

„Funktionale Charakterisierung der Patatin-ähnlichen
Phospholipase PNPLA1 in den Blut- und Sexualstadien des
humanpathogenen Malariaerregers *Plasmodium falciparum*“

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH
Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

von

Master of Science

Ansgar Flammersfeld

aus Recklinghausen

Berichter: Univ.-Prof. Dr. phil. nat. Gabriele Pradel
Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wolfram Antonin
Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Marc Spehr

Tag der mündlichen Prüfung: 20. April 2020

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek verfügbar.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Ansgar Flammersfeld,

erkläre hiermit, dass diese Dissertation und die darin dargelegten Inhalte die eigenen sind und selbstständig, als Ergebnis der eigenen originären Forschung, generiert wurden.

Hiermit erkläre ich an Eides statt

1. Diese Arbeit wurde vollständig oder größtenteils in der Phase als Doktorand dieser Fakultät und Universität angefertigt;
2. Sofern irgendein Bestandteil dieser Dissertation zuvor für einen akademischen Abschluss oder eine andere Qualifikation an dieser oder einer anderen Institution verwendet wurde, wurde dies klar angezeigt;
3. Wenn immer andere eigene oder Veröffentlichungen Dritter herangezogen wurden, wurden diese klar benannt;
4. Wenn aus anderen eigenen oder Veröffentlichungen Dritter zitiert wurde, wurde stets die Quelle hierfür angegeben. Diese Dissertation ist vollständig meine eigene Arbeit, mit der Ausnahme solcher Zitate;
5. Alle wesentlichen Quellen von Unterstützung wurden benannt;
6. Wenn immer ein Teil dieser Dissertation auf der Zusammenarbeit mit anderen basiert, wurde von mir klar gekennzeichnet, was von anderen und was von mir selbst erarbeitet wurde;
7. Teile dieser Arbeit wurden zuvor veröffentlicht, und zwar in:

Flammersfeld, A., Panyot, A., Yamaryo-Botté, Y., Aurass, P., Przyborski, J.M., Flieger, A., Botté, C., Pradel, G. (2019). A patatin-like phospholipase functions during gametocyte induction in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cellular Microbiology* **22**: e13136.

Eigenanteil: Konzeptualisierung (AF, GP), formelle Analyse (AF, AP, PA, GP), Untersuchungen (AF, AP, YYB, CB), Methodik (AF, AP, YYB, PA, AFli, JMP, CB), Validierung (AF, AFli, CB, GP), Schreiben des Manuskripts (AF, CB, GP).

Flammersfeld, A., Lang, C., Flieger, A., Pradel, G. (2018). Phospholipases during membrane dynamics in malaria parasites. *International Journal of Medical Microbiology* 308: 129-141.

Eigenanteil: Konzeptualisierung (AF, CL, AFli, GP), Analysen (AF, CL, AFli, GP), Schreiben des Manuskripts (AF, CL, AFli, GP).

Aachen, 20.04.2020

Ort, Datum



Unterschrift

Danksagung

Bei Prof. Dr. Gabriele Pradel (RWTH Aachen University, Institut für Zoologie, Abteilung für Zelluläre und Angewandte Infektionsbiologie) bedanke ich mich äußerst herzlich für die Möglichkeit an dem spannenden Arbeitsgebiet der Malaria-Forschung teilhaben zu können. Besonders ihre fachlichen Anregungen und Diskussionen, aber auch ihre stetige Unterstützung in allen Bereichen haben sehr zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Neben der unnachgiebigen Hilfe bei der Projektarbeit schätze ich auch sehr die Möglichkeit bekommen zu haben, an zahlreichen internationalen Fachkonferenzen teilzunehmen sowie mich aktiv in die Lehre einbringen zu können.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfram Antonin (RWTH Aachen University, Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie) sowie bei Herrn Prof. Dr. Marc Spehr (RWTH Aachen University, Institut für Biologie II, Abteilung Chemosensorik) für die bereitwillige Übernahme der Rollen als Zweitgutachter.

Sehr herzlich möchte ich mich bei allen Kollaborationspartnern für die vielen konstruktiven, fachlichen Diskussionen und ihre experimentelle Unterstützung bedanken: Prof. Dr. Antje Flieger, Dr. Philipp Auraß und Dr. Christina Lang (Robert Koch-Institut, Werningerode, D) und Prof. Dr. Cyrille Botté und Dr. Yushiki Yamaryo-Botté (ApicoLipid Team, Université Grenoble Alpes, F).

Für die konstruktive Team-Arbeit und die gute Arbeitsatmosphäre möchte ich mich im Besonderen auch bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken. Besonderen Dank möchte ich Dr. Julius Ngwa, Dr. Sandra Bennink und Alexandra Golzmann aussprechen, die stets ein offenes Ohr hatten und mir mit helfender Hand zur Seite standen. Ganz besonderer Dank gilt auch Atscharah Panyot für ihre engagierte Mitarbeit am PNPLA1-Projekt im Rahmen ihrer Master-Abschlussarbeit sowie Sofia Basova und Jean Pierre Musabyimana für unterstützende Arbeit bei Experimenten.

Bei Dr. Sandra Bennink, Dr. Meike Kiesow und Timo Reiß bedanke ich mich sehr herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zum Schluss bedanke ich mich bei den für mich wichtigsten Menschen - meiner Familie und im Besonderen bei meinen Eltern, meiner Frau Julia und bei meinem Sohn Aaron: Danke für euren Rückhalt und eine immerwährende Unterstützung während des Studiums und in allen Phasen dieser Arbeit!

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	i
Tabellenverzeichnis.....	v
Zusammenfassung.....	1
Summary	2
I. Einleitung	3
I.1 Die Tropenkrankheit Malaria	3
I.2 Der Erreger der <i>Malaria tropica</i> – <i>P. falciparum</i>	6
I.3 Der Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	6
I.3.1 Die Gametozytogenese von <i>P. falciparum</i>	9
I.3.2 Die Sexualphase von <i>P. falciparum</i>	12
I.4 Membranen und Phospholipide in <i>P. falciparum</i>	14
I.4.1 Phospholipide als Hauptbestandteil biologischer Membranen	14
I.4.2 Phospholipidmetabolismus in <i>P. falciparum</i>	15
I.4.3 Die Funktion von Phospholipasen.....	21
I.4.4 Phospholipasen als Virulenzfaktoren	24
I.4.5 Plasmodiale Phospholipasen	27
I.5 Ziele der Arbeit.....	29
II. Material und Methoden	31
II.1 Materialien.....	31
II.1.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	31
II.1.2 Geräte	32
II.1.3 Puffer und Stammlösungen	33
II.1.4 Medien.....	35
II.1.5 Kommerzielle Enzyme und Laborkits.....	37
II.1.6 Molekulare Größenstandards	37

II.1.7	Plasmide	38
II.1.8	Antikörper	41
II.1.9	Genidentifikationsnummern.....	42
II.1.10	Oligonukleotide	43
II.1.11	Organismen und Zelllinien	46
II.1.12	Computerprogramme und Online-Anwendungen	47
II.2	Zellbiologische Methoden	47
II.2.1	Zellbiologische Methoden – <i>P. falciparum</i>	47
II.2.2	Zellbiologische Methoden – <i>E. coli</i>	63
II.3	Molekularbiologische Methoden.....	64
II.3.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>P. falciparum</i>	64
II.3.2	Isolierung von RNA aus <i>P. falciparum</i>	64
II.3.3	Synthese von cDNA aus isolierter RNA	66
II.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	66
II.3.5	Orts-gerichtete Mutagenese PCR	68
II.3.6	Quantitative <i>real-time</i> -RT-PCR (qRT-PCR)	69
II.3.7	Agarose-Gelelektrophorese	70
II.3.8	Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....	70
II.3.9	Photometrische Analyse von Nukleinsäuren.....	70
II.3.10	Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten und Vektoren	71
II.3.11	Ligation von DNA-Fragmenten.....	71
II.3.12	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	72
II.3.13	Sequenzierung	72
II.4	Proteinbioschemische Methoden.....	72
II.4.1	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	72
II.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Analyse	74

II.4.3	Gewinnung polyklonaler Immunsereen	75
II.4.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	75
II.4.5	Western Blot-Analyse	76
II.4.6	Zelluläre Fraktionierung von <i>P. falciparum</i> Zelllysaten	77
II.5	Sonstige Methoden	78
II.5.1	Lipidomanalyse	78
II.5.2	Bestimmung der enzymatischen Aktivität rekombinanter Proteine mit Hilfe des NEFA-Kit	79
II.5.3	<i>In silico</i> -Analysen	80
II.5.4	Statistische Analysen.....	81
III.	Ergebnisse	82
III.1	Identifizierung putativer Phospholipasen in <i>P. falciparum</i>	82
III.2	<i>In silico</i> -Analysen des PNPLA1-Proteins.....	86
III.3	Transkriptionsanalyse des <i>pnpla1</i> -Gens	89
III.4	Expression von PNPLA1 in den Blut- und Sexualstadien.....	90
III.5	Generierung von PNPLA1- <i>Knock-out</i> -Mutanten	94
III.6	Generierung einer PNPLA1- <i>Knock-down</i> -Mutante.....	96
III.6.1	Expressionsanalyse von PNPLA1-HA in der PNPLA1-KD Linie.....	100
III.7	Phänotypische Charakterisierung der PNPLA1-KO Mutanten	104
III.7.1	Einfluss des PNPLA1-Funktionsverlusts auf die asexuelle Replikation	106
III.7.2	Phänotypische Analyse der Gametozytogenese	108
III.7.3	Phänotypische Analyse der Gametogenese und Zygotenbildung	111
III.8	Phänotypische Charakterisierung der PNPLA1-KD Mutante	113
III.8.1	Einfluss des konditionellen PNPLA1-Funktionsverlusts auf die asexuelle Replikation	114
III.8.2	Phänotypische Analyse der Gametozytogenese in der PNPLA1-KD Mutante.....	116

III.9	Einfluss von LysoPC-defizientem Medium auf die Gametozyteninduktion in den PNPLA1-KO und -KD Mutanten.....	119
III.10	Vergleichende Transkriptanalyse zwischen WT NF54 und den PNPLA1-KO Linien	121
III.11	Der antiplasmodiale Effekt von Phospholipase-Inhibitoren	125
III.11.1	Der Einfluss von Phospholipase-Inhibitoren auf die asexuelle Replikation	125
III.11.2	Der Einfluss von Phospholipase-Inhibitoren auf die Gametozytenbildung	126
III.11.3	Der Einfluss von Phospholipase-Inhibitoren auf die Gametozytenreifung	128
III.11.4	Der Einfluss von Phospholipase-Inhibitoren auf die Gametogenese	129
III.12	Funktionale Charakterisierung von PNPLA1 durch episomale Überexpression.....	130
III.12.1	Verifizierung der pARLII- <i>crt</i> -/ <i>fnpa</i> - <i>pnpla1</i> - <i>gfp</i> Plasmidaufnahme	131
III.12.2	Verifizierung der PNPLA1-GFP Expression auf Proteinebene	132
III.13	Phänotypische Analyse der <i>crt</i> -/ <i>fnpa</i> -PNPLA1-GFP/WT Linien.....	135
III.14	Komplementation der PNPLA1-KO Mutanten durch episomale Expression von PNPLA1-GFP.....	136
III.14.1	Verifizierung der PNPLA1-KO (<i>crt</i> / <i>fnpa</i> Komp) Linien	136
III.14.2	Phänotypische Analyse der PNPLA1-KO (<i>crt</i> / <i>fnpa</i> Komp) Linien	138
III.15	Vergleichende Lipidomanalyse der PNPLA1-KO Mutanten	139
III.16	<i>In vitro</i> -Analyse der katalytischen Aktivität von PNPLA1	145
IV.	Diskussion	147
IV.1	<i>In silico</i> -Analysen	148
IV.2	PNPLA1 wird in den Blut- und Sexualstadien von <i>P. falciparum</i> exprimiert.....	150
IV.3	Die Rolle von PNPLA1 in der Gametozyteninduktion.....	151
IV.4	Die Rolle von PNPLA1 in der Gametogenese.....	158
IV.5	Bestimmung der enzymatischen Aktivität von PNPLA1	160
IV.6	Inhibitorstudien	162

IV.7	Phospholipasen als potenzielles Wirkstoffziel.....	164
V.	Ausblick	166
VI.	Abkürzungsverzeichnis	169
VII.	Literaturverzeichnis.....	172
VIII.	Anhang.....	200
IX.	Publikationsliste	209

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht über die Malaria-Endemiegebiete.....	3
Abbildung 2 Der Lebenszyklus des humanpathogenen Malariaerregers <i>P. falciparum</i>	7
Abbildung 3 Schematische Darstellung der Regulation zur Einleitung der Gametozytogenese in <i>P. falciparum</i>	10
Abbildung 4 Membranumgebene Zellkompartimente asexueller Blutstadien in <i>P. falciparum</i> ..	16
Abbildung 5 Schematische Darstellung des Phospholipid-Metabolismus in <i>P. falciparum</i>	19
Abbildung 6 Einteilung der verschiedenen Phospholipase-Hauptgruppen nach ihrem katalytischen Wirkungsmechanismus	22
Abbildung 7 Verwendete DNA- und Protein-Molekulargewichtsstandards	38
Abbildung 8 Synchronisation asexueller Parasitenkulturen	53
Abbildung 9 Domänenstrukturen aller putativen lipolytischen Enzyme in <i>P. falciparum</i>	84
Abbildung 10 Phylogenetische Analyse von PNPLA1	87
Abbildung 11 <i>In silico</i> 3D-Proteinstruktur Modellierung von PNPLA1	88
Abbildung 12 Genexpressionsanalyse von <i>pnpla1</i> in den Blutstadien von <i>P. falciparum</i>	89
Abbildung 13 Nachweis der Spezifität der α -PNPLA1-RP1 und α -PNPLA1-RP2-spezifischen Antiseren	91
Abbildung 14 Expressionsanalyse von PNPLA1 in den Blut- und Sexualstadien der WT NF54 Linie mittels IFA	92
Abbildung 15 Bestimmung der geschlechtsspezifischen Expression von PNPLA1	93
Abbildung 16 Schematische Darstellung der Integration des pCAM-BSD-KO Vektors in das Genom von <i>P. falciparum</i> durch Einzelstrangüberlagerung.....	94
Abbildung 17 Diagnostische PCR zum Nachweis der Vektorintegration des pCAM-BSD-KO Vektors in den PNPLA1-KO Linien A12 und C11.....	95
Abbildung 18 Verifizierung der PNPLA1-KO Linien mittels IFA und Western Blot-Analyse...	96
Abbildung 19 Schematische Darstellung der Integration des pARL-HA- <i>glnS</i> Vektors in das Genom von <i>P. falciparum</i> durch Einzelstrangüberlagerung.....	97
Abbildung 20 Diagnostische PCR zum Nachweis der Vektorintegration des pARL-HA- <i>glnS</i> Vektors in der PNPLA1-KD Linie.....	98
Abbildung 21 Western Blot-Analyse zum Nachweis der konditionellen Herunterregulierung der PNPLA1-Expression in der PNPLA1-KD Linie.....	99

Abbildung 22 Expressionsanalyse von PNPLA1-HA in den Blut- und Sexualstadien der PNPLA1-KD Linie mittels IFA	101
Abbildung 23 Expressionsanalyse von PNPLA1-HA in den Blut- und Sexualstadien der PNPLA1-KD mittels Western Blot-Analyse.....	102
Abbildung 24 Proteinfractionierung der PNPLA1-KD Zelllinie zur proteinbiochemischen Analyse von PNPLA1-HA	104
Abbildung 25 Morphologische Untersuchung von asexuellen und sexuellen Parasiten der PNPLA1-KO A12 Linie.....	105
Abbildung 26 Quantifizierung der Tochter-Merozoiten in reifen Schizonten der PNPLA1-KO A12 und C11	106
Abbildung 27 Phänotypische Charakterisierung der asexuellen Replikation der PNPLA1-KO A12 und C11 Mutanten.....	107
Abbildung 28 Phänotypische Charakterisierung der Gametozytenbildung in den PNPLA1-KO A12 und C11 Mutanten	109
Abbildung 29 Phänotypische Charakterisierung der Gametozytenreifung in den PNPLA1-KO A12 und C11 Mutanten.....	110
Abbildung 30 Untersuchung der <i>in vitro</i> -Mikro- und Makrogametogenese sowie der Zygotenbildung von reifen Gametozyten der PNPLA1-KO A12 und C11 Linien.....	111
Abbildung 31 Morphologische Untersuchung von asexuellen und sexuellen Parasiten der PNPLA1-KD Linie.....	114
Abbildung 32 Phänotypische Charakterisierung der asexuellen Replikation nach konditionellem PNPLA1-Funktionsverlust	115
Abbildung 33 Phänotypische Charakterisierung der Gametozytenbildung nach konditionellem PNPLA1-Funktionsverlust	117
Abbildung 34 Phänotypische Charakterisierung der Gametozytenbildung nach konditionellem PNPLA1-Funktionsverlust vor und nach der Gametozyteninduktion	119
Abbildung 35 Gametozyteninduktion in den PNPLA1-KO und PNPLA1-KD Mutanten mit LysoPC-defizientem Medium	121
Abbildung 36 Reinheitskontrollen für die qRT-PCRs.....	123
Abbildung 37 Vergleichende qRT-PCR zur Untersuchung der Regulation ausgewählter Gene unter LysoPC-limitierenden Bedingungen in der WT NF54 Linie und in den PNPLA1-KO Linien A12 und C11	124

Abbildung 38 Einfluss des Phospholipase-Inhibitors 4-BPB auf die Gametozyteninduktion in <i>P. falciparum</i>	127
Abbildung 39 Einfluss von Phospholipase-Inhibitoren auf die Gametozytenentwicklung von <i>P. falciparum</i>	128
Abbildung 40 Einfluss von Phospholipase-Inhibitoren auf die Bildung von Mikrogameten in <i>P. falciparum</i>	130
Abbildung 41 Schematische Darstellung des pARLII- <i>crt-pnpla1-gfp</i> - sowie des pARLII- <i>fnpa-gfp</i> -Vektors für die episomale Expression von PNPLA1-GFP	131
Abbildung 42 Diagnostische PCR zum Nachweis der Plasmidaufnahme in den <i>crt-/fnpa</i> -PNPLA1-GFP/WT Linien.....	132
Abbildung 43 Western Blot-Analyse zur Verifizierung der episomalen Expression des PNPLA1-GFP Proteins in den <i>crt-/fnpa</i> -PNPLA1-GFP/WT Linien	133
Abbildung 44 Verifizierung der <i>crt-/fnpa</i> -PNPLA1-GFP/WT Linien mittels Lebendmikroskopie	134
Abbildung 45 Morphologische Untersuchung von asexuellen und sexuellen Parasiten der <i>crt-/fnpa</i> -PNPLA-GFP/WT Linien	135
Abbildung 46 Einfluss der episomalen PNPLA1-GFP Expression auf die Gametozyteninduktion	136
Abbildung 47 Verifizierung der PNPLA1-KO (<i>crt/fnpaKomp</i>) Linien auf DNA- und Proteinebene	137
Abbildung 48 Phänotypische Analyse der PNPLA1-KO (<i>crt/fnpaKomp</i>) Linien hinsichtlich der Gametozyteninduktion	139
Abbildung 49 Morphologische Untersuchung der für die Lipidomanalyse verwendeten Ringstadium-Parasiten.	140
Abbildung 50 Transkriptanalyse der für die Lipidomanalyse verwendeten Ringstadium-Parasiten	142
Abbildung 51 Lipidomanalyse der Gesamtlipide in der parentalen WT NF54 Linie sowie in den PNPLA1-KO Mutanten A12 und C11	144
Abbildung 52 <i>In vitro</i> -Analyse der katalytischen Aktivität von PNPLA1	146
Abbildung 53 Codon-optimierte <i>pnpla1</i> -Gensequenz	200
Abbildung 54 Schematische Vektorkarte des pMAL-c5x Expressionsvektors	201
Abbildung 55 Schematische Vektorkarte des pGEX-6P-1 Expressionsvektors	201

Abbildung 56 Schematische Vektorkarte des pCAM-BSD-KO Vektors	202
Abbildung 57 Schematische Vektorkarte des pARL-HA- <i>glmS</i> Vektors	202
Abbildung 58 Schematische Vektorkarte des pARLII- <i>crt</i> -GFP Vektors	203
Abbildung 59 Schematische Vektorkarte des pARLII- <i>fnpa</i> -GFP Vektors	203
Abbildung 60 Multiples Sequenz- <i>Alignment</i> von PNPLA1 und ausgewählter homologer Proteine in anderen <i>Plasmodium</i> -Arten.....	206
Abbildung 61 Sequenzierung der Integrationsloci der PNPLA1-KO Linien	207
Abbildung 62 Sequenzierung der Integrationsloci der PNPLA1-KD Linie	208

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Lipide und Fettsäuren	31
Tabelle 2 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren.....	32
Tabelle 3 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.....	32
Tabelle 4 Zusammensetzung verwendeten Puffer und Stammlösungen	33
Tabelle 5 Verwendete Medien und ihre Zusammensetzung.....	35
Tabelle 6 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper	41
Tabelle 7 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper.....	41
Tabelle 8 Relevante Proteine und ihre zugehörigen Gen-Identifikationsnummern	42
Tabelle 9 DNA-Sequenzen der für Klonierungen verwendeten Oligonukleotide.....	43
Tabelle 10 DNA-Sequenzen der für RT-PCRs und qRT-PCRs verwendeten Oligonukleotide....	44
Tabelle 11 DNA-Sequenzen der für die Orts-gerichtete Mutagenese-PCR verwendeten Oligonukleotide.....	45
Tabelle 12 DNA-Sequenzen der für diagnostische PCRs verwendeten Oligonukleotide.....	45
Tabelle 13 Auflistung der verwendeten Zelllinien und Bakterienstämme	46
Tabelle 14 Verwendete Computerprogramme und Online-Anwendungen	47
Tabelle 15 Standard-Pipettierschemata für <i>Q5</i> ®- und <i>GoTaq</i> ®-PCR-Reaktionen.....	67
Tabelle 16 Standard <i>Thermocycler</i> -Programmierungen für PCR-Reaktionen.....	67
Tabelle 17 Standard-Pipettierschema für die Orts-gerichtete Mutagenese-PCR	68
Tabelle 18 Standard <i>Thermocycler</i> -Programmierung für die Orts-gerichtete Mutagenese-PCR..	68
Tabelle 19 Pipettierschema und Programmierung des <i>StepOnePlus</i> TM für die qRT-PCR	69
Tabelle 20 Standard Pipettierschemata für den DNA-Restriktionsverdau	71
Tabelle 21 Standard-Pipettierschemata für SDS-Gele	76
Tabelle 22 Antiplasmodiale Wirkung von Phospholipase-Inhibitoren auf die asexuelle Replikation von <i>P. falciparum</i>	126
Tabelle 23 Putative lipolytische Enzyme in <i>P. falciparum</i> sowie deren orthologe Proteine in <i>P. berghei</i> , <i>P. vivax</i> Stamm und <i>P. knowlesi</i>	204

Zusammenfassung

Für das Überleben des Malariaerregers *P. falciparum* sowohl im humanen Wirt als auch im Moskitovektor ist ein präzise regulierter Phospholipidmetabolismus essenziell. Daher wurden in vorangegangenen Studien die in der Phospholipid-Synthese und -Akquirierung involvierten Proteine umfangreich experimentell untersucht und als Zielstrukturen für Malaria-Therapeutika evaluiert. Dagegen wurden Phospholipasen, die durch ihre Phospholipid-hydrolytische Aktivität potenziell wichtige Funktionen in den Membrandynamiken, bei dem Durchdringen von Wirtszellmembranen, in der Zellproliferation sowie in der Signaltransduktion aufweisen können, bislang nur unzureichend untersucht.

In einer im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten umfangreichen Genomanalyse konnten im *P. falciparum*-Genom insgesamt 22 putative Phospholipasen identifiziert werden, von denen vier als Patatin-ähnliche Phospholipasen (PNPLA) annotiert sind. Für die als PNPLA1 bezeichnete PNPLA, für welche eine PLA₂-spezifische Aktivität vorhergesagt wurde, konnte eine durchgängige zytosolische Expression in den Blut- und Sexualstadien gezeigt werden. PNPLA1-defiziente Parasiten wiesen dabei eine normale asexuelle Replikation, Gametozytenentwicklung und Gametogenese auf. Jedoch führte der PNPLA1-Verlust zu einer signifikant reduzierten Anzahl an Gametozyten und zu einer verlangsamten Entwicklung der fünf Reifestadien, während die episomale PNPLA1-Überexpression die Gametozytenbildung förderte. Der PNPLA1-Funktionsverlust führte weiterhin zu einer transkriptionellen Deregulierung von in der Gametozytogenese involvierten Genen, einschließlich des Gens für den Schlüsselregulator der Gametozytenbildung, dem Transkriptionsfaktor AP2-G. Eine vergleichende Lipidomanalyse zeigte, dass PNPLA1-defiziente Parasiten eine erhöhte Phospholipidkonzentration aufwiesen, insbesondere hinsichtlich Phosphatidylcholin (PC), dem Hauptbestandteil plasmodialer Membranen. Da der Parasit bei mangelnden Ausgangssubstraten für die essenzielle PC-Synthese mit einer erhöhten Gametozytenproduktion reagiert, ist PNPLA1 vermutlich indirekt über einen veränderten Lipidmetabolismus in die Gametozytenbildung involviert. Die erhöhten PC-Konzentrationen aufgrund des PNPLA1-Funktionsverlusts verhindern dabei den Wechsel vom asexuellen Replikationszyklus ins infektiöse Gametozytenstadium.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern durch die erstmalige Charakterisierung einer plasmodialen PNPLA eine wichtige Grundlage zur Aufklärung der biochemischen und funktionalen Rolle von Phospholipasen im Lebenszyklus des Malariaerregers und vertiefen das Verständnis über die Regulation der sexuellen Differenzierung.

Summary

The malaria pathogen *P. falciparum* displays a well-regulated lipid metabolism required to ensure its survival in the human host as well as in the mosquito vector. Therefore, proteins involved in synthesis and acquisition of phospholipids were extensively studied in the past and represent prime targets for malaria therapeutics. In contrast, not much is known about phospholipases, which may have potentially important functions in membrane dynamics, host cell membrane penetration, cell proliferation, and cell signaling due to their phospholipid-hydrolytic activity.

In a comprehensive genome analysis carried out within the scope of this work, a total of 22 putative phospholipases were identified in the *P. falciparum* genome, four of which are annotated as patatin-like phospholipases (PNPLA). PNPLA1, a putative PLA₂, is present in the asexual and sexual blood stages and here localizes to the cytosol. PNPLA1-deficient parasites showed normal asexual replication, gametocyte development and gametogenesis. However, parasites lacking PNPLA1 formed significantly less gametocyte numbers and showed delayed development of the five maturation stages, while episomal overexpression of PNPLA1 promoted gametocyte formation. The loss of PNPLA1 function also led to a transcriptional deregulation of genes related to gametocytogenesis, including the gene encoding the key regulator of sexual commitment, the transcription factor AP2-G. Comparative lipidomic analysis of asexual PNPLA1-deficient parasites revealed overall increased levels of major phospholipids, in particular phosphatidylcholine (PC), which is the main component of plasmodial membranes. PC synthesis is known to be pivotal for erythrocytic replication, while reduced availability of PC precursors drives the parasite into gametocytogenesis. Thus, the higher PC levels due to PNPLA1-deficiency might prevent the blood stage parasites from entering the sexual pathway.

By the first characterization of a plasmodial PNPLA, the results of this thesis contribute to the elucidation of the biochemical and functional role of phospholipases in the life cycle of the malaria pathogen and deepen the understanding of the sexual differentiation pathway.

I. Einleitung

I.1 Die Tropenkrankheit Malaria

Die Tropenkrankheit Malaria zählt gemessen an der Morbidität und Mortalität neben AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) und Tuberkulose auch im 21. Jahrhundert noch zu den gefährlichsten humanen Infektionskrankheiten weltweit. Mit 3,3 Mrd. Menschen leben etwa 50% der Weltbevölkerung in Malaria-Endemiegebieten, wobei sich die Verbreitung der Malaria vorwiegend über die Tropen und Subtropen erstreckt. Das subsaharische Afrika, in dem etwa 90% aller registrierten Neuinfektionen auftreten, zählt dabei vor Südostasien und Mittel- und Südamerika zu den am schwersten betroffenen Gebieten (Abbildung 1). Die Weltgesundheitsorganisation der Vereinten Nationen registrierte im Jahr 2018 schätzungsweise 218 Millionen Infektionen mit insgesamt 405.000 Todesfällen, wobei der Großteil der tödlich endenden Infektionen bei Kindern unter dem fünften Lebensjahr auftrat (272.000 Malariatote). Mit dieser

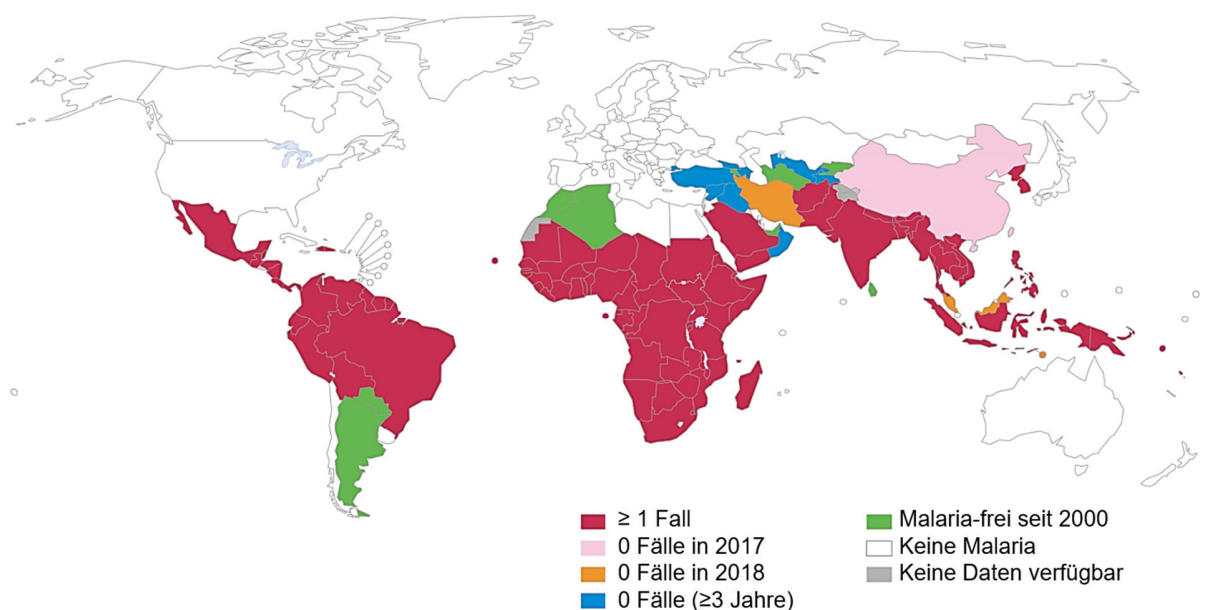


Abbildung 1 Übersicht über die Endemiegebiete sowie die Anzahl registrierter Fälle der Tropenkrankheit Malaria im Jahr 2018. Länder, in denen im Jahr 2018 ≥ 1 Malaria-Fälle behördlich registriert wurden, sind in rot dargestellt. Als Malaria-frei zertifizierte Länder sind in rosa und orange (kein registrierter Malaria-Fall in den Jahren 2017 bzw. 2018), blau (kein registrierter Malaria-Fall in den vergangenen drei Jahren) und grün (kein registrierter Malaria-Fall seit 2000) dargestellt (modifiziert nach World Health Organisation, 2019).

enormen Gesundheitsproblematik und der daraus resultierenden Mortalität gehen in den Malaria-Endemiegebieten auch schwerwiegende ökonomische, soziale und kulturelle Problematiken einher. Dies beinhaltet zum einen die gesundheitlichen Kosten im Sinne von Hospitalisierungen

und ärztlichen Konsultationen, krankheitsbedingte Verminderung der gesamtgesellschaftlichen Produktivität sowie daraus resultierend fehlende Gelder für Bildung oder Ausbau der Infrastruktur (World Health Organisation, 2019).

Der Begriff Malaria ist auf die Bezeichnung „mal‘aria“ (schlechte Luft) zurückzuführen, da man, als der Erreger der Krankheit noch nicht entdeckt war, die Symptome mit der Luft in den Marsch- und Sumpfgebieten in Verbindung brachte. Im Jahre 1880 konnte erstmals durch den französischen Mediziner Charles Laveran der Malariaerreger beschrieben werden. Laveran konnte zeigen, dass der eukaryotische einzellige Parasit der Gattung *Plasmodium* die Krankheit Malaria verursacht. Heute sind über hundert *Plasmodium*-Arten bekannt, wobei lediglich fünf als humanpathogen beschrieben werden: *Plasmodium falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* und *P. knowlesi* (zusammengefasst in Gillrie und Ho, 2017; Ngotho *et al.*, 2019). Das gemeinsame Krankheitsbild aller Malariaerkrankungen ist hohes Fieber. Begleitet wird diese Symptomatik von Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen und Übelkeit, und bei schweren, unbehandelten Verlaufsformen von Durchblutungsstörungen, Anämien und Organversagen mit Todesfolge. Darüber hinaus können auch schwere neurologische Komplikationen mit Bewusstseinsstörungen auftreten, die als zerebrale Malaria bezeichnet werden. Die klinischen Verläufe sind dabei abhängig von der Art des Erregers und insbesondere die Periodizität der Fieberschübe ist charakteristisch für die unterschiedlichen *Plasmodium*-Arten. Bei der *Malaria tertiana*, ausgelöst durch *P. vivax* oder *P. ovale*, kommt es zu regelmäßigen Fieberschüben in einem zeitlichen Intervall von 48 h, bei der *Malaria quartana*, ausgelöst durch *P. malariae*, treten diese alle 72 h auf. Unregelmäßige Fieberschübe hingegen sind charakteristisch für *Malaria tropica*, verursacht durch *P. falciparum*. Die *Malaria tropica* zählt dabei zu den gefährlichsten Krankheitsformen, die unbehandelt oft tödlich enden. Übertragen werden alle Erreger durch Moskitos der Gattung *Anopheles*, wobei ausschließlich die Blut-saugenden weiblichen Moskitos als Vektoren fungieren. Diese injizieren die Erreger in Form von Sporozoiten während der Blutmahlzeit mit dem Speichel in den humanen Wirt (zusammengefasst in Idro *et al.*, 2010; Gillrie und Ho, 2017).

Bislang gibt es keinen wirksamen Impfstoff, der einen vollständigen Schutz gegenüber Malaria erlaubt. Dabei gibt es drei generelle Ansatzpunkte für die Entwicklung von Impfstoffen, die an unterschiedlichen Stadien im Lebenszyklus des Malariaerregers ansetzen: prä-erythrozytäre Impfstoffe, Impfstoffe gegen die replikativen Blutstadien sowie Transmissions-blockierende Impfstoffe (zusammengefasst in Acquah *et al.*, 2019; Goh *et al.*, 2019; Salinas *et al.*, 2019; Wilson *et al.*, 2019). Der Malariaimpfstoff RTS,S/AS01 (Pharmaunternehmen GlaxoSmithKlinie, London,

GB) richtet sich gegen die prä-erythrozytären Sporozoiten und Leberstadien und gilt als einziges Malaria-Vakzin, das bislang erfolgreich die Phase III der klinischen Entwicklung durchlaufen hat. Jedoch weist auch dieser Impfstoff lediglich eine Schutzwirkung gegenüber Neuerkrankungen von 31-59% auf (RTS,S Clinical Trials Partnership, 2015; zusammengefasst in Mahmoudi und Keshavarz, 2017). Die effektivste Möglichkeit zum Schutz vor Malaria stellt daher noch immer die Expositionsprophylaxe dar, womit Maßnahmen zusammengefasst werden, welche die Infektionswahrscheinlichkeit durch Stiche mit infizierten weiblichen *Anopheles*-Moskitos minimieren. Diese beinhalten unter anderem die Verwendung von Repellentien, die Verwendung von imprägnierter Schutzkleidung, sowie das Schlafen unter Insektizid-imprägnierten Moskitonetzen (ITN, *insecticide-treated nets* bzw. LLINs, *long lasting insecticidal nets*). Eine weitere Präventionsmaßnahme im Kampf gegen Malaria stellt die Vektorkontrolle dar, wobei durch das flächendeckende Versprühen von Insektiziden die Ausbreitung der Krankheit durch das Abtöten der Überträgermoskitos eingedämmt werden soll (World Health Organisation, 2019).

Als Chemotherapeutika werden in der Malariabehandlung standardmäßig Artemisinin-basierte Therapeutika in Kombination mit einem oder mehreren weiteren Wirkstoffen verwendet (ACT, *artemisinin-based combination therapy*). Der Einsatz der ACT-Kombinationstherapeutika, zusammen mit der Expositionsprophylaxe, erwirkte dabei einen Rückgang der Malariatoten von 585.000 im Jahr 2010 auf 405.000 im Jahr 2018 und eine Reduktion der weltweiten Malariainfektionen von 251 Millionen im Jahr 2010 auf 228 Millionen im Jahr 2018. Dennoch können keine großen Fortschritte in der Ausrottung von Malaria verbucht werden, wobei sich insbesondere in den vergangenen Jahren die Zahl der weltweiten Malariafälle stabilisiert hat (World Health Organisation, 2019). Ein großes Problem hierbei stellen die sich rasant ausbreitenden Resistenzen der Erreger gegenüber den gängigen Medikamenten, insbesondere im Südost-asiatischen Raum, dar (World Health Organisation, 2019). So zeigte beispielsweise in kürzlich veröffentlichten Studien die Patientenbehandlung mit dem Malaria-Wirkstoff Dihydroartemisinin-Piperaquin bei 50% der Erkrankten in Thailand, Vietnam und Kambodscha keine ausreichende Wirkung mehr (Hamilton *et al.*, 2019; van der Pluijm *et al.*, 2019). Aufgrund der sich zunehmend ausbreitenden Resistenzen der Malariaerreger gegenüber bestehenden Medikamenten als auch der Moskitos gegenüber den verwendeten Insektiziden können die Erfolge der jüngeren Vergangenheit in der Bekämpfung und Eindämmung der Krankheit wieder rückläufig werden. Daher steht die Identifizierung neuer Medikamente und Impfstoffkandidaten weiterhin im Fokus der Malariaforschung.

I.2 Der Erreger der Malaria tropica – *P. falciparum*

Die komplizierte und lebensbedrohliche Krankheit *Malaria tropica* ist auf den Erreger *P. falciparum* zurückzuführen. Neben den oben beschriebenen Symptomen sind insbesondere eine hohe Parasitämie (>5%) im Blut, eine damit einhergehende Anämie und häufig vorkommende neurologische Komplikationen charakteristisch. *P. falciparum* zeigt im Vergleich zu anderen *Plasmodium*-Arten eine hohe Virulenz und Infektiosität. Dies ist zum einen auf die Fähigkeit zur Veränderung der Oberfläche der Wirtserythrozyten zurückzuführen, die in weiterer Konsequenz zur Blockierung von Kapillaren bis hin zum Organtod führt. Zum anderen weist der Erreger eine lange Verweildauer der Geschlechtsformen im menschlichen Blut auf, so dass diese auch nach dem Abklingen der Symptomatik auf den Endwirt, den *Anopheles*-Moskito, übertragen werden können (zusammengefasst in Idro *et al.*, 2010; Gillrie und Ho, 2017; Ngotho *et al.*, 2019). Der einzellige Parasit gehört wie die anderen *Plasmodium*-Arten zu den *Haemosporida* in der Gruppe der *Apicomplexa* (Levine, 1970). Zu den *Apicomplexa* zählen eukaryotische Parasiten, die infektiöse Sporozysten oder Oozysten produzieren sowie einen charakteristischen Generationswechsel mit alternierender geschlechtlicher und asexueller Vermehrung durchlaufen. Neben *Plasmodium* gehören zu diesem Stamm Arten der Gattungen *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Babesia*, *Theileria* und *Cryptosporidium*. Weitere Charakteristika der *Apicomplexa* sind eine gleitende Fortbewegung und ein Apikalkomplex mit Mikronemen, Rhoptrien und einem Konoid zur Wirtszellinvasion. Darüber hinaus besitzen diese einen als Apikoplasten bezeichnetes Plastid, das vermutlich auf die sekundäre Endosymbiose einer Rotalge zurückzuführen ist (zusammengefasst in Cowman und Crabb, 2006).

