goshu, S., Cook, J.L., and Williamson, K.C. (2009). The proteasome inhibitor epoxomicin has potent *Plasmodium falciparum* gametocytocidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 4080–4085.

Daigle, N., Beaudouin, J., Hartnell, L., Imreh, G., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J., and Ellenberg, J. (2001). Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *J. Cell Biol.* *154*, 71–84.

Deitsch, K., Driskill, C., and Wellems, T. (2001). Transformation of malaria parasites by the spontaneous uptake and expression of DNA from human erythrocytes. *Nucleic Acids Res.* *29*, 850–853.

Delbac, F., Sanger, A., Neuhaus, E.M., Stratmann, R., Ajioka, J.W., Toursel, C., Hermgotz, A., Tomavo, S., Soldati, T., and Soldati, D. (2001). *Toxoplasma gondii* myosins B/C: One gene, two tails, two localizations, and a role in parasite division. *J. Cell Biol.* *155*, 613–623.

Dixon, M.W. a, Dearnley, M.K., Hanssen, E., Gilberger, T., and Tilley, L. (2012). Shapeshifting gametocytes: how and why does *P. falciparum* go banana-shaped? *Trends Parasitol.* *28*, 471–478.

Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A.P., Tarning, J., Ph, D., Lwin, K.M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., et al. (2009). Artemisinin Resistance in. *Drug Ther. (NY)*. *361*, 455–467.

van Dooren, G.G., Marti, M., Tonkin, C.J., Stimmler, L.M., Cowman, A.F., and McFadden, G.I. (2005). Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* *57*, 405–419.

Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* *16*, 6127–6145.

Dubey, R., Harrison, B., Dangoudoubiyam, S., Bandini, G., Cheng, K., Kosber, A., Agopnernessian, C., Howe, D.K., Samuelson, J., Ferguson, D.J.P., et al. (2017). Differential Roles

for Inner Membrane Complex Proteins across *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* Development. *MSphere* 2, 1–19.

Dubremetz, J.F., and Torpier, G. (1978). Freeze fracture study of the pellicle of an Eimerian sporozoite (Protozoa, Coccidia). *J. Ultrastructure Res.* 62, 94–109.

Eksi, S., Morahan, B.J., Haile, Y., Furuya, T., Jiang, H., Ali, O., Xu, H., Kiattibutr, K., Suri, A., Czesny, B., et al. (2012). *Plasmodium falciparum* Gametocyte Development 1 (Pfgdv1) and Gametocytogenesis Early Gene Identification and Commitment to Sexual Development. *PLoS Pathog.* 8.

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., et al. (2014). PTEX is an essential nexus for protein export in malaria parasites. *Nature* 511, 587–591.

Enayati, A., and Hemingway, J. (2010). Malaria Management: Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 569–591.

Engelberg, K., Paul, A.S., Prinz, B., Kono, M., Ching, W., Heincke, D., Dobner, T., Spielmann, T., Duraisingh, M.T., and Gilberger, T.-W. (2013). Specific phosphorylation of the PfRh2b invasion ligand of *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* 452, 457–466.

Engelberg, K., Ivey, F.D., Lin, A., Kono, M., Lorestani, A., Faugno-Fusci, D., Gilberger, T.W., White, M., and Gubbels, M.J. (2016). A MORN1-associated HAD phosphatase in the basal complex is essential for *Toxoplasma gondii* daughter budding. *Cell. Microbiol.* 18, 1153–1171.

Epp, C., Raskolnikov, D., and Deitsch, K.W. (2008). A regulatable transgene expression system for cultured *Plasmodium falciparum* parasites. *Malar. J.* 7, 86.

Eric Hanssen, Christian Knoechel, b Megan Dearnley, c, d Matthew W.A. Dixon, c, d Mark Le Gros, b Carolyn Larabell, b, e and Leann Tilley, D. (2012). Soft X-ray microscopy analysis of cell volume and hemoglobin content in erythrocytes infected with asexual and sexual stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Structural Biol.* 177(2), 224–232.

Ferguson, D.J.P., Sahoo, N., Pinches, R.A., Bumstead, J.M., Tomley, F.M., and Gubbels, M.J. (2008). MORN1 has a conserved role in asexual and sexual development across the Apicomplexa. *Eukaryot. Cell* 7, 698–711.

Filarsky, M., Frasnica, S.A., Niederwieser, I., Brancucci, N.M.B., Carrington, E., Carrió, E., Moes, S., Jenoe, P., Bártfai, R., and Voss, T.S. R E S E A R C H.

Flueck, C., Bartfai, R., Volz, J., Niederwieser, I., Salcedo-Amaya, A.M., Alako, B.T.F., Ehlgen, F., Ralph, S.A., Cowman, A.F., Bozdech, Z., et al. (2009). *Plasmodium falciparum*

heterochromatin protein 1 marks genomic loci linked to phenotypic variation of exported virulence factors. *PLoS Pathog.* *5*.

Fowler, R.E., Smith, A.M.C., Whitehorn, J., Williams, I.T., Bannister, L.H., and Mitchell, G.H. (2001). Microtubule associated motor proteins of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* *117*, 187–200.

Francia, M.E., and Striepen, B. (2014). Cell division in apicomplexan parasites. *Nat. Rev. Microbiol.* *12*, 125–136.

Frédéric Arie^{1, 2,†}, Benoit Witkowski³, Chanaki Amaratunga⁴, Johann Beghain^{1, 2,†}, Anne- Claire Langlois^{1, 2}, Nimol Khim³, Saorin Kim³, Valentine Duru³, Christiane Bouchier⁵, Laurence Ma⁵, Pharath Lim^{3, 4, 6}, Rithea Leang⁶, Soheat Duong⁶, Sokunthea Sren, and D.M. (2016). A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *1*, 23–30.

