

Die Rolle von plasmodialen Perforinen während der Übertragung des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* auf die Mücke

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Christine Clara Wirth

aus Kronach

Berichter: Universitätsprofessorin Dr. phil. nat. Gabriele Pradel
 Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Marc Spehr

Tag der mündlichen Prüfung: 14. März 2016

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Wirth CC, Bennink S, Scheuermayer M, Fischer R und Pradel G (2015). Perforin-like protein PPLP4 is crucial for mosquito midgut infection by *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 201(2), pp. 90-99.

Wirth CC, Glushakova S, Scheuermayer M, Repnik U, Garg S, Schaack D, et al. (2014). Perforin-like protein PPLP2 permeabilizes the red blood cell membrane during egress of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Cell Microbiol* 16(5), pp. 709–733.

Deligianni E, Morgan RN, Bertuccini L, Wirth CC, de Monerri NCS, Spanos L, et al. (2013). A perforin-like protein mediates disruption of the erythrocyte membrane during egress of *Plasmodium berghei* male gametocytes. *Cell Microbiol* 15(8), pp. 1438-1455.

Danksagungen

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in der Forschungsgruppe von Prof. Gabriele Pradel an der RWTH Aachen verfasst und durch das Schwerpunktprogramm 1580 der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert.

Viele Personen haben maßgeblich zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen und ich möchte die Gelegenheit nutzen, mich an dieser Stelle für ihre Unterstützung zu bedanken:

Ich danke Prof. Gabriele Pradel für die Möglichkeit, im Anschluss an meine Diplomarbeit auch meine Doktorarbeit in ihrer großartigen Arbeitsgruppe durchzuführen. Für ihre umfassende Unterstützung und ihre Hilfestellungen in allen Projektfragen und Publikationsangelegenheiten während der vergangenen Jahre bin ich überaus dankbar, ebenso wie für die Chance, an mehreren nationalen und internationalen Fachtagungen teilzunehmen.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Prof. Marc Spehr für die bereitwillige Übernahme des Postens als Zweitprüfer bedanken.

Vielen Dank an Prof. Rainer Fischer, an dessen hervorragend ausgestattetem Institut die experimentellen Arbeiten für dieses Projekt durchgeführt wurden.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Matthias Scheuermayer für die Durchführung aller Insektariums-bezogenen Versuche dieses Projektes sowie auch seine ständige Rufbereitschaft in fachlichen und technischen Fragen.

Außerdem möchte ich mich bei allen Kollaborationspartnern bedanken, durch deren Input das Projekt zum Erfolg geführt werden konnte. Insbesondere bedanke ich mich bei Dr. Urska Repnik und Prof. Gareth Griffiths von der Universität Oslo für ihre Unterstützung bei den TEM-Experimenten und die Ausrichtung ihres inspirierenden EM-Kurses.

Ich möchte mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Pradel für ihre stete Unterstützung in allen Belangen bedanken. Die unzähligen fachlichen Diskussionen und nicht zuletzt vielfältigen Maßnahmen zur Stärkung der Moral haben dieses Projekt zu einem erfolgreichen Abschluss gebracht und die Zeit unvergesslich gemacht. An dieser Stelle möchte ich besonders Ludmilla, Selina, Andrea und Matthias danken, die mich in die Wunder der Malariaforschung eingeführt haben und mir auch später mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonderer Dank gilt Tim u. a. für dessen Einsatz in der Revisionsphase der PPLP2-Veröffentlichung und seinen fast unerschütterlichen Humor. Ebenso bin ich Martin zu Dank verpflichtet, der auch in Zeiten größter Arbeitslast stets „signifikant“ helfend zur Stelle war. Vielen Dank auch an Sandra für ihren Einsatz in der Revisionsphase der PPLP4-Veröffentlichung.

Unermesslicher Dank gilt meiner Familie für ihre immerwährende Unterstützung in all meinen Entscheidungen. In den vergangenen Jahren waren oft viel Einsatz und Verständnis von euch gefragt und beides habt ihr mir uneingeschränkt zukommen lassen. Mit euch habe ich das Ziel nun erreicht. Danke!

Inhalt

1. Einleitung	- 1 -
1.1. Ausbreitung und Verlauf der Malaria	- 1 -
1.2. Morphologie von Plasmodium ssp.	- 2 -
1.3. Der Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	- 4 -
1.4. Der Wirtszellaustritt des Malaria-Parasiten	- 6 -
1.5. Wissensstand zum Ausbruch der Gametozyten aus dem Wirtserythrozyten	- 9 -
1.6. Die MACPF/CDC-Superfamilie der porenbildenden Proteine	- 13 -
1.7. „Plasmodium perforin-like proteins“– Wissensstand zu Beginn des Projekts	- 17 -
1.8. Ziel der Arbeit.....	- 19 -
2. Material & Methoden	- 21 -
2.1. Material	- 21 -
2.1.1. Geräte.....	- 21 -
2.1.2. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	- 21 -
2.1.3. Enzyme, Laborkits, Größenstandards	- 22 -
2.1.4. Puffer und Stammlösungen.....	- 24 -
2.1.5. Medien	- 25 -
2.1.6. Zelllinien.....	- 26 -
2.1.7. Plasmide	- 26 -
2.1.8. Genidentifikationsnummern.....	- 28 -
2.1.9. Oligonukleotide	- 29 -
2.1.10. Antikörper	- 31 -
2.2. Zellbiologische Methoden.....	- 31 -
2.2.1. In vitro Kultivierung von <i>P. falciparum</i>	- 31 -
2.2.2. Kryokonservierung und Auftauen von <i>P. falciparum</i>	- 31 -
2.2.3. Anfertigung von Blutausstrichen und Ermittlung der Parasitämie	- 32 -
2.2.4. Synchronisierung kontinuierlicher <i>P. falciparum</i> -Kulturen.....	- 32 -
2.2.5. Exflagellations-Assay	- 33 -
2.2.6. Aufreinigung von Gametozyten über Percoll®-Gradient	- 33 -
2.2.7. Generierung genetisch veränderter <i>P. falciparum</i> -Zelllinien	- 34 -
2.2.8. Isolierung klonaler <i>P. falciparum</i> -Zelllinien durch limitierende Verdünnung	- 35 -
2.2.9. Aufzucht von <i>An. stephensi</i> -Moskitos.....	- 36 -
2.2.10. Gewinnung diverser <i>P. falciparum</i> -Mitteldarmstadien in Moskitos	- 36 -
2.2.11. Indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA)	- 37 -
2.2.12. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	- 38 -
2.2.13. Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Bakterien	- 39 -

2.3. Molekularbiologische Methoden	- 39 -
2.3.1. Transformation hitzekompetenter Bakterien.....	- 39 -
2.3.2. Isolation genomischer DNS (gDNS) aus <i>P. falciparum</i>	- 40 -
2.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels UV-Spektroskopie .	- 40 -
2.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	- 40 -
2.3.5. Erzeugung rekombinanter Plasmide	- 41 -
2.3.6. Sequenzierung.....	- 44 -
2.3.7. Gelelektrophorese.....	- 44 -
2.3.8. Transkriptanalyse mittels Reverser-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	- 45 -
2.4. Proteinbiochemische Methoden	- 48 -
2.4.1. Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	- 48 -
2.4.2. Proteinkonzentrationsbestimmung via Bradford-Assay	- 50 -
2.4.3. Gewinnung polyklonaler Immunsereen aus Mäusen	- 50 -
2.4.4. Quantifizierung der Hämoglobinfreisetzung während Exflagellation	- 51 -
3. Ergebnisse	- 52 -
3.1. Expressionsanalyse von PPLP1-5 in den intraerythrozytären Stadien von <i>P. falciparum</i>	- 52 -
3.2. Charakterisierung von PPLP2	- 57 -
3.2.1. Proteinexpressionsstudie zu PPLP2	- 57 -
3.2.2. Funktionale Charakterisierung von PPLP2 mittels Gen-„Knockout“	- 60 -
3.3. Charakterisierung von PPLP4	- 67 -
3.3.1. Expressionsstudie zu PPLP4 in <i>P. falciparum</i>	- 67 -
3.3.2. Funktionsstudie zu PPLP4 mittels Gen-„Knockout“	- 69 -
4. Diskussion.....	- 75 -
4.1. Aufbau und Expression der plasmodialen PPLPs.....	- 76 -
4.2. PPLP2 während des Zellaustritts der Gametozyten	- 77 -
4.3. PPLP4 bei der Durchquerung des Mitteldarmepithels durch Ookineten.....	- 82 -
4.4. Schlussfolgerung.....	- 84 -
5. Ausblick.....	- 87 -
6. Zusammenfassung.....	- 90 -
7. Summary.....	- 91 -
8. Literaturverzeichnis	- 92 -
9. Anhang.....	- 100 -
9.1. Sequenzierung des Integrationslokus.....	- 100 -
9.2. Abkürzungsverzeichnis	- 104 -
9.3. Lebenslauf	- 105 -
9.4. Publikationen.....	- 106 -

1. Einleitung

1.1. Ausbreitung und Verlauf der Malaria

Malaria ist eine von Moskitos übertragene Infektionskrankheit, die durch Parasiten der Spezies *Plasmodium* verursacht wird. Aktuell sind 3,2 Milliarden Menschen einem Infektionsrisiko ausgesetzt, für 1,2 Milliarden besteht ein hohes Risiko der Ansteckung mit Malaria (**Abb. 1.1**) [WHO, 2014]. Obwohl die Krankheit therapierbar ist und bereits vollständig entwickelte Präventionsstrategien existieren, berichtete die WHO in ihrem Malaria Report 2014 von etwa 198 Millionen Menschen, die 2013 an Malaria erkrankt waren. Die Sterbezahl dieser Erkrankung belief sich dabei auf ca. 584 000, darunter 453 000 Kinder unter fünf Jahren.

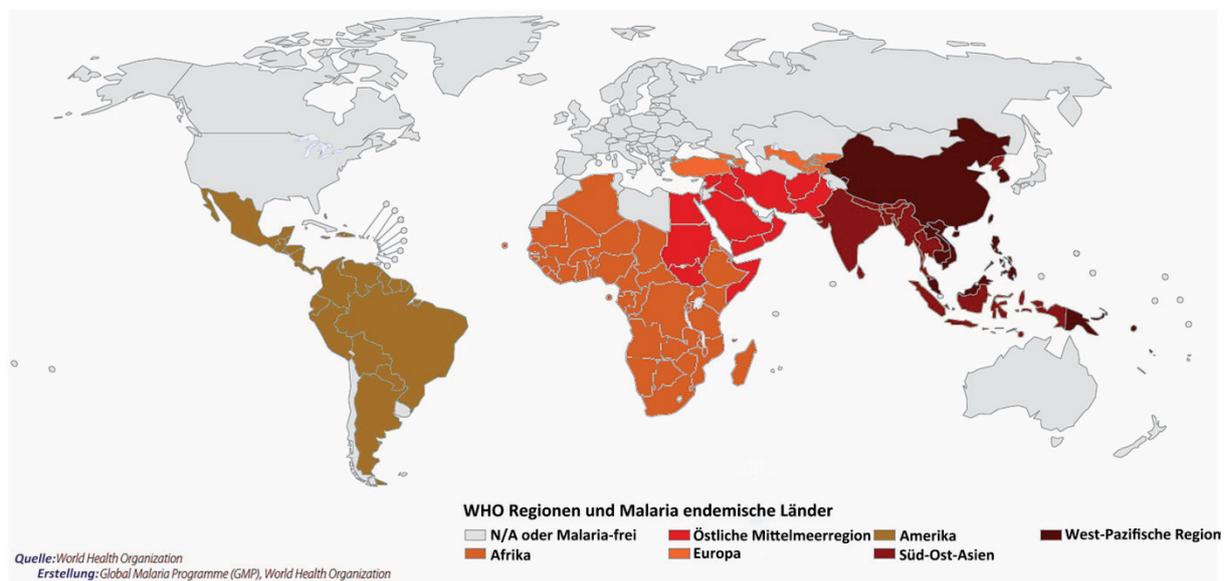


Abb. 1.1: Übersichtskarte über Malaria-endemische Gebiete im Jahr 2012 [WHO 2012].

Etwa 90 % aller Todesfälle ereigneten sich in Afrika mit Schwerpunkt auf südlich der Sahara gelegenen Regionen. Dank der seit dem Jahre 2000 zunehmend flächendeckenden Versorgung endemischer Gebiete, unter anderem mit Hilfsmitteln zur Vektorbekämpfung und diagnostischen Schnelltests, konnte ein weltweiter Rückgang der Malariainzidenz um etwa 30 % erzielt werden. Gleichzeitig sank die Sterberate weltweit um etwa 47 %, in Afrika allein um 54 %. Diese vielversprechenden Fortschritte in der Bekämpfung von Malaria werden jedoch durch das weiterhin bestehende Problem der Resistenzbildung im Parasiten und der krankheitsübertragenden *Anopheles*-Mücke bedroht. In den Grenzregionen Thailands zu Kambodscha z. B. weist die dort auftretende Population des humanpathogenen Malariaerregers *Plasmodium (P.) falciparum* bereits multiple Wirkstoffresistenzen gegen die meisten gängigen Therapeutika auf. Kann diesen zunehmenden Resistenzbildungen nichts

entgegengesetzt werden, droht eine erneute Zunahme der Sterberaten [WHO, 2014]. Es sind fünf humanpathogene Malariaparasiten bekannt: *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale* und *P. vivax*. Am weitesten verbreitet davon sind *P. falciparum* und *P. vivax*. Übertragen werden die Parasiten durch Mückenweibchen der Gattung *Anopheles*. Je nach vorherrschenden klimatischen Bedingungen variieren dabei die dominierenden Spezies [Kiszewski *et al.*, 2004]. Als Erreger der Krankheitsform Malaria tropica ist *P. falciparum* die Ursache für die häufigsten Komplikationen und damit verbunden für die höchste Malariasterblichkeit [zusammengefasst in Greenwood *et al.*, 2011; WHO, 2014].

Die allgemeine Symptomatik der Malaria ähnelt der eines grippalen Infekts. Zusätzlich zu Gliederschmerzen, Kopfschmerzen und Übelkeit kommen außerdem Anämie und Fieberschübe hinzu. Die Fieberschübe treten, charakteristisch für die auslösende *Plasmodium*-Spezies, periodisch, oder im Falle der durch *P. falciparum* hervorgerufenen Malaria tropica, langanhaltend und unregelmäßig auf. Dies liegt im Vermehrungszyklus der verschiedenen *Plasmodium*-Arten begründet. Die Fieberschübe treten auf, sobald der Parasit aus seinem Wirtserythrozyten ausbricht und dabei eine Immunreaktion auslöst. Anders als die übrigen humanpathogenen Spezies entwickelt sich *P. falciparum* asynchron, wodurch auch der Krankheitsverlauf nicht periodisch verläuft. Verschiedene Eigenschaften von *P. falciparum* tragen zu seiner vergleichsweise höheren Virulenz bei. Hierzu gehört die allgemeine Schwächung der Patienten durch die Fiebersymptomatik, schwere Anämie und Durchblutungsstörungen. Diese Durchblutungsstörungen werden durch eine Anhaftung infizierter Blutzellen, an vaskuläres Endothel verursacht, näher beschrieben in **Kapitel 1.3**. Dieser Pathogenitätsmechanismus liegt auch dem schweren Verlauf der zerebralen Malaria zugrunde [Miller *et al.*, 1972; zusammengefasst in Crompton *et al.*, 2014].

1.2. Morphologie von *Plasmodium* ssp.

Die Gattung *Plasmodium* gehört zum Stamm der Apicomplexa [Levine, 1970]. Diesem Stamm gehören mehrere obligatorisch intrazellulär replizierende Protozoen an, welche für eine Vielzahl human- und veterinärmedizinisch relevanter Infektionserkrankungen verantwortlich sind. Hierzu zählen u. a. Vertreter der Gattungen *Babesia*, *Toxoplasma* und *Cryptosporidium*. Komplexe Lebenszyklen, im Falle von *Plasmodium* mit Wirtswechsel zwischen Vertebraten und Arthropoden, sowie speziell für die Wirtszellinvasion ausgerichtete Organellen, zusammengefasst im namensgebenden Apikalkomplex, sind gemeinsame Charakteristika der Mitglieder dieses Stammes [zusammengefasst in Cowman und Crabb, 2006]. Der Apikalkomplex in *Plasmodium* ist in den Invasionsstadien, den Merozoiten (**Abb. 1.2A**), Ookineten und Sporozoiten, ausgeprägt. Der Komplex definiert das Vorderende des Parasiten und besteht aus den Polringen und sekretorischen Organellen, den Mikronemen und Rhoptrien. Die Polringe dienen als Ausgangspunkt für die längs laufenden Mikrotubuli,

welche dem Parasiten Formstabilität verleihen [Russel und Burns, 1984]. Die verhältnismäßig großen, keulenförmigen Rhoptrien sitzen am apikalen Ende des Parasiten und sind mit der Membran verbunden.

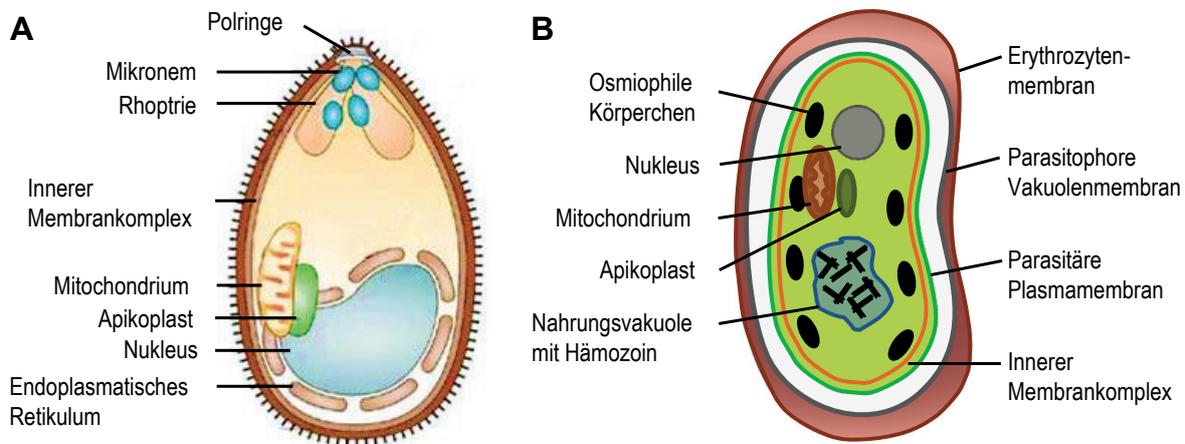


Abb. 1.2: Morphologie der *P. falciparum* Blutstadien. A Schematische Darstellung der wichtigsten Bestandteile eines Merozoiten. [modifiziert nach Baum *et al.*, 2006] B Schematische Darstellung der wichtigsten Komponenten eines reifen Gametozyten [modifiziert nach Wirth und Pradel, 2012].

Die Rhoptrien sind für Merozoiten und Sporozoitien beschrieben, nicht jedoch für Ookineten. Die kleineren Mikronemen sind ebenfalls mit der Membran verbunden und kommen in allen Invasionsstadien vor [zusammengefasst in Blackman und Bannister, 2001]. Beide Organellen enthalten essentielle Proteine für die Anhaftung und aktive Invasion der Wirtszelle mit Bildung einer parasitophoren Vakuole. Eine Ca^{2+} -abhängige Sekretion mikronemaler Proteine wird zudem mit dem Austritt von Merozoiten aus dem Wirtserythrozyten in Verbindung gebracht [zusammengefasst in Sharma und Chitnis, 2013]. Der innere Membrankomplex (IMC), zusammengesetzt aus flachen Membransäcken, zählt ebenfalls zu den allgemeinen Charakteristika der *Plasmodium ssp.* Er befindet sich direkt unterhalb der parasitären Plasmamembran (PPM) und dient der Formstabilität und Unterstützung bei Motilität und Invasionsvorgängen auf Grund seiner Verbindung mit dem Aktin-Myosin-Motor, sowie dem Mikrotubulinnetzwerk [zusammengefasst in Harding und Meissner, 2014]. In den unbeweglichen und nicht invasiven Gametozyten (**Abb. 1.2B**) ist der IMC ebenfalls vorhanden. Seine Struktur unterscheidet sich jedoch von den invasiven Stadien [Kono *et al.*, 2012; zusammengefasst in Harding und Meissner, 2014]. Die starken morphologischen Veränderungen des Parasiten während der fünf Stadien der Gametozytenentwicklung basieren auf Veränderungen des IMC und des damit verbundenen Zytoskeletts [Sinden, 1982].

Neben den für Eukaryoten typischen Zellorganellen wie Mitochondrien, Nukleus, Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum enthalten beinahe alle Parasitenstadien ein durch sekundäre Endosymbiose einer Rotalge entstandenes Organell, den Apikoplast [Köhler *et al.*, 1997; Janouskovec *et al.*, 2010]. Der Apikoplast ist von vier Membranen umgeben und enthält eigene, zirkuläre DNS. Chemische Inhibierung dieses Organells zeigte seine

essentielle Bedeutung für die Replikation des Parasiten [Yeh und DeRisi, 2011]. Innerhalb einer Wirtszelle ist *Plasmodium ssp.* immer von der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) umgeben, welche von der Wirtszellmembran abstammt. Diese dient der Abgrenzung des Parasiten vom Wirtszellzytoplasma und des Aufbaus einer für die weitere parasitäre Entwicklung optimierten Umgebung [zusammengefasst in Cowman und Crabb, 2006]. Intraerythrozytär lebende Parasitenstadien weisen zudem eine Nahrungsvakuole auf. In dieser wird Hämoglobin abgebaut und die für den Parasiten toxische Hämgruppe wird als eine parakristalline, biologisch inaktive Struktur eingelagert. Dies ist das Hämозoin, auch Malariapigment genannt [Abu Bakar *et al.*, 2010].

1.3. Der Lebenszyklus von *P. falciparum*

Plasmodium falciparum durchläuft eine komplexe, zweiphasige Entwicklung (**Abb. 1.3**). Die erste Phase beinhaltet die sexuelle Reproduktion des Parasiten und findet im Mitteldarm weiblicher *Anopheles*-Mücken statt. Für die zweite, asexuelle Reproduktionsphase muss der Parasit in den menschlichen Wirtsorganismus wechseln [zusammengefasst in White *et al.*, 2014]. Der Wirtswechsel erfolgt während der Blutmahlzeit eines infizierten Moskitoweibchens. Mit dem Speichel dieses Moskitos werden humanpathogene Sporozoit in die Dermis des menschlichen Organismus injiziert. Die beweglichen Sporozoit verschaffen sich aktiv Zugang zum Blutstrom und gelangen so in die Leber. Durch die in das gefensterte Endothel eingelagerten Kupfferschen Zellen, stationäre Makrophagen, gelangen die Parasiten schließlich in die Hepatozyten. Bemerkenswerterweise bleiben sie dabei vom Immunsystem unerkant. Die Sporozoit durchqueren in der Regel mehrere Hepatozyten, bevor sie sich jeweils in einer Leberzelle einnisten [zusammengefasst in Frevert, 2004]. Innerhalb der Wirtszelle grenzen sich die Parasiten vom Wirtszellzytoplasma ab, indem sie sich mit einer parasitophoren Vakuole umgeben. Diese entsteht durch Invagination der Wirtszellmembran bei Invasion des Parasiten. Die Membran der parasitophoren Vakuole wird vom Parasiten modifiziert, um den eigenen Entwicklungsbedürfnissen zu entsprechen [zusammengefasst in Prajapati und Singh, 2013]. Innerhalb von sechs bis acht Tagen entstehen durch mitotische Zellteilung aus einem Sporozoit 10 000 bis 30 000 Merozoiten. Dieser sogenannte Leberschizont schnürt die Merozoiten als Merosomen in den Blutstrom ab. Merosomen bestehen aus tausenden Merozoiten, welche von der Wirtszellmembran umgeben sind. Im Kapillarsystem der Lunge werden die Parasiten schließlich freigesetzt und infizieren innerhalb von Sekunden Erythrozyten [zusammengefasst in Wirth und Pradel, 2012]. Der Merozoit entwickelt sich innerhalb des Erythrozyten über das Ringstadium zum Trophozoiten und tritt dann in eine weitere Runde der asexuellen Replikation ein. Dabei werden pro Merozoit bis zu 32 neue Merozoiten im sogenannten Schizonten gebildet. Nach

etwa 48 h rupturiert die Wirtszellmembran des Schizonten und die einzelnen Merozoiten werden explosionsartig in den Blutstrom entlassen.

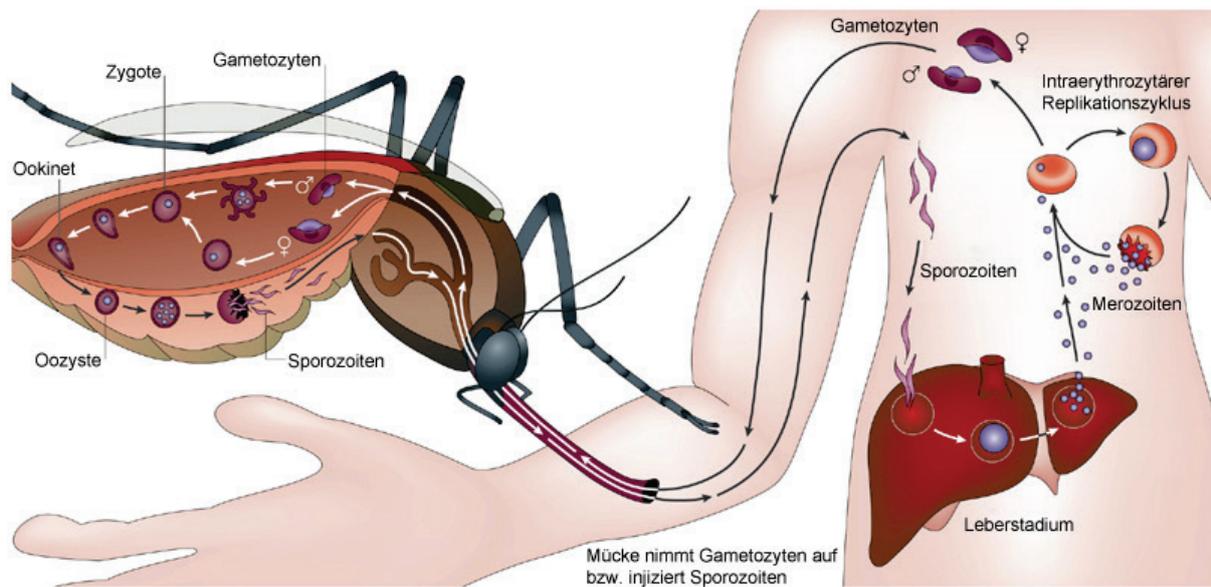


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *P. falciparum*. Mit dem Speichel einer infizierten *Anopheles* Mücke werden dem menschlichen Wirt Sporozoiten injiziert. Sporozoiten infizieren Hepatozyten und vermehren sich innerhalb des Leberschizonten. Der reife Schizont setzt Merozoiten frei, welche in den intraerythrozytären Replikationszyklus eintreten. Einzelne Merozoiten entwickeln sich zu Gametozyten, diese werden vom *Anopheles*-Weibchen aufgenommen. Im Mitteldarm der Mücke entwickeln sich Makro- und Mikrogameten, welche zu Zygoten fusionieren. Die sich daraus entwickelnden Ookineten verlassen den Darm und bilden an der Darmaußenwand Oozysten. In diesem Stadium werden Sporozoiten gebildet, welche nach ihrer Freisetzung in die Speicheldrüsen der Mücke einwandern. [modifiziert nach Su *et al.*, 2007]

Mit Invasion der Parasiten in neue Erythrozyten wird der intraerythrozytäre Replikationszyklus wieder begonnen. Die Symptome einer Malaria werden während des erythrozytären Zyklus hervorgerufen. Bei der Freisetzung der Merozoiten in den Blutstrom wird gleichzeitig auch Hämoglobin aus der Nahrungsvakuole des Schizonten freigesetzt. Dies führt zu einer starken Immun- bzw. Entzündungsreaktion des Körpers und dadurch zu den charakteristischen Fieberschüben. Mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten können sich zudem an das Endothel der Blutgefäße anhaften und umgehen somit die Selektion in der Milz. Diese Zelladhäsion wird unter anderem durch PfEMP-1 („*P. falciparum* erythrocyte membrane proteine-1“) vermittelt, ein parasitäres Oberflächenprotein in der Wirtserythrozytenmembran, und sorgt für Organschädigungen auf Grund von Durchblutungsstörungen in den verengten Kapillaren [zusammengefasst in Rowe *et al.*, 2009]. Des Weiteren sorgt auch die Rosettenbildung durch Anhaften nicht infizierter Blutzellen an infizierten Erythrozyten für eine Störung der Mikrozirkulation [zusammengefasst in White *et al.*, 2014]. Der intraerythrozytäre Replikationszyklus wiederholt sich über mehrere Wochen, bis auf Grund von Stressfaktoren die Differenzierung einzelner Merozoiten zu Gametozyten induziert wird. Gametozyten durchlaufen innerhalb von etwa zehn Tagen fünf Entwicklungsstadien, genannt Gametozyten Stadium I bis V. Erst reife Gametozyten Stadium V sind als Transmissionsstadien fähig, die Mücke zu infizieren.

Werden reife Gametozyten im Zuge einer Blutmahlzeit von einem *Anopheles*-Weibchen aufgenommen, tritt *P. falciparum* in die sexuelle Phase seines Lebenszyklus ein [zusammengefasst in Aly *et al.*, 2009]. Aufgrund mehrerer Faktoren wird bei den Gametozyten im Mitteldarm der Mücke die Bildung der Gameten, Gametogenese genannt, induziert. Die Gametozyten verlassen dabei den Schutz des Erythrozyten (**Kapitel 1.4**). Weibliche Makrogametozyten entwickeln sich dabei zu einem Makrogameten, während aus einem männlichen Mikrogametozyten acht bewegliche Mikrogameten entstehen. Zuvor durchläuft der Mikrogametozyt drei mitotische Kernteilungen [Janse *et al.*, 1986] und in einem „Exflagellation“ genannten Vorgang schnüren sich anschließend die einzelnen flagellenartigen Mikrogameten vom Residualkörper des Mikrogametozyten ab. Diese Mikrogameten rekrutieren durch schlagende Bewegungen umliegende Zellen, darunter auch Makrogameten, und heften sich an deren Oberfläche [Templeton *et al.*, 1998]. Dabei entstehen die lichtmikroskopisch leicht identifizierbaren Exflagellationszentren. Ein haploider Makrogamet fusioniert mit einem haploiden Mikrogameten und bildet die diploide Zygote. In diesem Stadium erfolgt einmalig eine Meiose und genetische Rekombination, wodurch die Zygote einen tetraploiden Zustand erlangt. Die Zygote entwickelt sich über das Zwischenstadium der Retorte zum motilen Ookineten, was das Ende der parasitären Sexualphase bedeutet.

Der Ookinet durchquert das Darmepithel und nistet sich unterhalb der Basallamina ein. Dort findet erneut ein asexueller Replikationszyklus statt, bei dem innerhalb einer Oozyste bis zu 10 000 haploide Sporozoiten gebildet werden [zusammengefasst in Kuehn und Pradel, 2010]. Reife Oozysten brechen auf und entlassen die Sporozoiten in die Hämolymphe der Mücke. Auf diese Weise werden die Sporozoiten zu den Speicheldrüsen befördert, in die sie aktiv eindringen. Ab diesem Punkt im parasitären Lebenszyklus wird die *Anopheles*-Mücke infektiös für den Menschen und der Lebenszyklus beginnt von vorne.

1.4. Der Wirtszellaustritt des Malaria-Parasiten

Im Laufe seines Lebenszyklus wechselt *Plasmodium ssp.* vielfach die Wirtszelle. Dabei ist der obligatorisch intrazellulär replizierende Parasit gezwungen, aus seiner aktuellen Wirtszelle auszutreten, bevor er in eine andere Zelle eindringen kann [zusammengefasst in Wirth und Pradel, 2012]. Zur Erschließung neuer Gewebeschichten ist *Plasmodium ssp.* auch in der Lage, vor der eigentlichen Wirtszellinvasion Zellschichten ausschließlich zu durchqueren. Der Zellaustritt des Parasiten folgt festen Abläufen und beinhaltet die sequenzielle Ruptur zweier Membranhüllen, der PVM und der Wirtszellmembran (HCM; „host cell membrane“).

Die Reihenfolge, in welcher die Membranen während des Zellaustritts geöffnet werden, konnte in den vergangenen Jahren für alle Austrittsstadien bestimmt werden. Dabei wird

immer zuerst die innenliegende PVM zerstört, bevor sich die äußere HCM öffnet [Glushakova *et al.*, 2009; Graewe *et al.*, 2011; Sologub *et al.*, 2011]. Innerhalb der Wirtszelle wird der Parasit durch die umgebende PVM vor den zelleigenen Proteasen geschützt. Sowohl der Austritt aus einer alten Wirtszelle, als auch das Eindringen in eine neue Zelle müssen schnell und koordiniert ablaufen, da der Malariaparasit in diesem Zeitraum weitestgehend schutzlos u. a. der T-Zell-basierten Immunabwehr ausgesetzt ist. Diese Anforderungen können nur durch eine direkte Steuerung und Beteiligung der Parasiten an den einzelnen Prozessen erfüllt werden.

Derzeit sind die Kenntnisse über die für solch eine Steuerung benötigten Signalwege für *Plasmodium spp.* noch weitestgehend hypothetischer Natur. Hingegen konnten für *Toxoplasma gondii*, einem weiteren Mitglied des Stammes der Apicomplexa, bereits erste Faktoren der Signalinduktion ermittelt werden. So konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* die K^+ -Konzentration in seiner Umgebung detektieren kann. Ist diese Konzentration hoch, verbleibt der Parasit unbeweglich in seiner Wirtszelle. Bei Absinken des extrazellulären K^+ -Niveaus wird hingegen der Bewegungsapparat des Parasiten induziert und damit der Zellaustritt eingeleitet [Moudy *et al.*, 2001]. Dementsprechend hatte die Inkubation der Parasiten mit dem K^+/H^+ -Ionophor Nigericin einen induzierenden Effekt auf den Zeitpunkt des Zellaustritts bei gleichzeitigem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [Fruth und Arrizabalaga, 2007]. Eine ähnliche Beobachtung konnte unsere Arbeitsgruppe in einer Inhibitorstudie mit Nigericin an *P. falciparum* Gametozyten machen [Sologub *et al.*, 2011]. Näheres hierzu wird in **Kapitel 1.5** erläutert.

Der bisher am intensivsten untersuchte Zellaustrittsmechanismus im Lebenszyklus von *P. falciparum* ist die Freisetzung der Merozoiten aus dem Wirtserythrozyten. Lebendmikroskopische Studien von Glushakova und Kollegen (2010) brachten wichtige Erkenntnisse zu den letzten Minuten vor dem Austritt der Merozoiten aus der Wirtszelle. So konnte Minuten vor dem finalen Aufbrechen der Wirtszelle ein osmotisches Anschwellen der parasitophoren Vakuole mit gleichzeitiger Verkleinerung des Erythrozytenkompartments beobachtet werden. Nach der Ruptur der PVM kommt es anschließend zur Permeabilisierung der Erythrozytenmembran (EM), einem Prozess, welcher nicht durch Cysteinproteaseinhibitor E-64 beeinflussbar ist [Glushakova *et al.*, 2009, 2010]. Zuletzt wird die Wirtszellmembran durch Bildung einer Pore geöffnet. Während die Membran sich zunächst nach außen umstülpt und schließlich unter Vesikelbildung fragmentiert, werden die einzelnen Merozoiten explosionsartig in die Umgebung freigesetzt [Abkarian *et al.*, 2011].

Mit den bisherigen Erkenntnissen ist es möglich, die beobachteten Abläufe auch auf molekularer Ebene hypothetisch zu begründen. Nach dem Anschwellen der Vakuole kommt es in infizierten Erythrozyten zu einer Entspannung der Wirtszellmembran [Glushakova *et al.*, 2010]. Da die Integrität der Membran zu diesem Zeitpunkt erhalten bleibt, ist der Effekt mit

dem Abbau des Zytoskeletts zu erklären. Es konnte gezeigt werden, dass *P. falciparum* schon kurz nach seinem Eindringen in den Erythrozyten damit beginnt, das Spektrin/Aktin-basierte Zytoskelett der Wirtszelle zu verändern [zusammengefasst in Burton und Bruce, 2011]. Unter anderem werden erythrozytäre Proteine durch Phosphorylierung in ihrer Funktion verändert und parasiteneigene Proteine in das Zytoskelett der Wirtszelle eingebaut [Maier *et al.*, 2008; Pantaleo *et al.*, 2010]. Auf diese Weise wird die Stabilität der Wirtszelle erhöht und ihre Verformbarkeit reduziert. Gegen Ende der intraerythrozytären Replikationsphase wird die Wirtszelle destabilisiert. Massenspektrometrische Untersuchungen reifer Blutschizonten bestätigten den Verlust wirtseigener Adapterproteine zwischen Aktin- und Spektrinfilamenten des Zytoskeletts [Millholland *et al.*, 2011]. Zudem wurden in der Vergangenheit mehrere am Merozoitengress beteiligte Proteasen identifiziert. Darunter befinden sich auch die Cysteinprotease Falcipain-2 und die Aspartatprotease Plasmeprin II, die beide am Abbau wirtseigener Zytoskelettelemente beteiligt sind [Le Bonniec *et al.*, 1999; Dua *et al.*, 2001]. Nach der Ruptur der PVM gelingt es dem Parasiten zudem durch Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die wirtseigene Ca^{2+} -abhängige Protease Calpain-1 zum weiteren Abbau des verbleibenden Zytoskeletts einzusetzen [Chandramohanadas *et al.*, 2009]. Das Zusammenspiel dieser Faktoren führt zur Entspannung der Wirtszellmembran und bietet eine mögliche Erklärung für deren spontane Fragmentierung während der finalen Merozoitenfreisetzung [zusammengefasst in Franco und Low, 2010].

Diverse Inhibitorstudien legen zudem eine maßgebliche Beteiligung von Proteasen auch an der Ruptur der umgebenden Membranen, der PVM und der EM, nahe [zusammengefasst in Roiko und Carruthers, 2009]. Die Cysteinprotease-Dipeptidylpeptidase PfDPAP3 wurde als Aktivator der Cysteinprotease PfSUB-1 identifiziert [Arastu-Kapur *et al.*, 2008]. PfSUB1 wird in Sekretionsorganellen der Merozoiten, den Exonemen, gespeichert und nach Eingang eines Zellaustrittsignals in die parasitophore Vakuole sekretiert. Dort setzen sie eine proteolytische Kaskade in Gang, an deren Ende die Ruptur der beiden umgebenden Membranen steht. Mehrere Mitglieder der SERA-Familie („serine-rich antigen“) dienen PfSUB1 als Substrat und sind in der parasitophoren Vakuole der Blutstadien des Malariaparasiten exprimiert. Frühere Studien haben gezeigt, dass SERA4, -5 und -6 offenbar eine essentielle Rolle im erythrozytären Replikationszyklus spielen [Miller *et al.*, 2002]. Bei Inhibitorstudien in Schizonten wurde PfSERA5 auch *in vivo* als PfSUB1-Substrat identifiziert [Yeoh *et al.*, 2007; Arastu-Kapur *et al.*, 2008]. Zwei bei der proteolytischen Spaltung von PfSERA5 entstehende Polypeptide binden an den ausbrechenden Merozoiten [Li *et al.*, 2002; Okitsu *et al.*, 2007]. Dieser Komplex ist möglicherweise sowohl am Austritt der Merozoiten aus der Wirtszelle, als auch an der Invasion des Parasiten in neue Erythrozyten beteiligt. Neuesten Erkenntnissen zufolge kann eine enzymatische Funktion für PfSERA5 im

Parasiten ausgeschlossen werden, obwohl dem Protein trotzdem eine essentielle Bedeutung zuzukommen scheint [Stallmach *et al.*, 2015]. Einem weiteren Vertreter der SERA-Familie, PbSERA3, wird eine essentielle Rolle bei der PVM-Ruptur während der Merozoitenfreisetzung aus dem Leberschizonten zugeschrieben [Schmidt-Christensen *et al.*, 2008]. Für das PbSERA3-Ortholog in *P. falciparum*, PfSERA6, konnte eine Beteiligung am Austritt der Merozoiten aus dem Wirtserythrozyten gezeigt werden. Kurz vor Ruptur des Schizonten wird PfSERA6 aus der parasitophoren Vakuole in das erythrozytäre Zytoplasma freigesetzt und dort proteolytisch durch PfSUB1 aktiviert. Der molekulare Wirkmechanismus konnte allerdings bislang nicht aufgeklärt werden [Ruecker *et al.*, 2012].

Sekunden vor der finalen Freisetzung der Merozoiten durch Eröffnung der EM kommt es zur Permeabilisierung der Wirtszellmembran [Glushakova *et al.*, 2010]. Dieser Schritt ist essentiell für den Abschluss der intraerythrozytären Replikationsphase und die Beteiligung von potenziell porenbildenden Mitgliedern der plasmodialen MACPF-Proteinfamilie, PPLP1-5 („*Plasmodium* perforin-like proteins“), wurde in diesem Zusammenhang mehrfach diskutiert. Garg und Kollegen (2013) gelang es, PPLP1 in den Mikronemen der Merozoiten nachzuweisen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Protein im Zuge des plötzlichen Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bei Einleitung der Merozoitenfreisetzung sekretiert wird, sich an die HCM anlagert und diese permeabilisiert. Inhibierung der PPLP1-Sekretion durch den Einsatz des Ca^{2+} -Komplexbildners BAPTA-AM führte zur Blockade der Merozoitenfreisetzung [Garg *et al.*, 2013].

1.5. Wissensstand zum Ausbruch der Gametozyten aus dem Wirtserythrozyten

Ebenso wie im Falle der Merozoitenfreisetzung aus dem Blutschizonten können nur reife Gametozyten in die Gametogenese, die Entwicklung der Geschlechtszellen, eintreten und in diesem Zusammenhang aktiv aus dem Wirtserythrozyten austreten [zusammengefasst in Wirth und Pradel, 2012]. Die Freisetzung der Gameten aus ihrer Wirtszelle ist für den Befruchtungsschritt während der Sexualphase des Parasiten unabdingbar. Anders jedoch als im Blutschizonten sind die extrinsischen Signale für die sogenannte Aktivierung der Gametozyten bekannt. Im Mitteldarm der Mücke erfährt der reife *P. falciparum* Gametozyt eine Absenkung der Umgebungstemperatur um etwa 5°C , während der Parasit gleichzeitig mit Xanthurensäure (XA), einem Nebenprodukt der Augenpigmentsynthese, in Kontakt kommt [zusammengefasst in Kuehn und Pradel, 2010].

In einer Transmissionselektronenmikroskopie-Studie gelang es, die ultrastrukturellen Veränderungen während des Aktivierungsprozesses und der finalen Freisetzung des Gametozyten aufzuklären [Sologub *et al.*, 2011]. Hierfür wurden reife Gametozyten *in vitro* aktiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach ihrer Aktivierung insbesondere auf Intaktheit der Membranhüllen sowie des IMC untersucht. Die Ergebnisse der Studie belegen,

dass der Zellaustritt von innen nach außen abläuft (**Abb. 1.4**). Bereits 1 min nach ihrer Aktivierung wies ein Großteil der untersuchten Parasiten eine mehrfach rupturierte PVM auf. An den Membranläsionen wurden besonders in Makrogametozyten vermehrt osmiophile Körperchen beobachtet. Auf die Bedeutung dieser Sekretionsorganelle wird in diesem Kapitel später näher eingegangen. Das mikrotubuläre Netzwerk des IMC war zu diesem Zeitpunkt der Aktivierung bereits vollständig abgebaut. Ebenfalls zu diesem Zeitpunkt konnte das Einsetzen des erythrozytären Zytoskelettabbaus sowie eine Abnahme des Zytoplasmas der Wirtszelle beobachtet werden. In aktivierten Gametozyten, 6-12 min nach Aktivierung, konnte keine PVM mehr beobachtet werden und die Doppelmembranstruktur des IMC war in ihrer Auflösung begriffen. In dieser Zeit rundete sich der Parasit ab und das Erythrozytenzytoplasma (EZ) verschwand komplett. Es folgte die Ruptur der destabilisierten HCM an einer Stelle, im Gegensatz zur mehrfach perforierten PVM. Nach 15-30 min hatten sich die aktivierten Gametozyten vollständig abgerundet, der IMC und die umgebende HCM hatten sich aufgelöst und der Austritt der Parasiten aus dem Wirtserythrozyten war abgeschlossen.

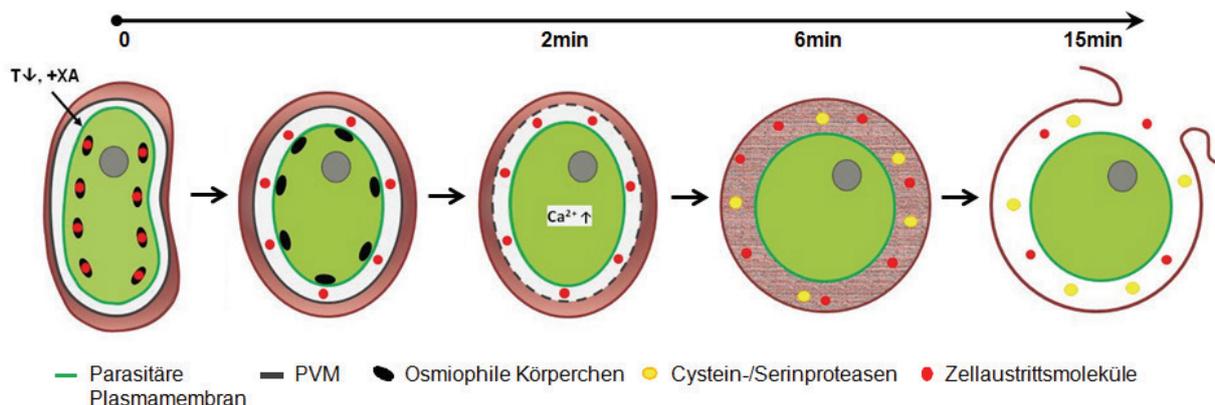


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Gametozytenaustritts aus dem Wirtserythrozyten. [modifiziert nach Wirth und Pradel, 2012]

Wie bereits kurz vor der Freisetzung der Merozoiten aus dem Wirtserythrozyten beobachtet, kommt es auch in Gametozyten nach ihrer Aktivierung zu einem starken Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [Billker *et al.*, 2004]. Bei Gen-Knockout-Studien in *P. berghei* wurde die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase CDPK4 als Bestandteil einer Signalkaskade aktivierter Mikrogametozyten identifiziert. In dieser Rolle gilt CDPK4 als maßgeblich für die Bildung der männlichen Mikrogameten [Kawamoto *et al.*, 1990, 1993; zusammengefasst in Kuehn und Pradel, 2010]. Bei Inkubation reifer *P. falciparum* Gametozyten mit dem intrazellulären Ca^{2+} -Komplexbildner BAPTA-AM wird der Austritt der Parasiten aus der Wirtszelle inhibiert. Dabei ist der Gametozyt zwar in der Lage die PVM zu öffnen, eine Abrundung des Parasiten, sowie die Ruptur der HCM, werden jedoch inhibiert [McRobert *et al.*, 2008; Sologub *et al.*, 2011]. Der Einfluss potenzieller Ca^{2+} -abhängiger

Signalkaskaden kommt dementsprechend erst nach der initialen Aktivierung des Gametozyten zum Tragen.