I.3 Der Lebenszyklus von *P. falciparum*

Der obligat intrazellulär lebende Parasit wechselt im Laufe seines komplexen Lebenszyklus zwischen dem humanen Wirt, in dem asexuelle Schizogonien stattfinden, und dem als Endwirt fungierenden *Anopheles*-Moskito, in welchem die sexuelle Replikation und anschließende Sporogonie erfolgen (Abbildung 2, zusammengefasst in Aly *et al.*, 2009). Die Übertragung des Parasiten erfolgt während der Blutmahlzeit eines infizierten weiblichen *Anopheles*-Moskitos, bei der etwa 100 Sporozoiten über die Speicheldrüse des Moskitos subkutan in den humanen Wirt injiziert werden (Vanderberg und Frevert, 2004). Die Sporozoiten migrieren aktiv von der Einstichstelle mit dem Blutstrom zur Leber, wo diese Hepatozyten infizieren. Das Eindringen eines einzigen Sporozoiten in eine Leberzelle ist dabei ausreichend, um eine Malariaerkrankung in seinem Wirt zu manifestieren (Mota *et al.*, 2001). In den Hepatozyten findet die als

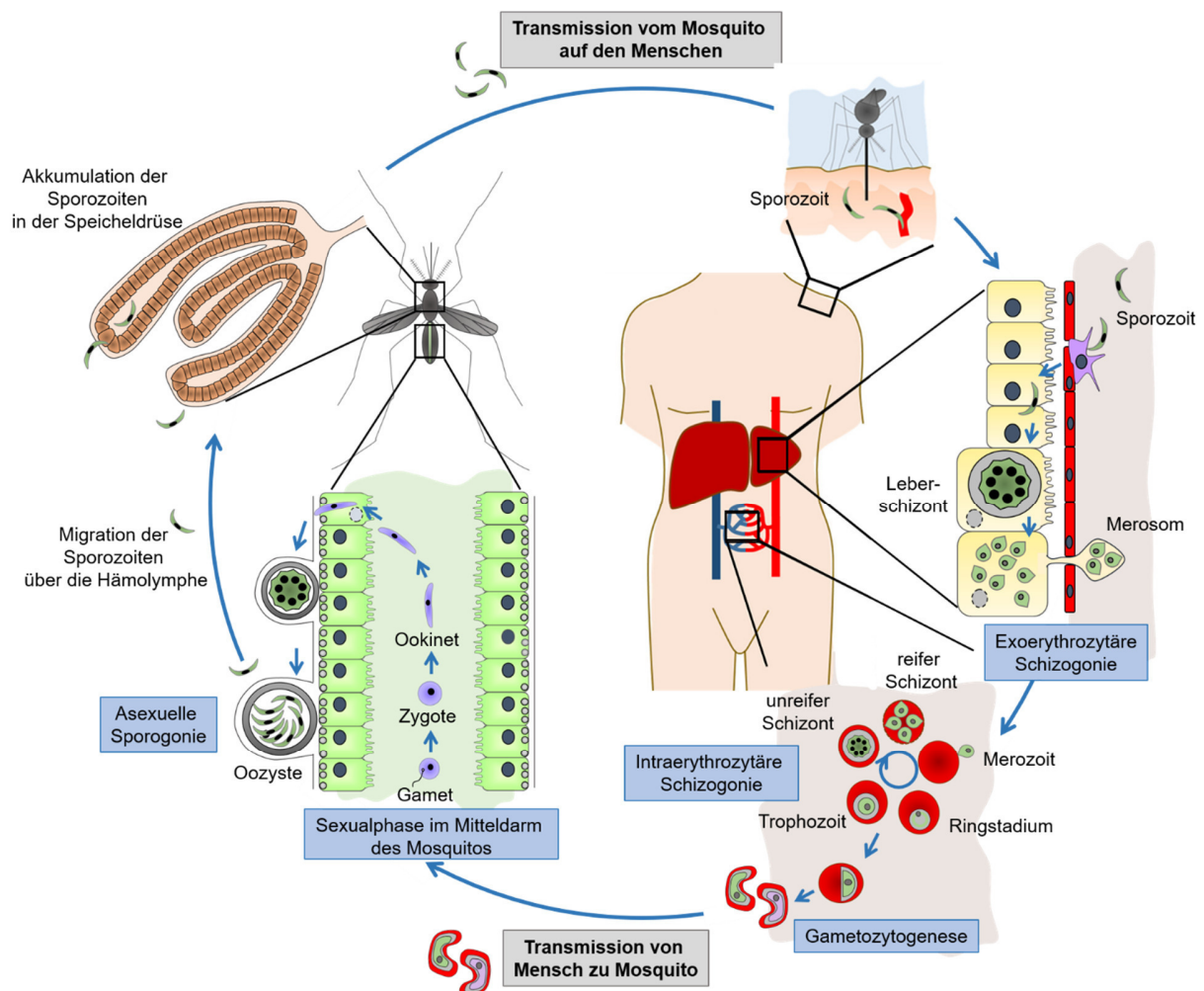


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *P. falciparum*. Der obligat intrazellulär lebende Parasit wechselt im Laufe seines komplexen Lebenszyklus zwischen dem humanen Wirt, in dem asexuelle Schizogonien stattfinden, und des als Überträger fungierenden *Anopheles*-Moskito, in welchem die sexuelle Replikation und die anschließende Sporogonie erfolgen. Die Übertragung des Parasiten erfolgt während der Blutmahlzeit eines weiblichen *Anopheles*-Moskito, bei der Sporozoiten in den humanen Wirt injiziert werden. Die Sporozoiten migrieren mit der Blutbahn zur Leber, wo diese Hepatozyten infizieren und zu Leberschizonten heranreifen. Die aus dem Leberschizonten in die Blutbahn freigesetzten Merozoiten infizieren Erythrozyten. Es folgt eine asexuelle Replikation, in der sich der Parasit während der erythrozytären Schizogonie mitotisch repliziert. Dabei differenziert sich der Parasit innerhalb von ~48 h über das Ringstadium, zum Trophozoiten weiter zum Schizonten, der erneut infektiöse Merozoiten in die Blutbahn freisetzt. Während jedem Zyklus der ungeschlechtlichen Vermehrung differenzieren sich einige Parasiten zu sexuellen Vorläuferstadien, die als männliche und weibliche Gametozyten bezeichnet werden. Diese werden mit der nächsten Blutmahlzeit eines *Anopheles*-Moskito in den Mitteldarm des Mosquitos aufgenommen, differenzieren dort zu männlichen Mikro- und weiblichen Makrogameten und bilden nach der Fertilisation eine Zygote. Die Zygote differenziert sich weiterhin zu einem Ookineten, der das Mitteldarmepithelium durchbricht und zu einer Oozyte heranreift. In der Oozyte bilden sich bis zu 1000 neue Sporozoiten, die nach ihrer Freisetzung zur Speicheldrüse des Mosquitos migrieren und dort für eine erneute Infektion des humanen Wirts bereitstehen (modifiziert nach Bennink und Pradel, 2019).

Gewebsschizogonie bezeichnete erste asexuelle Reproduktion statt und die Parasiten reifen durch mitotische Teilung zu Leberschizonten heran. Diese Phase dauert zwischen sechs und 15 Tagen und wird als hepatische oder präerythrozytäre Phase bezeichnet. Die Infektion ist bis zu diesem Zeitpunkt asymptomatisch. Pro Leberschizont werden bis zu 30.000 infektiöse Merozoiten gebildet und durch die Ausbildung von sogenannten Merosomen über das Lebersinusoid in die Blutbahn

abgegeben. Ein Merosom bezeichnet dabei die Abschnürung der Wirtszellmembran und beinhaltet tausende Merozoiten. Die Merozoiten werden anschließend aus den Merosomen freigesetzt und die Parasiten dringen innerhalb weniger Sekunden über die Ausbildung einer parasitophoren Vakuole in Erythrozyten ein (Baer *et al.*, 2007). Es folgt eine asexuelle Replikation, in der sich der Parasit während der erythrozytären Schizogonie mitotisch repliziert. Während der intraerythrozytären Schizogonie ernährt sich der Parasit hauptsächlich vom Zytoplasma der humanen Wirtszelle und dem darin befindlichen Hämoglobin, wobei der Anteil von Hämoglobin an der zytosolischen Gesamtproteinmenge im nicht-infizierten Erythrozyten etwa 95% beträgt. Bei der Hämoglobinproteolyse entsteht freies und für den Parasiten toxisches Häm, welches daher als inertes kristallförmiges Polymer in der Nahrungsvakuole eingelagert wird. Dieses Polymer ist als schwarz-braune Ablagerung in infizierten Erythrozyten zu erkennen und wird auch als Malaria-Pigment oder Hämozoïn beschrieben (zusammengefasst in Francis *et al.*, 1997). In den ersten Stunden nach dem Eindringen des Parasiten in den Erythrozyten bezeichnet man das erythrozytäre Stadium als Ringform, mit dem Auftreten der mikroskopisch gut erkennbaren Hämozoïn-Ablagerungen, welche auch als Malariapigment bezeichnet werden, spricht man vom Trophozoitenstadium. Etwa 36 Stunden nach dem Eindringen in den Erythrozyten beginnt der Parasit im sogenannten Schizontenstadium mit den ersten Kernteilungen. Der Parasit differenziert sich in bis zu 32 weitere Merozoiten, welche nach etwa 48 Stunden mit der Ruptur des Schizonten in die Blutbahn freigesetzt werden und mit dem erneuten Eindringen in nicht-infizierte Erythrozyten einen weiteren asexuellen Replikationszyklus beginnen (zusammengefasst in Vaughan und Kappe, 2012). Bei dem Wirtszellenaustritt kommt es auch zur Freisetzung des Hämozoïns in die Blutbahn, welches eine starke immunologische Reaktion des Wirtes auslöst. Ferner modifiziert der Parasit während der Schizogonie die biologischen Eigenschaften der Wirtszelle. So integriert der Parasit zum Beispiel das Oberflächenprotein *PfEMP1* (*erythrocyte membrane protein 1*) in als *Knobs* bezeichnete Ausstülpungen der Wirtszellmembran. *PfEMP1* ermöglicht die Zelladhäsion des parasitierten Erythrozyten an das vaskuläre System, womit der Parasit dem Passieren und allfälligem Ausfiltern durch die Milz oder anderem phagozytotischem Gewebe entgeht (zusammengefasst in Rowe *et al.*, 2009). Durch die Zelladhäsion, die auch als Sequestrierung bezeichnet wird, kann es in Folge zu Durchblutungsstörungen und damit einhergehend zu Organschädigungen kommen. Zusätzlich binden die infizierten Erythrozyten auch nicht-infizierte Erythrozyten, ein Vorgang, der als Rosettenbildung bezeichnet wird, und können zu Verengungen der Blutgefäße und damit einhergehend zu einer Störung der Mikrozirkulation

führen (Abbott und Proud, 2004). Bei Malaria-Patienten können >10% aller Erythrozyten mit dem Parasiten infiziert sein. Die Freisetzung des Hämozoins, die als Sequestrierung bezeichnete Zelladhäsion, die Rosettenbildung sowie der repetitive Kreislauf von Neuinfektion der Erythrozyten bedingen dabei alle durch Malaria hervorgerufenen klinischen Symptome wie Fieber, Anämie und in komplizierten Fällen Organversagen und Tod (zusammengefasst in White *et al.*, 2014).

I.3.1 Die Gametozytogenese von *P. falciparum*

Neben der asexuellen Phase im menschlichen Zwischenwirt durchläuft der Parasit eine sexuelle Phase im Moskito. Diese wird eingeleitet durch die Differenzierung einiger asexueller Parasiten zu den sexuellen Vorläuferstadien, den Gametozyten, im humanen Wirt. Die Bildung von Gametozyten wird als Gametozytogenese bezeichnet und wird in drei Phasen eingeteilt: Die Induktion zur Bildung von Gametozyten durch externe Stimuli, die sexuelle Schizogonie mit anschließender Differenzierung der Ringstadien zu morphologisch nicht von Trophozoiten unterscheidbaren Stadium I-Gametozyten und die Reifung zu infektiösen Stadium V-Gametozyten (Ikadai *et al.*, 2013). Da reife Gametozyten die einzigen Stadien sind, die auf den *Anopheles*-Vektor übertragen werden können, ist die Bildung der Gametozyten essenziell für die spätere Transmission vom humanen Wirt auf den Moskito und somit für den Lebenszyklus des Malaria-Parasiten. Die Gametozyten stellen dabei jedoch nur einen kleinen Teil der Parasitenpopulation während einer Infektion dar. Der molekularbiologische Hintergrund, warum einige Parasiten den asexuellen Replikationszyklus verlassen und sich zu Gametozyten differenzieren, war lange Zeit nicht bekannt und wurde auf verschiedene Umwelt- und Stoffwechsel-bedingte Ursachen zurückgeführt. Im Fokus lagen dabei insbesondere äußere Umwelteinflüsse, die als Stressfaktoren einen nachteiligen Effekt auf den intraerythrozytären Replikationszyklus haben und somit die Bildung von Gametozyten positiv beeinflussen. Dazu zählen beispielsweise die medikamentöse Behandlung mit Malariawirkstoffen wie Chloroquin (Buckling *et al.*, 1999), das Vorhandensein von unreifen Erythrozyten, den sogenannten Retikulozyten (Trager und Gill, 1992), eine erhöhte Parasitämie und damit einhergehend ein veränderter Hämatokrit (zusammengefasst in Baker, 2010) oder die *in vitro*-Kultivierung asexueller Parasiten mit dem Überstand von gebrauchtem Zellkulturmedium (Williams, 1999; Brancucci *et al.*, 2015). Auch dem Cholera-Toxin, ein vom Bakterium *Vibrio cholerae* produziertes Exotoxin, wurde eine erhöhende Bildungsrate von Gametozyten zugesprochen (Dyer und Day, 2000; Peatey *et al.*, 2013). Die molekularen Mechanismen, welche

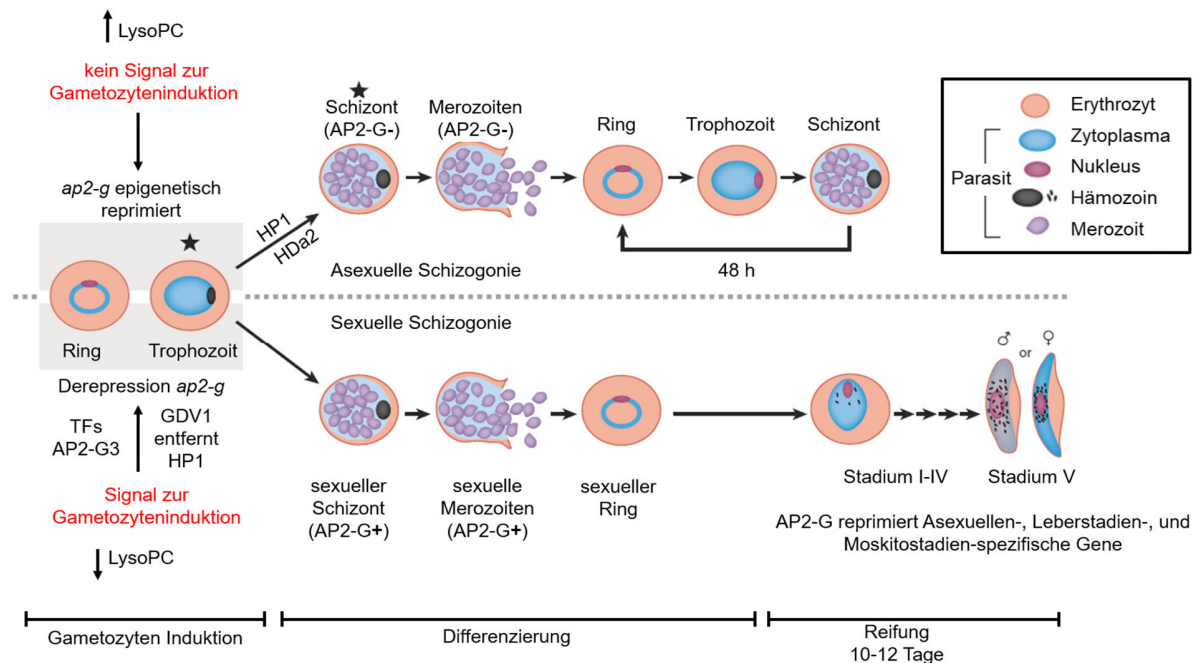


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Regulation zur Einleitung der Gametozytogenese. Ist LysoPC im umgebenen Medium nicht limitierend, ist der *ap2-g* Genlocus durch HP1 und HDa2 epigenetisch reprimiert. Die Zellen durchlaufen weiterhin die asexuelle Schizogonie. Ist LysoPC hingegen limitierend, führt dies zu metabolischen und epigenetischen Veränderungen, die die Gametozytogenese einleiten. Dies beinhaltet die Entfernung des HP1 (wahrscheinlich durch GDV1) vom *ap2-g* Genlocus sowie die Transkription weiterer Regulatoren wie Transkriptionsfaktoren (TFs) und AP2-G3. Die Induktion zur Gametozytogenese findet dabei kurz vor der Schizogonie statt. Aus allen Merozoiten eines induzierten Schizonten differenzieren sich über einen Zeitraum von 10-12 Tagen reife Stadium V-Gametozysten. AP2-G+, Expression des Transkriptionsfaktors AP2-G; AP2-G-, keine Expression des Transkriptionsfaktors AP2-G; GDV1, *gametocyte development protein 1*; HDa2, Histondeacetylase 2; HP1, Heterochromatin Protein 1 (modifiziert nach Josling *et al.*, 2018).

diese äußeren Stimuli mit endogenen Signalwegen verbinden, blieben jedoch unbekannt (Brancucci *et al.*, 2015). Basierend auf vorangegangenen Studien, in denen bereits gezeigt wurde, dass die *in vitro*-Kultivierung asexueller Parasiten in verbrauchtem Zellkulturmedium zu einer erhöhten Gametozytogenese führt, konnte kürzlich durch Brancucci *et al.* (2017) das erste definierte Umweltsignal identifiziert werden, welches die Bildung von Gametozyten induziert. Durch die Fraktionierung von humanem Serum mit anschließender Massenspektrometrie wurden solche Bestandteile des Serums identifiziert, die die Bildung von Gametozyten inhibieren bzw. fördern. Es konnte gezeigt werden, dass die Limitierung des Serumbestandteils Lysophosphatidylcholin (LysoPC) zu einer erhöhten Bildungsrate von Gametozyten führt. Umgekehrt inhibiert ein LysoPC-Überschuss die Gametozytogenese. Dabei wird davon ausgegangen, dass LysoPC nicht als Signal für eine Rezeptor-vermittelte Signalkaskade fungiert, sondern dass es durch die Limitierung von LysoPC zu metabolischen und epigenetischen Veränderungen innerhalb des Parasiten kommt, die die Bildung von Gametozyten fördern (Abbildung 3; Brancucci *et al.*, 2017). Durch die vollständige Genomsequenzierung von

Parasitenlinien, welche die Fähigkeit zur Bildung von Gametozyten verloren hatten, konnten Chromosomenabschnitte identifiziert werden, die für die Gametozytogenese essenziell sind. In den meisten Fällen wies dabei das Gen *ap2-g* Mutationen auf, welches als Schlüsselregulator der Gametozytogenese beschrieben wurde (Kafsack *et al.*, 2014; Sinha *et al.*, 2014). Die Überexpression des AP2-G-Proteins mit Hilfe eines starken konstitutiven Promoters führt zu einer erhöhten Gametozytogenese, während die AP2-G-Deletion mit dem Funktionsverlust der Parasiten zur Bildung von Gametozyten einhergeht (Kafsack *et al.*, 2014; Sinha *et al.*, 2014; Kent *et al.*, 2018). Das Gen *ap2-g* codiert für einen Transkriptionsfaktor, der zur Familie der *Apicomplexa*-spezifischen ApiAP2-DNA-bindenden Proteine gehört. AP2-G weist eine AP2-DNA-Bindungsdomäne auf, die *in vitro* an das GNGTAC-Motiv bindet, welches in den Promoterregionen zahlreicher Gametozyten-spezifischer Gene vorkommt (Kafsack *et al.*, 2014). So wird durch den Transkriptionsfaktor AP2-G die Expression zahlreicher weiterer für die Gametozytogenese wichtiger Proteine wie *Pfs16*, *Pfg27/25*, *Pfg14.744*, *Pfg14.745* und *Pfg14.748* sowie die Expression zahlreicher PHIST-Gene (*Plasmodium helical interspersed subtelomeric*) induziert (Eksi *et al.*, 2005; Kafsack *et al.*, 2014). Umgekehrt reprimiert AP2-G die Expression solcher Proteine, die für die asexuelle Replikation und die damit verbundene Umstrukturierung der Wirtszelle wichtig sind, z.B. Komponenten der sogenannten *Knob*-Komplexe (Fraschka *et al.*, 2018). Während AP2-G seine eigene Transkription positiv regulieren kann, ist der *ap2-g* Genlocus in den replikativen Blutstadien epigenetisch durch Histon-3-Lysin-9 Trimethylierung (H3K9me3) und das Heterochromatin Protein 1 (HP1) reprimiert (Brancucci *et al.*, 2014; Coleman *et al.*, 2014; Kafsack *et al.*, 2014; Sinha *et al.*, 2014; Poran *et al.*, 2017). So konnte gezeigt werden, dass sowohl durch eine konditionelle Deletion des HP1-Proteins als auch der Histondeacetylase HDa2 die Repression des *ap2-g*-Genlocus aufgehoben wird, was in Folge zu einer Hyper-Induktion der Gametozytenbildung führt (Brancucci *et al.*, 2014; Coleman *et al.*, 2014; zusammengefasst in Josling *et al.*, 2018). Durch Genomsequenzierung Gametozyten-defizienter Zelllinien wurde ein weiteres für die Gametozytogenese wichtiges Gen identifiziert - *gdv1* (*gametocyte development protein 1*; Eksi *et al.*, 2012). Die Expression des *gdv1*-Gens wird dabei vermutlich durch das eigene *antisense*-Transkript reguliert und ist essenziell für die Aktivierung des *ap2-g* Genlocus (Eksi *et al.*, 2012; Filarsky *et al.*, 2018). GDV1 fungiert dabei als Interaktionspartner von HP1 und induziert durch eine gegenseitige Wechselwirkung die Destabilisierung des Heterochromatins und somit die Transkription von *ap2-g* (Filarsky *et al.*, 2018; zusammengefasst in Rea *et al.*, 2018). AP2-G3 wurde als weiterer Transkriptionsfaktor identifiziert, der an der Aktivierung des *ap2-g* Genlocus

beteiligt ist. Durch eine *piggyBac*-Mutagenese konnte gezeigt werden, dass der Verlust des *ap2-g3* Genlocus zu einer Inhibierung der Gametozytogenese und somit zu einer signifikanten Reduzierung der Gametozytenbildung führt. AP2-G3 lokalisiert dabei wie HP1 und GDV1 im Nukleus, kommt aber zusätzlich auch im Zytosol des Parasiten vor und kann zwischen den beiden Kompartimenten wechseln. Möglicherweise ist AP2-G3 daher in der Übersetzung externer Umweltfaktoren auf das Transkriptionsprofil im Nukleus involviert (Kafsack *et al.*, 2014; Modrzynska *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017).

Wie z.B. das oben beschriebene LysoPC als externer Stimulus in die Aktivierung der *gdv1* und *ap2-g* Transkription umgeschrieben wird, ist bislang nicht bekannt. Zusammenfassend wird davon ausgegangen, dass die Expression von GDV1 und AP2-G durch viele verschiedene Faktoren epigenetisch reguliert wird. Die Expression dieser ist dabei stochastisch aktiv, sodass durch intrinsische Faktoren in einer Teilpopulation der asexuellen Parasiten die Gametozytogenese induziert wird und somit stets ein basales Level an Gametozyten gebildet wird. Die Anzahl Gametozyten-bildender Parasiten in der Gesamtpopulation wird dabei durch externe Stimuli, wie z.B. eine Limitierung des Phospholipids LysoPC, stark erhöht (zusammengefasst in Josling *et al.*, 2018; Ngotho *et al.*, 2019). Die Induktion zur Gametozytogenese findet dabei kurz vor der Schizogonie, also vor der DNA-Replikation, statt, wobei alle Merozoiten in einem Schizonten entweder ausschließlich Gametozyten oder ausschließlich asexuelle Parasiten bilden, jedoch nie eine Kombination aus beidem (Bruce *et al.*, 1990; Brancucci *et al.*, 2018). Ebenso bilden alle Merozoiten in einem Schizonten entweder nur weibliche oder nur männliche Gametozyten, aber nie eine Mischung aus beidem (Silvestrini *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). Neuere *in vitro*-Studien haben hingegen gezeigt, dass die konditionelle Aktivierung von *ap2-g* in asexuellen Ringstadium-Parasiten auch zur Umprogrammierung der Zelle und zur direkten Differenzierung in Gametozyten führen kann (Kent *et al.*, 2018; Bancells *et al.*, 2019).

1.3.2 Die Sexualphase von *P. falciparum*

Die Gametozyten durchlaufen innerhalb von 10-14 Tagen einen Reifungsprozess, wobei die verschiedenen Reifestadien morphologisch als Stadien I-V bezeichnet werden (Hawking *et al.*, 1971). Die unreifen Gametozyten (Stadien I-IV) sequestrieren dabei im humanen Wirtsgewebe, insbesondere im Knochenmark und in der Milz (Joice *et al.*, 2014; De Niz *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018; Obaldia *et al.*, 2018). Reife Stadium V-Gametozyten hingegen zirkulieren im peripheren Blutssystem des Wirts. Dies erlaubt ihnen bei einem erneuten Stich durch den *Anopheles*-Vektor

mit der Blutmahlzeit in den Mitteldarm des Moskitos aufgenommen zu werden. Im Mitteldarm des Moskitos erfolgt die sexuelle Fortpflanzungsphase des Lebenszyklus, welche eine genetische Rekombination und Variation innerhalb der Parasitenpopulation ermöglicht. Im Mitteldarm des Moskitos erfahren die Gametozyten, die noch immer von der PV und der Wirtszelle umgeben sind, zunächst zwei Stimuli: Das im Mitteldarm vorhandene Molekül Xanthurensäure (XA), ein Nebenprodukt der Augenpigmentsynthese, sowie ein Absinken der Umgebungstemperatur um etwa 5°C (Beard *et al.*, 1995; Billker *et al.*, 1997, 1998). Diese beiden Stimuli aktivieren die Gametozyten und initiieren über einen bislang nicht bekannten Rezeptor eine cyclische Guanosinmonophosphat (cGMP)/Ca²⁺-Signalkaskade. Dabei wird zunächst die membranständige Guanylylcyclase aktiviert, die die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in den sekundären Botenstoff cGMP unter Abspaltung eines Pyrophosphatrestes katalysiert (Muhia *et al.*, 2001). Durch die steigende cGMP-Konzentration wiederum wird die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) aktiviert, die die Enzyme Phosphatidylinositol-4-Kinase (PI4K) und Phosphatidylinositol-4-Phosphat-Kinase (PIP5K) phosphoryliert. Im Folgenden kommt es zur Synthese von Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI4P) aus Phosphatidyl-1D-*myo*-Inositol (PI) durch PI4K, welches durch PIP5K in PIP₂ umgesetzt wird. PIP₂ wiederum wird durch eine membrangebundene Phospholipase C in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) gespalten. Die steigende IP₃ Konzentration führt vermutlich zur Öffnung von Ca²⁺-Kanälen im endoplasmatischen Retikulum (ER) und somit zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-konzentration. Im Folgenden werden dadurch diverse Ca²⁺-abhängige Effektoren wie Proteinkinasen und Phosphatasen aktiviert, die die Umstrukturierung im Inneren des Parasiten und somit die Gametogenese einleiten (zusammengefasst in Bennink *et al.*, 2016; Flieger *et al.*, 2018). Um den physischen Kontakt männlicher und weiblicher Gameten zu ermöglichen, müssen diese zunächst aus der sie umgebenden Wirtszelle austreten. Der Austritt der Parasiten aus der Wirtszelle wird dabei über ein *inside-out*-Modell beschrieben. Zunächst entleeren innerhalb von etwa einer Minute nach Aktivierung osmiophile Körperchen zellaustrittsspezifische Moleküle in das Lumen der parasitophoren Vakuole, die die innenliegende parasitophore Vakuolenmembran (PVM) an mehreren Stellen gleichzeitig rupturieren (Sologub *et al.*, 2011). Gleichzeitig wird der Struktur-gebende innere Membrankomplex (IMK) abgebaut. Durch einen Ca²⁺-abhängigen Prozess entlassen anschließend Zellaustrittsvesikel ihren Inhalt, inklusive des Perforin-ähnlichen Proteins PPLP2, in das Erythrozytenzytosol. Die Erythrozytenmembran wird dadurch durchlässig und das Erythrozytenzytosol wird ins Medium freigesetzt bei gleichzeitiger Degradierung des

erythrozytären Zytoskeletts durch Cystein/Serin-Proteasen (Deligianni *et al.*, 2013; Wirth *et al.*, 2014). Etwa 10 min nach der Aktivierung hat sich der Gametozyt vollständig abgerundet und verlässt als Gamet die Wirtszelle über eine einzelne Öffnung der Erythrozytenmembran (Sologub *et al.*, 2011; Wirth *et al.*, 2014; Andreadaki *et al.*, 2018; zusammengefasst in Kuehn und Pradel, 2010; Wirth und Pradel, 2012). Während der Gametogenese rundet sich der weibliche Gametozyt zu einem Makrogamet ab, der männliche Gametozyt durchläuft drei Genomreplikationen mit anschließenden Kernteilungen, wobei sich acht motile flagellenartige Mikrogameten bilden (Janse *et al.*, 1986; zusammengefasst in Sinden *et al.*, 2010). Die flagellenartigen Mikrogameten schnüren sich vom Residualkörper des Mikrogametozyten ab und rekrutieren durch schlagartige Bewegungen umliegende Zellen. Bei dem als Exflagellation bezeichneten Vorgang adhären die Mikrogameten sowohl mit nicht-infizierten Erythrozyten als auch mit weiblichen Makrogameten (Templeton *et al.*, 1998). Dieser lichtmikroskopisch gut erkennbare Komplex wird als Exflagellationszentrum bezeichnet. Bei dem Kontakt zwischen einem haploiden Makrogamet und einem haploiden Mikrogamet fusionieren diese zu einer diploiden Zygote. Bei der anschließenden Differenzierung der Zygote durchläuft der Parasit einmalig eine Meiose, was die genetische Rekombination innerhalb der Parasitenpopulation erlaubt (zusammengefasst in Kuehn und Pradel, 2010). Das Ende der parasitären Sexualphase wird durch die etwa 20 Stunden dauernde Differenzierung der Zygote zu einem invasiven Ookineten definiert. Der motile Ookinet verlässt anschließend über die peritrophe Membran und das Mitteldarmepithelium den Mitteldarm des Moskitos. Hier verbleibt dieser unterhalb der Basallamina und differenziert sich in einem Zeitraum von 10-12 Tagen zu einer sessilen Oozyste. Über asexuelle Sporogonie bilden sich aus einer Oozyste bis zu 10.000 Sporozoiten, die durch die Ruptur der Oozyste freigesetzt werden und über die Hämolymphe zur Speicheldrüse gelangen. Bei der nächsten Blutmahlzeit werden die in der Speicheldrüse akkumulierten Sporozoiten über den Moskito-Speichel in die Blutbahn des humanen Wirtes inokuliert. Der Lebenszyklus des Malaria-Parasiten ist somit geschlossen (zusammengefasst in Aly *et al.*, 2009; Bennink *et al.*, 2016).

I.4 Membranen und Phospholipide in *P. falciparum*

I.4.1 Phospholipide als Hauptbestandteil biologischer Membranen

Im Zuge dieses komplexen Lebenszyklus kommt es häufig zu Membran-Neubildungen und -Umstrukturierungen. Jede eukaryotische und prokaryotische Zelle wird an ihrer Oberfläche von einer Plasmamembran umgeben, die als Barriere zwischen dem umgebenen Extrazellulärraum

und dem Zytoplasma dient. Die Plasmamembranen sind dabei nach einem einheitlichen Grundprinzip aufgebaut, wobei zusammen mit Cholesterinen, Glykolipiden und Proteinen sogenannte Phospholipide den strukturellen Hauptbestandteil darstellen. Phospholipide, auch als Glycerophospholipide bezeichnet, sind amphiphile Moleküle, die aus einem Glycerolgrundgerüst bestehen. Jeweils am C1-Atom (*sn1*-Position) und am C2-Atom (*sn2*-Position) sind diese mit einer hydrophoben Kohlenwasserstoffkette, einer Fettsäure, verestert. Diese bestehen aus 14 bis 24 Kohlenstoffatomen und können Doppelbindungen enthalten. Am C3-Atom (*sn3*-Position) des Glycerols ist die polare, hydrophile Kopfgruppe, z.B. Ethanolamin, Serin oder Cholin, über eine Phosphodiesterbindung gebunden (vgl. Abbildung 6). Die hauptsächlichen Phospholipide in biologischen Membranen sind Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI) und Spingomyelin (SM). Durch ihre amphiphile Eigenschaft lagern sich Phospholipide zu einer bimolekularen Lipiddoppelschicht zusammen, wobei ihr polares, hydrophiles Ende nach außen, ihr lipophiles Ende nach innen gerichtet ist. Als hauptsächliche Komponente biologischer Membranen sind Phospholipide dabei für zelluläre Organismen nicht nur zur Abgrenzung vom Extrazellulärraum wichtig, sondern auch zentral an sämtlichen Lebensvorgängen beteiligt. Dies beinhaltet unter anderem strukturelle Eigenschaften durch Kompartimentierung oder funktionelle Eigenschaften im Energiestoffwechsel durch Fettsäureoxidation. Darüber hinaus sind Phospholipide als Komponenten des Endomembransystems auch beim intrazellulären Transport und in der Proteinreifung beteiligt oder spielen, nach hydrolytischer Spaltung durch Phospholipasen, als *second messenger* eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion (zusammengefasst in Ohvo-Rekilä *et al.*, 2002; Vance, 2008; Cole *et al.*, 2012; Vance und Tasseva, 2013; Balla, 2013; van der Veen *et al.*, 2017).

1.4.2 Phospholipidmetabolismus in *P. falciparum*

Aufgrund seines komplexen Lebenszyklus benötigt der Parasit einen sehr präzise regulierten Lipidmetabolismus, der es dem Parasiten insbesondere während seiner intraerythrozytären Entwicklung erlaubt, Veränderungen in den strukturellen und funktionalen Eigenschaften der Wirtszelle zu etablieren. Dabei wurde die Lipid- und Membranzusammensetzung des Malaria-erregers bislang vor allem in den Blutstadien des Erregers untersucht, was auf die einfache Kultivierung und auf die Möglichkeit der quantitativen Aufreinigung dieser Stadien zurückzuführen ist. Während der erythrozytären Schizogonie durchläuft der Parasit mehrere Entwicklungsstadien, die als Ringstadium, Trophozoit und Schizont bezeichnet werden (vgl.

Abschnitt I.3). Mit 48 h ist hier die Generationszeit im Vergleich zu anderen Phasen des Lebenszyklus besonders kurz. Auch wenn sich die absolute Größe des infizierten Erythrozyten mit der Differenzierung des Parasiten nur unwesentlich ändert (~17%), wächst der Parasit innerhalb des Erythrozyten und nimmt in reifen Schizonten ~80% des Wirtszellenvolumens ein (Esposito *et al.*, 2010). Außerdem ist der Parasit innerhalb der Wirtszelle von einer PVM umgeben, ein Membrankompartiment, das durch die Invagination der Wirtszellmembran während der Invasion der roten Blutzellen entsteht (Abbildung 4). Von der PVM reicht ein tubovesikulares Netzwerk (TVN) in das Zytosol der Erythrozyten, eine Membranausstülpung zum verbesserten Stoffaustausch zwischen Parasit und Wirtszelle (zusammengefasst in Sherling und van Ooij, 2016; De Niz *et al.*, 2016). Weitere wichtige Kompartimente und Membranstrukturen im Parasiten sind die parasitäre Plasmamembran, die Nahrungsvakuole, das ER, der Golgiapparat, der Nukleus, die

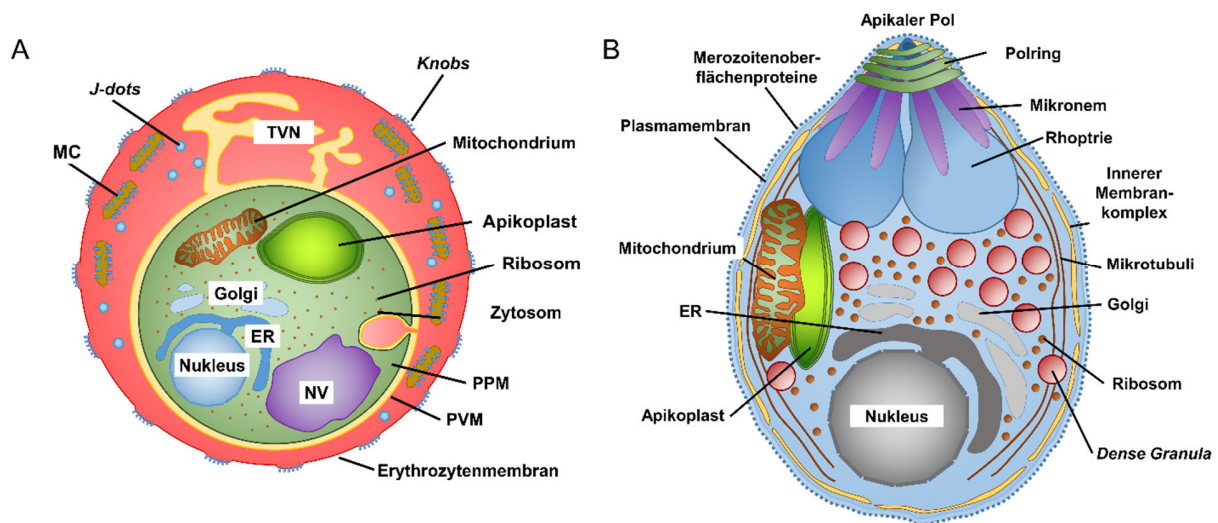


Abbildung 4 Membranumgebene Zellkompartimente der asexuellen Blutstadien in *P. falciparum*. (A) Schematische Darstellung eines Trophozoiten in einem Erythrozyten (~7,5 µm). (B) Schematische Darstellung eines Merozoiten (~1-2 µm). ER, endoplasmatisches Retikulum; *Knobs*, spezielle Membranausstülpungen zur Zelladhäsion; NV, Nahrungsvakuole; MC, *Maurer's cleft*, Bezeichnung für in das Zytoplasma der Wirtszelle eingelagerte Membranstrukturen; PPM, parasitäre Plasmamembran; PVM, parasitophore Vakuolenmembran; TVN, tubovesikulares Netzwerk (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2018).