Frénal, K., Jacot, D., Hammoudi, P.M., Graindorge, A., MacO, B., and Soldati-Favre, D. (2017a). Myosin-dependent cell-cell communication controls synchronicity of division in acute and chronic stages of *Toxoplasma gondii*. *Nat. Commun.* *8*.

Frénal, K., Dubremetz, J.F., Lebrun, M., and Soldati-Favre, D. (2017b). Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. *Nat. Rev. Microbiol.* *15*, 645–660.

Friesen, J., and Matuschewski, K. (2011). Comparative efficacy of pre-erythrocytic whole organism vaccine strategies against the malaria parasite. *Vaccine* *29*, 7002–7008.

Friesen, J., Silvie, O., Putrianti, E.D., Hafalla, J.C.R., Matuschewski, K., and Borrmann, S. (2010). Natural immunization against malaria: Causal prophylaxis with antibiotics. *Sci. Transl. Med.* *2*.

Froeschl, G., Beissner, M., Huber, K., Bretzel, G., Hoelscher, M., and Rothe, C. (2018). *Plasmodium knowlesi* infection in a returning German traveller from Thailand: A case report on an emerging malaria pathogen in a popular low-risk travel destination. *BMC Infect. Dis.* *18*, 4–9.

Gantz, V.M., Jasinskiene, N., Tatarenkova, O., Fazekas, A., Macias, V.M., Bier, E., and James, A.A. (2015). Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E6736–E6743.

Garoff, H., and Ansorge, W. (1981). Improvements of DNA Sequencing. *Anal. Biochem.* *115*, 450–457.

Gaskins, E., Gilk, S., DeVore, N., Mann, T., Ward, G., and Beckers, C. (2004).

Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Biol.* *165*, 383–393.

Geiger, M., Brown, C., Wichers, J.S., Strauss, J., Lill, A., Thuenauer, R., Liffner, B., Wilcke, L., Lemcke, S., Heincke, D., et al. (2020). Structural Insights Into PfARO and Characterization of its Interaction With PfAIP. *J. Mol. Biol.* *432*, 878–896.

Ghorbal, M., Gorman, M., MacPherson, C.R., Martins, R.M., Scherf, A., and Lopez-Rubio, J.J. (2014). Genome editing in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Biotechnol.* *32*, 819–821.

Giemsa, G. (1904). Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung. *Cent. Für Bakteriolog.* *37*, 307–313.

Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* *82*, 373–428.

Glotzer M Murray A W Kirschner M.W (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* *354*, 737–740.

Glushakova, S., Beck, J.R., Garten, M., Busse, B.L., Nasamu, A.S., Tenkova-Heuser, T., Heuser, J., Goldberg, D.E., and Zimmerberg, J. (2018). Rounding precedes rupture and breakdown of vacuolar membranes minutes before malaria parasite egress from erythrocytes. *Cell. Microbiol.* *20*.

Gomes, A.R., Bushell, E., Schwach, F., Girling, G., Anar, B., Quail, M.A., Herd, C., Pfander, C., Modrzynska, K., Rayner, J.C., et al. (2015). A genome-scale vector resource enables high-throughput reverse genetic screening in a malaria parasite. *Cell Host Microbe* *17*, 404–413.

Gosling, R.D., Drakeley, C.J., Mwitwa, A., and Chandramohan, D. (2008). Presumptive treatment of fever cases as malaria: Help or hindrance for malaria control? *Malar. J.* *7*, 5–8.

Gould, S.B., Tham, W.-H., Cowman, A.F., McFadden, G.I., and Waller, R.F. (2008). Alveolins, a new family of cortical proteins that define the protist infrakingdom Alveolata. *Mol. Biol. Evol.* *25*, 1219–1230.

Greenwood, B.M. (1987). Asymptomatic malaria infections - Do they matter? *Parasitol. Today* *3*, 206–214.

Grüring, C., Heiber, A., Kruse, F., Ungefähr, J., Gilberger, T.-W., and Spielmann, T. (2011). Development and host cell modifications of *Plasmodium falciparum* blood stages in four

dimensions. *Nat. Commun.* **2**, 165.

Gubbels, M.-J., Vaishnava, S., Boot, N., Dubremetz, J.-F., and Striepen, B. (2006). A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *J. Cell Sci.* **119**, 2236–2245.

Hammond, A., Galizi, R., Kyrou, K., Simoni, A., Siniscalchi, C., Katsanos, D., Gribble, M., Baker, D., Marois, E., Russell, S., et al. (2016). A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat. Biotechnol.* **34**, 78–83.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580.

Health Organization, W. World Malaria Report 2016 – English summary.

Hemingway, J., and Ranson, H. (2000). Insecticide Resistance in Vectors of Human Disease. *PLoS Pathog.* **2**, e371–391.

Hilts, M., Millet, C., Dixon, M.W., Siden-Kiamos, I., McMillan, P., and Tilley, L. (2014). Organization and function of an actin cytoskeleton in *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Cell. Microbiol.* **1–40**.

Hu, K. (2008). Organizational changes of the daughter basal complex during the parasite replication of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* **4**, e10.

Hu, G., Cabrera, A., Kono, M., Mok, S., Chahal, B.K., Haase, S., Engelberg, K., Cheemadan, S., Spielmann, T., Preiser, P.R., et al. (2010). Transcriptional profiling of growth perturbations of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Biotechnol.* **28**, 91–98.

Hu, K., Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., DiLullo, C., Yates, J., Roos, D.S., and Murray, J.M. (2006). Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* **2**, e13.

Hughes, K.R., and Waters, A.P. (2017). Rapid inducible protein displacement in *Plasmodium* in vivo and in vitro using knocksideways technology. *Wellcome Open Res.* **2**, 1–23.