In Anlehnung an eine Studie in *T. gondii* (**Kapitel 1.4**) wurde ein möglicherweise aktivierungsinduzierender Effekt durch die Erhöhung des extrazellulären K^+ -Spiegels und pHs untersucht. Reife Gametozyten, welche zuvor mit dem K^+/H^+ -Ionophor Nigericin inkubiert wurden, durchliefen die Gametogenese ohne zusätzliche Gabe von Xanthurensäure. Der positiv induzierende Effekt des Nigericins auf die Aktivierung der Gametozyten ist jedoch wahrscheinlich auf die Erhöhung der H^+ -Permeabilität der HCM und die damit verbundene Erhöhung des extrazellulären pH-Werts durch das Ionophor zurückzuführen. Diese Hypothese beruht auf den Erkenntnissen von Mauritz und Kollegen (2009), die anhand ihres mathematischen Modells eines *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten den Verlust von K^+ aus der Wirtszelle vorhergesagt haben. Dementsprechend wäre der Einfluss von K^+ auf das Zellaustrittsverhalten der Gametozyten unwahrscheinlich. Unterstützt wird diese Interpretation der Ergebnisse durch die Beobachtung von Sologub und Kollegen (2011), dass eine alleinige Erhöhung des pH-Werts auf 8,0 im Kulturmedium zu einer teilweisen Aktivierung der Gametogenese führte.

Wie bereits zuvor für die Freisetzung der Merozoiten beschrieben, spielen Proteasen auch beim Austritt der Gametozyten aus dem Erythrozyten eine tragende Rolle. Zwar konnten bisher noch keine konkreten Proteasen identifiziert werden, mit Hilfe diverser Inhibitorstudien ist es jedoch gelungen, die Kandidatensuche auf bestimmte Gruppen einzugrenzen. So konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur Mikrogametenbildung durch eine der Aktivierung vorangegangene Behandlung der Parasiten mit den Cystein-/Serinproteaseinhibitoren TLCK und TPCK stark reduziert werden konnte [Torres *et al.*, 2005; Rupp *et al.*, 2008]. Im Rahmen der Untersuchungen durch Sologub und Kollegen (2011) wurde festgestellt, dass bei diesen Inhibitor-behandelten Gametozyten zwar die PVM abgebaut wird, die HCM jedoch nicht geöffnet wird. Die gleiche Beobachtung wurde auch bei Gametozyten gemacht, welche vor ihrer Aktivierung mit dem Serinproteaseinhibitor PMSF inkubiert wurden. Der Einsatz von E64d, einem Cysteinproteaseinhibitor, führte bereits in einem frühen Stadium der Aktivierung zur Blockade. Hierbei wurde bereits die Ruptur der PVM inhibiert [Sologub *et al.*, 2011]. Aus diesen Resultaten kann eine hypothetische Beteiligung von Mitgliedern der Cystein- und Serinproteasefamilien an der Überwindung der PVM und HCM abgeleitet werden.

Die Beobachtung, dass die PVM innerhalb der ersten Minute an mehreren Stellen gleichzeitig rupturiert, lässt eine aktive, koordinierte Perforation der Membran durch den Parasiten vermuten. Kandidatenproteine hierfür sind die fünf potenziell porenbildenden Mitglieder der plasmodialen MACPF-Proteinfamilie, PPLP1-5 („*Plasmodium* perforin-like proteins“). Die Gruppe der PPLPs wurde noch nicht vollständig charakterisiert und eine

Beteiligung eines Mitglieds am Gametozytenaustritt konnte noch nicht bewiesen werden. Alle zu Projektbeginn vorhandenen Erkenntnisse werden in **Kapitel 1.7** ausführlicher erläutert. Reife Gametozyten sowohl des humanpathogenen *P. falciparum*, als auch des Nagermalariaerregers *P. berghei*, weisen überdies vesikuläre, elektronendichte Strukturen auf, die osmiophilen Körperchen bzw. die männlichen osmiophilen Körperchen [Sinden, 1982; Aikawa *et al.*, 1984; Olivieri *et al.*, 2015]. In *P. falciparum* wurden diese sekretorischen Organellen hauptsächlich in weiblichen Gametozyten vorgefunden [Alano *et al.*, 1995a; de Koning-Ward *et al.*, 2008; Sologub *et al.*, 2011]. Das gehäufte Auftreten der osmiophilen Körperchen direkt unterhalb der Perforationsstellen in der PVM aktivierter weiblicher Makrogametozyten ließ auf eine mögliche Beteiligung an der PVM-Ruptur spekulieren [Sologub *et al.*, 2011]. Osmiophile Körperchen enthalten das für Gametozyten spezifische Protein *Pfg377* [Alano *et al.*, 1995a], dessen Fehlen zu einer starken Reduktion der Anzahl dieser Organellen führt. Zudem wurde berichtet, dass der Verlust dieses Proteins einen Defekt im Austritt der Makrogametozyten aus ihrer Wirtszelle zur Folge hat [deKoning-Ward *et al.*, 2008]. Neuere Untersuchungen der *Pfg377*-defizienten Parasiten unter Verwendung einer neuen Färbemethode der EM konnten diesen Bericht jedoch nicht bestätigen, wodurch die Bedeutung der osmiophilen Körperchen in *P. falciparum* wieder offen ist [Suaréz-Cortés *et al.*, 2014]. Im Nagermalariaerreger *P. berghei* ist die maßgebliche Beteiligung der osmiophilen Körperchen jedoch nach wie vor unumstritten. In einer kürzlich veröffentlichten Studie gelang es den Verfassern zudem, in *P. berghei* ein männlich spezifisches Äquivalent zu den osmiophilen Körperchen zu identifizieren [Olivieri *et al.*, 2015]. Zwar unterscheiden sich männliche osmiophile Körperchen morphologisch von ihrem weiblich spezifischen Pendant, jedoch enthalten beide Sekretionsorganellen die gleichen für den Austritt der Gametozyten aus der Wirtszelle essentiellen Proteine, PbGEST und PbMDV-1/PEG3 [Ponzi *et al.*, 2009; Talman *et al.*, 2011; Olivieri *et al.*, 2015]. Gametozyten, denen eines dieser Proteine fehlt, können nach ihrer Aktivierung die parasitophore Vakuole nicht verlassen [Lal *et al.*, 2009; Ponzi *et al.*, 2009; Talman *et al.*, 2011]. Die Charakterisierung von *Pbg377* zeigte allerdings, dass das Protein, ebenso wie sein Ortholog *Pfg377*, ausschließlich in osmiophilen Körperchen enthalten ist. *Pbg377*-defiziente Makrogametozyten weisen eine zeitliche Verzögerung in ihrem Wirtszellaustritt auf, entwickeln sich jedoch zu fertilen Gameten heran [Olivieri *et al.*, 2015]. Da osmiophile Körperchen und männliche osmiophile Körperchen während der Freisetzung der Gametozyten aus ihrem Erythrozyten offenbar eine ähnliche Funktion wie die Exoneme während der Merozoitenfreisetzung aus dem Blutschizonten haben, könnten Gametozyten noch weitere für den Zellaustritt wichtige sekretorische Organellen ausbilden [Wirth und Pradel, 2012].

1.6. Die MACPF/CDC-Superfamilie der porenbildenden Proteine

Innerhalb der MACPF/CDC-Proteinfamilie sind die porenbildenden Toxine (PFT; „pore forming toxins“) die am besten untersuchten Vertreter. Während Cholesterin-abhängige Zytolysine (CDC; „cholesterol dependent cytolysins“) typische Pathogenitätsfaktoren vieler Bakterien darstellen, wurden in Eukaryoten MACPF-Proteine („Membrane attack complex/perforin“) als essentieller Bestandteil der Immunabwehr identifiziert. Dabei unterscheidet man bei der Zusammensetzung der Membranporen grundsätzlich zwischen dem oligomeren Konstrukt eines Proteins und einem Multiproteinkomplex. Die zuvor in ihrer wasserlöslichen Form vorliegenden Porenkomponenten bilden nach Erhalt eines spezifischen Rezeptorsignals eine Vorpore, welche anschließend in die Zielmembran eingefügt wird. Dabei erfahren die Proteinmonomere eine umfassende Konformationsänderung, bevor sie über β -Faltblattstrukturen in der Membran verankert werden [zusammengefasst in Rosado *et al.*, 2008].

PFTs stellen rund ein Drittel der bekannten bakteriellen Toxine und spielen eine tragende Rolle in vielen human- oder veterinärmedizinisch relevanten Bakterienspezies [zusammengefasst in Rosado *et al.*, 2008]. Pathogene wie z. Bsp. *Clostridium perfringens* verursachen durch die Sekretion von Perfringolysin O (PFO), einem Mitglied der CDCs, Gewebnekrosen. Rossjohn und Kollegen (1997) gelang es mit PFO erstmals die Struktur eines Vertreters der CDCs aufzuklären. Es konnte gezeigt werden, dass PFO aus einer N-terminalen CDC-Domäne mit zentraler β -Faltblattstruktur und einer C-terminalen Immunglobulin-Domäne (Ig) besteht. Die viersträngige β -Faltblattstruktur der CDC-Domäne weist in sich einen 90° -Winkel auf und an ihrer Basis befinden sich zwei α -Helix-Cluster, CH1 und CH2 genannt (**Abb. 1.5E, G**) [Rossjohn *et al.*, 1997; Shepard *et al.*, 1998]. Diese helikalen Cluster werden für die Insertion des Proteins in die Zielmembran verantwortlich gemacht [Shepard *et al.*, 1998; Shatursky *et al.*, 1999]. Das Signal zur Bildung der Vorpore wird durch die Bindung der Ig-Domäne an Cholesterol-reiche Lipidmembranen gegeben (**Abb. 1.6B**). Durch laterale Diffusion der membrangebundenen Proteine können sich mehrere CDC-Monomere unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen aneinanderlagern [zusammengefasst in Rosado *et al.*, 2008].

Vor der Insertion der Pore in die Zielmembran, kommt es zu einer grundlegenden Konformationsänderung der Monomere. Während die α -helikalen Strukturen der CH-Regionen entwunden werden und amphipathische Haarnadelstrukturen ausbilden, kommt es zu einem Kollaps innerhalb der N-terminalen Proteinregion. Dies bringt die CH1- und CH2-Regionen näher an die Membranoberfläche und ermöglicht so die Verankerung der Pore durch Einbringen der Haarnadelstrukturen in die Lipid-Doppelmembran (**Abb. 1.5F, H**) [Shatursky *et al.*, 1999; Tilley *et al.*, 2005].

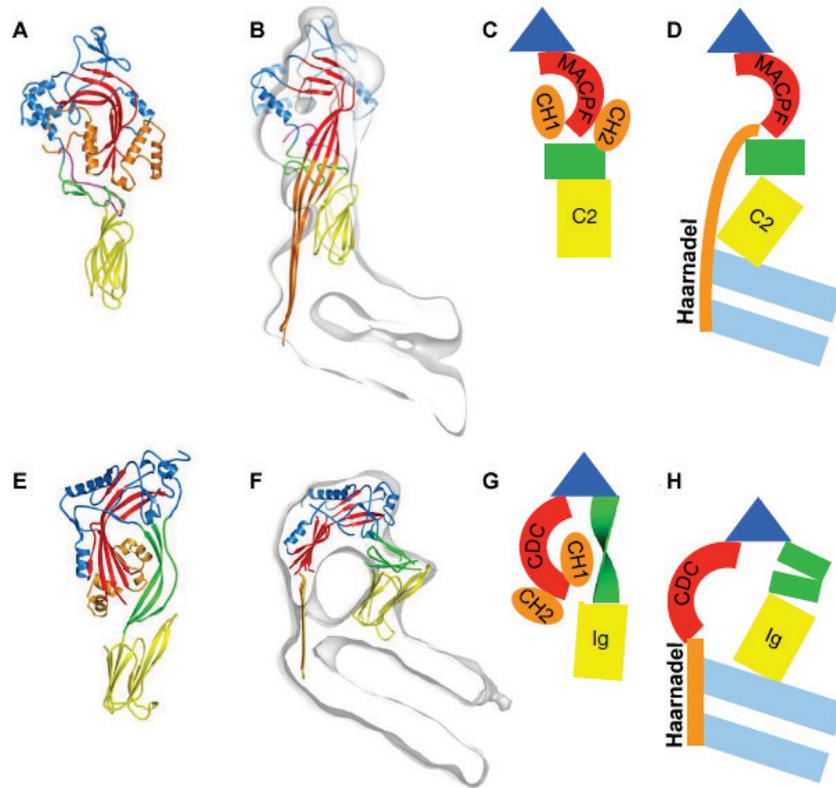


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Struktur in Perforin-1 (A-D) und einem CDC-Monomere (E-H). **A** Tertiäre Struktur eines Perforinmonomers mit MACPF-Domäne in blau und rot (zentrale β -Faltblattstruktur), CH1-/CH2-Regionen in orange, EGF-artiger Domäne in grün und C2-Domäne in gelb. **B** Konformation des Perforinmonomers nach Insertion in Zellmembran. **C, D** Subdomänenanordnung im Perforinmonomer in wasserlöslicher bzw. membranständiger Konformation. Farbzunordnung entspricht A und B, Doppelmembran als hellblaue Balken dargestellt. **E-H** Darstellung eines CDC äquivalent zu A-D. [modifiziert nach Law *et al.*, 2010]

Nachdem die Bemühungen um eine strukturelle und funktionelle Erforschung des CDC-Äquivalents in Säugetieren in den letzten Jahren intensiviert wurden, konnten bereits wichtige Erkenntnisse zur Funktionsweise einiger Vertreter der MACPF-Proteine gewonnen werden [zusammengefasst in Rosado *et al.*, 2008]. Zu den am besten untersuchten Vertretern der MACPF-Proteine zählen die Namensgeber selbst, nämlich die terminalen Komponenten des Membranangriffskomplexes („Membrane attack complex“) des Komplementsystems, sowie Perforin-1. Diese Moleküle sind wichtige Instrumente des Immunsystems und sind in dieser Rolle unter anderem an der Abwehr viraler und bakterieller Infektionen beteiligt [Tschopp *et al.*, 1986a; zusammengefasst in Voskoboinik und Trapani, 2006]. Auf Grund großer Unterschiede in den Sequenzen der MACPF- und CDC-Domänen brachten erst die Kristallstrukturanalysen einzelner Komplementfaktoren und von Perforin-1 eine Homologie beider Domänen inklusive der membranspannenden Bereiche ans Licht [Rosado *et al.*, 2007].

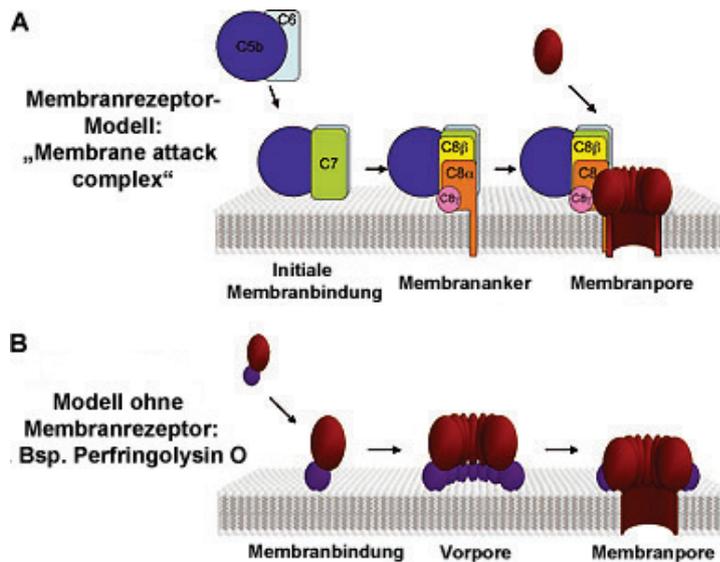


Abb. 1.6: Zwei Modelle der Membranporenbildung. **A** Membranrezeptor-Modell am Beispiel des MACs. Initiale Bindung des C5b-7-Komplexes und Verankerung des C5b-8-Komplexes in der Membran mit anschließender Rekrutierung von C9-Monomeren als porenbildende Komponente. **B** Rezeptorfrees Modell am Beispiel eines CDC-Vertreters, PFO. Direkte Bindung der Monomere durch Ig-Domäne (purpur) an Zielmembran. Bildung einer Vorpore und anschließendes Einfügen der Pore in die Zielmembran. [modifiziert nach Kondos *et al.*, 2010]

Wie zuvor bereits für die CDC-Domäne beschrieben, enthält auch die MACPF-Domäne eine zentrale, viersträngige β -Faltblattstruktur, welche im rechten Winkel abgeknickt vorliegt. Die Domäne wird von zwei α -helikalen Clustern flankiert, CH1 und CH2 (**Abb. 1.5A, C**). Anhand der Kristallstrukturanalyse muriner Perforin-Monomere konnte gezeigt werden, dass die MACPF-Domäne auf einer Art Sattel, bestehend aus CH1, CH2 und einer EGF-artigen Domäne („Epidermal growth factor“), sitzt. Unterhalb der EGF-artigen Domäne befindet sich im Perforin-Monomer eine membranbindende C2-Domäne (**Abb. 1.5A, C**). Diese C2-Domäne ist homolog zur Ig-Domäne der CDCs und verfügt über vier Ca^{2+} -Bindestellen welche die Bindungsaktivität des Monomers regulieren [Law *et al.*, 2010]. Perforin-1 wird von zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert und in intrazellulären Granula gespeichert. Niedrige Ca^{2+} -Konzentration sowie ein niedriger pH-Wert innerhalb der Granula verhindern die vorzeitige Ausbildung der Membranbindungsaktivität durch die Perforinmonomere. Durch die Antigen-vermittelte Aktivierung des zytotoxischen T-Lymphozyten wird Perforin-1 in die Umgebung freigesetzt. Durch die höhere Ca^{2+} -Konzentration und den neutralen pH-Wert im extrazellulären Raum wird eine Bindung der Monomere an die Zielmembran induziert. Erkennung und Bindung an die Zielmembran werden durch die C2-Domäne vermittelt, der genaue Mechanismus hierfür ist noch unbekannt. Jedoch wird vermutet, dass durch Bindung von Ca^{2+} -Ionen entweder eine Konformationsänderung an der Bindungsstelle hervorgerufen wird, oder dass durch direkte Interaktion der gebundenen Ionen mit den Kopfgruppen der Lipidmembran eine Bindung des Monomers vermittelt werden kann [Hurley und Misra, 2000; Shin *et al.*, 2010]. Mit Aktivierung der T-Zelle wird auch verstärkt das der Peptidase C1-Familie angehörige Cathepsin B an die Zelloberfläche befördert. Diese Oberflächenprotease spielt eine entscheidende Rolle für den Selbstschutz der T-Zelle vor Perforin-vermittelter Lyse [Balaji *et al.*, 2002].

Law und Kollegen (2010) gelang es außerdem mittels elektronenmikroskopischer Untersuchung membranständiger Perforinporen zu zeigen, dass es, anders als in CDC-Monomeren, bei Insertion der Membranpore offenbar zu keinem Kollabieren der Monomerstruktur kommt. Bei der Sequenzanalyse der CH1- und CH2-Regionen von Perforin wurden, wie bereits in den homologen Regionen von PFO, amphipathische Bereiche identifiziert. Dies untermauerte die Theorie, dass CDCs und MACPF-Proteine über denselben Membraninsertionsmechanismus verfügen. Jedoch sind die CH1- und CH2-Sequenzen von Perforin-1 doppelt so lang wie die in PFO. Dies resultiert in Haarnadelstrukturen, welche auf Grund ihrer Länge aus ihrer ursprünglichen Position heraus in die Zielmembran eingefügt werden können (**Abb. 1.5B, D**). Im Rahmen der elektronenmikroskopischen Analysen konnte zudem ermittelt werden, dass Perforinporen überwiegend aus 19-24 Monomeren zusammengesetzt sind und einen Durchmesser von 50-300 Å haben [Law *et al.*, 2010].

Für die Bildung des MACs durch das Komplementsystem wird im Gegensatz zur vergleichsweise simplen Porenbildung durch Perforin-1 oder PFO zunächst ein Rezeptorkomplex benötigt (**Abb. 1.6A**). Interessanterweise wird dieser Rezeptor durch das Komplementsystem selbst aufgebaut [zusammengefasst in Kondos *et al.*, 2010]. Nach Aktivierung des klassischen oder alternativen Signalwegs des Komplementsystems wird durch proteolytische Spaltung C5b gebildet. Durch Bindung zweier weiterer Komponenten, C6 und C7, entsteht der C5b-7-Komplex. Dieser Komplex weist bereits eine schwache Interaktion mit der Zielmembran auf. Ein Heterotrimer, bestehend aus C8 α , - β und - γ , bindet anschließend an den C5b-7-Komplex. Dabei verankert C8 α den gesamten Rezeptorkomplex fest in der Doppelmembran der Zielzelle.

Die porenbildende Komponente des Komplementsystems, C9, wird von diesem Rezeptorkomplex rekrutiert [zusammengefasst in Muller-Eberhard, 1986]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass eine durchschnittliche C9-Membranpore aus 12-18 Untereinheiten besteht [Biesecker *et al.*, 1993]. Während mit der Bildung von Perforinporen das Einschleusen weiterer apoptotisch wirksamer Proteine einhergeht, wird die lytische Wirkung des MACs, je nach Anzahl der Membranporen, auf einen osmotischen Effekt zurückgeführt [Kolb *et al.*, 1972]. Obwohl nur C8 α und C9 sich in die Membran einfügen können, weisen auch C6, C7 und C8 β eine MACPF-Domäne auf. Allerdings zeigten Sequenzanalysen, dass diese Rezeptorproteine über keinerlei für eine Membraninsertion notwendigen, amphipathischen oder hydrophobe Bereiche in den CH1- und CH2-Regionen verfügen [Rosado *et al.*, 2007; zusammengefasst in Kondos *et al.*, 2010].

1.7. „Plasmodium perforin-like proteins“ – Wissensstand zu Beginn des Projekts

Das Genom des Malariaerregers *P. falciparum* kodiert eine Gruppe von fünf Proteinen mit MACPF-Domäne [Kaiser *et al.*, 2004]. Basierend auf der Sequenzhomologie ihrer konservierten Domäne zu bekannten porenbildenden Proteinen (**Kapitel 1.6**) werden diese Proteine „*Plasmodium* perforin-like proteins“, kurz PPLP1-5, genannt. Seit ihrer ersten Beschreibung gelang es bereits, für einige Vertreter der PPLPs im Rahmen genetischer Studien Hinweise zur Funktionsweise zu erlangen.

PPLP1 wurde erstmals von Ishino und Kollegen (2005) im Nagermalariaerreger *P. berghei* charakterisiert. Die Homologie der MACPF-Domäne in PPLP1 zu den membranporenbildenden MACPF-Proteinen Perforin-1 und Komplementfaktor C9 (**Kapitel 1.6**) beträgt 56,7% bzw. 55,7%. Entsprechend ist die Ähnlichkeit der plasmodialen MACPF-Domäne zu den bekannten Porenbildnern sogar höher als die Sequenzhomologie von 51,5% zwischen Perforin-1 und C9 untereinander [Ishino *et al.*, 2005]. *In-silico* Strukturanalysen von PPLP1 ergaben zudem, dass PPLP1 über ein putativ membranspannendes Motiv verfügt, bestehend aus zwei amphipathischen, α -helikalen Regionen. Dies ähnelt den in **Kapitel 1.6** beschriebenen CH1- und CH2-Regionen von Perforin-1 und C9 und unterstützt die Hypothese, dass auch PPLP1 eine membranporenbildende Funktion erfüllen könnte [Ishino *et al.*, 2005]. Expressionsstudien in den Moskitostadien ergaben, dass PPLP1 mikronemal und ausschließlich in Mikronemen der Sporozoiten in den Speicheldrüsen exprimiert wird, nicht jedoch in den Sporozoiten der Oozysten. In Übereinstimmung mit diesen Befunden ergaben auch Funktionsstudien zu PPLP1 mittels Gen-Knockout einen phänotypischen Defekt der Parasiten beim Übergang aus dem Blutgefäß in die Leber des humanen Wirtsorganismus [Ishino *et al.*, 2005]. Der Defekt konnte nicht beobachtet werden, wenn Kupffer-Zell-defiziente Ratten mit den mutierten Parasiten infiziert wurden. Daraus konnte gefolgert werden, dass PPLP1 ausschließlich für die Durchquerung der Kupfferschen Zellen in den Lebersinusoiden essentiell ist [Ishino *et al.*, 2005]. Aufgrund seiner stadienspezifischen Funktion und Lokalisierung wurde PPLP1 auch „Sporozoite microneme protein essential for cell traversal 2“ (SPECT2) genannt.

PPLP2 war zum Zeitpunkt des Projektbeginns noch nicht charakterisiert. Im Rahmen einer Proteomstudie in *P. falciparum* wurde PPLP2 jedoch in Merozoiten nachgewiesen [Florens *et al.*, 2002].

PPLP3 wurde von Kadota und Kollegen (2004) in *P. berghei* charakterisiert. Die konservierte MACPF-Domäne weist eine Homologie von 53,3% bzw. 52% zum Komplementfaktor C9 bzw. Perforin-1 auf und ist beiden Proteinen somit ähnlicher als C9 und Perforin-1 untereinander. Wie bereits für PPLP1 gezeigt werden konnte, weist auch die *in-silico* Proteinstruktur der PPLP3 MACPF-Domäne ein putatives Transmembranmotiv, bestehend

aus zwei amphipathischen α -Helices, auf [Kadota *et al.*, 2004]. Expressionsstudien für alle Lebensstadien des Nagermalariaerregers zeigten eine ausschließlich Ookineten-spezifische Expression von PPLP3, daher auch „Membrane-attack ookinete protein“ (MAOP) genannt. Die apikale Lokalisation von PPLP3 in den Ookineten lässt eine mikronemale Speicherung des Proteins vermuten [Kadota *et al.*, 2004]. Durch Generierung einer PPLP3-defizienten Mutante wurde die Funktion des MACPF-Proteins in den invasiven Ookineten untersucht. Der Verlust des MACPF-Proteins führte in den Ookineten zu einem Defekt bei der Durchquerung des Mitteldarmepithels und somit zu einem Arrest im Lebenszyklus des Parasiten. PPLP3-defiziente Ookineten lagerten sich scheinbar irreversibel an das Mitteldarmepithel der Mücke an, konnten das Gewebe jedoch noch nicht durchqueren [Kadota *et al.*, 2004].

PPLP4 wurde bisher nicht funktional analysiert. Eine Untersuchung des Ookinetenproteoms in *P. berghei* ergab jedoch die Expression von PPLP4 in diesem Invasionsstadium [Raibaud *et al.*, 2006].

PPLP5 wurde im Rahmen einer Proteomanalyse in *P. berghei* Ookineten nachgewiesen [Ecker *et al.*, 2007]. Die Charakterisierung einer PPLP5-defizienten Parasitenzelllinie ergab einen vergleichbaren Phänotyp zu den PPLP3-defizienten Parasiten. Nach Anhaften der Knockout-Parasiten mit ihrem apikalen Ende an das Mitteldarmepithel kommt es zu einem Arrest des Lebenszyklus. Ecker und Kollegen (2007) gelang es jedoch zu zeigen, dass eine Umgehung der Epithelschicht für die Parasiten ausreicht, um den Lebenszyklus zu beenden. PPLP5 übernimmt dementsprechend ebenfalls ausschließlich in reifen Ookineten eine essentielle Funktion für die parasitäre Entwicklung in der Mücke. Für *P. falciparum* konnte PPLP5 aufgrund von Proteomanalysen auch in Gametozyten und Sporoziten nachgewiesen werden [Florens *et al.*, 2002]. Weitere Untersuchungen zu diesem MACPF-Protein im humanpathogenen Malariaerreger wurden jedoch bisher nicht vorgenommen.

Alle bisherigen Untersuchungsergebnisse zu den plasmodialen PPLPs unterstützen die Annahme einer potenziell membranporenbildenden Funktion der Proteine. Es konnte in verschiedenen invasiven Stadien eine essentielle Bedeutung eines oder mehrerer PPLPs demonstriert werden. Jedoch gelang es bisher nicht, die Beteiligung von MACPF-Proteinen beim Austritt des Parasiten aus seiner Wirtszelle nachzuweisen. Erkenntnisse zur Funktion eines PPLP-Homologs in einem nahen Verwandten von *Plasmodium*, *Toxoplasma gondii*, lieferten allerdings erste Hinweise auf eine mögliche Funktion der MACPF-Proteine beim Zellaustritt der Parasiten. So konnten Kafsack und Kollegen (2009) zeigen, dass *TgPPLP1* maßgeblich an der Ruptur der PVM in Schizonten beteiligt ist. Im humanpathogenen Malariaerreger *P. falciparum* wurden PPLP1-5 bisher nur auf Proteomebene analysiert. Funktionsanalysen beschränkten sich auf den Modellorganismus *P. berghei*. Obwohl

erfahrungsgemäß eine ähnliche Funktion homologer Proteine auch in *P. falciparum* angenommen werden kann, ist eine speziesspezifische Charakterisierung unabdingbar.

1.8. Ziel der Arbeit

Die Sexualphase von *P. falciparum* in der Mücke kann metaphorisch als „Flaschenhals“ in der Entwicklung des Parasiten bezeichnet werden. Von den während einer Blutmahlzeit aufgenommenen sexuellen Vorläuferstadien, den Gametozyten, durchläuft nur ein Bruchteil erfolgreich den Fertilisationsschritt. Getragen durch humane und insekteneigene Immunabwehrmechanismen im Mitteldarm der Mücke, wird die Parasitenzahl weiter reduziert, so dass zuletzt nur vereinzelt Ookineten den Mitteldarm verlassen und Oozysten bilden können. Eine solch gravierende Reduktion der Parasitämie bietet eine optimale Angriffsfläche für neue Strategien zur erfolgreichen Bekämpfung der Malariatransmission in Kombination mit therapeutischen Maßnahmen.

Für die Identifikation potenzieller Angriffsziele, u. a. transmissionsblockierender Vakzine, ist eine Aufklärung molekularer Mechanismen der parasitären Entwicklung im Mückendarm unabdingbar. Der Austritt der Gametozyten aus dem Wirtserythrozyten gilt dabei als initialer Schritt bei der Infektion der Mücke durch *Plasmodium*. Eine Intervention während dieses Prozesses würde zu einer effektiven Blockierung der Malariatransmission führen. In den letzten Jahren gelang es bereits, erste Erkenntnisse zur Gametozytenfreisetzung zu gewinnen. Beobachtungen zur Art der Ruptur der PVM im Zuge dieses Prozesses führten erstmals zu der Hypothese einer Beteiligung membranporenbildender Proteine. Eine Gruppe von fünf Perforin-artigen Proteinen (PPLP1-5) wurde im plasmodialen Genom identifiziert und teilweise funktionell charakterisiert. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle der PPLPs insbesondere in Bezug auf die PVM-Ruptur beim Gametozytenaustritt aus der Wirtszelle zu charakterisieren.

Das erste Hauptziel dieser Arbeit stellte die Expressionsanalyse von PPLP1-5 dar, insbesondere in beiden intraerythrozytären Zellaustrittsstadien von *P. falciparum*, den Schizonten und reifen Gametozyten. Hierfür sollte mittels reverser Transkriptase PCR zunächst das Transkriptionsmuster der PPLPs in den intraerythrozytären Parasitenstadien untersucht werden. Für die Analyse der Proteinexpression und der subzellulären Lokalisation der Proteine sollten IFAs durchgeführt werden. Zur Herstellung der verwendeten polyklonalen Antiseren gegen PPLP1-5 sollten entsprechende rekombinante Proteine im bakteriellen System hergestellt werden.

Das zweite Hauptziel dieser Arbeit umfasste die Charakterisierung und funktionelle Analyse von PPLP2 und PPLP4, mit Hilfe der reversen Genetik. Die subzelluläre Lokalisation und stadienspezifische Expression beider Proteine sollte mittels Immunfluoreszenzanalysen detailliert untersucht werden. Außerdem sollten für das entsprechende PPLP jeweils eine

defiziente Zelllinie durch homologe Rekombination erzeugt und auf phänotypische Veränderungen hin untersucht werden. Mittels Giemsa-gefärbter Blutausstriche sollte die Morphologie der intraerythrozytären Blutstadien sowie der aktivierten Gametozyten miteinander verglichen werden. Die Exflagellationsfähigkeit der Gametozyten sollte in Exflagellationsassays untersucht werden und Membranfütterungsexperimente mit *Anopheles stephensi* („Standard membrane feeding assay“, SMFA) sollten zur Validierung der Transmissionsfähigkeit dieser Parasiten auf die Mücke verwendet werden. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen aktivierter PPLP2- und PPLP4-defizienter Gametozyten sollten der ultrastrukturellen Untersuchung des Gametozytenaustritts im Zuge der Gametogenese dienen. Zudem sollten diverse Substanzen auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, phänotypische Eigenschaften PPLP2-defizienter Gametozyten aufzuheben bzw. nachzuahmen.

2. Material & Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Tab. 2.1: Wichtige verwendete Geräte und deren Hersteller.

Gerät	Hersteller
Elektroporationsapparatur, <i>Gene Pulser Xcell</i>	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Plattenleser, <i>Multimode Reader infinite200</i>	Tecan, Männedorf, CH
Lichtmikroskop, <i>Leica DMLS</i>	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop, <i>Leica Laborlux 11</i>	Leica, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop, <i>Leica DM 5500B</i>	Leica, Wetzlar
Falkonzentrifuge, <i>5810R</i>	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler, <i>Primus96 PLUS</i>	peqLAB, Erlangen
Zentrifuge, <i>Avanti J-E</i>	Beckmann, Krefeld

2.1.2. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Alle Einwegmaterialien, soweit nicht anders angegeben, stammen von folgenden Anbietern:

- BD Falcon, Heidelberg; Bio-Rad, München; Eppendorf, Hamburg; Sarstedt, Nümbrecht
- Erythrozytenkonzentrat (EK) und humanes Serum (A+) wurde vom Bayerischen Roten Kreuz (Augsburg) bzw. aus der transfusionsmedizinischen Abteilung des Universitätsklinikums Aachen bezogen
- NMRI-Mäuse (weiblich, sechs Wochen alt) wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen
- Zellkulturgas 5 % O₂, 5 % CO₂ in Stickstoff von Westfalen (Münster)
- Zellkulturmedium RPMI („Roswell Park Memorial Institute“ Medium) 1640 + 25 mM HEPES + L-Glutamin + Natriumbicarbonat von Invitrogen/Gibco, Karlsruhe

Tab. 2.2: Wichtige Chemikalien und deren Hersteller.

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid-Stammlösung	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ampizillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
BCIP/NBT-Tabletten	Roche, Basel, CH
Blastizidin Lösung	Invivogen, San Diego, CA, USA
Bradford Reagenz	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Diaphorase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Ethanol <i>p.a.</i>	Roth, Karlsruhe
Evans Blue	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fluoreszenz-Einschlussmedium	Citifluor Ltd, London UK
<i>Freund's Incomplete Adjuvant</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>GelCode® Blue Stain</i>	Pierce Biotechnology Inc., Waltham, MA, USA
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe

Chemikalien	Hersteller
Giemsa-Stammlösung	Roth, Karlsruhe
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hypoxanthin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Ketamin	Ceva Sante Animale, Libourne, FR
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol, <i>p.a.</i>	Roth, Karlsruhe
Michpulver, Blotting Grade	Roth, Karlsruhe
p-Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT)	Roth, Karlsruhe
Neutrales Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Percoll®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteaseinhibitorcocktail (cOmplete EDTA-free)	Roche, Basel, CH
Pyrimethamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS, <i>ultra pure</i> für die Elektrophorese	Roth, Karlsruhe
Sorbitol	AppliChem, Darmstadt
TEMED für die Elektrophorese	Roth, Karlsruhe
Tetronic® 90R4	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizol®	Invitrogen, Karlsruhe
Trypton aus Kasein	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasser, doppelt destilliert	Roth, Karlsruhe
Xanthurensäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylazin	Medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg

2.1.3. Enzyme, Laborkits, Größenstandards

Folgende Enzyme kamen in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung:

GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Mannheim)

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB New England Biolabs, Frankfurt)

Protector® RNase Inhibitor (Roche, Basel, CH)

Diverse Restriktionsenzyme (NEB New England Biolabs, Frankfurt)

SuperScript™ III Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe)

T4-DNA Ligase (NEB New England Biolabs, Frankfurt)

Folgende Laborkits wurden verwendet:

RNase free DNase Set (Qiagen, Hilden)

NucleoSpin® Blood (Macherey-Nagel, Düren)

NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Düren)

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren)

NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel, Düren)

Epoxy Embedding Medium Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Folgende Größenstandards wurden verwendet:

Für die Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäure-Fragmenten wurde der *100 bp DNA Ladder*-Größenstandard bzw. *1 kb DNA Ladder* (NEB New England Biolabs, Frankfurt) verwendet. Als Molekulargewichtsstandard für SDS-PAGE wurde *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt (**Abb. 2.1**).

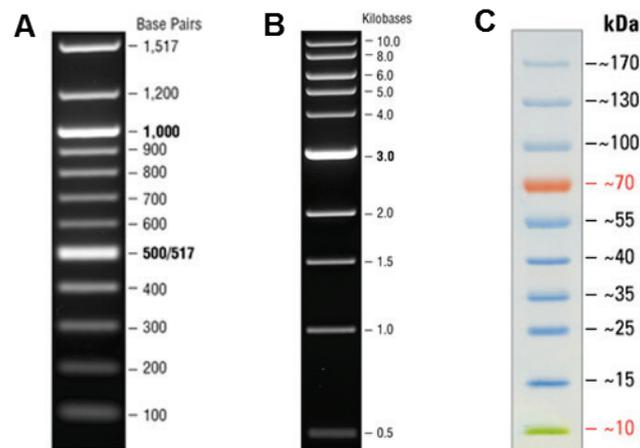


Abb. 2.1: Verwendete Größenstandards. **A** *100 bp DNA Ladder*. Die den Banden entsprechenden DNS-Fragmentgrößen sind in Basenpaaren („Base Pairs“) angegeben. **B** *1 kb DNA Ladder*. Die den Banden entsprechenden DNS-Fragmentgrößen sind in Kilobasen („Kilobases“) angegeben. **C** *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*. Das in der SDS-PAGE auftretende Bandenmuster ist dargestellt. Die Molekulargewichte der Banden sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Die Abbildungen sind den jeweiligen Produktseiten der Hersteller entnommen und wurden ggf. modifiziert.

2.1.4. Puffer und Stammlösungen

Tab. 2.3: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Stocklösungen.

Name	Zusammensetzung
5 % Acrylamid-Sammelgel	0,6 ml 30 % Acrylamid 1 ml 0,5 M Tris pH 6,8 12 µl 10 % SDS 12 µl 10 % APS 4 µl TEMED 2,4 ml dH ₂ O
12 % Acrylamid-Trenngel	4 ml 30 % Acrylamid 2,5 ml 0,5 M Tris pH 8,8 100 µl 10 % SDS 100 µl 10 % APS 4 µl TEMED 3,3 ml dH ₂ O
1000 x Ampizillin	100mg/ml in dH ₂ O
IFA Blockierlösung	3 % BSA in PBS
Chloramphenicol	50 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol
Cytomix-Puffer	120 mM KCl 0,15 mM CaCl ₂ 2 mM EGTA pH 7,6 5 mM MgCl ₂ 10 mM K ₂ HPO ₄ pH 7,6 10 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,6 25 mM Hepes pH7,6 pH 7,6
DEPC-Wasser	0,1 % (v/v) DEPC in dH ₂ O Inkubation über Nacht bei 37 °C, Autoklavieren
Elutionspuffer Proteinaufreinigung	20 mM Tris pH 7,1 200 mM NaCl 1 mM EDTA 10 mM Maltose In dH ₂ O
Fixierungslösung für EM	4 g Paraformaldehyd in 90 ml 60 °C warmem dH ₂ O ca. 50 µl 2 M NaOH (bis Lösung klar wird) 10 ml 10x PBS, pH 7,2 1 % Glutaraldehyd
Fixierungslösung für IFA	4 g Paraformaldehyd in 90 ml 60 °C warmen dH ₂ O ca. 50 µl 2 M NaOH (bis Lösung klar wird) 10 ml 10x PBS, pH 7,2
10 x Giemsapuffer	8 mM KH ₂ PO ₄ 6 mM Na ₂ HPO ₄ In dH ₂ O, pH 7,0
Glycerolyte 57	13,33 g DL-Natriumlactat 285 g Glycerol (45 % [v/v]) 4 mM KCl 8,75 mM Na ₂ HPO ₄ 3,77 mM NaH ₂ PO ₄ dH ₂ O ad 500 ml
1000 x Hypoxanthin	50 mg/ml in 1 M NaOH
IFA-Permeabilisierungslösung	125 mM Glyzin 0,1 % Triton-X-100 In PBS
Lysepuffer Proteinaufreinigung	50 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA 100 mM NaCl In dH ₂ O

Name	Zusammensetzung
Lysozymlösung	10 mg/ml in dH ₂ O
Malstat-Reagenz	2ml 10 % Triton-X-100 2 g L-Lactat 0,66 g Tris 66 mg APAD dH ₂ O ad 200 ml, pH 9,0
Narkose für Mäuse	80 mg/ml Ketamin 12 mg/ml Xylazin
NBT/Diaphorase-Lösung	1 mg NBT 1 mg Diaphorase 2 ml ddH ₂ O
10 x PBS	75 mM Na ₂ HPO ₄ 75 mM NaH ₂ PO ₄ 1,45 M NaCl dH ₂ O ad 1 l, pH 7,4
10 x SDS-PAGE-Laufpuffer	29 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS dH ₂ O ad 1 l
2 x Probenpuffer	2,5 ml 500 mM Tris-HCl pH 6,8 2 ml Glycerin 4 ml 10 % SDS 0,5 ml 0,1 % Bromphenolblau dH ₂ O ad 10 ml
10 x RPMI <i>incomplete</i>	0,05 g Hypoxanthin 5,94 g HEPES 10,43 g RPMI 1640 ddH ₂ O ad 100 ml
50 x TAE-Puffer	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 dH ₂ O ad 1l
1x TE-Puffer	10 mM Tris-Cl pH 7,5 1 mM EDTA in dH ₂ O
Waschpuffer Proteinaufreinigung	20 mM Tris pH 7,1 200 mM NaCl 1mM EDTA in dH ₂ O
1 mM Xanthurensäure	20,5 mg/ml Xanthurensäure in 0,5 M NH ₄ OH

2.1.5. Medien

Alle verwendeten Lösungen sowie das humane Serum wurden sterilfiltriert.

Tab. 2.4: Herstellung der verwendeten Zellkulturmedien.

Medium	Zusammensetzung
Medium für <i>Plasmodium</i> -Zellkultur ohne Selektion	500 ml 1 x RPMI 1640 50 ml Humanes Serum A ⁺ 550 µl 1000 x Hypoxanthin 550 µl 1000 x Gentamycin
Blastizidin (BSD)-Selektionsmedium	500 ml 1 x RPMI 1640 50 ml Humanes Serum A ⁺ 550 µl 1000 x Hypoxanthin 550 µl 1000 x Gentamycin 275 µl Blastizidin (5 mg/ml stock)

Medium	Zusammensetzung
1 x RPMI <i>incomplete</i>	10,43 g RPMI-1640-Pulver 5,94 g Hepes 0,05 g Hypoxanthin ddH ₂ O ad 1l
LB/Amp/Cam-Agar	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Agar ddH ₂ O ad 1 l 1 ml Ampizillin-Lösung und 1 ml Chloramphenicol-Lösung nach dem Autoklavieren zugeben, wenn Medium ≤ 50 °C
LB/Amp/Cam-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ddH ₂ O ad 1 l 1 ml Ampizillin-Lösung und 1 ml Chloramphenicol-Lösung nach dem Autoklavieren zugeben, wenn Medium ≤ 50 °C

2.1.6. Zelllinien

Verwendete *P. falciparum*-Zelllinien:

- Wildtyp NF54 (WT); Pyrimethamin-sensitiv [Ponnudurai *et al.*, 1981]
- F12; Klon aus dem Klon 3D7 des NF54 [Alano *et al.*, 1995b]
- PPLP2(-); PPLP2-*gene disruption*-Transfektion in NF54; Blastizidin-resistent; entstand im Rahmen dieser Arbeit
- PPLP4(-) 1C10 und 2D6; Klone einer PPLP4-*gene disruption*-Transfektion in NF54; Blastizidin-resistent; entstand im Rahmen dieser Arbeit

Verwendete *Escherichia (E.) coli*-Stämme:

- Transformationszellen *TopTen*® (NEB *New England Biolabs*, Frankfurt)
- Proteinexpressionszellen BL21-CodonPlus®-(DE3)-RIL (Stratagene); Genotyp *E. coli OneShot*®-Top10-Competent-Cells B F- ompT hsdS (rB- mB-) dcm+ Tetr gal endA Hte [argU ileY leuW Camr]

2.1.7. Plasmide

Expressionsvektor pH902

Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Williamson (Chicago) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich bei dem pH902-Vektor um das Vorläuferkonstrukt von pMAL-c und seinen Derivaten [Maina *et al.*, 1988], die von New England Biolabs vertrieben werden. Der Vektor kodiert unter anderem das Maltose-bindende Protein (MBP). Dieses Gen liegt direkt vor der Klonierungsstelle, in die das gewünschte DNS-Fragment eingefügt werden soll. Die Expression des auf diese Weise entstandenen Fusionsproteins wird über

das *lac*-Operon reguliert, indem der vom *lacI*-Gen kodierte Repressor die Expression unterbindet. Erst durch Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG), welches den Repressor bindet, wird die Expression des MBP-Fusionsproteins induziert (**Abb. 2.2A**). Die Selektion des Plasmids erfolgt über eine vektorvermittelte Ampizillinresistenz. Durch das hinter der Klonierungsstelle befindliche *lacZ*-Gen wird parallel zur Expression des Fusionsproteins auch der funktionelle Teil der β -Galaktosidase gebildet, wodurch eine Blau-Weiß-Selektion der exprimierenden Bakterienkolonien möglich wird.

Knockout-Vektorkonstrukt pCAM-BSD-KO

Dieser Vektor dient der Herstellung von *P. falciparum*-knockout-Parasiten durch homologe *single-crossover*-Rekombination (**Abb. 2.2B**). Die Selektion der transfizierten Parasiten wird durch eine vektorvermittelte Blastizidin-S-HCl-Resistenz erreicht [Mamoun *et al.*, 1999]. Es handelt sich dabei um eine Genkassette aus *Aspergillus terreus*, die das Blastizidin-S-Desaminase-Gen enthält. Auf Grund der Abstammung vom pDT-Tg23-Vektor, verfügt pCAM-BSD-KO zusätzlich über eine Ampizillinresistenz. Der Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Christian Doerig (Glasgow, UK) zur Verfügung gestellt.