Mitochondrien, der Apikoplast sowie Bestandteile des Apikalkomplexes und des Exomembransystems wie *Maurer's Cleft* und *J-dots* (zusammengefasst in Flammersfeld *et al.*, 2018). Das rasante Wachstum während des asexuellen Replikationszyklus geht mit einer enormen Membranneogenese einher und ist mit einer fünffachen Erhöhung des Phospholipid-Gehalts in den metabolisch hochaktiven asexuellen Blutstadien verbunden (zusammengefasst in Vial und Ancelin, 1992; Déchamps, Maynadier, *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2016). Die parasitären Membranen setzen sich dabei hauptsächlich aus Phospholipiden zusammen und enthalten nur wenig Cholesterol (zusammengefasst in Maguire und Sherman, 1990; Déchamps *et al.*, 2010). So beträgt

der Phospholipidgehalt *Plasmodium*-infizierter Erythrozyten ~60% gegenüber 38% in nicht-infizierten Erythrozyten (Tran *et al.*, 2016). In nicht-infizierten Erythrozyten sind PC (20-40%), PE (15-35%), PE Plasmalogen (~15%), SM (~15%) und PS (10-20%) die am meisten vorkommenden Phospholipide. Nach der Infektion mit *P. falciparum* ist ein Anstieg von PC (45-55%) und PE (20-35%) sowie ein Rückgang von PS (4-8%) und PE Plasmalogen (~10%) zu beobachten, während der prozentuale Anteil von SM (3-20%) nahezu unverändert bleibt (Botté *et al.*, 2013; Gulati *et al.*, 2015; zusammengefasst in Vial *et al.*, 2003; Flammersfeld *et al.*, 2018). Da in *Plasmodium* bislang kein Syntheseweg für Cholesterol identifiziert werden konnte, ist der Anteil dieses Steroidlipids in den parasitären Membranen im Vergleich zu nicht-infizierten Erythrozyten relativ gering (zusammengefasst in Vial und Ancelin, 1992; Vial *et al.*, 2003; Déchamps, Maynadier, *et al.*, 2010). So nimmt in *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten der relative Cholesterolanteil in den Membranen über einen nach innen gerichteten Gradienten von der Wirtszellmembran über die *Maurer's Cleft* und dem TVN hin zur parasitophoren Plasmamembran ab (Tokumasu *et al.*, 2014). Mit der Infektion der Erythrozyten steigt zudem der Anteil der neutralen Lipide Diacylglycerid (DAG) und Triacylglycerid (TAG) um das zwei- bis fünf-fache, wobei diese hauptsächlich in Membranen der Nahrungsvakuole lokalisieren und an der Kristallisation des toxischen Häms involviert sind (Jackson *et al.*, 2004; Gulati *et al.*, 2015). Während der Schizogonie nimmt auch der Anteil der Lysophospholipide (LysoPL) zu (Gulati *et al.*, 2015). Die Funktion der LysoPLs in *Plasmodium* ist noch nicht genau untersucht, sie können aber als Reaktionsprodukte von lipolytischer Enzytme die Membranfluidität beeinflussen, intrazelluläre Signalwege über Ca^{2+} -Mobilisierung modulieren, in der Proteinfaltung involviert sein und die Zellproliferation und -migration beeinflussen (zusammengefasst in Grzelczyk und Gendaszewska-Darmach, 2013). Auch während der Gametozytogenese steigt wie bei den asexuellen Replikationsstadien die Gesamtmenge der Lipide um das fünf- bis sechs-fache (Tran *et al.*, 2016). Insbesondere der prozentuale Anteil von SM (27%), von Cholesterol (29%) und der neutralen Lipide (27%) nimmt in Stadium V-Gametozyten im Vergleich zu asexuellen Trophozoitenstadien (18%, 2%, 19%) signifikant zu, wobei gleichzeitig der relative Anteil an Phospholipiden reduziert ist (37% im Vergleich zu 61%). Während der relative Anteil von Cholesterolen (20%) in asexuellen Parasiten im Vergleich zu nicht-infizierten Erythrozyten (50%) relativ gering ist, beträgt der prozentuale Anteil in reifen Stadium V- Gametozyten etwa 30% (Tran *et al.*, 2016). Cholesterol moduliert im Allgemeinen die Fluidität von Membranen und führt

möglicherweise zu einer erhöhten Flexibilität der reifen Gametozyten, um während der Zirkulation im Blutsystem der allfälligen Milzfiltration zu entgehen (Tiburcio *et al.*, 2012).

Nicht-infizierte Erythrozyten besitzen keinen Synthesewege für die *de novo*-Generierung von Lipiden. Daher benötigt der Parasit für die Membranneogenese eine Vielzahl verschiedenerer Enzyme und Transporter, um die Lipide entweder aus der Wirtszelle oder dem umgebenen Medium zu akquirieren oder diese selbst zu synthetisieren. PC, PE und PS, die von Malaria-Parasiten quantitativ am meisten generierten Phospholipide, spielen eine wesentliche strukturelle und regulatorische Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung des Parasiten (zusammengefasst in Bobenchik *et al.*, 2011). Lipidmetabolische und genetische Studien in *P. falciparum* haben dabei für die Phospholipid-Biosynthese zwei hauptsächliche Synthesewege identifiziert: Den Cytidindiphosphat (CDP)-Cholin Syntheseweg, auch als Kennedy-Syntheseweg bezeichnet, sowie den Serindecaboxylase-Phosphoethanolamin-Methyltransferase-(SDPM)-Syntheseweg (zusammengefasst in Ramakrishnan *et al.*, 2013).

Die PC-Synthese über den CDP-Cholin-Syntheseweg erfordert Cholin als Ausgangssubstrat (Abbildung 5). Dieses gelangt über einen erythrozytären Cholin-Transporter in die Wirtszelle. Darüber hinaus ist der Parasit in der Lage, die Permeabilität der Erythrozytenmembran für Cholin zu erhöhen. Aus dem Erythrozytenzytosol wird das Cholin dann weiter über einen bislang nicht identifizierten Transporter in den Parasiten aufgenommen (Ancelin *et al.*, 1991; Biagini *et al.*, 2004; Lehane *et al.*, 2004). Der in Eukaryoten hochkonservierte CDP-Cholin-Syntheseweg besteht aus einer dreistufigen enzymatischen Kaskade. Im ersten Syntheseschritt phosphoryliert die Cholinkinase (CK) unter ATP-Verbrauch Cholin zu Phosphocholin (P-Cho), welches im Folgenden durch die CTP:Phosphocholin-Cytidylyltransferase (CCT) zu CDP-Cholin umgesetzt wird. Im letzten Schritt wird der P-Cho-Rest durch die Cholin/Ethanolamin-Phosphotransferase (CEPT) auf Diacylglycerol übertragen und es entsteht PC (zusammengefasst in Ben Mamoun *et al.*, 2010; Ramakrishnan *et al.*, 2013). Ein weiteres Ausgangssubstrat für die PC-Synthese ist das Lysophospholipid LysoPC, welches aus dem umgebenden Medium akquiriert und über einen bislang nicht bekannten Mechanismus in den Parasiten transportiert wird. Obwohl LysoPC direkt über Acetylierung in PC umgewandelt werden könnte, wurde ein entsprechendes Enzym bislang noch nicht in *Plasmodium* identifiziert (Soupene und Kuypers, 2015; zusammengefasst in Soupene *et al.*, 2008; Hishikawa *et al.*, 2014). Daher wird davon ausgegangen, dass LysoPC zunächst durch Lysophospholipaseaktivität hydrolysiert wird. Aus dem daraus resultierenden Glycero-3-P-Cho

wird wiederum durch eine Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase (GDPDP) Cholin freigesetzt, das über den oben beschriebenen CDP-Cholin-Syntheseweg in PC umgewandelt wird (Brancucci *et al.*, 2017; Wein *et al.*, 2018). Interessanterweise wurde LysoPC als erster Umweltfaktor identifiziert, der bei Limitierung die Gametozytogenese einleitet, was die Wichtigkeit des Lipidmetabolismus für die parasitäre Differenzierung unterstreicht (vgl. Abschnitt I.3.1; Brancucci *et al.*, 2017).

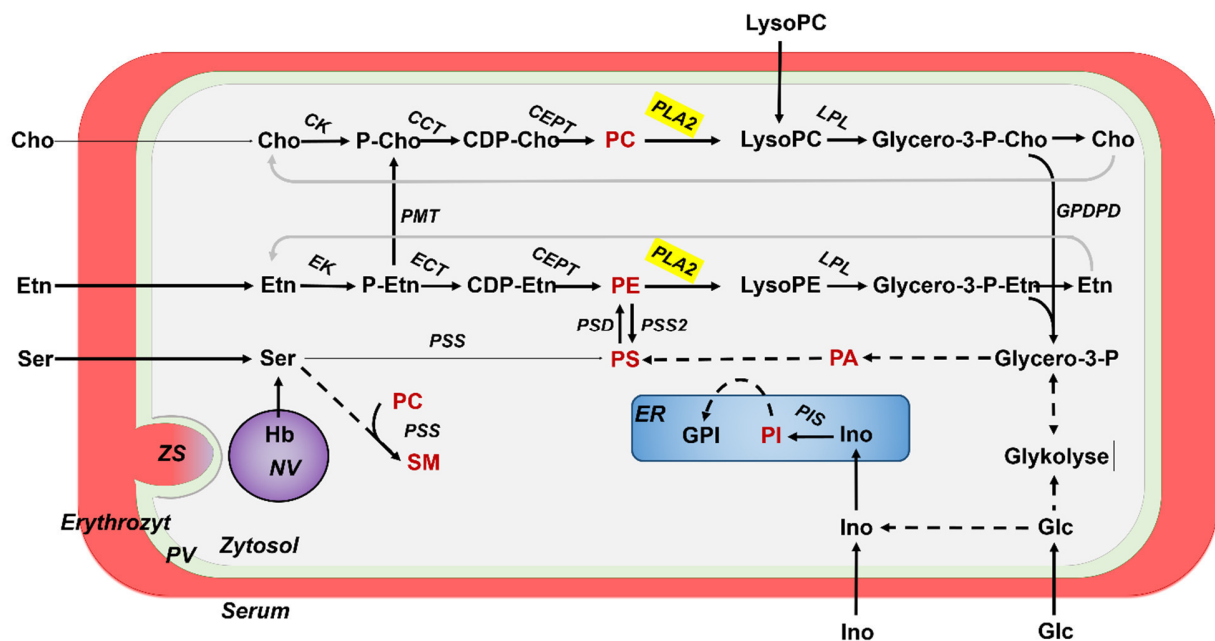


Abbildung 5 Schematische Darstellung des Phospholipid-Metabolismus in *P. falciparum*. Die gelb unterlegte enzymatische Reaktion ist ein durch mpmp.huji.ac.il vorhergesagter, hypothetischer Hydrolyseschritt. CCT, CTP:P-Cho-Cytidyltransferase; CDP, Cytidylidiphosphat; CEPT, Cholin/Ethanolamin-Phosphotransferase; Cho, Cholin; CK, Cholinase; CTP, Cytidyltriphosphat; ECT, CTP:P-Etn-Cytidyltransferase; EK, Ethanolaminkinase; Etn, Ethanolamin; ER, endoplasmatisches Retikulum; Glc, Glukose; GPDGP, Glycerophosphodiester Phosphodiesterase; GPI, Glycosylphosphatidylinositol; Hb, Hämoglobin; Ino, Inositol; LPL, Lysophospholipase; NV, Nahrungsvakuole; PC, Phosphatidylcholin; P-Cho, Phosphocholin; PE, Phosphatidylethanolamin; PI, Phosphatidylinositol; PIS, Phosphatidylinositolsynthetase; PLA2, Phospholipase A₂; PMT, Phosphoethanolamin-Methyltransferase; PS, Phosphatidylserin; PSD, Phosphatidylserin Decarboxylase; PSS2, Phosphatidylserin Synthase 2; PV, Parasitophore Vakuole; Ser, Serin; SM, Sphingomyeline; ZS, Zytostom (modifiziert nach Flammersfeld *et al.* 2019).

Die PC-Synthese über den SDPM-Syntheseweg läuft über die Umsetzung von Phosphoethanolamin (P-Etn) durch die Phosphoethanolamin-Methyltransferase (PMT) zu P-Cho, ein Enzym, das in der Regel in Pflanzen vorkommt (Rontein *et al.*, 2001; Pessi *et al.*, 2004). Eine direkte Umwandlung von PE in PC via Trimethylierung durch Phospholipid-Methyltransferaseaktivität, wie sie in Säugetierzellen häufig vorkommt, konnte in *P. falciparum* bislang nicht nachgewiesen werden (Witola *et al.*, 2018). Über den SPDM-Syntheseweg ist der Parasit zusätzlich in der Lage die Phospholipide PS und PE zu generieren. Für die Synthese von

PE wird zunächst Ethanolamin (Etn) aus dem umgebenen Medium aufgenommen. Dieses wird im ersten Schritt durch die Ethanolaminkinase (EK) unter ATP-Verbrauch zu Phosphoethanolamin (P-Etn) phosphoryliert, das im Weiteren entweder wie oben beschrieben durch PMT zu P-Cho und weiter zu PC oder durch die CTP:P-Etn-Cytidyltransferase (ECT) zu CDP-Etn umgesetzt wird. Im letzten Schritt wird CDP-Etn durch CEPT unter dem Verbrauch von Diacylglycerol in PC umgewandelt (Vial *et al.*, 1984; zusammengefasst in Ancelin und Vial, 1986; Tischer *et al.*, 2012). Die Aufnahme von Etn aus dem Plasma ist jedoch begrenzt. Daher wird Etn hauptsächlich auch aus der Decarboxylierung von Serin gewonnen, das wiederum selbst hauptsächlich aus der Degradierung von Hämoglobin gewonnen wird (Elabbadi *et al.*, 1997). Die Decarboxylierungsreaktion wird dabei von dem Enzym Serin-Decarboxylase katalysiert, das ähnlich wie PMT hauptsächlich in Pflanzen vorkommt (Rontein *et al.*, 2001). PS wird direkt aus PE durch eine PS Synthetase 2 (PSS2) generiert. Die umgekehrte Reaktion, die Umwandlung von PS in PE wird dagegen durch die PS Decarboxylase (PSD) katalysiert (Baunaure *et al.*, 2003; zusammengefasst in Déchamps, Maynadier, *et al.*, 2010). Während ~89% des gesamten PC über den CDP-Cholin-Syntheseweg generiert werden, werden ~11% über PMT über den SDPM-Syntheseweg generiert (Wein *et al.*, 2018). Bei einer Limitierung von Cholin oder LysoPC kann der Parasit jedoch ausreichende Mengen PC direkt über PMT synthetisieren (Brancucci *et al.*, 2017; Wein *et al.*, 2018). Während PE im gleichem Maße aus Etn (43%) und Ser (57%) generiert wird, kann PS ausschließlich über die PSS2 aus PE generiert werden (Wein *et al.*, 2018).

PI wird durch die PI-Synthase aus Inositol synthetisiert, das wiederum entweder direkt aus dem Serum akquiriert oder *de novo* über Inositol-3-Phosphat aus Glucose-6-phosphat synthetisiert wird (zusammengefasst in Ramakrishnan *et al.*, 2013). SM hingegen wird vorwiegend im Golgiapparat sowie im TVN über die SM-Synthase aus Ceramiden generiert, die wiederum selber aus der Aminosäure (AS) Serin gewonnen werden (Elmendorf und Haldar, 1993; Elmendorf und Haldar, 1994; Ansorge *et al.*, 1995; zusammengefasst in Gerold und Schwarz, 2001). Für die (Phospho)lipidsynthese sind ferner freie Fettsäuren wie Ölsäure oder Palmitinsäure essentiell (Mi-Ichi *et al.*, 2006, 2007). Fettsäuren werden in *Plasmodium* hauptsächlich aus dem umgebenen Medium akquiriert, können aber auch *de novo* über die Fettsäure Synthase in einem als FASII (*fatty acid synthesis*)-bezeichneten Syntheseweg generiert werden. Die Fettsäuren werden dabei im Apikoplasten synthetisiert und im Anschluss in das Zytoplasma transportiert (Mitamura *et al.*, 2000; Vielemeyer *et al.*, 2004; zusammengefasst in Vial *et al.*, 2003). Der FASII-Syntheseweg ist dabei hauptsächlich in den Moskito-Stadien sowie während der präerythrozytären Schizogonie in

den Hepatozyten aktiv, während in der erythrozytären Replikationsphase Fettsäuren hauptsächlich über den Zellimport akquiriert werden (Yu *et al.*, 2008; Vaughan *et al.*, 2009; van Schaijk *et al.*, 2014).

1.4.3 Die Funktion von Phospholipasen

Phospholipide wie PC, PE und PS sind Substrate ubiquitär vorkommender Enzymgruppen, die als Phospholipasen bezeichnet werden und eine Untergruppe der Lipasen/Esterasen sind. In Abhängigkeit ihres katalytischen Wirkungsmechanismus werden die lipolytischen Enzyme in die vier Hauptgruppen Phospholipase A (PLA), B (PLB), C (PLC) und D (PLD) unterteilt (Abbildung 6), wobei es generell zwei Arten von Phospholipasen gibt: Die Acylhydrolasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von Glycerophospholipiden in freie Fettsäuren und Lysophospholipide bzw. bei Lysophospholipasen die hydrolytische Spaltung von Lysophospholipiden in Glycerol und einer freien Fettsäure. So hydrolysieren PLAs die Esterbindung an der *sn*1- (PLA₁) oder *sn*2-Position (PLA₂) und PLBs können sowohl an der *sn*1- als auch an der *sn*2-Position die Esterbindung hydrolysieren. PLCs und PLDs hingegen werden als Phosphodiesterasen bezeichnet und spalten die alkoholische Kopfgruppe von Phospholipiden ab. Dabei hydrolysieren PLCs die Glycerol-orientierte Phosphodiesterbindung und PLDs die Alkohol-orientierte Phosphodiesterbindung (zusammengefasst in Flores-Díaz *et al.*, 2016). Laut dem Nomenklaturkomitee der Internationalen Vereinigung für Biochemie und Molekularbiologie (IUBMB, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) werden PLA₁, PLA₂, PLB, PLC und PLD nach dem Enzymklassifikationssystem mit den EC-Nummern (engl. *Enzyme Commission numbers*) 3.1.1.32, 3.1.1.4, 3.1.1.5, 3.1.4.10 bzw. 3.1.4.4 bezeichnet (zusammengefasst in De Maria *et al.*, 2007; Aloulou *et al.*, 2018). Die katalytische Aktivität der meisten Phospholipasen wird zum einen von ihrer Substratspezifität und ihrer Affinität zu Lipiddoppelschichten bestimmt. Die Bindung an Lipiddoppelschichten bzw. Membranen führt dabei zu einer Aktivitätssteigerung, ein Vorgang der als Grenzflächenaktivierung bezeichnet wird (zusammengefasst in Roberts, 1996; Aloulou *et al.*, 2006).

Die Superfamilie der PLA₂ wird weiter auf Basis ihrer katalytischen Mechanismen (Serin-Aspartat-, Histidin-Aspartat-, Serin-Histidin-Aspartat-Hydrolasen) sowie ihrer funktionellen Eigenschaften und Lokalisation in verschiedene Untergruppen unterteilt (zusammengefasst in Schaloske und Dennis, 2006). Dabei werden hauptsächlich sekretierte PLA₂ (sPLA₂), zytosolische PLA₂ (cPLA₂), Ca²⁺-unabhängige PLA₂ (iPLA₂, independent PLA₂), Plättchen-aktivierender

Faktor Acetylhydrolasen (PAF-AH) sowie lysosomale PLA₂ (LPLA₂) unterschieden (zusammengefasst in Aloulou *et al.*, 2018). Jede Phospholipase spielt dabei unterschiedliche Rollen im Gewebs- und Zell-spezifischen Lipidmetabolismus sowie in der Entwicklung und Ausprägung diverser Krankheitssymptomatiken (zusammengefasst in Dennis *et al.*, 2011; Murakami *et al.*, 2011). In Säugetierzellen stellen dabei sPLAs, Enzyme mit einer katalytischen Histidin-Aspartat-Diade, die umfangreichste Untergruppe dar. Das Molekulargewicht liegt zwischen 14 kDa und 19 kDa (zusammengefasst in Murakami *et al.*, 2015). Sie sind in vielfältigen

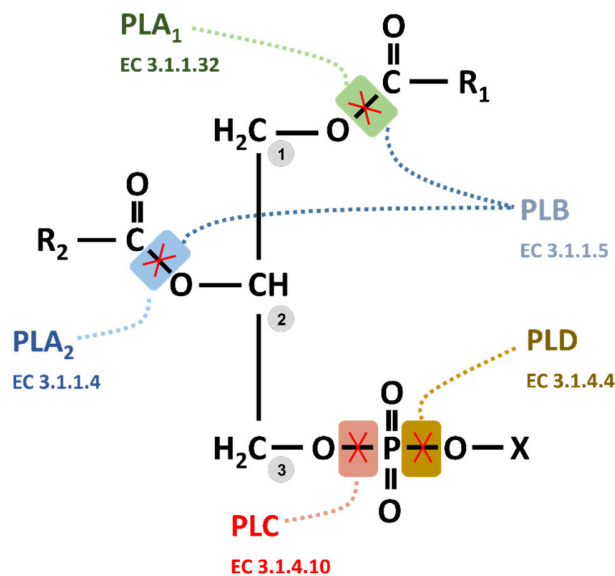


Abbildung 6 Schematische Darstellung eines Phospholipids sowie die Einteilung der verschiedenen Phospholipase-Hauptgruppen nach ihrem katalytischen Wirkungsmechanismus. In einem Phospholipid sind langkettige Monocarbonsäuren (R₁/R₂) an der sn1- (1) und sn2-Position (2) über eine Esterbindung an ein Glycerol-Rückgrat gebunden. An der sn3-Position (3) des Glycerols ist eine polare Kopfgruppe (X), z.B. Cholin, über eine Phosphodiesterbindung gebunden. Phospholipasen A₁ (PLA₁) und A₂ (PLA₂) hydrolysieren die Acylesterbindungen an der sn1- bzw. sn2-Position. Phospholipasen B können die Acylesterbindungen sowohl an der sn1- als auch an der sn2-Position hydrolysieren. PLCs hydrolysieren hingegen die Glycerophosphatbindung, PLDs katalysieren die hydrolytische Abspaltung der polaren Kopfgruppe (X). EC, *Enzyme commission number* (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2018).

Prozessen involviert, wie z.B. in der Degradation von aus der Nahrung aufgenommenen Phospholipiden, in der Signaltransduktion von Entzündungsreaktionen oder in der Produktion von Eicosanoiden durch Lipxygenasen oder Cyclooxygenasen, deren Ausgangsstoff mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind (zusammengefasst in Lambeau und Gelb, 2008). Einige sPLAs sind dabei auch in der Lage Membranphospholipide zu degradieren oder sind in der Neutralisation von Krankheitserregern, z.B. durch den hydrolytischen Abbau bakterieller Lipide, beteiligt (Bezzine *et al.*, 2000; Koduri *et al.*, 2002; Singer *et al.*, 2002).

Die cPLAs sind in die Signaltransduktion involviert und zeigen dabei eine hohe Affinität gegenüber Arachidonsäure an der sn2-Position von Phospholipiden. Arachidonsäure ist eine

vielfach ungesättigte Fettsäure, die durch verschiedene Enzyme metabolisiert und in potente *second messenger* Signalmoleküle z.B. in Entzündungsreaktionen umgewandelt werden (zusammengefasst in Kramer und Sharp, 1997). Die iPLAs sind hinsichtlich ihrer enzymatischen Funktion sehr divers und spielen unter anderem eine wichtige Rolle in der zellulären Phospholipid- und Membranhomöostase, im Fettkatabolismus, in der Zelldifferenzierung, in der mitochondrialen Integrität sowie in der Signaltransduktion (zusammengefasst in Winstead *et al.*, 2000; Hermansson *et al.*, 2016). Die iPLAs werden intrazellulär exprimiert und können im Zytosol, auf der Membranninnenseite, im ER oder in der Mitochondrienmembran lokalisieren (zusammengefasst in Ramanadham *et al.*, 2015). Wie cPLAs besitzen iPLAs eine katalytische Serin-Aspartat-Diade. Dabei weisen iPLAs keine definierte Substratspezifität auf und können sowohl PLA₂-, PLA₁-, Lysophospholipase-, Transacylase-, und Thioesterase-Aktivität aufweisen (Lio und Dennis, 1998; Jenkins *et al.*, 2004; Jenkins *et al.*, 2006; Carper *et al.*, 2008). iPLAs werden aufgrund ihrer Homologie zu dem Kartoffelprotein „Patatin“ zu den Patatin-ähnlichen Phospholipasen (PNPLA) gezählt. Patatin wurde ursprünglich als Speicherprotein in Kartoffeln beschrieben, einem 45 kDa Glykoprotein, das etwa 20% des gesamten löslichen Proteins in einer Kartoffelknolle ausmacht. Patatin lokalisiert in der Vakuole, besitzt aber pH-Wert-abhängig auch Acylhydrolase-, β -1,3-Glucanase- und Esteraseaktivität gegenüber einem breiten Substratspektrum (zusammengefasst in Senda *et al.*, 1996; Shewry, 2003). PNPLAs definieren sich durch vier konservierte Sequenzblöcke: Im Block II befindet sich das katalytische Serin in einem Glycin-X-Serin-X-Glycin (GX SXG)-Konsensusmotiv, wobei X eine beliebige AS bezeichnet. Der zweite katalytisch aktive AS-Seitenrest der katalytischen Serin-Aspartat Diade befindet sich in Block IV in einem Aspartat-Glycin-Motiv. Im Block III befindet sich ein konserviertes Prolin, das bei Prokaryoten in einem Alanin-Serin-X-X-X-Prolin-Motiv eingebettet ist, bei Eukaryoten in einer Alanin-Alanin-Prolin-Sequenz. In Block I befindet sich eine Anreihung von Glycin nahe dem N-Terminus (zusammengefasst in Schrag und Cygler, 1997; Hirschberg *et al.*, 2001; Rydel *et al.*, 2003; Banerji und Flieger, 2004). Bei den LPLAs wurden bislang zwei Arten identifiziert: die saure Ca²⁺-unabhängige PLA₂ und die lysosomale PLA₂. In Säugetierzellen lokalisieren diese in Lysosomen und weisen ein saures pH-Optimum auf. Sie spielen unter anderem eine wichtige Rolle in der Surfactant-Homöostase und beeinflussen somit die Oberflächenspannung in den respiratorischen Alveolen (Bridges *et al.*, 2010; zusammengefasst in Hiraoka *et al.*, 2006; Kitsioulis *et al.*, 2009).

PLBs hydrolysieren Phospholipide an der *sn*1- und *sn*2-Position, weisen darüber hinaus aber auch Lysophospholipaseaktivität und Transacylaseaktivität auf. Sie kommen in zahlreichen

Mikroorganismen, Protozoen und Säugetierzellen vor und spielen eine wichtige Rolle als Virulenzfaktor in pathogenen Pilzen (Delagebeaudeuf *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Delagebeaudeuf *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2001; Farn *et al.*, 2001; Maury *et al.*, 2002; Morgan *et al.*, 2004; zusammengefasst in Djordjevic, 2010). PLCs sind als Phosphodiesterasen definiert, die in Phospholipiden die Glycerol-orientierte Phosphodiesterbindung hydrolysieren und somit den *second messenger* Diacylglycerol (DAG) und wasserlösliche phosphorylierte Kopfgruppen freisetzen können. Generell unterscheidet man zwischen PC-spezifischen (PC-PLC) und PI-spezifischen (PI-PLC) PLCs, wobei die PLCs das jeweilige Phospholipid präferiert hydrolysieren, aber dennoch eine breite Substratspezifität aufweisen. PLCs spielen im Allgemeinen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion in eukaryotischen Zellen, die genaue Funktion wird in Abschnitt I.4.5 im Detail beschrieben (zusammengefasst in Aloulou *et al.*, 2018). PLDs hydrolysieren hingegen die Alkohol-orientierte Esterbindung in einem Phospholipid und setzen so ein Phosphoglycerid und einen Alkohol frei. Die negativ geladenen Phosphoglyceride wirken zum einen als intrazelluläre Signallipide, die über die Ausbildung einer intermolekularen Wasserstoffbrückenbindung Signal- und Effektorproteine rekrutieren können (zusammengefasst in Kooijman und Burger, 2009; Bruntz *et al.*, 2014). Zum anderen können Phosphoglyceride durch ihre kleine Kopfgruppe (ein an das Phosphat gebundenes Wasserstoffatom) eine negative Krümmung in der Lipiddoppelschicht induzieren und somit die Membraneigenschaften modulieren (zusammengefasst in Kooijman *et al.*, 2005). Im Weiteren können PLDs durch eine Transphosphatidylierung eine neue Kopfgruppe auf die *sn3*-Position im Phosphoglycerid transferieren, wodurch ein neues Phospholipid entstehen kann. Bei dieser Reaktion wird ein nukleophiler Akzeptoralkohol wie Serin, Cholin oder Ethanolamin benötigt (zusammengefasst in McDermott *et al.*, 2004; Aloulou *et al.*, 2018).

I.4.4 Phospholipasen als Virulenzfaktoren

Phospholipasen tragen auch zur Virulenz vieler intrazellulär-lebender Organismen bei. So codieren beispielsweise die Genome von Pathogenen oder symbiontisch-lebenden Mikroorganismen für eine signifikant höhere Anzahl an PNPLAs als die Genome sich frei vermehrender Mikroorganismen (zusammengefasst in Banerji und Flieger, 2004; Kienesberger *et al.*, 2008). Die Wirkungen als Pathogenitätsfaktoren sind dabei sehr divers, lassen sich dennoch in zwei grundsätzliche Mechanismen einteilen: Zum einen können Phospholipasen durch ihre katalytische Wirkung die Integrität von Membranen beeinflussen und sind somit maßgeblich an dem Abbau

und dem Durchdringen von Wirtszellmembranen beteiligt. Zum anderen können die Produkte ihrer katalytischen Reaktion als *second messenger* wirken und Signalwege, Entzündungskaskaden, den Membrantransport sowie die Zellproliferation beeinflussen (zusammengefasst in Schmiel und Miller, 1999; Sato und Frank, 2004; Istivan und Coloe, 2006; Sitkiewicz *et al.*, 2007).

Die als Virulenzfaktor wohl am detailliertesten charakterisierte Phospholipase ist die PNPLA Exoenzym U (ExoU) des gramnegativen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* (zusammengefasst in Javanmardi *et al.*, 2019). ExoU weist ein Molekulargewicht von 74 kDa auf. Aktiviert wird das Enzym durch den eukaryontischen Kofaktor Superoxidismutase und zeigt PC-spezifische PLA und LysoPC-spezifische LPLA-Aktivität (Phillips *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2005; Tamura *et al.*, 2004). Dabei wird ExoU durch ein Typ III-Sekretionssystem direkt in Wirtszellen injiziert und lokalisiert dort an die Zytoplasmamembran (Rabin *et al.*, 2006; Stirling *et al.*, 2006). ExoU-exprimierende *P. aeruginosa*-Stämme sind für zahlreiche humane Zellen zytotoxisch, können einen septischen Schock induzieren, Epithelzellen zerstören oder Pneumonien verursachen (Sato *et al.*, 2003; Pankhaniya *et al.*, 2004; zusammengefasst in Sato und Frank, 2004; Shaver und Hauser, 2004). Darüber hinaus kann ExoU durch die Freisetzung von Arachidonsäure aus den eukaryotischen Zellmembranen auch immunmodulatorische Funktionen haben. Durch die Freisetzung von Arachidonsäure können Entzündungsreaktionen durch die Produktion von Eicosanoiden ExoU-abhängig moduliert werden (Saliba *et al.*, 2005). Weitere immunmodulatorische Funktionen durch ExoU greifen auf transkriptioneller Ebene: So kann ExoU durch die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie c-Fos oder c-Jun die Zellteilung und Zytokinproduktion oder die Interleukin-8-Freisetzung modulieren. Die Transkriptionsfaktoren translokalisieren nach Aktivierung in den Zellkern und sind an der Ausbildung des AP-1-Komplexes beteiligt, der die Genexpression für Entzündungsreaktionen oder die Zellteilung kontrolliert (McMorran *et al.*, 2003; Cuzick *et al.*, 2006).

Legionella pneumophila ist ein fakultativ intrazellulär replizierendes Bakterium und der Erreger der Legionärskrankheit, eine interstitielle Pneumonie verbunden mit Fieber und Durchfällen (zusammengefasst in Albert-Weissenberger *et al.*, 2007; Hilbi *et al.*, 2010; Berjeaud *et al.*, 2016; Hiller *et al.*, 2018). Das Genom des gramnegativen Stäbchen-Bakteriums codiert für verschiedene Phospholipasen, die potenzielle Pathogenitätsfaktoren darstellen, darunter sind 15 PLAs, drei PLCs und eine PLD. Elf der PLAs sind als PNPLAs annotiert und werden in ursprünglich alphabetischer Reihenfolge mit PatA/VipD, PatB, PatC/VpdA, PatD, PatE, PatF/VpdC, PatG/VpdB, PatI, PatJ,

PatH und PatK bezeichnet (zusammengefasst in Banerji *et al.*, 2008; Lang und Flieger, 2011; Hiller *et al.*, 2018). Während seiner intrazellulären Replikation sekretiert das Bakterium beispielsweise die PNPLA VipD über ein als Dot/Icm Typ IVB bezeichnetes Sekretionssystem in das Zytosol der Wirtszelle (Shohdy *et al.*, 2005; van Rheenen *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2011). Dort wird VipD durch die Bindung von Rab5 und Rab22, Regulatoren des endosomalen Systems, aktiviert. Durch ihre PLA₁-Aktivität ist VipD in der Lage die Phagosomenreifung durch die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-3-phosphat und die damit einhergehende Veränderung der endosomalen Proteinzusammensetzung zu inhibieren (Ku *et al.*, 2012; Gaspar und Machner, 2014; Lucas *et al.*, 2014). Durch die Manipulation des Wirtszell-Vesikeltransportes entgeht *Legionella* durch die VipD-Aktivität einer Verschmelzung des *Legionellen*-Phagosoms mit primären Lysosomen und somit dem phagolysosomalen Degradationsweg. Darüber hinaus kann VipD Phospholipide, bevorzugt PC und PE, in der Mitochondrienmembran hydrolysieren. Die dabei entstehenden Lysophospholipide destabilisieren die Mitochondrienmembran und fördern die Freisetzung von Cytochrom C sowie die damit einhergehende Aktivierung der Cystein-Aspartat-spezifischen Protease 3 (Caspase 3). Die Aktivierung der Caspase 3 leitet den programmierten Zelltod, die Apoptose, der Wirtszelle ein (Zhu *et al.*, 2013).

PlaB, eine weitere durch *Legionella* exprimierte Phospholipase mit PLA-Aktivität, wird im Gegensatz dazu nicht sekretiert, sondern lokalisiert an der bakteriellen Oberfläche und zeigt eine Kontakt-abhängige PC- und PG-spezifische PLA-Aktivität. PlaB-defiziente *L. pneumophila* Mutanten haben im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte hämolytische Aktivität, zeigen eine verringerte Vermehrungsrate in Maus-Makrophagen auf und sind in ihrer Fähigkeit Lungengewebe zu kolonisieren beeinträchtigt (Flieger *et al.*, 2004; Bender *et al.*, 2009; Schunder *et al.*, 2010; Kuhle *et al.*, 2014).

Auch in dem protozoischen Parasit *Toxoplasma gondii*, neben *Plasmodium* ein weiterer Vertreter der *Apicomplexa*, wurden PNPLAs als wichtige Pathogenitätsfaktoren identifiziert (zusammengefasst in Montoya und Liesenfeld, 2004; Saadatnia und Golkar, 2012). In *Toxoplasma* wurden insgesamt sechs potenzielle PNPLAs identifiziert. Die als TgPL1 bezeichnete PNPLA weist zwar die für eine PNPLA typischen konservierten Sequenzblöcke auf, jedoch besitzt sie kein für eine PLA₂-Aktivität notwendiges katalytisches Serin. Eine entsprechende Phospholipase-Aktivität konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Jedoch ist TgPL1 essenziell für das Überleben des Parasiten in aktivierten Makrophagen, wobei es die Bildung von NO-Radikalen

inhibiert und eine immunmodulatorische Funktion aufweist (Mordue *et al.*, 2007; Tobin und Knoll, 2012). *TgPL1* lokalisiert dabei in zytosolischen Vesikeln während des Tachyzoitenstadiums, in Bradyzoiten lokalisiert es in der parasitären Vakuole und Zystenwand (Magle *et al.*, 2014). *TgPL2* ist eine PNPLA mit einem Molekulargewicht von 315 kDa, die eine N-terminale Transmembrandomäne aufweist. *TgPL2* lokalisiert an der Peripherie des Apikoplasten und ist dort für die Aufrechterhaltung der Membranintegrität des mit vier Membranen umgebenen Organells essenziell. Die PNPLA spielt mit einer PC- und LPC-spezifischen lipolytischen Aktivität eine wichtige Funktion in der Membranhomöostase des Organells. So weisen *TgPL2*-defiziente Parasiten eine veränderte Lipidzusammensetzung der Apikoplasten-Membranen auf, die zum Verlust des kompletten Organells und damit einhergehend zum späten Zelltod führen kann (Lévêque *et al.*, 2017). Auch *TgPL3* spielt eine wichtige Funktion für die Infektiosität und Virulenz der Parasiten. So konnte gezeigt werden, dass *TgPL3*-defiziente Parasiten im Mausmodell in der Ausbildung ihrer chronisch-latenten Form inhibiert sind (Frankel *et al.*, 2007). *TgPL3* wurde aber wie die *TgPLs* 4-6 in *T. gondii* bislang nicht detaillierter experimentell untersucht (zusammengefasst in Wilson und Knoll, 2018).

Auch in zahlreichen anderen Mikroorganismen wurde Phospholipase-Aktivität als hauptsächlicher Pathogenitätsfaktor nachgewiesen, wie z.B. bei den pathogenen Bakterien *Listeria monocytogenes*, *Leishmania major*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica*, *Streptococcus pyogenes* oder bei den pathogenen Pilzen *Cryptococcus neoformans*, *Candida neoformans*, oder *Candida albicans* (zusammengefasst in Calderone und Fonzi, 2001; Istivan und Coloe, 2006; Flores-Díaz *et al.*, 2016; Wilson und Knoll, 2018; Barman *et al.*, 2018).

I.4.5 Plasmodiale Phospholipasen

Während die in der Lipidbiosynthese und -Akquirierung involvierten Enzyme in *P. falciparum*, wie in Abschnitt I.4.2 beschrieben, in der Vergangenheit umfangreich erforscht wurden, ist die biochemische und funktionale Rolle der Phospholipasen weitestgehend unbekannt (zusammengefasst in Mitamura und Palacpac, 2003; Coppens, 2013; Ramakrishnan *et al.*, 2013; Flammersfeld *et al.*, 2018). Lediglich zwei plasmodiale Phospholipasen, das PLA₂-Homolog *PbPL* in *P. berghei* und PI-PLC wurden bislang eingehender untersucht:

PbPL (PBANKA_1128100) ist eine zwischen den verschiedenen *Plasmodium*-Arten hoch konservierte Phospholipase, die insgesamt aus 755 AS besteht. Am N-Terminus befindet sich im *PbPL* Protein ein Signalpeptid, der C-Terminus weist eine 32%ige Homologie und 55%ige

Ähnlichkeit zur humanen sekretierten Phospholipase Lezithin:Cholesterol Acyltransferase (LCAT) auf. LCAT ist ein Enzym, das in zwei Reaktionsschritten zunächst die Fettsäure an der *sn2*-Position in PC hydrolysiert, um diese in einem weiteren Schritt mit Cholesterin zu verestern. Das katalytische Zentrum von *PbPL* besteht aus einer katalytischen Serin-Aspartat-Histidin-Triade. Bhanot *et al.* (2005) konnten in ihrer Studie zeigen, dass *PbPL* auf der Oberflächenmembran der infektiösen Sporozoiten lokalisiert. Die Sporozoiten migrieren, nachdem sie von dem *Anopheles*-Moskito in die Haut des Wirtes injiziert wurden, von der Einstichstelle zur Leber, wo sie Hepatozyten infizieren und innerhalb einer parasitophoren Vakuole zu Leberschizonten proliferieren. Auf ihrem Weg von der Einstichstelle zur Leber müssen die Sporozoiten zunächst Hautepithelzellen, Lebergewebszellen und letztendlich bei der Invasion der Hepatozyten die Zellmembran transmigrieren (vgl. Abschnitt I.3). Bhanot *et al.* haben gezeigt, dass die an der Oberfläche lokalisierte *PbPL* durch ihre Membran-lytische Funktion wesentlich an der Transmigration beteiligt ist und *PbPL*-defiziente Parasiten durch eine verlängerte Präpatenz eine um 90% verringerte Leberinfektionsrate aufwiesen (Bhanot *et al.*, 2005). In einer daran anschließenden Studie konnte durch Burda *et al.* (2015) gezeigt werden, dass *PbPL* zudem an der PVM in Leberschizonten lokalisiert. Hier ist die Phospholipase an der Ruptur der PVM am Ende der exoerythrozytären Schizogonie beteiligt und *PbPL*-defiziente Parasiten wiesen einen signifikant verzögerten Austritt aus den Wirtshepatozyten und damit einhergehend eine später einsetzende erythrozytäre Schizogonie auf (Burda *et al.*, 2015). Darüber hinaus spielt *PbPL* auch eine wichtige Rolle bei dem Austritt der Parasiten aus der sessilen Oozyste am Ende der asexuellen Sporogonie und der Freisetzung der Sporozoiten in die Hämolymphe. Die Deletion von *PbPL* beeinträchtigt zwar nicht die Entwicklung der Mitteldarmstadien und führt im Vergleich zu Wildtyp-Parasiten zu einer normalen Anzahl von Sporozoiten in den Oozysten, jedoch konnte nach dem *PbPL*-Funktionsverlust eine verminderte Anzahl freigesetzter Sporozoiten in der Hämolymphe und in der Speicheldrüse detektiert werden. Zusammenfassend hat *PbPL* somit wichtige Funktionen in drei Phasen des plasmodialen Lebenszyklus: In der Freisetzung der Sporozoiten aus der Oozyste, in der Transmigration der Sporozoiten zu den Hepatozyten sowie in der Ruptur der PVM am Ende der Gewebsschizogonie (Bhanot *et al.*, 2005; Burda *et al.*, 2015).