J. Stephan Wichers, Judith A. M. Scholz, Jan Strauss, Susanne Witt, Andrés Lill, Laura-Isabell Ehnold, A., Niklas Neupert, Benjamin Liffner, Renke Lühken, Michaela Petter, Stephan Lorenzen, D.W.W., and Christian Löw, Catherine Lavazec, Iris Bruchhaus, Egbert Tannich, Tim W. Gilberger, A.B. (2019). Dissecting the Gene Expression, Localization, Membrane Topology, and Function of the *Plasmodium falciparum* STEVOR Protein

Family. *MBio* 10, 1–20.

Jayabalasingham, B., Bano, N., and Coppens, I. (2010). Metamorphosis of the malaria parasite in the liver is associated with organelle clearance. *Cell Res.* 20, 1043–1059.

Jensen (1978). Observations on Gametogenesis in.

Joice, R., Nilsson, S.K., Montgomery, J., Dankwa, S., Morahan, B., Seydel, K.B., Bertuccini, L., Alano, P., Kim, C., Duraisingh, M.T., et al. (2014). *Plasmodium falciparum* transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Genes Brain Behav* 6, 1–16.

Kafsack, B.F.C., Rovira-graells, N., Clark, T.G., and Bancells, C. (2014). Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in human malaria parasites. *507*, 248–252.

Khosh-Naucke, M., Becker, J., Mesén-Ramírez, P., Kiani, P., Birnbaum, J., Fröhlke, U., Jonscher, E., Schlüter, H., and Spielmann, T. (2018a). Identification of novel parasitophorous vacuole proteins in *P. falciparum* parasites using BioID. *Int. J. Med. Microbiol.* 308, 13–24.

Khosh-Naucke, M., Becker, J., Mesén-Ramírez, P., Kiani, P., Birnbaum, J., Fröhlke, U., Jonscher, E., Schlüter, H., and Spielmann, T. (2018b). Identification of novel parasitophorous vacuole proteins in *P. falciparum* parasites using BioID. *Int. J. Med. Microbiol.* 308, 13–24.

Klayman, D.L., Ai ' , +, Lin, J., Acton, N., Scov~u, J.P., Hoch, J.M., Milhous, W.K., Theoharides, A.D., and Dobek, A.S. (1984). Isolation of Artemisinin (Qinghaosu) From *Artemzsa a N N U a* Growing in the United States. *J. Nat. Prod.* L7d 47, 715–717.

Knobloch (2003). *Malaria - Grundlagen und klinische Praxis*.

De Koning-Ward, T.F., Gilson, P.R., and Crabb, B.S. (2015). Advances in molecular genetic systems in malaria. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 373–387.

De Koning-Ward, T.F., Dixon, M.W.A., Tilley, L., and Gilson, P.R. (2016). *Plasmodium* species: Master renovators of their host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 494–507.

Kono, M., Herrmann, S., Loughran, N.B., Cabrera, A., Engelberg, K., Lehmann, C., Sinha, D., Prinz, B., Ruch, U., Heussler, V., et al. (2012). Evolution and architecture of the inner membrane complex in asexual and sexual stages of the malaria parasite. *Mol. Biol. Evol.* 29, 2113–2132.

Kono, M., Heincke, D., Wilcke, L., Wong, T.W.Y., Bruns, C., Herrmann, S., Spielmann, T., and Gilberger, T.W. (2016a). Pellicle formation in the malaria parasite. *J. Cell Sci.* 129, 673–680.

- Kono, M., Heincke, D., Wilcke, L., Wong, T.W.Y., Bruns, C., Herrmann, S., Spielmann, T., and Gilberger, T.W. (2016b). Pellicle formation in the malaria parasite. *J. Cell Sci.* *129*, 673–680.
- Kreidenweiss, A., Kremsner, P.G., and Mordmüller, B. (2008). Comprehensive study of proteasome inhibitors against *Plasmodium falciparum* laboratory strains and field isolates from Gabon. *Malar. J.* *7*, 1–8.
- Kudryashev, M., Lepper, S., Stanway, R., Bohn, S., Baumeister, W., Cyrklaff, M., and Frischknecht, F. (2010). Positioning of large organelles by a membrane-associated cytoskeleton in *Plasmodium* sporozoites. *Cell. Microbiol.* *12*, 362–371.
- Kutner, S., Breuer, W. V, Ginsburg, H., Aley, S.B., and Cabantchik, Z.I. (1985). Characterization of Permeation Pathways in the Plasma-Membrane of Human-Erythrocytes Infected with Early Stages of *Plasmodium-Falciparum* - Association with Parasite Development. *J. Cell. Physiol.* *125*, 521–527.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Lambros, C., and Vanderberg, J.P. (1979). Synchronization of *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stages in Culture. *J. Parasitol.* *65*, 418.
- Lasonder, E., Rijpma, 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., et al. (2016). Integrated transcriptomic and proteomic analyses of *P. Falciparum* gametocytes: Molecular insight into sex-specific processes and translational repression. *Nucleic Acids Res.* *44*, 6087–6101.
- Lazarus, Schneider, T. (2008). A new model for hemoglobin ingestion and transport by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Cell Sci.* *121*, 1937–1949.
- Lee Sim, B.K., Toyoshima, T., David Haynes, J., and Aikawa, M. (1992). Localization of the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen in micronemes of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* *51*, 157–159.
- Leffler, E.M., Band, G., Busby, G.B.J., Kivinen, K., Le, Q.S., Clarke, G.M., Bojang, K.A., Conway, D.J., Jallow, M., Sisay-Joof, F., et al. (2017). Resistance to malaria through structural variation of red blood cell invasion receptors. *Science* (80-.). *356*, 1140–1152.
- Lepes, T. (1974). Present status of the global malaria eradication programme and prospects for the future. *J. Trop. Med. Hyg.* *77*, 47–53.
- Leung, J.M., He, Y., Zhang, F., Hwang, Y.C., Nagayasu, E., Liu, J., Murray, J.M., and Hu,