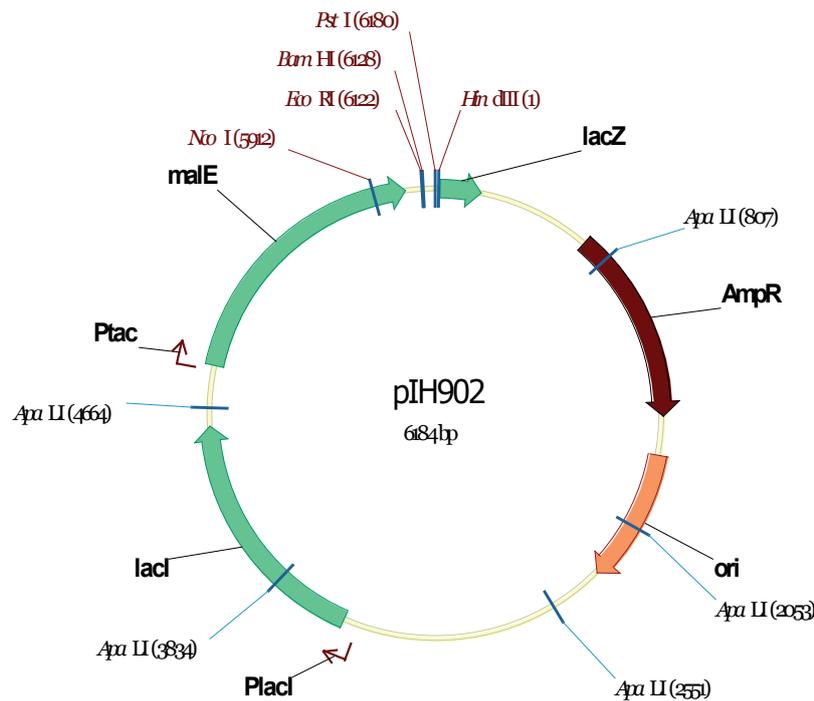


Abb. 2.2A: Vektorkarte des pIH902 Expressionsvektors.

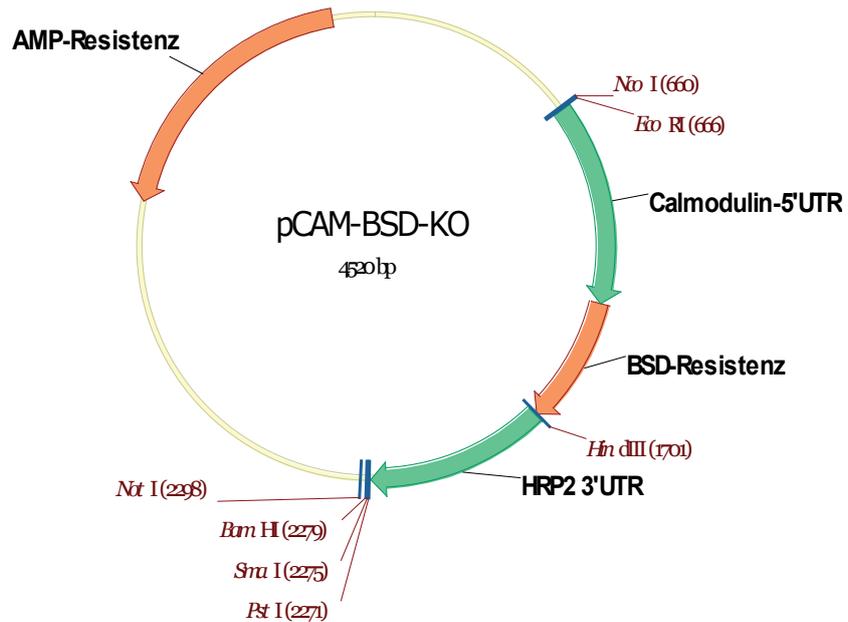


Abb. 2.2B: Vektorkarte des *Knockout*-Vektors pCAM-BSD-KO. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Andrea Kühn zur Verfügung gestellt.

2.1.8. Genidentifikationsnummern

Tab. 2.5 Relevante Gene und die dazugehörigen früheren bzw. aktuellen Genidentifikationsnummern (Gen-ID) basierend auf *P. falciparum*-Datenbank www.plasmodb.org [Aurrecochea *et al.*, 2009].

Genname	Frühere Gen-ID	Aktuelle Gen-ID
<i>pplp1</i>	PF0430c	PF3D7_0408700
<i>pplp2</i>	PFL0805w	PF3D7_1216700
<i>pplp3</i>	PF3D7_1216700	PF3D7_0923300
<i>pplp4</i>	PF3D7_0923300	PF3D7_0819400
<i>pplp5</i>	PF3D7_0819400	PF3D7_0819200
<i>pfaldolase</i>	PF14_0425	PF3D7_1444800
<i>pfama-1</i>	PF11_0344	PF3D7_1133400
<i>pfccp2</i>	PF14_0532	PF3D7_1455800
<i>pfs230</i>	PFB0405w	PF3D7_0209000
<i>pfs25</i>	PF10_0303	PF3D7_1031000
<i>pf377</i>	PFL2405c	PF3D7_1250100
<i>Pfs28</i>	PF10_0302	PF3D7_1030900

2.1.9. Oligonukleotide

Tab. 2.6 Oligonukleotidsequenzen für die Herstellung rekombinanter Proteine (RP) und genetisch modifizierter Parasiten (*pplp2(-)* bzw. *pplp4(-)*). Restriktionsschnittstellen sind in Großbuchstaben und Fettdruck dargestellt, Stopcodons sind unterstrichen.

Name, Orientierung, Restriktionsschnittstelle	Sequenz	Produkt
<i>pplp1</i> RP		
PFD0430cS1-EcoRI, S, EcoRI	at GAATTC gcctcttttctgcctcaac	870 bp
PFD0430cAS1-EcoRI, AS, EcoRI	at GAATTC <u>ttat</u> gcatcgtgttatccaga	
<i>pplp2</i> RP1/2		
PFL0805wS1-EcoRI, S, EcoRI	at GAATTC ggtgataaacgttcaaaggaaa	1020 bp
PFL0805wAS1-EcoRI, AS, EcoRI	ta GAATTC <u>ttagg</u> aaaatcccattaatatcgttg	
PLP2-pIH/Stu-ac-S, S, Stul	gcgta AGGCCT tcaagcgctttcaaaaagaagca	948 bp
PLP2-pIH/Sal-ac-AS, AS, Sall	tacgc GTCGAC <u>ttat</u> ctggttgcttgaaaattgtatg	
<i>pplp2(-)</i>		
PLP2KO2-BamHI-S, S, BamHI	ta GATCC ttgtctcttaagtattaggttagga	802 bp
PLP2KO2-NotI-AS, AS, NotI	at GCGCCGC <u>ttat</u> tattcatatgcaacatgtgtacc	
<i>pplp3</i> RP		
PFI1145S1-EcoRI, S, EcoRI	at GAATTC cgagataatcgcaa	666 bp
PFI1145AS1-EcoRI, AS, EcoRI	ta GAATTC <u>ttaat</u> cttttaaatgataaatcattagg	
<i>pplp4</i> RP1/2		
PF08_0050S1-EcoRI, S, EcoRI	at GAATTC aaaccattttcagcgtctatgc	903 bp
PF08_0050AS1-EcoRI, AS, EcoRI	at GAATTC <u>ttacag</u> accagtgcttttatatcc	
PLP4-pGex/BamHI-ac2-S, S, BamHI	gcgta GGATCC agcactggtctgattttcgtt	634 bp
PLP4-pIH/PstI-ac-AS, AS, PstI	tacgc CTGCAG <u>ttagg</u> attggctttcacaaggttc	
<i>pplp4(-)</i>		
PPLP4-KO-S1, S, BamHI	at GATCC cctaatcgtatgttactgtttatc	531 bp
PPLP4-KO-AS1, AS, NotI	ta GCGCCGC <u>ttatt</u> ggtaacataacttcattgg	
<i>pplp5</i> RP		
PF08_0052S1-EcoRI, S, EcoRI	at GAATTC ttaaaatacctggggatgtcg	999 bp
PF08_0052AS1-EcoRI, AS, EcoRI	ta GAATTC <u>ttatt</u> ggcttgttcccattca	

Tab. 2.7 : Für RT-PCR verwendete Oligonukleotidsequenzen.

Name, Orientierung	Sequenz	Produkt
<i>pplp1</i>		
PFD0430c.1for, S	atgatgatgaaagtgaaat	227 bp
PFD0430c.1rev, AS	cataacatcatcttgttcct	
<i>pplp2</i>		
PLP2-RT-ac-S, S	agtagtacaacaaggagaag	281 bp
PLP2-RT-ac-AS, AS	ctgatataacatcacctaaa	
<i>pplp3</i>		
PFI1145w.1for, S	actaggggctcatttatatt	217 bp

Name, Orientierung	Sequenz	Produkt
PF1145w.1rev, AS	gatcgtgctgtaatatgtt	
pplp4		
PF08_0050.1for, S	gatccaggatttaaagaagt	206 bp
PF08_0050.1rev, AS	gcaaaatagcttttatatgg	
pplp5		
PF08_0052.1for, S	gttatgctttgcattatt	227 bp
PF08_0052.1rev, AS	atccgaatttagttttctct	
pfama-1		
PfAMA-1 RT1 S, S	ggattatgggtcgatgga	180 bp
PfAMA-1 RT1 A, AS	gatcatactagcgttctt	
pfccp2		
PfCCp2-RT2-S, S	tccgatggagaatccgtt	187 bp
PfCCp2-RT2-AS, AS	gtatcccatgtcttgta	
pfaldolase		
Aldo-RT-S, S	tagatggattagcagaaagatgc	378 bp
Aldo-RT-AS, AS	agaaaccaaccatcttgagtagtg	

Tab. 2.8: Oligonukleotidkombinationen, welche für die diagnostische PCR zur Analyse spezifischer Genloci in genetisch modifizierten Parasiten verwendet wurden. 5' bzw. 3' Integration entsprechen der 5' bzw. 3' Region des modifizierten Zielgens. Episom bezeichnet episomal vorliegende Plasmid-DNS, Wildtyp bezeichnet den wildtypischen Genloкус.

Zielregion	Name	Sequenz	Produkt
pplp2(-)			
5' Integration	PLP2KO2-Integ5-F	ggaaggggcataagaagaaga	1085 bp
	pCAM-BSD/R	caattaaccctcactaaag	
3' Integration	PLP2KO2-Integ3-R	gcgcttgataatcccatctt	1039 bp
	pCAM-BSD/F	tattcctaatacatgtaaatcttaa	
Episom	pCAM-BSD/F	tattcctaatacatgtaaatcttaa	970 bp
	pCAM-BSD/R	caattaaccctcactaaag	
Wildtyp	PLP2KO2-Integ5-F	ggaaggggcataagaagaaga	1154 bp
	PLP2KO2-Integ3-R	gcgcttgataatcccatctt	
pplp4(-)			
5' Integration	PPLP4 KO-Integ5-F	ttgctttaataactttgaaccattt	672 bp
	pCAM-BSD/R	caattaaccctcactaaag	
3' Integration	pCAM-BSD/F	tattcctaatacatgtaaatcttaa	748 bp
	PPLP4 KO-Integ3-R	ataccaccaaataatgggcaga	
Episom	pCAM-BSD/F	tattcctaatacatgtaaatcttaa	697 bp
	pCAM-BSD/R	caattaaccctcactaaag	
Wildtyp	PPLP4 KO-Integ5-F	ttgctttaataactttgaaccattt	723 bp
	PPLP4 KO-Integ3-R	ataccaccaaataatgggcaga	
Sequenzierung des 5' Integrationsloкус	pCAM 5'Seq-R	ctaactcacattaattgcgt	

2.1.10. Antikörper

Primärantikörper, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in **Tab. 2.5** aufgelistet. Als Sekundärantikörper wurden in Immunfluoreszenzanalysen (IFA) Fluorochrom-gekoppelte Alexa Fluor® 488-Antikörper, sowie Alexa Fluor® 594-Antikörper (beides aus Ziege) jeweils in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

Tab. 2.9: Verwendete Primärantikörper.

Antikörper	Tier	Verdünnung	Herkunft
anti-PfPLP1 RP1	Maus	1:20	AG Pradel
anti-PfPLP2RP1	Maus	1:10-20	AG Pradel
anti-PfPLP2RP2	Maus	1:20	AG Pradel
anti-PfPLP3RP1	Maus	1:20	AG Pradel
anti-PfPLP4RP1	Maus	1:20	AG Pradel
anti-PfPLP4RP2	Maus	1:50-100	AG Pradel
anti-PfPLP5RP1	Maus	1:20	AG Pradel
anti-Pfs25	Kaninchen	1:1000	ATCC (Virginia, USA)
anti-Pfs230	Kaninchen	1:400	Biogenes
anti-PfMSP1	Kaninchen	1:1000	ATCC (Virginia, USA)
anti-Pfs28	Kaninchen	1:300	ATCC (Virginia, USA)
anti-MBP	Maus	1:20	AG Pradel

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. *In vitro* Kultivierung von *P. falciparum*

Die kontinuierliche Kultivierung aller verwendeten *P. falciparum* Stämme erfolgte wie in Ifediba und Vanderberg (1981) beschrieben. Alle Parasitenkulturen wurden in luftdicht verschlossenen Zellkulturflaschen inkubiert. Hierfür wurden 5 ml A+-Zellkulturmedium mit humanem EK auf einen Hämatokrit von 5 % eingestellt und mit infizierten Erythrozyten angeimpft. Die Parasitämie wurde alle zwei Tage mittels Blutausschicht ermittelt und gegebenenfalls durch Verdünnung der Kultur auf etwa 0,2-0,5 % eingestellt, um Wachstumsinhibition bzw. unerwünschte Gametozytenbildung durch Dichtestress zu vermeiden [Stephens und Christophers, 1904]. Zur Kultivierung von Gametozyten wurden 15 ml Zellkulturmedium mit 5 % Hämatokrit vorgelegt und mit infizierten Erythrozyten aus einer kontinuierlichen Kultur auf eine Ausgangsparasitämie von etwa 2 % eingestellt. Alle Kulturen wurden mit einem Gasgemisch aus 5 % CO₂/ 5 % O₂ in N₂ begast und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Ab Tag zwei nach Ansetzen der Gametozytenkultur, wurden täglich etwa 10 ml Zellkulturmedium ausgetauscht, wobei die Kultur stets auf einer Heizplatte bei 37 °C warmgehalten wurde.

2.2.2. Kryokonservierung und Auftauen von *P. falciparum*

Zur dauerhaften Erhaltung aller Parasitenstämme, wurden infizierte Erythrozyten nach möglichst geringer Kultivierdauer eingefroren. Zu diesem Zweck wurden kontinuierliche Kulturen mit einer Parasitämie zwischen fünf und acht Prozent, überwiegend Ringstadien,

verwendet. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur (RT) und 500 x g pelletiert und in 1,2 ml Glycerolyte 57 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Kryoröhrchen überführt, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei -80 °C eingelagert. Zur Rückführung kryokonservierter Parasiten in die aktive Zellkultur wurden die Zellen bei 37 °C aufgetaut und in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Unter ständigem Schwenken wurden 200 µl einer sterilen 12 %igen NaCl-Lösung tropfenweise zugegeben und die Suspension danach für 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 ml einer 1,6 %igen NaCl-Lösung langsam zugetropft, die Zellen bei RT und 500 x g abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml 0,2 % Glukose/ 0,9 % NaCl resuspendiert. Zuletzt wurden die Zellen pelletiert, in 5 ml Zellkulturmedium mit 5 % Hämatokrit resuspendiert und als kontinuierliche Kultur weitergeführt (**Kap. 2.2.1**).

2.2.3. Anfertigung von Blutaussstrichen und Ermittlung der Parasitämie

Zur Ermittlung der Parasitämie sowie zur morphologischen Evaluierung von Parasiten wurden dünne Blutaussstriche hergestellt und anschließend mit Giemsa angefärbt. Für den Ausstrich wurden 100 µl einer Parasitenkultur bei RT und 2500 x g pelletiert, 90 µl des Überstandes entfernt und die Zellen sorgfältig im verbliebenen Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf einen Objektträger getropft und mit einem zweiten Objektträger gleichmäßig zu einer einzigen Zellschicht ausgestrichen. Der Ausstrich wurde luftgetrocknet und durch Abspülen mit Methanol und anschließender Lufttrocknung fixiert. Die Färbung erfolgte in einem 10-minütigen Tauchbad in 5 %iger Giemsalösung. Der Objektträger wurde mit dH₂O abgespült und final luftgetrocknet. Die Auswertung der Blutaussstriche erfolgte am Lichtmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung mit einem Ölimmersionsobjektiv. Zur Ermittlung der Parasitämie wurde für zehn Gesichtsfelder die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl infizierter Zellen bestimmt und in ein prozentuales Verhältnis gesetzt.

$$\frac{\text{infizierte Zellen} \times 100}{\text{Gesamtzellzahl}} = \text{Parasitämie [\%]}$$

2.2.4. Synchronisierung kontinuierlicher *P. falciparum*-Kulturen

Für eine vorrübergehende synchrone Entwicklung der asexuellen Parasiten in einer kontinuierlichen Kultur wurde diese mit Sorbitol behandelt, wodurch alle Stadien außer dem Ringstadium abgetötet werden [modifiziertes Protokoll nach Lambros und Vanderberg, 1979]. Hierfür wurde ein Zeitpunkt abgewartet, an dem die Kultur min. 1 % Ringstadien enthielt. Die Zellen wurden bei RT und 500 x g pelletiert und in 5% igem Sorbitol resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen wieder pelletiert, einmal mit A+-Medium gewaschen, zuletzt in 5 ml A+-Medium aufgenommen und

weiterkultiviert. Nach 4 h wurde dieser Vorgang wiederholt und im letzten Schritt 250 µl frisches EK zugegeben.

2.2.5. Exflagellations-Assay

Um die Fähigkeiten verschiedener *P. falciparum* Zelllinien, Mikrogameten durch Exflagellation zu bilden, miteinander zu vergleichen oder den Effekt von potenziell exflagellationsinhibierenden Substanzen zu quantifizieren, wurden *in vitro* Exflagellations-Assays durchgeführt. Hierfür wurden pro Ansatz 100-300 µl einer reifen Gametozytenkultur entnommen. Für den Vergleich der Exflagellationsfähigkeit verschiedener Zelllinien wurde jeweils zum selben Zeitpunkt eine Probe des ursprünglichen Wildtyp-Stammes NF54 als Referenz, sowie eine Probe der genetisch modifizierten Zelllinie entnommen. Diese Proben wurden durch Zugabe von 10 µM Xanthurensäure aktiviert und für 15 min bei RT inkubiert. Zur lichtmikroskopischen Auswertung wurden 10 µl des Ansatzes auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckgläschen abgedeckt und bei 400-facher Vergrößerung analysiert. Es wurde die Anzahl an Exflagellationszentren in jeweils 30 Gesichtsfeldern ermittelt. Pro Experiment und Zelllinie wurden in der Regel drei Proben ausgewertet. Bei der Evaluierung des Porenversieglers Tetronic® 90R4 wurden die Proben vor ihrer Aktivierung 1 h bei 37 °C mit 5, 10, 20 bzw. 30 mg/ml Tetronic® 90R4 inkubiert. Die gleichzeitig angesetzte Kontrolle wurde mit der gleichen Menge des verwendeten Lösungsmittels, dH₂O, behandelt. Die graphische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit *Microsoft® Excel 2010*.

2.2.6. Aufreinigung von Gametozyten über Percoll®-Gradient

Um Gametozyten möglichst rein aus einer gemischten Parasitenkultur zu isolieren, wurden die Zellen über eine Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll® aufgetrennt [modifiziertes Protokoll nach Kariuki *et al.*, 1998]. Für die Auftrennung wurde ein Gradient aus je 4 ml 50- und 35 %-igem Percoll® in RPMI-*Incomplete*-Medium (ICM) hergestellt und in ein 15-ml-Röhrchen geschichtet, beginnend mit der 50 %-igen Schicht. Alle Schritte der Aufreinigung erfolgten bei 37 °C. Pro Gradient wurden maximal zwei reife Gametozytenkulturen bei 800 x g pelletiert und einmal mit 10 ml ICM gewaschen. Die Zellen wurden in 2 ml ICM aufgenommen und auf den vorgewärmten Gradienten geschichtet. Der Gradient wurde 12 min bei 500 x g zentrifugiert, wobei auf eine stark reduzierte Beschleunigung und Bremswirkung der Zentrifuge geachtet wurde. Die Gametozyten befanden sich in der Interphase zwischen den beiden Percoll®-Schichten und wurden mit einer vorgewärmten 2-ml-serologischen Pipette abgenommen und in ein frisches Röhrchen überführt. Die entnommenen Zellen wurden mit ICM auf ein Volumen von 10 ml gebracht und bei 800 x g pelletiert. Zuvor wurden 10 µl der Suspension abgenommen und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Gesamtzahl der Parasiten bestimmt. Hierfür wurden die vier Großquadrate ausgezählt, der Mittelwert gebildet und mit dem Berechnungsfaktor 10⁴ der

Zählkammer multipliziert um die Zellzahl pro ml zu berechnen. Dieser Wert wurde mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension, 10 ml, multipliziert um die Gesamtzellzahl zu berechnen. Nach dem Pelletieren der Zellen wurden diese zweimal mit je 10 ml ICM gewaschen um verbliebenes Percoll® zu entfernen. Falls benötigt, wurden die Gametozyten an dieser Stelle durch Zugabe von 10 µM Xanthurensäure aktiviert. Wurden die Zellen für eine Einbettung in Epon verwendet, wurden sie in 4 % Formaldehyd/ 1 % Glutaraldehyd in PBS pH 7,4 aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Wurden die Gametozyten für die Extraktion der Gesamt-RNS verwendet, wurden die Zellen im 5-fachen Pelletvolumen Trizol® aufgenommen, 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.7. Generierung genetisch veränderter *P. falciparum*-Zelllinien

Im Rahmen dieser Dissertation sollte der wildtypische Genlocus verschiedener Gene von *P. falciparum* durch die Integration eines Vektors unterbrochen und somit funktionslos gemacht werden [modifiziertes Protokoll nach Wu *et al.*, 1995]. Eine zum wildtypischen Genlocus homologe Gensequenz wurde mittels PCR amplifiziert, wobei am 5'-Ende eine BamHI-Schnittstelle und am 3'-Ende ein Stopp-Codon sowie eine NotI-Schnittstelle eingebracht wurde. Diese Schnittstellen wurden für die Ligation des Genfragments in den pCAM-BSD-KO-Vektor verwendet (**Kap. 2.3.5**). Das fertige Plasmid wurde in hitzekompetente *E. coli* Zellen transformiert (**Kap. 2.3.1**), vervielfältigt und mit dem Kit NucleoBond® Xtra Midi gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Die Transfektion von Parasiten des Stammes NF54 erfolgte nach dem von Wu und Kollegen (1995) beschriebenen Protokoll. Dabei wurden 4 ml einer synchronen kontinuierlichen Parasitenkultur mit min. 5 % Ringstadien bei 4 °C und 500 x g pelletiert und einmal in 5 ml kaltem Cytomix-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit 60 µg des Plasmids vermischt und mit Cytomix-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 400 µl eingestellt. Die Zellsuspension wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und bis zur Elektroporation auf Eis gelagert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Plasmid inkubiert. Die Elektroporation wurde bei einer Spannung von 0,31 kV und einer Kapazität von 950 µF im Optimalfall für 10-13 msec durchgeführt. Sofort nach erfolgtem Impuls wurden 500 µl A+-Medium zum Ansatz gegeben und dieser für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension restlos aus der Küvette entfernt, in eine Zellkulturflasche mit 5 ml A+-Medium und 200 µl EK überführt, begast und bei 37 °C inkubiert. Nach 4 h Inkubation wurde das Zellkulturmedium gewechselt und die Transfektanten-Selektion mit Blastizidin (BSD) begonnen. Der Kontrollansatz wurde auf zwei Flaschen aufgeteilt und eine davon mit A+-Medium, die andere mit dem BSD-Selektionsmedium versetzt. An Tag 1 nach der Transfektion wurde bei den Transfektanten das Medium gewechselt und 50 µl frisches EK zugegeben. Bei den Kulturen wurde täglich das Medium gewechselt und etwa alle fünf Tage der Zustand der Parasiten mittels Blutausschickung überprüft, sowie 100 µl frisches EK

zugegeben. Sobald Wachstum in den Transfektionsansätzen beobachtet wurde, wurden regelmäßig Aliquots kryokonserviert (**Kap. 2.2.2**). Die mit Selektionsmedium inkubierte Negativkontrolle wurde auf überlebende Zellen untersucht und entsorgt. Nach etwa zwei Wochen des Wachstums, wurde regelmäßig gDNS der Transfektanten isoliert, um mittels Integrations-PCR die Integration des Plasmids in das Genom zu überprüfen (**Kap. 2.3.4**). Die dabei verwendeten Oligonukleotide sind in der schematischen Darstellung der Mutanten eingezeichnet (**Abb. 3.6A und 3.13A**). Die Kombination der Oligonukleotide 1 und 2 weist den intakten wildtypischen Genlokus nach, 3 und 4 das episomal vorhandene Plasmid, 1 und 4 das 3'-Ende des Integrationslokus und 2 kombiniert mit 3 das 5'-Ende des Integrationslokus. Als Negativ-Kontrolle wurde gDNS der Kontroll-Transfektanten mitgeführt.

2.2.8. Isolierung klonaler *P. falciparum*-Zelllinien durch limitierende Verdünnung

Für die phänotypische Charakterisierung genetisch veränderter Parasiten wurden einzelne Klone mit vollständiger Plasmidintegration durch systematische Verdünnung aus gemischten Parasitenkulturen isoliert. Als vorbereitende Maßnahme wurden Transfektanten unter langsamer Rotation zwei Tage vor Ausklonierung kultiviert. Dies sollte die Anzahl an Mehrfachinfektionen reduzieren. Am Tag der Ausklonierung wurde die Gesamtzellzahl pro ml mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Mittels Blutausrichs wurde die Parasitämie ermittelt. Aus beiden Werten wurde die Anzahl infizierter Erythrozyten pro ml Parasitenkultur berechnet. Durch eine Verdünnungsreihe wurde die Parasitenkultur in vier Schritten auf 12 Parasiten in einem Endvolumen von 38,4 ml BSD-Selektionsmedium und 5 % Hämatokrit eingestellt. Die verdünnte Kultur wurde auf zwei 96-Loch-Mikrotiterplatten zu je 200 µl Parasitensuspension pro Vertiefung verteilt. Die Platten wurden in einem luftdicht verschlossenen Plastikbehälter mit 5 % CO₂/ 5 % O₂ in N₂ begast und bei 37 °C inkubiert. Alle zwei Tage wurden 100 µl Medium pro Vertiefung gewechselt. Bei jedem dritten Medium-Wechsel wurde zusätzlich 1 % EK zugegeben. Nach drei Wochen Inkubation wurden die Ansätze mittels Malstatassay auf Parasitenwachstum getestet. Der Malstat-Assay basiert auf einer Farbreaktion, welche auf das Vorhandensein der plasmodialen Lactat-Dehydrogenase hinweist [Makler *et al.*, 1998]. Für diesen Test wurden 20 µl pro Ansatz in eine Mikrotiterplatte überführt, 100 µl Malstatreagenz und 20 µl einer 1:2 Mischung von NBT und Diaphorase zugegeben und max. 30 min schüttelnd bei RT inkubiert. Bei positiver Malstatreaktion verfärbte sich die Suspension lila. Positiv auf Parasitenwachstum getestete Ansätze wurden umgehend in eine kleine Zellkulturflasche transferiert und mit 5 % Hämatokrit in BSD-Selektionsmedium, wie zuvor beschrieben, kultiviert. Sobald Parasiten im Blutausrich nachgewiesen werden konnten, wurden einige Aliquots für die Kryokonservierung vorbereitet und gDNS wurde zur Untersuchung des Integrationslokus mittels diagnostischer PCR isoliert. Wurden im Rahmen der diagnostischen PCR 5' und 3' Integration ohne zusätzliches Vorhandensein des wildtypischen Genlokus nachgewiesen,

so galt die Ausklonierung als erfolgreich und die klonale Zelllinie wurde für die phänotypische Charakterisierung weiterverwendet.

2.2.9. Aufzucht von *An. stephensi*-Moskitos

Für die Untersuchung der Mitteldarmstadien von *P. falciparum* wurden Moskitos der Spezies *An. stephensi* im Insektarium gezüchtet. Zunächst wurden Eier in 1 ‰ Salzlösung bei einem Raumklima von 28 °C und 80 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Larven schlüpften nach ca. zwei Tagen und verpuppten sich innerhalb von sechs bis acht Tagen. Benötigte Nährstoffe wurden täglich in Form von Trockenfutter für Katzen in die Salzlösung gegeben. Puppen wurden täglich mit einer Pipette eingesammelt, in ein kleines Glasschälchen mit Salzlösung überführt und in einen Moskitokäfig gestellt, wo die adulten Moskitostadien nach ca. zwei Tagen schlüpften. Die tägliche Fütterung der adulten Moskitos erfolgte über Wattetupfer, welche zuvor mit Zuckerlösung aus 5 % Saccharose (Sigma) und 0,05 % Para-Aminobenzoesäure (PABA; Sigma) getränkt und auf den Käfig gelegt wurden. Für die Produktion neuer Eier wurde Moskitoweibchen einmal wöchentlich eine Blutmahlzeit an einer nicht infizierten NMRI-Maus ermöglicht. Zu diesem Zweck wurde das Tier mit 0,01 ml/g Ketamin / Xylazin narkotisiert und für 20 min auf den Käfig gelegt. Die Eiablage erfolgte zwei bis drei Tage später in Salzlösung.

2.2.10. Gewinnung diverser *P. falciparum*-Mitteldarmstadien in Moskitos

Infektion von Moskitos mit *P. falciparum* („Standard membrane feeding assay“, SMFA)

Zur Gewinnung von *P. falciparum* Mitteldarmstadien mussten weibliche *An. stephensi*-Moskitos gezielt mit sexuellen Vorläuferstadien, den Gametozyten, infiziert werden. Drei bis fünf Tage alte Moskito-Weibchen (ca. 50 Stück), welche bis zum Vortag ihrer Verwendung mit einer Zuckerlösung aus 5 % Saccharose, 0,05 % PABA und 0,04 mg/ml Gentamycin gefüttert wurden [Beier *et al.*, 1994], wurden in einen speziell vorbereiteten Pappkontainer überführt. Die zu verfütternden Gametozyten wurden am selben Tag mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und durch Mischung mit frischem EK auf eine Parasitämie von 0,25 % in hitzeinaktiviertem A+-Serum gebracht. Es wurde darauf geachtet, dass die Temperatur der Zellsuspension konstant bei 37 °C blieb. Die Gametozytensuspension wurde in einen vorgewärmten Glas-„Feeder“ transferiert, dessen Boden dünn mit Parafilm bespannt war und auf den netzbespannten Deckel des Pappkontainers gelegt. Während der 20 min Blutmahlzeit wurde der Raum abgedunkelt und verlassen. Anschließend wurden die potenziell infizierten Moskitos im Pappkontainer in den S3**-Bereich des Insektariums verbracht und bei 26 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Moskitos wurden weiter mit 5 % iger Saccharose-Lösung inkl. 0,04 mg/ml Gentamycin gefüttert.

Sektion infizierter Moskitos und Transmission Assay

Für die phänotypische Charakterisierung der Mitteldarmstadien bzw. der Transmissionsfähigkeit verschiedener Parasitenlinien, wurden weibliche *An. stephensi* Moskitos zum selben Zeitpunkt mit der zu untersuchenden Zelllinie und dem entsprechenden WT-Kontrollstamm infiziert. Entsprechend dem zu untersuchenden Parasitenstadium wurden zu einem definierten Zeitpunkt 20 bis 30 Moskitos pro Infektion und Zelllinie seziiert und analysiert. Zur Untersuchung der Ookineten wurde 24 h nach Infektion kältebetäubten Moskitos der Mitteldarm entfernt und in 1xPBS durch Resuspendieren mechanisch zerstört. Die dabei freigesetzten Ookineten wurden mittels IFAs analysiert (**Kap. 2.2.11**). Für die Bewertung der Transmissionsfähigkeit einer Zelllinie im Rahmen eines Transmissions-Assays wurden acht Tage nach erfolgter Blutmahlzeit die Mitteldärme von je 20 Mücken pro Infektion und Zelllinie entfernt und 10 min mit 0,2 % Mercurochrom/PBS gefärbt. Die Anzahl an Oozysten wurde lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung bestimmt.

2.2.11. Indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA)

Für die Analyse der Proteinexpression und –lokalisierung in den verschiedenen Blutstadien von *P. falciparum* wurden die zu untersuchenden Proteine mit spezifischen Antiseren detektiert und indirekt durch einen sekundären Antikörper fluoreszenzmarkiert [modifiziertes Protokoll nach Child *et al.*, 2010]. Zunächst wurden die Felder von mit Teflon umrandeten Objektträgern mit entsprechendem Zellmaterial so beschichtet, dass sich eine einzelne Zellschicht auf dem Glas befand. Nach Lufttrocknung wurden die Präparate zur Fixierung mit einem Tropfen 4 % Formaldehyd/PBS beschichtet und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 125 mM Glyzin/0,1 % Triton-X-100/PBS für 20 min bei RT permeabilisiert bzw. freie reaktive Aldehyd-Gruppen blockiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindestellen folgte eine Inkubation für 1 h mit 3 % BSA/PBS bei RT. Zur Immunodetektion der zu untersuchenden Proteine und einer stadienspezifischen Gegenmarkierung wurden diese primären Antikörper mit Blockierlösung entsprechend verdünnt (**Tab. 2.9**) und als 20 µl-Tropfen auf das Präparat aufgetragen. Die Antikörperinkubation erfolgte für 2 h bei 37 °C. Nach zweimal 10 min Waschen der Präparate in 1xPBS wurden die Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper, verdünnt mit Blockierlösung, ebenfalls als Tropfen auf die Zellen aufgetragen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden abgedunkelt durchgeführt. Nach dreimal 10 min Waschen in 1xPBS wurde die Kernfärbung mit Hoechst 33342 ebenfalls am Tropfen für 2 min bei RT durchgeführt. Der Objektträger wurde durch Abklopfen von überschüssiger Färbelösung befreit, mit einem Reagenz zur Sicherung der Fluoreszenz (Citifluor) beschichtet und mit einem Deckgläschen blasenfrei abgedeckt. Die Ränder des Präparates wurden luftdicht mit Nagellack verschlossen. Die IFAs wurden bis zu ihrer Auswertung am

Fluoreszenzmikroskop dunkel bei 4 °C gelagert. Aufgenommene Bilder wurden mit Adobe® Photoshop CS5.1 bearbeitet.

2.2.12. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für die Untersuchung ultrastruktureller Veränderungen in fixierten Zellen eignet sich besonders die Transmissionselektronenmikroskopie. Hierfür werden die fixierten Zellen in ein festes Medium eingebettet und davon Ultradünnschnitte hergestellt. Anschließend werden die Schnitte mit elektronendichten Partikeln kontrastiert und anschließend mikroskopisch ausgewertet.

Einbettung von Zellmaterial in Epon

Pro EM-Probe wurden min. 2 ml einer Parasitenkultur mit einer Parasitämie $\geq 5\%$ verarbeitet. Zur Untersuchung des Gametozytenaustritts aus dem Wirtserthrozyten wurden einer reifen WT-Gametozytenkultur sowie einer Gametozytenkultur genetisch modifizierter Parasiten jeweils drei Proben entnommen. Eine der Proben wurde umgehend pelletiert (200 x g, 2 min), der Überstand entfernt und die Zellen zur Fixierung in 4 % Formaldehyd/1 % Glutaraldehyd in PBS resuspendiert und min. 1 h bei 4 °C inkubiert. Zwei Proben wurden mit 100 mM Xanthurensäure bei RT aktiviert und nach 7 bzw. 15 min fixiert. Vor der weiteren Verarbeitung wurden die Zellen zweimal mit PBS bei RT gewaschen (200 x g, 2 min). Zur Postfixierung und Kontrastierung der Proben wurden die Zellen in 200 μ l 1 % OsO_4 /1,5 % $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ /PBS resuspendiert und 2 h bei RT inkubiert. Nach zwei Waschschrritten mit ddH₂O wurden die Proben in 200 μ l 0,5 % Uranylacetat/ddH₂O für 30 min bei RT gefärbt. Nach zwei Waschschrritten mit ddH₂O wurden die Zellen mittels Ethanol vollständig entwässert. Hierfür wurden die Zellen nacheinander jeweils zweimal für 15 min in 200 μ l 70 %, 80 %, 95 % und 100 % Ethanol bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten zweimal 30 min Inkubation der Zellen in je 200 μ l Propylenoxid. Die entwässerten Zellen wurden dann für 1 h in einer 1:2 Mischung aus Epon und Propylenoxid bei RT inkubiert, pelletiert (300 x g, 2 min) und in 400 μ l Epon resuspendiert. Nach 16 h Inkubation bei RT wurden die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 5 min), das Epon ausgetauscht und die Probe 2 Tage bei 60 °C ausgehärtet.

Vorbereitung und Auswertung der Ultradünnschnitte für TEM

Die Proben der PPLP2(-)-Experimente wurden zur weiteren Bearbeitung zu Dr. Urska Repnik (Department of Biosciences, University of Oslo) gesendet. Proben der PPLP4(-)-Parasiten wurden in der Abteilung für Elektronenmikroskopie der Universität Würzburg vorbereitet. Die Ultradünnschnitte der Proben wurden mit einem Ultramikrotom (Leica Ultracut UCT) angefertigt und zur weiteren Färbung 30 min mit 1 % Uranylacetat sowie 15 s mit 0,2 % Bleicitrat inkubiert. Die optische Untersuchung der Schnitte für PPLP2(-) erfolgte

mit dem *CM100* Transmissionselektronenmikroskop (FEI). Die Bilder wurden digital mit einer *Quemesa TEM CCD* Kamera und *iTEM Software* (Olympus Soft Imaging Solutions) aufgenommen. Die optische Auswertung der PPLP4(-)-Präparate wurde mit einem *EM10* Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen) von Prof. Gabriele Pradel durchgeführt. Zur weiteren Bearbeitung des Bildmaterials wurde Adobe© Photoshop CS5.1 verwendet.

2.2.13. Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Bakterien

Für die Klonierung und Expression rekombinanter Proteine wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene *E. coli*-Stämme verwendet. Für die Amplifizierung von Plasmiden wurde der Transformationsstamm *E. coli* Top10 verwendet. Alle transformierten Plasmide vermitteln Ampizillin-Resistenz, weshalb die Transformanten in LB/Amp-Medium bzw. –Agar kultiviert wurden. Der verwendete Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus®-(DE3)-RIL besitzt ein zusätzliches Plasmid, welches mit Chloramphenicol selektiert wird. Daher wurden transfizierte *E. coli* BL21 in LB/Amp/CAM-Medium bzw. –Agar kultiviert. Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm („rounds per minute“) schüttelnd inkubiert, angeimpfte Nährböden wurden kopfüber im Brutschrank gelagert. Plattenkulturen wurden bis zu mehrere Wochen bei 4 °C gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden Aliquots einer Flüssigkultur mit 50 % sterilem Glycerin resuspendiert und bei -80 °C gelagert. Zur Wiederaufnahme der kryokonservierten Bakterienkultur wurde mit einer Impföse etwas Zellmaterial von der Oberfläche des Aliquots entfernt, in frisches Nährmedium überführt und wie beschrieben kultiviert.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Transformation hitzekompetenter Bakterien

Für die Klonierung und Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* wurde die Fähigkeit kompetenter Bakterien genutzt, Fremd-DNS in Form gentechnisch veränderter Plasmide aufzunehmen und zu amplifizieren bzw. plasmidkodierte Proteine zu exprimieren. Pro Transformationsansatz wurden 80 µl hitzekompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 50 ng Plasmidpräparation oder 2 µl Ligationsansatz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Durch Eintauchen des Transformationsansatzes für 30 s in ein 42 °C warmes Wasserbad wurde den Zellen ein Hitzeschock zugefügt. Nach 1 min Inkubation auf Eis, erfolgte die Zugabe von 200 µl SOC-Medium zum Reaktionsansatz. Die Zellen wurden 1 h bei 37 °C rollend regeneriert und anschließend auf Selektions-Agarplatten ausplattiert. Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht.

2.3.2. Isolation genomischer DNS (gDNS) aus *P. falciparum*

Für die gezielte Überprüfung von Genloci nach Transfektion von *P. falciparum* wurde regelmäßig gDNS aus Transfektanten isoliert. Außerdem wurde plasmodiale gDNS aus wildtypischen Parasiten als Matrize für Klonierungs-PCR verwendet. Zur gDNS-Gewinnung wurden Parasitenkulturen mit Parasitämie > 4 % pelletiert (800 x g, 2 min, RT), die Zellen in 5 ml 0,1 % Saponin/PBS resuspendiert und zur vollständigen Lyse der Erythrozyten 5 min inkubiert. Die freigesetzten Parasiten wurden pelletiert (1800 x g, 10 min, RT), in 200 µl PBS resuspendiert und die gDNS mit Hilfe des Kits *NucleoSpin® Blood* (Machery-Nagel), gemäß der Herstellerangaben, isoliert. Die finale Elution der Nucleinsäuren von der Säule erfolgte in 30 µl vorgewärmtem ddH₂O.

2.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren mittels UV-Spektroskopie

Um die Konzentration und Reinheit von Nucleinsäureisolaten zu bestimmen, wurden die Proben mit einem Photometer basierend auf der UV-Spektroskopie analysiert. In einer UV-Einmalküvette wurden 2 µl der Probe mit 68 µl ddH₂O gemischt und die Absorption der Mischung bei 260 nm im Photometer gemessen. Für die Festlegung des Nullpunkts der Messung wurde reines ddH₂O verwendet. Der Reinheitsgrad der Probe wird als Verhältnis E₂₆₀/E₂₈₀ angegeben. Laut Herstellerangaben liegt das Absorptionsoptimum für DNS bei ca. 1,8, für RNS bei ca. 2,0.

2.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur gezielten Vervielfältigung von Nucleotidsequenzen wurde die PCR verwendet. Bei dieser Reaktion wird durch eine sequentiell wiederholte Temperaturveränderung doppelsträngige Matrizen-DNS im Denaturierungsschritt einzelsträngig gemacht, in der Hybridisierungsphase binden spezifisch gewählte komplementäre Oligonucleotide an die DNS und im Verlängerungsschritt (Elongationsphase) verlängert das Enzym DNS-Polymerase ausgehend vom Oligonucleotid den komplementären Nucleotidstrang. Durch Wiederholung dieser einzelnen Schritte werden spezifische Nucleotidsequenzen exponentiell amplifiziert. Die Hybridisierungstemperatur wurde 3 °C unter der niedrigsten Schmelztemperatur der verwendeten Oligonucleotide gewählt. Die Dauer der Elongationsphase wurde abhängig von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz gewählt. Die drei Schritte der PCR wurden 25 bis 35 mal wiederholt. Für Kolonie-PCR, Integrations-PCR und RT-PCR wurde *GoTaq®-Polymerase* (Promega), für die initiale Amplifikation von Klonierungsfragmenten wurde *Phusion® Polymerase* (NEB) verwendet. Die jeweiligen Pipettierschemata sind in **Tab. 2.10** dargestellt. Jeweils verwendete Thermocycler-Programme sind in **Tab. 2.11** aufgeführt.

Tab. 2.10: Pipettierschemata für die jeweils verwendeten DNS-Polymerase-Reaktionen

Komponenten	GoTaq® DNA Polymerase		Phusion® DNA Polymerase	
	Stock Konz.	Volumina	Stock Konz.	Volumina
Reaktionspuffer	5 x (Green Go Taq® Reaction Buffer)	10 µl	5 x (Phusion® HF Buffer)	10 µl
MgCl ₂ -Lösung	25 mM	2 µl	in Puffer enthalten	
dNTPs	10 mM	1 µl	10 mM	1 µl
Oligonukleotid sense	10 pmol	2 µl	10 pmol	2,5 µl
Oligonukleotid antisense	10 pmol	2 µl	10 pmol	2,5 µl
gDNS/cDNS Matrize	100 ng/µl	1 µl	100 ng/µl	1 µl
Polymerase	5 u/µl	0,25 µl	5 u/µl	0,5 µl
MQ ddH ₂ O		31,75 µl		32,5 µl
Endvolumen		50 µl		50 µl

Konz. Konzentration; u Einheit (*unit*).

Tab. 2.11: Verwendete Thermocycler-Programmierung für PCR-Reaktionen.

	GoTaq® DNA Polymerase		Phusion® DNA Polymerase	
	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	98 °C	30 s
Phase 1 Denaturierung	95 °C	30 s	98 °C	10 s
Phase 2 Hybridisierung	Oligonukleotid abhängig	30 s	Oligonukleotid abhängig	30 s
Phase 3 Elongation	72 °C	1 min	72 °C/ 68 °C	1 min
Finale Elongation	72 °C	2 min	72 °C/ 68 °C	5 min
Lagerung	12 °C	∞	12 °C	∞
Zyklenanzahl	25-35		35	

min Minuten; s Sekunden; ∞ unendlich; Klammer kennzeichnet Zykluslänge.

2.3.5. Erzeugung rekombinanter Plasmide

Für die Herstellung genetisch modifizierter Parasiten, sowie für die Expression rekombinanter Proteine wurden im Rahmen dieser Arbeit rekombinante Plasmide generiert. Die spezifischen DNS-Fragmente, welche in das entsprechende Plasmidgerüst kloniert werden sollten, wurden unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (Tab. 2.6) in einer PCR-Reaktion amplifiziert (Kap. 2.3.4). Die Oligonukleotidsequenzen enthielten zusätzlich Restriktionsschnittstellen, welche für die Ligation der Fragmente in das Plasmid verwendet wurden, sowie ein Stopcodon im „antisense“-Oligonukleotid.

Reinigung von DNS-Fragmenten

Um unerwünschte Komponenten, wie etwa Salze und Enzyme aus einer vorangegangenen Reaktion, aus dem Nukleinsäureansatz zu entfernen, wurden die Ansätze jeweils nach PCR-Amplifikation und Restriktionsverdau mit dem Kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* nach Herstellerangaben gereinigt. Zur Reinigung von PCR-Reaktionen und restriktionsverdauter DNS-Fragmente wurde nach dem Protokoll „PCR Clean-up“, zur Reinigung restriktionsverdauter Plasmide nach dem Protokoll „Agarose Gel Clean-up“ vorgegangen. Die finale Elution der Nukleinsäuren erfolgte in 30 µl vorgewärmten ddH₂O.

Restriktionsverdau von DNS-Fragmenten und Plasmiden

Die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen basieren auf der restriktionsschnittstellenvermittelten Ligation des DNS-Fragments mit dem kompatiblen Plasmid. Zu diesem Zweck wurden das jeweilige PCR-Fragment sowie das Plasmid mit denselben Restriktionsenzymen nach dem in **Tab. 2.12** aufgeführten Pipettierschema geschnitten.