PI-PLC (PF3D7_1013500) ist ein Protein, das aus 1385 AS besteht, und in nahezu allen Phasen des Lebenszyklus exprimiert wird. Im Allgemeinen hydrolysieren PI-PLCs, aktiviert durch die Signalweiterleitung eines G-Protein-gekoppelten-Rezeptors (GPCR), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu den *second messengern* Inosit-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol

(DAG). Das zyklische IP₃ diffundiert zum endoplasmatischen Retikulum und moduliert dort einen Ionenkanal, so dass Ca²⁺ ins Zytoplasma entlassen wird. Das lipophile DAG verbleibt dagegen nach der Hydrolyse in der Plasmamembran, wo es zusammen mit der steigenden intrazellulären Ca²⁺-Ionenkonzentration eine membranständige Proteinkinase C (PKC) aktiviert. PKC wiederum moduliert bzw. aktiviert durch Phosphorylierung nachgeordnete Enzyme und Faktoren und besitzt damit eine zentrale Rolle bei der zellulären Signaltransduktion (zusammengefasst in Berridge *et al.*, 2000; Rhee, 2001). In *Plasmodium* hingegen konnte bislang jedoch weder ein heterotrimerer GPCR, noch ein IP₃-sensitiver Rezeptor oder eine PKC identifiziert werden (Beraldo *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2011). Dennoch konnte in *Plasmodium* für die PI-PLC eine Beteiligung an der Signaltransduktion vom Zelläußeren ins Zellinnere und eine essenzielle Funktion in zahlreichen Ca²⁺-abhängigen Signalwegen gezeigt werden. Beispielsweise wird die PI-PLC bei dem Kontakt eines Merozoiten mit der Erythrozytenoberfläche aktiviert, wodurch ein Anstieg der intrazellulären Calmodulin- und Ca²⁺-Ionenkonzentration induziert wird. Dies wiederum aktiviert die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase B (PKB). Im Folgenden wird über die Sezernierung des Mikronemen-Inhalts, wie z.B. der Proteine EBA175 oder AMA1, die Bindung zwischen Merozoit und Wirtszelle intensiviert und der Merozoit apikal vor dem Eindringen in den Erythrozyten ausgerichtet. Durch einen chemischen induzierten Funktionsverlust der PI-PLC durch den kommerziellen PLC Inhibitor U73122 kann dieser Ca²⁺-/Calmodulin-abhängige Signalweg zur PKB-Aktivierung und somit die Merozoiteninvasion inhibiert werden (Vaid und Sharma, 2006; Vaid *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010; Raabe, Wengelnik, *et al.*, 2011; Raabe, Berry, *et al.*, 2011).

Auch bei der Gleitmotilität von Sporozoiten, bei der sowohl die Aktin-Myosin-Bewegung als auch die koordinierte Mikronemen-Sekretion als Ca²⁺-abhängige Prozesse beschrieben wurden, sowie bei der in Abschnitt I.3.2 beschriebenen Einleitung der Gametogenese konnte durch chemische *loss-of-function* Studien eine essenzielle Beteiligung der PI-PLC gezeigt werden (Kebaier und Vanderberg, 2010; Carey *et al.*, 2014; zusammengefasst in Kuehn und Pradel, 2010; Bennink *et al.*, 2016).

I.5 Ziele der Arbeit

Die Aufklärung molekularer Mechanismen, die für die Vermehrung und Ausbreitung des humanpathogenen Malariaerregers *P. falciparum* essenziell sind, sind Grundlage für die anwendungsorientierte Entwicklung wirksamer Interventionsstrategien. Insbesondere der Lipidmetabolismus sowie die darin involvierten Enzyme stellen dabei aufgrund der Auxotrophie

des Malariaerregers gegenüber vieler Fettsäuren und Lipide vielversprechende Angriffspunkte für zukünftige Wirkstoffe dar. Während zahlreiche Lipidmetabolismus-assoziierte Proteine in vorangegangenen Studien eingehend untersucht wurden, war die Proteinfamilie der Phospholipasen in *P. falciparum* bislang weitestgehend unbeachtet. Ziel dieser Arbeit war es daher zunächst alle in *Plasmodium* codierten Phospholipasen mittels Genomanalyse zusammenzufassen sowie deren potenzielle Funktion mittels Literaturrecherche und vergleichender Homologien zu evaluieren.

Während insbesondere PNPLAs in anderen pathogenen Mikroorganismen als wichtige Pathogenitätsfaktoren beschrieben worden sind, ist die Funktion und Wirkungsweise dieser Proteinklasse in *P. falciparum* gänzlich unbekannt. Um die biologische Relevanz dieser lipolytischen Proteine für *P. falciparum* beispielhaft zu demonstrieren, stellte die umfassende, funktionale Charakterisierung der als PNPLA1 bezeichneten PNPLA das Hauptziel dieser Arbeit dar. Hierfür sollte zunächst eine *in silico*-Analyse durchgeführt werden, um Rückschlüsse auf eine potenzielle Funktion zu erhalten. Im nächsten Schritt sollte die Expression und subzelluläre Lokalisation in den Blut- und Sexualstadien von *P. falciparum* mittels semiquantitativer RT-PCRs, Immunofluoreszenzassays, Western Blot-Analysen und Proteinfractionierungen untersucht werden. Für die funktionale Charakterisierung sollten mittels reverser Genetik PNPLA1-defiziente Mutanten generiert werden, um den Einfluss von PNPLA1 auf die intraerythrozytäre Replikation, die Gametozytenbildung, die Gametozytenreifung sowie auf die Gametogenese phänotypisch zu untersuchen. Dabei sollten sowohl Techniken des konventionellen Gen *Knock-outs* als auch des konditionierten Gen *Knock-downs* verwendet werden. Da Phospholipasen potenziell im plasmodialen Lipidmetabolismus involviert sind, sollten zusätzlich zum einen die enzymatische Aktivität und Substratspezifität von PNPLA1 mittels rekombinant exprimierter Proteine evaluiert und ferner mit Hilfe der PNPLA1-defizienten Parasiten vergleichende Lipidanalysen durchgeführt werden. In einem finalen Schritt sollte mittels chemischer *loss-of-function* Studien der Effekt von Phospholipase-Inhibitoren auf die Blut- und Sexualstadien in *Plasmodium* untersucht und mit dem Phänotyp der PNPLA1-defizienten Parasiten verglichen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zu einem besseren Verständnis über die molekularbiologischen Funktionen von Phospholipasen in *P. falciparum* beitragen und könnten als Grundlage für die Entwicklung neuartiger Antimalaria-Chemotherapeutika verwendet werden.

II. Material und Methoden

II.1 Materialien

II.1.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den folgenden Herstellern bezogen: Carl Roth (Karlsruhe, D), Eppendorf (Hamburg, D), GE Healthcare (München, D), Hartenstein (Würzburg, D), Sarstedt (Nümbrecht, D) und VWR (Radnor, USA). Das zur *in vitro*-Kultivierung von *P. falciparum* eingesetzte Gasgemisch (5% O₂/5% CO₂/90% N₂) wurde von der Firma Westfalen AG (Münster, D) bezogen. Das für die *in vitro*-Kultivierung von *P. falciparum* verwendete humane Erythrozytenkonzentrat (Blutgruppe A+) und das humane Serum (Blutgruppe A+) wurden von der transfusionsmedizinischen Abteilung des Universitätsklinikums Aachen (D) bezogen. Zur Generierung von Immunseren wurden 6-8 Wochen alte, weibliche SWISS-Mäuse von Janvier (Le Genest-Saint-Isle, F) oder NMRI-Mäuse von Charles River Laboratories (Wilmington, USA) verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den folgenden Firmen und Herstellern bezogen: Carl Roth (Karlsruhe, D), Invitrogen (Carlsbad, USA), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Die in dieser Arbeit verwendeten Lipide und Fettsäuren sind inklusive Herstellerangaben in Tabelle 1 zusammengefasst. Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren sind inklusive Herstellerangaben in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 1 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Lipide und Fettsäuren sowie deren Hersteller.

Lipid/Fettsäure	Hersteller
C13:0 Fettsäuren	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
C15:0-Fettsäurestandard	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Cholinchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Lipidomix® Standard	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Lysophosphatidylcholin 16:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Lysophosphatidylglycerol 16:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Ölsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Phosphatidylcholin (C21:0/C21:0)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylglycerol (C18:0/C18:0)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylinositol (C18:0/C18:0)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA

Tabelle 2 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren und deren Hersteller.

Inhibitor	Hersteller
2,4'-Dibromoacetophenon (4-BPB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
ASB14780	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bromoenol-Lacton	Biomol, Hamburg, D
Chloroquindiphosphatsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Epoxomicin	Enzo Life Science, New York, USA
N-Tosyl-L-Lysine Chlormethylketon-Hydrochlorid	AppliChem, Darmstadt, D
N-(p-Amylcinnamoyl) Anthranilsäure (ACA)	Biomol, Hamburg, D

II.1.2 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 3 mit Angabe der Typenbezeichnung und ihrem jeweiligen Hersteller aufgeführt.

Tabelle 3 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
Analysenwaage <i>ABJ 80-4NM</i>	Kern, Balingen, D
Autoklav DX-45	Systec, Linden, D
Autoklav VX-120	Systec, Linden, D
Elektroporator <i>Gene Pulser II</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
Fluoreszenzmikroskop <i>Leica DM 5500B</i>	Leica, Wetzlar, D
Fotoscanner <i>Epson Perfection 4990</i>	Epson, Suwa, JPN
Gaschromatographie mit Massen-spektrometrie-Kopplung <i>Agilent 5977A-7890B</i>	Agilent, Santa Clara, USA
Geldokumentationssystem <i>iX20</i>	Intas, Göttingen, D
Gelelektrophorese- und Spannungs-kammer	Bio-Rad, Hercules, USA
Horizontalschüttler <i>DOS-10L</i>	neoLab, Heidelberg, D
Inkubationsschrank <i>Heracell 150i</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inkubationsschrank <i>UNB 100</i>	Memmert, Schwabach, D
Magnetrührer <i>Hei-Tec</i>	Heidolph, Schwabach, D
Laborschüttler <i>MaxQ™ 8000</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lichtmikroskop <i>Leica DMLS</i>	Leica, Wetzlar, D
Lichtmikroskop <i>Motic BA310</i>	Motic, Hongkong, HK
pH-Meter <i>FiveEase™</i>	Mettler Toledo, Columbus, USA
Photometer <i>NanoDrop 2000c</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettierhilfe <i>Accu-Jet® Pro</i>	Brand GmbH, Wertheim, D
Pipettierhilfe <i>Eppendorf® Research®</i> 0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 20 µl; 200 µl; 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Plattenleser <i>SPARK 10M</i>	Tecan, Männedorf, CH
Präzisionswaage <i>PCB 1000-2</i>	Kern, Balingen, D
<i>Real-Time PCR System StepOnePlus™</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sterilbank <i>Scanlaf Mars</i>	Labogene, Lillerød, DK
<i>Thermocycler FlexCycler²</i>	Analytik Jena, Jena, D
<i>Thermocycler peqstarXS</i>	VWR, Radnor, USA
<i>Thermocycler SimpliAmp</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
Tischzentrifuge <i>Biofuge pico/fresco</i>	Heraeus, Hanau, D
Tischzentrifuge kühlbar <i>5415 R</i>	Eppendorf, Hamburg, D

Gerät	Hersteller
Ultraschallhomogenisator <i>UP50H</i>	Hielscher, Teltow, D
UV-Transilluminator <i>ECX-F26.MX</i>	Vilber Lourmat, Eberhardzell, D
Zentrifuge <i>Allegra X-15R</i>	Beckman Coulter, Brea, USA
Zentrifuge <i>Avanti J-E</i>	Beckman Coulter, Brea, USA

II.1.3 Puffer und Stammlösungen

Die Zusammensetzungen der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Stammlösungen können der folgenden Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4 Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Stammlösungen.

Puffer/Stammlösung	Zusammensetzung
Ampicillin Stammlösung (1000 x)	100 mg/ml in dH ₂ O
Blastizidin S Stammlösung	10 mg/ml Blastizidin S in dH ₂ O
Chloramphenicol Stammlösung (1000 x)	30 mg/ml in Ethanol p.a.
Cytomix-Puffer	120 mM KCl 0,15 mM CaCl ₂ 10 mM K ₂ HPO ₄ 10 mM KH ₂ PO ₄ 25 mM HEPES 2 mM EGTA 5 mM MgCl ₂ dH ₂ O ad 100 ml, pH 7,6
DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v) DEPC in dH ₂ O
Giemsa Puffer (10x)	8 mM KH ₂ PO ₄ 6 mM Na ₂ HPO ₄ dH ₂ O ad 1 l, pH 7,0
Glycerolyt 57	13,33 g DL-Natriumlaktat (einer 60%igen Lösung) 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
Hypoxanthin (1000 x)	50 mg/ml in 1 M NaOH
Lysepuffer für Parasitenlysate	4 ml 10% SDS 0,5 ml 10% Triton X-100 5 ml 1xPBS dH ₂ O ad 10 ml
Lysepuffer Proteinexpression	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA, pH 8,0 dH ₂ O ad 1 l
LysoPC (16:0) Stammlösung	99 mg in 10 ml Methanol (20 mM)
Lysozym/Triton X-100 Lösung	10 mg Lysozym 1 µl Triton X-100 40 mM Tris-HCl, pH 7,5

Puffer/Stammlösung	Zusammensetzung
Malstat-Reagenz	2 ml 10% Triton X-100 2 g L-Laktat 0,66 g Tris 66 mg APAD dH ₂ O ad 200 ml, pH 9,0
Ölsäure Stammlösung	84,74 mg in 10 ml Ethanol (30 mM)
Palmitinsäure Stammlösung	76,93 mg in 10 ml Ethanol (30 mM)
PBS (10 x)	10,6 g Na ₂ HPO ₄ 3,9 g NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O 85,5 g NaCl dH ₂ O ad 1 l, pH 7,4
Proteinaufreinigung Säulenpuffer (mit Maltose)	20 mM Tris-HCl, pH 7,2 200 mM NaCl 1 mM EDTA, pH 8,0 10 mM Maltose dH ₂ O ad 1 l
Proteinaufreinigung Säulenpuffer (ohne Maltose)	20 mM Tris-HCl, pH 7,2 200 mM NaCl 1 mM EDTA, pH 8,0 dH ₂ O ad 1 l
SDS-PAGE-Laufpuffer (10 x)	29 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS dH ₂ O ad 1 l
SDS-Probenpuffer (5 x)	60 mM Tris-HCl 50% Glycerin 10% SDS 0,1% Bromphenolblau, pH 6,8
TAE (50 x)	2 M Tris-HCl 2 M Essigsäure 50 mM EDTA, pH 8,0 dH ₂ O ad 1 l
TBS (10 x)	100 mM Tris-HCl 1,5 M NaCl dH ₂ O ad 1 l, pH 7,5
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0 dH ₂ O ad 100 ml, pH 8,0
Western Blot Blockierlösung	5% Milchpulver in 1 x TBS
Western Blot Equilibrierungs-Puffer	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ dH ₂ O ad 1 l, pH 9,5
Western Blot Stopp-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA, pH 8,0 dH ₂ O ad 1 l

Puffer/Stammlösung	Zusammensetzung
Western Blot Transferpuffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 200 ml Methanol dH ₂ O ad 1 l
Xanthurensäure (1 mM)	0,05 g Xanthurensäure 1 ml 0,5 M NH ₄ OH 243 ml dH ₂ O

II.1.4 Medien

In Tabelle 5 sind alle für die Kultivierung von *P. falciparum* und *E. coli* verwendeten Medien sowie deren Zusammensetzung zusammengefasst. Zur *in vitro*-Kultivierung von *P. falciparum* wurde humanes Serum (Blutgruppe A+) verwendet und in allen verwendeten Medien vor Verwendung für 2 h bei 55°C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Alle weiteren Komponenten wurden, falls nicht anders angegeben, in RPMI gelöst und vor Verwendung sterilfiltriert (0,2 µm). Die zur Kultivierung von *E. coli* verwendeten Medien wurden mit dH₂O hergestellt und durch Autoklavieren sterilisiert. Antibiotika und Glucose-Stammlösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm) und nach dem Abkühlen im Anschluss an den Autoklaviervorgang dem Medium hinzugefügt.

Tabelle 5 Verwendete Medien und ihre Zusammensetzung.

Medien zur <i>in vitro</i> -Kultivierung von <i>P. falciparum</i>	
Bezeichnung	Zusammensetzung
A+-Zellkulturmedium	500 ml RPMI 1640 50 ml humanes Serum A+ 550 µl 1000x Hypoxanthin 550 µl 1000x Gentamycin
BSD Zellkulturmedium	500 ml RPMI 1640 50 ml humanes Serum A+ 550 µl 1000x Hypoxanthin 550 µl 1000x Gentamycin 137,5 µl Blastizidin S* Stammlösung (*5,4 µM finale Konzentration)
WR99210 Zellkulturmedium	500 ml RPMI 1640 50 ml humanes Serum A+ 550 µl 1000x Hypoxanthin 550 µl 1000x Gentamycin 67,5 µl WR99210* Stammlösung (*2,5 mM finale Konzentration)

GlcNAc Zellkulturmedium	500 ml RPMI 1640 50 ml humanes Serum A+ 550 µl 1000x Hypoxanthin 550 µl 1000x Gentamycin 67,5 µl WR99210 Stammlösung 6,08 g N-Acetyl-Glucosamin* (*50 mM finale Konzentration)
-SerM	500 ml RPMI 1640 1950 mg fett-freies BSA 961 mg NaHCO ₃ 500 µl Ölsäure Stammlösung* 500 µl Palmitinsäure Stammlösung* 500 µl 1000x Hypoxanthin 500 µl 1000x Gentamycin (*30 µM finale Konzentration)
-SerM/LysoPC	500 ml RPMI 1640 1950 mg fett-freies BSA 961 mg NaHCO ₃ 500 µl Ölsäure Stammlösung* 500 µl Palmitinsäure Stammlösung* 500 µl 1000x Hypoxanthin 500 µl 1000x Gentamycin 500 µl LysoPC Stammlösung** (*30 µM finale Konzentration, ** 20 µM finale Konzentration)
-SerM/Cholin	500 ml RPMI 1640 1950 mg fett-freies BSA 961 mg NaHCO ₃ 999,87 mg Glucose*** 20,94 mg Cholinchlorid** 500 µl Ölsäure Stammlösung* 500 µl Palmitinsäure Stammlösung* 500 µl 1000x Hypoxanthin 500 µl 1000x Gentamycin (*30 µM finale Konzentration, ** 300 µM finale Konzentration, *** 11,1 mM finale Konzentration)
-SerM/Serum	500 ml RPMI 1640 1950 mg fett-freies BSA 961 mg NaHCO ₃ 500 µl Ölsäure Stammlösung* 500 µl Palmitinsäure Stammlösung* 550 µl 1000x Hypoxanthin 550 µl 1000x Genamycin 50 ml humanes Serum A+ (*30 µM finale Konzentration)

Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	
Medium	Zusammensetzung
SOC	20 g/l Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 0,5 g/l NaCl 0,186 g/l KCl 0,952 g/l MgCl ₂ pH 7-7,5 Nach dem Autoklavieren wurden pro 1 L Medium 20 ml sterilfiltrierte 1 M Glucose-Lösung hinzu- gegeben.
LB _(Amp/Cam) -Medium [Agar]	10 g/l Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 5 g/l NaCl [15 g/l Agar] (1 ml/l Ampicillin Stammlösung) (1 ml/l Chloramphenicol Stammlösung)

II.1.5 Kommerzielle Enzyme und Laborkits

Die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Laborkits und kommerziellen Enzyme wurden von folgenden Firmen und Herstellern bezogen: MACHEREY-NAGEL (Düren, D), New England Biolabs (Ipswich, USA), Promega (Madison, USA), Invitrogen (Karlsruhe, D), QIAGEN (Hilden, D), Roche (Basel, CH) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D).

II.1.6 Molekulare Größenstandards

Bei der Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden 5 µl des *2-Log DNA Ladders* (New England Biolabs, Ipswich, USA) als Größenstandard zur Abschätzung der DNA-Fragmentlänge verwendet (Abbildung 7A). Bei der Auftrennung von Protein-Gemischen mittels SDS-PAGE wurden 5 µl des *PierceTM Unstained Protein Molecular Weight Markers* zur Abschätzung der Proteingrößen verwendet (Abbildung 7B). Bei der Western Blot-Analyse wurden je nach molekularer Größenbandbreite der Proteinproben 5 µl des *PageRulerTM Prestained Protein Ladders* oder des *SpectraTM Multicolor High Range Protein Ladders* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet (Abbildung 7C und D).

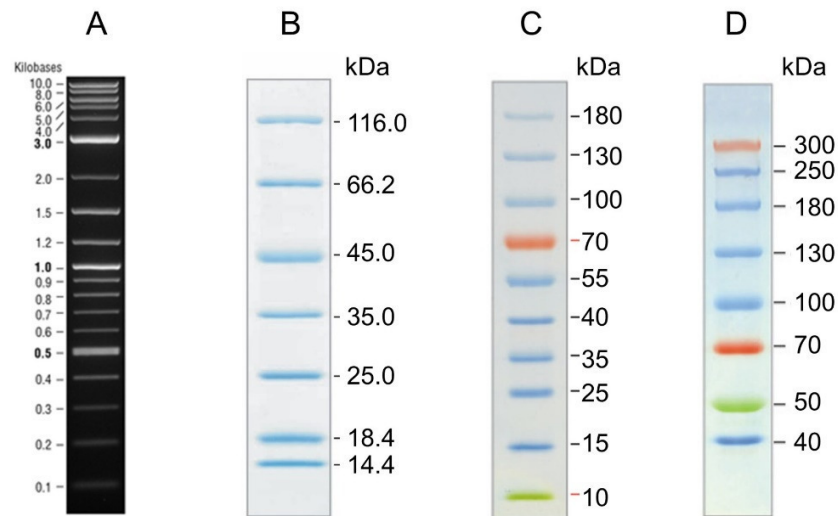


Abbildung 7 Verwendete DNA- und Protein-Molekulargewichtsstandards. (A) 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, USA). (B) Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). (C) PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). (D) Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

II.1.7 Plasmide

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide zur rekombinanten Proteinexpression in *E. coli* sowie zur Generierung transgener *P. falciparum* Parasitenlinien mittels reverser Genetik beschrieben. Alle aufgeführten Plasmide enthalten einen Replikationsursprung (*origin of replication*, kurz *ori*) zur Amplifikation in *E. coli* Zellen. Weitere relevante Gensequenzen und Eigenschaften der jeweiligen Plasmide werden aufgeführt. Die Vektorkarten der jeweiligen Plasmide befinden sich im Anhang dieser Arbeit (Abbildung 54-Abbildung 59).

pMAL-c5x (New England Biolabs, Ipswich, USA)

Der pMAL-c5x Vektor (Abbildung 54) wurde zur rekombinanten Proteinexpression in *E. coli* Zellen verwendet. Der Vektor besitzt drei Leserahmen. Einer der Leserahmen dient der Ampicillinresistenz zur Selektion in *E. coli* Zellen, der zweite Leserahmen codiert für den Lac-Repressor, der über den *lacIq* Promotor reguliert wird. Der dritte Leserahmen besteht aus dem *malE*-Gen, welches für das Maltose-bindende Protein codiert und über den *tac* Promoter und das *lac*-Operon reguliert wird. Die Gensequenz für das zu exprimierende Protein wird über die *multiple cloning site* 3' hinter der *malE*-Sequenz im gleichen Leserahmen eingebracht. Der Lac-Repressor bindet an das *lac*-Operon und verhindert somit die Expression des Zielproteins. Durch die Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) kommt es zu einer allosterischen Konformationsänderung des Lac-Repressors, die die Wechselwirkung mit dem *lac*-Operator

inhibiert und somit die Expression des Zielgens induziert. IPTG, ein Galactose-Thioglycosid, wird selber nicht von den *E. coli* Zellen metabolisiert, weshalb die Konzentration über die Expressionsdauer konstant bleibt. Die rekombinanten Proteine werden zytoplasmatisch als MBP-Fusionsproteine exprimiert, die über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt werden können. Der MBP-Tag ist dabei N-terminal (Nagai und Thøgersen, 1987; Riggs, 2001).

pGEX-6P-1 (GE Healthcare, Chicago, USA)

Der pGEX-6P-1 Vektor (Abbildung 55) wurde zur rekombinanten Proteinexpression in *E. coli* Zellen verwendet. Der Vektor besitzt drei Leserahmen. Einer der Leserahmen dient der Ampicillinresistenz zur Selektion in *E. coli* Zellen, der zweite Leserahmen codiert für den Lac Repressor, der über den *lacIq* Promotor reguliert wird. Der dritte Leserahmen codiert für die Glutathione S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* und wird über den *tac* Promoter und das *lac*-Operon reguliert. Die Gensequenz für das zu exprimierende Protein wird über die *multiple cloning site* 3' hinter der *gst*-Sequenz im gleichen Leserahmen eingebracht. Die Proteinexpression wird wie für den Vektor pMAL-c5x beschrieben durch die Zugabe von IPTG induziert. Die rekombinanten Proteine werden zytoplasmatisch als GST-Fusionsproteine exprimiert, die über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt werden können. Der GST-Tag befindet sich dabei N-terminal (Kaelin *et al.*, 1992).

pCAM-BSD-KO

Der pCAM-BSD-KO Vektor (Abbildung 56) dient der Generation von Protein-*Knock-out*-Mutanten in *P. falciparum* auf DNA-Ebene, indem das Zielgen gezielt disruptiert wird. Der Vektor besitzt zwei Leserahmen. Einer der Leserahmen dient der Ampicillinresistenz zur Selektion in *E. coli* Zellen, der andere Leserahmen dient der Blasticidinresistenz zur Selektion erfolgreich transfizierter Parasiten. Die BSD-Resistenz wird über das Gen für die Blasticidin-S-Deaminase aus *Aspergillus terreus* vermittelt. Die Blasticidinresistenzkassette wird über den Promotor des Gens *pfhrpIII* (*P. falciparum* histidin-rich protein III) und die Terminationssequenz des Gens *pfhrpII* (*P. falciparum* histidin-rich protein II) reguliert. Der Vektor integriert über das Einbringen einer homologen Sequenz mittels Einzelstrangüberlagerung in das Genom von *Plasmodium* und unterbricht somit das Leseraster der Zielsequenz. Der Vektor besitzt seinen Ursprung in dem publizierten Vektor pCAM-BSD, dieser ist auf den kommerziell erhältlichen Vektor pBlueskript II SK+ (Stratagene, La Jolla, USA) zurückzuführen (Mamoun *et al.*, 1999; Sidhu *et al.*, 2005; Dorin-Semblat *et al.*, 2007).

pARL-HA-*glmS*

Der pARL-HA-*glmS* Vektor (Abbildung 57) dient der Generation von Protein-*Knock-down*-Mutanten in *P. falciparum* auf RNA-Ebene, in denen durch Zugabe eines Induktors die Expression des Zielproteins konditionell ausgeschaltet bzw. herunterreguliert werden kann. Der Vektor besitzt zwei Leserahmen. Einer der Leserahmen dient der Ampicillinresistenz zur Selektion in *E. coli* Zellen, der zweite Leserahmen dient der WR99210-Resistenz zur Selektion erfolgreich transfizierter Parasiten. Die WR99210-Resistenz wird über das Gen *hDHFR* (Humane Dihydrofolatreduktase) vermittelt. Die Transkription wird über den Promotor für das Gen *pfhsp86* Promotor vermittelt, die Terminationssequenz stammt aus dem Gen für *pbd3* (*P. berghei* Dihydrofolatreduktase). Der Vektor integriert über das Einbringen einer homologen Sequenz mittels Einzelstrangüberlagerung in das Genom von *Plasmodium*. Das Zielgen wird so mit der Sequenz für einen HA-Affinitätstag sowie einer Ribozym-Sequenz (*glmS*) in der 3'UTR markiert. Die HA-Sequenz stammt aus dem humanen Influenza Hemagglutinin, die *glmS*-Sequenz stammt aus *Bacillus subtilis*. Nach Integration des Vektors in das Genom von *Plasmodium* entsteht bei der Expression des Gens chimäre RNA. Das Ribozym in der 3'UTR kann durch den Induktor D-(+)-Glucosamin Hydrochlorid (GlcN) induziert werden und katalysiert die Degradierung der RNA (Prommana *et al.*, 2013). Der Vektor besitzt seinen Ursprung in dem publizierten Vektor pARL1a+ (Crabb *et al.*, 2004). Der pARL-HA-*glmS* Vektor wurde freundlicherweise von Dr. Jude Przyborski (Universitätsklinikum Heidelberg, D) für diese Studie zur Verfügung gestellt.

pARLII-GFP

Der pARLII-GFP Vektor kann für die Überexpression eines Zielproteins in *P. falciparum* genutzt werden, wobei das Protein episomal als Fusionsprotein mit einem C-terminalen GFP-Tag (grün fluoreszierendes Protein) exprimiert wird. Der Vektor integriert nicht in das Genom von *P. falciparum*. Der Vektor besitzt drei Leserahmen. Einer der Leserahmen dient der Ampicillinresistenz zur Selektion in *E. coli* Zellen, der zweite Leserahmen codiert für die humane Dihydrofolatreduktase, die eine Resistenz gegenüber WR99210 zur Selektion erfolgreich transfizierter Parasitenzellen vermittelt, und der dritte Leserahmen codiert für eine GFP-Protein-Sequenz. Die für das Zielprotein codierenden Abschnitte der Gensequenz (ohne Introns) werden über die *multiple cloning site* so in den Vektor eingebracht, dass diese im gleichen Leserahmen wie die *gfp*-Gensequenz liegen, um eine Expression als GFP-Fusionsprotein zu gewährleisten. Der Vektor wurde in zwei Variationen verwendet. Im *crt*-pARLII-GFP Vektor (Abbildung 58) ist die

episomale Expression des Zielproteins unter der Kontrolle des *crt*-Promoters, der in *P. falciparum* die Expression des *chloroquine resistance transporter*-Proteins reguliert und sowohl in asexuellen und sexuellen Blutstadien aktiv ist (Przyborski *et al.*, 2005; Spork *et al.*, 2009; Külzer *et al.*, 2010). Im *fnpa*-pARLII-GFP Vektor (Abbildung 59) ist die episomale Expression des Zielproteins unter der Kontrolle des Gametozyten-spezifischen *fnpa*-Promoters, der in *P. falciparum* die Expression des PfFNPA Proteins reguliert (Pradel *et al.*, 2004; Bennink *et al.*, 2018).

II.1.8 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper sind mit ihren jeweiligen verwendeten Verdünnungen, dem Ursprungstier sowie ihrer Herkunft in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper mit ihrer jeweiligen Verdünnung, Ursprungstier und Herkunft. IFA, indirekter Fluoreszenzassay; WB, Western Blot.

Bezeichnung	Ursprung	Verdünnung IFA	Verdünnung WB	Herkunft
α -PfAktinI	Maus	-	1:1000	(Ngwa <i>et al.</i> , 2013)
α -AMA1	Kaninchen	-	1:1000	(Boes <i>et al.</i> , 2015)
α -PfFL	Maus	1:200	1:1000	AG Pradel (Weißbach <i>et al.</i> , 2017)
α -GFP	Maus	1:200	1:6000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
α -HA	Kaninchen	1:100	1:1500	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
α -HA	Ratte	-	1:1000	Roche, Basel, CH
α -HP1	Kaninchen	-	1:20000	Till Voss (Brancucci <i>et al.</i> , 2014)
α -NMS	Maus	1:200	-	AG Pradel
α -Pf39	Maus	-	1:1000	AG Pradel
α -PfPNPLA1rp1	Maus	1:200	1:1000	AG Pradel
α -PfPNPLA1rp2	Maus	1:200	-	AG Pradel
α -Pfs230	Maus	1:200	-	AG Pradel
α -Pfs230	Kaninchen	1:200	-	Biogenes, Berlin, D
α -Pfs25	Kaninchen	1:1000	-	ATCC, Manassas, USA

Die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper sind mit ihren jeweiligen verwendeten Verdünnungen, dem Ursprungstier sowie ihrer Herkunft in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper mit ihrer jeweiligen Verdünnung, Ursprungstier und Herkunft. IFA, indirekter Fluoreszenzassay; WB, Western Blot.

Bezeichnung	Ursprung	Verdünnung	Verwendung	Hersteller
α -Maus-Alexa Fluor 488	Ziege	1:1000	IFA	Invitrogen, Carlsbad, USA

Bezeichnung	Ursprung	Verdünnung	Verwendung	Hersteller
α -Maus-Alexa Fluor 594	Ziege	1:1000	IFA	Invitrogen, Carlsbad, USA
α -Kaninchen-Alexa Fluor 488	Ziege	1:1000	IFA	Invitrogen, Carlsbad, USA
α -Kaninchen-Alexa Fluor 594	Ziege	1:1000	IFA	Invitrogen, Carlsbad, USA
α -Maus-Alkalische Phosphatase	Ziege	1:15.000	WB	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
α -Kaninchen-Alkalische Phosphatase	Ziege	1:15.000	WB	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
α -Ratte-Alkalische Phosphatase	Ziege	1:15.000	WB	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

II.1.9 Genidentifikationsnummern

In Tabelle 8 sind alle für diese Arbeit verwendeten bzw. relevanten Proteine mit ihren zugehörigen Genidentifikationsnummern gemäß der *Plasmodium* Datenbank PlasmoDB aufgeführt (www.plasmodb.org, Aurrecoechea *et al.*, 2009).

Tabelle 8 Relevante Proteine und ihre zugehörigen Gen-Identifikationsnummern (GenID) gemäß der *Plasmodium* Datenbank PlasmoDB (www.plasmodb.org, Aurrecoechea *et al.*, 2009).

Proteinname	Gen-ID	Beschreibung
7-Helix-1	PF3D7_0525400	7-Helix-1 Protein
ActinI	PF3D7_1246200	Zytoskelett Strukturprotein
Aldolase	PF3D7_1444800	Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase
α/β Hydrolase	PF3D7_1001600	Hydrolase
AMA1	PF3D7_1133400	Apikales Membranantigen 1
AP2-G	PF3D7_1222600	Transkriptionsfaktor mit AP2 Domäne
apiAP2	PF3D7_0516800	Transkriptionsfaktor mit AP2 Domäne
CCp2	PF3D7_1455800	LCCL-Domäne aufweisendes Protein
CK	PF3D7_1401800	Cholin Kinase
CRT	PF3D7_0709000	Chloroquin Resistenz Transporter
EK	PF3D7_1124600	Ethanolamin Kinase
Falcilysin	PF3D7_1360800	Protease
FNPA	PF3D7_1451600	LCCL-Domäne beinhaltendes Protein
GAPDH	PF3D7_1462800	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDV1	PF3D7_0935400	<i>Gametocyte development protein 1</i>
HP1	PF3D7_1220900	Heterochromatin Protein 1
<i>Pf39</i>	PF3D7_1108600	ER-residentes Ca^{2+} -bindendes Protein
<i>Pfs230</i>	PF3D7_0209000	6-Cystein Protein

Proteinname	Gen-ID	Beschreibung
<i>Pfs25</i>	PF3D7_1031000	Ookinete Oberflächenprotein P25
PMT	PF3D7_1343000	Phosphoethanolamin Methyltransferase
PNPLA1	PF3D7_0209100	Patatin-ähnliche Phospholipase
PNPLA2	PF3D7_1358000	Patatin-ähnliche Phospholipase
PNPLA3	PF3D7_0924000	Patatin-ähnliche Phospholipase
PNPLA4	PF3D7_0218600	Patatin-ähnliche Phospholipase
REX1	PF3D7_0935900	<i>Ring-exported protein 1</i>
SAMS	PF3D7_0922200	S-Adenosylmethionin Synthetase
SBP1	PF3D7_0501300	<i>Skeleton-binding protein 1</i>
Seryl tRNA-Ligase	PF3D7_0717700	Ligase
Sir2A	PF3D7_1328800	Transkription-regulatorisches Protein Sir2A

II.1.10 Oligonukleotide

Alle für Klonierungszwecke, diagnostische- und Integrations-PCRs, semiquantitative RT-PCRs sowie für quantitative *real-time*-RT-PCRs (qRT-PCRs) verwendeten Oligonukleotide sind in den folgenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 9 Auflistung der DNA-Sequenzen der für Klonierungen verwendeten Oligonukleotide. Die Sequenzen sind in 5'→3' Richtung aufgeführt. Angegeben sind die Bezeichnung des jeweiligen Oligonukleotids, der Zielvektor, die verwendete Restriktionsendonuklease sowie die Größe des erwarteten PCR-Produkts. Zur Zielsequenz homologe Bereiche sind in Großbuchstaben angegeben, Restriktionsschnittstellen der Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. Für die Klonierung von PNPLA1-RP3 wurde die *pnpla1*-Gensequenz als Matrize verwendet, die Codon-optimiert ist für die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* Zellen (Abbildung 53). bp, Basenpaare; fw, *forward*; REN, Restriktionsendonuklease; rev, *reverse*.

Oligonukleotid	Vektor	Sequenz (5'→3')	REN	Größe
PNPLA1rp1 fw	pMAL-c5x	tagc <u>gaaggatttc</u> ATGGGCAACTGCTTCTGCACCA	<i>XmnI</i>	541 bp
PNPLA1rp1 rev		tagc <u>ctgcag</u> TGCTAACTTGTGAGCTAACCT	<i>PstI</i>	
PNPLA1rp2 fw	pMAL-c5x	tagc <u>gaaggatttc</u> CGTTTCCATTTTGTCGCTGGACGGAGGG	<i>XmnI</i>	510 bp
PNPLA1rp2 rev		tagc <u>ctgcag</u> TAGCCATAAAGGAACTTTATTAATACC	<i>PstI</i>	
PNPLA1rp3 fw	pGEX-6P-1	tcgat <u>ctcgag</u> ATGAGTGATGATGATGATAAGATATATATATAT	<i>BamHI</i>	2060 bp
PNPLA1rp3 rev		tagc <u>ctcgag</u> TTACAGGTATTTGCTGCGAATATAGTTATT	<i>XhoI</i>	
PNPLA1-KO fw	pCAM-BSD-KO	tagg <u>atgcc</u> AGAATGCAGGTGGAGTTAGA	<i>BamHI</i>	567 bp
PNPLA1-KO rev		atg <u>cgggccgc</u> TTATCCACAATAAAGCAACGAAT	<i>NotI</i>	
PNPLA1-KD fw	pARL-HA- <i>glmS</i>	tagc <u>cgggccgc</u> ACAGGATGTTAGTAATATGTGGCC	<i>NotI</i>	867 bp

Oligonukleotid	Vektor	Sequenz (5'→3')	REN	Größe
PLPLA1-KD rev		tacg ccctagg TAGATATTTTGAACGTAT GTAATT	<i>AvrII</i>	
PNPLA1-GFP fw	pARLII- GFP	tcgat ctcgag ATGAGTGATGATGATGAT AAGATATATATATAT	<i>XhoI</i>	2058 bp
PNPLA1-GFP rev		tag ccctagg TAGATATTTTGAACGTAT GTAATTATTTGC	<i>AvrII</i>	

Tabelle 10 DNA-Sequenzen der für RT-PCRs und qRT-PCRs verwendeten Oligonukleotide. Die Sequenzen sind in 5'→3' Richtung aufgeführt. Angegeben sind das jeweilige Zielgen, die Bezeichnung des jeweiligen Oligonukleotids sowie die Größe des erwarteten PCR-Produkts. bp, Basenpaare; fw, *forward*; rev, *reverse*.