- K. (2017). Stability and function of a putative microtubule-organizing center in the human parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell* 28, 1361–1378.
- Leung, K.F., Dacks, J.B., and Field, M.C. (2008). Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic* 9, 1698–1716.
- Liffner, B., Frölich, S., Heinemann, G.K., Liu, B., Ralph, S.A., Dixon, M.W.A., Gilberger, T.W., and Wilson, D.W. (2020). PfCERLI1 is a conserved rhoptry associated protein essential for *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of erythrocytes. *Nat. Commun.* 11.
- Lindenthal, C., Weich, N., Chia, Y.S., Heussler, V., and Klinkert, M.Q. (2005). The proteasome inhibitor MLN-273 blocks exoerythrocytic and erythrocytic development of *Plasmodium* parasites. *Parasitology* 131, 37–44.
- Lingelbach, K.R. (1993). *Plasmodium falciparum*: A molecular view of protein transport from the parasite into the host erythrocyte. *Exp. Parasitol.* 76, 318–327.
- Liu, L., Richard, J., Kim, S., and Wojcik, E.J. (2014). Small molecule screen for candidate antimalarials targeting *Plasmodium* Kinesin-5. *J. Biol. Chem.* 289, 16601–16614.
- Lopaticki, S., Maier, A.G., Thompson, J., Wilson, D.W., Tham, W.H., Triglia, T., Gout, A., Speed, T.P., Beeson, J.G., Healer, J., et al. (2011). Reticulocyte and erythrocyte binding-like proteins function cooperatively in invasion of human erythrocytes by malaria parasites. *Infect. Immun.* 79, 1107–1117.
- Lorestani, A., Sheiner, L., Yang, K., Robertson, S.D., Sahoo, N., Brooks, C.F., Ferguson, D.J.P., Striepen, B., and Gubbels, M.J. (2010). A *Toxoplasma* MORN1 null mutant undergoes repeated divisions but is defective in basal assembly, apicoplast division and cytokinesis. *PLoS One* 5.
- Lorestani, A., Ivey, F.D., Thirugnanam, S., Busby, M.A., Marth, G.T., Cheeseman, I.M., and Gubbels, M.J. (2012). Targeted proteomic dissection of *Toxoplasma* cytoskeleton sub-compartments using MORN1. *Cytoskeleton* 69, 1069–1085.
- Ma, H., Lou, Y., Lin, W.H., and Xue, H.W. (2006). MORN motifs in plant PIPKs are involved in the regulation of subcellular localization and phospholipid binding. *Cell Res.* 16, 466–478.
- Mahajan, B., Selvapandiyan, A., Gerald, N.J., Majam, V., Zheng, H., Wickramarachchi, T., Tiwari, J., Fujioka, H., Moch, J.K., Kumar, N., et al. (2008). Centrins, cell cycle regulation proteins in human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 283, 31871–31883.

- Malleret, B., Claser, C., Ong, A.S.M., Suwanarusk, R., Sriprawat, K., Howland, S.W., Russell, B., Nosten, F., and Rénia, L. (2011). A rapid and robust tri-color flow cytometry assay for monitoring malaria parasite development. *Sci. Rep.* *1*, 118.
- Mann, T., and Beckers, C. (2001). Characterization of the subpellicular network, a filamentous.pdf. *Mol. Biochem. Parasitol.* *115*, 257–268.
- Marti, M., Baum, J., Rug, M., Tilley, L., and Cowman, A.F. (2005). Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte. *J. Cell Biol.* *171*, 587–592.
- Mcnamara, C.W., Lee, M.C.S., Lim, C.S., Lim, S.H., Roland, J., Simon, O., Yeung, B.K.S., Chatterjee, A.K., McCormack, S.L., Micah, J., et al. (2014). Europe PMC Funders Group Targeting Plasmodium phosphatidylinositol 4-kinase to eliminate malaria. *504*, 248–253.
- Miller, L.H., Aikawa, M., Johnson, J.G., and Shiroishi, T. (1979). Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes: Attachment and junction formation. *J. Exp. Med.* *149*, 172–184.
- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., and Doumbo, O.K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature* *415*, 673–679.
- Moon, R.W., Hall, J., Rangkuti, F., Ho, Y.S., Almond, N., Mitchell, G.H., Pain, A., Holder, A.A., and Blackman, M.J. (2013). Adaptation of the genetically tractable malaria pathogen *Plasmodium knowlesi* to continuous culture in human erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 531–536.
- Moores, C.A., and Milligan, R.A. (2006). Lucky 13 - Microtubule depolymerisation by kinesin-13 motors. *J. Cell Sci.* *119*, 3905–3913.
- Mordmüller, B., Surat, G., Lagler, H., Chakravarty, S., Ishizuka, A.S., Lalremruata, A., Gmeiner, M., Campo, J.J., Esen, M., Ruben, A.J., et al. (2017). Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. *Nature* *542*, 445–449.
- Morrisette, N.S., and Sibley, L.D. (2002a). Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *66*, 21–38.
- Morrisette, N.S., and Sibley, L.D. (2002b). Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *66*.
- Morrisette, N.S., Murray, J.M., and Roos, D.S. (1997). Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* *110*, 35–42.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods Enzymol.* *155*, 335–350.