Tab. 2.12: Pipettierschema für den Restriktionsverdau von PCR-Fragment und Plasmid

Komponente	Plasmid-Verdau	Fragment-Verdau	Probe-Verdau
DNS	3-5 µg	3 µg	1-3 µg
10x Puffer	5 µl	5 µl	2 µl
10x BSA	5 µl	5 µl	2 µl
Restriktionsenzym 1	1,3 µl	1,3 µl	0,5 µl
Restriktionsenzym 2	1,3 µl	1,3 µl	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 20 µl

Für die Reaktion wurde ausschließlich gereinigte DNS verwendet und die Inkubation erfolgte für Plasmidverdau 3 bis 8 h, für PCR-Fragmente 1 bis 4 h bei 37 °C. Zur Inaktivierung der Enzyme wurde der Reaktionsansatz nach erfolgter Inkubation für 15 min auf 65 °C erhitzt. Der Restriktionsverdau wurde zusätzlich zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation von PCR-Fragment und Plasmid verwendet. Dieser Probe-Verdau (**Tab. 2.12**) wurde 1 bis 2 h bei 37 °C inkubiert und umgehend zur Analyse gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Ligation des PCR-Fragments mit dem Plasmid

Das Enzym *T4-DNA-Ligase* (NEB) katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'Hydroxyl- und 5'Phosphat-Gruppen zweier doppelsträngiger DNS-Fragmente. Zur Ermittlung des optimalen Mengenverhältnisses zwischen restriktionsgeschnittenem Plasmid und PCR-Fragment, wurde folgende Formel verwendet:

$$5 \times \frac{50 \text{ [ng Plasmid]} \times \text{Insertlänge[bp]}}{\text{Vektorlänge [bp]}} = \text{ng Insert}$$

Die Reaktion wurde gemäß **Tab. 2.13** angesetzt und 1 bis 3 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend direkt für die Transformation in *E. coli Top10* verwendet.

Tab. 2.13: Pipettierschema für Ligationsreaktion.

Komponente	Volumen
<i>T4 DNA Ligase</i> (NEB)	1 µl
10 x Puffer	2 µl
geschnittener Vektor 50 ng/µl	1 µl
geschnittenes PCR-Produkt	x µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Kolonie-PCR

Tab. 2.14: Pipettierschema für den PCR-Reaktionsmix

Komponenten	Stock Konz.	Volumina
Reaktions Puffer	5 x (<i>Green Go Taq® Reaction Buffer</i>)	5 µl
MgCl ₂ -Lösung	25 mM	1 µl
dNTPs	10 mM	0,5 µl
Fragmentspezifischer Oligonukleotid <i>sense</i>	10 pmol	1 µl
Fragmentspezifischer Oligonukleotid <i>antisense</i>	10 pmol	1 µl
Bakterien in ddH ₂ O [vorgelegt]		10 µl
GoTaq® DNA Polymerase	5 u/µl	0,12 µl
Milli-Q ddH ₂ O		6,38 µl
Endvolumen		25 µl

Konz. Konzentration; u Einheit (*unit*).

Nach der Transformation der Liganden in *E. coli Top10* und positivem Kolonienwachstum auf Selektionsagarplatte wurden Bakterienklone mittels diagnostischer PCR auf das Vorhandensein des vollständigen Vektorkonstrukts getestet. Hierfür wurde pro PCR-Reaktionsansatz eine einzelne Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt, auf einer frischen Agarplatte ausgestrichen (sog. „Masterplatte“) und in einem 0,2-µl-Reaktionsgefäß mit 10 µl ddH₂O resuspendiert. Als Negativkontrolle wurde 100 ng Plasmid-DNS ohne ligiertes Genfragment verwendet. Nach Zugabe des PCR-Reaktionsmixes, hergestellt nach dem in **Tab. 2.14** angegebenen Pipettierschema, wurden die Reaktionsansätze im „Thermocycler“ inkubiert (**Tab. 2.11**; *GoTaq® DNA Polymerase*) und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet. Für die auf das

gewünschte Genfragment positiv getesteten Bakterienklone wurden jeweils 5 ml Flüssigmedium von der „Masterplatte“ angeimpft und über Nacht kultiviert um die Vektor-DNS zu amplifizieren.

2.3.6. Sequenzierung

Zur Überprüfung der DNS-Sequenz rekombinanter Plasmide, sowie der Integrationsloci genetisch modifizierter Parasiten, wurden diese am Fraunhofer IME (Aachen) sequenziert. Rekombinante Plasmide wurden in *E. coli Top10* amplifiziert, aus einer 5 ml Flüssigkultur gereinigt und ca. 200 ng in den Sequenzieransatz gegeben. Für die Sequenzierung des Integrationslokus einer Transfektante wurde der 5' bzw. der 3' Bereich des Genlokus amplifiziert, das PCR-Fragment gereinigt und ca. 150 ng in den Sequenzieransatz gegeben. Der Sequenzieransatz wurde nach dem in **Tab. 2.15** dargestellten Pipettierschema angefertigt. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mit *Chromas*® und *CloneManager*®.

Tab. 2.15: Pipettierschema des Sequenzieransatzes

Komponente	Volumen
DNS (Plasmid 200 ng, PCR 150 ng)	x µl
Oligonukleotide 10 pmol	2 µl
ddH ₂ O	ad 30 µl

2.3.7. Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden Moleküle in einer Gelmatrix nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Dabei wird ein elektrisches Feld erzeugt, in welchem die kleinsten Moleküle am schnellsten die Gelmatrix durchlaufen.

Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNS- und RNS-Fragmenten wurden 1,2 % ige Agarosegele in TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Proben wurden mit 6 x DNS-Ladepuffer gemischt, 10 bis 20 µl auf das Gel aufgetragen und bei 0,5 bis 10 V/cm aufgetrennt. Als Größenstandard wurde je nach zu erwartender Fragmentlänge der Probe zusätzlich 5 µl *100 bp DNA ladder* bzw. *1 kb DNA ladder* (NEB) aufgetragen (**Abb. 2.1**). Auf Grund der negativen Ladung der Nukleinsäuren wandern diese nach Anlegen des elektrischen Felds zur Kathode. Die Auswertung des Bandenmusters erfolgte unter UV-Licht.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen aus Parasiten- und Bakterienlysaten bzw. aus Proteinaufreinigungen wurden 12 %ige Trenngele mit 5 %igen Sammelgelen verwendet. Zur

Denaturierung der Proteine und zur Vereinheitlichung der Ladung wurden die aufzutrennenden Proteinproben mit 5 x SDS-Probenpuffer vermischt und 10 min bei 90 °C gekocht. Die Proben wurden 5 min bei 2500 x g zentrifugiert und 10 bis 20 µl des Überstandes in eine Geltasche pipettiert. Als Größenstandard wurde jeweils 5 µl *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas) verwendet. Die negativ geladenen Proteine wurden zur Bildung einer gleichmäßigen Lauffront zunächst bei 80 V 15 min, anschließend bei 120 bis 140 V in SDS-Laufpuffer aufgetrennt. Zur Färbung der Proteine im Polyacrylamidgel wurde das Gel 3 x 10 min in ddH₂O gewaschen und dann 1 h in einer Coomassie-basierten Färbelösung (*GelCode® Blue Stain Reagent*; Pierce Biotechnology, Inc.) bei RT inkubiert. Zuletzt wurde das Gel nach Bedarf mit ddH₂O entfärbt.

2.3.8. Transkriptanalyse mittels Reverser-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Für die Transkriptionsanalyse einzelner Gene in bestimmten Stadien des plasmodialen Lebenszyklus wird die Methode der RT-PCR genutzt. Hierfür wird die Gesamt-RNS aus Parasiten eines bestimmten Stadiums isoliert und als Matrize für die Herstellung von cDNS mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase verwendet. Anschließend wird die so gewonnene cDNS für eine diagnostische PCR zum Nachweis stadienspezifischen Transkripts eingesetzt.

RNS-Isolation

Für die Gewinnung der Gesamt-RNS aus asexuellen Blutstadien von *P. falciparum* wurden synchronisierte Parasitenkulturen pelletiert, während Gametozyten über einen Percoll®-Gradienten aufgereinigt wurden (**Kap. 2.2.6**). Die pelletierten Zellen wurden im 20fachen Volumen Trizol® resuspendiert, 5 min bei 37 °C inkubiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Zur weiteren Verarbeitung wurde die Suspension bei 37 °C aufgetaut, das 0,2fache Trizolvolumen an Chloroform zugegeben und die Probe durch Schütteln gründlich gemischt. Nach 2 min Standzeit bei RT wurde das Lysat zur Phasentrennung zentrifugiert (1800 x g, 1h, 4 °C). Anschließend wurde, unter Vermeidung der Interphase, die wässrige Phase in ein steriles Gefäß überführt. Zur Präzipitation der Nukleinsäuren wurde die Probe mit dem 0,5fachen ihres eigenen Volumens an 100 %igem Isopropanol durch mehrfaches Invertieren gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das Präzipitat wurde durch 30 min Zentrifugation bei 21000 x g, 4 °C pelletiert und mit 0,5 ml kaltem 75 %igem Ethanol gewaschen (21000 x g, 5 min, 4 °C). Nach Lufttrocknung des Pellets wurde dieses bei 60 °C in 50 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Nukleinsäurekonzentration in der Probe wurde photometrisch bestimmt (**Kap. 2.3.3**).

Entfernung von genomischer DNS, Proteinen und Salzen aus RNS-Proben

Zur Entfernung möglicher gDNS-Kontaminationen in RNS-Proben wurde das „RNase free DNase Set“ verwendet. Der Reaktionsansatz wurde gemäß dem Pipettierschema in **Tab. 2.16** erstellt und 10 min bei RT inkubiert. Zur Entfernung von Salzen, Proteinen und Enzymen wurde die Probe anschließend mit 250 µl DEPC-H₂O, 150 µl Chloroform und 150 µl Phenol gründlich vermischt. Nach 2 min Standzeit bei RT wurde das Gemisch zur Phasentrennung 10 min bei 4000 x g, 4 °C abzentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde in ein frisches 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation der RNS mit 30 µl 3 M NaAc und 1 ml Ethanol gemischt. Die Probe wurde min. 1 h bei -20 °C inkubiert und anschließend das Präzipitat 30 min bei 21000 x g, 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 1 ml kaltem 75 %igem Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und bei 60 °C in 50 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Konzentration und Qualität des RNS-Isolats wurde zum einen photometrisch bestimmt, zum anderen wurde 1 µl der RNS-Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Das Vorhandensein einer deutlichen Doppelbande bei 1,9 bzw. 4,5 kb zeigte die erfolgreiche Reinigung von RNS an.

Tab. 2.16: Pipettierschema für das „RNase free DNase Set“ zur Entfernung von gDNS aus RNS-Proben.

Komponente	Volumen
Gesamt-RNS-Isolat (max 5 µg)	x µl
RDD-Puffer	10 µl
DNase I	2,5 µl
DEPC-H ₂ O	aa 100 µl

cDNS-Synthese

Bei der Herstellung der cDNS wurde die zuvor isolierte Gesamt-RNS als Matrize verwendet. Als Negativ-Kontrolle wurde pro Isolat eine Probe mitgeführt, welche nicht mit dem Enzym „Reverse Transkriptase“ versetzt wurde (-RT). Pro Ansatz wurden bis zu 5 µg RNS verwendet und unter Verwendung unspezifischer kurzer Oligonukleotide („Random Hexamers“) durch die *SuperScript™III*-Reversen Transkriptase in cDNS umgewandelt. Die Ansätze wurden nach dem Pipettierschema in **Tab. 2.17** hergestellt. Nach 5 min Inkubation bei 65 °C wurde die Reaktion min. 1 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden pro Reaktionsansatz 5 µl des RT-Mixes zugegeben (**Tab. 2.18**), vorsichtig gemischt und kurz abzentrifugiert. Für die (-)-RT-Kontrolle wurde anstelle des Enzyms das gleiche Volumen an DEPC-H₂O zugegeben. Die Reaktion wurde 5 min bei 25 °C, 1 h bei 50 °C und zur Terminierung der Enzymreaktion 15 min bei 70 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurde jeweils 1 µl RNase H zugegeben und 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Endkonzentration wurde zur Orientierung anhand der eingesetzten Menge RNS berechnet. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNS bei -20 °C gelagert.

Tab. 2.17: Pipettierschema für den cDNS-Synthese-Mix.

Komponente	Probe [Volumen]
RNS, max. 5 µg	max. 11 µl
“Random hexamers”	1 µl
10mM dNTP-Mix	1 µl
DEPC-H ₂ O	aa 13 µl

Tab. 2.18: Pipettierschema für den RT-Mix.

Komponente	Probe [Volumen]	(-)-RT-Kontrolle [Volumen]
5x SuperScript™ III RT Puffer	4 µl	4 µl
0,1 M DTT	1 µl	1 µl
Protector RNase Inhibitor	1 µl	1 µl
SuperScript™ III Reverse Transkriptase	1 µl	-
DEPC-H ₂ O	-	1 µl

Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Zum Nachweis von Genexpression auf RNS-Ebene, wird aus Gesamt-RNS hergestellte cDNS als Matrize für eine diagnostische PCR (**Kap. 2.3.4**) verwendet. Zum Abschätzen der cDNS-Konzentration in den einzelnen Proben wurde zunächst eine PCR-Reaktion zum Nachweis des Haushaltsgens *pfaldolase* durchgeführt. In die PCR-Reaktion wurde jeweils 1 µl einer cDNS-Probe eingesetzt. Das Bandenmuster der gelelektrophoretisch analysierten PCR-Amplifikate wurde fotografiert und mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Adobe® Photoshop CS5.1 wurde die Intensität der einzelnen Banden gemessen. Die relative Intensität der Banden wurde verwendet um das jeweils einzusetzende Probenvolumen zu berechnen. Die PCR-Reaktion wurde nach dem in **Tab. 2.19** angegebenen Pipettierschema angesetzt und nach dem in **Tab. 2.20** angegebenen Thermocycler-Programm inkubiert.

Tab. 2.19: Pipettierschema des RT-PCR-Reaktionsmix.

Komponenten	Stock Konz.	Volumina [µl]
<i>Green Go Taq</i> ® Reaktions Puffer	5 x	5
MgCl ₂ -Lösung	25 mM	1,5
dNTPs	10 mM	0,5
Fragmentspezifisches Oligonukleotid <i>sense</i>	10 pmol	1
Fragmentspezifisches Oligonukleotid <i>antisense</i>	10 pmol	1
cDNS (ca. 125 ng)		x
GoTaq ® DNA Polymerase	5 u/µl	0,25
MQ ddH ₂ O		aa 25

Konz. Konzentration; u Einheit (*unit*).

Tab. 2.20: Verwendetes Thermocycler-Programm für RT-PCR-Reaktion.

	GoTaq® DNA Polymerase	
	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Phase 1 Denaturierung	95 °C	30 s
Phase 2 Hybridisierung	45 °C	20 s
Phase 3 Elongation	72 °C	45 s
Finale Elongation	72 °C	1 min
Lagerung	12 °C	∞
Zyklenanzahl	25	

min Minuten; s Sekunden; ∞ unendlich; Klammer kennzeichnet Zykluslänge.

Für alle RT-PCR-Reaktionen wurden dieselbe Hybridisierungstemperatur und dasselbe Thermocyclerprogramm verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide sind in **Tab. 2.7** aufgeführt. Zum Ausschluss einer Kontamination der cDNS-Proben mit gDNS wurde dasselbe Volumen der (-)-RT-Kontrolle in einer RT-PCR-Reaktion eingesetzt wie von der dazugehörigen cDNS-Probe. In diesem Ansatz und in jeweils einem cDNS-positiven RT-PCR-Ansatz als Ladekontrolle wurden die Oligonukleotide zum Nachweis von *pfaldolase* verwendet. Zum Ausschluss einer Kontamination der cDNS aus asexuellen Blutstadien mit cDNS der Gametozytenstadien wurde Transkript des sexualstadienspezifisch transkribierten Gens *pfccp2* amplifiziert. Zum Ausschluss einer Kontamination des Sexualstadientranskripts mit Transkript aus asexuellen Stadien wurden die cDNS-Proben auf das Vorhandensein von *pfama1*-Transkripts hin untersucht. Die Auswertung der RT-PCR erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (**Kap. 2.3.7**).

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden rekombinante Proteine als Antigene zur Antikörperproduktion hergestellt. Als Expressionssystem wurde *E. coli* verwendet und um eine Isolation des Zielproteins aus dem Bakterienlysat zu ermöglichen, wurden die rekombinanten Proteine mit dem N-terminalen MBP exprimiert. Mittels dieses Affinitäts-„Tags“ wurde das Zielprotein via Affinitäts-Chromatografie aus dem Lysat gereinigt.

Miniexpression

Nach erfolgreicher Klonierung des rekombinanten pIH902-Expressionsvektors (**Kap. 2.3.5**) und dessen Transformation in den *E. coli* Expressionsstamm BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL (**Kap. 2.3.1**) wurden einzelne Bakterienklone im kleinen Maßstab auf die Expression des rekombinanten Proteins hin untersucht. Hierfür wurde pro Bakterienklon eine Vorkultur in 5 ml LB/Amp/Cam-Flüssigmedium über Nacht bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Am Folgetag wurden jeweils zwei Ansätze pro Klon, bestehend aus 5 ml LB/Amp/Cam-Flüssigmedium mit

250 µl Vorkultur, angesetzt und bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 wurde in jeweils einem der beiden Ansätze durch Zugabe von 0,75 mM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) die Überexpression des rekombinanten Proteins induziert. Nach 5 h Inkubation der Bakterienkulturen wurden pro Ansatz 100 µl Probe entnommen, die Zellen pelletiert und in 20 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Proben via SDS-PAGE (**Kap. 2.3.7**), durch direkten Vergleich des Proteinmusters der nicht induzierten und induzierten Kulturen, analysiert.

Maxiexpression und Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen

Im Rahmen der Miniexpression positiv auf Überexpression des rekombinanten Proteins getestete Bakterienklone wurden für die Proteinexpression im großen Maßstab verwendet. Hierfür wurden 50 ml Vorkultur in LB/Amp/Cam-Flüssigmedium über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 2 l LB/Amp/Cam-Flüssigmedium, jeweils 500 ml pro 2 l-Erlenmeyerkolben, im Verhältnis 1:40 mit der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 wurden die Kulturen auf 16 °C abgekühlt und durch Zugabe von 0,75 mM IPTG induziert. Nach 5-10 h Inkubation bei 16 °C und 180 rpm wurden die Zellen bei 4 °C und x g 10 min zentrifugiert, das Zellpellet einmal mit kaltem PBS gewaschen und in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung der MBP-Fusionsproteine erfolgte, mit Modifikationen, wie in Williamson *et al.* (1995) beschrieben. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung des Überstands, wurde das Zellpellet gewogen, die Zellen pro Gramm Zellmaterial in 3 ml Lysepuffer mit *cOmplete*® *EDTA-free* Proteaseinhibitorcocktail und 0,27 mg/ml Lysozym vollständig resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Zur Unterstützung des Lysevorgangs, sowie zur Zerstörung der freigesetzten DNS wurde das Lysat einer Ultraschallbehandlung unterzogen (50 % Intensität, 50 % Betriebszyklus, 2 x 2 min). Anschließend wurden pro ml Lysat 6 µl MgCl₂ (1 M) sowie 0,08 g NaCl zugefügt und 1 h rollend bei 4 °C inkubiert. Das Zelllysate wurde im nächsten Schritt abzentrifugiert (18000 x g, 1,5 h, 4 °C) und der Überstand in ein frisches 50-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 2 ml, nach Herstellerangaben gewaschenen, Amylosekügelchen gemischt. Das Volumen wurde mit TE-Puffer auf 50 ml eingestellt und die Suspension über Nacht bei 4 °C rollend inkubiert um den Fusionsproteinen eine Bindung an die Amylose zu ermöglichen. Am folgenden Tag wurden die Amylosekügelchen bei 200 x g 5 min pelletiert und zweimal mit jeweils 40 ml Säulen-Waschpuffer gewaschen. Für die Elution der Proteine von den Amylosekügelchen wurden diese mit 10 ml Elutionspuffer 30 min bei 4 °C rollend inkubiert und anschließend pelletiert. Der Überstand enthielt die Fusionsproteine und wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zwei weitere Elutionsschritte mit jeweils 5 bzw. 3 ml Elutionspuffer folgten. Der Erfolg der

Proteinaufreinigung wurde durch eine SDS-PAGE überprüft. Die Amylosekügelchen wurden nach Herstellerangaben recycelt und max. fünfmal wiederverwendet.

2.4.2. Proteinkonzentrationsbestimmung via Bradford-Assay

Die Bestimmung des Proteingehalts in wässrigen Lösungen erfolgte mittels Bradford-Assay. Dabei wird der Proteinlösung Coomassie Brilliant Blue Farbstoff zugegeben, dessen Adsorptionsspektrum sich durch die Bindung an Proteine von 470 zu 595 nm verschiebt. Im Rahmen des Assays wird eine Standardgerade mit einer BSA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen erstellt und die Absorption bei 595 nm gemessen. Die so ermittelte Geradengleichung wird zur Berechnung der unbekanntenen Proteinkonzentration einer Probe verwendet. Zur Erstellung einer solchen Standardreihe wurden in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte jeweils 0, 2, 4, 6, 10, 15 und 20 µl einer BSA-Lösung (100 µg/ml) vorgelegt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Von der zu untersuchenden Proteinlösung wurde jeweils eine 1:10 und 1:100 Verdünnung hergestellt und ebenfalls in die Mikrotiterplatte pipettiert. Alle Ansätze wurden als Triplikat angesetzt. Zu den Proteinlösungen wurde jeweils 180 µl Bradford-Reagenz zugegeben und durch leichtes Rütteln der Platte vermischt. Die Absorption der Ansätze bei 595 nm wurde umgehend im Plattenleser *Tecan*® *Reader* gemessen und die Geradengleichung der Standardgerade mit Hilfe von *Microsoft*® *Excel 2010* ermittelt.

2.4.3. Gewinnung polyklonaler Immunsereen aus Mäusen

Für die Charakterisierung des Expressionsmusters von Proteinen mit antikörperbasierten Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit polyklonale Antiseren gegen PPLP1-5 hergestellt. Die Antiseren wurden in Mäusen generiert.

Pufferaustausch und Aufkonzentration von Proteinlösungen

Als vorbereitende Maßnahme für die Immunisierung von Mäusen mit rekombinantem Protein aus eigener Herstellung, wurde bei den proteinhaltigen Elutionsfraktionen (**Kap. 2.4.1**) mittels *Amicon*® Zentrifugal Filtereinheiten ein Pufferaustausch vorgenommen sowie das Gesamtvolumen eingeengt. Hierfür wurden die erste und zweite Elutionsfraktion in der Filtereinheit zentrifugiert (2000 x g, ca. 30 min, 4 °C) und der Durchfluss sicherheitshalber bis zur Auswertung der Proben durch SDS-PAGE bei -20 °C aufbewahrt. Die Filtermembran wurde dreimal mit je 10 ml 5 % Glycerin/PBS gewaschen. Die an die Membran gebundenen Proteine wurden zuletzt durch wiederholtes Spülen der Membran mit ca. 1 ml 5 % Glycerin/PBS wieder abgelöst und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentration und Reinheit der Proteinlösung wurde durch SDS-PAGE (**Kap. 2.3.7**) und Bradford-Assay (**Kap. 2.4.2**) bestimmt.

Immunisierung und Immunsерumgewinnung bei Mäusen

Die für diese Arbeit hergestellten polyklonalen Immunsereen wurden in weiblichen NMRI-Mäusen produziert. Pro Konstrukt wurden zwei bis vier Wochen alte Mäuse subcutan oder intraperitoneal mit 100 µg Protein in 150 bis 200 µl *Freund's Incomplete Adjuvant* immunisiert. Nach vier Wochen erfolgte eine zweite Immunisierung der Tiere mit 60 µg Protein in *Freund's Incomplete Adjuvant*. Etwa zehn Tage nach der zweiten Immunisierung wurden die Tiere durch die Verabreichung von 150 µl Narkose-Lösung pro Maus betäubt, das Blut durch Herzpunktion entnommen und in einem Serumröhrchen 30 min bei RT inkubiert. Den Tieren wurde nach erfolgter Blutentnahme die Halswirbelsäule durchtrennt. Nach der Inkubationszeit wurden die geronnenen Blutbestandteile 15 min bei 800 x g pelletiert und der flüssige Bestandteil, das Immunsерum, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.4.4. Quantifizierung der Hämoglobinfreisetzung während Exflagellation

Zur Bestimmung der während des Zellaustritts von Gametozyten freigesetzten Menge an EZ im Überstand wurde der Hämoglobingehalt im Medium bestimmt. Für exflagellationsfähige WT NF54 und PPLP2(-)-Gametozytenkulturen wurde mittels Neubauer Zählkammer die Gametozytämie bestimmt. Daraus wurde ermittelt, welches Kulturvolumen 2×10^5 Gametozyten enthielt. Für den Assay wurde das errechnete Volumen an Zellsuspension jeweils als Triplikat aliquotiert und zweimal mit A+-Medium gewaschen. Die Zellen wurden zuletzt in 100 µl Medium aufgenommen und in eine Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurden die Gametozyten durch Zugabe von 100 µM XA bei RT aktiviert. Die Platte wurde 45 min nach Aktivierung der Gametozyten bei 150 x g zentrifugiert und jeweils 60 µl Überstand pro Probe in eine frische Mikrotiterplatte überführt. Die optische Dichte der einzelnen Ansätze wurde bei OD_{405} im Plattenleser gemessen. Als Negativkontrolle wurde der Überstand nicht aktivierter Gametozyten verwendet und als 0 % festgelegt. Zur Festlegung der 100 % Lyse wurde dasselbe Volumen an Gametozytenkultur nach Zentrifugation in 0,1 % Saponin/PBS komplett lysiert. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft® Excel 2010.

3. Ergebnisse

3.1. Expressionsanalyse von PPLP1-5 in den intraerythrozytären Stadien von *P. falciparum*

Die Transkription der fünf bekannten plasmodialen Gene mit konservierter MACPF-Domäne, *pplp1-5*, wurde via semiquantitativer RT-PCR untersucht (**Abb. 3.1**). Gesamt-RNS aus Trophozoiten, Schizonten und unreifen (Stadium II – IV) sowie reifen Gametozyten (Stadium V) wurde isoliert und in cDNS umgeschrieben. Jeweils 100 µg cDNS wurden als Matrize in einer diagnostischen PCR verwendet um genspezifisches Transkript nachzuweisen.

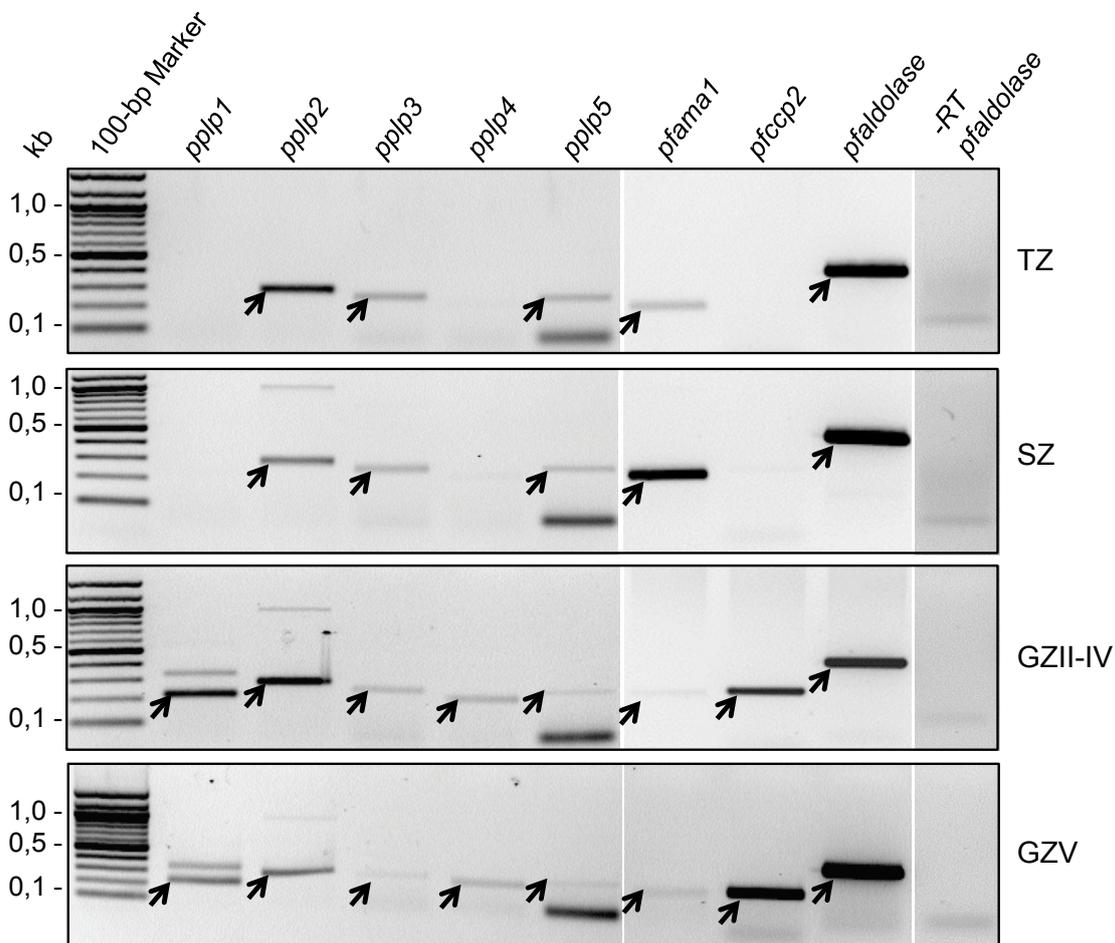


Abb. 3.1 Transkriptanalyse für *pplp1-5* in den Blutstadien von *P. falciparum* mittels RT-PCR. Stadienspezifische cDNS aus Trophozoiten (TZ), Schizonten (SZ), unreifen (GZII-IV) und reifen Gametozyten (GZV) wurde auf die Transkription von *pplp1-5* (*pplp1*: 227 bp; *pplp2*: 281 bp; *pplp3*: 217 bp; *pplp4*: 206 bp; *pplp5*: 227 bp) mittels diagnostischer PCR untersucht. Transkript von *pfama1* wurde zum Nachweis asexueller Gentranskripte verwendet (180 bp), *pfccp2* zum Nachweis sexualstadienspezifischer Gentranskripte (187 bp). Transkriptanalyse von *pfaldolase* wurde als Ladekontrolle verwendet (378 bp). Zum Ausschluss einer Matrizenkontamination mit gDNS wurden cDNS-Ansätze ohne Zugabe des Enzyms reverse Transkriptase inkubiert (-RT). Diese Proben wurden in der diagnostischen PCR auf vorhandenes *pfaldolase*-Transkript hin untersucht. Die abgebildeten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Transkript von *pplp1* wurde in unreifen und reifen Gametozyten nachgewiesen. Dabei wurde zusätzlich ein etwa 350 bp großes Fragment amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide flankieren eine gDNS-Sequenz, welche ein Intron enthält. Da die gDNS-Kontrolle der RT-PCR in allen Experimenten negativ war, ist eine Amplifikation der entsprechenden genomischen *pplp1*-Sequenz unwahrscheinlich. Dies könnte ein Hinweis auf alternatives Spleißen der *pplp1*-mRNS sein.

Transkription von *pplp2* wurde sowohl in Trophozoiten und Schizonten, als auch in unreifen und reifen Gametozyten nachgewiesen. In reifen Gametozyten wurde das Gen jedoch geringer exprimiert als in unreifen Gametozyten. Da der *pplp2*-Genlokus über keine bekannten Intronsequenzen verfügt, ist ein zusätzlich amplifiziertes Genfragment von etwa 1 kb in den RT-PCR-Ansätzen für Schizonten und Gametozyten nicht näher definierbar.

Transkript von *pplp3* wurde in allen untersuchten Parasitenstadien amplifiziert. Das nachgewiesene Expressionslevel war insgesamt gering, wobei es in reifen Gametozyten am schwächsten ausfiel. *Pplp4*-Transkript wurde in geringem Maße in Trophozoiten und Schizonten, stärker in Gametozyten aller Stadien amplifiziert. Der Nachweis einer geringen *pplp5*-Transkription gelang in allen untersuchten Stadien. Die stärkste Expression wurde in Trophozoiten und Schizonten nachgewiesen. Zusätzlich zum amplifizierten *pplp5*-Transkript wurde auch ein PCR-Fragment von deutlich weniger als 100 bp Größe amplifiziert. Dies ist auf die Bildung von Oligonukleotid-Dimere zurückzuführen.

Amplifikation des für die asexuellen Blutstadien spezifischen *pfama1*-Transkripts („apical membrane protein 1“, apikales Membranprotein 1) [Peterson *et al.*, 1989] und des Gametozyten-spezifischen *pfccp2*-Transkripts („LCCL-domain protein 2“) [Pradel *et al.*, 2004] dienten zur Überprüfung der Stadienspezifität der verwendeten cDNS-Proben. Während *pfccp2* erwartungsgemäß ausschließlich in Gametozyten nachgewiesen wurde, wurde *pfama1* zusätzlich zu den asexuellen Blutstadien auch in einer sehr geringen Konzentration in den untersuchten Gametozytenstadien amplifiziert. Dies ist am wahrscheinlichsten auf eine technisch bedingte geringe Verunreinigung des RNS-Isolats aus Gametozyten mit RNS aus Schizonten zurückzuführen. Transkriptanalyse für *pfaldolase*, welches das in den Blutstadien konstitutiv exprimierte Enzym Fructose-bisphosphat-Aldolase [Knapp *et al.*, 1990] kodiert, wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Fructose-bisphosphat-Aldolase ist essentieller Bestandteil der Glykolyse und somit der Energiegewinnung. Matrizenkucleinsäure, welche ohne Zugabe des Enzyms reverse Transkriptase hergestellt wurde (-RT), wurde auf *pfaldolase*-Transkript hin untersucht und diente zum Ausschluss einer möglichen Kontamination mit gDNS. Die sogenannte -RT-Kontrolle fiel für alle Proben negativ aus.

Zur Analyse der Proteinexpression in *P. falciparum* Blutstadien wurden Immunsereen gegen PPLP1-5 in Mäusen hergestellt. Zur Immunisierung verwendete rekombinante Proteine (RP)

wurden als MBP-Fusionsproteine in *E. coli* als heterologes Expressionssystem hergestellt (**Abb. 3.2**). Hierfür verwendete Proteinregionen umfassten für die jeweiligen RP1-Varianten einen großen Teil der konservierten MACPF-Domäne. PPLP2RP2 umfasste das C-terminale Ende der MACPF-Domäne, sowie den Hauptteil des C-Terminus. Das rekombinante Peptid PPLP4RP2 umfasste den überwiegenden Teil des nicht konservierten C-Terminus. Die jeweiligen Fusionsproteine wurden via Affinitätschromatografie aus Bakterienlysat gereinigt (**Abb. 3.3**) und nach erfolgreicher Aufkonzentrierung zur Immunisierung der Mäuse verwendet.

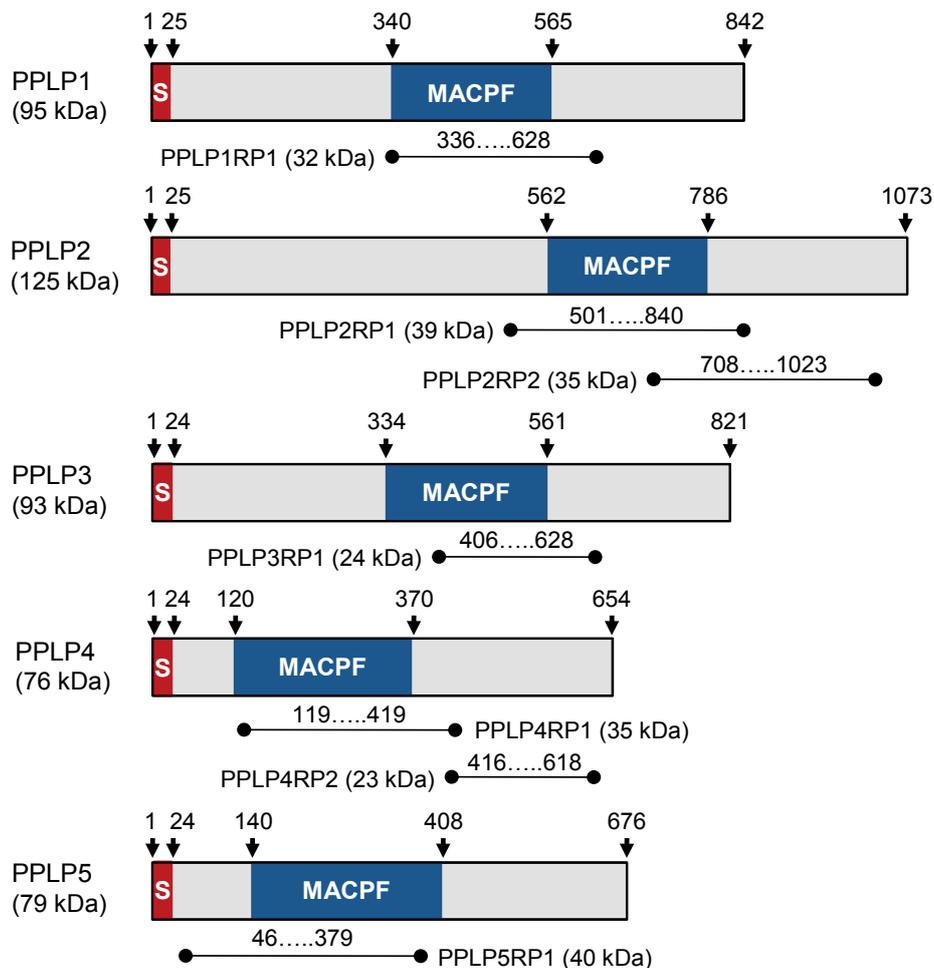


Abb. 3.2 Domänenstruktur von *P. falciparum* PPLP1-5. Signalpeptid (S; rote Box) und MACPF-Domäne (blaue Box) sind dargestellt. Die unterstrichenen Regionen beschreiben die entsprechenden Regionen der rekombinanten Proteine. Pfeile geben die Koordinaten in der Aminosäuresequenz an.

Gewonnene Immunseren detektierten im Rahmen von IFAs die jeweiligen Zielproteine in den plasmodialen Zellaustrittsstadien, den Schizonten und den aktivierten Gametozyten (**Abb. 3.4A**). In späten Schizonten wurde Expression aller PPLPs detektiert, wobei PPLP3 lediglich eine schwach ausgeprägte Markierung zeigte. Die Lokalisation der Proteine war für alle Proteine intrazellulär und in vesikelartigen Strukturen. Mehrere für PPLP1/2/4 und PPLP5 positive vesikelartige Strukturen konnten außerdem in Gametozyten 10 min nach

Aktivierung nachgewiesen werden. PPLP2-positive Vesikel wiesen in diesen Stadien eine periphere Verteilung auf.

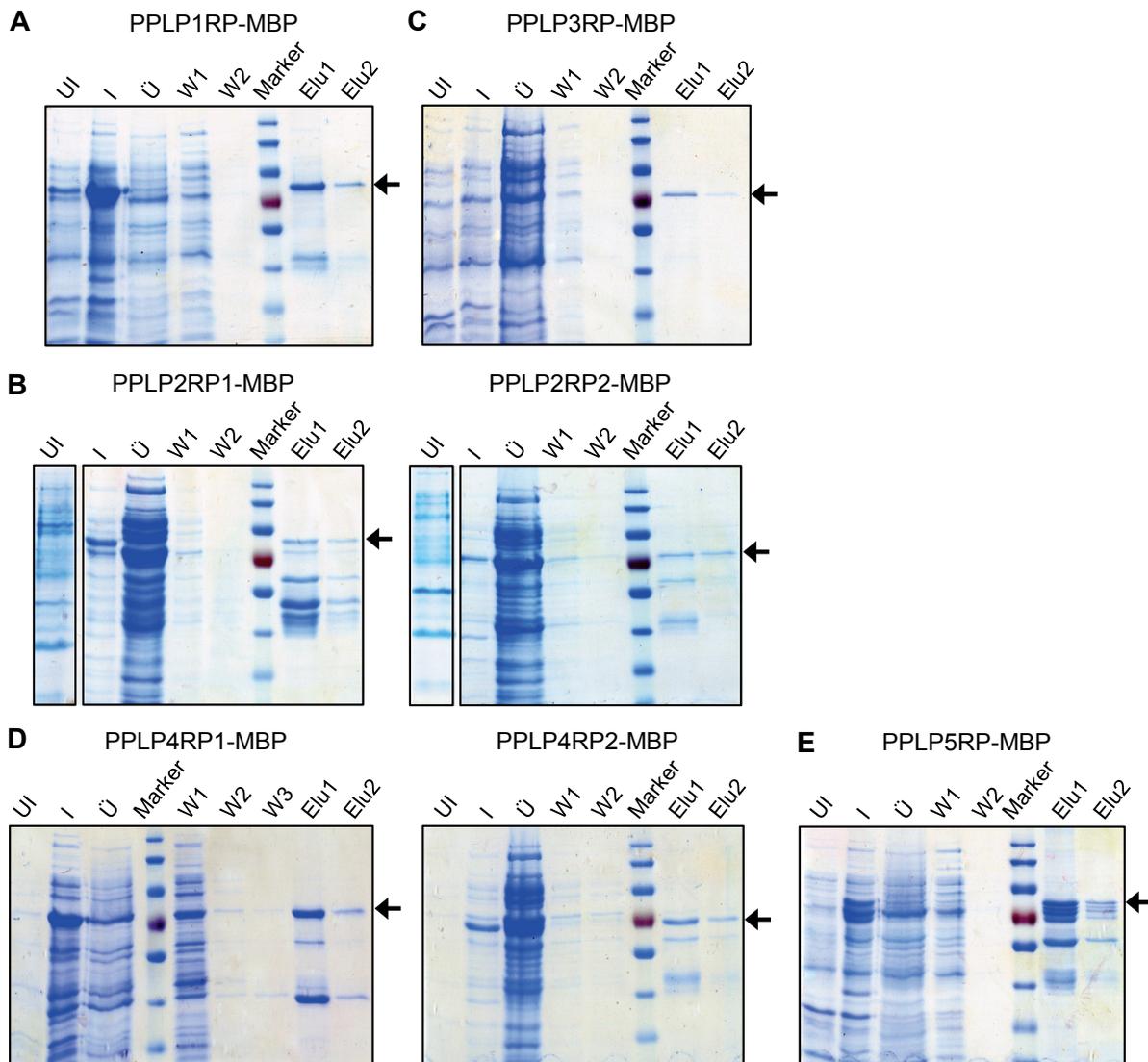


Abb. 3.3 Expression rekombinanter MBP-Fusionsproteine für PPLP1-5. SDS-PAGE der Überexpression mit anschließender Aufreinigung von **A** PPLP1RP-MBP (34 kDa+43 kDa), **B** PPLP2RP1-MBP (39 kDa+43 kDa) und PPLP2RP2-MBP (35 kDa+43 kDa), **C** PPLP3RP-MBP (27 kDa+43 kDa), **D** PPLP4RP1-MBP (35 kDa+43 kDa) und PPLP4RP2-MBP (23 kDa+43 kDa) und **E** PPLP5RP-MBP (42 kDa+43 kDa) in *E. coli*. Gezeigt werden jeweils eine Probe der nicht induzierten (UI) und induzierten (I) Expressionskultur, des Lysatüberstands (Ü), des ersten und zweiten Waschschrittes (W1, W2) und der beiden Eluate (Elu1, Elu2). Pfeile markieren die erwartete Laufhöhe der rekombinanten Proteine.

PPLP3 zeigte in IFAs von aktivierten Gametozyten keine Markierung. Zur stadienspezifischen Markierung der Parasiten wurde bei Schizonten MSP1 („merozoite surface protein 1“, Merozoiten Oberflächenprotein 1) [Hall *et al.*, 1984] markiert. Bei aktivierten Gametozyten wurde zur Hervorhebung dieser Parasitenstadien Pfs230 markiert, ein sekretiertes Oberflächenprotein männlicher und weiblicher Gametozyten [zusammengefasst in Williamson, 2003]. Zum Ausschluss unspezifischer Antikörperbindungen wurden Schizonten und reife Gametozyten in IFAs anstelle eines

Primärantikörpers mit Serum nicht immunisierter Mäuse bzw. Immunsereum gegen MBP inkubiert (**Abb. 3.4B**). Diese Negativkontrollen zeigten keine Markierung.

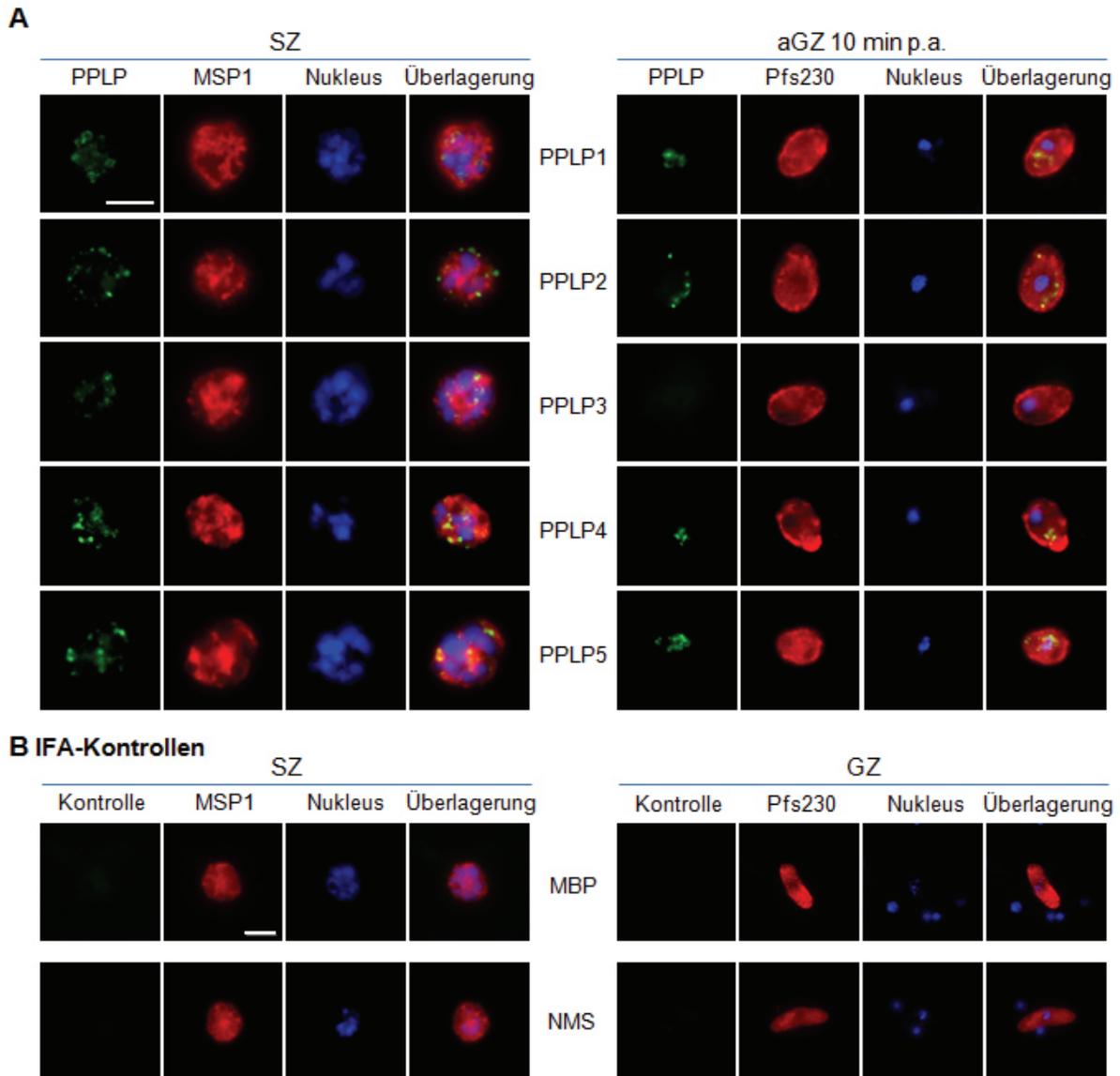


Abb. 3.4 Expressionsanalyse von PPLP1-5 in den Zellaustrittsstadien von *P. falciparum* mittels IFA. **A** Inkubation reifer Schizonten (SZ) und 10 min aktivierter Gametozyten (aGZ 10 min p.a.) mit Antiseren gegen PPLP1-5 (grün) aus Maus. SZ wurden mit Antiserum gegen MSP1, aGZ mit Antiserum gegen Pfs230 aus Kaninchen (rot) visualisiert. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342 (blau). Der Maßstab beträgt 5 µm. **B** Serum nicht immunisierter Mäuse (NMS; grün) wurde als Negativkontrolle für IFAs von SZ und Gametozyten (GZ) verwendet. Antiserum gegen MBP aus Maus wurde als Negativkontrolle verwendet, um eine unspezifische Markierung der Parasiten durch Antiseren, welche gegen MBP-Fusionsproteine gerichtet sind, auszuschließen. SZ wurden durch Inkubation mit Antiserum gegen MSP1 aus Kaninchen, GZ mit Antiserum gegen Pfs230 aus Kaninchen (beides rot) stadienspezifisch markiert. Zellkerne wurden durch Hoechst 33342 angefärbt (blau). Der Maßstab beträgt 5 µm.