Gen	Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Größe
<i>aldolase</i>	Aldolase RT fw	TAGATGGATTAGCAGAAAGATGC	378 bp
	Aldolase RT rev	TCAAAATCACGCACATCCTG	
<i>ama1</i>	AMA1 RT fw	AGAAACCAACCATCTTGAGTAGTGG	407 bp
	AMA1 RT rev	AGAAACCAACCATCTTGAGTAGTGG	
<i>ccp2</i>	CCp2 RT fw	AGTTGTTGATGGGCTTTTGG	286 bp
	CCp2 RT rev	ATTCGGTGCCATTAGGGTTA	
<i>pnpla1</i>	pnpla1 RT fw	CGGGTCAGGTGCCTACTAAA	220 bp
	pnpla1 RT rev	TCAAAATCACGCACATCCTG	
<i>seryl-tRNA-Ligase</i>	Seryl-tRNA-Ligase fw	AAGTAGCAGGTCATCGTGGTT	158 bp
	Seryl-tRNA-Ligase rev	TTCGGCACATTCTTCCATAA	
<i>ap2-g</i>	AP2-G RT fw	TTCCAACACGAAAGGAGAGC	198 bp
	AP2-G RT rev	TGCATGCTCTCTTCCCATTC	
<i>ck</i>	CK RT fw	CATTTGATGGTGGGCGTATC	150 bp
	CK RT rev	CCCAGTGTTTCAGGTAAATGACG	
<i>pmt</i>	PMT RT fw	AACAGAAAAAGAAAATTGGGATGA	250 bp
	PMT RT rev	GGACCAGCCATCATCAAGAC	
<i>a/βhydrolase</i>	a/β hydrolase RT fw	GCCTCCCTCAAAAGTGCATC	243 bp
	a/β hydrolase RT rev	TAATGTTTCGTTCCCCGCAAT	
<i>gdv1</i>	GDV1 RT fw	CGCAACATGCTCAAAAGTAACC	153 bp
	GDV1 RT rev	GTTTTCCTTCCCTGGGCCTAA	
<i>sir2a</i>	Sir2A RT fw	CCCAAGTTTTTCGAGGGTCAT	238 bp
	Sir2A RT rev	CCCCTAGCTTCATGTAATCCATC	
<i>ek</i>	EK RT fw	TCATGTCCAATGGAAAGAGCAT	203 bp
	EK RT rev	CCCCAAACGATATGTGAGCA	
<i>sams</i>	SAMS RT fw	TGTGGTGGACATTTGGAACC	197 bp
	SAMS RT rev	GCTGGTCCCTCCAAGAACAAA	
<i>apiap2</i>	ApiAP2 RT fw	AGCCCATGTTGCAATGTTTC	210 bp
	ApiAP2 RT rev	AGATGTGCACAGCGAGGAAT	
<i>sbp1</i>	SBP1 RT fw	CCAGCCGAATCTATGTCCCC	224 bp
	SBP1 RT rev	TGTTCTGGGTTTTGTTCTAGCA	
<i>rex1</i>	REX1 RT fw	TGATGTAGATCCAGCAGTGCA	342 bp
	REX RT rev	TGTTTCATCTTTTGCTTGCGC	
<i>gapdh</i>	GAPDH RT fw	CACCAAAGGATGACACCCCA	180 bp
	GAPDH RT rev	CAGTGGATGCATGAACGGTG	

Tabelle 11 Auflistung der DNA-Sequenzen der für die Orts-gerichtete Mutagenese-PCR verwendeten Oligonukleotide. Angegeben sind die Bezeichnung des jeweiligen Oligonukleotids sowie die Oligonukleotid-Sequenzen in 5'→3' Richtung. Die mutagenen Basen sind in Klein-Buchstaben dargestellt. Für die Orts-gerichtete Mutagenese-PCR wurde die *pnplA1*-Gensequenz als Matrize verwendet, die Codon-optimiert ist für die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* Zellen (Abbildung 53). fw, *forward*; rev, *reverse*.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
PNPLA1ΔS383A fw	GATATGGTTTGTGGCACCgcTGCCGGTGGTCTGATT
PNPLA1ΔS383A rev	AATCAGACCACCGGCAGcGGTGCCACAAACCATATC
PNPLA1ΔD531A fw	ATCCATCTGGTGgcgGGTGCACCTGAAAGCA
PNPLA1ΔD531A rev	TGCTTTCAGTGCACCcgcCACCAGATGGAT
PNPLA1ΔD487A fw	CGCCGAAAGCTATgcaGGCATTAACAAAG
PNPLA1ΔD487A rev	CTTTGTTAATGCCtgcATAGCTTTCGGCG

Tabelle 12 Auflistung der DNA-Sequenzen der für diagnostische PCRs verwendeten Oligonukleotide. Angegeben sind die Zielregionen, die Bezeichnung des jeweiligen Oligonukleotids, die DNA-Sequenz in 5'→3' Richtung sowie die erwarteten Größen der PCR-Produkte. bp, Basenpaare; fw, *forward*; KD, *Knock-down*; KO, *Knock-out*; rev, *reverse*.

Zielregion	Name	Sequenz (5'→3')	Größe
PNPLA1-KO			
5'-Integration	PNPLA1-KO-Integ5'	TTTTATTTTTTACCTGACCAGTTC	773 bp
	pCAM-BSD rev	CAATTAACCCTCACTAAAG	
3'-Integration	PNPLA1-KO-Integ3'	GTCAATATGCCCCCTCCGTCCAGCG	833 bp
	pCAM-BSD fw	TATTCCTAATCATGTAAATCTTAAA	
Episom	pCAM-BSD fw	TATTCCTAATCATGTAAATCTTAAA	712 bp
	pCAM-BSD rev	CAATTAACCCTCACTAAAG	
Wildtyp	PNPLA1-KO-Integ3'	GTCAATATGCCCCCTCCGTCCAGCG	881 bp
	PNPLA1-KO-Integ5'	TTTTATTTTTTACCTGACCAGTTC	
PNPLA1-KD			
5'-Integration	PNPLA1-KD-Integ5'	CTGGACGGAGGGGGCATATTGACC	1124 bp
	pARL-HA- <i>glmS</i> rev	CCTTAGAGCTCGGCATAATCTGG	
3'-Integration	PNPLA1-KO-Integ3'	GCTTACAAATAATTACATATTTATATGCTA CCTC	1019 bp
	pARL-HA- <i>glmS</i> fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCG	
Episom	pARL-HA- <i>glmS</i> fw	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCG	1079 bp
	pARL-HA- <i>glmS</i> rev	CCTTAGAGCTCGGCATAATCTGG	
Wildtyp	PNPLA1-KO-Integ3'	GCTTACAAATAATTACATATTTATATGCTA CCTC	1062 bp
	PNPLA1-KD-Integ5'	CTGGACGGAGGGGGCATATTGACC	
crt-/fnpa-PNPLA1-GFP			
Plasmid-nachweis	PNPLA1-GFP-epi-fw	GATATGGTATGCGGTACAGCCGCCGGTGGT T TAATAAG	1108 bp
	PNPLA1-GFP-epi-rev	CAAGTGTTGGCCATGGAA	

II.1.11 Organismen und Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene *E. coli* Stämme und *P. falciparum*-Zelllinien verwendet. Die verwendeten Organismen und Zelllinien sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13 Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien und Bakterienstämme. Aufgeführt sind die Zelllinien/Stämme mit ihrer Beschreibung, dem verwendeten Transfektionsvektor und ihrer Herkunft/Referenz. ASEX, episomale Expression in asexuellen Parasiten; GZ, episomale Expression in Gametozyten.

Stamm/Linie	Beschreibung	Transfektionsvektor (integriert/episomal); Resistenz	Herkunft/Referenz
<i>P. falciparum</i>			
<i>P. falciparum</i> WT NF54	Parasitärer Wildtyp	-	(Ponnudurai <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. falciparum</i> PNPLA1-KO Klon A12	Parasitäre PNPLA1- <i>Knock-out</i> Mutante	pCAM-BSD-KO (integriert); BSD	Wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert.
<i>P. falciparum</i> PNPLA1-KO Klon C11	Parasitäre PNPLA1- <i>Knock-out</i> Mutante	pCAM-BSD-KO (integriert); BSD	Wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert.
<i>P. falciparum</i> PNPLA1-KD	Parasitäre PNPLA1- <i>Knock-down</i> Mutante	pARL-HA- <i>glmS</i> (integriert); WR99210	Wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert.
<i>P. falciparum crt</i> -PNPLA1-GFP/WT	Parasitäre PNPLA1-GFP Überexpressionslinie (ASEX)	pARLII- <i>crt</i> -GFP (episomal); WR99210	Wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert.
<i>P. falciparum fnpa</i> -PNPLA1-GFP/WT	Parasitäre PNPLA1-GFP Überexpressionslinie (GZ)	pARLII- <i>fnpa</i> -GFP (episomal); WR99210	Wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert.
<i>P. falciparum</i> PNPLA1-KO (<i>crt</i> KOMP)	Parasitäre PNPLA1- <i>Knock-out</i> Mutante mit komplementierter PNPLA1-GFP Überexpression (ASEX)	pARLII- <i>crt</i> -GFP (episomal); WR99210	Wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert.
<i>P. falciparum</i> PNPLA1-KO (<i>fnpa</i> KOMP)	Parasitäre PNPLA1- <i>Knock-out</i> Mutante mit komplementierter PNPLA1-GFP Überexpression (GZ)	pARLII- <i>fnpa</i> -GFP (episomal); WR99210	Wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert.
<i>E. coli</i>			
<i>E. coli</i> Stellar	Bakterieller Klonierungs- und Transformationsstamm	-	Clontech, Mountain View, USA
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus®-(DE3)-RIL	Bakterieller Expressionsstamm	Chloramphenicol	Stratagene, La Jolla, USA

II.1.12 Computerprogramme und Online-Anwendungen

In dieser Arbeit wurden verschiedene Computerprogramme und Online-Anwendungen für die bioinformatische Analyse von Proteinen und Gensequenzen, für die Bildbearbeitung sowie zur statistischen Auswertung erhobener Daten verwendet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Programme sind Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14 Verwendete Computerprogramme und Online-Anwendungen mit Angaben zu den jeweiligen Entwicklern und Herstellern.

Programm/Online-Anwendung	Entwickler/Internetseite
BLAST: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	NCBI, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (Altschul <i>et al.</i> , 1990)
Clone Manager 9	Scientific & Educational Software, Denver, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
iCn3D <i>Structure Viewer</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/full.html (Wang <i>et al.</i> , 2000)
ImageJ 1.51f	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, (Schneider <i>et al.</i> , 2012)
I-Tasser	https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER (Yang <i>et al.</i> , 2015)
Leica LAS AF Lite	Leica, Wetzlar, D
<i>Mass Hunter Software</i>	Agilent, Santa Clara, USA
MEGA7: <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software</i> Version 7.0	Pennsylvania State University, USA (Hall, 2013; Kumar <i>et al.</i> , 2016)
Photoshop Cs5.1	Adobe, San José, USA
PlasmoGEM <i>Phenotypes</i>	https://plasmogem.sanger.ac.uk/phenotypes (Gomes <i>et al.</i> , 2015; Bushell <i>et al.</i> , 2017)
PlasmoDB	www.plasmodb.org (Aurrecoechea <i>et al.</i> , 2009)
Primer3web Version 4.1.0	http://primer3.ut.ee (Koressaar und Remm, 2007; Untergasser <i>et al.</i> , 2012; Koressaar <i>et al.</i> , 2018)

II.2 Zellbiologische Methoden

II.2.1 Zellbiologische Methoden – *P. falciparum*

II.2.1.1 *In vitro*-Kultivierung von *P. falciparum*

Die kontinuierliche *in vitro*-Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten *P. falciparum* Linien erfolgte in 25 cm³ Zellkulturflaschen bei 37°C (Ifediba und Vanderberg, 1981). Hierfür wurden 5 ml Zellkulturmedium auf einen Hämatokrit von 5% mit humanen Erythrozyten (Blutgruppe A+) eingestellt und mit infizierten Erythrozyten inokuliert. Wurden Parasiten der Wildtyp (WT) NF54 Linie verwendet, wurde A+-Zellkulturmedium verwendet, bei genetisch modifizierten *P. falciparum* Zelllinien wurde dem Zellkulturmedium der entsprechende Selektionsmarker

hinzugegeben (Tabelle 5). Die Parasiten wurden in einer Gasatmosphäre von 5% CO₂/5% O₂ in N₂ inkubiert. Um ein Überwachsen der Kulturen zu vermeiden und die durch Dichtestress induzierte Bildung von Gametozyten zu verringern, wurden die Kulturen dreimal wöchentlich hinsichtlich ihrer Parasitämie mittels Giemsa-gefärbter Blutausstriche (Abschnitt II.2.1.2) analysiert und gegebenenfalls durch Verdünnung der Kultur mit frischen Erythrozyten auf eine Parasitämie von 0,5-1% eingestellt.

Zur Kultivierung von Gametozyten wurden 1 ml einer kontinuierlichen Kultur in eine 75 cm³ Zellkulturflasche mit 12,5 ml Zellkulturmedium mit einem Hämatokrit von 5% überführt. Die Kulturen wurden unter oben beschriebenen Bedingungen ohne weiteres Verdünnen kultiviert, wobei das Medium täglich gewechselt wurde. Um reine Gametozyten zu erhalten, wurden die asexuellen Blutstadien durch die fünftägige Behandlung mit GlcNAc-Medium abgetötet. Um vollständig reife Stadium V-Gametozyten zu erhalten, wurden die Gametozytenkulturen für mindestens weitere 14 Tage nach der ersten GlcNAc-Behandlung abgetötet.

Zur langfristigen Konservierung der *P. falciparum* Zelllinien konnten diese bei -80°C kryokonserviert werden. Hierfür wurden 5-15 ml einer Parasitenkultur mit vorwiegend Ringstadien $\geq 5\%$ in ein 15 ml Röhrchen überführt, bei Raumtemperatur (RT) pelletiert (1000xg, 5 min) und die Zellen in 1-2 ml Glycerolyt 57-Lösung aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend in ein Kyroröhrchen überführt und nach 5-minütiger Inkubation bei RT bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Rückführung kryokonservierter Kulturen in die kontinuierliche Kultivierung wurden diese bei RT aufgetaut und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Der Zellsuspension wurden 200 µl sterile 12%ige NaCl-Lösung tropfenweise hinzugegeben und, nach 5 min Inkubation bei RT, weitere 10 ml einer sterilen 1,6%igen NaCl-Lösung. Die Zellen wurden pelletiert (1000xg, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml 0,2% Glukose/0,9% NaCl tropfenweise resuspendiert. Nach einem finalen Zentrifugationsschritt (1000xg, 5 min, RT) wurden die Zellen in 5 ml Zellkulturmedium mit 5% Hämatokrit aufgenommen und in eine 25 cm³ Zellkulturflasche überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte wie oben beschrieben.

II.2.1.2 Anfertigung von Blutausstrichen und Ermittlung der Parasitämie

Zur Bestimmung der Parasitämie sowie zur Evaluierung der Morphologie wurden dünne Blutausstriche mit anschließender Giemsaefärbung hergestellt. Für den Ausstrich wurden 100 µl einer resuspendierten Parasitenkultur entnommen, pelletiert (5000xg, 1 min, RT), 85 µl des Überstandes verworfen und die Zellen im Restüberstand resuspendiert. Anschließend wurden die

Zellen als Tropfen auf einen Glas-Objektträger übertragen und mit einem zweiten Objektträger gleichmäßig zu einer dünnen Zellschicht ausgestrichen. Der Ausstrich wurde auf einer Heizplatte luftgetrocknet und die Zellen mit Methanol auf dem Objektträger fixiert. Nach erneuter Trocknung erfolgte die Präparatfärbung in einem 10-minütigen Tauchbad in 5%iger Giemsalösung. Der Objektträger wurde mit dH₂O abgespült, um unspezifische Färbungen zu entfernen, und final luftgetrocknet. Die Auswertung der Blutausstriche erfolgte am Lichtmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung mit Immersionsöl. Die plasmodialen Zellkerne in gefärbten Ausstrichen erschienen durch die Komplexbildung der Giemsalösung mit der DNA purpurrot, das Zytoplasma leicht bläulich und die Erythrozyten hellrot. Für die Ermittlung der Parasitämie bzw. Gametozytämie wurden für zehn Gesichtsfelder die Gesamtzellzahl (≥ 1000 Zellen) sowie die Anzahl infizierter Erythrozyten im Triplikat bestimmt und mit Hilfe folgender Formeln in ein prozentuales Verhältnis gesetzt.

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

$$\text{Gametozytämie [\%]} = \frac{\text{infizierte Zellen}}{\text{infizierte Zellen} + \text{nicht infizierte Zellen}} \times 100$$

II.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl pro ml in verschiedenen Kulturen oder Proben erfolgte mittels Neubauer Zählkammer. Hierfür wurden 10 µl einer 1:100 bis 1:1000 Verdünnung der jeweiligen Kultur in das Hämatozytometer appliziert und die Anzahl der Zellen in den vier Eckquadraten, welche wiederum in jeweils 16 kleinere Quadrate unterteilt sind, gezählt. Die Gesamtzellzahl konnte anschließend mit Hilfe des Mittelwertes der Zellzahl in den vier Eckquadraten berechnet werden:

$$\text{Gesamtzellzahl} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \text{Mittelwert}_{\text{Eckquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

II.2.1.4 Transfektion von *P. falciparum*

Zur genetischen Modifikation von *P. falciparum*-Parasitenlinien wurden kontinuierliche Kulturen mit entsprechenden, im Zuge dieser Arbeit generierten Plasmiden transfiziert (Wu *et al.*, 1996; Rug und Maier, 2013). Für die Transfektion wurden am Vortag 100 µg der entsprechenden Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl durch Zugabe von 250 µl Ethanol und 10 µl 3 M

NaOAc (pH 4,8-5,2) bei -20°C über Nacht präzipitiert. Zur Vorbereitung für die Transfektion wurde die Plasmid-DNA pelletiert (13.200xg, 30 min, 4°C), mit 1 ml kaltem Ethanol (75%) gewaschen und nach Lufttrocknung in 15 µl vorgewärmten TE-Puffer resuspendiert. Die so aufkonzentrierte Plasmid-DNA wurde im Folgenden mit vorgewärmtem Cytomix-Puffer auf 400 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und mindestens 5 min bei 37°C inkubiert. Zur Transfektion wurden 5 ml einer frisch aufgetauten kontinuierlichen *P. falciparum* Kultur verwendet, welche $\geq 5\%$ Ringstadien enthielt. Die Zellen wurden pelletiert (1000xg, 5 min, 37°C) und, nach Verwerfen des Überstands, vorsichtig mit der vorbereiteten Plasmid-DNA vermischt und in eine Elektroporationsküvette (2 mm) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe des *Gene Pulser II* Elektroporators (Bio-Rad, Hercules, USA) bei 310 V, 350 µF und einer durchschnittlichen Zeitkonstante zwischen 7,5-12 ms. Im direkten Anschluss an die Elektroporation wurden die transfizierten Zellen zusammen mit 10 ml A+-Zellkulturmedium und mit humanen Erythrozyten (5% Hämatokrit) in eine 75 cm³ Zellkulturflasche überführt. Die Kultur wurde im Folgenden unter oben beschriebenen Bedingungen bei 37°C kultiviert. 6 h nach Transfektion wurde das anfänglich hinzugegebene A+-Medium durch das entsprechende Selektionsmedium ersetzt und während der weiteren Kultivierung wurden wöchentlich 100 µl frische Erythrozyten den Kulturen hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurde bei jeder Transfektion eine Kultur ohne Plasmid-DNA, also lediglich mit 400 µl Cytomix-Puffer, transfiziert. Eine Hälfte der Cytomix-Kontrollkultur wurde in A+-Medium kultiviert, um die Vitalität der Kulturen nach Transfektion zu überprüfen. Die andere Hälfte der Cytomix-Kontrollkultur wurde ebenfalls 6 h nach Transfektion im entsprechenden Selektionsmedium kultiviert, um die Effizienz und Wirksamkeit des Selektionsmediums zu überprüfen. Nach ungefähr drei bis vier Wochen konnten im Normalfall die ersten resistenten Parasiten mittels Blutausstrich detektiert werden. Diese wurden nach Isolierung der genomischen DNA (Abschnitt II.3.1) mittels diagnostischer PCR (Abschnitt II.3.4) hinsichtlich einer erfolgreichen genetischen Manipulation analysiert.

II.2.1.5 Isolierung klonaler *P. falciparum*-Zelllinien durch Monoklonalisierung

Um eine einheitliche Zellpopulation mit vollständiger Plasmidintegration zu erhalten, wurde eine systematische Verdünnung aus gemischten Parasitenkulturen durchgeführt, wobei die verschiedenen Zellen innerhalb einer Kultur monoklonalisiert wurden. Hierfür wurde die zu vereinzelnde Parasitenkultur zunächst synchronisiert und einen Replikationszyklus vor der

Ausklonierung schüttelnd inkubiert, um die Anzahl von Mehrfachinfektionen zu reduzieren. Für die Monoklonalisierung wurden die Gesamtzellzahl pro ml Parasitenkultur mittels Neubauer Zählkammer sowie die Parasitämie mit Hilfe Giemsa-gefärbter Blutaussstriche bestimmt. Durch die Bestimmung dieser beiden Werte konnte die Anzahl infizierter und nicht-infizierter Erythrozyten pro ml Parasitenkultur berechnet werden. Durch eine Verdünnungsreihe wurde die Parasitenkultur in vier Schritten auf eine Gesamtzahl von 12 Parasiten in einem finalen Volumen von 19,2 ml Parasitenkultur bei 5% Hämatokrit eingestellt. Anschließend wurde die so verdünnte Kultur in einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte mit 200 µl Parasitenkultur pro Vertiefung verteilt. Die Platten wurden in einem luftdicht verschlossenen Behälter mit 5% CO₂/5% O₂ in N₂ wie oben beschrieben begast und bei 37°C inkubiert. In einem zeitlichen Abstand von 2 Tagen wurde das Medium gewechselt, indem 100 µl Medium-Überstand pro Vertiefung entnommen und mit frischem Medium ersetzt wurde. Nach zwei bis drei Wochen Inkubation wurden die Ansätze mittels Malstat-Assay (Abschnitt II.2.1.16) oder Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen (Abschnitt II.2.1.2) hinsichtlich Parasitenwachstum ausgewertet und positiv getestete Ansätze in Zellkulturflaschen zur weiteren Kultivierung transferiert (Abschnitt II.2.1.1). Der Nachweis der 5'- und 3'-Integration ohne zusätzliches Vorhandensein des wildtypischen Genlocus erfolgte mittels diagnostischer PCR (Abschnitt II.3.4). Positiv getestete Ansätze wurden anschließend kryokonserviert und die klonalen Zelllinien für die phänotypische Charakterisierung verwendet.

II.2.1.6 Aufreinigung von Gametozyten mit Hilfe von Percoll®-Gradienten

Zur Isolierung von reinen Gametozyten aus einer gemischten Parasitenkultur wurden die Zellen mittels Percoll®-Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Hierfür wurden zunächst je 4 ml 50%iges und 35%iges Percoll® in RPMI-*Incomplete*-Medium (ICM) hergestellt und in einem 15 ml Röhrchen zu einem Gradienten übereinandergeschichtet. Die Parasitenkulturen wurden pelletiert (1500xg, 5 min, 37°C) und mit 10 ml vorgewärmten ICM gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml vorgewärmten ICM resuspendiert und auf den vorgewärmten Gradienten geschichtet. Die Auftrennung der Zellen im Dichtegradienten erfolgte mittels Zentrifugation (500xg, 12 min, 37°C, reduzierte Zentrifugationsbeschleunigung und -Abbremsung). Durch den Dichtegradienten reichern sich die Gametozytenstadien in der Interphase zwischen den beiden Percoll®-Schichten an. Die aufkonzentrierten Gametozyten wurden in ein neues 15 ml Röhrchen überführt, mit 10 ml ICM gewaschen und je nach weiterem Verwendungszweck in A⁺-Medium, Lysepuffer (Western Blot-Analyse) oder TRIzol® (RNA-

Extraktion) aufgenommen. Um aktivierte Gametozyten zu erhalten, wurden die Zellen in A+-Medium aufgenommen und mit einer finalen Konzentration von 10 μ M XA bei RT für 15 min *in vitro* aktiviert. Die Qualität und Quantität der Aufreinigung wurde durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer sowie mittels Giemsa-gefärbter Blutaussstriche überprüft.

II.2.1.7 Herstellung von Parasiten-Lysaten

Zur Untersuchung der Proteinexpression in verschiedenen Parasitenstadien und Zelllinien mittels Western Blot-Analyse wurden Lysate der entsprechenden Stadien und Zelllinien hergestellt. Für die Gewinnung von asexuellen Stadien-Lysaten wurden zuvor synchronisierte Kulturen (Abschnitt II.2.1.8) in ein 15 ml oder 50 ml Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (2200xg, 5 min, 4°C). Nachdem der Kulturüberstand verworfen wurde, wurde das Pellet in 10 ml 0,05% Saponin/PBS zur Lyse der Erythrozyten resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die von der Erythrozyten-Membran freigesetzten Parasiten wurden anschließend erneut pelletiert (3000xg, 5 min, 4°C), mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und in 50-200 μ l Lysepuffer mit *complete EDTA-free* Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC, Roche, Basel, CH) aufgenommen. Für die Gewinnung von Gametozyten-Lysaten wurde diese entsprechend Abschnitt II.2.1.6 angereichert und die Gametozyten wurden mittels milder Saponin-Lyse (0,03% Saponin/PBS, 3 min, 37°C) von der umgebenden Wirtszellmembran freigesetzt. Die Zellen wurden erneut pelletiert, mit warmen PBS gewaschen und wie oben beschrieben in Lysepuffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail aufgenommen.

II.2.1.8 Synchronisation asexueller *P. falciparum* Kulturen

Für die Gewinnung definierter asexueller Parasitenstadien wurden die *P. falciparum* Kulturen standardmäßig nach einem Protokoll von Lambros und Vanderberg mit 5%igem Sorbitol behandelt (Lambros und Vanderberg, 1979). Während Ringstadien durch die Behandlung mit Sorbitol nicht beeinträchtigt werden, kommt es bei den späteren Stadien wie Trophozoiten und Schizonten zur Zellyse, wodurch eine synchrone Entwicklung der Parasiten erzielt werden kann. Für die Synchronisierung wurde die jeweilige Kultur mit einer Parasitämie $\geq 5\%$ und überwiegend Ringstadien pelletiert (1000xg, 5 min, RT) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml 5%igem Sorbitol resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert (1000xg, 5 min, RT), mit 10 ml A+-Medium gewaschen und anschließend zusammen mit frischem Medium in eine neue Zellkulturflasche zur weiteren Kultivierung überführt. Die Synchronisierung der *P. falciparum* Kulturen wurde nach 4-6 h wiederholt. Für die Versuche zur Gametozyteninduktion sowie zur Probenvorbereitung für die Lipidomanalyse war es

notwendig, dass die verschiedenen Kulturen ein möglichst gleiches asexuelles Entwicklungsstadium mit definiertem Differenzierungszeitpunkt (Stunden nach dem Eindringen in den Erythrozyten) aufwiesen. Hierfür wurde ein Protokoll nach Brancucci *et al.* verwendet (Brancucci *et al.*, 2015, 2017). In diesem Protokoll wurden die Kulturen mit mehreren konsekutiven Sorbitol-Behandlungen wie oben beschrieben synchronisiert. Insgesamt wurde jede Kultur viermal synchronisiert, wobei in einem Replikationszyklus die Sorbitol-Behandlung nach 16 h wiederholt wurde. Die erste Behandlung mit 5%igem Sorbitol lysiert alle infizierten Erythrozyten, in denen sich der Parasit bereits ≥ 24 h differenziert (Brancucci *et al.*, 2015). Demnach befinden sich 16 h später in den Kulturen lediglich solche Parasiten, die sich in den

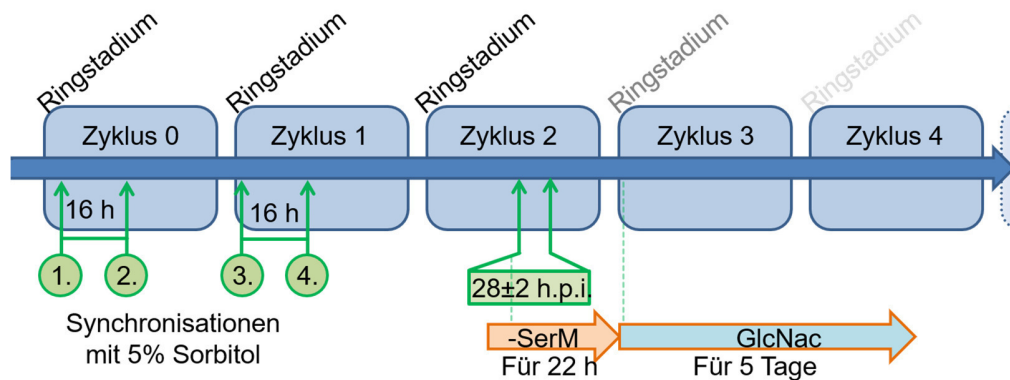


Abbildung 8 Synchronisation asexueller Parasitenkulturen zur Vorbereitung auf die Gametozyteninduktion sowie zur Probenaufreinigung für die Lipidomanalyse. Die Kulturen wurden mit vier konsekutiven Sorbitol-Behandlungen in einem zeitlichen Intervall von 16 h synchronisiert. Die erste Behandlung mit 5%igem Sorbitol lysiert alle infizierten Erythrozyten, in denen sich der Parasit bereits ≥ 24 h differenziert. Nach der zweiten Sorbitol-Behandlung verbleiben demnach in den Kulturen lediglich solche Parasiten, die sich in den Erythrozyten für 16-24 h differenziert haben. Diese zwei Synchronisationsschritte wurden im darauffolgenden Replikationszyklus wiederholt. Die Versuche zur Gametozyten-Induktion sowie die Probenaufreinigung für die Lipidomanalyse wurden mit den synchronisierten Kulturen im auf die letzte Sorbitol-Behandlung (4.) folgen Replikationszyklus durchgeführt (Brancucci *et al.*, 2015, 2017). h.p.i., hours post-invasion (Stunden nach dem Eindringen des Parasiten in den Erythrozyten).

Erythrozyten für 16-40 h differenziert haben. Bei der zweiten Behandlung mit 5%igem Sorbitol verbleiben demnach in den Kulturen lediglich solche Parasiten, die sich in den Erythrozyten für 16-24 h differenziert haben. Dieser Zeitpunkt bzw. der Differenzierungszeitpunkt wird im Folgenden als *hours post-invasion* (h.p.i., Stunden nach dem Eindringen des Parasiten in den Erythrozyten) bezeichnet. Die zwei ersten Synchronisationsschritte wurden im darauffolgenden Replikationszyklus wiederholt. Um die Parasiten möglichst nicht zu stressen und um eine vorzeitige Gametozytogenese zu vermeiden, wurden die Parasitenkulturen so verdünnt, dass eine Parasitämie von 4% nicht überschritten wurde. Die Synchronisationsschritte wurden zudem mit vorgewärmten Sorbitol (37°C) durchgeführt. Die Versuche zur Gametozyteninduktion (28±2 h.p.i.) sowie die Probenaufreinigung für die Lipidomanalyse (10±2 h.p.i.) wurden, wie in

Abbildung 8 dargestellt, mit den synchronisierten Kulturen im auf die vierte Sorbitol-Behandlung folgenden Replikationszyklus durchgeführt.

II.2.1.9 Phänotypische Charakterisierung der asexuellen Replikation

PNPLA1-KO Linien

Für die vergleichende Untersuchung der asexuellen Replikation zwischen dem parental WT NF54 und den PNPLA1-KO Parasitenlinien wurden die Kulturen, wie in Abschnitt II.2.1.8 beschrieben, mit 5%igem Sorbitol konsekutiv synchronisiert und zur Vermeidung von Mehrfachinfektionen auf einem Wippschüttler inkubiert. Im darauffolgendem Replikationszyklus wurden die Parasitämie mittels Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen sowie die Gesamtzellzahl mittels Neubauer-Kammer der jeweiligen Kulturen bestimmt, um die Kulturen auf eine exakte Ausgangsparasitämie von 0,25% bei einem Hämatokrit von 5% einzustellen. Beim Ansetzen des asexuellen Replikationsassays bestanden die Kulturen durch die vorherigen Synchronisationsschritte hauptsächlich aus Ringstadien ($\geq 90\%$). Die Kulturen wurden über einen Zeitraum von 120 h wie beschrieben unter äquivalenten Bedingungen kultiviert, wobei täglich das Zellkulturmedium gewechselt wurde. In einem zeitlichen Intervall von 24 h (0, 24, 48, 72, 96, 120 h nach Ansetzen des Versuchs) wurden im Triplikat je 50 μ l der resuspendierten Parasitenkulturen zur Anfertigung von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen entnommen. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch bei 1000-facher Vergrößerung. Die Parasitämie wurde, wie in Abschnitt II.2.1.2 beschrieben, in einer Gesamtzellzahl von je 1000 Zellen bestimmt. Für die quantitative Bestimmung der prozentualen Zusammensetzung der Replikationsstadien wurden jeweils 100 Parasiten in die asexuellen Parasitenstadien Ringstadium, Trophozoitenstadium sowie in unreife und reife Schizonten unterteilt. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Abschnitt II.5.4 beschrieben.

PNPLA1-KD Linie

Die vergleichende Untersuchung der asexuellen Replikation der PNPLA1-KD Parasitenlinie wurde analog zur Untersuchung der asexuellen Replikation der PNPLA1-KO Parasitenlinien durchgeführt. Die PNPLA1-Proteinexpression in der PNPLA1-KD Mutante wurde durch Zugabe von D-(+)-Glucosamin Hydrochlorid (GlcN, Sigma Aldrich, Taufkirchen, D) mit einer finalen Konzentration von 2,5 mM konditionell herunterreguliert. Die GlcN-Behandlung erfolgte bereits ein Replikationszyklus vor dem Ansetzen des Experiments. Bei der Untersuchung der asexuellen Replikation der PNPLA1-KD Linie wurde die mit 2,5 mM GlcN-behandelte Kultur zur

unbehandelten Kultur verglichen. Um einen unspezifischen Effekt der GlcN-Behandlung auszuschließen, wurden parentale WT NF54 Kulturen analog angesetzt und ausgewertet.

II.2.1.10 Phänotypische Charakterisierung der Gametozytenbildung PNPLA1-KO Linien

Für die vergleichende Untersuchung der Gametozytenbildung zwischen dem parentalen WT NF54 und den PNPLA1-KO Parasitenlinien wurden die Kulturen, wie in Abschnitt II.2.1.8 beschrieben, mit 5%igem Sorbitol konsekutiv synchronisiert. Im darauffolgendem Replikationszyklus wurde die Parasitämie mittels Giemsa-gefärbten Blutausstrichen sowie die Gesamtzellzahl mittels Neubauer-Kammer der jeweiligen Kulturen bestimmt, um die Kulturen auf eine exakte Ausgangsparasitämie von 2,0% bei einem Hämotokrit von 5% einzustellen. Die Kulturen wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen wie beschrieben unter äquivalenten Bedingungen kultiviert, wobei täglich das Zellkulturmedium gewechselt wurde. Alle zwei Tage wurden im Triplikat je 50 µl der resuspendierten Parasitenkulturen zur Anfertigung von Giemsa-gefärbten Blutausstrichen entnommen.

Um die Gametozytenbildung unter LysoPC-limitierenden Bedingungen zu untersuchen, wurden die Kulturen mit 5%igem Sorbitol konsekutiv synchronisiert (vgl. Abbildung 8) und im darauffolgenden Replikationszyklus wie beschrieben auf eine Parasitämie von 1,0% bei einem Hämotokrit von 5% eingestellt. 28 ± 2 h.p.i. wurden die Kulturen für 22 h zur Induktion der Gametozytenbildung mit -SerM-Medium inkubiert (Brancucci *et al.*, 2015, 2017). Die weitere Kultivierung erfolgte für fünf Tage in GlcNAc-Zellkulturmedium zum Abtöten asexueller Parasiten (Fivelman *et al.*, 2007; Ngwa *et al.*, 2017) und im Folgenden in A+-Zellkulturmedium, wobei täglich das Zellkulturmedium gewechselt wurde. Zwei Tage nach der Gametozyteninduktion wurden in einem zeitlichen Intervall von 48 h je 50 µl der resuspendierten Parasitenkulturen zur Anfertigung von Giemsa-gefärbten Blutausstrichen im Triplikat entnommen. Kulturen, die anstelle von -SerM-Medium mit -SerM+LysoPC, -SerM+Cholin- oder -SerM+Serum-Medium induziert wurden, wurden als Kontrollen verwendet. Um den Einfluss von Phospholipase-Inhibitoren auf die Gametozytenbildung zu untersuchen, wurde diese in den jeweiligen Kulturen wie beschrieben mit -SerM-Medium induziert. Das -SerM-Medium wurde dabei mit der entsprechenden IC₅₀-Konzentration des jeweiligen Inhibitors supplementiert. -SerM-Medium mit bzw. ohne 1% v/v DMSO (Lösemittel) wurde als Kontrolle verwendet.

Die Auswertung der Gametozytämie erfolgte lichtmikroskopisch bei 1000-facher Vergrößerung. Die Gametozytämie wurde, wie in Abschnitt II.2.1.2 beschrieben, in einer Gesamtzellzahl von je 1000 Zellen bestimmt. Für die quantitative Bestimmung der prozentualen Zusammensetzung der Gametozytenstadien II-V wurden jeweils 100 Parasiten analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Abschnitt II.5.4 beschrieben.

PNPLA1-KD Linie

Die vergleichende Untersuchung der Gametozytenbildung in der PNPLA1-KD Parasitenlinie wurde analog zur Untersuchung der Gametozytenbildung in den PNPLA1-KO Parasitenlinien durchgeführt. Die PNPLA1-Proteinexpression in der PNPLA1-KD Mutante wurde durch Zugabe von GlcN (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D) mit einer finalen Konzentration von 2,5 mM konditionell herunterreguliert. Die GlcN-Behandlung erfolgte bereits ein Replikationszyklus vor dem Ansetzen des Experiments. Bei der Untersuchung der Gametozytenbildung in der PNPLA1-KD Linie wurde die mit 2,5 mM GlcN-behandelte Kultur zur unbehandelten Kultur verglichen. Um einen unspezifischen Effekt der GlcN-Behandlung auszuschließen, wurden parentale WT NF54 Kulturen analog angesetzt und ausgewertet. Zur Untersuchung der Gametozytenbildung in der unbehandelten und in der mit 2,5 mM GlcN behandelten PNPLA1-KD Kultur wurden diese konsekutiv mit 5%igem Sorbitol synchronisiert und auf eine Ausgangsparasitämie von 2,0% bei einem Hämatokrit von 5% eingestellt. Die Kulturen wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen, wie in Abschnitt II.2.1.1 beschrieben, mit bzw. ohne GlcN-Behandlung kultiviert, wobei täglich das Zellkulturmedium gewechselt wurde. Alle zwei Tage wurden im Triplikat je 50 µl der resuspendierten Parasitenkulturen zur Anfertigung von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen entnommen.

Um zu untersuchen, ob der funktionale PNPLA1-Verlust die Bildung von Gametozyten vor oder nach der Gametozyteninduktion beeinflusst, wurden die Kulturen wie beschrieben synchronisiert und auf eine Ausgangsparasitämie von 2,0% bei einem Hämatokrit von 5% eingestellt. Bei einer Parasitämie von 10% (vorwiegend Ringstadien) wurde die Bildung von Gametozyten durch die Zugabe von lysierten Erythrozyten für 24 h induziert (Schneweis *et al.*, 1991; Ngwa *et al.*, 2017). Nach einem Waschschrift mit 10 ml RPMI wurden die Kulturen anschließend zum Abtöten asexueller Parasitenstadien für fünf Tage in GlcNAc-Zellkulturmedium und im Folgenden in A⁺-Zellkulturmedium kultiviert (Fivelman *et al.*, 2007; Ngwa *et al.*, 2017). Das jeweilige Zellkulturmedium wurde dabei entweder vor und während der Zugabe oder nach dem Entfernen der lysierten Erythrozyten mit 2,5 mM GlcN supplementiert.

Um die Gametozytenbildung unter LysoPC-limitierenden Bedingungen zu untersuchen, wurden die Kulturen mit 5%igem Sorbitol konsekutiv synchronisiert und im darauffolgenden Replikationszyklus wie beschrieben auf eine Parasitämie von 1,0% bei einem Hämotokrit von 5% eingestellt (vgl. Abbildung 8). 28 ± 2 h.p.i. wurden die Kulturen für 22 h zur Induktion der Gametozytenbildung mit -SerM-Medium ohne bzw. mit Zugabe von 2,5 mM GlcN inkubiert (Brancucci *et al.*, 2015; Brancucci *et al.*, 2017). Die weitere Kultivierung erfolgte für fünf Tage in GlcNAc-Zellkulturmedium zum Abtöten asexueller Parasiten (Fivelman *et al.*, 2007; Ngwa *et al.*, 2017) und im Folgenden in A+-Zellkulturmedium (jeweils ohne Zugabe von GlcN), wobei täglich das Zellkulturmedium gewechselt wurde. Zwei Tage nach der Gametozyteninduktion wurden in einem zeitlichen Intervall von 48 h je 50 µl der resuspendierten Parasitenkulturen zur Anfertigung von Giemsa-gefärbten Blutausstrichen im Triplikat entnommen. Kulturen, die anstelle von -SerM-Medium mit -SerM+LysoPC- oder -SerM+Cholin-Medium (ohne bzw. mit Zugabe von 2,5 mM GlcN) induziert wurden, wurden als Kontrollen verwendet. Um den Einfluss von Phospholipase-Inhibitoren auf die Gametozytenbildung zu untersuchen, wurde diese in den jeweiligen Kulturen wie beschrieben mit -SerM-Medium ohne bzw. mit Zugabe von 2,5 mM GlcN induziert. Das -SerM-Medium wurde dabei zusätzlich mit der entsprechenden IC₅₀-Konzentration des jeweiligen Inhibitors supplementiert. -SerM-Medium mit bzw. ohne 1% v/v DMSO (Lösemittel) wurde als Kontrolle verwendet.