- Mundwiler-Pachlatko, E., and Beck, H.-P. (2013). Maurer's clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 19987–19994.
- Nery, S., Deans, A., Mosobo, M., Marsh, K., Rowe, J.A., and Conway, D.J. (2010). UKPMC Funders Group Expression of *Plasmodium falciparum* genes involved in erythrocyte invasion varies among isolates cultured directly from patients. *149*, 208–215.
- Niraja Suresh, K.H. (2018). Mechanisms of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *Curr Opin Pharmacol.* *42*, 46–54.
- Nkumama, I.N., O'Meara, W.P., and Osier, F.H.A. (2017). Changes in Malaria Epidemiology in Africa and New Challenges for Elimination. *Trends Parasitol.* *33*, 128–140.
- Nussenzweig, R.S., Vanderberg, J., Most, H., and Orton, C. (1967). Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *plasmodium berghei*. *Nature* *216*, 160–162.
- O. Billker*, V. Lindo†, M. Panico†, A. E. Etienne†, T.P., and A. Dell†, M. Rogers‡, R.E.S.& H.R.M. (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *392*, 289–292.
- O'Neill, M.T., Phuong, T., Healer, J., Richard, D., and Cowman, A.F. (2011). Gene deletion from *Plasmodium falciparum* using FLP and Cre recombinases: Implications for applied site-specific recombination. *Int. J. Parasitol.* *41*, 117–123.
- Olotu, A., Fegan, G., Wambua, J., Nyangweso, G., Leach, A., Lievens, M., Kaslow, D.C., Njuguna, P., Marsh, K., and Bejon, P. (2016). Seven-year efficacy of RTS, S/ASo1 malaria vaccine among young african children. *N. Engl. J. Med.* *374*, 2519–2529.
- van Ooij, C., Withers-Martinez, C., Ringel, A., Cockcroft, S., Haldar, K., and Blackman, M.J. (2013). Identification of a *Plasmodium falciparum* phospholipid transfer protein. *J. Biol. Chem.* *288*, 31971–31983.
- Ouologuem, D.T., and Roos, D.S. (2014). Dynamics of the *Toxoplasma gondii* inner membrane complex. *J. Cell Sci.* *127*, 3320–3330.
- Parkyn Schneider, M., Liu, B., Glock, P., Suttie, A., McHugh, E., Andrew, D., Batinovic, S., Williamson, N., Hanssen, E., McMillan, P., et al. (2017). Disrupting assembly of the inner membrane complex blocks *Plasmodium falciparum* sexual stage development. *PLoS Pathog.* *13*, 1–30.
- Pennisi, E. (2015). SCIENCE AND SOCIETY. Gene drive turns mosquitoes into malaria fighters. *Science* (80-.). *350*, 1014.

- Pérez-Moreno, G., Cantizani, J., Sánchez-Carrasco, P., Ruiz-Pérez, L.M., Martín, J., El Aouad, N., Pérez-Victoria, I., Tormo, J.R., González-Menendez, V., González, I., et al. (2016). Discovery of new compounds active against *Plasmodium falciparum* by high throughput screening of microbial natural products. *PLoS One* *11*, 1–16.
- Pieperhoff, M.S., Pall, G.S., Jiménez-Ruiz, E., Das, S., Melatti, C., Gow, M., Wong, E.H., Heng, J., Müller, S., Blackman, M.J., et al. (2015). Conditional U1 gene silencing in *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* *10*, 1–24.
- Prasad, R., Atul, Kolla, V.K., Legac, J., Singhal, N., Navale, R., Rosenthal, P.J., and Sijwali, P.S. (2013). Blocking *Plasmodium falciparum* development via dual inhibition of hemoglobin degradation and the ubiquitin proteasome system by MG132. *PLoS One* *8*, e73530.
- Prommana, P., Uthaipibull, C., Wongsombat, C., Kamchonwongpaisan, S., Yuthavong, Y., Knuepfer, E., Holder, A.A., and Shaw, P.J. (2013a). Inducible Knockdown of *Plasmodium* Gene Expression Using the glmS Ribozyme. *PLoS One* *8*, 1–10.
- Prommana, P., Uthaipibull, C., Wongsombat, C., Kamchonwongpaisan, S., Yuthavong, Y., Knuepfer, E., Holder, A.A., and Shaw, P.J. (2013b). Inducible Knockdown of *Plasmodium* Gene Expression Using the glmS Ribozyme. *PLoS One* *8*, 1–10.
- Prudêncio, M., and Mota, M.M. (2007). To Migrate or to Invade: Those Are the Options. *Cell Host Microbe* *2*, 286–288.
- Rayner, J. C., Vargas-Serrato, E., Huber, C. S., Galinski, M. R., and Barnwell, J.W. (2001). A *Plasmodium falciparum* Homologue of *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Protein (PvRBP1) Defines a Trypsin-resistant Erythrocyte Invasion Pathway. *J. Exp. Med.* *194*, 1571–1582.
- Riglar, D.T., Rogers, K.L., Hanssen, E., Turnbull, L., Bullen, H.E., Charnaud, S.C., Przyborski, J., Gilson, P.R., Whitchurch, C.B., Crabb, B.S., et al. (2013). Spatial association with PTEX complexes defines regions for effector export into *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Nat. Commun.* *4*, 1415.
- Rocco, F. (2004). The miraculous fever-tree: Malaria, medicine and the cure that changed the world.
- Römer, W., Pontani, L.-L., Sorre, B., Rentero, C., Berland, L., Chambon, V., Lamaze, C., Bassereau, P., Sykes, C., Gaus, K., et al. (2010). Actin dynamics drive membrane reorganization and scission in clathrin-independent endocytosis. *Cell* *140*, 540–553.
- Roucher, C., Rogier, C., Sokhna, C., Tall, A., and Trape, J.F. (2014). A 20-year longitudinal

study of plasmodium ovale and plasmodium malariae prevalence and morbidity in a West African population. *PLoS One* 9, 1–13.

Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 196, 801–810.

Rudlaff, R.M., Kraemer, S., Streva, V.A., and Dvorin, J.D. (2019). An essential contractile ring protein controls cell division in *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.* 10, 1–13.

Sachs, J., and Malaney, P. (2002). The economic and social burden of malaria. *Nature* 415, 680–685.