3.2. Charakterisierung von PPLP2

3.2.1. Proteinexpressionsstudie zu PPLP2

Expressionsstudien zu PPLP2 wurden via IFAs in Trophozoiten und Schizonten (**Abb. 3.5A**) und in aktivierten Gametozyten durchgeführt (**Abb. 3.5B**) [Wirth *et al.*, 2014]. Zur Detektion von PPLP2 wurde polyklonales Antiserum gegen PPLP2RP1, generiert in Maus, verwendet. Die Expression von PPLP2 konnte ab dem Trophozoitenstadium nachgewiesen werden und lag intrazellulär in vesikelartigen Strukturen vor. Mehrere PPLP2-positive Vesikel wurden auch in späten Schizonten detektiert. Die asexuellen Blutstadien wurden durch Markierung des Oberflächenproteins MSP1 hervorgehoben. Auch in reifen Gametozyten konnte PPLP2-Expression gezeigt werden. Dort lag das Protein ebenfalls in vesikelartigen Strukturen vor (**Abb. 3.5B**). Diese Strukturen lagen, mit Ausnahme der Kernregion, relativ gleichmäßig im Zytoplasma der Gametozyten verteilt vor. Nach *in-vitro*-Aktivierung der Gametozyten und somit nach Einleitung der Gametogenese relokalisieren diese Vesikel innerhalb von zwei Minuten in die Peripherie des Parasiten, insbesondere nahe der PPM. Zehn Minuten nach Aktivierung hatte sich die Anzahl an PPLP2-positiven Strukturen deutlich reduziert. Nach 15 Minuten und somit nach Austritt des Gametozyten aus der Wirtszellmembran, konnte PPLP2 hingegen nicht mehr detektiert werden. Gametozyten und Gameten wurden durch immunhistologische Detektion des geschlechtsunspezifischen Oberflächenproteins Pfs230 markiert.

Als nächstes wurde untersucht, ob PPLP2 in den osmiophilen Körperchen der Gametozyten vorliegt (**Abb. 3.5C**) [Wirth *et al.*, 2014]. Für dieses Experiment wurde eine transgene *P. falciparum*-Zelllinie verwendet, welcher das Protein Pfg377 fehlt, ein für osmiophile Körperchen spezifisches Protein. Pfg377-defiziente (Pfg377(-)) Makrogametozyten zeigen eine stark reduzierte Anzahl an osmiophilen Körperchen und galten bis vor kurzem als unfähig zum Austritt aus der Wirtszelle [de Koning-Ward *et al.*, 2008]. In IFAs wurde in Pfg377(-)-Gametozyten eine PPLP2-Markierung vergleichbar mit der in WT-Gametozyten beobachtet. Pfg377(-)-Gametozyten wurden durch Immunodetektion von Pfs230 stadienspezifisch markiert. Als Kontrolle ist in **Abb. 3.5C** ein weiblicher Pfs25-positiver WT-Gametozyt dargestellt, welcher ebenfalls positiv für PPLP2 markiert wurde. Pfs25 ist ein Sexualstadienprotein, welches geschlechtsspezifisch in weiblichen Gametozyten intrazellulär vorliegt und während der Gametogenese an die Parasitenoberfläche verlagert wird [zusammengefasst in Pradel, 2007].

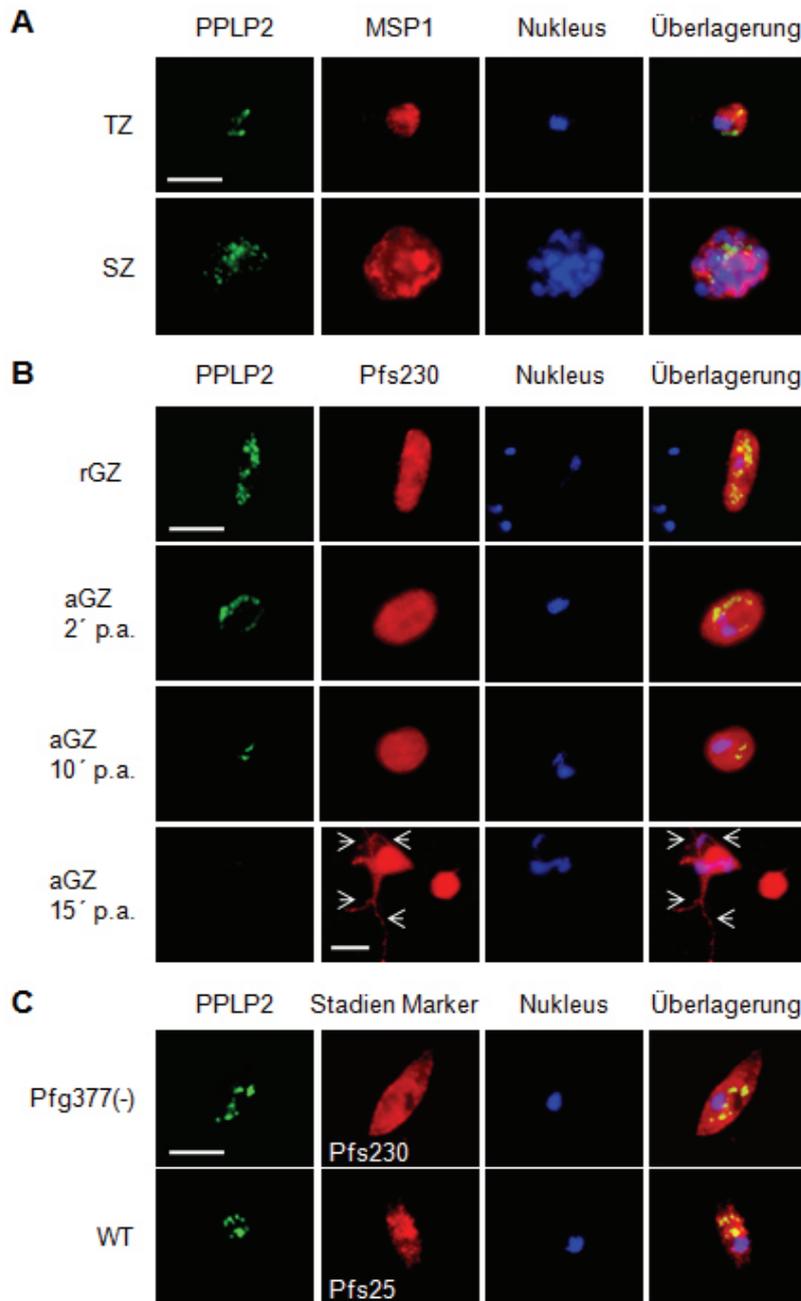


Abb. 3.5 PPLP2 wird in asexuellen Blutstadien und Gametozyten exprimiert [modifiziert nach Wirth *et al.*, 2014]. **A** Trophozoiten (TZ) und Schizonten (SZ) wurden mit Antiserum gegen PPLP2RP1 aus Maus inkubiert (grün). Die asexuellen Blutstadien wurden mit Antiserum gegen MSP1 visualisiert (rot). Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt (blau). **B** Reife Gametozyten (rGZ) und Gametozyten 2/10/15 min nach ihrer Aktivierung (aGZ 2'/10'/15' p.a.) wurden mit Antiserum gegen PPLP2RP1 aus Maus inkubiert (grün). Gametozyten wurden mit Antiserum gegen Pfs230 aus Kaninchen sichtbar gemacht (rot). Nuklei wurden mit Hoechst 33342 gefärbt (blau). Pfeile markieren Mikrogameten. **C** Die Immundetektion erfolgte wie in B. Pfg377(-) Gametozyten wurden mit Antiserum gegen Pfs230 aus Kaninchen markiert, weibliche WT-Gametozyten mit Antiserum gegen Pfs25 aus Kaninchen (rot). A-C zeigen PPLP2-Detektion mit Antiserum gegen PPLP2RP1, ein vergleichbares Muster wurde auch mit Antiserum gegen PPLP2RP2 beobachtet. Ergebnisse aus A-C sind repräsentativ für drei bis fünf unabhängige Experimente. Der Maßstab entspricht 5 µm.

Wie zuvor in Garg *et al.* (2013) berichtet, wird PPLP1 in Abhängigkeit von der intrazellulären Calciumkonzentration aus dem Schizonten freigesetzt. Diese Freisetzung von PPLP1 konnte durch Zugabe des intrazellulären Calcium-Komplexbildners BAPTA-AM inhibiert werden. In diesem Kontext wurde bereits gezeigt, dass BAPTA-AM die Ruptur der EM beim Austritt aktivierter Gametozyten aus der Wirtszelle blockiert [Sologub *et al.*, 2011]. Dementsprechend wurde untersucht, ob BAPTA-AM einen Einfluss auf die Freisetzung von PPLP2 nach Aktivierung der Gametozyten hat. Reife Gametozyten wurden während ihrer Aktivierung mit BAPTA-AM inkubiert und die Lokalisation der PPLP2-positiven vesikulären Strukturen zwischen 0–20 min nach erfolgter Aktivierung mittels IFAs untersucht (**Abb. 3.6**). Im Gegensatz zu unbehandelten Gametozyten verblieben die PPLP2-positiven Strukturen in

der gesamten beobachteten Zeitspanne innerhalb des Parasiten. Sie wiesen dementsprechend während der Aktivierungsphase keine Relokalisation in die Peripherie auf.

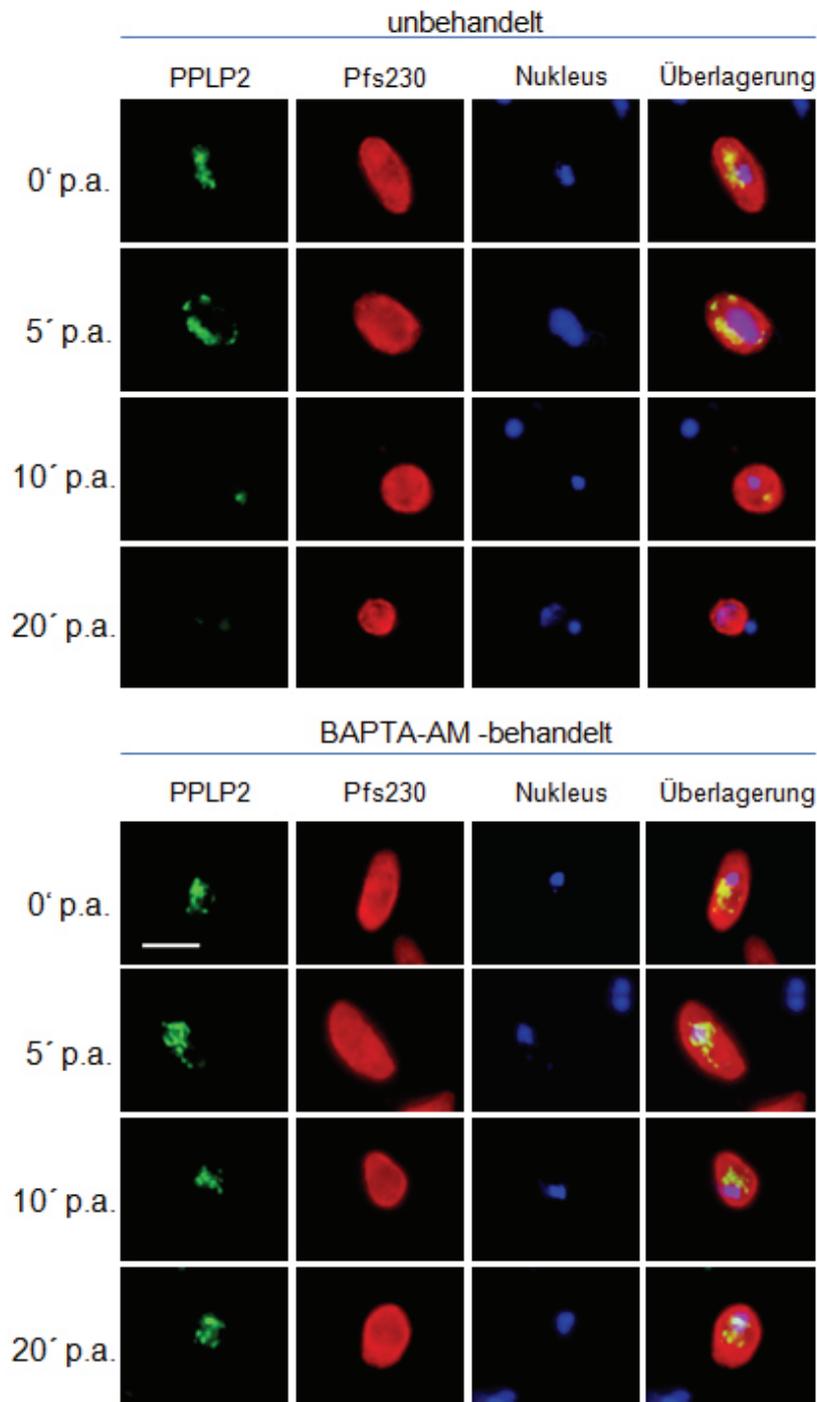


Abb. 3.6 Relokalisation PPLP2-positiver Vesikel in die Peripherie von aktivierten Gametozyten wird durch deren Behandlung mit BAPTA-AM inhibiert [modifiziert nach Wirth *et al.*, 2014]. Unbehandelte und mit BAPTA-AM behandelte Gametozyten, jeweils 0/5/10/20 min nach ihrer Aktivierung ('p.a.) wurden mit Antiserum gegen PPLP2RP1 aus Maus (grün) markiert. Für die stadienspezifische Markierung der Gametozyten wurde Antiserum gegen Pfs230 aus Kaninchen (rot) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33324 markiert. Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Der Maßstab entspricht 5 µm.

3.2.2. Funktionale Charakterisierung von PPLP2 mittels Gen-„Knockout“

Zur funktionalen Charakterisierung von PPLP2 wurde eine PPLP2-defiziente (PPLP2(-)) Zelllinie generiert [Wirth *et al.*, 2014]. Der *pplp2*-Genlocus wurde innerhalb der MACPF-Domäne via homologer Rekombination durch Einzelstrangüberlagerung („single cross-over“) mit dem pCAM-BSD-Plasmid unterbrochen (**Abb. 3.7A**).

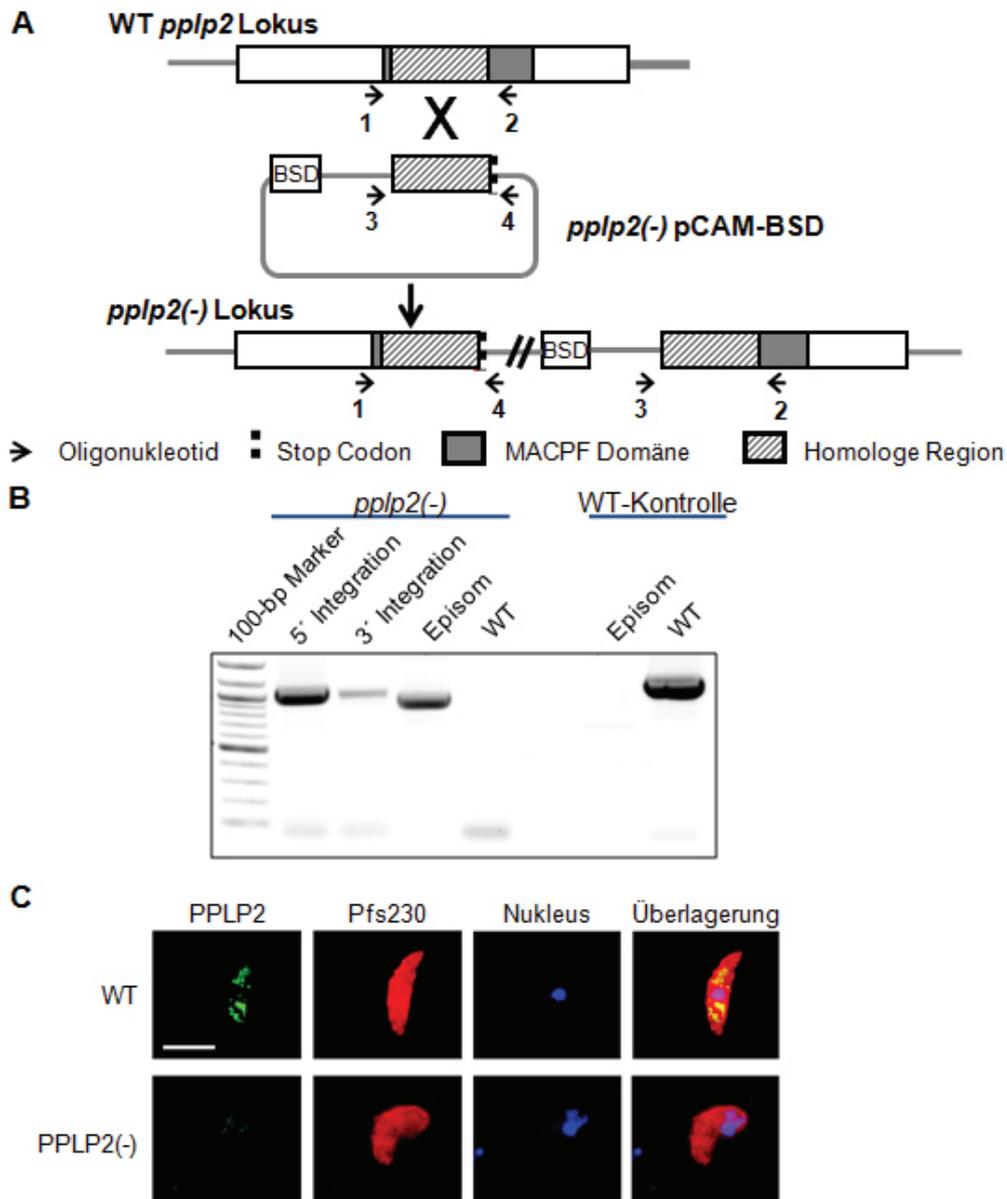


Abb. 3.7 Herstellung einer PPLP2(-)-Parasiten-Zelllinie [modifiziert nach Wirth *et al.*, 2014]. **A** Schema der Versuchsstrategie zur „Single-crossover“ homologen Rekombination. Nummerierte Pfeile markieren die Position der Oligonukleotide, welche zur Bestätigung einer Integration des Vektors *pplp2*(-)-pCAM-BSD verwendet wurden. **B** Nachweis der Plasmidintegration in das Parasiten-Genom durch diagnostische PCR. Amplifikation spezifischer PCR-Fragmente für Oligonukleotide 1 und 4 (1085 bp; siehe A) sowie 2 und 3 (1039 bp) zeigen eine 5'- bzw. 3'- Integration von *pplp2*-pCAM-BSD in den WT Genlocus. Des Weiteren zeigt die Amplifikation mit Oligonukleotiden 3 und 4 (870 bp) das Vorhandensein episomalen Plasmids an, während mit 1 und 2 (1154 bp) der WT-*pplp2*-Genlocus nachgewiesen wird. Ergebnisse sind repräsentativ für fünf unabhängige Experimente. **C** Inkubation von WT- und PPLP2(-)-Gametozyten mit Antiserum gegen PPLP2R2P2 aus Maus (grün). Die Gametozyten wurden mit Antiserum gegen Pfs230 aus Kaninchen markiert (rot), Zellkerne wurden mit Hoechst 33324 angefärbt. Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Der Maßstab beträgt 5 μ m.

Die Unterbrechung des WT-*pplp2*-Genlokus und die Abwesenheit des wildtypischen *pplp2*-Genlokus wurden durch eine diagnostische PCR verifiziert (**Abb. 3.7B**). Als Negativkontrolle wurde gDNS der parentalen WT NF54-Zelllinie als Matrize in der PCR verwendet. Die in der PCR gewonnenen DNS-Fragmente vom 5'- bzw. 3'-Ende des *pplp2*-Integrationslokus wurden zusätzlich sequenziert und *in silico* abgeglichen (**Abb. A1A**). Der Abgleich zeigte die Integration des *pplp2*(-)-pCAM-BSD-Vektorkonstrukts in die entsprechende homologe Region des WT-*pplp2*-Lokus. Die fehlende Expression von PPLP2 in Gametozyten der PPLP2(-)-Zelllinie im Gegensatz zu WT-Parasiten wurde via IFA mit anti-PPLP2RP2 Antiserum demonstriert (**Abb. 3.7C**).

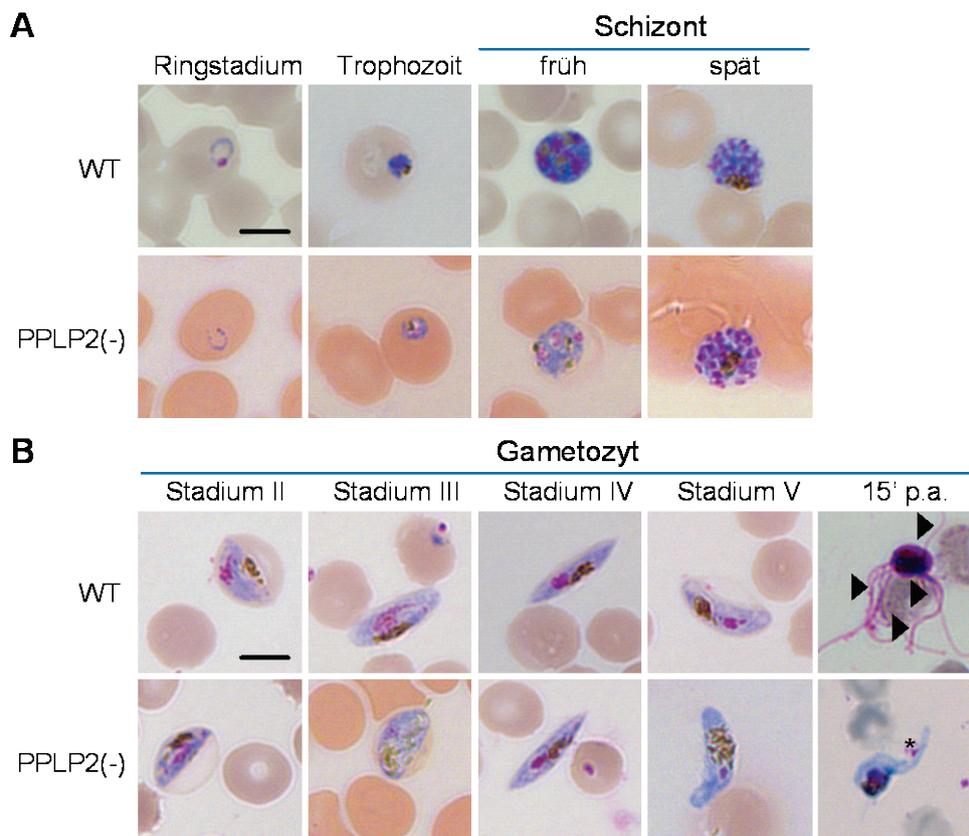


Abb. 3.8 Morphologie der asexuellen und sexuellen Blutstadien von PPLP2(-)-Parasiten [modifiziert nach Wirth *et al.*, 2014]. **A** Mit Giemsa gefärbte Blutaussstriche von Ringstadien, Trophozoiten und frühen sowie späten Schizonten wurden mittels Hellfeldmikroskopie analysiert und mit WT-Parasiten verglichen. **B** Mit Giemsa gefärbte Blutaussstriche von Gametozyten der Stadien II bis V sowie von Exflagellationszentren 15 min nach Aktivierung (15' p.a.) wurden lichtmikroskopisch analysiert und mit WT-Parasiten verglichen. Pfeile kennzeichnen einzelne Mikrogameten, Sterne kennzeichnen Superflagellen. Der Maßstab beträgt 5 μ m.

Der morphologische Vergleich der PPLP2(-)-Blutstadien mit den Parasiten der parentalen WT-Zelllinie wurde an Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen vorgenommen (**Abb. 3.8A**) [Wirth *et al.*, 2014]. Die asexuellen Ringstadien, Trophozoiten sowie frühe und späte Schizonten der beiden Zelllinien wiesen keinerlei Unterschiede zueinander auf. Beim Vergleich der verschiedenen Gametozyten-Entwicklungsstadien (Stadien II-V) wurden ebenfalls keine Unterschiede zwischen Mutante und WT-Parasiten festgestellt. Nach Aktivierung reifer

Gametozyten wurde bei PPLP2(-)-Parasiten das Fehlen typischer Exflagellationszentren festgestellt. Während bei Exflagellationszentren des WT der Residualkörper mit den noch anhaftenden flagellenartigen Mikrogameten deutlich identifizierbar war, bildeten männliche PPLP2(-)-Gametozyten eine oder zwei dicke zytoplasmatische Ausstülpungen (**Abb. 3.8B**). Diese Missbildungen wurden bereits als „Superflagellen“ beschrieben [Deligianni *et al.*, 2013].

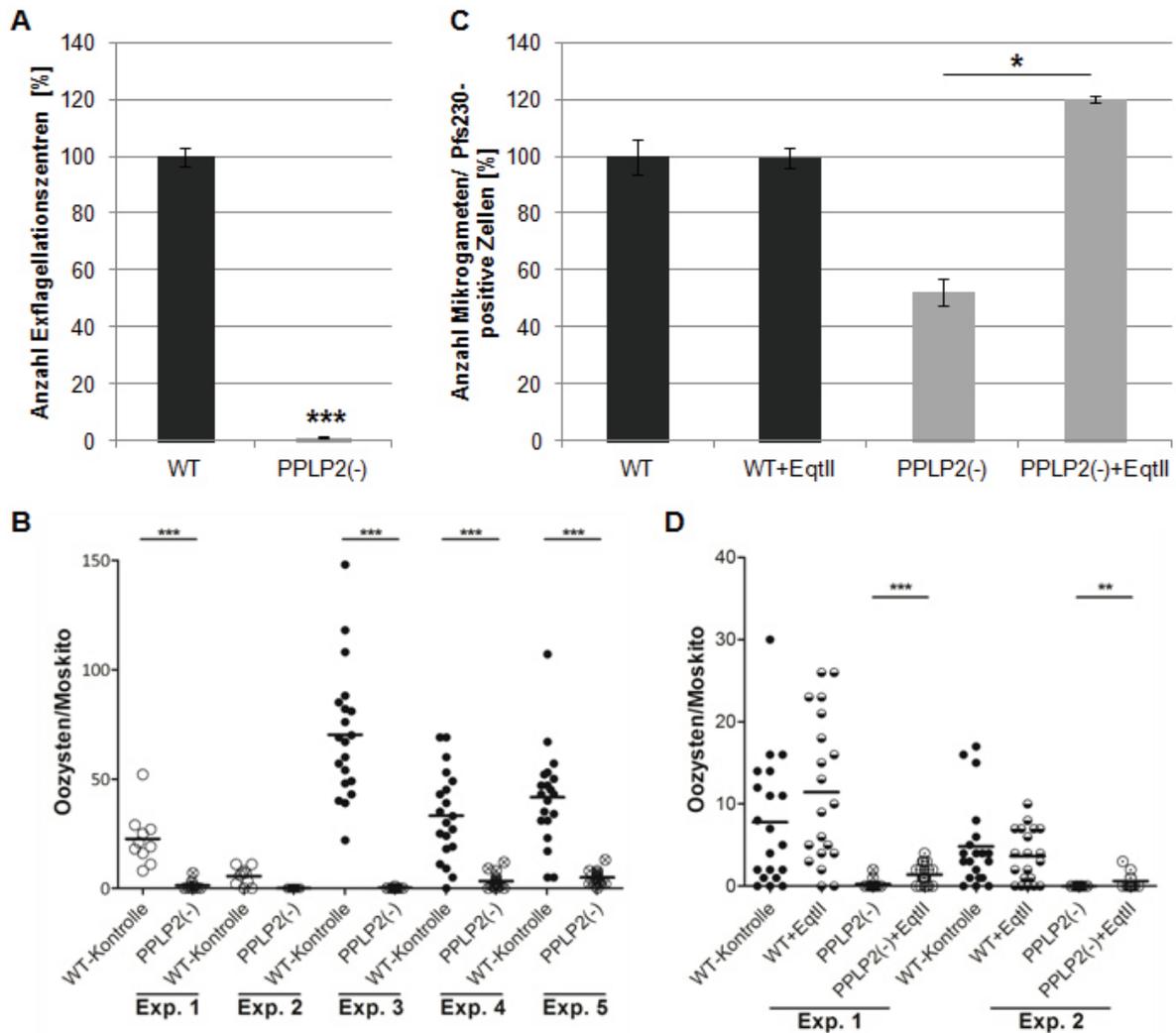


Abb. 3.9 PPLP2(-)-Parasiten sind in ihrer Übertragung auf den Mückenvektor blockiert, Behandlung mit EquinotoxinII (EqtII) hebt diesen Effekt jedoch auf [modifiziert nach Wirth *et al.*, 2014]. **A** Exflagellationsassay mit WT- und PPLP2(-)-Gametozyten. Die Anzahl an Exflagellationszentren 15 min nach Aktivierung reifer PPLP2(-)-Gametozyten ist prozentual im Bezug zum WT dargestellt (Mittelwert \pm SEM). $***p \leq 0,001$ (Mann-Whitney Test, $N = 3$). **B** Vergleichender Transmissionsassay mit WT- und PPLP2(-)-Gametozyten. Die Anzahl an PPLP2(-)-Oozysten pro Mitteldarm wurde acht Tage nach der Blutmahlzeit mit der WT-Kontrolle verglichen. $***p \leq 0,001$ (Mann-Whitney Test, $N = 10-20$). **C** Die Anzahl von Mikrogameten 15 min nach Aktivierung reifer Gametozyten wurde für EqtII-behandelte PPLP2(-)-Parasiten, DMSO-behandelte PPLP2(-)-Parasiten und EqtII-behandelte WT-Parasiten prozentual in Relation zur unbehandelten WT-Kontrolle gesetzt. Die Auszählung wurde mittels IFA durchgeführt. Parasiten wurden mit Antiserum gegen Pfs230 aus Kaninchen markiert und der prozentuale Anteil von Mikrogameten aus allen Pfs230-positiven Parasiten bestimmt (Mittelwert \pm SEM). $*p \leq 0,1$ (Mann-Whitney Test, $N = 3$). **D** Transmissionsassay mit EqtII-behandelten Gametozyten. Die Anzahl an Oozysten von EqtII-behandelten PPLP2(-)- bzw. WT-Parasiten pro Mitteldarm wurde acht Tage nach der Blutmahlzeit mit der jeweiligen unbehandelten Parasitenkontrolle verglichen. $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$ (Mann-Whitney Test, $N = 20$).

Die Exflagellationsfähigkeit der PPLP2(-)-Mikrogametozyten wurde via Exflagellationsassays quantifiziert (**Abb. 3.9A**). Die Exflagellationsfähigkeit von aktivierten PPLP2(-)-Gametozyten 15 min nach ihrer Aktivierung war in Relation zu aktivierten WT-Mikrogametozyten um 98,9 % reduziert ($***p \leq 0,001$; Mann-Whitney Test). Dies führte im Rahmen von SMFAs zu einer signifikanten Reduktion der Infektion von *An. stephensi*-Weibchen durch PPLP2(-)-Gametozyten. PPLP2(-)-Gametozyten wurden an weibliche *An. stephensi*-Moskitos in fünf unabhängigen Experimenten verfüttert (**Abb. 3.9B**; SMFAs wurden freundlicherweise von Dr. Matthias Scheuermayer durchgeführt). Die Anzahl der PPLP2(-)-Oozysten, welche 10-12 Tage nach Fütterung an der Darmaußenseite identifiziert werden konnten, wurde mit der Anzahl an Oozysten in WT-Kontroll-Fütterungen verglichen. Alle SMFAs mit PPLP2(-)-Gametozyten zeigten eine Reduktion der Oozystenanzahl um 87 bis 100 % mit $***p \leq 0,001$ (Mann-Whitney Test) [modifiziert nach Wirth *et al.*, 2014].

Ultrastrukturelle Eigenschaften von PPLP2(-)-Gametozyten vor und nach *in-vitro*-Aktivierung wurden mittels TEM untersucht [Wirth *et al.*, 2014]. Hierfür wurden PPLP2(-)- und WT-Gametozyten 0/7/15 min nach ihrer Aktivierung fixiert und analysiert (**Abb. 3.10**; Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. Urska Repnik gemacht und zur Verfügung gestellt). Die Auswertung ergab, dass nicht aktivierte WT-Gametozyten von drei Membranen umgeben waren, der EM, der PVM und der PPM. Direkt unterhalb der PPM befand sich der IMC, bestehend aus einer dicken Doppelmembran. Bei WT-Gametozyten fehlte bereits 7 min nach ihrer Aktivierung die PVM und der IMC war nicht mehr durchgehend vorhanden. Die umgebende EM wurde ungefähr 15 min nach erfolgter Aktivierung der Gametozyten zerstört (**Abb. 3.10A** linke Spalte). Diese Beobachtungen stimmen mit früheren Berichten über den sequentiellen Austritt der Gametozyten aus dem Erythrozyten überein [Sologub *et al.*, 2011]. Reife PPLP2(-)-Gametozyten wiesen vor ihrer Aktivierung eine mit WT-Parasiten vergleichbare Ultrastruktur auf, auch hinsichtlich der drei sie umgebenden Membranschichten und des IMC (**Abb. 3.10A** rechte Spalte). Ebenfalls nennenswert ist die Beobachtung optisch unauffälliger osmiophiler Körperchen in PPLP2(-)-Gametozyten. Bei Gametozyten 7 min nach ihrer Aktivierung war die PVM rupturiert und Fragmente der PVM sowie der PVM entstammende Membranstapel wurden regelmäßig gesichtet. Anders als bei WT-Gametozyten zu diesem Zeitpunkt war das EZ bei PPLP2(-)-Gametozyten noch vorhanden. Während WT-Gametozyten 15 min nach ihrer Aktivierung bereits vollständig aus dem Wirtserythrozyten ausgetreten waren, blieben die PPLP2(-)-Parasiten innerhalb des optisch intakten Erythrozyten gefangen (**Abb. 3.10A** rechte Spalte).

Ähnlich wie in WT-Gametozyten lag der IMC in aktivierten PPLP2(-)-Gametozyten in seiner Auflösung begriffen vor und Axoneme von Mikrogameten wurden regelmäßig gesichtet. Der Arrest aktivierter PPLP2(-)-Gametozyten innerhalb der EM wurde bei Parasiten beider Geschlechter beobachtet (Makrogametozyt: **Abb. 3.10B**; Mikrogametozyt: **Abb. 3.10C**). In

einigen Fällen wurden in TEM-Proben aktivierter PPLP2(-)-Mikrogametozyten Superflagellen gesichtet (**Abb. 3.10C**). Diese bestanden aus einem Bündel Axoneme, welche sowohl von PPM, als auch von EM umgeben waren. EZ war zwischen den umgebenden Membranen der Superflagellen ebenfalls vorhanden.

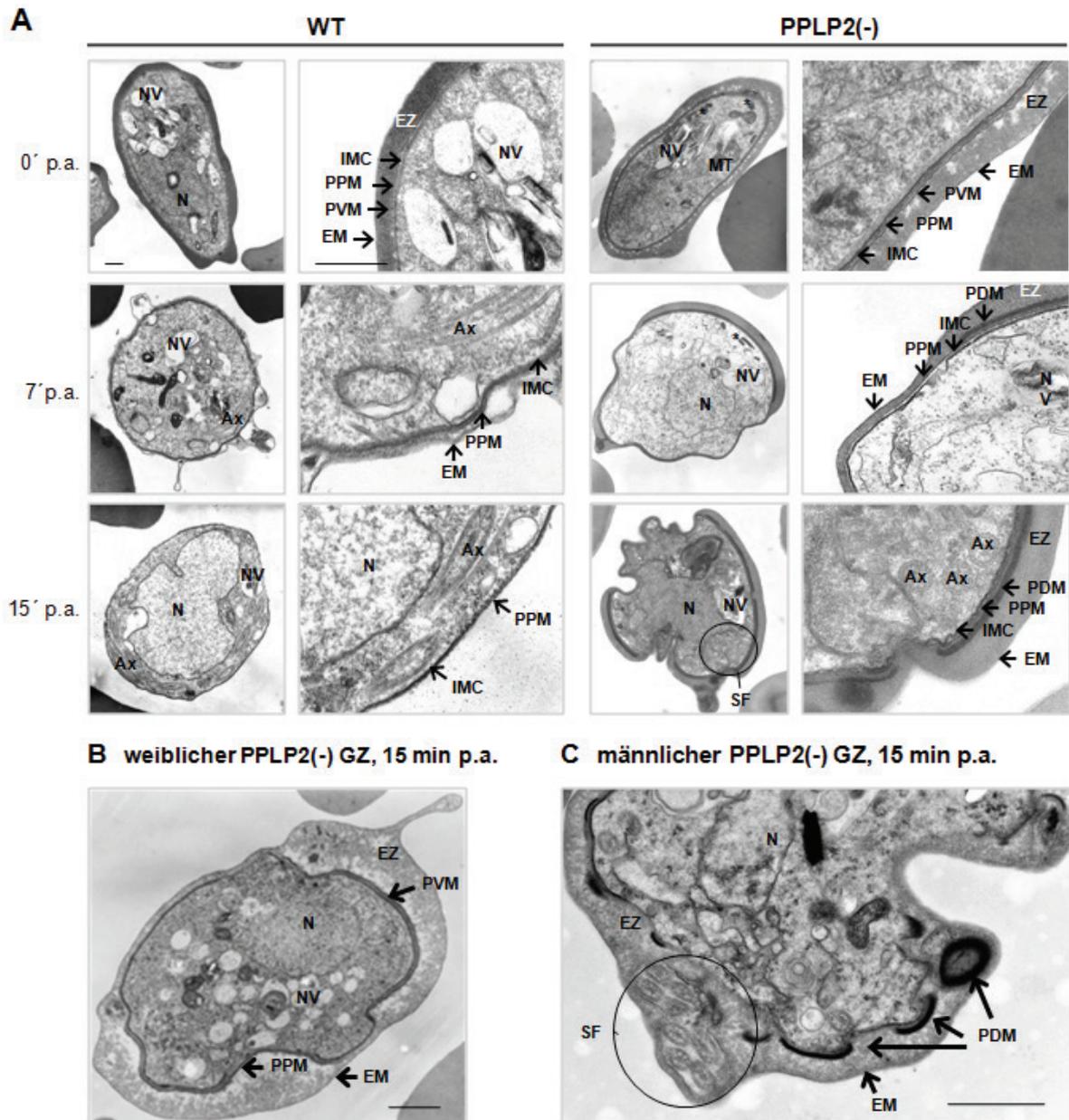
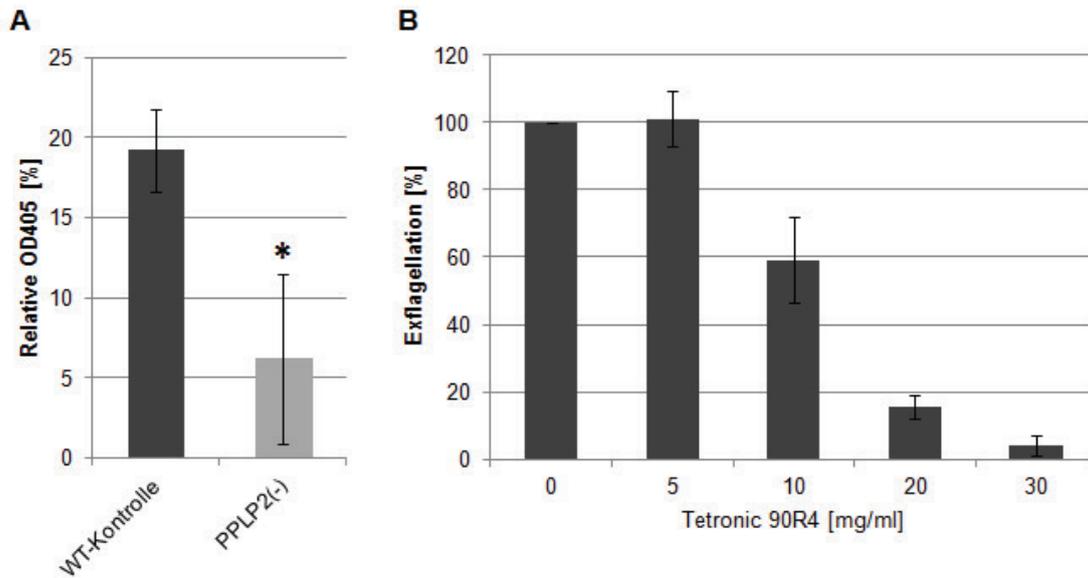


Abb. 3.10 Aktivierte PPLP2(-)-Gametozyten stecken im Erythrozyten fest [modifiziert nach Wirth *et al.*, 2014]. **A** TEM-Untersuchungen reifer PPLP2(-)-Gametozyten 0/7/15' p.a. im Vergleich zu WT-Gametozyten. Sterne (*) markieren OKs. Axoneme (Ax) sind ein Merkmal männlicher Gametozyten. **B** Ultrastruktur eines aktivierten weiblichen PPLP2(-)-Gametozyten 15' p.a.. **C** Ultrastruktur des Superflagellums. Ein Bündel von acht Axonemen ist im Querschnitt eines PPLP2(-)-Gametozyten (GZ) 15' p.a. zu sehen. Die Ergebnisse in A-C sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Ax, Axoneme; EM, Erythrozytenmembran; EZ, Erythrozytenzytoplasma; IMC, Innerer Membrankomplex; MT, Mitochondrium; N, Nukleus; NV, Nahrungsvakuole; p.a., nach Aktivierung; PDM, der PVM entstammende Membranstapel; PVM, Parasitophore Vakuolenmembran; SF, Superflagellum. Der Maßstab beträgt 500 nm (A) bzw. 1 μ m (B, C).



C Tetronic 90R4-treated, 15 min p.a.

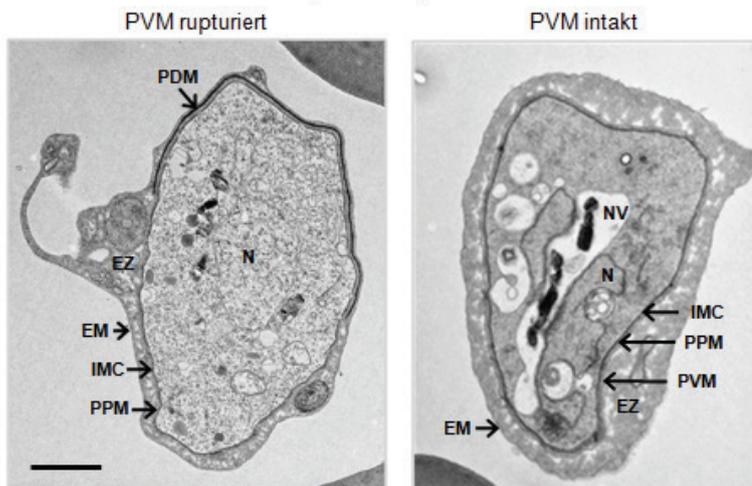


Abb. 3.11 EM-Permeabilisierung steht im Zusammenhang mit der Gametozytenfreisetzung aus dem Erythrozyten [modifiziert nach Wirth *et al.*, 2014]. **A** Vergleich der Hämoglobinabgabe von aktivierten PPLP2(-) bzw. WT-Gametozyten. Im Überstand aktivierter PPLP2(-) sowie WT-Gametozyten wurde 45' p.a. freigesetztes Hämoglobin als OD₄₀₅ gemessen und in einen prozentualen Zusammenhang gesetzt. Als maximale Hämoglobin-Freisetzung wurde der Wert Saponin-lysiertes WT-Gametozyten als 100 % festgesetzt. Der Versuch wurde jeweils als Triplikat durchgeführt (Mittelwert ± SEM). * $p \leq 0,1$ (Mann-Whitney Test, N = 3). **B** Exflagellationsinhibitionsassay mit Tetronic® 90R4. Gametozyten, welche vor ihrer Aktivierung mit Tetronic® 90R4 (zwischen 5 und 30 mg/ml) behandelt wurden, wurden auf ihre Exflagellationsfähigkeit untersucht. Als Kontrolle wurden Gametozyten mit dem entsprechenden Volumen an ddH₂O vorbehandelt (auf 100 % festgesetzt). Der Versuch wurde jeweils als Triplikat durchgeführt (Mittelwert ± SEM). **C** Ultrastrukturelle Analyse von mit Porenversiegler Tetronic® 90R4 behandelten aktivierten WT-Gametozyten. Transmissionselektronische Analyse mit Tetronic® 90R4 behandelter Gametozyten 15' p.a.. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. EM, Erythrozytenmembran; EZ, Erythrozytenzytoplasma; IMC, Innerer Membrankomplex; N, Nukleus; NV, Nahrungsvakuole; p.a., nach Aktivierung; PDM, PVM-abstammige Membranschichten; PPM, parasitäre Plasmamembran; PVM, parasitophore Vakuolenmembran. Der Maßstab beträgt 1 µm.

Resultierend aus den im Rahmen der TEM-Analyse gemachten Beobachtungen, dass aktivierte PPLP2(-)-Gametozyten in der EM gefangen blieben, wurde untersucht, ob eine Entfernung der EM die Entwicklungsblockade der Parasiten aufheben kann [modifiziert nach Wirth *et al.*, 2014]. Hierfür wurde Equinatoxin II (EqII) verwendet, ein porenbildendes Toxin,

welches selektiv die Membran *P. falciparum* infizierter Erythrozyten permeabilisiert, jedoch keinen Effekt auf die PVM hat [Jackson *et al.*, 2007]. EqtlI wurde bereits erfolgreich zur Aufhebung des Arrests von PPLP2(-)-*P. berghei*-Gametozyten im Erythrozyten verwendet [Deligianni *et al.*, 2013]. Für mit EqtlI behandelte PPLP2(-)- und WT-*P. falciparum*-Gametozyten wurde 15 min nach ihrer Aktivierung mittels IFA die Anzahl an freien Mikrogameten bestimmt (**Abb. 3.9C**). Als Kontrolle wurden Gametozyten beider Zelllinien mit DMSO behandelt. Die Anzahl an freien Mikrogameten stieg in EqtlI-behandelten PPLP2(-)-Gametozyten mit 119 ± 1 % signifikant an (Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,1$, Mann-Whitney Test) im Vergleich zur DMSO Kontrolle (52 ± 4 %, $p \geq 0,05$; Mittelwert \pm SEM, Mann-Whitney Test). Auf die Fähigkeit zur Exflagellation von WT-Gametozyten hatte die Behandlung der Parasiten mit EqtlI keinen Effekt ($99 \pm 3,5$ %, $p \geq 0,05$; Mittelwert \pm SEM, Mann-Whitney Test). Wie erwartet, war in SMFAs nach EqtlI-Behandlung auch ein Anstieg der Anzahl an Oozysten zu beobachten (**Abb. 3.9D**; SMFAs wurden freundlicherweise von Dr. Matthias Scheuermayer durchgeführt), welche an der Darmaußenseite gefunden wurden (Experiment 1: *** $p \leq 0,001$; Experiment 2: ** $p \leq 0,01$; Mann-Whitney Test). Diese Resultate zeigen, dass der durch den Funktionsverlust von PPLP2 hervorgerufene phänotypische Effekt über die künstliche Permeabilisierung der EM teilweise aufgehoben werden kann.