Die Auswertung der Gametozytämie erfolgte lichtmikroskopisch bei 1000-facher Vergrößerung. Die Gametozytämie wurde, wie in Abschnitt II.2.1.2 beschrieben, in einer Gesamtzellzahl von je 1000 Zellen bestimmt. Für die quantitative Bestimmung der prozentualen Zusammensetzung der Gametozytenstadien II-V wurden jeweils 100 Parasiten analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Abschnitt II.5.4 beschrieben.

PNPLA1-GFP Überexpressionslinien

Für die vergleichende Untersuchung der Gametozytenbildung in den *crt/fnpa*-PNPLA1-GFP/WT und PNPLA1-KO (*crt/fnpa*Komp) Parasitenlinien wurden die Kulturen, wie in Abschnitt II.2.1.8 beschrieben, mit 5%igem Sorbitol konsekutiv synchronisiert und auf eine Parasitämie von 1,0% bei einem Hämotokrit von 5% eingestellt (vgl. Abbildung 8). 28 ± 2 h.p.i. wurden die Kulturen für 22 h zur Bildung von Gametozyten mit -SerM-Medium inkubiert (Brancucci *et al.*, 2015; Brancucci *et al.*, 2017). Die weitere Kultivierung erfolgte für fünf Tage in GlcNAc-Zellkulturmedium zum Abtöten asexueller Parasiten (Fivelman *et al.*, 2007; Ngwa *et al.*, 2017) und

im Folgenden in A+-Zellkulturmedium, wobei täglich das Zellkulturmedium gewechselt wurde. Zwei Tage nach der Gametozyteninduktion wurden in einem zeitlichen Intervall von 48 h je 50 µl der resuspendierten Parasitenkulturen zur Anfertigung von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen im Triplikat entnommen. Alle zwei Tage wurden im Triplikat je 50 µl der resuspendierten Parasitenkulturen zur Anfertigung von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen entnommen. Die Auswertung der Gametozytämie erfolgte lichtmikroskopisch bei 1000-facher Vergrößerung. Die Gametozytämie wurde, wie in Abschnitt II.2.1.2 beschrieben, in einer Gesamtzellzahl von je 1000 Zellen bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Abschnitt II.5.4 beschrieben.

II.2.1.11 Gametozyten-Toxizitäts-Assay

Um den Einfluss Phospholipase-spezifischer Inhibitoren auf die Gametozytenentwicklung zu untersuchen, wurden Kulturen der WT NF54 Parasitenlinie, wie in Abschnitt II.2.1.1 beschrieben, kultiviert. Sobald mit Hilfe Giemsa-gefärbter Blutaussstriche durch Dichtestress induzierte Stadium II-Gametozyten in den Kulturen detektiert wurden, wurde für jede zu testende Substanz je 1 ml der Kultur in eine 24-Kavität-Mikrotiterplatte im Triplikat vorgelegt und mit den im Malstat-Assay bestimmten IC₅₀ und IC₉₀-Konzentrationen der Inhibitoren supplementiert. Als Negativkontrollen wurden Chloroquin (12,1 nM) oder 1% v/v DMSO verwendet. Als Positivkontrolle wurde der Proteasom-Inhibitor Epoxomicin mit einer finalen Konzentration von 60 nM verwendet (Czesny *et al.*, 2009; Aminake *et al.*, 2011; Ngwa *et al.*, 2017). Die Gametozytenkulturen wurden für insgesamt 48 h mit den angegebenen Substanzen behandelt, wobei diese nach 24 h erneuert wurden. Die Kulturen in den 24-Kavität-Mikrotiterplatten wurden für insgesamt 10 Tage wie beschrieben kultiviert, wobei das Medium täglich gewechselt wurde. An Tag 10 wurden von den Kulturen Giemsa-gefärbte Blutaussstriche im Triplikat angefertigt. Die Auswertung der Gametozytämie erfolgte lichtmikroskopisch bei 1000-facher Vergrößerung. Die Gametozytämie wurde, wie in Abschnitt II.2.1.2 beschrieben, in einer Gesamtzellzahl von je 1000 Zellen bestimmt. Für die quantitative Bestimmung der prozentualen Zusammensetzung der Gametozytenstadien IV-V wurden jeweils 100 Parasiten analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Abschnitt II.5.4 beschrieben.

II.2.1.12 *In vitro*-Exflagellations-Assay

Der *in vitro*-Exflagellations-Assay wurde zum einen zur phänotypischen Analyse von Mutanten durchgeführt, und zum anderen um den Effekt von potenziell Exflagellations-inhibierenden Substanzen zu quantifizieren. Hierfür wurden je Ansatz 100 µl einer vollständig reifen

Gametozytenkultur (Stadium V, 14 Tage nach Gametozyteninduktion) entnommen und mit einer finalen Konzentration von 10 µM XA für 15 min bei RT inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen pelletiert (3.000xg, 20 sec, RT) und in 15 µl des Überstandes resuspendiert. 10 µl der resuspendierten Kultur wurden anschließend auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch im Phasenkontrast bei 400-facher Vergrößerung. Pro Ansatz wurden 30 unterschiedliche Gesichtsfelder hinsichtlich der Anzahl der Exflagellationszentren analysiert, wobei je Experiment jeder Ansatz in vier Replikaten wiederholt wurde. Bei der Evaluierung von potenziell Exflagellations-inhibierenden Substanzen wurden die Kulturen vor der Aktivierung durch XA 15 min bei 37°C mit dem jeweiligen Inhibitor inkubiert. Als Negativkontrolle wurde jeweils die gleiche Menge des Lösungsmittels verwendet, in welchem der Inhibitor zuvor gelöst wurde. Als Positivkontrolle wurde der Cystein/Serin-Protease-Inhibitor Tosyl-L-lysyl-Chlormethylketon-Hydrochlorid (TLCK) verwendet (Rupp *et al.*, 2008). Um zwei oder mehrere Zelllinien miteinander hinsichtlich der Fähigkeit zur Exflagellation bzw. zur Bildung von Mikrogameten zu vergleichen, wurden folgende zwei Verfahrensweisen durchgeführt. Entweder wurden die Gesamtzellzahl sowie die Gametozytämie der zuvor über einen Percoll®-Gradienten angereicherten Gametozyten mittels Neubauerkammer bestimmt und durch Zugabe von nicht infizierten Erythrozyten auf eine finale Gametozytämie von 2% bei einem Hämatokrit von 5% eingestellt. Oder die Gametozytämie wurde wie in Abschnitt II.2.1.2 beschrieben mittels Giemsa-gefärbten Blutausstrichs bestimmt, um anschließend die Exflagellationsfähigkeit der jeweiligen Mutante in Relation zum parental WT NF54 über folgende Formel zu berechnen. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Abschnitt II.5.4 beschrieben.

Exflagellationsfähigkeit Mutante [%] =

$$\frac{\text{Gametozytämie WT NF54} [\%]}{\text{Gametozytämie Mutante} [\%]} \times \frac{\text{Mittelwert Exflagellationszentren Mutante} [-]}{\text{Mittelwert Exflagellationszentren WT NF54} [-]}$$

II.2.1.13 Vergleichende Untersuchung der Makrogameten und Zygoten-Entwicklung

Zur phänotypischen Analyse von Mutanten wurde die Gametogenese im Hinblick auf die Entwicklung von Makrogameten und Zygoten untersucht. Hierfür wurden, wie in Abschnitt II.2.1.6 beschrieben, vollständig reife Gametozyten mittels Percoll®-Gradient angereichert, in A+-Medium aufgenommen und die Gametozytämie sowie die Gesamtzellzahl mittels

Neubauerkammer (Abschnitt II.2.1.2 und II.2.1.3) und Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen bestimmt. Die angereicherten Kulturen wurden im Folgenden durch die Zugabe von nicht-infizierten Erythrozyten auf eine Gametozytämie von 2% mit einem Hämatokrit von 5% eingestellt. Alle beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten bei 37°C. Die Aktivierung der Gametozyten erfolgte *in vitro* bei RT durch Zugabe von XA mit einer finalen Konzentration von 10 µM für 30 min (Makrogameten) oder 6 h (Zygoten), bevor die Kulturen auf IFA-Objektträger geschichtet und nach Lufttrocknung bei -80°C in Methanol fixiert wurden. Im Weiteren wurden die Makrogameten bzw. Zygoten, wie in Abschnitt II.2.1.14 beschrieben, im indirekten Immunfluoreszenz Assay mit α -Pfs25-Antiserum immunmarkiert. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch bei 600-facher Vergrößerung mit einem *Leica DM 5500 B* Fluoreszenzmikroskop (Leica, Wetzlar, D), wobei die Anzahl der Makrogameten bzw. Zygoten in jeweils 1000 Erythrozyten in fünf Replikaten bestimmt wurde. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Abschnitt II.5.4 beschrieben.

II.2.1.14 Indirekter Immunfluoreszenz-Assay

Der indirekte Immunfluoreszenz-Assay (IFA) dient zur Untersuchung der Expression und Lokalisation von Proteinen in den verschiedenen Blutstadien von *P. falciparum*. Dabei werden an eine Festphase fixierte Zellen zunächst mit spezifischen Antiseren inkubiert, welche an die zu untersuchenden Proteine bzw. Antigene binden. In einem weiteren Schritt können diese dann über einen Fluorophor-markierten Sekundärantikörper, welcher wiederum spezifisch an den ersten Primärantikörper bindet, mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops nachgewiesen werden. Ein wesentlicher Vorteil des IFAs gegenüber einem direkten Immunfluoreszenz-Assay liegt im stärkeren Fluoreszenzsignal, da mehrere Sekundärantikörper an den spezifisch gebundenen Primärantikörper binden können und es so zu einer Signalverstärkung kommt. Dieses Verfahren erlaubt auch die sensitive Detektion kleinster Proteinmengen. Für den IFA wurden zunächst die zu untersuchenden Parasitenlinien in einer dünnen Zellschicht auf einen diagnostischen Objektträger aufgetragen und luftgetrocknet. Im Weiteren wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden der IFA verwendet, die sich im Wesentlichen in der Art der Zellfixierung unterscheiden. Alle beschriebenen Arbeitsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Paraformaldehydfixierung (PFA)

Die auf den Objektträger aufgebraachten Zellen wurden durch eine 10-minütige Inkubation mit 40 µl 4% Paraformaldehyd (PFA)/PBS (pH 7,2) am Tropfen bei RT fixiert. Anschließend wurden

die Zellmembranen mit 40 µl 0,1% Triton X-100/125 mM Glycin für 10 min bei RT permeabilisiert, um intrazelluläre Zielantigene für die Antikörper zugänglich zu machen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch die Inkubation mit 3% BSA/1xPBS (Blockierungslösung) für 1 h bei RT blockiert, gefolgt von einer zweistündigen Inkubation bei 37°C mit 20 µl der jeweiligen Primärantikörperlösung, welche zuvor entsprechend Tabelle 6 in Blockierungslösung vorbereitet wurde. Nach zwei Waschschritten mit PBS im Färbebad für je 10 min, wurden die Zellen mit 20 µl des entsprechenden Fluorophor-markierten Sekundärantikörpers (Verdünnung in Blockierungslösung entsprechend Tabelle 7) für 1 h bei 37°C inkubiert. Um eine vorzeitige Fluoreszenzlöschung der Licht-sensiblen Fluorophore zu vermindern, wurden alle weiteren Arbeitsschritte abgedunkelt durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden nicht gebundene Antikörper bzw. unspezifische Antikörper-Wechselwirkungen durch zwei weitere Waschschrritte für je 10 min mit PBS im Färbebad entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper und die anschließende Visualisierung mit dem Fluorophor-markierten Sekundärantikörper wie beschrieben. In einigen Fällen wurde anstelle der Inkubation mit dem zweiten Primär- und Sekundärantikörper eine Gegenfärbung mit 0,01% Evans Blue (AppliChem, Darmstadt, D) in 1xPBS für 1 min bei RT gefolgt von zwei Waschschrritten in 1xPBS für je 5 min durchgeführt. Die DNA der Zellkerne wurde anschließend durch eine 1-minütige Inkubation bei RT mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst33342 (Invitrogen, Carlsbad, USA; 1:5000 in PBS) markiert. Die diagnostischen Objektträger wurden mit dem Amin-basierten Bleichschutz CitiFluor™ AF2 (Citifluor Limited, Leicester, UK) eingedeckt und mit Deckgläschen sowie Nagellack luftdicht versiegelt. Bis zur fluoreszenz-mikroskopischen Auswertung des IFAs wurden die Objektträger im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die Auswertung erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung mit einem *Leica DM 5500 B* Fluoreszenzmikroskop (Leica, Wetzlar, D). Die digitalen IFA-Aufnahmen wurden mit den Computerprogrammen *Leica LAS AF Lite* (Leica, Wetzlar, D) und *Photoshop Cs5.1* (Adobe, San José, USA) prozessiert.

Methanol-Fixierung

Die auf den Objektträger aufgetragenen Zellen wurden durch eine 10-minütige Inkubation bei -80°C im Methanol-Bad fixiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine 30-minütige Inkubation mit 1xPBS/0,5% BSA/0,01% Saponin (IFA-Lösung) schüttelnd im Färbebad gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation mit 1% neutralem Ziegen-Serum (neutral goat serum, NGS) in IFA-Lösung am Tropfen bei RT blockiert. Anschließend wurden die spezifischen Primärantikörper

Tabelle 6 entsprechend in IFA-Lösung verdünnt und als 20 µl Tropfen auf die diagnostischen Objektträger gegeben. Alle folgenden Schritte wurden entsprechend zum IFA mit PFA-Fixierung durchgeführt, wobei die Antikörper-Verdünnungen sowie die Waschschrte mit IFA-Lösung durchgeführt wurden. Die finalen Waschschrte erfolgten mit PBS.

II.2.1.15 Quantifizierung von Merozoiten

Um die durchschnittliche Anzahl der sich in einem Schizonten bildenden infektiösen Merozoiten zu quantifizieren und diese zwischen verschiedenen Zelllinien zu vergleichen, wurden synchronisierte Schizonten-Kulturen (Abschnitt II.2.1.8) der entsprechenden Linien auf einen Objektträger gebracht und luftgetrocknet. Die Fixierung der Zellen erfolgte wie beschrieben durch eine 10-minütigen Inkubation mit 4% Paraformaldehyd (PFA)/PBS (pH 7,2) am Tropfen bei RT gefolgt von einem Permeabilisierungsschritt mit 0,1% Triton X-100/125 mM Glycin für 10 min bei RT und der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 3% BSA/1xPBS für 1 h bei RT. Die DNA der Zellkerne wurde anschließend durch eine 1-minütige Inkubation bei RT mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst33342 (Invitrogen, Carlsbad, USA; 1:5000 in PBS) markiert. Die Gegenfärbung der Zellen mit Evans Blue (AppliChem, Darmstadt, D) sowie das luftdichte Versiegeln der Objektträger erfolgte wie beschrieben (Abschnitt II.2.1.14). Die Auswertung und Quantifizierung der Merozoiten erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung mit einem *Leica DM 5500 B* Fluoreszenzmikroskop (Leica, Wetzlar, D). Die Quantifizierung der Merozoiten erfolgte an reifen Schizonten. Um dabei lediglich einfach-infizierte Schizonten auszuwerten, wurden nur solche ausgewertet, die klar segmentierte Merozoiten mit geringer Überlappung und einzelne pigmentierte Restkörper aufwiesen.

II.2.1.16 Malstat-Assay

Der Malstat-Assay ist eine *in vitro* kolorimetrische Methode, die es ermöglicht, die Aktivität der plasmodialen Lactat-Dehydrogenase zu detektieren und zu quantifizieren (Makler *et al.*, 1998). Der Malstat-Assay beruht auf der Oxidation von Laktat zu Pyruvat durch die parasitäre Laktatdehydrogenase (LDH) bei gleichzeitiger Reduktion des hinzugefügten 3-Acetylpyridinadenindinukleotid (APAD) zu APADH. Das so entstehende APADH wiederum dient als Co-Substrat für die Umwandlung des hinzugegebenen Nitroblautetrazoliumchlorids (NBT) zu NBTH und wird durch das ebenfalls hinzugegebene Enzym Diaphorase oxidiert. Bei der Reduktion durch die Diaphorase von NBT zu NBTH (purpurfarbenes Formazan) kommt es zu einem purpurfarbenen Farbumschlag, welcher über die optische Dichte bei 630 nm gemessen werden

kann. Der Farbumschlag korreliert direkt mit der plasmodialen LDH-Aktivität und lässt somit Rückschlüsse auf die Parasitämie sowie das Parasitenwachstum zu.

Der Malstat-Assay wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung sowohl der antiparasitären Wirkung verschiedener Inhibitoren als auch zur Auswertung von Monoklonalisierungen (Abschnitt II.2.1.5) von Parasitenlinien verwendet. Zur Bestimmung der antiparasitären Wirkung verschiedener Inhibitoren wurde zunächst eine synchronisierte WT NF54 Parasitenkultur, welche vorwiegend Ringstadien enthielt, auf eine Parasitämie von 1% eingestellt. Die in DMSO gelösten Inhibitoren wurden in einer Verdünnungsreihe mit je acht verschiedenen Konzentrationen vorbereitet. Diese wurden anschließend im Triplikat in die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 180 µl der Parasitenkultur vermischt. Pro Ansatz wurde so eine finale Inhibitorkonzentration zwischen 0,05 nM und 500 µM (N-(p-Amylcinnamoyl) Anthranilsäure und 2,4'-Dibromoacetophenon) bzw. zwischen 7,81 µM und 1 mM (Bromoenol-Lacton und ASB14780) eingestellt. Als Positivkontrolle wurden Chloroquin (finale Inhibitorkonzentration zwischen 3,91 nM und 0,5 µM) sowie eine toxische Lösungsmittelkonzentration von 20% verwendet; als Negativkontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO ohne Inhibitor-Zugabe verwendet. Die Kontrollen wurden ebenfalls im Triplikat angefertigt. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend in einer luftdichten Kammer für 72 h bei 37°C inkubiert und mit einem Gasgemisch aus 5% CO₂/5% O₂ in N₂ täglich begast. Nach 72 h wurden jeweils 20 µl der Kulturen in eine neue Mikrotiterplatte überführt und mit 100 µl Malstat-Reagenz sowie 20 µl einer 1:1 Mischung der NBT- und Diaphorase-Lösungen (je 1 mg/ml) vermischt. Die Proben wurden anschließend für 5-30 min schüttelnd und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Farbumschlag bei 630 nm im *SPARK 10M* Plattenlesegerät (Tecan, Männedorf, CH) ausgelesen. Zur Bestimmung der antiplasmodialen IC₅₀- und IC₉₀-Konzentration wurde mit Hilfe von *GraphPad Prism 5* eine Dosis-Wirkungskurve der normierten Werte auf einer halblogarithmischen Konzentrations-Skala angefertigt.

II.2.2 Zellbiologische Methoden – *E. coli*

II.2.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei 37°C in flüssigem LB-Medium oder auf LB-Agarplatten. Flüssigkulturen wurden dabei schüttelnd bei 180-250 rpm inkubiert. Angeimpfte Agarplatten wurden mit dem Deckel nach unten gerichtet im Wärmeschrank inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung für maximal vier Wochen bei 4°C

gelagert. Dem LB-Flüssigmedium bzw. den LB-Agarplatten wurden zur Selektion positiver Klone das entsprechende Antibiotikum hinzugegeben. Bei der rekombinanten Proteinexpression mit *E. coli* BL21 Zellen wurde dem Medium zusätzlich das Antibiotikum Chloramphenicol zugesetzt. Um die Bakterien langfristig zu konservieren, wurden 500 µl einer frischen ÜN-Kultur mit 500 µl sterilem 80%igem Glycerol versetzt, in ein Kryoröhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C kryokonserviert. Die Wiederaufnahme der kryokonservierten Kulturen erfolgte durch Überführen einer kleinen Menge der eingefrorenen Zellen in frisches Medium.

II.2.2.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (CaCl₂-behandelt) mit dem jeweiligen rekombinanten Plasmid wurden 50 µl der kryokonservierten Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und mit 1 µl eines Ligationsansatzes (Abschnitt II.3.11) oder bis zu 100 ng eines geschlossenen Plasmids vermengt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis, wurden diese einem Hitzeschock für 30 sec bei 42°C ausgesetzt. Nach einer kurzen Regenerationszeit von 2 min wurden 300 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und die Zellen bei 37° schüttelnd (180 rpm) für 60 min inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf vorgewärmte LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht kultiviert. Durch die Zugabe der entsprechenden Selektionsantibiotika konnten die Zellen, welche erfolgreich das Plasmid aufgenommen haben, selektiert werden.

II.3 Molekularbiologische Methoden

II.3.1 Isolierung genomischer DNA aus *P. falciparum*

Zur Isolierung genomischer DNA (gDNA) aus *P. falciparum* wurden 5-15 ml der jeweiligen Kultur pelletiert (2 min, 2500xg, 4°C) und anschließend die umgebende Erythrozytenmembran durch eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) mit 0,2% Saponin/PBS lysiert. Die freigesetzten Parasiten wurden anschließend erneut pelletiert (10 min, 3000xg, 4°C), mit 10 ml 1xPBS gewaschen und in einem finalen Volumen von 200 µl 1xPBS resuspendiert. Die weitere Isolierung der gDNA erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des NucleoSpin® Blood Kits der Firma MACHEREY-NAGEL (Düren, D). Die gDNA wurde mit 50-100 µl ddH₂O eluiert.

II.3.2 Isolierung von RNA aus *P. falciparum*

Zur Isolierung von RNA aus *P. falciparum* wurden sowohl synchronisierte asexuelle Blutstadien (Ringstadien, Trophozoiten, Schizonten), über einen Percoll®-Gradienten (Abschnitt II.2.1.6)

angereicherte, unreife (Stadium II-IV), reife (Stadium V) oder aktivierte (30 min nach Aktivierung) Gametozyten als auch die in der Lipidomanalyse (Abschnitt II.5.1) untersuchten Parasitenkulturen verwendet. Die Zellen wurden nach der entsprechenden Aufreinigung pelletiert und nach der Aufnahme in 20 vol% vorgewärmten TRIzol® für 5 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Proben wurden anschließend bis zur weiteren RNA-Isolierung bei -80°C gelagert. Zur Extraktion der RNA wurden die gesammelten Proben bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, mit dem 0,2-fachen TRIzol®-Volumen Chloroform versetzt und durch Schütteln vermischt. Anschließend wurden die Proben für 2-3 min bei RT inkubiert und zur Phasentrennung zentrifugiert (30min, 1400xg, 4°C). Die untere organische Phase bestand anschließend vorwiegend aus Proteinen, die Interphase enthielt die gDNA. Die RNA befand sich in der oberen wässrigen Phase und wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe des 0,5-fachen Probenvolumens 100% Isopropanol und mehrfaches Invertieren erfolgte die Präzipitation der RNA bei 4°C für mindestens 2 h. Das Präzipitat wurde anschließend pelletiert (30 min, 16.000xg, 4°C) und mit 500 µl kaltem 75%vol. Ethanol gewaschen (5 min, 16.000xg, 4°C). Das RNA-Pellet wurde für 5 min Luft-getrocknet und durch 10-minütige Inkubation bei 60°C in 50 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und -Reinheit erfolgte photometrisch (Abschnitt II.3.9).

Um potenzielle Verunreinigungen durch gDNA zu entfernen, wurde die aufgereinigte RNA mit dem *RNase free DNase Kit* der Firma QIAGEN (Hilden, D) nach Herstellerangaben behandelt. Hierfür wurden 2-5 µg RNA-Präzipitat mit 10 µl RDD-Puffer und 2,5 µl DNase I in einem Gesamtvolumen von 100 µl RNase-freiem H₂O versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Zur Entfernung von Reaktionsbestandteilen wie Salzen und Proteinen wurden die Reaktionsgemische anschließend mit 250 µl DEPC-H₂O, 150 µl Chloroform und 150 µl Phenol versetzt und gründlich durch Invertieren gemischt. Nach 3-minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben zur Phasentrennung erneut zentrifugiert (10 min, 12.000xg, 4°C) und die obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt, in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von 0,1 vol% kaltem 3 M NaOAc (pH 4,8-5,2) und 2,5 vol% kaltem Ethanol (100%) für mindestens 1 h bei -20°C präzipitiert. Anschließend wurde die RNA pelletiert (30 min, 12.000xg, 4°C), mit 1 ml 75%-igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für maximal 5 min luftgetrocknet bevor es bei 60°C in 20-50 µl DEPC-H₂O gelöst wurde. Die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentrationen erfolgte photometrisch (Abschnitt II.3.9).

II.3.3 Synthese von cDNA aus isolierter RNA

Zur Synthese von cDNA aus isolierter Gesamt-RNA wurde das SuperScript™ IV First-Strand Synthesis Kit der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Hierfür wurden 1,5-2,5 µg RNA (in einem Gesamtvolumen von bis zu 11 µl) mit 1 µl *random hexamers* (50 µM) und 1 µl dNTP-Mix (10 mM) vermengt und auf ein Gesamtvolumen von 13 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 65°C inkubiert, für 1 min auf Eis gekühlt und mit vorbereitetem cDNA-Synthese-Mix, bestehend aus 4 µl 5x SSIV Puffer, 1 µl DTT (100 mM), 1 µl RNaseOUT™ rekombinantem RNase Inhibitor sowie der SuperScript® IV reversen Transkriptase (200 U/µl), vermengt. Der reverse Transkriptase-Mix wurde anschließend für je 10 min bei 23°C, bei 55°C und für die abschließende Termination der Reaktion bei 80°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt. Die sich noch in der Probe befindliche RNA wurde durch die Zugabe von 1 µl *E. coli* RNase H (37°C, 20 min) entfernt. Als Negativkontrolle und um mögliche Verunreinigungen mit verbliebener gDNA auszuschließen, wurde pro Ansatz ein –RT-Ansatz (ohne reverse Transkriptase) parallel hergestellt, bei dem die Proben mit 1 µl DEPC-H₂O anstelle der Reversen Transkriptase behandelt wurden.

II.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist eine etablierte molekularbiologische Methode zur gezielten Amplifikation von DNA-Abschnitten. Durch eine enzymatische *in vitro*-Reaktion mit einer thermostabilen DNA-Polymerase kann das Ausgangsprodukt exponentiell vervielfältigt und somit in kleinsten Mengen detektiert bzw. für die weitere Verwendung aufgereinigt und modifiziert werden. Eine PCR-Reaktion besteht im Wesentlichen aus drei Schritten, die zyklisch in einem *Thermocycler* wiederholt werden. Zunächst wird die doppelsträngige Matrizen-DNA durch eine Temperaturerhöhung auf $\geq 95^{\circ}\text{C}$ durch Denaturierung der Wasserstoffbrückenbindungen in ihre Einzelstränge aufgeschmolzen. Anschließend wird die Temperatur auf einen Wert gesenkt, bei dem die spezifischen Oligonukleotide komplementär an die Einzelstränge hybridisieren. Dieser Schritt wird als *Annealing*-Phase bezeichnet. Im darauffolgenden Schritt wird die Temperatur im Elongationsschritt auf einen für die verwendete DNA-Polymerase optimalen Wert eingestellt. Die DNA-Polymerase synthetisiert nun ausgehend vom 3'-OH-Ende der gebundenen Oligonukleotide einen neuen komplementären DNA-Strang.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden je nach Analysemethode bzw. weiterem Verwendungszweck unterschiedliche Polymerasen und *Thermocycler*-Programme verwendet. Für Klonierungszwecke wurde die *Q5® High Fidelity DNA-Polymerase* (New England Biolabs, Ipswich, USA) verwendet. Diese Polymerase zeichnet sich aufgrund ihrer 3'→5' Exonuklease-Aktivität durch eine sehr niedrige Fehlerrate in der DNA-Synthese aus. Zur Analyse von Bakterienkolonien, für diagnostische Zwecke wie die Identifikation transgener Parasitenlinien durch Integrations-PCR oder zur semiquantitativen Analyse der Genexpression mittels reverser Transkriptase-PCR (RT-PCR) wurde die *GoTaq®-DNA-Polymerase* (Promega, Madison, USA) verwendet. Die standardmäßig verwendeten Pipettierschemata für PCR-Reaktionen mit der *Q5® High Fidelity Polymerase* sowie der *GoTaq®-Polymerase* ist in Tabelle 15 aufgeführt, die standardmäßig verwendeten Reaktionsprogramme für den *Thermocycler* sind in

Tabelle 16 zusammengefasst. Bei der Kolonie-PCR wurde statt der angegebenen Template-DNA eine in dH₂O resuspendierte Bakterienkolonie verwendet.

Tabelle 15 Standard-Pipettierschemata für *Q5®*- und *GoTaq®*-PCR-Reaktionen.

<i>GoTaq®</i>-PCR-Reaktion		<i>Q5®</i>-PCR Reaktion	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
5x GoTag Reaktionspuffer	10 µl	5x <i>Q5®</i> Reaktionspuffer	10 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl	10 mM dNTPs	1 µl
10 mM dNTPs	1 µl	10 µM Oligonukleotid <i>forward</i>	2 µl
10 µM Oligonukleotid <i>forward</i>	1 µl	10 µM Oligonukleotid <i>reverse</i>	2 µl
10 µM Oligonukleotid <i>reverse</i>	1 µl	Template DNA	100 ng
Template DNA	100 ng	<i>Q5®</i> DNA-Polymerase	0,5 µl
GoTaq® DNA-Polymerase	0,125 µl	dH ₂ O	ad 50 µl
dH ₂ O	Ad 50 µl		

Tabelle 16 Standard *Thermocycler*-Programmierungen für PCR-Reaktionen.

	<i>Q5®</i>-PCR Reaktion		<i>GoTaq®</i>-PCR-Reaktion	
Schritt	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	98°C	30 sec	95°C	2 min
Denaturierung	98°C	30 sec	95°C	30 sec
Annealing	42-48°C	30 sec	42-48°C	30 sec
Elongation	68°C	30 sec/kb	68°C	1 min/kb
Finale Elongation	68°C	5 min	68°C	5 min
Lagerung	4°C	∞	4°C	∞
Anzahl Zyklen	33 x		Kolonie-PCR	33 x
			Integrations-PCR	33 x
			RT-PCR	25 x

II.3.5 Orts-gerichtete Mutagenese PCR

Um gezielt Punktmutationen in einen definierten DNA-Bereich einzubringen, wurde die Orts-gerichtete Mutagenese PCR verwendet. Das Einbringen gezielter Mutationen in die lineare Gensequenz führt somit zu einem Austausch definierter Nukleinbasen. Dadurch kann das Basentriplett so verändert werden, dass in dem durch das Gen codierten Protein gezielte AS ausgetauscht werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Orts-gerichtete Mutagenese PCR dafür verwendet, um katalytisch aktive AS-Seitenreste zu mutagenisieren. Bei der Orts-gerichteten Mutagenese PCR binden mutagene Oligonukleotide sowohl in 5'→3' Richtung als auch in 3'→5' Richtung komplementär an die zu mutierende DNA-Sequenz. Die mutagenen Oligonukleotide enthalten dabei die einzufügenden Punktmutationen. Durch eine PCR-Reaktion wird das komplette Plasmid, welches das zu mutagenisierende Gen enthält, amplifiziert. Für die Orts-gerichtete Mutagenese wurde die *Pfu* DNA-Polymerase (Promega, Madison, USA) verwendet, welche zusätzlich zur Polymerase-Aktivität eine 3'→5' Nuklease-Aktivität aufweist. Das Pipettierschema sowie das *Thermocycler*-Programm für die Orts-gerichtete Mutagenese-PCR sind in Tabelle 18 und Tabelle 19 zusammengefasst. Im Anschluss an die PCR wurde die methylierte parentale Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (5 U) für 1 h bei 37°C verdaut. Nach der Inaktivierung des *DpnI*-Restriktionsenzym (10 min, 95°C) wurden kompetente *E. coli* Zellen mit 10 µl des Ansatzes zur Selektion transformiert (Abschnitt II.2.2.2). Anschließend wurde das Plasmid mit Hilfe der *E. coli* Zellen amplifiziert, aufgereinigt und zur Überprüfung der Punktmutation sequenziert (Abschnitt II.3.13).

Tabelle 17 Standard-Pipettierschema für die Orts-gerichtete Mutagenese-PCR.

Komponente	Menge
10 µM mutagenes Oligonukleotid <i>forward</i>	2 µl
10 µM mutagenes Oligonukleotid <i>reverse</i>	2 µl
10 mM dNTPs	1 µl
<i>Pfu</i> DNA Polymerase 10x Puffer	2 µl
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	1 µl
Template Plasmid-DNA	25 ng
dH ₂ O	Ad 20 µl

Tabelle 18 Standard *Thermocycler*-Programmierung für die Orts-gerichtete Mutagenese-PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	2 min
Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	42°C	1 min

Schritt	Temperatur	Dauer
Elongation	68°C	2 min/1 kb
Finale Elongation	68°C	10 min
Lagerung	4°C	∞
Anzahl Zyklen	25 x	

II.3.6 Quantitative *real-time*-RT-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR (*real-time*-PCR, qPCR) beruht auf dem gleichen Prinzip wie die oben beschriebene PCR, wobei eine gleichzeitig zur DNA-Amplifikation stattfindende Quantifizierung der vervielfältigten Nukleinsäuren erfolgt. Bei der *real-time*-reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR) erfolgt vor der eigentlichen PCR eine reverse Transkriptase-Reaktion, bei der aufgereinigte RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird, welche im Folgenden als Matrize für die qRT-PCR verwendet wird. Mit der qRT-PCR lassen sich die Expression verschiedener Gene in zwei unterschiedlichen Proben vergleichen, z.B. die Expression eines bestimmten Gens in zwei zu vergleichenden Zelllinien oder unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, welcher in die kleine Furche doppelsträngiger DNA interkaliert. Bei steigender Konzentration von DNA-Amplifikaten steigt somit auch die Fluoreszenzintensität in den zu untersuchenden Proben. Für die Quantifizierung wurde der *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Das Pipettierschema und das entsprechende Reaktionsprogramm sind Tabelle 19 zu entnehmen. Die Transkriptionsanalyse erfolgte nach der publizierten $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001), wobei die C_T -Werte auf das endogene Referenzgen für die Seryl-tRNA-Ligase (PF3D7_0717700) normalisiert wurden. Die qRT-PCR wurde mit dem *real-time*-PCR System *StepOnePlus*TM (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt.

Tabelle 19 Standard-Pipettierschema und Programmierung des *StepOnePlus*TM für die qRT-PCR.

<i>Maxima SYBR Green</i> qRT-PCR Reaktion		qRT-PCR Programm		
Komponente	Volumen	Schritt	Temperatur	Dauer
2 x Maxima SYBR Green Mix (+ROX)	10 µl	Initiale Denaturierung	95°C	10 min
10 µM Oligonukleotid <i>forward</i>	0,6 µl	Denaturierung*	95°C	15 sec
10 µM Oligonukleotid <i>reverse</i>	0,6 µl	Annealing/ Elongation*	60°C	60 sec
cDNA Matrize	2 µl		95°C	10 sec
ddH ₂ O	ad 20 µl	Schmelzkurven-analyse**	60°C (+0,3°C)	30 sec
*Anzahl Zyklen (Denaturierung, Annealing, Elongation): 40x; **Anzahl Zyklen Schmelzkurve: 81x				

II.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung unterschiedlich großer Nukleinsäurefragmente sowie zur Überprüfung der Integrität von Plasmiden verwendet. Das Grundprinzip der Agarose-Gelelektrophorese beruht dabei auf dem Migrationsverhalten unterschiedlich großer Nukleinsäurefragmente in einem Gel mit definierter Porengröße, wobei sich die Nukleinsäuren unter Anlegen einer Spannung aufgrund des negativ geladenen Phosphatrückgrats zur Anode bewegen. Die Migrationsgeschwindigkeit ist dabei direkt proportional zur DNA-Fragmentlänge. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden 1,2%ige (m/v) TAE-Agarose-Gele vorbereitet und mit den jeweiligen Proben in DNA-Ladepuffer beladen. Die Auftrennung erfolgte in einer mit TAE-gefüllten horizontalen Flachbettkammer durch Anlegen einer Spannung zwischen 80-120 V (20-25 min). Als Größenstandard wurden jeweils 5 µl des *2-Log DNA Ladders* (New England Biolabs, Ipswich, USA) verwendet. Zur Visualisierung der DNA unter UV-Licht wurde dem Agarosegel zuvor der nicht-toxische Fluoreszenz-DNA-Farbstoff *Roti®-GelStain* (Carl Roth, Karlsruhe, D) in einer Menge von 50 µl/l zugegeben. Die Dokumentation des Laufmusters erfolgte mit Hilfe des *Gel iX20 Imager* Geldokumentationssystems (Intas, Göttingen, D) und die Bearbeitung der Gelbilder erfolgte mit *Adobe® Photoshop 8.0.1*.

II.3.8 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen, nach PCR-Reaktionen sowie nach einem präparativen Restriktionsverdau erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin® Gel- und PCR Clean-Up Kits* (MACHEREY-NAGEL, Düren, D). Die aufzureinigende DNA im Agarosegel wurde mit einem UV-Transilluminator (Vilber Lourmat, Eberhardzell, D) visualisiert und mit einem Skalpell aus dem übrigen Agarosegel herausgetrennt. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Die DNA wurde mit 15-20 µl dH₂O von den Silica-Säulen eluiert.

II.3.9 Photometrische Analyse von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurden photometrisch bestimmt. Hierfür wurde die Extinktion der Nukleinsäure-Lösung bei 260 nm mit Hilfe des *NanoDrop™ 2000c* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen. Zur Überprüfung der Reinheit und Homogenität der Nukleinsäureproben wurden zudem die Quotienten $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$ und $E_{260\text{ nm}}/E_{230\text{ nm}}$ bestimmt, die bei reinen DNA Proben ohne Verunreinigungen durch Proteine oder

organische Substanzen bei etwa 1,8-2,0 bzw. $\geq 2,0$ liegen sollten. Bei reinen RNA Proben sollte der Quotient $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$ bei etwa 2,0 liegen.

II.3.10 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten und Vektoren

Restriktionsendonukleasen hydrolysieren DNA an definierten Stellen und erzeugen so glatte Enden (engl. *blunt ends*) oder versetzte bzw. komplementäre Enden (engl. *sticky ends*). Die Restriktion von DNA mittels Restriktionsenzymen wurde sowohl für die Klonierung von DNA-Fragmenten in den jeweiligen Zielvektor über das Einbringen von komplementären Enden als auch zur Restriktionsanalyse, also zur Integritätsprüfung eines Plasmids, verwendet. Die Zusammensetzung der Restriktionsverdau ist in Tabelle 20 dargestellt. Der Reaktionsansatz wurde für 2-4 h bei 37°C inkubiert. Die restriktionsverdaute DNA wurde im Anschluss, wie in Abschnitt II.3.8 beschrieben, aufgereinigt oder mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Tabelle 20 Standard Pipettierschemata für den DNA-Restriktionsverdau.

Komponente	Präparativer Verdau	Analytischer Verdau
DNA (PCR-Produkt/Vektor)	1-5 µg	1-4 µg
10x <i>CutSmart</i> Puffer	4 µl	2 µl
Restriktionsenzym A	1 µl	1 µl
Restriktionsenzym B	1 µl	1 µl
dH ₂ O	ad 40 µl	ad 20 µl

II.3.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von restriktionsverdauten DNA-Fragmenten in den jeweiligen Zielvektor wurde die T4-DNA-Ligase von New England Biolabs (Ipswich, USA) verwendet. Die T4-DNA-Ligase katalysiert dabei die kovalente Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 5'-Phosphatenden und den freien 3'-Hydroxylgruppen und erlaubt somit die Verknüpfung von DNA-Fragmenten und Zielvektoren mit korrespondierenden Schnittstellen. Neben den zu ligierenden DNA-Fragmenten wurden 1 µl T4-DNA-Ligase sowie 2 µl 10xT4-DNA-Ligase Reaktionspuffer dem Reaktionsansatz mit einem finalen Volumen von 20 µl hinzugefügt. Standardmäßig wurden 75 ng Vektor-DNA für die Ligation verwendet, das zu ligierende DNA-Fragment (Insert) wurde in quantitativer dreifacher Menge hinzugegeben. Die Menge des Inserts wurde dabei mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Menge Insert [ng]} = \frac{\text{Menge Vektor [ng]} \times \text{Größe Insert [kb]}}{\text{Größe Vektor [kb]}} \times 3$$

II.3.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-Isolierung aus *E. coli*-Zellen erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kits* oder des *NucleoBond® Xtra Midi Kits* (MACHEREY-NAGEL, Düren, D) nach Herstellerangaben. Das *NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit* wurde für die Mini-Präparation einer 5 ml *E. coli* Übernachtskultur (37°C, 180 rpm) verwendet, das *NucleoBond® Xtra Midi Kits* für Midi-Präparation einer 300 ml *E. coli* Übernachtskultur (37°C, 180 rpm) verwendet. Die finale Elution der DNA von der Silica-Matrix erfolgte bei der Mini-Präparation mit 30-50 µl sterilem dH₂O. Bei der Midi-Isolation wurde die pelletierte Plasmid-DNA nach Präzipitation in sterilem dH₂O resuspendiert, um eine finale Endkonzentration von 1-2 µg/µl zu erhalten.