Saini, E., Zeeshan, M., Brady, D., Pandey, R., Kaiser, G., Koreny, L., Kumar, P., Thakur, V., Tatiya, S., Katris, N.J., et al. (2017). Photosensitized INA-Labelled protein 1 (PhIL1) is novel component of the inner membrane complex and is required for *Plasmodium* parasite development. *Sci. Rep.* 7, 1–11.

Salinas, N.D., Paing, M.M., and Tolia, N.H. (2014). Critical glycosylated residues in exon three of erythrocyte glycophorin A engage *Plasmodium falciparum* EBA-175 and define receptor specificity. *MBio* 5, 1–10.

Salmon, B.L., Oksman, A., and Goldberg, D.E. (2001). Malaria parasite exit from the host erythrocyte: A two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 271–276.

Santos, J.M., Lebrun, M., Daher, W., Soldati, D., and Dubremetz, J.F. (2009). Apicomplexan cytoskeleton and motors: Key regulators in morphogenesis, cell division, transport and motility. *Int. J. Parasitol.* 39, 153–162.

Schaffer, M., Mahamid, J., Engel, B.D., Laugks, T., Baumeister, W., and Plitzko, J.M. (2017). Optimized cryo-focused ion beam sample preparation aimed at in situ structural studies of membrane proteins. *J. Struct. Biol.* 197, 73–82.

Scorrano, L., De Matteis, M.A., Emr, S., Giordano, F., Hajnóczky, G., Kornmann, B., Lackner, L.L., Levine, T.P., Pellegrini, L., Reinisch, K., et al. (2019). Coming together to define membrane contact sites. *Nat. Commun.* 10, 1–11.

Seder, R.A., Chang, L.J., Enama, M.E., Zephir, K.L., Sarwar, U.N., Gordon, I.J., Holman, L.S.A., James, E.R., Billingsley, P.F., Gunasekera, A., et al. (2013). Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science* (80-.). 341, 1359–1365.

Sidik, S.M., Huet, D., Ganesan, S.M., Huynh, M.H., Wang, T., Nasamu, A.S., Thiru, P.,

- Saeij, J.P.J., Carruthers, V.B., Niles, J.C., et al. (2016). A Genome-wide CRISPR Screen in *Toxoplasma* Identifies Essential Apicomplexan Genes. *Cell* 166, 1423-1435.e12.
- Silvestrini, F., Alano, P., and Williams, J.L. (2000). Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 121, 465-471.
- Singh, B., Kim Sung, L., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S.S.G., Cox-Singh, J., Thomas, A., and Conway, D.J. (2004). A large focus of naturally acquired *Plasmodium Knowlesi* infection in human beings. *Lancet* 363, 1017-1024.
- Singh, S., Alam, M.M., Pal-Bhowmick, I., Brzostowski, J.A., and Chitnis, C.E. (2010). Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. *PLoS Pathog.* 6.
- 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., et al. (2014). commitment and development in *Plasmodium*.
- Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Chareonviriyaphap, T., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Elyazar, I.R., Kabaria, C.W., Harbach, R.E., et al. (2011). The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit. Vectors* 4, 89.
- Spangenberg, T., Burrows, J.N., Kowalczyk, P., McDonald, S., Wells, T.N.C., and Willis, P. (2013). The Open Access Malaria Box: A Drug Discovery Catalyst for Neglected Diseases. *PLoS One* 8.
- Stedman, T.T., Sussmann, A.R., and Joiner, K.A. (2003). *Toxoplasma gondii* Rab6 mediates a retrograde pathway for sorting of constitutively secreted proteins to the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* 278, 5433-5443.
- Stokkermans, T.J.W., Schwartzman, J.D., Keenan, K., Morrissette, N.S., Tilney, L.G., and Roos, D.S. (1996). Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. *Exp. Parasitol.* 84, 355-370.
- Straimer, J., Gnadig, N.F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Duru, V., Ramadani, A.P., Dacheux, M., Khim, N., Zhang, L., Lam, S., et al. (2015). *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science* (80-.). 347, 428-431.
- Striepen, B., Jordan, C.N., Reiff, S., and van Dooren, G.G. (2007). Building the perfect parasite: cell division in apicomplexa. *PLoS Pathog.* 3, e78.
- Struck, N.S., de Souza Dias, S., Langer, C., Marti, M., Pearce, J.A., Cowman, A.F., and

- Gilberger, T.W. (2005). Re-defining the Golgi complex in *Plasmodium falciparum* using the novel Golgi marker PfGRASP. *J. Cell Sci.* *118*, 5603–5613.
- Stubbs, J., Simpson, K.M., Triglia, T., Plouffe, D., Tonkin, C.J., Duraisingh, M.T., Maier, A.C., Winzeler, E.A., and Cowman, A.F. (2005). Microbiology: Molecular mechanism for switching of *P. falciparum* invasion pathways into human erythrocytes. *Science* (80-.). *309*, 1384–1387.
- Sturm, A., Graewe, S., Franke-Fayard, B., Retzlaff, S., Bolte, S., Roppenser, B., Aepfelbacher, M., Janse, C., and Heussler, V. (2009). Alteration of the parasite plasma membrane and the parasitophorous vacuole membrane during exo-erythrocytic development of malaria parasites. *Protist* *160*, 51–63.
- Suarez, C., Lentini, G., Ramaswamy, R., Maynadier, M., Aquilini, E., Berry-Sterkers, L., Cipriano, M., Chen, A.L., Bradley, P., Striepen, B., et al. (2019). A lipid-binding protein mediates rhoptry discharge and invasion in *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* parasites. *Nat. Commun.* *10*.
- T, R., Epstein, J.E., Lyke, K.E., Mordmüller, B., Alonso, P., Kremsner, P.G., Seder, R.A., and Hoffman, S.L. (2015). Progress with *P. falciparum* sporozoite based malaria vaccines. *33*, 7452–7461.
- Takeshima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M., and Kangawa, K. (2000). Junctophilins: A novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol. Cell* *6*, 11–22.
- Taketa, A. (1988). No TDNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochem Biophys Acta* *949*, 318–324.
- Tao, D., Ubaida-Mohien, C., Mathias, D.K., King, J.G., Pastrana-Mena, R., Tripathi, A., Goldowitz, I., Graham, D.R., Moss, E., Marti, M., et al. (2014). Sex-partitioning of the *Plasmodium falciparum* stage V gametocyte proteome provides insight into falciparum-specific cell biology. *Mol. Cell. Proteomics* *13*, 2705–2724.
- Taraschi, T.F., Trelka, D., Schneider, T., and Matthews, I. (1998). *Plasmodium falciparum*: Characterization of organelle migration during merozoite morphogenesis in asexual malaria infections. *Exp. Parasitol.* *88*, 184–193.
- Terezina M. Johnson, Zenon Rajfur, Ken Jacobson, and C.J.B. (2007). Immobilization of the Type XIV Myosin Complex in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell* *18*, 3039–3046.
- 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., and Cowman, A.F. (2010). Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for *Plasmodium falciparum* PfRh4 invasion

ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 17327–17332.

Thomas, J.A., Tan, M.S.Y., Bisson, C., Borg, A., Umrekar, T.R., Hackett, F., Hale, V.L., Vizcay-Barrena, G., Fleck, R.A., Snijders, A.P., et al. (2018). A protease cascade regulates release of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* from host red blood cells. *Nat. Microbiol.* *3*, 447–455.

Tonkin, C.J., Van Dooren, G.G., Spurck, T.P., Struck, N.S., Good, R.T., Handman, E., Cowman, A.F., and McFadden, G.I. (2004). Localization of organellar proteins in *Plasmodium falciparum* using a novel set of transfection vectors and a new immunofluorescence fixation method. *Mol. Biochem. Parasitol.* *137*, 13–21.

Tremp, A.Z., Al-Khattaf, F.S., and Dessens, J.T. (2014). Distinct temporal recruitment of *Plasmodium* alveolins to the subpellicular network. *Parasitol. Res.* *113*, 4177–4188.

Triglia, T., Thompson, J., Caruana, S.R., Delorenzi, M., and Speed, T. (2001). Identification of Proteins from. *Society* *69*, 1084–1092.

Umlas, J., and Fallon, J.N. (1971). New thick-film technique for malaria diagnosis. Use of saponin stromatolytic solution for lysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *20*, 527–529.

Vicente, J.J., and Wordeman, L. (2015). Mitosis, microtubule dynamics and the evolution of kinesins. *Exp. Cell Res.* *334*, 61–69.

W. Trager and J. B. Jensen (1976). Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *Science* (80-). *193*, 673–675.

Walczak, Claire E.; Cai, S., and Khodjakov, A. (2010). Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 91–102.

Walliker, D., Quakyi, I.A., Wellems, T.E., Mccutchan, T.F., Szarfman, A.N.A., London, W.T., Corcoran, L.M., Burkot, T.R., and Carter, R. (1987). Genetic Analysis of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*.

Wang, L., Delahunty, C., Fritz-Wolf, K., Rahlfs, S., Helena Prieto, J., Yates, J.R., and Becker, K. (2015). Characterization of the 26S proteasome network in *Plasmodium falciparum*. *Sci. Rep.* *5*, 1–14.

Webster, W.A.J., and McFadden, G.I. (2014). From the genome to the phenome: Tools to understand the basic biology of *plasmodium falciparum*. *J. Eukaryot. Microbiol.* *61*, 655–671.

Weiss, G.E., Gilson, P.R., Taechalertpaisarn, T., Tham, W.H., de Jong, N.W.M., Harvey, K.L., Fowkes, F.J.I., Barlow, P.N., Rayner, J.C., Wright, G.J., et al. (2015). Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during

- Plasmodium falciparum Invasion of Erythrocytes. *PLoS Pathog.* *11*, 1–25.
- Weiss, G.E., Crabb, B.S., and Gilson, P.R. (2016). Overlaying Molecular and Temporal Aspects of Malaria Parasite Invasion. *Trends Parasitol.* *32*, 284–295.
- Wetzel, J., Herrmann, S., Swapna, L.S., Prusty, D., Peter, A.T.J., Kono, M., Saini, S., Nellimarla, S., Wai, T., Wong, Y., et al. (2015). The Role of Palmitoylation for Protein Recruitment to the Inner Membrane Complex of the Malaria Parasite *. *290*, 1712–1728.
- Wickstead, B., Gull, K., and Richards, T.A. (2010). Patterns of kinesin evolution reveal a complex ancestral eukaryote with a multifunctional cytoskeleton. *BMC Evol. Biol.* *10*.
- Williams, J.L. (1999). STIMULATION OF PLASMODIUM FALCIPARUM GAMETOCYTOGENESIS BY CONDITIONED MEDIUM FROM PARASITE CULTURES. *60*, 7–13.
- Winkler, W.C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J.A., and Breaker, R.R. (2004). Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* *428*, 281–286.
- Wu, Y., Sifri, C.D., Lei, H.H., Su, X.Z., and Wellems, T.E. (1995). Transfection of Plasmodium falciparum within human red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 973–977.
- Wu, Y., Encheva, V., Green, J.L., Lasonder, E., Prommaban, A., Kunzelmann, S., Christodoulou, E., Grainger, M., Truongvan, N., Bothe, S., et al. (2019). Protein ubiquitylation is essential for the schizont to merozoite transition in Plasmodium falciparum blood-stage development. *BioRxiv* 755439.
- Yang, L., Guan, T., and Gerace, L. (1997). Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. *J. Cell Biol.* *137*, 1199–1210.
- Yang, Y., Kitagaki, J., Dai, R.M., Yien, C.T., Lorick, K.L., Ludwig, R.L., Pierre, S.A., Jensen, J.P., Davydov, I. V., Oberoi, P., et al. (2007). Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Res.* *67*, 9472–9481.
- Yeoman, J. a, Hanssen, E., Maier, A.G., Klonis, N., Maco, B., Baum, J., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Dixon, M.W. a, and Tilley, L. (2011). Tracking Glideosome-associated protein 50 reveals the development and organization of the inner membrane complex of Plasmodium falciparum. *Eukaryot. Cell* *10*, 556–564.
- Zeeshan, M., Shilliday, F., Liu, T., Abel, S., Mourier, T., Ferguson, D.J.P., Rea, E., Stanway, R.R., Roques, M., Williams, D., et al. (2019a). Plasmodium kinesin-8X associates with mitotic spindles and is essential for oocyst development during parasite proliferation and transmission. *PLoS Pathog.* *15*, 1–28.