Zur Validierung der Beobachtung aus den TEM-Analysen, dass das EZ während des gesamten Aktivierungsprozesses bei PPLP2(-)-Gametozyten vorhanden ist, wurde während der Aktivierung freigesetztes Hämoglobin quantifiziert (**Abb. 3.11A**). Hierfür wurde eine vergleichbare Anzahl PPLP2(-)- und WT-Gametozyten aktiviert und nach 45 min wurde im jeweiligen Überstand die Menge an Hämoglobin durch photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 405 nm ermittelt. Die Werte wurden relativ zur vollständig lysierten Saponin-Kontrolle angegeben. Das Experiment zeigte mit einer relativen OD₄₀₅ von 6 ± 5 % bei aktivierten PPLP2(-)-Gametozyten im Vergleich zu 19 ± 2 % (Mittelwert \pm SEM) für aktivierte WT-Gametozyten eine deutliche Reduktion der Hämoglobinfreisetzung durch die mutierten Parasiten.

Zur Untersuchung der Notwendigkeit einer Permeabilisierung der EM für den Austritt von Gametozyten aus dem umgebenden Erythrozyten, wurden WT-Gametozyten mit dem Porenversiegler Tetronic® 90R4 behandelt. Die behandelten Gametozyten wurden 15 min nach ihrer Aktivierung in einem Exflagellationsassay mit unbehandelten Gametozyten verglichen (**Abb. 3.11B**). Die Resultate zeigten eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Exflagellation in behandelten WT-Gametozyten mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von $12,1 \pm 1,86$ mg/ml. Dies deutet auf Membranpermeabilisierung als essentiellen Bestandteil des Zellaustritts hin.

Die Morphologie von mit Tetronic® 90R4 behandelten Gametozyten wurde mittels TEM untersucht (Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. Urska Repnik gemacht und zur

Verfügung gestellt). Während behandelte, nicht aktivierte Gametozyten morphologisch unauffällig waren (Daten nicht gezeigt), befanden sich die aktivierten und behandelten Gametozyten 15 min nach ihrer Aktivierung noch immer im Erythrozyten (**Abb. 3.11C**). Die Gametozyten waren dabei sich abzurunden, EM und EZ blieben jedoch intakt. In etwa 50 % der mit Tetronic® 90R4 behandelten Gametozyten blieb auch die PVM intakt (N = 10; **Abb. 3.11C**). Dies deutet auf eine mögliche Beeinflussung des PVM Zerfalls durch Tetronic® 90R4 hin.

3.3. Charakterisierung von PPLP4

3.3.1. Expressionsstudie zu PPLP4 in *P. falciparum*

Expressionsstudien zu PPLP4 wurden via IFAs in Trophozoiten, Blutschizonten und in Gametozyten Stadium III bis V durchgeführt (**Abb. 3.12**) [Wirth *et al.* 2015]. Außerdem wurden *in vitro* gewonnene Makrogameten und Zygoten sowie aus infizierten Moskitos isolierte Ookineten auf die Expression von PPLP4 hin untersucht. Zum Nachweis von PPLP4 wurde Antiserum gegen PPLP4RP2 verwendet. PPLP4 konnte in allen untersuchten Stadien von *P. falciparum* immunhistologisch nachgewiesen werden. Das Färbungsmuster wies dabei auf eine intrazelluläre Lokalisation von PPLP4 in vesikelartigen Strukturen hin. Im Ookineten war hingegen eine deutlich apikale Lokalisation von PPLP4 zu beobachten. Die asexuellen Blutstadien wurden durch Detektion von MSP1, Gametozyten durch Detektion von Pfs230, Makrogameten durch Detektion von Pfs25 und sowohl Zygoten als auch Ookineten durch Detektion von Pfs28 stadienspezifisch markiert. Das Ookinetenprotein Pfs28 ist ein Paralog zu Pfs25 [Duffy und Kaslow, 1997].

Im Zuge der immunhistologischen Expressionsstudien fiel auf, dass nur eine Untergruppe der Gametozyten PPLP4-positiv markiert wurde. Zur weiteren Untersuchung und Quantifizierung wurden IFAs mit einer Doppelmarkierung reifer Gametozyten durchgeführt (**Abb. 3.13**). Es wurde jeweils PPLP4 in Kombination mit entweder dem geschlechtsunspezifischen Sexualstadienmarker Pfs230 [Williamson *et al.*, 2003] oder mit dem für weibliche Gametozyten spezifischen Marker Pfs25 markiert [Pradel, 2007]. Die Auszählung ergab eine Expression von PPLP4 in $95,8 \pm 1,7$ % der weiblichen, Pfs25 positiven, Gametozyten (Mittelwert \pm SEM in drei verschiedenen Experimenten; N = 150). Von allen Pfs230-positiven Gametozyten waren $76,8 \pm 2,8$ % (Mittelwert \pm SEM in drei verschiedenen Experimenten; N = 200) ebenfalls PPLP4 positiv. Der Anteil an weiblichen Gametozyten in diesem Datensatz betrug $80,0 \pm 4,3$ % (Mittelwert \pm SEM in drei verschiedenen Experimenten; N = 250), berechnet als prozentualer Anteil Pfs25 positiver Zellen von der Gesamtzahl an Gametozyten im Hellfeld [Wirth *et al.* 2015].

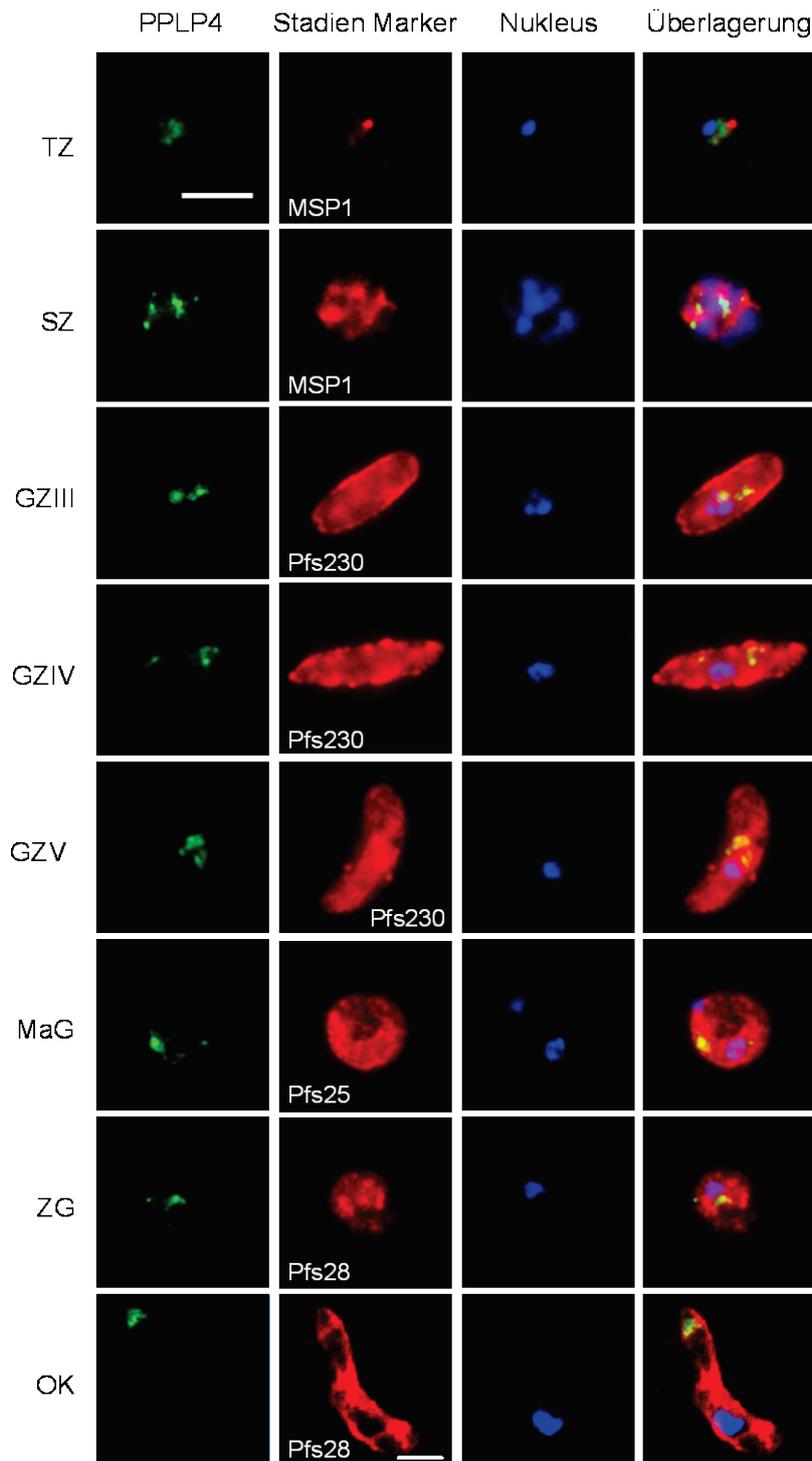


Abb. 3.12 PPLP4 wird in allen Blutstadien und in den Mitteldarmstadien von *P. falciparum* exprimiert [modifiziert nach Wirth *et al.*, 2015]. Mittels IFA wurden Trophozoiten (TZ), Schizonten (SZ), unreife Gametozyten (GZIII bzw. GZIV), reife Gametozyten (GZV), Makrogameten (MaG), Zygoten (ZG) und Ookineten (OK) analysiert. Antiserum gegen PPLP4RP2 aus Maus (grün) wurde zum Nachweis von PPLP4 verwendet. Als stadienspezifische Gegenmarkierung (rot) wurde zur Markierung von TZ und SZ Antiserum gegen MSP1, für GZ Antiserum gegen Pfs230, für MaG Pfs25 und für ZG sowie OK Antiserum gegen Pfs28 verwendet. Alle stadienspezifischen Antiseren stammten aus Kaninchen. Nuklei wurden mit Hoechst 33342 gefärbt (blau). Ergebnisse sind repräsentativ für fünf unabhängige Experimente. Der Maßstab entspricht 5 µm.

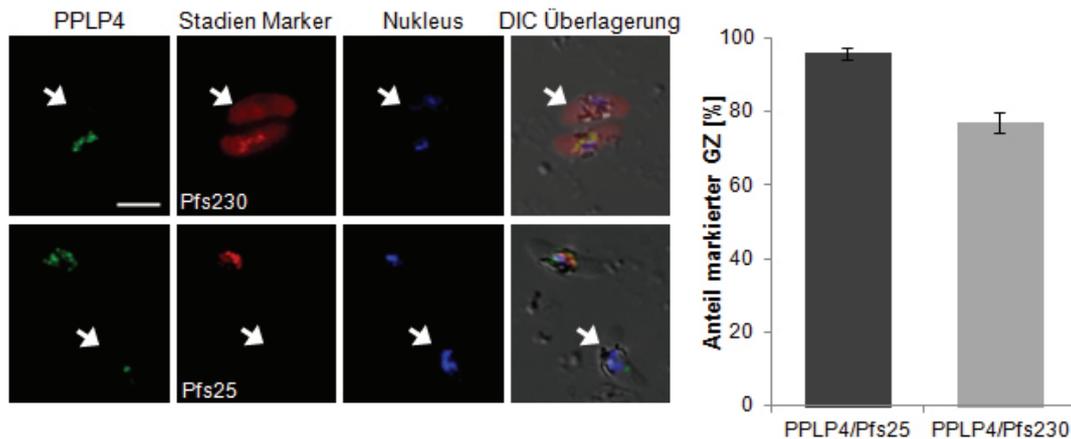


Abb. 3.13 PPLP4 wird in Gametozyten geschlechtsspezifisch exprimiert [modifiziert nach Wirth *et al.*, 2015]. Bei IFAs unter Verwendung von Antiserum aus Maus gegen PPLP4RP2 (grün) in Kombination mit Antiserum aus Kaninchen gegen das sexualstadienspezifische Oberflächenantigen Pfs230 (rot), waren 76,8 % der Pfs230-positiven Gametozyten PPLP4-positiv. Weibliche Gametozyten, welche mit Antiserum gegen Pfs25 markiert wurden (rot), waren zu 95,8 % positiv für PPLP4. Weiße Pfeile markieren PPLP4-negative Gametozyten. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342, die Durchlichtaufnahme wurde mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) aufgenommen. Der Maßstab beträgt 5 μ m.

3.3.2. Funktionsstudie zu PPLP4 mittels Gen-„Knockout“

Zur funktionalen Charakterisierung von PPLP4 wurde eine PPLP4-defiziente (PPLP4(-)) Zelllinie generiert [Wirth *et al.* 2015]. Via „single cross-over“ Rekombination mit dem pCAM-BSD-Plasmid wurde der WT-*pplp4*-Genlocus am N-Terminus innerhalb der MACPF-Domäne unterbrochen (**Abb. 3.14A**). Nach erfolgreicher Integration des Plasmids in den *pplp4*-Genlocus, wurden mittels limitierender Verdünnung zwei klonale Zelllinien isoliert. Die Zelllinien wurden PPLP4(-)1C10 und PPLP4(-)2D6 benannt. Die Unterbrechung des Genlocus, sowie die Abwesenheit des WT-*pplp4*-Genlocus wurden für beide Zelllinien durch diagnostische PCR bestätigt (**Abb. 3.14B**). Als Negativkontrolle wurde gDNS der parentalen NF54-Zelllinie als Matrize in der PCR eingesetzt. Die in der PCR gewonnenen DNS-Fragmente vom 5'- bzw. 3'-Ende des *pplp4*-Integrationslocus beider klonaler Zelllinien wurden zusätzlich sequenziert und *in silico* abgeglichen (**Abb. A1B/C**). Der Abgleich zeigte in beiden Fällen die Integration des *pplp4*(-)-pCAM-BSD-Vektorkonstrukts in die entsprechende homologe Region des WT-*pplp4*-Lokus. Die fehlende Expression von PPLP4 in Gametozyten der PPLP4(-)1C10- und PPLP4(-)2D6-Zelllinien im Vergleich zu WT-Parasiten wurde via IFA mit anti-PPLP4RP2 Antiserum demonstriert (**Abb. 3.13C**) [Wirth *et al.* 2015].

Zum morphologischen Vergleich der PPLP4(-)1C10- und PPLP4(-)2D6-Blutstadien mit den Parasiten der parentalen WT-Zelllinie wurden Giemsa-gefärbte Blutaussstriche mittels Hellfeldmikroskopie ausgewertet (**Abb. 3.15**) [Wirth *et al.* 2015]. Sowohl die asexuellen Ringstadien, Trophozoiten und Blutschizonten, als auch die Gametozyten Stadien II bis V wiesen keinerlei optische Veränderung in Größe und Form im Vergleich zum WT auf. Ebenso wurden in Ausstrichen aktivierter Gametozytenkulturen beider PPLP4(-)-Zelllinien

15 min nach ihrer Aktivierung ausschließlich wildtypisch ausgeprägte Exflagellationszentren beobachtet (**Abb. 3.15**). Diese Ergebnisse legen nahe, dass PPLP4(-)-Parasiten keine phänotypischen Veränderungen ihrer Morphologie in den Blutstadien aufweisen.

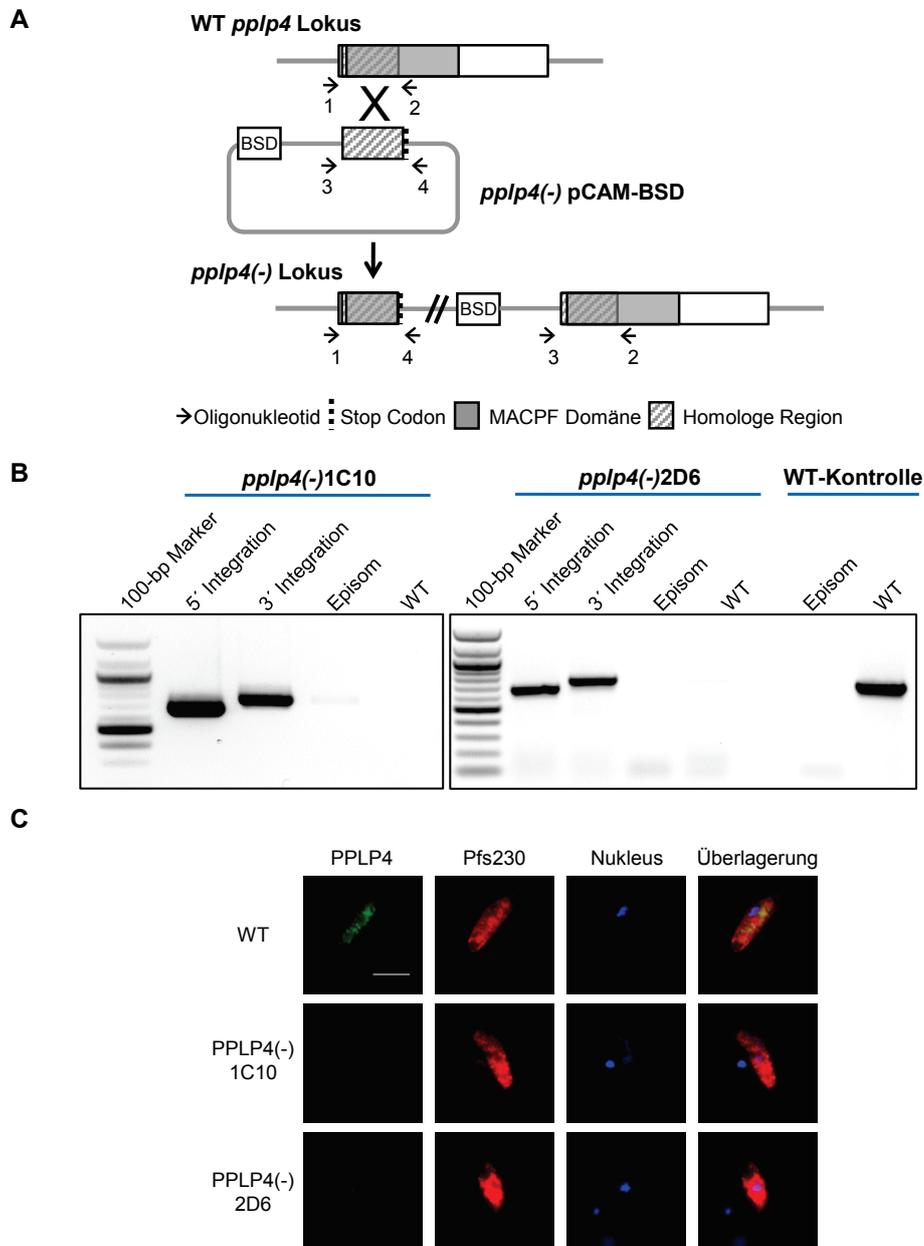


Abb. 3.14 Herstellung einer PPLP4(-)-Zelllinie [modifiziert nach Wirth *et al.*, 2015]. **A** Schema der Versuchsstrategie zur „Single-crossover“ homologen Rekombination. Nummerierte Pfeile markieren die Position der Oligonukleotide, welche zur Bestätigung einer Integration des Vektors *pplp4(-)*-pCAM-BSD verwendet wurden. **B** Nachweis der Plasmidintegration in das Parasiten-Genom durch diagnostische PCR für die zwei klonalen *pplp4(-)*-Zelllinien *pplp4(-)*1C10 und *pplp4(-)*2D6. Amplifikation spezifischer PCR-Fragmente für Oligonukleotide 1 und 4 (siehe A) sowie 2 und 3 zeigen 5'- bzw. 3'- Integration von *pplp4*-pCAM-BSD in den WT Genlocus an. Amplifikation mit Oligonukleotiden 3 und 4 wurde für den Nachweis episomalen Plasmids durchgeführt, der Nachweis von WT-*pplp4*-Genlocus erfolgte mit den Oligonukleotiden 1 und 2. Die WT-Kontrolle ist negativ für den Nachweis von episomalem Plasmid und positiv für WT-*pplp4*-Lokus. Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. **C** Inkubation von PPLP4(-)1C10 und PPLP4(-)2D6-Gametozyten mit Antiserum gegen PPLP4RP2 aus Maus (grün). Die Gametozyten wurden mit Antiserum gegen Pfs230 aus Kaninchen markiert (rot), Zellkerne wurden mit Hoechst 33324 gefärbt. Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Der Maßstab beträgt 5 μ m.

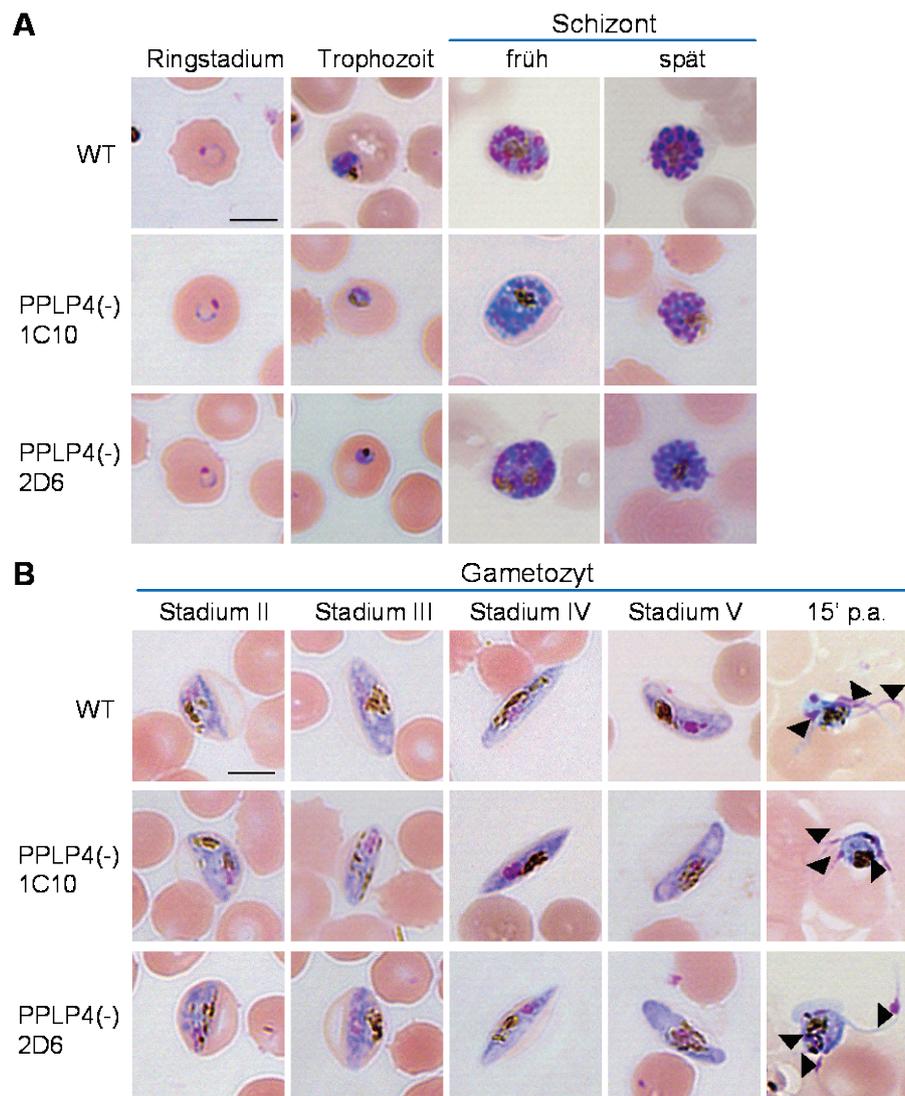


Abb. 3.15 Die Morphologie der asexuellen und sexuellen Blutstadien von PPLP4(-)Parasiten [modifiziert nach Wirth *et al.*, 2015]. **A** Mit Giemsa gefärbte Blutausstriche von Ringstadien, Trophozoiten und frühen sowie späten Schizonten der klonalen Zelllinien PPLP4(-)1C10 und 2D6 wurden mittels Hellfeldmikroskopie analysiert und mit WT-Parasiten verglichen. **B** Mit Giemsa gefärbte Blutausstriche von Gametozyten der Stadien II bis V, sowie von Exflagellationszentren 15 min nach Aktivierung (15' p.a.) der klonalen Zelllinien PPLP4(-)1C10 und 2D6 wurden lichtmikroskopisch analysiert und mit WT-Parasiten verglichen. Pfeile kennzeichnen einzelne Mikrogameten. Der Maßstab beträgt 5 µm.

Mittels vergleichendem Exflagellationsassay wurde die Fähigkeit reifer PPLP4(-)Gametozyten motile Mikrogameten zu bilden im Vergleich zum WT-Parasitenstamm evaluiert (**Abb. 3.16**) [modifiziert nach Wirth *et al.* 2015]. Dieses Experiment zeigte keine Veränderung im Phänotyp der PPLP4(-)Parasiten während der Exflagellation reifer Gametozyten. PPLP4(-)1C10-Gametozyten wiesen 15 min nach ihrer Aktivierung im Vergleich zur WT-Kontrolle $95 \pm 2,5 \%$ ($p \geq 0,05$) Exflagellationszentren auf, PPLP4(-)2D6-Gametozyten zum selben Zeitpunkt $98 \pm 13 \%$ ($p \geq 0,05$; Mittelwert \pm SEM, Friedman Test; repräsentativ für zwei unabhängige Experimente).

Nach dem Einsatz reifer Gametozyten beider PPLP4(-)Zelllinien in SMFAs zeigte sich jedoch im Vergleich zur WT-Kontrolle eine signifikante Reduktion der Oozystenanzahl in den

Moskitos (**Abb. 3.16B**; SMFAs wurden freundlicherweise von Dr. Matthias Scheuermayer durchgeführt) [modifiziert nach Wirth *et al.* 2015]. Entsprechend war die Infektionsrate durch PPLP4(-)-Parasiten in den Moskitos deutlich reduziert. Reife PPLP4(-)-1C10-Gametozyten zeigten eine Reduktion der Oozystenentwicklung um 100 % (Experimente 1 und 4). PPLP4(-)-2D6-Gametozyten zeigten ebenfalls eine vollständige Blockierung der Oozystenbildung in den Experimenten 3 und 4, in Experiment 2 wurde eine Reduktion um 98 % im Vergleich zur WT-Kontrolle ($***p \leq 0,001$; Mann-Whitney Test) beobachtet.

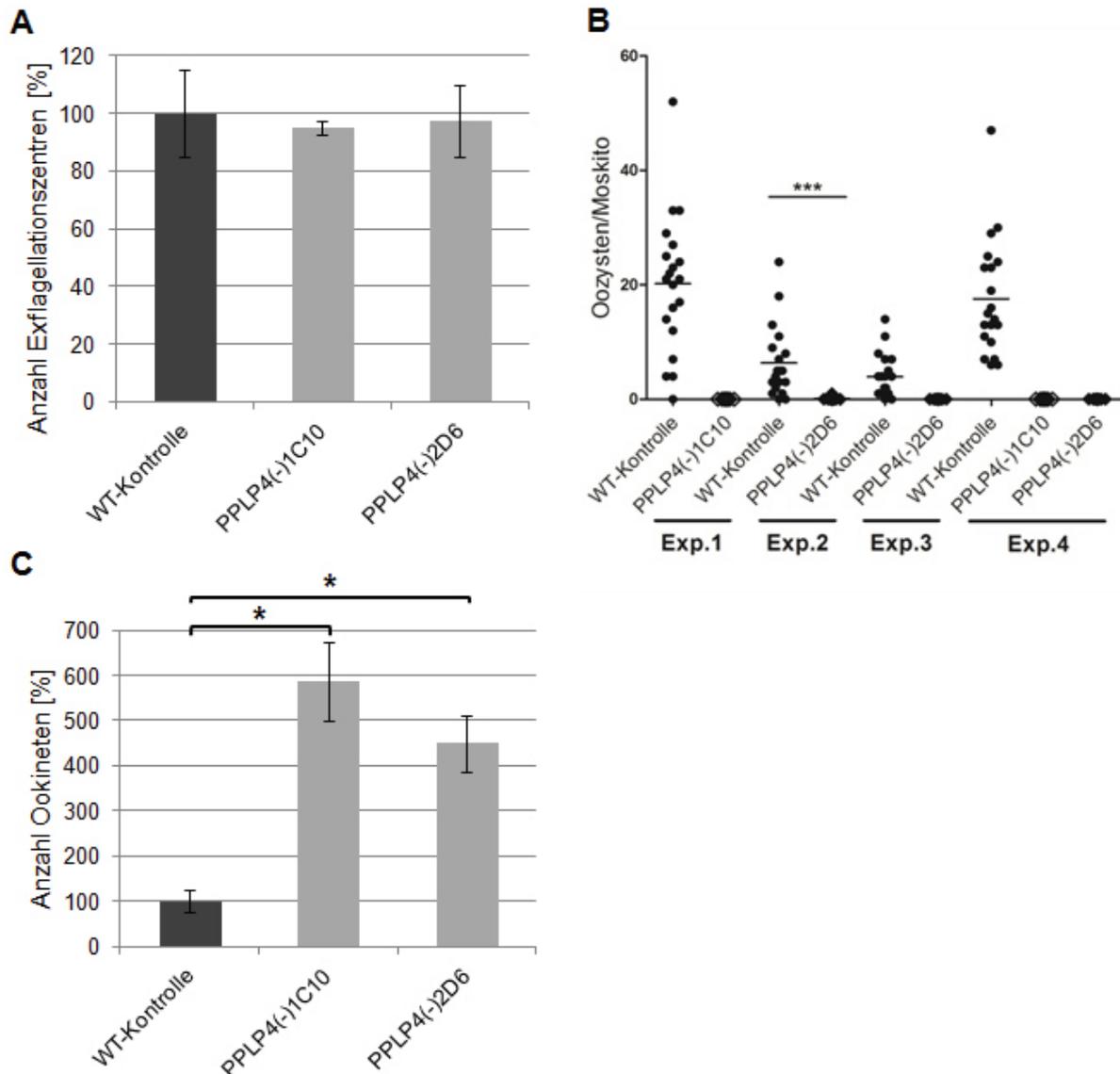


Abb. 3.16 PPLP4(-)-Parasiten sind in ihrer Übertragung auf die Mücke blockiert [modifiziert nach Wirth *et al.*, 2015]. **A** Die Anzahl an Exflagellationszentren reifer PPLP4(-)-Gametozyten 15 min nach ihrer Aktivierung ist im Vergleich zum WT (auf 100 % gesetzt) ohne signifikanten Unterschied ($p \geq 0,05$; Mittelwert \pm SEM, Friedman Test; $N = 3$). **B** Die Anzahl an Oozysten pro Mitteldarm ist nach erfolgter Infektion von *An. stephensi*-Moskitos mit PPLP4(-)-Gametozyten (klonale Zelllinien PPLP4(-)-1C10 und PPLP4(-)-2D6) mittels SMFA im Vergleich zur WT-Kontrolle signifikant reduziert. $***p \leq 0,001$ (Mann-Whitney Test, $N = 20$). **C** 24h nach Infektion von *An. stephensi*-Moskitos mit PPLP4(-)-Gametozyten (klonale Zelllinien PPLP4(-)-1C10 und PPLP4(-)-2D6) bzw. der WT-Kontrolle mittels SMFA, wurden in IFAs von jeweils fünf Mitteldärmen zusammen Ookineten quantifiziert. Für die Visualisierung der Mitteldarmstadien wurde Antiserum gegen Pfs28 aus Kaninchen verwendet. Die Anzahl an Ookineten in der WT-Kontrolle wurde auf 100 % festgelegt, im Vergleich hierzu war die Anzahl an Ookineten der PPLP4(-)-Zelllinien deutlich erhöht; $*p \leq 0,1$ (Mann-Whitney Test, $N = 3$).

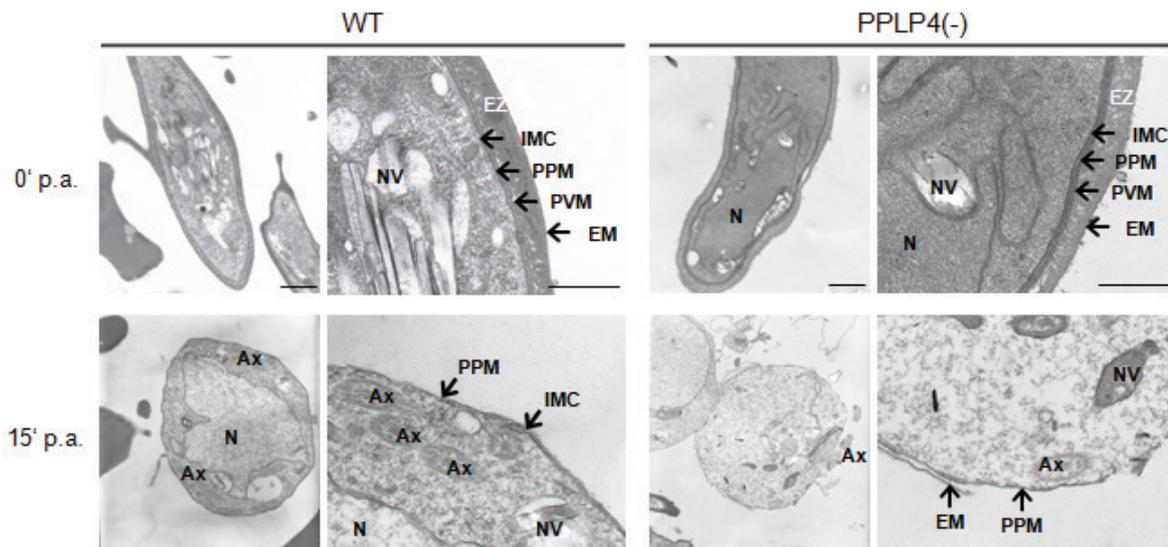


Abb. 3.17 Untersuchung reifer PPLP4(-)-Gametozyten 0 min (0') und 15 min (15') p.a. mittels TEM zeigt keine ultrastrukturelle Abweichung zu WT-Gametozyten [modifiziert nach Wirth *et al.*, 2015]. Axoneme sind ein Merkmal männlicher Gametozyten. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Ax, Axoneme; EM, Erythrozytenmembran; EZ, Erythrozytenzytoplasma; IMC, Innerer Membrankomplex; N, Nukleus; NV, Nahrungsvakuole; p.a., nach Aktivierung; PVM, Parasitophore Vakuolenmembran. Der Maßstab beträgt 1 μm (Übersichtsaufnahme) bzw. 500 nm (Detailaufnahme).

Zur Analyse der ultrastrukturellen Eigenschaften der PPLP4(-)-Gametozyten vor und nach *in-vitro*-Aktivierung wurden Proben mittels TEM untersucht (**Abb. 3.17**; Aufnahmen wurden freundlicherweise von Prof. Gabriele Pradel gemacht und zur Verfügung gestellt) [Wirth *et al.* 2015]. Hierfür wurden reife Gametozyten der PPLP4(-)- und WT-Zelllinien unmittelbar vor und 15 min nach ihrer Aktivierung fixiert und ausgewertet. Sowohl bei nicht aktivierten als auch bei aktivierten Gametozyten der mutierten Zelllinie konnte kein ultrastruktureller Unterschied zu WT-Gametozyten beobachtet werden. Nicht aktivierte Gametozyten waren von den drei beschriebenen Membranen, der PPM, PVM und EM, umgeben und wiesen einen optisch intakten IMC auf [Sologub *et al.*, 2011]. Der Großteil der aktivierten PPLP4(-)-Gametozyten war 15 min nach seiner Aktivierung aus dem Wirtserythrozyten ausgetreten oder wies eine bereits geöffnete EM auf. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich die PVM bereits weitestgehend aufgelöst und der IMC war größtenteils abgebaut. Diese Beobachtung bestätigte die unauffälligen Ergebnisse der Exflagellationsassays.

Zur weiteren Untersuchung, in welchem Entwicklungsschritt die PPLP4(-)-Parasiten nach Aufnahme durch die Mücke stecken bleiben, wurde der Mitteldarminhalt von Moskitos 20 h nach SMFA analysiert (**Abb. 3.16C**; SMFAs und Quantifizierung wurden freundlicherweise von Dr. Matthias Scheuermayer durchgeführt) [Wirth *et al.* 2015]. Mittels IFA wurde die Anzahl an vorhandenen Ookineten quantifiziert. Mit 587 ± 87 % für PPLP4(-)1C10 und 450 ± 62 % für PPLP4(-)2D6 relativ zur WT-Kontrolle ($*p \leq 0,1$; Mann-Whitney Test), wurde eine 5- bis 6-fach erhöhte Anzahl an Ookineten in Mitteldärmen von Moskitos gefunden, welche mit den PPLP4(-)-Parasiten gefüttert wurden. Durch die festgesetzte Gametozytämie in

SMFAs ist dieser hohe Anstieg in der Ookinetenanzahl am wahrscheinlichsten durch eine Akkumulation der Parasiten im Mitteldarm zu begründen.

Castillo *et al.*, 2015]. Eine Rolle der ApiPLPs nicht nur in invasiven Prozessen, sondern auch bei der Membranruptur während des Zellaustritts eines Parasiten, konnte währenddessen lediglich in einem engen Verwandten von Plasmodium, *Toxoplasma gondii*, nachgewiesen werden. Das homologe TgPLP1 ist an der Ruptur der PVM im Zuge des parasitären Zellaustritts beteiligt [Kafsack *et al.*, 2009].

In der vorliegenden Arbeit wurden die fünf PPLPs, insbesondere PPLP2 und PPLP4, auf ihre potenzielle Funktion in den Zellaustrittstadien und während der Transmission von *P. falciparum* hin untersucht.

4.1. Aufbau und Expression der plasmodialen PPLPs

Basierend auf Suchalgorithmen der Datenbank Pfam 27.0 [Finn *et al.*, 2014] kodiert das Genom von *P. falciparum* fünf MACPF-Proteine, PPLP1 bis 5. Die MACPF-Domäne enthält charakteristischerweise das konservierte Aminosäureleitmotiv (Y/W)-X6-(F/Y)GTH(F/Y)-X6-GG und ist typisch für bekannte porenbildende Proteine, wie z. B. humanes Perforin-1 [zusammengefasst in Rosado *et al.*, 2008; Garg *et al.*, 2013]. Bei Perforin-1 befindet sich die MACPF-Domäne am N-Terminus der Aminosäuresequenz, gefolgt von einer „Epidermal-Growth-Factor“-Domäne (EGF) und der C-terminalen C2-Domäne. Die C2-Domäne vermittelt in Abhängigkeit von Calcium eine initiale Bindung von Perforin-1 an die Zielmembran [Law *et al.*, 2010].

Im Gegensatz zu Perforin-1 befinden sich die MACPF-Domänen der plasmodialen PLPs im Zentrum der jeweiligen Proteinsequenz und es konnten weder EGF- noch C2-Domänen identifiziert werden [Garg *et al.*, 2013; Wirth *et al.*, 2014]. Die MACPF-Domänen der PPLPs umfassen neben dem konservierten Aminosäureleitmotiv jeweils zwei α -Helix-Bündel, für welche, in Anlehnung an deren Funktion in Perforin-1, eine wichtige Rolle bei der Porenbildung vorhergesagt wird [Garg *et al.*, 2013]. Trotz fehlender C2-Domäne gibt es zudem Anhaltspunkte für eine calciumabhängige Sekretion und Funktionsweise von PPLP1 und PPLP2: Während bei PPLP1 experimentelle Daten mit nativem und rekombinantem Protein auf eine calciumregulierte hämolytische Funktionsweise des Proteins hindeuten [Garg *et al.*, 2013], deutet bei PPLP2 bisher lediglich die vorhergesagte 3D-Struktur des C-Terminus eine calciumabhängige Funktionsweise des plasmodialen MACPF-Proteins an [Wirth *et al.*, 2014]. Zusätzlich wurde in allen fünf MACPF-Proteinen ein N-terminales Signalpeptid vorhergesagt [SignalP 4.1; Petersen *et al.*, 2011]. Somit erfüllen die Proteine die Grundvoraussetzung für eine auf Sekretion des löslichen Proteins beruhende Funktionsweise.

Die Daten der Expressionsanalysen zu PPLP1 bis 5, basierend auf reverser Transkriptase PCR (RT-PCR) und IFAs, weisen teilweise eine Diskrepanz zwischen Transkriptions- und Translationsrate dieser Gene auf. Während interessanterweise alle fünf PPLPs in Blutschizonten und, mit Ausnahme von PPLP3, auch in aktivierten Gametozyten auf

Proteinebene nachgewiesen werden konnten, war es uns mit der eingesetzten Menge an stadienspezifischer RNS nur möglich, *pplp1*-Transkript in unreifen und reifen Gametozyten zu detektieren. Garg und Kollegen (2013) gelang es jedoch im Rahmen ihrer Untersuchungen zur Rolle von PPLP1 beim Austritt der Merozoiten aus dem Blutschizonten in geringer Menge Transkript des Gens auch in asexuellen Blutstadien nachzuweisen. PPLP1-Protein liegt jedoch nachweisbar und in ausreichender Menge vor, um eine essentielle Funktion bei der Membranruptur im Schizonten zu erfüllen. Dies weist zum einen auf eine sehr niedrige Transkriptionsrate des *pplp1*-Gens, zum anderen aber auch auf eine strenge posttranskriptionale Regulation der Translations- bzw. Proteindegradationsrate hin [zusammengefasst in de Sousa Abreu *et al.*, 2009].

Gleiches gilt für *pplp4*, welches auf Transkriptebene nur in sehr geringer Konzentration in den asexuellen Blutstadien nachgewiesen werden konnte, obwohl die Konzentration des zugehörigen Proteins in Schizonten vergleichsweise hoch war.

PPLP3 hingegen zeigte im Vergleich zu den übrigen Mitgliedern der plasmodialen MACPF-Proteinfamilie eine schwache Expression in Schizonten. In Gametozyten konnte PPLP3 immunhistologisch nicht detektiert werden. Auf Transkriptebene war eine Expression von *pplp3* jedoch in allen untersuchten Stadien nachweisbar. Dieser Unterschied zwischen Transkriptions- und Translationsrate lässt sich durch eine mögliche aktive Herabregulierung der Proteinexpression mit langer Halbwertszeit der dazugehörigen mRNA erklären.

Alle fünf untersuchten plasmodialen MACPF-Proteine zeigten ein vesikuläres Expressionsmuster. Es ist bekannt, dass die löslichen Perforin-1-Monomere in zytoplasmatischen sekretorischen Granula der zytotoxischen T-Zellen gespeichert vorliegen [zusammengefasst in Voskoboinik und Trapani, 2006]. Dies ermöglicht, zum Schutz der Zelle vor frühzeitiger Porenbildung, die Lagerung der Proteine bis zu ihrem Einsatz bei einem nicht physiologischen pH-Wert von 4,9 bis 5,2. Erst beim Eintritt der Monomere in eine pH-neutrale Umgebung, gekoppelt mit einem Anstieg der Calciumkonzentration, kommt es zur Porenbildung [zusammengefasst in Voskoboinik und Trapani, 2006]. Im Hinblick auf die strukturellen Ähnlichkeiten zwischen dem humanen Perforin-1 und den plasmodialen PLPs kann für die vesikuläre Speicherung der PPLPs im Parasiten eine vergleichbare Eigenschutzfunktion angenommen werden.

4.2. PPLP2 während des Zellaustritts der Gametozyten

Durch IFAs konnte eine Proteinexpression von PPLP2 in den asexuellen Blutstadien sowie in Gametozyten beider Geschlechter nachgewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass PPLP2 in vesikelartigen Zellorganellen asexueller und sexueller Blutstadien gespeichert wird. Während diese Vesikel in reifen Gametozyten etwa 5 min nach erfolgter *in-vitro*-Aktivierung in unmittelbare Nähe zur PPM verlagert werden, konnte eine solche Relokalisation des Proteins in reifen Schizonten kurz vor der EM-Ruptur nicht beobachtet

werden. Dies entspricht den Beobachtungen von Garg und Kollegen (2013), dass PPLP1, jedoch nicht PPLP2, in reifen *P. falciparum* Schizonten aus den Mikronemen sezerniert und anschließend an die Hüllmembranen verlagert wird.

Lange Zeit waren osmiophile Körperchen die einzigen bekannten, am Zellaustritt beteiligten, Sekretionsorganellen in Gametozyten. Während osmiophile Körperchen hauptsächlich in weiblichen Gametozyten vorkommen, konnten inzwischen auch sogenannte männliche osmiophile Körperchen identifiziert werden [Sinden, 1982; Aikawa *et al.*, 1984; Olivieri *et al.*, 2015]. Die Ruptur der PVM in aktivierten weiblichen Gametozyten wurde bislang mit der Anwesenheit von osmiophilen Körperchen in Verbindung gebracht, welche sich während der Aktivierung an die PPM verlagern, um anschließend ihren Inhalt in das Lumen der parasitophoren Vakuole zu entleeren. Unterhalb der Membranöffnungen der ruptierten PVM können Anhäufungen der osmiophilen Körperchen beobachtet werden. Die Vesikel verschwinden innerhalb von 2 min nach Aktivierung der Gametozyten, zeitgleich mit Auflösung der PVM [Sologub *et al.*, 2011]. Gametozyten, welche eine Defizienz des für osmiophile Körperchen spezifischen Proteins Pfg377 aufweisen, haben eine reduzierte Anzahl dieser Organelle. Berichte über eine phänotypische Auswirkung dieses Defizits auf den Zellaustritt von Makrogameten wurden jedoch zuletzt angezweifelt [Alano *et al.*, 1995a; Severini *et al.*, 1999; de Koning-Ward *et al.*, 2008; Suárez-Cortés *et al.*, 2014]. Unumstritten ist jedoch der Zusammenhang zweier weiterer Zellaustrittsmoleküle mit den osmiophilen Körperchen, MDV-1/Peg3 [Furuya *et al.*, 2005; Silvestrini *et al.*, 2005; Lanfrancotti *et al.*, 2007; Ponzi *et al.*, 2009] und GEST [Talman *et al.*, 2011]. Bei Defizienz eines dieser beiden Proteine in *P. berghei* kommt es zu einer Blockierung der PVM-Ruptur [Ponzi *et al.*, 2009; Talman *et al.*, 2011]. Die kürzlich in *P. berghei* identifizierten männlichen osmiophilen Körperchen sind Pfg377-negativ, jedoch enthalten auch diese Organellen die zuvor beschriebenen Zellaustrittsmoleküle [Olivieri *et al.*, 2015]. Diese Daten deuten an, dass die Entleerung der osmiophilen Körperchen und der männlichen osmiophilen Körperchen für die PVM-Ruptur eine wichtige Bedeutung hat. Wir konnten zeigen, dass PPLP2 auch in Pfg377(-)-Gametozyten unverändert exprimiert wird. Dies lässt den Schluss zu, dass PPLP2 in anderen für den Zellaustritt relevanten Vesikeln als den Pfg377-positiven osmiophilen Körperchen gespeichert wird.