II.3.13 Sequenzierung

Zur Überprüfung rekombinanter Plasmide sowie zur Analyse der Integrationsloci genetisch modifizierter Parasitenlinien wurde die Nukleotidabfolge der jeweiligen DNA-Abschnitte mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierungen wurden am Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie (Fraunhofer IME, Aachen, D) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden 400-600 ng isolierter Plasmid-DNA mit 2 µl des jeweiligen spezifischen Sequenzierungs-Oligonukleotids (10 pmol/µl) in einem Gesamtvolumen von 30 µl dH₂O vorbereitet. Für die Sequenzierung der Integrationsloci wurden die 5' und 3' Bereiche der Integrationsloci mittels *Q5®*-PCR mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide sowie aufgereinigter genomischer DNA der jeweiligen Parasitenlinie als Matrize wie beschrieben amplifiziert (Abschnitt II.3.4), die PCR-Amplifikate aufgereinigt (Abschnitt II.3.8) und je 150 ng des jeweiligen DNA-Fragments wie oben beschrieben zur Sequenzierung vorbereitet. Die analytische Auswertung und Überprüfung der DNA-Sequenzierungen erfolgte mit dem Programm *CloneManager® 9*.

II.4 Proteinbioschemische Methoden

II.4.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in *E. coli*

Für die Generierung polyklonaler Immunsereen sowie zur enzymatischen Aktivitätsbestimmung ausgewählter Phospholipasen wurden im Rahmen dieser Arbeit rekombinante *Plasmodium*-Proteine heterolog in *E. coli* exprimiert und via Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Für die rekombinante Proteinexpression wurde die jeweilige Gensequenz des Zielproteins entweder in den Expressionsvektor pMAL-c5x oder in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 kloniert

und im *E. coli* BL21 CodonPlus®-(DE3)-RIL-Expressionsstamm rekombinant exprimiert. Bei der rekombinanten Proteinexpression unter der Verwendung des pMAL-c5x Expressionsvektors entsteht ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen MBP-Tag (Maltose-bindendes Protein), bei der rekombinanten Proteinexpression unter der Verwendung des pGEX-6P-1 Expressionsvektors entsteht ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen GST-Tag (Gluthatione-S-Transferase). Diese Tags können in einer anschließenden Affinitätschromatographie für die gezielte Isolation des Zielproteins aus Bakterienlysat verwendet werden. Nach erfolgreicher Klonierung der Expressionskonstrukte wurden kompetente *E. coli* BL21 CodonPlus®-(DE3)-RIL-Expressionsstämme mit diesen via Hitzeschock transformiert. Zunächst wurden einzelne Klone hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Expression der jeweiligen Fusionsproteine im kleinen Maßstab (5 ml) analysiert. Hierfür wurden die *E. coli* Kulturen mit dem entsprechenden Medium angesetzt und bei 37°C für 12-16 h schüttelnd (180 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Übernachtskulturen 1:10 mit frischem Medium verdünnt und erneut bei 37°C schüttelnd (180 rpm) inkubiert, bis diese eine Zelldichte von OD=0,5 erreicht hatten. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe des Induktors Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) mit einer finalen Konzentration von 0,75 mM induziert und die Kulturen für weitere 2-3 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Eine nicht-induzierte Kultur wurde als Kontrolle verwendet. Zur Analyse der erfolgreichen Proteinexpression wurden 100 μ l der Kulturen pelletiert, in 20 μ l Lysepuffer resuspendiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Positiv getestete Klone wurden anschließend im 3 l Maßstab exprimiert, um quantitativ ausreichende Mengen des rekombinanten Proteins aufzureinigen zu können. Hierfür wurden wie bei der Expression im kleinen Maßstab Vorkulturen in 20 ml des jeweiligen Mediums über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Hauptkultur wurde anschließend durch eine 1:100 Verdünnung der Vorkultur angeimpft und schüttelnd (180 rpm) bis zu einer Zelldichte von OD=0,6 bei 37°C inkubiert. Die rekombinante Proteinexpression wurde durch Zugabe des Induktors IPTG mit einer finalen Konzentration von 0,1-0,75 mM induziert. Für die rekombinante Proteinexpression wurden die Kulturen für weitere 4-5 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Für die Proteinaufreinigung wurden die Kulturen anschließend pelletiert (10 min, 5000xg, 4°C) und das Zellpellet in 40 ml kaltem 1xPBS gewaschen (20 min, 4000xg, 4°C). Das Pellet wurde gewogen und pro Gramm Pelletgewicht wurde dieses mit 3 ml *cOmplete® EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche, Basel, CH) versetztem Lysepuffer, 80 μ l Lysozym-Stammlösung (10 mg/ml) und 30 μ l PMSF Stammlösung (100 mM) resuspendiert und zum Zellaufschluss für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben sonifiziert (3x45 sec,

50% Intensität, 0,5 Zyklen) und mit 6 µl MgCl₂-Stammlösung (1 mM) und 0,08 g NaCl pro ml Zelllysats vermennt. Nach einer einstündigen Inkubation rotierend bei 4°C wurden die nicht löslichen Bestandteile per Zentrifugation (1,5 h, 15.000xg, 4°C) entfernt und der Überstand für die weitere Proteinaufreinigung via Affinitätschromatographie verwendet.

Der Überstand des Zelllysats wurde mit den Amylose-Kügelchen (New England Biolabs, Ipswich, USA) ÜN bei 4°C rotierend inkubiert. Diese wurden zuvor in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 30 ml Säulenpuffer (ohne Maltose) gewaschen (5 min, 1000xg, 4°C) und in 2,5 ml TE-Puffer aufgenommen. Während der ÜN-Inkubation mit dem Überstand des Zelllysats binden die rekombinanten Fusionsproteine über ihren MBP-Tag spezifisch an die stationären Amylose-Kügelchen. Nach der ÜN-Inkubation wurden die Kügelchen mit den daran gebundenen Fusionsproteinen dreimal mit 50 ml Säulenpuffer (ohne Maltose) zum Entfernen unspezifischer Wechselwirkungen gewaschen (5 min, 60xg, 4°C). Das Zielprotein wurde durch die Zugabe von 10 ml Säulenpuffer (mit Maltose) während einer 20-minütigen Inkubation bei 4°C von den Amylosekügelchen durch den Überschuss von Maltose eluiert, gefolgt von einem weiteren analogen Elutionsschritt mit 5 ml Säulenpuffer (mit Maltose). Die Elutionsfraktionen wurden mit Hilfe von 50 kDa MWCO *Amicon*® *Filters* (Merck Millipore, Burlington, USA) durch Zentrifugation (10 min, 4000xg, 4°C) aufkonzentriert und mit sterilem 1xPBS gewaschen (Pufferwechsel). Die erfolgreiche Proteinaufreinigung wurde anschließend mittels SDS-PAGE (Abschnitt II.4.4) analysiert. Die finale Proteinkonzentration wurde per Bradford-Test (Abschnitt II.4.2) bestimmt.

II.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Analyse

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur Quantifizierung von Proteinkonzentrationen in einer Lösung. Beim Bradford-Test reagiert der Farbstoff Triphenylmethan Coomassie-Brilliant-Blau G-250 in saurer Lösung mit den unpolaren und kationischen AS-Seitenketten der linearen Polypeptidkette (Bradford, 1976). Bei der Komplexbildung mit den Proteinen verschiebt sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs dabei von 470 nm nach 595 nm, wobei die Verschiebung des Absorptionsmaximums direkt linear zur Proteinmenge innerhalb der Lösung ist. Von der zu untersuchenden Proteinlösung wurde jeweils eine 1:10 und 1:100 Verdünnung hergestellt und 20 µl im Triplikat in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt. Neben der zu untersuchenden Probe wurde eine BSA-Verdünnungsreihe mit bekannter Proteinkonzentration aus einer BSA-Stammlösung (100µg/ml)

hergestellt (0, 2, 4, 6, 10, 15, 20 µl BSA-Stammlösung mit dH₂O auf 20 µl aufgefüllt) und je 20 µl im Triplikat ebenfalls in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt. Die verdünnten Proben sowie die BSA-Standardverdünnungsreihe wurden mit 180 µl 1 x Bradford-Reagenz auf 200 µl aufgefüllt. Die Verschiebung des Absorptionsspektrum wurde in einem *Tecan Spark 10M* Plattenleser (Tecan, Männedorf, CH) gemessen. Die Berechnung der unbekannten Proteinkonzentration erfolgte über die BSA-Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration mit Hilfe von *Microsoft® Excel* 2014.

II.4.3 Gewinnung polyklonaler Immunseren

Zur Verwendung in Expressions- und Lokalisationsstudien wurden im Rahmen dieser Arbeit polyklonale Immunseren in weiblichen Mäusen generiert. Hierfür wurden für die Erstimmunisierung 100 µg des jeweiligen aufgereinigten Proteins in einem Gesamtvolumen von 100 µl PBS gelöst und mit 100 µl des immunologischen Wirkstoffverstärkers *Freund'sches incomplete Adjuvans* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) vermischt. Dieses Gemisch wurde 6-8 Wochen alten weiblichen Mäusen subkutan injiziert. Eine zweite Immunisierung erfolgte nach vier Wochen mit einer Gesamtproteinmenge von 50 µg. Zehn Tage nach der Zweitimmunisierung wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion eines Ketamin/Xylazin-Gemisches (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nach Herstellerangaben betäubt. Das Serum der Mäuse wurde durch Herzpunktion gewonnen und in ein Serumröhrchen überführt. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurden die geronnenen Blutbestandteile pelletiert (800xg, 15 min, RT) und der Überstand als Immunserum aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Arbeiten an den Versuchstieren wurden freundlicherweise von Alexandra Golzmann und Dr. Che Julius Ngwa durchgeführt.

II.4.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine biochemische Methode zur Auftrennung von Proteingemischen in Abhängigkeit ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Die Auftrennung der Proteine erfolgt dabei innerhalb einer diskontinuierlichen Gelmatrix auf Polyacrylamidbasis, wobei die Eigenladung der Proteine durch die Zugabe des anionischen Tensids SDS überlagert wird. Dadurch werden die Proteine im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer linearen Peptidstruktur proportional zur Molekülmasse aufgetrennt, weshalb kleinere Proteine im Gel weniger stark zurückgehalten werden als größere.

Zur Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE wurden diese mit 5 x SDS-PAGE-Probenpuffer und DTT versetzt und für 10 min bei 95°C zum Aufbrechen der Sekundär- und Tertiärstrukturen denaturiert. Die Proben wurden anschließend in die Geltaschen pipettiert und die Gelelektrophorese in vertikalen, mit SDS-Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammern durchgeführt. Für die Migration der Proben im 5%igen Sammelgel, in dem sich die Proteine konzentrieren und der Größe nach stapeln, wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Für die eigentliche Separation im Trenngel wurde die Spannung auf 100-120 V erhöht. Die Trenn- und Sammelgele wurden entsprechend Tabelle 21 vorbereitet. Als Molekulargewichtsstandards wurden je nach Verwendungszweck 5 µl des *Unstained Protein Molecular Weight Markers*, des *PageRuler Prestained Protein Ladders* oder des *Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladders* (Abbildung 7, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in eine gesonderte Geltasche geladen. Zur Visualisierung des Migrationsverhaltens der jeweiligen Proben wurde das SDS-Gel dreimal je 10 min mit dH₂O gewaschen und anschließend mit dem *GelCode Blue Stain Reagent* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gefärbt. Für eine anschließende Western Blot-Analyse wurde das SDS-Gel nach der Probenauftrennung mit dH₂O für 5 min gewaschen und wie beschrieben weiterverwendet (Abschnitt II.4.5).

Tabelle 21 Standard-Pipettierschemata für SDS-Gele. SDS, Natriumdodecylsulfat; TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin.

Komponente	Sammelgel 5%	Trenngel 10%	Trenngel 12%
30% Acrylamid	0,6 ml	3,3 ml	4,0 ml
dH ₂ O	2,4 ml	4,0 ml	3,3 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	2,5 ml	2,5 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0 ml	-	-
10% SDS	12 µl	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl
10% Ammonium Persulfat (APS)	12 µl	100 µl	100 µl

II.4.5 Western Blot-Analyse

Die Western Blot-Analyse ist ein molekularbiologisches Verfahren zum spezifischen Nachweis von Proteinen durch Übertragung (*Blotting*) auf eine Trägermembran mit anschließender Immundetektion mittels spezifischer Antikörper. Zunächst wurde das zu untersuchende Proteingemisch mittels SDS-PAGE (Abschnitt II.4.4) im elektrischen Feld entsprechend der molekularen Größen aufgetrennt. Im Weiteren wurde das Polyacrylamidgel wie beschrieben für 5 min in dH₂O gewaschen und mit Hilfe eines weiteren elektrischen Feldes, welches senkrecht zu dem Polyacrylamidgel angelegt wurde, auf eine Nitrocellulose-Membran (GE Healthcare, München, D) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte dabei für 2-3 h auf Eis in einer mit

Transferpuffer gefüllten Blotting-Apparatur (BioRad, Hercules, USA) bei einer Spannung von 60 V. Anschließend wurde die Membran für 5 min in TBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation mit Blockierlösung bei RT blockiert. Nach einem kurzen Waschschrift in TBS wurde die Membran mit dem spezifischen Primärantikörper entsprechend der in Tabelle 6 angegebenen Verdünnungen in 3% TBSM (3% Milchpulver in TBS) bei 4°C ÜN schüttelnd inkubiert. Im Weiteren wurde die Membran je 10 min mit 3% TBSM, zweimal mit 3% TBSM/0,1%Tween-20 und final erneut mit 3% TBSM bei RT gewaschen, bevor diese mit dem entsprechenden Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 7) in 3% TBSM für 1 h bei RT inkubiert wurde. Die Membran wurde final je 10 min mit 1xTBS, zweimal mit 1xTBS/0,1% Tween-20 und zuletzt erneut mit 1xTBS bei RT gewaschen, bevor diese für 3-5 min in Equilibrierungspuffer bei RT inkubiert wurde. Die Detektion erfolgte durch Zugabe einer Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)/5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)-Lösung (Roche, Basel, CH) nach Herstellerangaben im Dunkeln. Dabei wird BCIP durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase zu 5-Brom-4-chlorindolyl und Phosphat hydrolysiert, wobei 5-Brom-4-chlorindolyl weiter zum dunkelblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert und NBT zum blauen Di-Formazanfarbstoff reduziert wird. Die Licht-stabilen Farb-Präzipitate werden auf der Membran sichtbar und erlauben so die kolorimetrische Detektion der Alkalischen Phosphatase. Die Reaktion wurde nach etwa 5-30 min oder sobald die gewünschte Bandenintensität erreicht wurde durch Waschen in Stopp-Puffer beendet. Die Membran wurde anschließend Luft-getrocknet und für die weitere Verarbeitung mit einem *Epson Perfection 4990 Photoscanner* (Epson, Suwa, JPN) digitalisiert.

II.4.6 Zelluläre Fraktionierung von *P. falciparum* Zelllysaten

Unter Zellfraktionierung versteht man die Auftrennung von Zellbestandteilen nach einem Zellaufschluss, wobei sich beispielsweise die Löslichkeit der Zellkomponenten oder deren Sedimentationsgeschwindigkeit im Dichtegradienten zu Nutze gemacht wird. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode verwendet, die auf der Löslichkeit der zu untersuchenden Proteine in verschiedenen Puffern basiert. Das Protokoll wurde nach Grüning *et al.* modifiziert (Grüning *et al.*, 2012). Für die zelluläre Fraktionierung wurden zunächst synchronisierte Schizonten-Kulturen ($\sim 3 \cdot 10^6$ Schizonten) mittels Percoll®-Gradient angereichert und von ihren Wirtszellen durch fünfminütige Inkubation mit 0,03% Saponin/PBS bei 4°C befreit. Nach einem Waschschrift mit kaltem PBS wurden die Zellen mittels hypotonischer Lyse in 200 µl 5 mM Tris-HCl (pH 8,0)/1%

PIC für 10 min bei RT aufgeschlossen und im Weiteren bei -20°C eingefroren. Die Parasiten wurden anschließend langsam auf Eis aufgetaut und für 5 min bei 16.000xg zentrifugiert (4°C). Dieser Schritt trennte die löslichen von den nicht-löslichen Zellbestandteilen, wobei sich im Überstand nach der Zentrifugation zum großen Teil die löslichen, zytosolischen Proteine befanden. Das Pellet wurde anschließend sequentiell zunächst mit 200 µl jeweils frisch zubereitetem 0,1 M Na₂CO₃ auf Eis für 30 min (periphere Fraktion), 200 µl eiskaltem 1%Triton X-100 auf Eis für 30 min (Fraktion mit integralen Membranproteinen) und final mit 200 µl 0,5xPBS/4%SDS/0,5% Triton X-100 (unlöslicher Anteil) extrahiert. Nach jeder Fraktionierung wurde das verbliebende Pellet mit 1 ml kaltem PBS gewaschen, um Verunreinigungen zwischen den einzelnen Fraktionen zu vermeiden. Alle Überstände der jeweiligen Fraktionierungen wurden zudem zur Entfernung von Verunreinigungen erneut zentrifugiert (16.000xg, 5 min, 4°C). Äquivalente Mengen der einzelnen Fraktionen wurden anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert.

II.5 Sonstige Methoden

II.5.1 Lipidomanalyse

Zur globalen Analyse der Lipidzusammensetzung sowie der chemisch-strukturellen Diversität der Lipide in den asexuellen Blutstadien von *P. falciparum* wurde durch Prof. Dr. Cyrille Botté und Dr. Yoshiki Yamaryo-Botté (ApicoLipid Team, Insitute for Advanced Biosciences, La Tronce, F) eine Lipidomanalyse durchgeführt. Für die Lipidomanalyse wurden die Parasitenkulturen durch vier konsekutive Sorbitol-Behandlungen synchronisiert (vgl. Abschnitt II.2.1.8). Im auf die vierte Sorbitol-Behandlung folgenden Replikationszyklus wurden die hoch synchronen Parasitenkulturen 10 ± 2 h.p.i. in ein vorgewärmtes (37°C) 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Synchronisation wurde mittels qRT-PCR verifiziert (Abschnitt II.3.6). Die Gesamtzahl der Parasiten wurde mittels Giemsa-gefärbter Blutausstriche sowie durch Auszählen im Hämocytometer bestimmt. Von einem Teil der Kulturen die Gesamt-RNA zur Generierung von cDNA isoliert, um die synchrone Differenzierung der verwendeten Parasitenkulturen mittels semiquantitativer RT-PCR sowie qRT-PCRs zu verifizieren.

Um ein exaktes Abbild der aktuellen Lipidzusammensetzung zu erhalten und eine mögliche Degradation der vorhandenen Lipide zu vermeiden, wurden die Kulturen im Folgenden durch schnelles Herunterkühlen auf 0°C metabolisch inaktiviert. Hierfür wurden die *P. falciparum* Kulturen in den 50 ml Reaktionsgefäßen über einer Trockeneis-/100% Ethanolmischung suspendiert, während die Zellsuspension kontinuierlich gerührt wurde. Alle weiteren

Arbeitsschritte erfolgten auf Eis bei 4°C. Anschließend wurden die Parasiten durch eine 5-minütige Behandlung mit 0,15% Saponin/0,1% (m/v) BSA/PBS von den umgebenden Erythrozyten-Membranen freigesetzt. Nach drei Waschschritten mit je 1 ml eiskaltem PBS (8000xg, 1 min) wurden die Parasitenpellets bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C aufbewahrt. Die vollständige Lyse der umgebenen Erythrozyten wurde lichtmikroskopisch verifiziert. Die Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) Lipidextraktion erfolgte nach einem Protokoll von Amiar *et al.* (2016) in Gegenwart von Butylhydroxytoluol, PC (C21:0/C21:0), C13:0 Fettsäuren und dem Lipidomix® Lipid-Standardgemisch (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA). Anschließend wurden die polaren Bestandteile der Extraktion mittels Zweiphasen-Separation unter Verwendung von 0,2%igem KCl abgetrennt und das Gesamtlipid-Extrakt in einem Rotationsverdampfer Stickstoff-getrocknet. Das Lipidgemisch wurden in 1-Butanol aufgenommen und durch eine zwei-dimensionale *Nano-SIL* Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (MACHEREY-NAGEL, Düren, D) aufgetrennt. In der ersten Dimension wurde ein Chloroform/Methanol/28% Ammoniumhydroxid-Gemisch im Verhältnis 65:35:8 (v/v/v) als Lösungsmittel verwendet, in der zweiten Dimension wurde ein Chloroform/Aceton/ Methanol/Essigsäure/Wasser-Gemisch im Verhältnis 40:15:14:13:7,5 (v/v/v/v/v) verwendet. Die Lipid-Spots wurden mit authentischen Standards verglichen, von der Trägerplatte geschabt und in Glas-Reaktionsgefäße überführt. Für die anschließende Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS) wurden die Fettsäureester mit C15:0 Fettsäurestandards (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) und mit 0,5 M HCl/Methanol durch eine saure Methanolyse in besser flüchtige Fettsäuremethylester umgeestert (85°C, 6 h). Die so entstandenen Fettsäuremethylester wurden mit Hexan extrahiert, um diese mittels Agilent 5977A-7890B GC-MS (Agilent, Santa Clara, USA) qualitativ und quantitativ zu analysieren (Ramakrishnan *et al.*, 2012). Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der *Mass Hunter Software* (Agilent, Santa Clara, USA), wobei jede Fettsäure mit Hilfe von authentischen Standard-Methylester Kalibrierungskurven quantifiziert wurde.

II.5.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität rekombinanter Proteine mit Hilfe des NEFA-Kit

Um eine potenzielle Phospholipase-Enzymaktivität sowie die Substratspezifität *in vitro* nachzuweisen, wurde das *non-esterified fatty acids* (NEFA)-Kit (Wako Chemicals, Neuss, D) nach Herstellerangaben verwendet. Bei dem NEFA-Kit handelt es sich um eine *in vitro* kolorimetrische Methode, die es ermöglicht, nicht-veresterte Fettsäuren zu quantifizieren. Die nicht-veresterten

Fettsäuren werden dabei mit Hilfe von Coenzym A und Adenosintriphosphat durch eine Acyl-CoA Synthetase zu Acyl-CoA, AMP und Phosphorsäure umgesetzt. Das so entstandene Acyl-CoA wird anschließend durch eine Acyl-CoA-Oxidase zu 2,3-trans-Enoyl-CoA und Wasserstoffperoxid umgewandelt. In dem NEFA-Reagenz 2 befindet sich das Enzym Peroxidase, wodurch in Gegenwart des starken Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid aus 3-Methyl-N-Ethyl-N-(β -Hydroxyethyl)-Anilin (MEHA) und 4-Aminoantipyrin (4-AA) durch oxidative Kupplung ein blau-violetter Farbstoff entsteht. Durch die Messung der Absorption bei 550 nm kann dieser Farbstoff und damit die Konzentration der nicht veresterten Fettsäuren gemessen werden. Da bei der Hydrolyse von Phospholipiden durch Phospholipasen freie Fettsäuren als Reaktionsprodukt entstehen, kann diese Methode verwendet werden, um indirekt auf die Aktivität von Phospholipasen zu schließen. Für die Aktivitätsmessung wurden die Phospholipasen zuvor als Volllänge-Protein rekombinant im *E. coli* BL21 CodonPlus®-(DE3)-RIL-Expressionsstamm, wie in Abschnitt II.4.1 beschrieben, exprimiert. Nach der Induktion der Proteinexpression mit 0,75 mM IPTG bei einer $OD_{600}=0,6$ wurden die Proteine für 2 h bei 37°C exprimiert. 1 ml der Bakterienkultur wurde anschließend bei 5000g für 5 min zentrifugiert und die Zellen mit 1 ml Lysozym/Triton X-100 Lösung für 30 min bei 37°C lysiert. Für die Bestimmung der Lipidhydrolyse wurden jeweils 25 μ l des Zelllysats mit 25 μ l des jeweiligen 2xPhospholipidmix (13,4 mM in 40 mM Tris-HCl) für 22 h bei 37°C schüttelnd (170 rpm) inkubiert. Die durch die Hydrolyse freigesetzten freien Fettsäuren wurden anschließend mit Hilfe des NEFA-Kits nach Herstellerangaben analysiert. Eine Verdünnungsreihe von Ölsäure mit bekannter Konzentration wurde als Standard verwendet und diente zur Konzentrationsbestimmung der freien Fettsäuren. Die Intensität des Farbumschlags war dabei direkt linear zur Phospholipaseaktivität. Die Analyse der katalytischen Aktivität wurde von Frau Prof. Dr. Antje Flieger und Herrn Dr. Philipp Auraß (Robert-Koch Institut, Werningerode, D) durchgeführt.

II.5.3 *In silico*-Analysen

Die Gensequenzen, lineare AS-Sequenzen sowie der strukturelle Aufbau inklusive der Domänenstrukturen der untersuchten Proteine wurden der Datenbank *PlasmoDB* entnommen (www.plasmodb.org, Aurecochea *et al.*, 2009). Die Identifizierung homologer Proteine erfolgte auf Basis der linearen AS-Sequenz mit der *online* Computeranwendung *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Altschul *et al.*, 1990). Die phylogenetische Analyse von PNPLA1 und orthologer Proteine erfolgte mit dem Computerprogramm *Molecular Evolutionary*

Genetics Analysis Version 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). Zur Modellierung der dreidimensionalen Proteinstruktur wurde der *i-Tasser* Server verwendet (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>, Yang *et al.*, 2015). Die Abkürzung *i-Tasser* steht für *Iterative Threading ASSEmbly Refinement* und bezeichnet dabei ein iteratives bioinformatisches Verfahren zur Vorhersage eines dreidimensionalen Strukturmodells von Proteinmolekülen auf Basis bereits in Protein-Datenbanken hinterlegten Protein-Kristallstrukturen und Strukturfragmenten durch wiederholende Reassemblierungen. Bei einer Modellierung gibt dabei der *C-Score* mit Werten zwischen -5 bis 2 die geschätzte Qualität der vorhergesagten Modelstruktur an, wobei höhere C-Werte einen höheren Vertrauensgrad bedeuten. Der *Identity*-Wert zwischen 0 und 1 gibt die prozentuale Sequenzidentität in der strukturellen Modellanpassung an. Der *Coverage*-Wert zwischen 0 und 1 gibt die strukturelle Ähnlichkeit des vorhergesagten Modells mit der ausgewählten Protein-Kristallstruktur an. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit können daher ähnliche Funktionen zwischen der verwendeten Kristallstruktur sowie des modellierten Proteins abgeleitet werden. Auch sowohl beim *Identity*-Wert als auch beim *Coverage*-Wert bedeuten höhere Werte generell einen höheren Vertrauensgrad. Das mit dem *i-Tasser* Server generierte 3D-Strukturmodell wurde mit Hilfe des *iCn3D Macromolecular Structure Viewer* (Wang *et al.*, 2000) visualisiert.

II.5.4 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen der in dieser Arbeit erhobenen Daten erfolgte mit dem Computerprogramm *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Die Daten wurden entweder mit Hilfe der *One-Way ANOVA mit Post-Hoc Bonferroni Multiple Comparison Test* oder dem *Student's t-test* ausgewertet. Bei einem Signifikanzwert von $p > 0,05$ wurden die Unterschiede zwischen den Datenreihen als nicht signifikant (n.s.) betrachtet, bei einem Signifikanzwert von $p < 0,05$ wurde eine statistische Signifikanz zwischen den Datenreihen angenommen. Die in den Abbildungen angegebenen Signifikanzniveaus wurden dabei wie folgt dargestellt: $p > 0,05$, n.s. (nicht signifikant); * $p < 0,05$ (statistisch signifikanter Unterschied); ** $p < 0,01$ (hoher statistisch signifikanter Unterschied); *** $p < 0,001$ (sehr hoher statistisch signifikanter Unterschied). Sofern nicht anders angegeben, sind alle Daten als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben.

III. Ergebnisse

III.1 Identifizierung putativer Phospholipasen in *P. falciparum*

Während die im Lipid-Metabolismus sowie in der Lipidsynthese und -Akquirierung involvierten Enzyme in *P. falciparum* in der Vergangenheit bereits im Detail erforscht wurden, ist die biochemische und funktionale Rolle der Phospholipasen weitestgehend unbekannt (zusammengefasst in Flammersfeld *et al.*, 2018). Daher sollten in einem ersten Schritt alle putativen, im *Plasmodium*-Genom codierten Phospholipasen identifiziert und zusammengefasst sowie deren potenzielle Funktion mittels Literaturrecherche evaluiert werden. Dabei wurden die Phospholipasen mit Hilfe der PlasmoDB Datenbank (<http://plasmodb.org/plasmo>; Aurrecoechea *et al.*, 2009) und den EC-Nummern 2.3.1.43, 3.1.1.4, 3.1.1.5, 3.1.1.32, 3.1.4.3, 3.1.4.4, 3.1.4.11, 3.1.4.12 und 3.1.4.41 identifiziert. Diese EC Nummern klassifizieren phospholipolytische Enzyme, wobei für die Genomanalyse hauptsächlich Proteine mit konservierten lipolytischen Domänen mittels der *NCBI Conserved Domain* Datenbank ausgewählt wurden (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb>; Marchler-Bauer *et al.*, 2017). Insgesamt konnten durch die Kollaborationspartner Prof. Dr. Antje Flieger und Dr. Christine Lang (Robert Koch-Institut, Werningerode, D) im Genom von *P. falciparum* 22 Gene für putative Phospholipasen identifiziert. Die Gen-Identifizierungsnummern sowie die Domänenstrukturen der jeweiligen Phospholipasen sind graphisch in Abbildung 9 dargestellt. Die weitere Auswertung zu Transkriptionsdaten und orthologen *Plasmodium*-Proteinen wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Gabriele Pradel durchgeführt und ist Tabelle 23 zusammengefasst.

Die höchste Anzahl putativer Phospholipasen konnte der Familie der α/β Hydrolasen zugeordnet werden. Diese Phospholipasen werden durch eine katalytische Triade bestehend aus Serin-Aspartat-Histidin charakterisiert und weisen eine typische Faltung mit konservierten α -Helix- und β -Faltblatt-Sekundärstrukturelementen auf. Das katalytische Serin ist dabei in einem GXSXG-Motiv eingebettet (Arpigny und Jaeger, 1999). Insgesamt konnten 14 putative α/β Hydrolasen identifiziert werden. 12 dieser Hydrolasen wurden als LPLAs annotiert, wobei 10 eine hohe Homologie (36-61%) zueinander zeigen. Diese haben eine ungefähre Länge von 400 AS, enthalten kein Signalpeptid und bestehen nahezu ausschließlich aus der oben beschriebenen α/β Hydrolase-Domäne. Die übrigen vier α/β Hydrolasen (PF3D7_0731800, PF3D7_1001400, PF3D7_1001600, PF3D7_1126600) dagegen sind mit insgesamt 675-921 AS wesentlich größer und beinhalten N- und C-terminale Extensionen außerhalb der α/β Hydrolase-Domänen. Zwei α/β Hydrolasen

(PF3D7_0731800 und PF3D7_1001400) weisen zusätzlich ein N-terminales Signalpeptid auf (Abbildung 9). Insgesamt acht der 14 α/β Hydrolasen werden hauptsächlich in Gametozyten transkribiert (vgl. Tabelle 23). Von diesen α/β Hydrolasen wurde bislang lediglich *PfPARE* (engl. *prodrug activation and resistance esterase*; PF3D7_0709700) eingehender untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass Pepstatin-resistente Parasitenlinien im *pfpare*-Gen mutagenisiert sind. Pepstatin-Ester sind starke Inhibitoren gegenüber plasmodialen sauren Aspartat-Proteasen und werden durch Esterasen aktiviert. Daher wird vermutet, dass *PfPARE* anstelle der lipolytischen Funktion eine Esterase-Aktivität aufweist und kurzkettige Säuregruppen in Nicht-Phospholipidsubstraten hydrolysiert (Istvan *et al.*, 2017).

Neben diesen potenziellen α/β Hydrolasen wurde ein Gen für eine Phospholipase mit putativer Acyltransferase-Aktivität identifiziert (PF3D7_0629300). Das Protein besteht aus 863 AS, weist ein N-terminales Signalpeptid auf und beinhaltet C-terminal eine Lezithin:Cholesterol Acyltransferase-Domäne. Das höchste Transkriptionslevel wurde in Sporozoiten detektiert (vgl. Tabelle 23). Die Funktion der zu diesem Protein orthologen Phospholipase in *P. berghei* (*PbPL*) wurde bereits umfangreich experimentell untersucht und ist in Abschnitt I.4.5 beschrieben. Jedoch konnte bislang für diese Phospholipase neben der Membran-lytischen Funktion eine Acyltransferase-Aktivität nicht experimentell belegt werden (Bhanot *et al.*, 2005; Burda *et al.*, 2015). Ferner wurde ein Gen identifiziert, das für eine putative PLA₁ (PF3D7_0814400) codiert. Für PF3D7_0814400 konnte das höchste Transkriptionslevel in reifen Stadium V-Gametozyten detektiert werden. Das Protein enthält eine DDHD-Domäne mit einem konservierten Histidin- und drei konservierten Aspartat-AS-Seitenresten. Diese Domäne stellt eine potenzielle Metallionen-Bindungsstelle dar und konnte bereits häufig sowohl in Phospholipasen als auch in Phosphoesterasen detektiert werden (zusammengefasst in Lev, 2004). Darüber hinaus besitzt das Protein ein konserviertes GX SXG-Motiv, welches auf eine potenzielle Phospholipase-Aktivität hindeutet.

In dem Genom von *P. falciparum* codieren zwei der insgesamt 22 putativen Phospholipasen-Gene für so genannte Phosphodiesterasen (vgl. Abschnitt I.4.3). Eine der Phosphodiesterasen wird als PI-PLC (PF3D7_1013500) bezeichnet. Die essenzielle PI-PLC wird in zahlreichen Stadien von *P. falciparum* exprimiert und spielt durch die Hydrolyse von PIP₂ in die Sekundärsignale IP₃ und DAG eine entscheidende Funktion in der zellulären Signaltransduktion. In Abschnitt I.4.5 wurde die Funktion von PI-PLC in *P. falciparum* eingehend erläutert. Das Gen der zweiten putativen

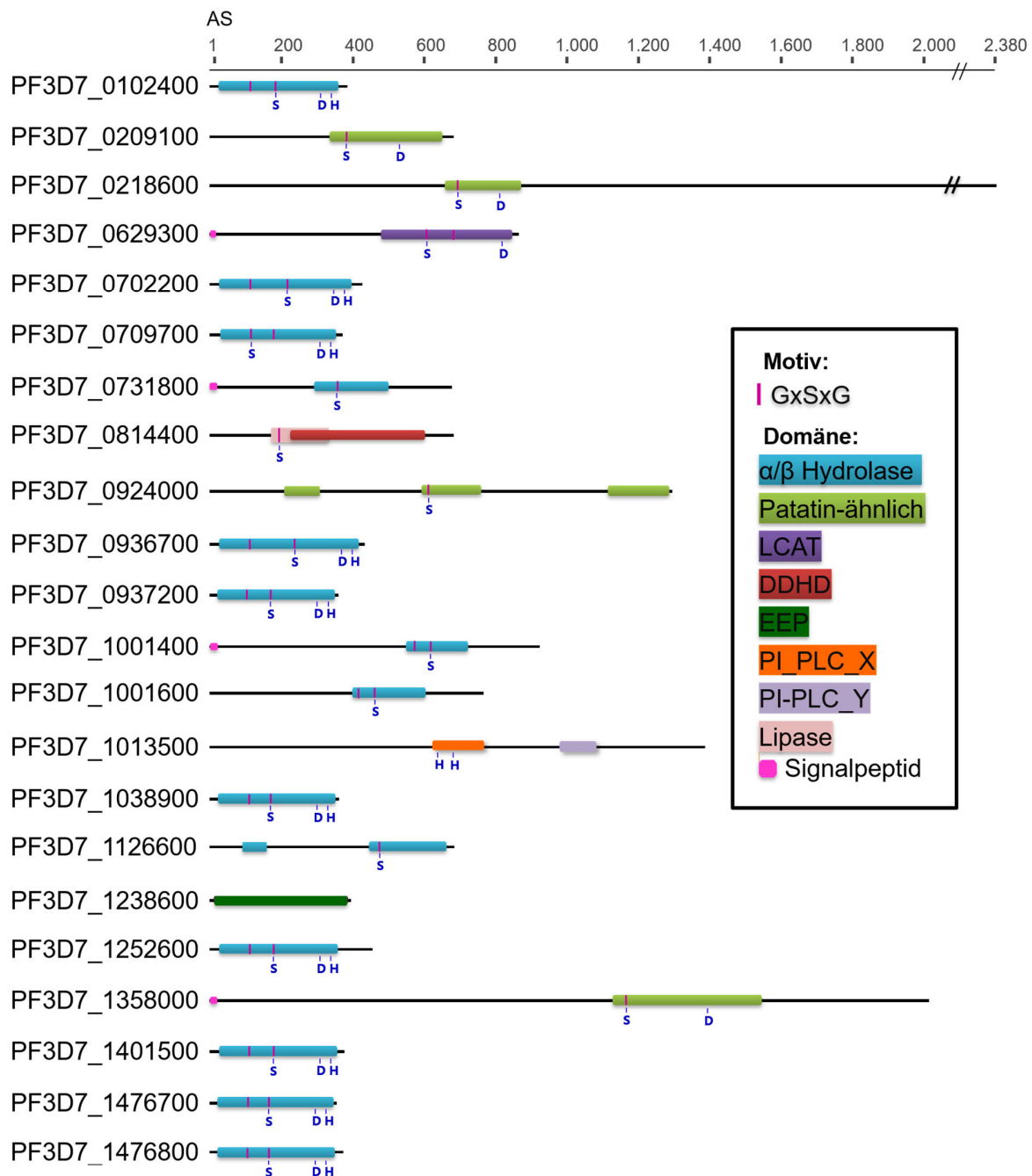


Abbildung 9 Graphische Darstellung der Domänenstrukturen aller putativen lipolytischen Enzyme in *P. falciparum*. Die Vorhersage beruht auf der Verwendung konservierter Proteindomänenstrukturen in der NCBI-Datenbank. Die dargestellten Aminosäuren stellen die katalytisch aktiven Aminosäureseitenketten dar. AS, Aminosäure; D, Aspartat; G, Glycin; H, Histidin; S, Serin; X, beliebige Aminosäure; LCAT, Lezithin:Cholesterol Acyltransferase; EEP, Exonuklease-Endonuklease-Phosphatase Protein Domäne; GXSXG, Aminosäuremotiv mit katalytischem Serin; PI-PLC, Phosphatidylinositol-spezifische PLC Domäne; X, beliebige Aminosäure. Die Genomanalyse erfolgte durch Prof. Dr. Antje Fieger und Dr. Christine Lang (Robert Koch-Institut, Werningerode, D) und wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Gabriele Pradel ausgewertet; Eigenanteil: 30% (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2018).

Phosphodiesterase (PF3D7_1238600) codiert für ein Protein mit 393 AS, das eine Sphingomyelin-Phosphodiesterase-Domäne enthält und als *PfNMS* (neutrale Sphingomyelinase) bezeichnet wird.

Im Gegensatz zu PI-PLC enthält *Pf*NMS kein Signalpeptid und wird hauptsächlich in Sporozoiten exprimiert. Für *Pf*NMS konnte *in vitro* eine Sphingomyelinase-, PLC- und Lysophospholipase C-spezifische Aktivität nachgewiesen werden, die durch den SMase-Inhibitor Scyphostatin inhibiert werden kann (Hanada *et al.*, 2002).