Zeeshan, M., Ferguson, D.J.P., Abel, S., Burrell, A., Rea, E., Brady, D., Daniel, E., Delves, M., Vaughan, S., Holder, A.A., et al. (2019b). Kinesin-8B controls basal body function and flagellum formation and is key to malaria transmission. *Life Sci. Alliance* 2, 1–13.

Zhang, C., Gao, H., Yang, Z., Jiang, Y., Li, Z., Wang, X., Xiao, B., Su, X. zhuan, Cui, H., and Yuan, J. (2017). CRISPR/Cas9 mediated sequential editing of genes critical for ookinete motility in *Plasmodium yoelii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 212, 1–8.

Zhang, M., Wang, C., Otto, T.D., Oberstaller, J., Liao, X., Adapa, S.R., Udenze, K., Bronner, I.F., Casandra, D., Mayho, M., et al. (2018). Uncovering the essential genes of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by saturation mutagenesis. *Science* (80-.). 360.

Zucker, J.R. (1996). Changing Patterns of Autochthonous Malaria Transmission in the United States: A Review of Recent Outbreaks. *Emerg. Infect. Dis.* 2, 37–43.

Publikationen

Geiger, M., Brown, C., Wichers, J.S., Strauss, J., Lill, A., Thuenauer, R., Liffner, B., Wilcke, L., Lemcke, S., **Heincke, D.**, et al. (2020). Structural Insights Into PfARO and Characterization of its Interaction With PfAIP. *J. Mol. Biol.* 432, 878–896.

Kono, M., **Heincke, D.**, Wilcke, L., Wong, T.W.Y., Bruns, C., Herrmann, S., Spielmann, T., and Gilberger, T.W. (2016). Pellicle formation in the malaria parasite. *J. Cell Sci.* 129, 673–680.

Prinz, B., Harvey, KL., Wilcke, L., Ruch, U., Engelberg, K., Biller, L., Lucet, I., Erkelenz, S., **Heincke, D.**, Spielmann, T., Doerig, C., Kunick, C., Crabb, BS., Gilson, PR., Gilberger, TW. (2016) Hierarchical phosphorylation of apical membrane antigen 1 is required for efficient red blood cell invasion by malaria parasites. *Sci. Rep. Oct.* 4:6:34479

Wetzel, J., Herrmann, S., Swapna, L.S., Prusty, D., Peter, A.T.J., Kono, M., Saini, S., Nellimarla, S., Wai, T., Wong, Y., Wilcke, L., Ramsay, O., Cabrerea, A., Biller, L., **Heincke, D.**, Mossman, K., Spielmann, T., Ungermann, C., Parkinson, J. Gilberger, T. (2015). The Role of Palmitoylation for Protein Recruitment to the Inner Membrane Complex of the Malaria Parasite *. *290*, 1712–1728.

Engelberg, K., Paul, AS., Prinz B., Kono, M., Ching, W., **Heincke, D.**, Dobner, T., Duraisingh, MT., Gilberger, TW., (2013) Specific phosphorylation of the PfRh2b invasion ligand of *Plasmodium falciparum*. *Biochem J.* 457-66

Danksagung

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Tim Gilberger für die Möglichkeit in seinem Labor an diesem spannenden Thema arbeiten zu können sowie für inspirierende Gespräche, die Möglichkeit viel ausprobieren zu können und für die Geduld.

Ebenso ein großes Dankeschön an Dr. Tobias Spielmann für die Übernahme der Co-Betreuung am BNI, die Erstellung des Gutachtens und immer eine offene Tür im Laboralltag am BNI.

Danke auch an Prof. Dr. Egbert Tannich für die Übernahme der Co-Betreuung am BNI.

Vielen Dank an Valerie Mordhorst und Prof. Dr. Kai Grünwald für das *plungen* und die FIB-SEM Mikroskopie sowie an Katharina Höhn für Hilfe bei der Elektronenmikroskopie, die nicht in diese Arbeit eingeflossen ist, und Samuel Pazicky für das gemeinsame Bearbeiten der Massspec-Proben.

Ein besonderes Dankeschön gilt allerdings den unzähligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Gilberger und Spielmann die ich meiner Zeit in Hamilton, am BNI und am CSSB kennenlernen durfte. Es war ein Geschenk mit so vielen besonderen Menschen zusammen lernen zu dürfen. Danke für die tolle Atmosphäre, die große Hilfsbereitschaft untereinander und für entstandene Freundschaften.

Andrea Greenwood, Melissa Khosh-Nauke und Jennifer Pieper – danke für das Korrigieren dieser Arbeit!

Zudem möchte ich mich bei meiner Familie und bei meinen Freunden für die Unterstützung und das schöne Leben außerhalb der Arbeit bedanken!!