Die essentielle Bedeutung eines Calciumanstiegs für die EM-Lyse durch PPLP1 konnte bereits von Garg und Kollegen (2013) gezeigt werden. Merozoiten sekretieren bei hohen Calciumkonzentrationen mehr PPLP1 in ihre Umgebung, während unter dem Einfluss des Ca²⁺-Komplexbildners BAPTA-AM die PPLP1-Sekretion eingestellt wurde. Interessanterweise scheinen calciuminduzierte Signalkaskaden in Gametozyten erst nach Zerstörung der PVM einen Effekt zu haben, da BAPTA-AM zwar ein Abrunden der Gametozyten verhindert, jedoch nicht die Ruptur der PVM [McRobert *et al.*, 2008; Sologub *et*

al., 2011]. Übereinstimmend mit diesen Erkenntnissen konnten wir zeigen, dass PPLP2-positive Vesikel in aktivierten Gametozyten unter Einwirkung des Ca^{2+} -Komplexbildners weder relokalisieren, noch ihren Inhalt in die Wirtszelle entleeren. Zudem bleibt das EC erhalten [Wirth *et al.*, 2014]. Die Ergebnisse belegen, dass die Entleerung der PPLP2-positiven Vesikel erst nach Ruptur der PVM, jedoch vor Öffnung der EM erfolgt und von einer hohen intrazellulären Calciumkonzentration abhängig ist.

Für die funktionale Charakterisierung von PPLP2 wurde im Rahmen dieser Arbeit eine PPLP2(-)-Zelllinie generiert und analysiert. Der Austritt der intraerythrozytären Merozoiten aus dem Erythrozyten beinhaltet die Fragmentierung und anschließende Vesikelbildung der EM nach explosionsartiger Freisetzung der Merozoiten aus dem infizierten Erythrozyten am Ende eines Replikationszyklus [Glushakova *et al.*, 2005]. Der hinter diesem Prozess stehende Mechanismus ist bisher nicht vollständig verstanden, jedoch beinhaltet er den fortschreitenden Verdau des erythrozytären Zytoskeletts [Chandramohanadas *et al.*, 2009; Glushakova *et al.*, 2009] und die der Membranruptur vorangehende Permeabilisierung der EM [Glushakova *et al.*, 2010; Garg *et al.*, 2013]. Eine Rolle von PPLP2 bei der Membranpermeabilisierung und -reorganisation während des Merozoitenaustritts konnte in einer vergleichenden Studie zwischen PPLP2(-) Parasiten und WT-Parasiten nicht festgestellt werden [Wirth *et al.*, 2014]. Es konnten weder Anomalien während der Merozoiteninvasion eines Erythrozyten, noch während der intraerythrozytären Entwicklung zum Schizonten oder dem Zellaustritt der Merozoiten festgestellt werden. Ein essentieller Einfluss von PPLP2 auf Invasions- bzw. Zellaustrittsprozesse der Merozoiten konnte so ausgeschlossen werden [Wirth *et al.*, 2014].

Im Gegensatz zum schnellen Zellaustritt der Merozoiten aus dem Wirtserythrozyten handelt es sich beim Zellaustritt der Gametozyten um einen langsamen Prozess. Obwohl die PVM mit einer zeitlichen Verzögerung von nur etwa 1 min nach Aktivierung verhältnismäßig schnell rupturiert, bleiben die Parasiten für weitere 10 min von der EM bedeckt und verlassen den Erythrozyten erst, nachdem sich die Gameten vollständig entwickelt haben [Sologub *et al.*, 2011]. Diese zeitliche Verzögerung im Zellaustrittsprozess gestattet den sich entwickelnden Gameten möglicherweise, sich an die Gegebenheiten im Moskitomitteldarm zu adaptieren. So konnte gezeigt werden, dass sich im Anschluss an die Gametozytenaktivierung das plasmodiale Transmembranprotein PfGAP50 aus dem IMC an die Oberfläche des Parasiten, die PPM, verlagert [Simon *et al.*, 2013]. Erst nach Relokalisation von PfGAP50 beenden die Gameten ihren Zellaustritt. PfGAP50 ermöglicht es den neu gebildeten Gameten einen in der Blutmahlzeit mitenthaltenen Regulator des Komplementsystems, Faktor H, zu binden. Auf diese Weise entgehen die Gameten einer Lyse durch die ebenfalls mit der Blutmahlzeit in den Mückendarm gelangten humanen Komplementfaktoren. Es hat den Anschein, als würde der Schutz durch die EM den

Gametozyten genügend Zeit verschaffen, um sich in fertile Gameten weiterzuentwickeln, welche in der Lage sind, sich gegen im Blut enthaltene Immunfaktoren zu verteidigen.

In Übereinstimmung mit der verzögerten Ruptur der EM konnte etwa 5 min nach Aktivierung der Gametozyten und nach erfolgter Zerstörung der PVM, eine Relokalisation der PPLP2-positiven vesikelartigen Strukturen in die Peripherie der Gametozyten beobachtet werden. In Einklang mit diesen Beobachtungen konnten PPLP2(-)-Gametozyten zwar die PVM rupturieren, jedoch nicht die EM, wodurch die Parasiten im Transmissionsprozess blockiert wurden. Dies führt zu der Folgerung, dass die PVM-Ruptur nicht von PPLP2 beeinflusst wird. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch von Deligianni und Kollegen (2013) im Nagermalaria-Modell erzielt. Sie berichteten, dass PPLP2(-)-*P. berghei*-Gametozyten nicht in der Lage waren, die EM im Zuge des Zellaustritts zu permeabilisieren, während die Ruptur der PVM unbeeinflusst blieb. Anders als in *P. falciparum* wird PPLP2 in *P. berghei* nur in männlichen Gametozyten exprimiert und ist somit nur für den Zellaustritt männlicher Gametozyten von Bedeutung [Deligianni *et al.*, 2013]. Die Entwicklung von PPLP2(-)-Gametozyten beider Geschlechter verlief unauffällig. Durch künstliche Permeabilisierung der EM erlangten die Gameten teilweise ihre Fertilität wieder und konnten die Transmission zur Mücke durchlaufen. Sowohl bei *P. falciparum* als auch bei *P. berghei* wurden in einigen Fällen *in vitro* missgestaltete Mikrogameten beobachtet, bei denen sich die einzelnen Axoneme zu Superflagellen zusammengelagert hatten. Dies wurde auf den fehlkoordinierten Austritt der Axoneme aus dem Zytoplasma des gametozytären Residualkörpers zurückgeführt [Deligianni *et al.*, 2013].

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass reife Gametozyten unfähig waren aus dem Wirtserythrozyten auszutreten, während auch das EZ nach Aktivierung der Gametozyten nicht aus dem infizierten Erythrozyten entweichen konnte. Sowohl die PPLP2(-)-Gametozyten, als auch das EZ verblieben innerhalb der Wirtszelle und konnten in Ultradünnschnitten mittels Transmissionselektronenmikroskopie beobachtet werden. In WT-Gametozyten hingegen verschwindet das EZ etwa 5 min nach Aktivierung, folglich mehrere Minuten vor Ruptur der EM [Sologub *et al.*, 2011]. Zudem setzten aktivierte PPLP2(-)-Gametozyten weniger Hämoglobin in das umgebende Medium frei als WT-Gametozyten. Diese Resultate lassen den Schluss zu, dass nach Aktivierung der Gametozyten PPLP2 die EM permeabilisiert und somit in der Freisetzung des EZ in die Umgebung resultiert. Interessanterweise konnte bereits in früheren Studien zum gametozytären Zellaustritt beobachtet werden, dass die Behandlung der Parasiten mit den Proteaseinhibitoren E64d und TLCK die Ruptur der PVM bzw. EM verhinderte, jedoch in beiden Fällen das EZ dennoch verschwand [Sologub *et al.*, 2011]. Diese Befunde führen zu der Schlussfolgerung, dass die Ruptur der PVM, die Permeabilisierung der EM mit Austreten des EZ und die

Ruptur der EM drei aufeinanderfolgende, zugleich jedoch unabhängig gesteuerte Ereignisse sind [Wirth *et al.*, 2014].

Die Blockierung der Gametogenese sowie die Transmission der PPLP2(-)-Gametozyten konnte durch das porenbildende Toxin Equinatoxin II teilweise rückgängig gemacht werden. Durch Verabreichung des Membranporen verschließenden Copolymers Tetronic 90R4 wurden aktivierte WT-Gametozyten und das EZ innerhalb der Wirtszelle zurückgehalten [Wirth *et al.*, 2014]. Diese Beobachtungen liefern weitere Belege für eine essentielle Rolle der EM-Permeabilisierung während des gametozytären Zellaustritts. Zur weiteren Unterstützung dieser These konnte gezeigt werden, dass wenige Minuten nach Aktivierung von WT-Gametozyten, jedoch bereits mehrere Minuten vor Ruptur der EM, die EM durchlässig für extrazelluläres Phalloidin wird. In PPLP2(-)-Gametozyten konnte diese Permeabilisierung hingegen nicht beobachtet werden [Wirth *et al.*, 2014]. Der letzte Beweis für eine direkte Beteiligung von PPLP2 an der Permeabilisierung der EM wurde durch den Nachweis erbracht, dass rekombinantes PPLP2 konzentrationsabhängig Erythrozyten lysiert [Wirth *et al.*, 2014].

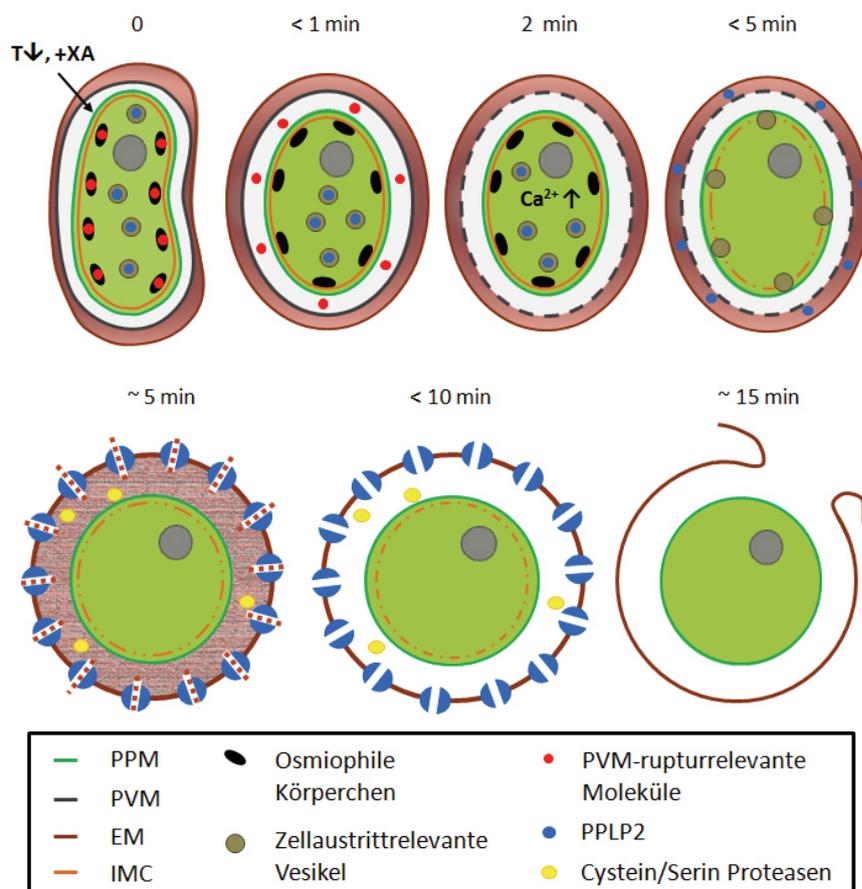


Abb. 4.1 Hypothetisches Modell des Zellaustritts aktivierter *P. falciparum* Gametozyten aus dem Erythrozyten. Der geschätzte zeitliche Ablauf wird angedeutet. T, Temperatur, XA, Xanthurensäure [modifiziert aus Wirth *et al.*, 2014].

Im Hinblick auf die vorhandenen Daten zu den molekularen Mechanismen des gametozytären Zellaustritts des Malariaerregers *P. falciparum* wird folgendes hypothetisches Modell vorgeschlagen (**Abb. 4.1**): Der reife Gametozyt erfährt nach seinem Wirtswechsel

Umweltreize, wie z. B. das Vorhandensein von Xanthurensäure im Moskitomitteldarm, sowie eine Temperatursenkung. Diese Reize signalisieren dem Parasiten die Transmission vom Menschen zur Mücke. Innerhalb von etwa 1 min nach seiner Aktivierung entleeren die osmiophilen Körperchen zellaustrittsspezifische Moleküle wie GEST und MDV-1/Peg3 in das Lumen der parasitophoren Vakuole und führen so zur Ruptur der PVM. Durch die im Zuge der Aktivierung ansteigende intrazelluläre Calciumkonzentration entleeren Pfg377-negative Vesikel ihren Inhalt inklusive PPLP2, in das EZ. PPLP2 oligomerisiert und fügt sich unter Bildung einer Membranpore in die EM ein. Etwa 5 min nach Aktivierung wird die EM durchlässig und das EZ wird ins Medium freigesetzt, während gleichzeitig das erythrozytäre Zytoskelett durch Cystein/Serin-Proteasen geschwächt wird. In der Zwischenzeit hat sich der aktivierte Gametozyt vollständig abgerundet und die Gametogenese abgeschlossen. Etwa 10 min nach Aktivierung des Gametozyten öffnet sich die EM an einer einzigen Stelle und entlässt den Gameten zur Befruchtung in das Mitteldarmlumen.

4.3. PPLP4 bei der Durchquerung des Mitteldarmepithels durch Ookineten

Neben der Charakterisierung von PPLP2 bildete die funktionale Untersuchung von PPLP4 einen weiteren Forschungsschwerpunkt. Zuvor veröffentlichte Transkriptomdaten wiesen niedrige Konzentrationen an *pplp4*-Transkript in den asexuellen Blutstadien und Gametozyten auf, während für Ookineten eine etwa 20-fach höhere Konzentration im Vergleich zu reifen Gametozyten nachgewiesen werden konnte [Aurrecochea *et al.*, 2009]. Durch IFAs konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Proteinexpression von PPLP4 in den asexuellen Blutstadien, in Gametozyten aller Entwicklungsstadien, in Makrogameten und Zygoten gezeigt werden. Hier lag das Protein in vesikelartigen Strukturen innerhalb des Parasiten vor. Außerdem konnte PPLP4 in Ookineten nachgewiesen werden, wo es am apikalen Pol konzentriert vorlag. In früheren Studien konnte bereits eindeutig gezeigt werden, dass PPLP1 in den Mikronemen der Merozoiten gespeichert vorliegt [Garg *et al.*, 2013] und das Verteilungsmuster von PPLP3 in Ookineten ebenfalls auf eine mikronemale Speicherung hinweist [Kadota *et al.*, 2004]. Die Hypothese einer Speicherung von PPLP4 in den Mikronemen der Ookineten erscheint daher plausibel [Wirth *et al.* 2015].

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass lediglich eine Subpopulation der Gametozyten PPLP4-positiv markiert wurde. Der Anteil an PPLP4-positiven Gametozyten entsprach dabei in etwa dem experimentell ermittelten prozentualen Anteil an weiblichen Gametozyten. Eine geschlechtsspezifische Differenzierung der PPLP4-positiven Gametozyten zeigte, dass circa 96 % dieser Parasiten weiblich waren. Auf diesen Ergebnissen basierend kann auf eine weiblich-spezifische Expression von PPLP4 geschlossen werden [Wirth *et al.* 2015].

Zur funktionalen Charakterisierung von PPLP4 wurde eine PPLP4(-)-Parasitenlinie generiert und zwei klonale Zelllinien wurden zur weiteren Charakterisierung isoliert. Die PPLP4(-)-Parasiten zeigten weder in ihrem intraerythrozytären Replikationszyklus, noch während der Gametozytenreifung, phänotypische Auffälligkeiten. Die reifen PPLP4(-)-Gametozyten bildeten fertile Gameten und traten vollständig aus dem Wirtserythrozyten aus. Die durchgeführten ultrastrukturellen Analysen bestätigen diese Ergebnisse. Zusammengefasst lassen diese Daten folgern, dass PPLP4 keine essentielle Funktion während des asexuellen Blutzyklus, der Gametozytendifferenzierung oder der Gametogenese von *P. falciparum* hat [Wirth *et al.* 2015].

Interessanterweise zeigten sich jedoch phänotypische Veränderungen im Transmissionsverhalten der PPLP4(-)-Gametozyten. Nach Verwendung der Parasiten in SMFAs konnte eine drastische Reduktion der Oozysten festgestellt werden. Stattdessen fanden sich signifikant mehr Ookineten in den Mitteldärmen infizierter Mücken im Vergleich zur WT-Kontrolle. Diese Resultate lassen sich hypothetisch mit einer Akkumulation der Ookineten im Mitteldarm lumen erklären. Diese Akkumulation ist möglicherweise auf die Unfähigkeit der PPLP4(-)-Ookineten zurückzuführen, das Mitteldarmepithel zu durchqueren.

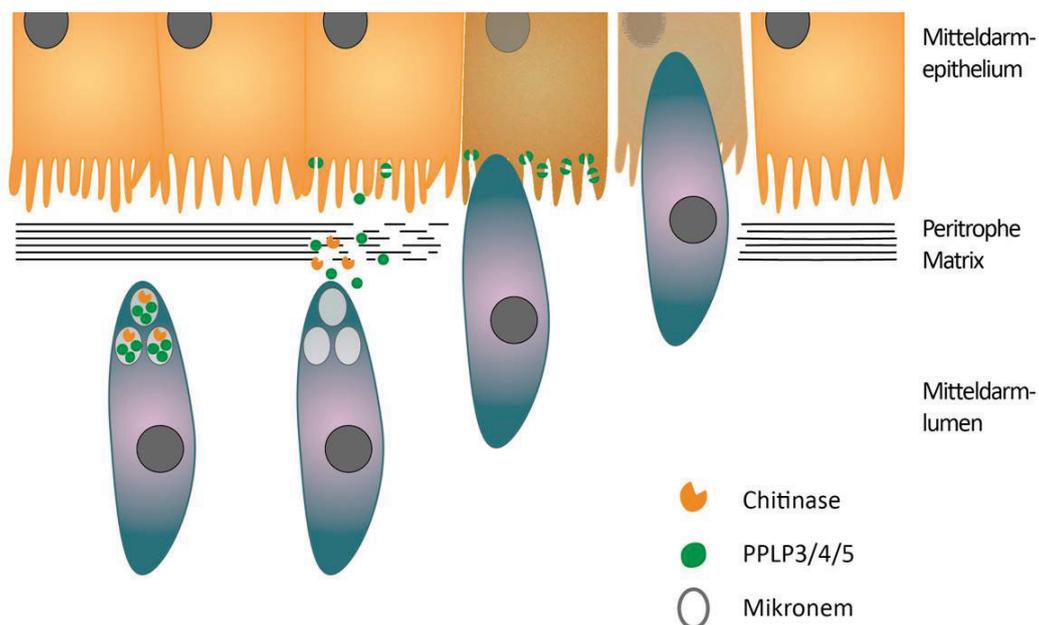


Abb. 4.2 Hypothetisches Modell der Durchquerung des Mitteldarmepithels durch WT-Ookineten.

Der Austritt der WT-Ookineten aus dem Mitteldarm lumen beginnt mit der Auflösung der peritrophen Membran, gefolgt von der Anhaftung an das Mitteldarmepithel und die Ruptur des selbigen (**Abb. 4.2**). Dies führt im weiteren Verlauf zur Durchquerung der Epithelschicht durch den Ookineten. Im Laufe der vergangenen zwanzig Jahre wurden mehrere an diesen Prozessen beteiligte Proteine identifiziert. Ein Beispiel hierfür ist die vom Ookineten sezernierte hydrolytische Chitinase, welche die peritrophe Membran verdaut und somit den Zugang zur Darmepithelschicht ermöglicht [zusammengefasst in Langer und Vinetz, 2001].

Mehrere Adhäsionsproteine wurden identifiziert, welche sich entweder auf dem Plasmalemma der Ookineten befinden oder aus den Mikronemen sekretiert werden. Diese Proteine, darunter auch Pbs25 und Pbs28 [Tomas *et al.*, 2001], das „secreted ookinete adhesive protein“ SOAP, das „circumsporozoite and TRAP-related protein“ CTRP und das „von Willebrand factor A domain-related protein“ WARP [Yuda *et al.*, 1999; Yuda *et al.*, 2001; Dessens *et al.*, 2003] vermitteln die Anlagerung an und Invasion in die Mitteldarmepithelzellen. Überraschenderweise konnte bislang für zwei weitere der fünf identifizierten plasmodialen Perforine, namentlich PPLP3 und PPLP5, eine essentielle Beteiligung an der Durchquerung des Mitteldarmepithels durch Ookineten nachgewiesen werden [Wirth *et al.*, 2015; Ecker *et al.*, 2007; Kadota *et al.*, 2004]. Bemerkenswerterweise führt der Verlust von PPLP3 und PPLP5 zu einem ähnlichen Phänotyp wie den in dieser Arbeit vorgestellten PPLP4(-)-Phänotyp. In allen drei Fällen sind die Ookineten nicht dazu in der Lage, das Mitteldarmlumen zu verlassen. Für PPLP5(-)-Ookineten konnte zudem gezeigt werden, dass die Parasiten zwar die peritrophe Matrix überwinden konnten, jedoch im Mikrovillisaum der Epithelzellen stecken blieben [Ecker *et al.*, 2007]. Bei Defizienz eines dieser drei PPLPs ist eine gegenseitige Verlustkompensation folglich nicht möglich.

Unter Einbeziehung der bereits vorhandenen Daten zu den molekularen Mechanismen der Durchquerung des Mitteldarmepithels durch *P. falciparum*-Ookineten wird daher folgendes hypothetisches Modell vorgeschlagen (**Abb. 4.2**): Der Ookinet reagiert auf bislang unbekannte Umweltreize mit der Sekretion diverser mikronemal gespeicherter Moleküle, welche für die Durchquerung des Mitteldarmepithels essentiell sind. Darunter befindet sich auch eine hydrolytische Chitinase, welche die schützende peritrophe Matrix zersetzt und so dem Ookineten Zugang zur Epithelschicht verschafft. Neben verschiedenen Adhäsionsproteinen werden mit der Chitinase auch drei Perforin-artige Proteine, namentlich PPLP3, PPLP4 und PPLP5 aus den Mikronemen freigesetzt. Diese MACPF-Proteine interagieren ähnlich dem Prinzip des Membranangriffskomplexes des Komplementsystems. Zwei Vertreter der PPLPs bilden einen Rezeptorkomplex in der Epithelzellmembran und rekrutieren das dritte PPLP als porenbildende Komponente. Diese oligomerisiert zu einer Vorpore und fügt sich in die Zielmembran ein. Durch eine Vielzahl solcher Membranporen kommt es zu einer auf osmotischen Effekten beruhenden Schwächung der Epithelzellmembran. Hierdurch begünstigt kann der anhaftende motile Ookinet entweder mit Hilfe weiterer membranolytischer Effektorproteine oder durch mechanische Kräfte die Membranbarriere überwinden. Die Invasion führt zur Apoptose der befallenen Epithelzelle.

4.4. Schlussfolgerung

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten in Verbindung mit den Ergebnissen von Wirth *et al.* (2015), Wirth *et al.* (2014), Garg *et al.* (2013) und Deligianni *et al.* (2013) liefern wichtige Indizien für die Funktion und das molekulare Zusammenspiel der plasmodialen

Perforine in den asexuellen Blutstadien, sowie den Mitteldarmstadien von *P. falciparum*. Wir konnten zeigen, dass in Schizonten und Gametozyten des humanpathogenen Malariaerregers stets mehrere plasmodiale MACPF-Proteine in vesikelartigen Strukturen vorliegen.

Unsere Daten in Verbindung mit früheren Proteincharakterisierungsstudien zeigen, dass die plasmodialen Perforine eine stadienspezifische Funktionsweise haben. So liegen zwar sowohl PPLP1 als auch PPLP2 in reifen Blutschizonten vor, eine Beteiligung an der Permeabilisierung der EM, unmittelbar vor der Merozoitenfreisetzung, konnte allerdings nur für PPLP1 nachgewiesen werden [Garg *et al.*, 2013]. In PPLP2(-)-Parasiten blieb der intraerythrozytäre Replikationszyklus hingegen unverändert [Wirth *et al.*, 2014]. Stattdessen konnte im Rahmen dieser Arbeit die Beteiligung von PPLP2 an der Permeabilisierung der gleichen Membran zu einem anderen Zeitpunkt im plasmodialen Lebenszyklus, dem Austritt der Gametozyten aus dem Wirtserythrozyten, gezeigt werden [Wirth *et al.*, 2014].

Tab. 4.1 Tabelle der plasmodialen Perforine und des aktuellen Standes ihrer Charakterisierung. Grau dargestellte Aussagen sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Angegebene Literaturreferenzen sind repräsentativ für Publikationen zu den einzelnen Perforinen.

Perforin	<i>Plasmodium</i> Spezies	Putative Proteinfunktion und -lokalisierung	Literatur
PPLP1	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i>	Calcium-abhängige Permeabilisierung der EM in reifen Schizonten und Durchquerung der Kupfferschen Zellen durch Sporoziten; Lokalisierung in Mikronemen der Merozoiten und Sporoziten, in vesikelartigen Strukturen in Gametozyten	Ishino <i>et al.</i> , 2005; Garg <i>et al.</i> , 2013; Risco-Castillo <i>et al.</i> , 2015
PPLP2	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i>	Permeabilisierung der EM in aktivierten Gametozyten; Lokalisierung in vesikelartigen Strukturen in Gametozyten und in asexuellen Blutstadien	Deligianni <i>et al.</i> , 2013; Wirth <i>et al.</i> , 2014
PPLP3	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i>	Beteiligung an Durchquerung des Mitteldarmepithels durch Ookineten; vermutlich Lokalisierung in Mikronemen der Ookineten	Kadota <i>et al.</i> , 2004
PPLP4	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i>	Beteiligung an Durchquerung des Mitteldarmepithels durch Ookineten; vermutlich Lokalisierung in Mikronemen der Ookineten, in vesikelartigen Strukturen asexueller Blutstadien, weiblicher Gametozyten und den Mitteldarmstadien	Raubaud <i>et al.</i> , 2006; Wirth <i>et al.</i> , 2015
PPLP5	<i>P. berghei</i> , <i>P. falciparum</i>	Beteiligung an Durchquerung des Mitteldarmepithels durch Ookineten; vermutlich Lokalisierung in Mikronemen der Ookineten, in vesikelartigen Strukturen asexueller Blutstadien, Gametozyten und Sporoziten	Ecker <i>et al.</i> , 2007

Das in weiblichen Gametozyten zeitgleich exprimierte PPLP4 wiederum ist für den Zellaustritt der Gametozyten aus dem Erythrozyten ohne funktionale Bedeutung, während PPLP4(-)-Ookineten das Mitteldarmlumen nicht verlassen können [Wirth *et al.* 2015]. Neben PPLP4 zeigten auch reverse genetische Studien zu PPLP3 und PPLP5 eine essentielle Beteiligung dieser MACPF-Proteine an der Durchquerung des Mitteldarmepithels durch Ookineten [Ecker *et al.*, 2007; Kadota *et al.*, 2004]. Eine gemeinsame Beteiligung dieser Proteine am selben molekularen Prozess ist daher anzunehmen.

Dies führt zu der Hypothese, dass bestimmte plasmodiale Perforine wechselnde Rollen und bestimmte Funktionen in den verschiedenen Lebensstadien des Malariaerregers haben. In diesem Zusammenhang wäre die Bildung heterogener Oligomere nach Vorbild des Komplementsystems vorstellbar, welche eine stadien- und zielmembranabhängig variable Zusammensetzung aufweisen. Während das von zytotoxischen T-Zellen sekretierte Perforin-1 selbstständig an die Zielmembran bindet, zur Vorpore oligomerisiert und anschließend in die Zielmembran eingebracht wird, bilden C5b bis C8 des Komplementsystems einen Rezeptorkomplex in der Zielmembran. Erst dieser Rezeptorkomplex ermöglicht es den finalen porenbildenden C9-Monomeren an die Membran zu binden und die finale Membranpore zu bilden. Obwohl alle genannten Komplementfaktoren über eine MACPF-Domäne verfügen, können jedoch nur C8 alpha-gamma und C9 in die Membran integrieren [Dunstone und Tweten, 2012]. Für das molekulare Zusammenspiel von PPLP3, PPLP4 und PPLP5 wird, in Anlehnung an diese beiden Funktionsmodelle, ein komplementähnliches System angenommen. Ein Membranrezeptor, bestehend aus zwei PPLPs, rekrutiert die dritte, porenbildende Komponente. Der exakte Mechanismus hinter der Porenbildung und die physiologische Bedeutung dieses Vorgangs müssen jedoch erst noch untersucht werden. Für PPLP1 konnte hingegen eine calciumabhängige Membranporenbildung gezeigt werden, wie sie bereits von Perforin-1 bekannt ist [Garg *et al.*, 2013]. Der hämolytische Effekt von rekombinantem PPLP2 lässt auf ein ähnliches Funktionsprinzip schließen, wobei der Einfluss von Calcium in diesem Zusammenhang noch näher untersucht werden muss [Wirth *et al.*, 2014]. **Tabelle 4.1** fasst die aktuellen Forschungsdaten zur Expression und Funktion der fünf PPLPs in *Plasmodium* zusammen.

5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Beteiligung von Vertretern der PPLPs an zwei für die Transmission des humanpathogenen Malariaparasiten *P. falciparum* entscheidenden Prozessen nachgewiesen. Während PPLP2 als für die Permeabilisierung der EM essentieller Faktor identifiziert wurde, zeigten reverse genetische Studien für PPLP4 eine Beteiligung an der Durchquerung des Mitteldarmepithels durch Ookineten. Auffälligerweise werden jedoch stets mehrere Mitglieder der PPLP-Familie in den verschiedenen Lebensstadien des Parasiten exprimiert, obwohl genetische Studien deutliche Hinweise darauf liefern, dass die Funktion der PPLPs streng stadienspezifisch ausgerichtet ist. Im nächsten Schritt wird daher die Funktionsweise dieser Proteine genauer zu definieren sein und es gilt zu bestimmen, ob die Bildung von Membranporen von einem einzelnen PPLP-Vertreter ausgehen kann oder ob mehrere PPLPs miteinander interagieren.

Der Verbleib der verschiedenen in Gametozyten exprimierten PPLPs während der Gametogenese soll mittels Western-Blot-Studien und Immunoelektronenmikroskopie untersucht werden. Bisherige Bemühungen zur Gewinnung von Immunseren gegen die plasmodialen Perforine zum Einsatz in diesen Methoden blieben erfolglos. Alternativ sollen daher genetisch veränderter Parasitenzelllinien hergestellt werden, welche eine zweifach getaggte Form der PPLPs exprimieren. Anhand geeigneter Tags sollen die einzelnen PPLPs immunodetektiert werden. Gleichzeitig können verwendete Affinitätstags auch zur Reinigung dieser Proteine aus Parasitenlysat verwendet werden. Auf diese Weise sollen mögliche Interaktionspartner des nativen Proteins isoliert und im Anschluss massenspektrometrisch bestimmt werden.

Für eine eingehende funktionale Charakterisierung der einzelnen PPLPs sollen aktive rekombinante Proteinvarianten im eukaryotischen Expressionssystem, z. B. *Pichia pastoris*, hergestellt werden. Neben rekombinanten Proteinen, welche die gesamte Länge des jeweiligen PPLPs umfassen, sollen auch gezielt Fragmente exprimiert werden. In Hämolyseassays sollen unter verschiedenen Pufferkonditionen zunächst membranolytisch aktive rekombinante PPLPs identifiziert werden. Ein anschließender Vergleich der hämolytischen Aktivität der dazugehörigen Proteinvarianten miteinander soll dann Aufschluss über die Notwendigkeit der verschiedenen Proteindomänen für die Funktion des Proteins geben. Diese Methode kann auch zur Klärung der Frage nach einer calciumabhängigen Regulatorfunktion des C-Terminus der PPLPs angewandt werden.

Im Hinblick auf das humane Perforin-1 ergibt sich zudem eine weitere Möglichkeit für das selektive Vorgehen der PPLPs: Zytotoxische T-Lymphozyten schützen sich durch die Oberflächenpeptidase Cathepsin B (Genidentifikationsnummer NP_680090.1) vor einer perforinabhängigen Membranschädigung [Balaji *et al.*, 2002]. Der Vergleich der

Aminosäuresequenz dieses Proteins mit plasmodialen Sequenzen der „NCBI Protein Reference Sequences“-Datenbank mittels Protein-Blast („NCBI blastp“) ergab sechs homologe Peptidasen mit einem E-Wert unter $1e-11$ (**Tab. 5.1**). Rekombinante Proteine, welche jeweils die gesamte Proteinsequenz dieser Kandidaten umfassen, sollen auf ihre Fähigkeit zur proteolytischen Spaltung der einzelnen PPLPs mittels Western-Blot-Analyse hin untersucht werden. Desweiteren können die rekombinanten Peptidasen in Hämolyseassays mit membranolytisch aktiven rekombinanten PPLPs verwendet werden, um einen möglichen inhibitorischen Effekt auf die Hämoglobinfreisetzung feststellen zu können.

Tab. 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse eines Protein-Blasts mit humanem Cathepsin B (Genidentifikationsnummer NP_680090.1, UniGene.org) als Referenzsequenz im Genom von *P. falciparum* (Datenbank „Reference proteins“). Der Blast wurde mit dem Programm „NCBI blastp“ durchgeführt.

Gen-ID	Name	Score	E-Wert	Identität
PF3D7_1116700	Dipeptidyl-Amino-peptidase 1 (DPAP1)	93,2	4e-21	27 %
PF3D7_1247800	Dipeptidyl-Amino-peptidase 2 (DPAP2)	73,9	8e-15	26 %
PF3D7_1458000	Cystein-Proteinase Falcipain 1 (FP1)	72,8	2e-14	23 %
PF3D7_1115700	Cystein-Proteinase Falcipain 2 (FP2A)	69,3	2e-13	24 %
PF3D7_1115300	Cystein-Proteinase Falcipain 2b (FP2B)	68,2	5e-13	24 %
PF3D7_1115400	Cystein-Proteinase Falcipain 3 (FP3)	61,6	7e-11	25 %

Das humane Serumprotein Vitronectin (Genidentifikationsnummer NP_000629.3) ist ebenfalls Teil eines körpereigenen Selbstschutzmechanismus. Durch seine Bindung an den C5b-7-Komplex, eine Vorstufe des finalen Membranangriffskomplex des Komplementsystems, sowie an monomeres Perforin-1, verhindert Vitronectin eine unspezifische Membranporenbildung in körpereigenen Zellen [Podack *et al.*, 1978; Tschopp *et al.*, 1986b]. Der Effekt von Vitronectin auf die membranolytische Aktivität von PPLP1 und PPLP2 soll sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht werden. Die *in vitro*-Analyse soll im Rahmen von Hämolyseassays mit rekombinantem PPLP1 und PPLP2 durchgeführt werden. Für *in vivo*-Untersuchungen sollen *P. falciparum*-Parasiten selbst Vitronectin episomal exprimieren. Stadienspezifische Promotoren ermöglichen dabei eine getrennte Betrachtung des Einflusses von Vitronectin auf Blutschizonten und reife Gametozyten als intraerythrozytäre Zellaustrittsstadien. Alternativ können Erythrozyten auch mit kommerziell erhältlichem humanem Vitronectin beladen und anschließend für eine Infektion durch *P. falciparum*-Merozoiten verwendet werden [Murphy *et al.*, 2006]. Potenzielle Auswirkungen auf die Membranrupturen während des Zellaustrittsprozesses der untersuchten Parasitenstadien sollen u. a. durch TEM-Untersuchungen der behandelten Parasiten erfasst werden.

Eine Identifikation der molekularen Funktionsweise und der Regulationsmechanismen hinter der in der vorliegenden Arbeit identifizierten membran- und stadienspezifischen Aktivität der plasmodialen PLPs würde wesentlich zu einem vollständigen Verständnis der vielfältigen Membranrupturereignisse im Lebenszyklus des Malariaerregers *P. falciparum* beitragen. Die Kenntnis über mögliche Selbstschutzmechanismen des Parasiten in Form von Oberflächenproteinen ist zudem von Interesse bei der stetigen Suche nach potenziellen Wirkstoffzielen für die Therapie und Prävention von Malaria.

6. Zusammenfassung

Sowohl in der asexuellen Phase des obligat intrazellulären Malariaerregers *P. falciparum* im Menschen, als auch während seiner sexuellen Replikationsphase im *Anopheles*-Vektor wechselt der Parasit wiederholt die Wirtszelle. Von besonderem Interesse ist dabei der Austritt aktivierter Gametozyten aus dem Wirtserythrozyten im Mitteldarm der Mücke. Dies markiert den Beginn der Sexualphase und ist für die Transmission des Malariaerregers unverzichtbar. Der Zellaustritt wird vom Parasiten aktiv reguliert und beginnt mit der Ruptur der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM), gefolgt von der Erythrozytenmembran (EM). Eine detaillierte Kenntnis der Mitteldarmstadien ist Grundvoraussetzung für die Entwicklung transmissionsblockierender Strategien als Teil der Malariaprävention. Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der fünf plasmodialen Perforin-artigen Proteine (PPLP1 bis 5) hinsichtlich ihrer potenziellen Beteiligung am Austritt aktivierter Gametozyten.

Zunächst wurde das Expressionsmuster von PPLP1 bis 5 in Blutschizonten und Gametozyten untersucht. Mittels Immunfluoreszenzassays (IFA) konnte gezeigt werden, dass in beiden Stadien mehrere Vertreter dieser Proteinfamilie zeitgleich vorliegen. Die Charakterisierung von PPLP2 und PPLP4 durch Methoden der reversen Genetik ergab, dass PPLP2, jedoch nicht PPLP4, essentiell für den Zellaustritt der Gametozyten ist. Tatsächlich konnte durch Messung der Hämoglobinfreisetzung und elektronenmikroskopische Analyse gezeigt werden, dass PPLP2 an der Permeabilisierung der EM einige Minuten vor deren Ruptur direkt beteiligt ist. Aktivierte PPLP2-defiziente Gametozyten konnten zwar die Ruptur der PVM einleiten, die fertig entwickelten Gameten verblieben jedoch im Wirtserythrozyten. Hierdurch wurde die Transmission des Parasiten zur Mücke unterbunden.

Für PPLP4 konnte mittels IFAs eine geschlechtsspezifische Expression in weiblichen Gametozyten nachgewiesen werden. PPLP4-defiziente Gametozyten durchlaufen die Gametogenese vollständig, in Fütterungsexperimenten mit dem *Anopheles*-Vektor akkumulieren die Ookineten jedoch im Mitteldarm der Mücke. Dies deutet auf eine essentielle Rolle von PPLP4 bei der Infektion des Mücken-Vektors hin.

PPLP2 und PPLP4 konnten somit eigenständige, essentielle Funktionen bei der Transmission des Malariaparasiten zum *Anopheles*-Vektor zugeordnet werden. Diese Resultate vervollständigen eine erste funktionale Charakterisierung aller fünf plasmodialen Perforine und belegen eine streng stadienspezifische Funktionsweise der PPLPs. Die molekularen Grundlagen der unterschiedlichen Funktionen und Regulierungsprozesse gilt es jedoch als Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten zu klären.

Mit der Identifizierung von PPLP2 und PPLP4 als essentielle Faktoren für die Weiterführung des *P. falciparum*-Lebenszyklus im Mitteldarm der Mücke konnte zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Malariatransmission beigetragen werden.

7. Summary

The obligate intracellular malaria parasite *Plasmodium falciparum* undergoes several changes of host cells during its intraerythrocytic blood cycle in the human host as well as during its sexual phase in the *Anopheles* vector. Of particular interest in this area is the egress of activated mature gametocytes from the host erythrocyte upon transmission to the mosquito midgut. This process marks the beginning of the sexual phase and is essential for the transmission of the malaria parasite. Host cell egress is actively regulated by the parasite and starts with rupture of the parasitophorous vacuole membrane (PVM) followed by the erythrocyte membrane (EM). Detailed knowledge about *P. falciparum* midgut stages is a prerequisite for development of transmission blocking strategies as part of malaria prevention. The aim of this thesis therefore was the analysis of five plasmodial perforin-like proteins (PPLP1 to 5) regarding their potential role during gametocyte egress.

First of all, the expression pattern of PPLP1 to 5 in blood schizonts and activated gametocytes was investigated. Using immunofluorescence assays (IFA), simultaneous expression of several members of the PPLP family was detected for both parasite stages. However, characterization of PPLP2 and PPLP4 using reverse genetics showed that only PPLP2, not PPLP4, is essential for gametocyte egress. Participation of PPLP2 in EM permeabilization prior to membrane rupture was successfully demonstrated by quantification of hemoglobine release and electron microscopy. Although activated PPLP2-deficient gametocytes were able to initiate PVM rupture, the fully developed gamete remained trapped inside the host cell, therefore blocking parasite transmission to the mosquito.

Regarding PPLP4, IFAs revealed female specific expression of the protein in gametocytes. PPLP4-deficient gametocytes complete gametogenesis but standard membrane feeding assays using *Anopheles* mosquitoes revealed a severely reduced formation of oocysts, while ookinetes accumulate in the mosquito midgut. These results point to an essential role of PPLP4 in the infection of the mosquito vector.

It has therefore been shown for PPLP2 and PPLP4 that both perforin-like proteins play independent roles in transmission of the malaria parasite to the *Anopheles* vector. These results complete the initial functional characterization of all five plasmodial perforins and provide evidence for a strict stage specific mode of action of the PPLPs. Basic molecular principles of different functions and regulation processes displayed by the PPLPS will be subject to future research projects.

The identification of PPLP2 and PPLP4 as essential factors for progress of the *P. falciparum* life cycle upon transmission to the mosquito midgut contributed to a better understanding of the molecular mechanisms during transmission of the malaria parasite.

8. Literaturverzeichnis

- Abkarian M, Massiera G, Berry L, Roques M, Braun-Breton C (2011).** A novel mechanism for egress of malarial parasites from red blood cells. *Blood*, 117(15), pp. 4118–24.
- Abu Bakar N, Klonis N, Hanssen E, Chan C, Tilley L (2010).** Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Cell Sci* 123, pp. 441–50.
- Adl SM, Leander BS, Simpson AG, Archibald JM, Anderson OR, Bass D, et al. (2007).** Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst Biol* 56, pp. 684–689.
- Aikawa M, Carter R, Ito Y, Nijhout MM (1984).** New observations on gametogenesis, fertilization, and zygote transformation in *Plasmodium gallinaceum*. *J Protozool* 31, pp. 403–413.
- Alano P, Read D, Bruce M, Aikawa M, Kaido T, Tegoshi T, et al. (1995a).** COS cell expression cloning of Pfg377, a *Plasmodium falciparum* gametocyte antigen associated with osmiophilic bodies. *Mol Biochem Parasitol* 74, pp. 143–56.
- Alano P, Roca L, Smith DK, Read D, Carter R, Day K (1995b).** *Plasmodium falciparum*: Parasites Defective in Early Stages of Gametocytogenesis. *Exp Parasitol* 81, pp. 227–235.
- Aly ASI, Vaughan AM, Kappe SHI (2009).** Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu Rev Microbiol* 63, pp. 195–221.
- Arastu-Kapur S, Ponder EL, Fonovic UP, Yeoh S, Yuan F, Fonovic M, et al. (2008).** Identification of proteases that regulate erythrocyte rupture by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Chem Biol* 4, pp. 203–213.
- Aurrecochea C, Brestelli J, Brunk BP, Dommer J, Fischer S, Gajria B, et al. (2009).** PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Res* 37, pp. 539–43.
- Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA (2002).** Surface Cathepsin B Protects Cytotoxic Lymphocytes from Self-destruction after Degranulation. *J Exp Med* 196, pp. 493–503.
- Baum J, Richard D, Healer J, Rug M, Krnajski Z, Gilberger TW et al. (2006).** A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. *J Biol Chem*. 281, pp: 5197–208.
- Beier MS, Pumpuni CB, Beier JC, Davis JR (1994).** Effects of paraaminobenzoic acid, insulin, and gentamicin on *Plasmodium falciparum* development in anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 31, pp. 561–565.
- Bhakdi S, Ey P, Bhakdi-Lehnen B (1976).** Isolation of the terminal complement complex from target sheep erythrocyte membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 419, pp. 445–457.
- Biesecker G, Lachmann P, Henderson R (1993).** Structure of complement poly-C9 determined in projection by cryo-electron microscopy and single particle analysis. *Mol Immunol* 30, pp. 1369–1382.
- Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B, Brinkmann V (2004).** Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* 117, pp. 503–514.
- Blackman MJ, Bannister LH (2001).** Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol* 117, pp. 11–25.
- Burton NM und Bruce LJ (2011).** Modelling the structure of the red cell membrane. *Biochem. Cell Biol* 89, pp. 200–215.
- Chandramohanadas R, Davis PH, Beiting DP, Harbut MB, Darling C, Velmourougane G, et al. (2009).** Apicomplexan parasites co-opt host calpains to facilitate their escape from infected cells. *Science* 324, pp. 794–797.

- Child MA, Epp C, Bujard H, Blackman MJ (2010).** Regulated maturation of malaria merozoite surface protein-1 is essential for parasite growth. *Mol Microbiol* 78, pp. 187–202.
- Cowman AF, Crabb BS (2006).** Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell* 124, pp. 755–66.
- Crompton PD, Moebius J, Portugal S, Waisberg M, Hart G, Garver LS, et al. (2014).** Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. *Annu Rev Immunol* 32, pp. 157–87.
- de Koning-Ward TF, Olivieri A, Bertuccini L, Hood A, Silvestrini F, Charvalias K, et al. (2008).** The role of osmiophilic bodies and Pfg377 expression in female gametocyte emergence and mosquito infectivity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 67:278–90.
- Deligianni E, Morgan RN, Bertuccini L, Wirth CC, Silmon de Monerri NC, Spanos L, et al. (2013).** A perforin-like protein mediates disruption of the erythrocyte membrane during egress of *Plasmodium berghei* male gametocytes. *Cell Microbiol* 15, pp. 1438–55.
- de Sousa Abreu R, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C (2009).** Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* 5(12), pp. 1512–1526.
- Dessens JT, Sidén-Kiamos I, Mendoza J, Mahairaki V, Khater E, Vlachou D, et al. (2003).** SOAP, a novel malaria ookinete protein involved in mosquito midgut invasion and oocyst development. *Mol Microbiol* 49, pp. 319–329.
- Dua M, Raphael P, Sijwali PS, Rosenthal PJ, Hanspal M (2001).** Recombinant falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane ankyrin and protein 4.1. *Mol Biochem Parasitol* 116, pp. 95–99.
- Duffy P E und Kaslow D C (1997).** A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines. *Infection and Immunity* 65, pp. 1109–1113.
- Dunstone MA und Tweten RK (2012).** Packing a punch: the mechanism of pore formation by cholesterol dependent cytolysins and membrane attack complex/perforin-like proteins. *Curr Opin Struct Biol* 22, pp. 342–349.
- Ecker A, Pinto SB, Baker KW, Kafatos FC, Sinden RE (2007).** *Plasmodium berghei*: Plasmodium perforin-like protein 5 is required for mosquito midgut invasion in *Anopheles stephensi*. *Exp Parasitol* 116, pp. 504–508.
- Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, et al. (2002).** A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 419, pp. 520–526.
- Franco T und Low PS (2010).** Erythrocyte adducin: a structural regulator of the red blood cell membrane. *Transfus Clin Biol* 17, pp. 87–94.
- Frevert U (2004).** Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol* 20, pp. 417–424.
- Fruth IA und Arrizabalaga G (2007).** *Toxoplasma gondii*: induction of egress by the potassium ionophore nigericin. *Int J Parasitol* 37, pp. 1559–1567.
- Ecker A, Pinto SB, Baker KW, Kafatos FC, Sinden RE (2007).** *Plasmodium berghei*: Plasmodium perforin-like protein 5 is required for mosquito midgut invasion in *Anopheles stephensi*. *Exp Parasitol* 116, pp. 504–508.
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, et al. (2014).** Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42(Database issue):D222–30.
- Furuya T, Mu J, Hayton K, Liu A, Duan J, Nkrumah L, et al. (2005).** Disruption of a *Plasmodium falciparum* gene linked to male sexual development causes early arrest in gametocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, pp. 16813–16818.
- Garg S, Agarwal S, Kumar S, Yazdani SS, Chitnis CE, Singh S (2013).** Calcium-dependent permeabilization of erythrocytes by a perforin-like protein during egress of malaria parasites. *Nat Commun* 4, p. 1736.
- Glushakova S, Yin D, Li T, Zimmerberg J (2005).** Membrane transformation during malaria parasite re-lease from human red blood cells. *Curr Biol* 15, pp. 1645–1650.
- Glushakova S, Mazar J, Hohmann-Marriott MF, Hama E, Zimmerberg J (2009).** Irreversible effect of cysteine protease inhibitors on the release of malaria parasites from infected erythrocytes. *Cell Microbiol*, 11(1), pp. 95–105.

- Glushakova S, Humphrey G, Leikina E, Balaban A, Miller J, Zimmerberg J (2010).** New stages in the program of malaria parasite egress imaged in normal and sickle erythrocytes. *Curr Biol* 20, pp. 1117–1121.
- Graewe S, Rankin KE, Lehmann C, Deschermeier C, Hecht L, Froehlke U, et al. (2011).** Hostile takeover by Plasmodium: reorganization of parasite and host cell membranes during liver stage egress. *PLoS Pathog* 7, e1002224.
- Greenwood BM und Targett GaT (2011).** Malaria vaccines and the new malaria agenda. *Clin Microbiol Infect* 17(11), pp. 1600–1607.
- Hall R, Hyde JE, Goman M, Simmons DL, Hope IA, Mackay M, et al. (1984).** Major surface antigen gene of a human malaria parasite cloned and expressed in bacteria. *Nature* 311, pp. 379–382.
- Harding CR und Meissner M (2014).** The inner membrane complex through development of Toxoplasma gondii and Plasmodium. *Cell Microbiol.* 16, pp. 632–41.
- Hurley JH und Misra S (2000).** Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29, pp. 49–79.
- Ifediba T, Vanderberg JP (1981).** Complete in vitro maturation of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Nature* 294, pp. 364-366.
- Ishino T, Chinzei Y und Yuda M (2005).** A Plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. *Cell Microbiol* 7(2), pp. 199–208.
- Jackson KE, Spielmann T, Hanssen E, Adisa A, Separovic F, Dixon MW, et al. (2007).** selective permeabilization of the host cell membrane of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells with streptolysin O and equinatoxin II. *Biochem J* 403, pp. 167–75.
- Janouskovec J, Horák A, Oborník M, Lukes J, Keeling PJ (2010).** A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, pp. 10949–54.
- Janse CJ, van der Klooster PF, van der Ploeg M, Overdulve JP (1986).** Rapid repeated DNA replication during microgametogenesis and DNA synthesis in young zygotes of *Plasmodium berghei*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80(1), pp. 154-7.
- Kadota K, Ishino T, Matsuyama T, Chinzei Y, Yuda M (2004).** Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, pp. 16310-16315.
- Kafsack BF, Pena JD, Coppens I, Ravindran S, Boothroyd JC, Carruthers VB (2009).** Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science* 323, pp. 530–533.
- Kafsack BFC und Carruthers VB (2010).** Apicomplexan perforin-like proteins. *Communicative & Integrative Biology* 3(1), pp. 18–23.
- Kaiser K, Camargo N, Coppens I, Morrisey JM, Vaidya AB, Kappe SH (2004).** A member of a conserved Plasmodium protein family with membrane-attack complex/perforin (MACPF)-like domains localizes to the micronemes of sporozoites. *Mol Biochem Parasitol* 133, pp.15-26.
- Kariuki MM, Kiara JK, Mulaa FK, Mwangi JK, Wasunna MK, Martin SK (1998).** *Plasmodium falciparum*: purification of the various gametocyte developmental stages from in vitro-cultivated parasites. *Am J Trop Med Hyg* 59, pp. 505-508.
- Kawamoto F, Alejo-Blanco R, Fleck SL, Kawamoto Y, Sinden RE (1990).** Possible roles of Ca²⁺ and cGMP as mediators of the exflagellation of Plasmodium berghei and Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* 42, pp. 101–108.
- Kawamoto F, Fujioka H, Murakami R, Syafruddin Hagiwara M, Ishikawa T, Hidaka H (1993).** The roles of Ca²⁺/calmodulin- and cGMP-dependent pathways in gametogenesis of a rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *Eur J Cell Biol* 60, pp. 101–107.
- Kiszewski A, Mellinger A, Spielman A, Malaney P, Sachs SE, Sachs J (2004)** A global index representing the stability of malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg* 70, pp. 486-498.

- Knapp B, Hundt E, Kiipper HA (1990).** *Plasmodium falciparum* aldolase: gene structure and localization. *Mol Biochem Parasitol* 40, pp. 1–12.
- Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJM, et al. (1997).** A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science* 275, pp. 1485–9.
- Kolb WP, Haxby JA, Arroyave CM, Muller-Eberhard HJ (1972).** Molecular analysis of the membrane attack mechanism of complement. *J Exp Med* 135, pp. 549–566.
- Kondos SC, Hatfaludi T, Voskoboinik I, Trapani JA, Law RH, Whisstock JC, Dunstone MA (2010).** The structure and function of mammalian membrane-attack-complex/perforin-like proteins. *Tiss Antigens* 76, pp. 341–351.
- Kono M, Herrmann S, Loughran NB, Cabrera A, Engelberg K, Lehmann C, et al. (2012).** Evolution and architecture of the inner membrane complex in asexual and sexual stages of the malaria parasite. *Mol Biol Evol.* 29, pp. 2113–32.
- Kuehn A und Pradel G (2010).** The coming-out of malaria gametocytes. *J Biomed Biotechnol* 2010, 976827.
- Lal K, Delves MJ, Bromley E, Wastling JM, Tomley FM, Sinden RE (2009).** Plasmodium male development gene-1 (mdv-1) is important for female sexual development and identifies a polarised plasma membrane during zygote development. *Int J Parasitol* 39, pp. 755–761.
- Lambros C und Vanderberg JP (1979).** Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 65, pp. 418–420.
- Lanfrancotti A, Bertuccini L, Silvestrini F, Alano P (2007).** *Plasmodium falciparum*: mRNA co-expression and protein co-localisation of two gene products upregulated in early gametocytes. *Exp Parasitol* 116, pp. 497–503.
- Langer RC und Vinetz JM (2001).** Plasmodium ookinete-secreted chitinase and parasite penetration of the mosquito peritrophic matrix. *Trends Parasitol* 17, pp. 269–272.
- Law RH, Lukoyanova N, Voskoboinik I, Caradoc-Davies TT, Baran K, Dunstone MA, et al. (2010).** The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature* 468, pp. 447–451.
- Le Bonniec S, Deregnacourt C, Redeker V, Banerjee R, Grellier P, Goldberg DE, Schrevel, J. (1999).** Plasmepsin II, an acidic hemoglobinase from the *Plasmodium falciparum* food vacuole, is active at neutral pH on the host erythrocyte membrane skeleton. *J Biol Chem* 274, pp. 14218–14223.
- Levine ND (1970).** Taxonomy of the sporozoa. *J Parasitol* 56, pp. 208–9.
- Li J, Mitamura T, Fox BA, Bzik DJ, Horii T (2002).** Differential localization of processed fragments of *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen and further processing of its N-terminal 47 kDa fragment. *Parasitol Int* 5, pp. 343–352.
- Maier AG, Rug M, O'Neill MT, Brown M, Chakravorty S, Szeszak T, et al. (2008).** Exported proteins required for virulence and rigidity of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Cell*, 134(1), pp. 48–61.
- Maina CV, Riggs PD, Grande AG, Slatko BE, Moran LS, Tagliamonte JA, et al. (1988).** An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* 74, pp. 365–373.
- Makler MT, Piper RC, Milhous WK (1998).** Lactate Dehydrogenase and the Diagnosis of *Malaria Parasitol Today* 149, pp. 376–7.
- Mamoun CB, Gluzman IY, Goyard S, Beverley SM, Goldberg DE (1999).** A set of independent selectable markers for transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, pp. 8716–8720.
- Mauritz JM, Esposito A, Ginsburg H, Kaminski CF, Tiffert T, Lew VL (2009).** The homeostasis of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *PLoS Comput Biol* 5, e1000339.
- McRobert L, Taylor CJ, Deng W, Fivelman QL, Cummings RM, Polley SD, Billker O, Baker DA (2008).** Gametogenesis in malaria parasites is mediated by the cGMP-dependent protein kinase. *PLoS Biol* 6, e139.

- Miller LH (1972).** The ultrastructure of red cells infected by *Plasmodium falciparum* in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66, pp. 459-62.
- Miller SK, Good RT, Drew DR, Delorenzi M, Sanders PR, Hodder AN, et al. (2002).** A subset of *Plasmodium falciparum* SERA genes are expressed and appear to play an important role in the erythrocytic cycle. *J Biol Chem* 277, pp. 47524-47532.
- Millholland MG, Chandramohanadas R, Pizarro A, Wehr A, Shi H, Darling C, et al. (2011).** The malaria parasite progressively dismantles the host erythrocyte cytoskeleton for efficient egress. *MCP* 10(12), M111.010678.
- Moudy R, Manning TJ, Beckers CJ (2001).** The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 276, pp. 41492-41501.
- Muller-Eberhard HJ (1986).** The membrane attack complex of complement. *Annu Rev Immunol* 4, pp. 503-28.
- Murphy SC, Harrison T, Hamm HE, Lomasney JW, Mohandas N, Haldar K (2006).** Erythrocyte G protein as a novel target for malarial chemotherapy. *PLoS Medicine* 3(12), e528.
- Okitsu SL, Boato F, Mueller MS, Li DB, Vogel D, Westerfeld N, Zurbriggen R, Robinson, JA, Pluschke G (2007).** Antibodies elicited by a virosomally formulated *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen-5 derived peptide detect the processed 47 kDa fragment both in sporozoites and merozoites. *Peptides* 28, pp. 2051-2060.
- Olivieri A, Bertuccini L, Deligianni E, Franke-Fayard B, Currà C, Siden-Kiamos I, et al. (2015).** Distinct properties of the egress-related osmiophilic bodies in male and female gametocytes of the rodent malaria parasite *P. lasmodium berghei*. *Cellular Microbiology* 17, pp. 355-368.
- Pantaleo A, Ferru E, Carta F, Mannu F, Giribaldi G, Vono R, et al. (2010).** Analysis of changes in tyrosine and serine phosphorylation of red cell membrane proteins induced by *P. falciparum* growth. *Proteomics* 10(19), pp. 3469-3479.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011).** SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8, pp. 785-786.
- Peterson MG, Marshall VM, Smythe JA, Crewther PE, Lew A, Silva A, et al. (1989).** Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol* 9, pp. 3151-4.
- Podack ER, Kolb WP, Müller-Eberhard HJ (1978).** The C5b-6 complex: formation, isolation, and inhibition of its activity by lipoprotein and the S-protein of human serum. *J Immunol* 120(6), pp. 1841-1848.
- Podack ER und Konigsberg PJ (1984).** Cytolytic T cell granules. Isolation, structural, biochemical, and functional characterization. *J Exp Med* 160, pp. 695-710.
- Ponnudurai T, Leeuwenberg AD, Meuwissen JH (1981).** Chloroquine sensitivity of isolates of *Plasmodium falciparum* adapted to in vitro culture. *Trop Geogr Med* 33, pp. 50-54.
- Ponzi M, Siden-Kiamos I, Bertuccini L, Curra C, Kroeze H, Camarda G, et al. (2009).** Egress of *Plasmodium berghei* gametes from their host erythrocyte is mediated by the MDV-1/PEG3 protein. *Cell Microbiol* 11, pp. 1272-1288.
- Pradel G, Hayton K, Aravind L, Iyer LM, Abrahamsen MS, Meija C, et al. (2004).** A multidomain adhesion protein family expressed in *Plasmodium falciparum* is essential for transmission to the mosquito. *J Exp Med* 199, pp. 1533-44.
- Pradel G. (2007).** Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies. *Parasitology*. 134, pp. 1911-29.
- Prajapati SK und Singh OP (2013).** Remodeling of human red cells infected with *Plasmodium falciparum* and the impact of PHIST proteins. *Blood Cells Mol Dis* 51, pp. 195-202.
- Raubaud A, Brahimi K, Roth CW, Brey PT, Faust DM (2006).** Differential gene expression in the ookinete stage of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol* 150, pp. 107-113.

- Risco-Castillo V, Topcu S, Marinach C, Manzoni G, Bigorgne A, Briquet S, et al. (2015).** Plasmodium sporozoites use PLP1 to egress from transient vacuoles and escape degradation by host cell lysosomes. Konferenzbeitrag BioMalPar XI Mai 2015.
- Roiko MS und Carruthers VB (2009).** New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress. *Cell Microbiol* 11, pp. 1444–14452.
- Rosado CJ, Buckle AM, Law RH, Butcher RE, Kann WT, Bird CH, et al. (2007).** A common fold mediates vertebrate defense and bacterial attack. *Science* 317, pp. 1548–1551.
- Rosado CJ, Kondos S, Bull TE, Kuiper MJ, Law RH, Buckle AM, et al. (2008).** The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cell Microbiol* 10, pp. 1765–1774.
- Rossjohn J, Feil SC, McKinsty WJ, Tweten RK, Parker MW (1997).** Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* 89, pp. 685–692.
- Rowe JA, Claessens A, Corrigan RA, Arman M (2009).** Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med* 11: e16.
- Ruecker A, Shea M, Hackett F, Suarez C, Hirst EM, Milutinovic K, et al. (2012).** Proteolytic activation of the essential parasitophorous vacuole cysteine protease SERA6 accompanies malaria parasite egress from its host erythrocyte. *J Biol Chem* 287(45), pp. 37949–63.
- Rupp I, Bosse R, Schirmeister T, Pradel G (2008).** Effect of protease inhibitors on exflagellation in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 158, pp. 208–212.
- Russell DG und Burns RG (1984).** The polar ring of coccidian sporozoites: a unique microtubule-organizing centre. *J. Cell Sci.* 65, pp. 193–207.
- Schmidt-Christensen A, Sturm A, Horstmann S, Heussler VT (2008).** Expression and processing of *Plasmodium berghei* SERA3 during liver stages. *Cell Microbiol* 10, pp. 1723–1734.
- Severini C, Silvestrini F, Sannella A, Barca S, Gradoni L, Alano P (1999).** The production of the osmiophilic body protein Pfg377 is associated with stage of maturation and sex in *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Mol Biochem Parasitol* 100, pp. 247–252.
- Sharma P und Chitnis CE (2013).** Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens. *Curr Opin Microbiol* 16, pp. 432–7.
- Shatursky O, Heuck AP, Shepard LA, Rossjohn J, Parker MW, Johnson AE, Tweten RK (1999).** The mechanism of membrane insertion for a cholesterol-dependent cytolysin: a novel paradigm for pore-forming toxins. *Cell* 99, pp. 293–299.
- Shepard LA, Heuck AP, Hamman BD, Rossjohn J, Parker MW, Ryan KR, et al. (1998).** Identification of a membrane-spanning domain of the thiol-activated pore-forming toxin *Clostridium perfringens* perfringolysin O: an alpha-helical to beta-sheet transition identified by fluorescence spectroscopy. *Biochem* 37, pp. 14563–14574.
- Shin OH, Lu J, Rhee JS, Tomchick DR, Pang ZP, Wojcik SM, et al. (2010).** Munc13 C2B domain is an activity-dependent Ca²⁺ regulator of synaptic exocytosis. *Nat Struct Mol Biol* 17, p. 280.
- Silvestrini F, Bozdech Z, Lanfrancotti A, Di Giulio E, Bultrini E, Picci L, et al. (2005).** Genome-wide identification of genes upregulated at the onset of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 143, pp. 100–110.
- Simon N, Lasonder E, Scheuermayer M, Kuehn A, Tews S, Fischer R, et al. (2013).** Malaria parasites co-opt human factor H to prevent complement-mediated lysis in the mosquito midgut. *Cell Host Microbe* 13, pp. 29–41.
- Sinden RE (1982).** Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro: an electron microscopic study. *Parasitology* 84, pp. 1–11.

- Sologub L, Kuehn A, Kern S, Przyborski J, Schillig R, Pradel G (2011).** Malaria proteases mediate inside-out egress of gametocytes from red blood cells following parasite transmission to the mosquito. *Cell Microbiol* 13, pp. 897–912.
- Stallmach R, Kavishwar M, Withers-Martinez C, Hackett F, Collins CR, Howell Sa, et al. (2015).** *Plasmodium falciparum* SERA5 plays a non-enzymatic role in the malarial asexual blood-stage lifecycle. *Mol Micro* 96(2), pp. 368-387.
- Stephens JWW und Christophers SR (1904).** The practical study of malaria and other blood parasites. *University Press of Liverpool, London*.
- Su X, Hayton K, Wellems TE (2007).** Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. *Nature Rev Genet* 8, pp. 497–506.
- Suaréz-Cortés P, Silvestrini F, Alano P (2014).** A fast, non-invasive, quantitative staining protocol provides insights in *Plasmodium falciparum* gamete egress and in the role of osmiophilic bodies. *Malar J.* 13, p. 389.
- Talman AM, Lacroix C, Marques SR, Blagborough AM, Carzaniga R, Menard R, Sinden RE (2011).** PbGEST mediates malaria transmission to both mosquito and vertebrate host. *Mol Microbiol* 82, pp. 462–474.
- Templeton TJ, Keister DB, Muratova O, Procter JL, Kaslow DC (1998).** Adherence of erythrocytes during exflagellation of *Plasmodium falciparum* microgametes is dependent on erythrocyte surface sialic acid and glycoporphins. *J. Exp. Med.* 187, pp. 1599-1609.
- Tilley SJ, Orlova EV, Gilbert RJ, Andrew PW, Saibil HR (2005).** Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* 121, pp. 247–256.
- Tomas AM, Margos G, Dimopoulos G, van Lin LHM, de Koning-Ward TF, Sinha R, et al. (2001).** P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *EMBO J* 20, pp. 3975-3983.
- Torres JA, Rodriguez MH, Rodriguez MC, de la Cruz Hernandez-Hernandez F (2005).** *Plasmodium berghei*: effect of protease inhibitors during gametogenesis and early zygote development. *Exp Parasitol* 111, pp. 255–259.
- Tschopp J, Masson D, Stanley KK (1986a).** Structural/ functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytolysis. *Nature* 322, pp. 831–834.
- Tschopp J, Masson D, Schäfer S (1986b).** Inhibition of the lytic activity of perforin by lipoproteins. *J Immunol* 137, pp. 1950–1953.
- Voskoboinik I und Trapani JA (2006).** Addressing the mysteries of perforin function. *Immunol Cell Biol* 84, pp. 66-71.
- White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu O, Dondorp AM (2014).** Malaria. *Lancet.* 383, pp. 723–35.
- WHO (World Health Organization) (2014).** World malaria report.
- Williamson KC, Keister DB, Muratova O, Kaslow DC (1995).** Recombinant Pfs230, a *Plasmodium falciparum* gametocyte protein, induces antisera that reduce the infectivity of *Plasmodium falciparum* to mosquitoes. *Mol Biochem Parasitol* 75, pp. 33–42.
- Williamson KC (2003).** Pfs230: from malaria transmission blocking vaccine candidate toward function. *Parasite Immunol* 25, pp. 351–359.
- Wirth CC und Pradel G (2012).** Molecular mechanisms of host cell egress by malaria parasites. *Int J Med Microbiol* 302, pp. 172–178.
- Wirth CC, Glushakova S, Scheuermayer M, Repnik U, Garg S, Schaack D, et al. (2014).** Perforin-like protein PPLP2 permeabilizes the red blood cell membrane during egress of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Cell Microbiol* 16(5), pp. 709–733.
- Wirth CC, Bennink S, Scheuermayer M, Fischer R und Pradel G (2015).** Perforin-like protein PPLP4 is crucial for mosquito midgut infection by *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 201(2), pp. 90-99.

Wu Y, Sifri CD, Lei HH, Su XZ, Wellems TE (1995). Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, pp. 973-977.

Yeh E und DeRisi JL (2011). Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol.* 9: e1001138.

Yeoh S, O'Donnell RA, Koussis K, Dluzewski AR, Ansell KH, Osborne SA, et al. (2007). Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes. *Cell* 131, pp. 1072-1083.

Yuda M, Sakaida H, Chinzei Y (1999). Targeted disruption of the *Plasmodium berghei* CTRP gene reveals its essential role in malaria infection of the vector mosquito. *J Exp Med* 190, pp. 1711-1716.

Yuda M, Yano K, Tsuboi T, Torii M, Chinzei Y (2001). Von Willebrand Factor A domain- related protein, a novel microneme protein of the malaria ookinete highly conserved throughout Plasmodium parasites. *Mol Biochem Parasitol* 116, pp. 65-72.

9. Anhang

9.1. Sequenzierung des Integrationslokus

A

```
1 atg aat ata ctc ctc aaa tat cat ctt tcy tac ata ttc ttc ttt gcy cat tta att gta att aat ata aaa tgc aag gaa ata
85 aat aat aat ttg gtc aat gat gaa aaa gat agc ata aat aac ctg gaa gag cct agc ccc ttc cat att tta aaa aaa gaa aac
169 agt aac aat ata gag aat cat tct aat aaa ata aat aat ata ttt aaa aat aat tat agt tat agt tat agt tac agt tta tta
253 gat aat tct tta tat gat aat aaa tac gaa tca gat ttt ttt cct caa aaa aaa aac aat aaa aat gaa gaa aag tat aag
337 gga acy cat ggc aca aat ttt gct att ata aat gaa cat atg aat gag ata cat aat gat atg tta gga caa aat gaa ata cta
421 tct aac gaa ttg gat aca acy aaa gat ata ata aaa gag gaa cat gta aaa aat aaa aat aag aat cat tca ttt tat atg
505 aat aaa gaa aat gaa aaa aaa ttt cta gat aat act ttt cca gaa aat aaa gaa aat aat aaa aat aaa agy aat tcy aaa
589 ttt att gaa gaa aac gac ctg aac agt tca gyt gaa aat tac ttt gag aat gat aaa ttt att gaa ata gag tat cca ata aaa
673 aat aaa gat att gat gaa tat gag gaa gaa att aaa aac cga aac cat aag gaa gag gat aat aaa aat aga aca tat cat agt aat
757 ggg gag gat agt att aag agt tta aat ttt ata aat tat atg aat atg gat aaa gaa aaa aaa gga aag aaa aaa agt tat aat
841 aga aaa aaa gaa aat tat aac aac gac aat tat aac aat gat tca gat ctg att aat gct tta aaa caa gga gat tat

PLP2K02-Integ5-F >
925 agt cca gat tgc gac aca tgc aat aaa aat ata aat ggt cat atg aat aaa CGA RGC GCC RTA RGA RGA RGA atg tat gac agy

1009 aac tat tat aag gat ttt aat tta agy gat gca tta cct ata aat aaa aca cac tat agt atg tta tta aaa agt gat gat gat
>>..... Sequenz 1.....>

1093 act att att aaa gaa aaa aat gaa aat gat gta gat gat att ata aca aaa gag aaa aga aaa gaa aac tta aaa gaa gtt tat
>..... Sequenz 1.....>

1177 aat gat aaa aag aat aac tat ttg tct ctt aag tat tta ggt tta gga tat gac ata att atg ggt aat cct gaa gga gat cct
>..... Sequenz 1.....>

1261 aca ttg aac gtc gac cct ggt ttc agy gga cct gta ttg caa ata aat tta aaa gaa ata agt tta aat agt tat gat aat cat
>..... Sequenz 1.....>

1345 aaa aat gat gat aat cat atg aat gat gat att cat aaa aat gat gat aat cat atg aat agt gat aat cat aaa aat gat gaa
>..... Sequenz 1.....>
<<..... Sequenz 2.....<

1429 tat cat aaa aat gat gaa tat cat aaa aat gat gaa gac cat aat gac gat aat tat gat aat cat gct gat gyt gat aaa cgt
>..... Sequenz 1.....>
<..... Sequenz 2.....<

1513 tca aag gaa aga aag agt aag att caa aca act aat gag tcy atg aag cca tgg gtt ata cca gaa cac tcc tgc agt caa tcy
>..... Sequenz 1.....>
<..... Sequenz 2.....<

1597 aaa aat gtt gaa gaa att cga aat ttg gaa caa tac aaa tta gaa tta tta tca gac gta aag gtt agt act ccc tct agt ttc
>..... Sequenz 1.....>
<..... Sequenz 2.....<

1681 cca tat tcc ttt tct gca tct gcc gaa ttt aag aat gct tta aaa aaa tta aaa gta caa aac aat gta ata ttt ttg atg aaa
>..... Sequenz 1.....>
<..... Sequenz 2.....<

1765 ata tat tgc tta aga tat tat aca ggt ata cca ata aca aca aca agt tat aaa ttt agt gag aat ttt aaa aat gcy tta agt
<..... Sequenz 1.....>>
<..... Sequenz 2.....<

1849 aaa tta cca aaa tat ttt gat ggy tta aga gaa gat agt aaa tgt agt tat gaa tat tat att aat aaa tgy aat agt cca gaa
<..... Sequenz 2.....<

STOP
1933 tgc gaa gaa aat gta aac aag tgy atg tta ttt ttt aaa tta cat ggt aca cat gtt gca tat gaa ata TAA gcy gcc gcc aac
<..... Sequenz 2.....<

2017 gcy gcy gag ctc cag ctt ttg ttc cct tta gcy agy gtt aat tgc gcy ctt ggc gta atc atg gtc ata gct gtt tcc tgc gcy
<..... Sequenz 2.....<

2101 aaa ttg tta tcc gct cac aat tcc aca caa cat acy agc cgy aag cat aaa gty taa agc ctg ggy tgc cta atg agt gag CTR
<..... Sequenz 2.....<<

< pCAN-BSD/F
2185 MET CAC ATT ART TGC CTT gcy ctc act gcc cgc ttt cca gtc ggy aaa cct gtc gty cca gct gca tta atg aat cgy cca acy

[...]
```

B

```

1   tgt ata aac atg gaa ata tag aac aaa tca ata aat att aaa tat aaa cac tta tgt tat ata tat tta tgc ata tat gtc
82  taa aaa aaa aat aaa cgg aaa tat ata tat ata tat ata taa taa tgt aga cgt ata tat ttc att tta caa act
163 ata caa tat ata tat ata tat ata ttt ttt ttt ttt ttt ttg acg taa caa ttt tac act atg tgc ttt aaa ttt
244 tat tag tta cga tca ccg tta cac taa taa tat att tat ttt tat tgc aca ttt ttt ttt tct att gta tga ttc act
325 ttt ttt tct ttt ttc ttt ttt ttt taa atc ttt att att att att tca ctt tga tac cat taa atc aat tga atc atc

                                PPLP4 KO-Integ5-F >
406 att tat tat tgt cgt ata caa tgy gta tat atc ctt ata aat TGC TTT RRT AAC TTT TGA ACC RIT Tat ttt taa tgt aat
                                >>..... Sequenz 5.....>
487 ctt ttg aat atg atg ata ttt tca aat tat tta ttt aac ata cta atc gta tgt tac ttg ttt atc tat ata ggt tgc ttt
>..... Sequenz 5.....>
568 tct att tgt cat gat ata aaa act gac gaa aaa acc aat gaa ata ttc agc aaa tat ttg gga aaa ggc tat gat att ttg
>..... Sequenz 5.....>
649 ttt ggt tat cca tta cct aat aat gaa ctt att gac gat cca gga ttt aaa gaa gtt att ata gac aca caa tta tca att
>..... Sequenz 5.....>
730 gac aac ata tca aat tat att tgt aaa aag gaa gaa tat gta gat gtt ata gaa gac ata aat gat ata ggt tat cta gga
>..... Sequenz 5.....>
811 atg cag aaa ata aat att gat gat ttg gat aat cgt ata aaa cca ttt tca gcg tct atg cca tat aaa agc tat ttt gca
>..... Sequenz 5.....>
892 gac tta gaa att aag aag aaa aaa tat gca cta gct caa aat atg tgt gta tta aat tat gct aca tat gat tta aaa gaa
>..... Sequenz 5.....>
973 tcc ggy aac aat ata aat aag gat ttc gta tta gac att gaa aaa tta cct att tta aca aaa aac caa atg aag tta tgc
>..... Sequenz 5.....>
1054 acc aat TAA cgy ceg cca ccg cgy tgy agc tcc agc ttt tgt tcc CIT TAG TGA GGG TTA RIT Ccg cgc ttg gcg taa tca
>..... Sequenz 5.....>
1135 tgy tca tag ctg ttt cct gtg tga aat tgt tat ccg ctc aca att cca cac aac ata cga gcc gga agc ata aag tgt aaa
>..... Sequenz 5.....>

                                < pCAM 5' Seq R
1216 gcc tgy ggt gcc taa tga gty agC TAA CTC ACA TTA RIT GCG Ttg cgc tca ctg ccc gct ttc cag tgc gga aac ctg tgc

[...

                                pCAM-BSD/F >
5428 aaa gta caa cat taa tat ata gct ttt aat att tT RIT CCT RIT CAT GTA RIT CTT AAA ttt ttc tta aac ata tgt
                                >>... Sequenz 6.....>
5509 taa ata ttt att tct cat tat ata taa gaa cat att tat taa act gca gcc cgy ggy atc cct aat cgt atg tta ctt gtt
>..... Sequenz 6.....>
5590 tat cta tat agy ttc gtt ttc tat ttg tca tga tat aaa aac tga cga aaa aac caa tga aat att cag caa ata ttt ggy
>..... Sequenz 6.....>
5671 aaa agy cta tga tat ttt gtt tgy tta tcc att acc taa taa tga act tat tga cga tcc agy att taa aga agt tat tat
>..... Sequenz 6.....>
5752 aga cac aca att atc aat tga caa cat atc aaa tta tat ttg taa aaa gga aga ata tgt aga tgt tat aga aga cat aaa
>..... Sequenz 6.....>
5833 tga tat agy tta tct agy aat gca gaa aat aaa tat tga tga ttt gga taa tcy tat aaa acc att ttc agc gtc tat gcc
>..... Sequenz 6.....>
5914 ata taa aag cta ttt tgc aga ctt aga aat taa gaa gaa aaa ata tgc act agc tca aaa tat gtg tgt att aaa tta tgc
>..... Sequenz 6.....>
5995 tac ata tga ttt aaa aga atc cgy gaa caa tat aaa taa gga ttt cgt att aga cat tga aaa att acc tat ttt aac aaa
>..... Sequenz 6.....>
6076 aaa cca aat gaa gtt atg tac caa agt att ata tat gaa taa taa tct gca ttg ttc aga agy tat aaa aag ctg gat gaa
>..... Sequenz 6.....>

                                < PPLP4 KO 3'-Integ-R
6157 att ttt tga aaa ata tgy aac tca tgt agt att atC TGC CCA TTT TGG TGG TAT gtc att taa tac cat gga aat tac gaa
6238 aag aaa aat tga aga aat aaa aat ata taa gta taa ata ctc tct ttg gaa taa ccc ata ttt aaa tat ctt taa atc tgy
6319 atc gtt att tca aga tct tag cat taa tga tga tgy tca caa aga aaa taa aaa aaa taa tag taa taa tat taa tat
6400 aga tga gaa gaa gaa aaa tga tgc tta tat aaa aaa tga tgc gtt aat aga aca ata tag gga caa tat taa tct aga aat
6481 tcy ggy agy aaa taa ttt tga tga aaa gty gag aaa ttt aac ata ttt agt ttg gaa aaa ttc tat tta ttc taa tat agt
6562 tcc tat aca tct tga ctt gta ttc att gaa tac att cat gcc tat aga aaa aaa gga atc ata tga tat ggc ttt att att
6643 tta taa taa ttt gta ccg aat aga taa tga aaa ctt tta tct ttc tca aga cat aac aga tgt att atc cga agy aaa aca
6724 gat aac tgy ttc aaa taa agy atc ttt gat ttt aag tgc tcc ttg gta tat aaa aag cac tgy tct gat ttt cgt tta
6805 cga cag ttc tga gaa att aaa aac taa taa aag taa gga ccc caa aat aaa aat ata tcc atg tac taa taa agy gca ata
6886 tga tat tgc ttg ttc ata tat aac aaa gaa gaa aaa tat tat aac att cgy atg gat ata ctg tgt aaa gca taa ttt tat
6967 taa att tga aac gct tta tca aaa taa tga taa tat tat atc taa gga cgy taa aac att tat gag cct tac ctg cac cga
7048 agy aaa tac gat agc ttt cgy ttt taa aat gaa att aaa aaa gtt gga aaa att aga aaa gtt aaa aat aaa acc atg tac
7129 tat agy aga tga tca gtg tac tat taa taa taa taa caa aag aaa ttc cga tta ttt att atg ggy ctt ttg tgt acc ttc atc
7210 ttt tcy tag tct ttc ttc ttt aca att aac cta tat tca tga tga tac tat aca aaa tga tat acy agy agc ttg ttc aga
7291 tat ata tat taa taa ata cga taa tat ttt tct agy ttt tac ttt ttc ctt cga taa taa att tga aca agt aaa aac gga
7372 acc ttg tga aag cca atc caa ata ttg ttt tca tat aat acc aaa gaa aaa aaa aat gta tta tgt tgy gat gtt ttt
7453 att atg cag att tga tgy gaa cac gaa tag aaa gtt tac ata taa ata a

```

C

```

1   tgt ata aac atg gaa ata tag aac aaa tca ata aat att aaa tat aaa cac tta tgt tat ata tat tta tgc ata tat gtc
82  taa aaa aaa aat aaa cgg aaa tat ata tat ata tat ata tat taa taa tgt aga cgt ata tat ttc att tta caa act
163 ata caa tat ata tat ata tat ata ttt ttt
244 tat tag tta cga tca cgg tta cac taa taa tat att tat ttt tat tgc aca ttt ttt ttt ttt ttt ttt ttt ttt ttt ttt
325 ttt ttt tct ttt ttc ttt ttt ttt ttt taa atc ttt att att

                                PPLP4 KO-Integ5-F >
406 att tat tat tgt cgt ata caa tgg gta tat atc ctt sta aat TGC TTT RRT AAC TTT TGA ACC RIT Tat ttt taa tgt aat
>>.....Sequenz 7.....>

487 ctt ttg aat atg atg ata ttt tca aat tat tta ttt aac ata cta atc gta tgt tac ttg ttt atc tat ata ggt tgc ttt
>.....Sequenz 7.....>

568 tct att tgt cat gat ata aaa act gac gaa aaa acc aat gaa ata ttc agc aaa tat ttg gga aaa ggc tat gat att ttg
>.....Sequenz 7.....>

649 ttt ggt tat cca tta cct aat aat gaa ctt att gac gat cca gga ttt aaa gaa gtt att ata gac aca caa tta tca att
>.....Sequenz 7.....>

730 gac aac ata tca aat tat att tgt aaa aag gaa gaa tat gta gat gtt ata gaa gac ata aat gat ata ggt tat cta gga
>.....Sequenz 7.....>

811 atg cag aaa ata aat att gat gat ttg gat aat cgt ata aaa cca ttt tca gcg tct atg cca tat aaa agc tat ttt gca
>.....Sequenz 7.....>

892 gac tta gaa att aag aag aaa aaa tat gca cta gct caa aat atg tgt gta tta aat tat gct aca tat gat tta aaa gaa
>.....Sequenz 7.....>

973 tcc ggy aac aat ata aat aag gat ttc gta tta gac att gaa aaa tta cct att tta aca aaa aac caa atg aag tta tgt
>.....Sequenz 7.....>

                                < pCAM-BSD/R
1054 acc aat TAA cgg cgg cca cgg cgg tgg agc tcc agc ttt tgt tcc CTT TAG TGA GGG TTA RIT Gcg cgc ttg gcg taa tca
>.....Sequenz 7.....>

1135 tgg tca tag ctg ttt cct gty tga aat tgt tat cgg ctc aca att cca cac aac ata cga gcc gga agc ata aag tgt aaa

                                < pCAM 5'/Seq R
1216 gcc tgg ggt gcc taa tga gty agC TAA CTC ACA TTA RIT GCG Ttg cgc tca ctg ccc gct ttc cag tgg gga aac ctg tgg

[...

                                pCAM-BSD/R>
5428 aaa gta caa cat taa tat ata gct ttt aat att tT RIT CCT RRT CAT GTA RRT CTT RAR ttt ttc ttt tta aac ata tgt
5509 taa ata ttt att tct cat tat ata taa gaa cat att tat taa act gca gcc cgg ggy atc cct aat cgt atg tta ctt gtt
>>.....Sequenz 8.....>

5590 tat cta tat agy ttc gtt ttc tat ttg tca tga tat aaa aac tga cga aaa aac caa tga aat att cag caa ata ttt ggy
>.....Sequenz 8.....>

5671 aaa agy cta tga tat ttt gtt tgg tta tcc att acc taa taa tga act tat tga cga tcc agy att taa aga agt tat tat
>.....Sequenz 8.....>

5752 aga cac aca att atc aat tga caa cat atc aaa tta tat ttg taa aaa gga aga ata tgt aga tgt tat aga aga cat aaa
>.....Sequenz 8.....>

5833 tga tat agy tta tct agy aat gca gaa aat aaa tat tga tga ttt gga taa tcy tat aaa acc att ttc agc gtc tat gcc
>.....Sequenz 8.....>

5914 ata taa aag cta ttt tgc aga ctt aga aat taa gaa gaa aaa ata tgc act agc tca aaa tat gty tgt att aaa tta tgc
>.....Sequenz 8.....>

5995 tac ata tga ttt aaa aga atc cgg gaa caa tat aaa taa gga ttt cgt att aga cat tga aaa att acc tat ttt aac aaa
>.....Sequenz 8.....>

6076 aaa cca aat gaa gtt atg tac caa agt att ata tat gaa taa taa tct gca ttg ttc aga agy tat aaa aag ctg gat gaa
>.....Sequenz 8.....>

                                < PPLP4 KO 3'-Integ-R
6157 att ttt tga aaa ata tgy aac tca tgt agt att aTC TGC CCA TTT TGG TGG TAT gtc att taa tac cat gga aat tac gaa
>.....Sequenz 8.....>

6238 aag aaa aat tga aga aat aaa aat ata taa gta taa ata ctc tct ttg gaa taa ccc ata ttt aaa tat ctt taa atc tgg
6319 atc gtt att tca aga tct tag cat taa tgt aga tgg tca caa aga aaa taa aaa taa tag taa taa taa tat taa tat
6400 aga tga gaa gaa gaa aaa tga tgc tta tat aaa aaa tga tgt gtt aat aga aca ata tag gga caa tat taa tct aga aat
6481 tcy ggy agy aaa taa ttt tga tga aaa gty gag aaa ttt aac ata ttt agt ttg gaa aaa ttc tat tta ttc taa tat agt
6562 tcc tat aca tct tga ctt gta ttc att gaa tac att cat gcc tat aga aaa aaa gga atc ata tga tat ggc ttt att att
6643 tta taa taa ttt gta cgg aat aga taa tga aaa ctt tta tct ttc tca aga cat aac aga tgt att atc cga agy aaa aca
6724 gat aac tgy ttc aaa taa agy atc ttt gat ttt aag ttg tcc tgt tgg ata tat aaa aag cac tgy tct gat ttt cgt tta
6805 cga cag ttc tga gaa att aaa aac taa taa aag taa gga ccc caa aat aaa aat ata tcc atg tac taa taa agy gca ata
6886 tga tat tgc ttg ttc ata tat aac aaa gaa gaa aaa tat tat aac att cgy atg gat ata ctg tgt aaa gca taa ttt tat
6967 taa att tga aac gct tta tca aaa taa tga taa tat tat atc taa gga cgy taa aac att tat gag cct tac ctg cac cga
7048 agy aaa tac gat agc ttt cgy ttt taa aat gaa att aaa aat gtt gga aaa att aga aaa gtt aaa aat aaa acc atg tac
7129 tat agy aga tga tca gty tac tat taa taa tat caa aag aaa ttc cga tta ttt att atg ggy ctt ttg tgt acc ttc atc
7210 ttt tcy tag tct ttc ttc ttt aca att aac cta tat tca tga tga tac tat aca aaa tga tat acy agy agc ttg ttc aga
7291 tat ata tat taa taa ata cga taa tat ttt tct agy ttt tac ttt ttc ctt cga taa taa att tga aca agt aaa aac gga
7372 acc ttg tga aag caa atc caa ata ttg ttt tca tat att acc aaa gaa aaa aaa aat gta tta tgt tgy gat gtt ttt
7453 att atg cag att tga tgy gaa cac gaa tag aaa gtt tac ata taa ata a

```

Abb. A1 A Genomische DNS-Sequenz des *pplp2(-)*-Lokus mit positiv sequenzierten Bereichen für die 5'- und 3'-Integration des *pplp2*-pCAM-BSD-Vektorkonstrukts. Die homologe *pplp2*-Region, welche für das Vektorkonstrukt zur Unterbrechung der Gensequenz verwendet wurde, ist grau markiert. Die pCAM-Vektorsequenz ist weiß auf schwarz dargestellt. Die zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide sind mit Großbuchstaben, fett und unterstrichen eingezeichnet. Positiv sequenzierte Bereiche (Sequenzen 1-4) sind gepunktet unterstrichen und Pfeile (<; >) zeigen die 5' nach 3' Richtung an. Doppelte Pfeile (<<; >>) markieren das Ende einer Sequenzierung.

B Genomische DNS-Sequenz des *pplp4(-)1C10*-Lokus mit positiv sequenzierten Bereichen für die 5'- und 3'-Integration des *pplp4*-pCAM-BSD-Vektorkonstrukts. Die homologe *pplp4*-Region, welche für das Vektorkonstrukt zur Unterbrechung der Gensequenz verwendet wurde, ist grau hinterlegt. Die DNS-Sequenz „upstream“ des *pplp4*-Lokus ist grau geschrieben. Die pCAM-BSD-KO-Vektorsequenz ist weiß auf schwarz dargestellt. Die zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide sind mit Großbuchstaben, fett und unterstrichen eingezeichnet. Positiv sequenzierte Bereiche (Sequenzen 5 und 6) sind gepunktet unterstrichen und Pfeile (<; >) zeigen die 5' nach 3' Richtung an. Doppelte Pfeile (<<; >>) markieren das Ende einer Sequenzierung.

C Genomische DNS-Sequenz des *pplp4(-)2D6*-Lokus mit positiv sequenzierten Bereichen für die 5'- und 3'-Integration des *pplp2*-pCAM-BSD-Vektorkonstrukts. Die homologe *pplp4*-Region, welche für das Vektorkonstrukt zur Unterbrechung der Gensequenz verwendet wurde, ist grau hinterlegt. Die DNS-Sequenz „upstream“ des *pplp4*-Lokus ist grau geschrieben. Die pCAM-BSD-KO-Vektorsequenz ist weiß auf schwarz dargestellt. Die zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide sind mit Großbuchstaben, fett und unterstrichen eingezeichnet. Positiv sequenzierte Bereiche (Sequenzen 7 und 8) sind gepunktet unterstrichen und Pfeile (<; >) zeigen die 5' nach 3' Richtung an. Doppelte Pfeile (<<; >>) markieren das Ende einer Sequenzierung.

9.2. Abkürzungsverzeichnis

<i>An.</i>	<i>Anopheles</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNS	„complementary“ (komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EK	Erythrozytenkonzentrat
EM	Erythrozytenmembran
EZ	Erythrozytenzytoplasma
ICM	„Incomplete RPMI medium“ RPMI1640 Medium ohne humanes Serum
IFA	Indirekte Immunfluoreszenz Analyse
IMC	„Inner membrane complex“ (innerer Membrankomplex)
MACPF	„Membrane attack complex/perforin“
MBP	Maltose-bindendes Protein
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PBS	„Phosphate buffered saline“ (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
PPM	parasitäre Plasmamembran
PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RPMI Medium	„Roswell Park Memorial Institute“ Medium
RT	Raumtemperatur (21°C)
SEM	„Standard error of the mean“ (Standardfehler)
SMFA	„Standard membrane feeding assay“ (Membranfütterungsexperiment)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
WT	Wildtyp-Parasitenlinie NF54

9.3. Lebenslauf

9.4. Publikationen

Wirth CC, Bennink S, Scheuermayer M, Fischer R und Pradel G (2015). Perforin-like protein PPLP4 is crucial for mosquito midgut infection by *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 201(2), pp. 90-99.

Wirth CC, Glushakova S, Scheuermayer M, Repnik U, Garg S, Schaack D, Kachman MM, Weißbach T, Zimmerberg J, Dandekar T, Griffiths G, Chitnis CE, Singh S, Fischer R, Pradel G (2014). Perforin-like protein PPLP2 permeabilizes the red blood cell membrane during egress of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Cell Microbiol* 16(5), pp. 709-733.

Kern S, Agarwal S, Huber K, Gehring AP, Strödke B, **Wirth CC**, Brügl T, Abodo LO, Dandekar T, Doerig C, Fischer R, Tobin AB, Alam MM, Bracher F, Pradel G (2014). Inhibition of the SR protein-phosphorylating CLK kinases of *Plasmodium falciparum* impairs blood stage replication and malaria transmission. *PLoS One* 9(9):e105732.

Ngwa CJ, Scheuermayer M, Mair GR, Kern S, Brügl T, **Wirth CC**, Aminake MN, Wiesner J, Fischer R, Vilcinskis A, Pradel G (2013). Changes in the transcriptome of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* during the initial phase of transmission from the human to the mosquito. *BMC Genomics*. 14, p. 256.

Deligianni E, Morgan RN, Bertuccini L, **Wirth CC**, de Monerri NC, Spanos L, Blackman MJ, Louis C, Pradel G, Siden-Kiamos I (2013). A perforin-like protein mediates disruption of the erythrocyte membrane during egress of *Plasmodium berghei* male gametocytes. *Cell Microbiol*.15(8), pp. 1438-1455.

Wirth CC, Pradel G (2012). Molecular mechanisms of host cell egress by malaria parasites. *Int J Med Microbiol*. 302(4-5), pp. 172-178.