Des Weiteren codiert das Genom von *P. falciparum* für vier Phospholipasen (PF3D7_0209100, PF3D7_0218600, PF3D7_0924000, PF3D7_1358000) mit einer Patatin-ähnlichen Proteindomäne. Die vier PNPLAs weisen eine Größe zwischen 679 und 2380 AS auf. Neben den PNPLA-Domänen konnten keine weiteren konservierten Proteindomänen annotiert werden, lediglich die durch PF3D7_1358000 codierte PNPLA beinhaltet ein N-terminales Signalpeptid. Die großen Bereiche außerhalb der PNPLA-Domänen könnten möglicherweise auf noch nicht identifizierte Proteindomänen hindeuten. PNPLAs weisen, wie in Abschnitt I.4.3 beschrieben, ein typisches GX SXG-Motiv auf, wobei das katalytische Serin mit einem Aspartat eine katalytische Diade darstellt. In allen vier PNPLAs konnten diese charakteristischen Motive identifiziert werden, lediglich die durch PF3D7_0924000 codierte PNPLA weist verschiedene Aspartatreste auf, die für die katalytische Diade in Frage kommen (vgl. Abbildung 9). Die Funktion dieser PNPLAs wurde in *P. falciparum* bislang nicht experimentell untersucht. Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass PF3D7_1358000 eine hohe Homologie zu der in *T. gondii* beschriebenen PNPLA TgPL2 aufweist. TgPL2 lokalisiert an der Peripherie des Apikoplasten und ist für die Aufrechterhaltung der Membranintegrität des mit vier Membranen umgebenen Organells essenziell (Leveque *et al.*, 2017; vgl. Abschnitt I.4.4).

Die Gene der meisten putativen Phospholipasen sind auch in den Genomen anderer *Plasmodium*-Arten identifiziert worden, wie z.B. in den Genomen von *P. vivax*, *P. berghei* und *P. knowlesi*. In der Sanger PlasmogEM Knock-out-Screen Datenbank wurde das Genom von *P. berghei* mittels Hochdurchsatz-reverser Genetik hinsichtlich seiner Funktionalität untersucht (www.plasmogem.sanger.ac.uk/phenotypes; Gomes *et al.*, 2015; Bushell *et al.*, 2017). Dadurch konnten solche Gene identifiziert werden, die für die asexuelle Replikation von *P. berghei* essenziell sind. Die Analyse der homologen Phospholipasen in *P. berghei* ergab, dass 14 der 22 putativen Phospholipasen für die asexuelle Replikation nicht essenziell sind. Dahingegen sind die Phospholipasen PBANKA_1013500 (Homolog zur PI-PLC PF3D7_1013500) sowie PBANKA_1134300 (Homolog zur PNPLA PF3D7_1358000) mit signifikant reduzierten Wachstumsraten essenziell für die asexuelle Replikation in *P. berghei* (Bushell *et al.*, 2017).

Allerdings konnte für PF3D7_1358000 in einer weiteren funktionalen Genomstudie die essenzielle Funktion während der erythrozytären Schizogonie nicht bestätigt werden (Zhang *et al.*, 2018). Die homologen Proteine in *P. vivax*, *P. berghei* und *P. knowlesi* der 22 in *P. falciparum* identifizierten putativen Phospholipasen sowie die Analyse der *Sanger PlasmoGEM Knock-out-Screen* Datenbank sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Insbesondere die Genome von intrazellulär-lebenden Pathogenen oder symbiontisch-lebenden Mikroorganismen codieren für eine signifikant höhere Anzahl an PNPLAs als die Genome sich frei vermehrender Mikroorganismen. Daher sind PNPLAs als Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren, speziell auch in *Plasmodium*, besonders interessant und stellen mögliche Angriffspunkte für zukünftige Antimalaria-Medikamente dar. Die oben beschriebenen PNPLAs wurden in *P. falciparum* bislang nicht experimentell untersucht. In der vorliegenden Arbeit wird daher die PNPLA mit der Genidentifikationsnummer PF3D7_0209100 als erste der insgesamt vier PNPLAs funktional und biochemisch charakterisiert. PF3D7_0209100 wird im Folgenden als PNPLA1 bezeichnet.

III.2 In silico-Analysen des PNPLA1-Proteins

PNPLA1 wird durch das Gen PF3D7_0209100 codiert und hat mit insgesamt 679 AS ein Molekulargewicht von 78 kDa. PNPLA1 weist dabei eine Patatin-ähnliche Domäne zwischen AS 338 bis AS 544 und eine C-terminale *fatty acid binding* (FabD)/Lysophospholipase-ähnliche Domäne zwischen AS 332 bis AS 673 auf. Das für PNPLAs charakteristische GX SXG-Motiv befindet sich in den AS-Positionen AS 381 bis AS 385, während das katalytische Asparat der Serin-Aspartat-Diade in AS-Position 531 lokalisiert (Abbildung 10A). Um Rückschlüsse auf die potenzielle Funktion von PNPLA1 zu erhalten, wurden in einem ersten Schritt mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) auf Basis der linearen PNPLA1-AS-Sequenz homologe Proteine in anderen *Plasmodium*-Arten identifiziert und im Weiteren mit Hilfe des MEGA7-Programms (Hall, 2013; Kumar *et al.*, 2016) in einer phylogenetischen Analyse zusammengefasst. Die phylogenetische Analyse ist in Abbildung 10B dargestellt. Die Sequenzvergleiche zeigten, dass PNPLA1 in den ausgewählten *Plasmodium*-Arten hoch konserviert sind und eine Homologie zwischen 60,7% und 67,4% aufweisen. Dabei konnte die höchste Identität für die homologen Proteine in *P. ovale* (67,4%) und *P. malariae* (69,4%) gezeigt werden, während das homologe Protein in *P. berghei* (60,7%) die geringste Identität aufwies. Wie weitere Sequenzvergleiche zeigten, zeigen alle homologen Proteine insbesondere in der oben beschriebenen Patatin-ähnlichen

Domäne eine hohe Sequenzübereinstimmung (Abbildung 60). In der Darstellung sind das charakteristische GX SXG-Motiv sowie das katalytische Aspartat der Serin-Aspartat-Diade hervorgehoben.

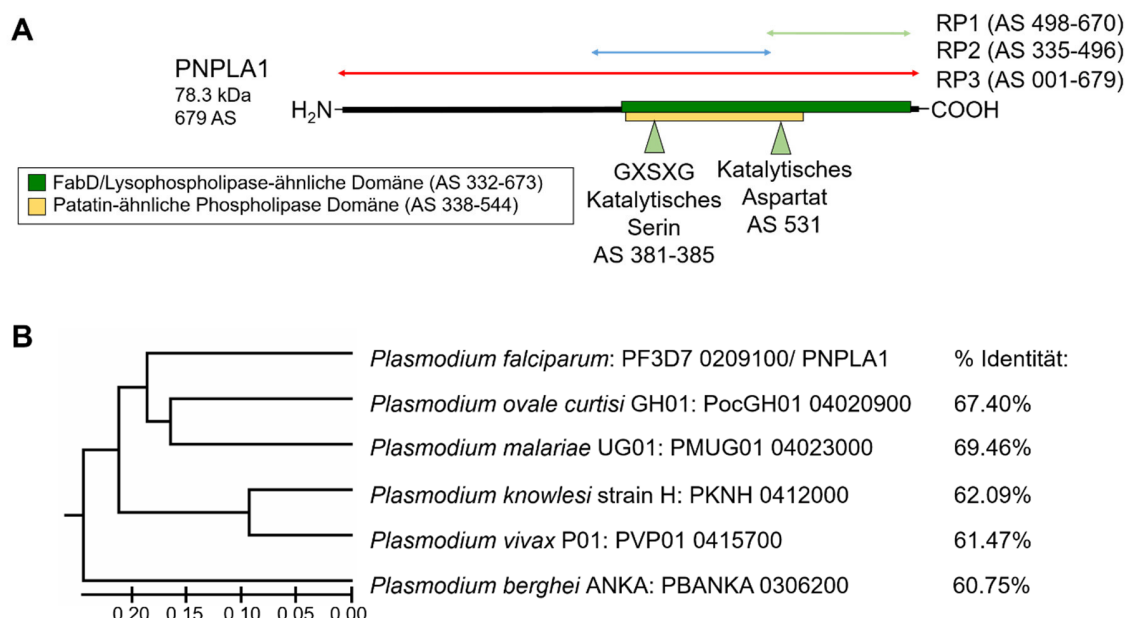


Abbildung 10 Schematische Darstellung und phylogenetische Analyse von PNPLA1. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von PNPLA1. PNPLA1 weist mit 679 AS ein Molekulargewicht von 78 kDa auf. Die FabD (engl. *fatty acid binding* Domäne)/Lysophospholipase-ähnliche Domäne ist in grün dargestellt, die Patatin-ähnliche Phospholipase Domäne ist in gelb dargestellt. Die katalytischen AS der Serin-Aspartat-Diade sind durch einen hellgrünen Pfeil hervorgehoben. Die Linien oberhalb der Schemazeichnung beschreiben die Regionen, die für die Generierung rekombinanter Proteine verwendet wurden. AS, Aminosäure; GX SXG, Aminosäuremotiv mit katalytischem Serin, RP, rekombinantes Protein. (B) Phylogenetische Analyse von PNPLA1 mit ausgewählten homologen Proteinen anderer *Plasmodium*-Arten. Angegeben sind die *Plasmodium*-Arten, die jeweilige Gen-Identifizierungsnummer sowie die prozentuale Sequenzidentität. Die homologen Proteine wurden mit Hilfe des NCBI *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) ausgewählt; die phylogenetische Analyse erfolgte mit dem MEGA7 Programm. Die phylogenetische Analyse wurden in Zusammenarbeit mit Atscharah Panyot, im Rahmen ihrer während dieser Arbeit betreuten Masterarbeit, durchgeführt; Eigenanteil: 50% (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Um weitere Rückschlüsse auf die potenzielle Funktion bzw. katalytische Aktivität von PNPLA1 vorherzusagen, wurde die PNPLA1 3D-Proteinstruktur mit Hilfe des *I-Tasser* Servers *in silico* modelliert und mit dem *iCn3D Structure Viewer* visualisiert (Wang *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2015). Die *I-Tasser* Vorhersage der 3D-Struktur beruht dabei auf in Protein-Datenbanken hinterlegten Protein-Kristallstrukturen. Die Qualität der vorhergesagten Modellstruktur wird durch den *C-Score* (zwischen -5 und 2), dem *Identity*-Wert (zwischen 0-1) sowie dem *Coverage*-Wert (zwischen 0-1) angegeben, wobei höhere Werte einen größeren Vertrauensgrad der Modellierung bedeuten (vgl. Abschnitt II.5.3). Bei einem hohen *Coverage*-Wert können ferner ähnliche Funktionen zwischen dem Protein der verwendeten Kristallstruktur sowie des modellierten Proteins abgeleitet werden. Das Modell mit dem höchsten Vertrauensgrad (*C-Score*: -1,61; *Identity*: 0,156; *Coverage*: 0,842)

basierte auf der Kristallstruktur des humanen Proteins 6AUN, einer Ca^{2+} -unabhängigen $\text{PLA}_2\beta$, und ist in Abbildung 11 dargestellt. In der Abbildung ist die lineare AS-Sequenz als farblicher Verlauf vom N-Terminus (blau) zum C-Terminus (rot) visualisiert. Die katalytischen AS-Seitenreste der Serin-Aspartat-Diade sind in Rot hervorgehoben. Durch die Vergrößerung der katalytischen Diade wird die räumliche Nähe der katalytischen AS-Seitenreste des Serins (AS 383) und des Aspartats (AS 531) verdeutlicht (Abbildung 11). Die Ca^{2+} -unabhängige $\text{PLA}_2\beta$ 6AUN lokalisiert im Zytosol und ist in zahlreichen zellphysiologischen Prozessen wie in der Ca^{2+} -Homöostase, in Entzündungskaskaden sowie in der Apoptose involviert. In Menschen wurde die $\text{PLA}_2\beta$ mit zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson in Verbindung gebracht (Kauther *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012; Malley *et al.*, 2018). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass $\text{PLA}_2\beta$ Membran-Phospholipide hydrolysiert; dabei können potente Lipid *second messenger* freigesetzt werden (zusammengefasst in Burke und Dennis, 2009). $\text{PLA}_2\beta$ weist dabei eine Präferenz gegenüber Plasmalogen-Phospholipiden mit Arachidonsäure an der *sn2*-Position auf. Die $\text{PLA}_2\beta$ besitzt ferner eine ATP-Bindungsstelle und kann durch Calmodulin, ein Ca^{2+} -bindendes regulatorisches Protein, in der Gegenwart von Ca^{2+} inhibiert werden (Hazen und Gross, 1991; Wolf und Gross, 1996; Malley *et al.*, 2018). In Makrophagen ist die Phospholipase möglicherweise als konstitutiv exprimiertes Enzym in der Aufrechterhaltung der Membran-Homöostase involviert (Ackermann *et al.*, 1995).

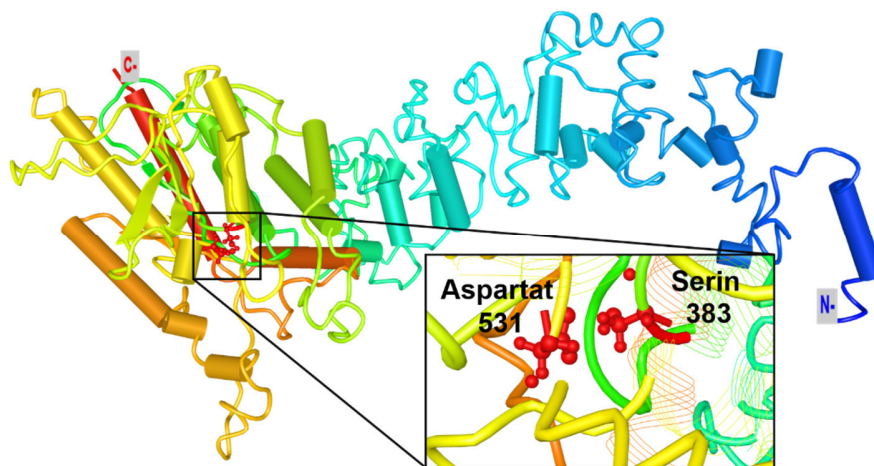


Abbildung 11 *In silico* 3D-Proteinstruktur Modellierung von PNPLA1. Die 3D-Struktur wurde mit Hilfe des *I-Tasser Servers* modelliert und mit der *iCn3D Software* visualisiert. Die Modellierung (*C-Score*: -1,61; *Identity*: 0,156; *Coverage*: 0,842) basiert auf der linearen Aminosäuresequenz von PNPLA1 und der bereits aufgeklärten Kristallstruktur der humanen Ca^{2+} -unabhängigen $\text{PLA}_2\beta$ (Proteindatenbank: 6AUN). Die lineare Aminosäuresequenz ist als farblicher Verlauf vom N-Terminus (blau) zum C-Terminus (rot) visualisiert, die katalytischen Aminosäurereste der Serin-Aspartat-Diade sind in rot hervorgehoben. Das katalytische Zentrum ist in der Vergrößerung dargestellt. Die *in silico*-Analyse wurden in Zusammenarbeit mit Atscharah Panyot, im Rahmen ihrer während dieser Arbeit betreuten Masterarbeit, durchgeführt; Eigenanteil: 50% (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

III.3 Transkriptionsanalyse des *pnpla1*-Gens

Zunächst sollte die Genexpression des *pnpla1*-Gens mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert werden. Dazu wurde jeweils die Gesamt-RNA aus asexuellen Ring-, Trophozoiten-, und Schizontenstadien sowie aus unreifen (Stadium II-IV), reifen (Stadium V) und aktivierten (15 min nach Aktivierung) Gametozyten isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde anschließend als Matrize in RT-PCRs eingesetzt, wobei die zu untersuchenden Transkripte mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide amplifiziert wurden (Tabelle 12). Als Ladekontrolle für die verschiedenen cDNA-Proben wurden spezifische Oligonukleotide für die Amplifikation des für die Fructose-bisphosphat-Aldolase codierenden Gens *aldolase* verwendet (Knapp *et al.*, 1990). Die Reinheit der einzelnen cDNA-Proben im Hinblick auf Stadienspezifität wurde durch die Amplifikation des für die asexuellen Blutstadien spezifischen *ama1*-Transkripts (Peterson *et al.*, 1989) und des für die Gametozytenstadien-spezifischen *ccp2*-Transkripts (Pradel *et al.*, 2004) verifiziert. Um potenzielle Kontaminationen der cDNA mit gDNA

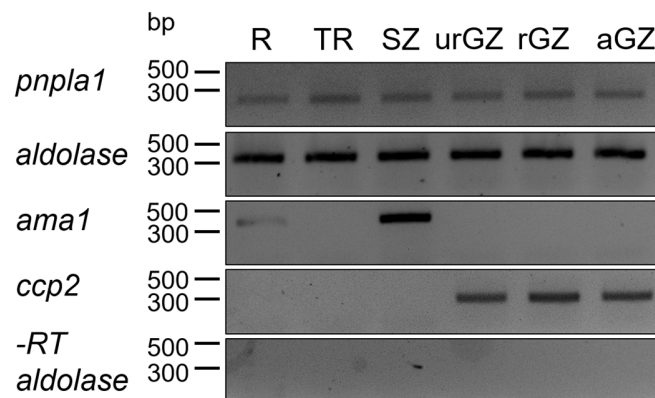


Abbildung 12 Genexpressionsanalyse von *pnpla1* in den Blutstadien von *P. falciparum* mittels semiquantitativer RT-PCR auf cDNA-Ebene. Die Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Die RT-PCR zeigt die *pnpla1*-Transkription (220 bp) in asexuellen Ringstadien (R), in Trophozoiten (TR), in Schizonten (SZ), in unreifen Gametozyten (uGZ; Stadium II-IV), in reifen Gametozyten (rGZ; Stadium V) sowie in aktivierten Gametozyten (aGZ; 15 min nach Aktivierung). Das konstant exprimierte Referenzgen *aldolase* (378 bp) wurde als Ladekontrolle verwendet. Das in asexuellen Blutstadien exprimierte *ama1*-Gen (407 bp) sowie das Gametozyten-spezifische *ccp2*-Gen (286 bp) wurden als Stadien-spezifische Kontrollen verwendet. Eine potenzielle Kontamination der generierten cDNA mit gDNA wurde durch eine -RT (ohne reverse Transkriptase)-Kontrolle und der Amplifikation des *aldolase*-Gens (378 bp) ausgeschlossen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. bp, Basenpaare (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

auszuschließen, wurden zusätzlich für jedes Stadium die RNA-Isolate ohne Zugabe der reversen Transkriptase (-RT) in cDNA umgeschrieben und auf *aldolase*-Transkript hin untersucht. Die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Auftrennung der RT-PCRs sind in Abbildung 12 dargestellt. Für *pnpla1* konnte die Transkription in den Ring- und Trophozoitenstadien als auch in den Schizonten gezeigt werden. Zusätzlich konnten ähnlich hohe Transkriptionslevel durchgängig in

den unreifen (Stadium II-IV), reifen (Stadium V) und aktivierten Gametozyten (15 min nach Aktivierung) detektiert werden. Die parallel angefertigten Kontrollen verifizierten die Stadienspezifische Reinheit der cDNA-Proben (*amal1*, *ccp2*) und dass homogene Mengen cDNA für die Transkriptanalysen verwendet wurden (*aldolase*). Die -RT-Kontrollen (-RT *aldolase*) waren für alle Proben erwartungsgemäß negativ, womit eine Kontamination der cDNA-Proben mit gDNA ausgeschlossen werden konnte.

III.4 Expression von PNPLA1 in den Blut- und Sexualstadien

Im Folgenden sollte die Expression und Lokalisation von PNPLA1 in den Blut- und Sexualstadien mittels IFAs auf Proteinebene untersucht werden. Hierfür wurden zunächst PNPLA1-spezifische Immunsereen in Mäusen generiert. Zur Immunisierung der Mäuse wurden rekombinante MBP-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die für die rekombinanten Proteine verwendeten PNPLA1-Regionen sind in Abbildung 10A graphisch schematisiert. Beide rekombinanten Proteine umfassen Teile der funktionalen Lysophospholipase- und Patatin-ähnlichen Phospholipase-Domänen, wobei die für PNPLA1-RP1 verwendete Proteinregion die AS 498-670 und die für PNPLA1-RP2 verwendete Proteinregion die AS 335-496 umspannt. Die für die entsprechenden Proteinregionen codierenden Bereiche wurden mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pMAL-c5x kloniert. Die Expression der MBP-Fusionsproteine erfolgte in *E. coli* BL21-CodonPlus®-(DE3)-RIL Zellen, gefolgt von einer Affinitätschromatographie aus dem Bakterienlysat unter der Verwendung von Amylose-Resin (vgl. Abschnitt II.4.1).

Zunächst wurden die so hergestellten α -PNPLA1-RP1- und α -PNPLA1-RP2-spezifischen Antiseren in der Western Blot-Analyse auf ihre Funktionalität und Spezifität untersucht. Dafür wurde das in Abschnitt III.16 beschriebene rekombinante PNPLA1-RP3 Volllänge-GST-Fusionsprotein (vgl. Abbildung 10A) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit den jeweiligen Antiseren immundetektiert. Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse sind in Abbildung 13 dargestellt und zeigen, dass sowohl das α -PNPLA1-RP1-spezifische als auch das α -PNPLA1-RP2-spezifische Antiserum das rekombinante PNPLA1-RP3 Protein detektieren, welches auf einer erwarteten Höhe von ~105 kDa migrierte. In beiden Western Blot-Analysen wurden zusätzliche Banden detektiert. Sowohl PNPLA1-RP1 und PNPLA1-RP2 als auch PNPLA1-RP3 wurden rekombinant in *E. coli* Zellen exprimiert. Daher könnten die detektieren Banden auf *E. coli*-

spezifische Proteine oder aber auf Degradierungsprodukte der rekombinanten Proteine zurückzuführen sein.

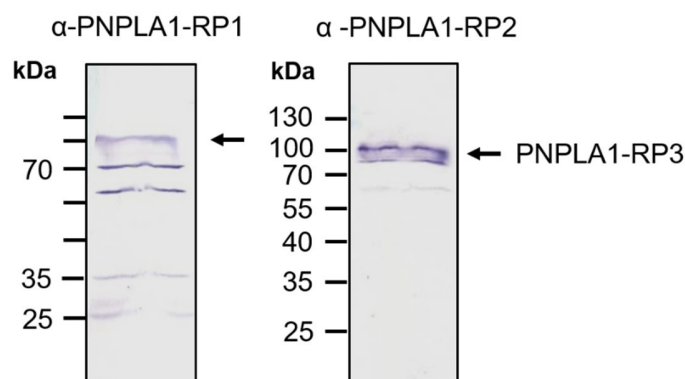


Abbildung 13 Nachweis der Spezifität der α -PNPLA1-RP1 und α -PNPLA1-RP2-spezifischen Antiseren. Das rekombinante Volllängeprotein PNPLA1-RP3 wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit den α -PNPLA1-RP1- und α -PNPLA1-RP2-spezifischen Antiseren immunodetektiert. Das rekombinante PNPLA1-RP3 Protein ist ein GST-Fusionsprotein und migriert auf einer erwarteten Höhe von 105 kDa. Die erwartete Größe ist durch Pfeile gekennzeichnet (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Die Ergebnisse der IFA-Analysen zur Untersuchung der Expression und Lokalisation von PNPLA1 in den Blut- und Sexualstadien von *P. falciparum* sind in Abbildung 14 zusammengefasst. PNPLA1 wurde dabei mit den generierten α -PNPLA1-RP1 bzw. α -PNPLA1-RP2-Antiseren immunmarkiert und ist in grün dargestellt. Die asexuellen Blutstadien wurden mittels Evans Blue (rot) gegengefärbt, während die Sexualstadien mit α -Pfs230-Antiserum zur Detektion des oberflächenständigen und Sexualstadien-spezifischen Proteins Pfs230 immunmarkiert wurden (rot). Die Zellkerne wurden jeweils mit Hoechst33342 (blau) angefärbt. Die Ergebnisse der IFAs bestätigen die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCRs auf Proteinebene und zeigen, dass PNPLA1 sowohl in den asexuellen Blutstadien als auch in den unreifen und reifen Gametozytenstadien exprimiert wird. Auch 15 und 30 min nach Aktivierung der reifen Gametozyten konnte PNPLA1 in den Parasiten detektiert werden. PNPLA1 lag dabei in allen untersuchten Stadien gleichmäßig zytosolisch vor und die PNPLA1-Markierung erstreckte sich jeweils über die gesamte Parasitenzelle. Eine Markierung spezifischer Strukturen, wie z.B. eine Membran-ständige oder granuläre Lokalisation wurde nicht beobachtet.

Als Negativkontrollen wurden zudem parallel IFAs durchgeführt, in denen anstelle der α -PNPLA1-spezifischen Primärantiseren das Serum nicht-immunisierter Mäuse (NMS, *neutral mouse serum*) zur Immundetektion verwendet wurde. Die NMS-Kontrollen zeigten dabei wie erwartet keine Markierung für PNPLA1, wodurch eine unspezifische Immundetektion ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 14C).

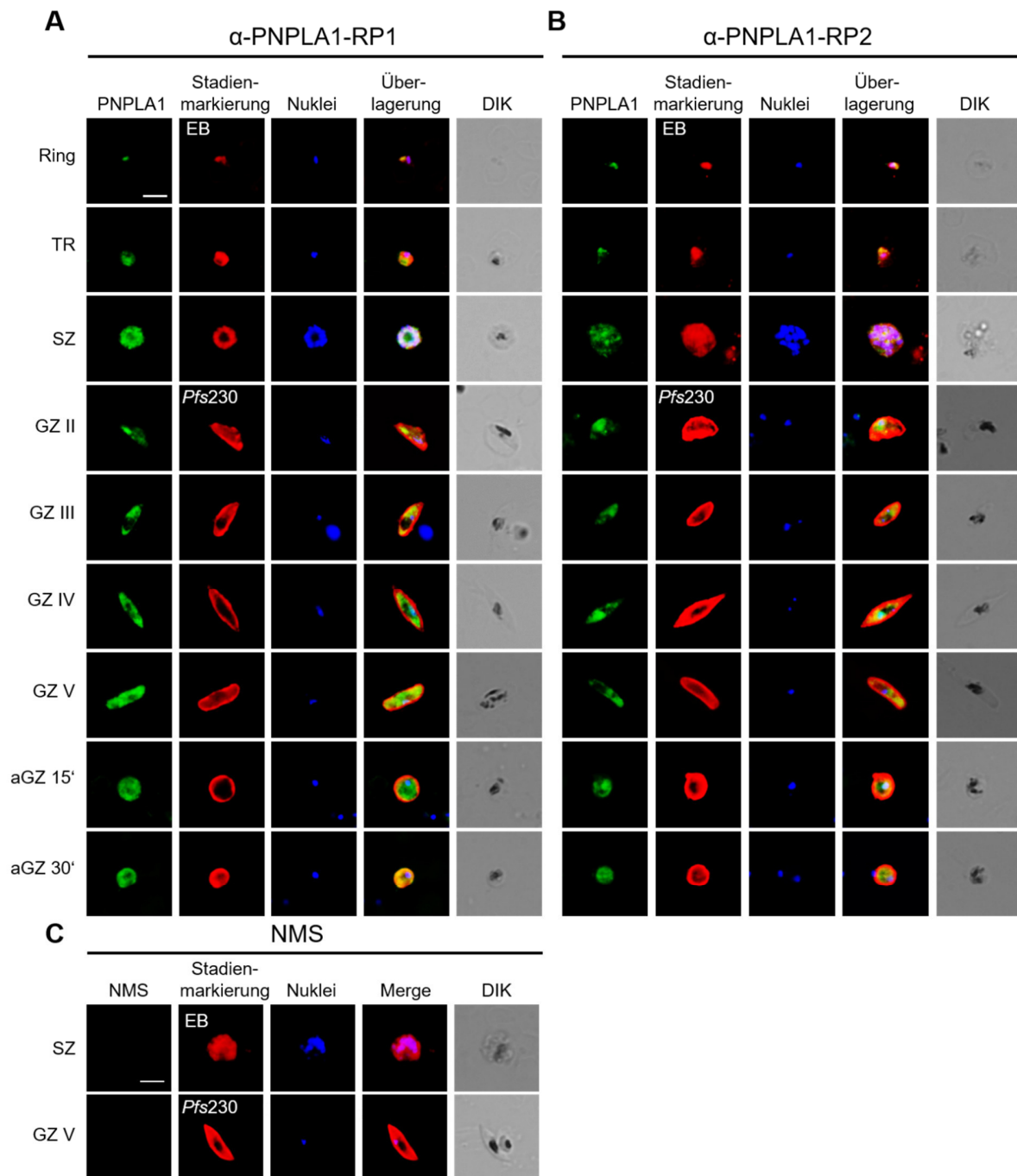


Abbildung 14 Expressionsanalyse von PNPLA1 in den Blut- und Sexualstadien der WT NF54 Linie mittels IFA. Nachweis der PNPLA1-Expression in Ringstadien, Trophozoiten (TR), Schizonten (SZ), in den Gametozytenstadien II-V (GZ II-V) sowie in aktivierten Gametozyten (aGZ) 15 und 30 min nach Aktivierung. PNPLA1 wurde mittels α -PNPLA1-RP1- (A) bzw. α -PNPLA1-RP2-Antiserum (B) immunmarkiert (grün). Die asexuellen Blutstadien wurden mit Hilfe von Evans Blue (EB) gegengefärbt, die Gametozyten wurden mittels α -*Pfs230*-Antiserum zur Detektion des Sexualstadien-spezifischen *Pfs230*-Proteins immunmarkiert (rot). Die Nuklei wurden mit Hoechst33342 visualisiert (blau). (C) Als Negativkontrolle zu den IFAs wurden die Parasiten mit dem Serum nicht-immunisierter Mäuse (NMS, *neutral mouse serum*) immunmarkiert. Gezeigt ist exemplarisch ein Schizont (SZ) sowie ein Stadium V-Gametozyt (GZ V). Der Größenmaßstab beträgt 5 μ m. Die Ergebnisse in (A) bis (C) sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. DIK, Differentialinterferenzkontrast (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019). Die IFAs wurden in Zusammenarbeit mit Atscharah Panyot, im Rahmen ihrer während dieser Arbeit betreuten Masterarbeit, durchgeführt; Eigenanteil: 50%.

Im Weiteren wurde eine potenzielle geschlechtsspezifische Expression von PNPLA1 untersucht. Der Parasit *P. falciparum* bildet männliche und weibliche Gametozyten nicht in einem gleichmäßigen 1:1 Verhältnis, sondern in einem durchschnittlichen Verhältnis von 1:4 (Talman *et al.*, 2004). Zur Untersuchung der geschlechtsabhängigen PNPLA1-Expression in Gametozyten wurden IFAs mit α -PNPLA1-RP1-spezifischem Antiserum durchgeführt. Die Gametozyten wurden gleichzeitig zum einen mit dem geschlechtsunabhängigem, α -*Pfs230*-spezifischem Antiserum (zusammengefasst in Williamson, 2003) oder mit dem geschlechtsspezifischem, α -*Pfs25*-spezifischem Antiserum immunmarkiert (zusammengefasst in Pradel, 2007).

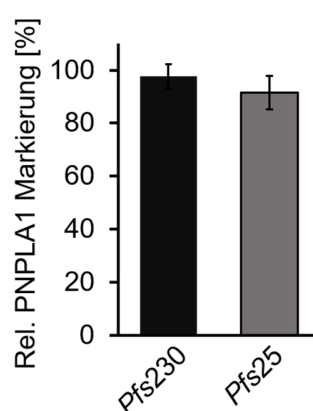
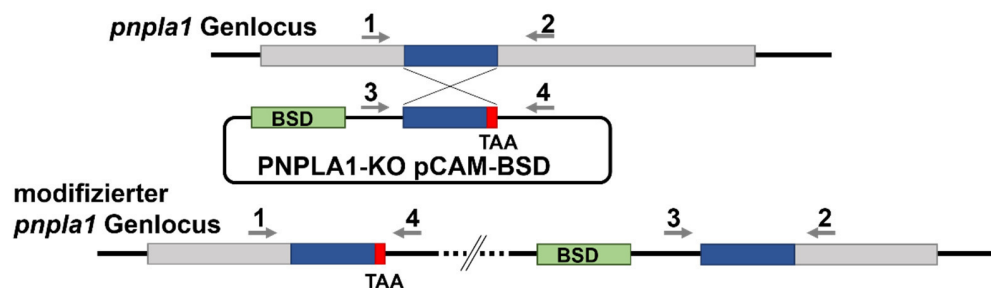


Abbildung 15 Bestimmung der geschlechtsspezifischen Expression von PNPLA1 in den Gametozyten des WT NF54. Gametozyten der WT NF54 Linie wurden entweder geschlechterunabhängig mittels *Pfs230*-spezifischem Antiserum (Markierung männlicher und weiblicher Gametozyten) oder geschlechtsabhängig mittels *Pfs25*-spezifischem Antiserum (Markierung ausschließlich weiblicher Gametozyten) visualisiert. Zur Untersuchung einer potenziellen geschlechtsspezifischen Expression wurde PNPLA1 mit α -PNPLA1-RP1-Antiserum immunmarkiert. Die relative PNPLA1-Markierung wurde in *Pfs230*- bzw. *Pfs25*-positiven Gametozyten quantifiziert. Zur Quantifizierung wurden jeweils 100 Gametozyten ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Das *Pfs25*-Protein wird ausschließlich als Oberflächenprotein in weiblichen Gametozyten gebildet, nicht jedoch in den männlichen Gametozyten. Zur Analyse wurde in drei unabhängigen Experimenten die PNPLA1-Markierung geschlechterabhängig und -unabhängig quantifiziert. Würde eine geschlechtsspezifische Expression in weiblichen Gametozyten vorliegen, sollte bei den *Pfs25*-positiven weiblichen Gametozyten eine nahezu 100%ige gleichzeitige Immunmarkierung für PNPLA1 vorliegen, während bei der geschlechtsunabhängigen Markierung mit dem α -*Pfs230*-spezifischem Antiserum aufgrund des durchschnittlichen Geschlechterverhältnisses von 1:4 (männlich zu weiblich) lediglich ~80% eine gleichzeitige Immunmarkierung für PNPLA1 aufweisen sollten. Würde eine geschlechtsspezifische Expression in männlichen Gametozyten vorliegen, sollte bei den *Pfs25*-positiven Gametozyten keine gleichzeitige Markierung für PNPLA1 vorliegen. Die Quantifizierung drei unabhängiger Experimente ergab, dass PNPLA1 in

Die funktionale Charakterisierung von PNPLA1 sollte durch die phänotypische Charakterisierung von PNPLA1-defizienten Parasiten erfolgen. Daher wurde zunächst eine PNPLA1-*Knock-out*-Mutante (KO) generiert, in der der Leserahmen für das *pnplal* Gen mit Hilfe des pCAM-BSD-KO-Vektors unterbrochen wird. Der pCAM-BSD-KO Vektor enthält ein Blasticidin-S-Deaminase-codierendes Gen, welches eine Resistenz gegenüber Blasticidin vermittelt und zur Selektion erfolgreich transfizierter Parasiten dient (vgl. Abschnitt II.1.7). Der Vektor integriert über das Einbringen einer homologen Sequenz mittels Einzelstrangüberlagerung (*single cross-over recombination*) in das Genom von *P. falciparum*. Durch das Einfügen eines Stopcodons in das Leseraster der Zielsequenz kommt es zum Funktionsverlust des Genlocus, da lediglich ein N-terminaler Stumpf des Zielproteins translatiert wird (Sidhu *et al.*, 2005; Dorin-Semblat *et al.*, 2007; Solyakov *et al.*, 2011; Wirth *et al.*, 2014, 2015). Zur Generierung der PNPLA1-KO Linie wurde ein homologer Bereich gewählt, welcher in der 5'-Region des codierenden Gens liegt und welcher für einen nicht funktionalen Bereich des PNPLA1-Gens codiert (Abbildung 16).



Im Anschluss an die Klonierung des *pnpl1*-Genfragments in den pCAM-BSD-KO Vektor wurden asexuelle Blutstadien von *P. falciparum* Abschnitt II.2.1.4 entsprechend mit dem Vektorkonstrukt transfiziert und zur Selektion erfolgreicher Transfektanten in BSD-Zellkulturmedium kultiviert.

Nach erfolgreicher Integration wurden die Einzelklone PNPLA1-KO A12 und C11 durch Monoklonalisierung (Abschnitt II.2.1.5) isoliert und die Unterbrechung des *pnpla1*-Genlocus sowie die Abwesenheit wildtypischer *pnpla1*-DNA durch diagnostische PCRs verifiziert. Für die diagnostischen PCRs wurden die in Abbildung 16 dargestellten Oligonukleotid-Kombinationen verwendet, als Negativkontrolle diente DNA des parentalen WT NF54 als Matrize. Die Reaktionsprodukte der diagnostischen PCR wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und sind in Abbildung 17 dargestellt. Sowohl für die PNPLA1-KO A12 Linie als auch für die PNPLA1-KO C11 Linie konnte eine vollständige 5'- und 3'-Integration des Vektors bei gleichzeitiger Abwesenheit des wildtypischen Genlocus gezeigt werden, während in der parentalen WT NF54 Negativkontrolle lediglich der wildtypische *pnpla1*-Locus detektiert wurde. Zusätzlich zur 5'- und 3'-Integration konnte in den PNPLA1-KO Zelllinien A12 und C11 die nicht-integrierte episomale Plasmid-DNA nachgewiesen werden. Zur weiteren Überprüfung der Integration wurden jeweils der 5'- und der 3'-Integrationslocus mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte sequenziert (vgl. Abbildung 61).

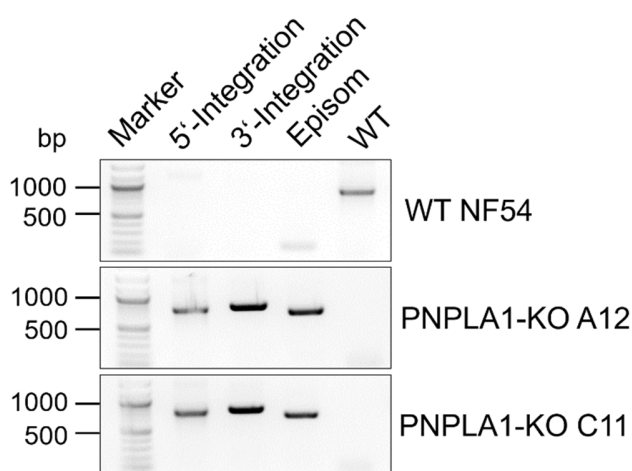


Abbildung 17 Diagnostische PCR zum Nachweis der Vektorintegration des pCAM-BSK-KO Vektors in den PNPLA1-KO Linien A12 und C11. Als Matrize wurde gDNA der PNPLA1-KO Linien A12 und C11 sowie als Negativkontrolle der parentalen WT NF54 Linie verwendet. Die Oligonukleotide 1 und 4 sowie 2 und 3 (vgl. Abbildung 16) wurden zum Nachweis der 5'-Integration (773 bp) bzw. 3'-Integration (833 bp) verwendet. Das episomale Plasmid wurde mit den Oligonukleotiden 3 und 4 (712 bp) nachgewiesen, der wildtypische *pnpla1* Genlocus wurde mit den Oligonukleotiden 1 und 2 (881 bp) amplifiziert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Die fehlende Expression des PNPLA1-Proteins in den KO-Parasitenlinien wurde im Weiteren durch IFA- und Western Blot-Analysen verifiziert. Für die IFAs wurden Schizonten der parentalen WT NF54 Linie sowie Schizonten der PNPLA1-KO Linien A12 und C11, wie in Abschnitt II.2.1.14 beschrieben, auf Objektträgern fixiert, mit PNPLA1-spezifischen Antiserum, in diesem Fall α -PNPLA1-RP1, immunmarkiert und analog zu den beschriebenen Experimenten

gegengefärbt. Während PNPLA1 in den Schizonten der parentalen WT NF54 Linie wie zuvor beschrieben gleichmäßig im Zytoplasma lokalisierte, konnte in den Schizonten der PNPLA1-KO Linien A12 und C11 keine Markierung für PNPLA1 detektiert werden (Abbildung 18A). Für die Western Blot-Analyse wurden Lysate gemischter asexueller Blutstadien der parentalen WT NF54 Linie und der PNPLA1-KO Linien A12 und C11 per SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, um anschließend PNPLA1 mit α -PNPLA1-RP1 Antiserum zu detektieren. PNPLA1 konnte lediglich in dem Lysat der NF54 Wildtyp-Zelllinie immundetektieren, während in den Lysaten der PNPLA1-KO A12 und C11 Linien keine PNPLA1-spezifische Bande nachgewiesen werden konnte (Abbildung 18B). Als Ladekontrollen sowie zur Überprüfung der Integrität der verwendeten Lysate diente das konstant exprimierte ER-assoziierte Protein *Pf39* als Referenz, welches mittels α -*Pf39*-Antiserum auf eine Höhe von ~39 kDa detektiert wurde.

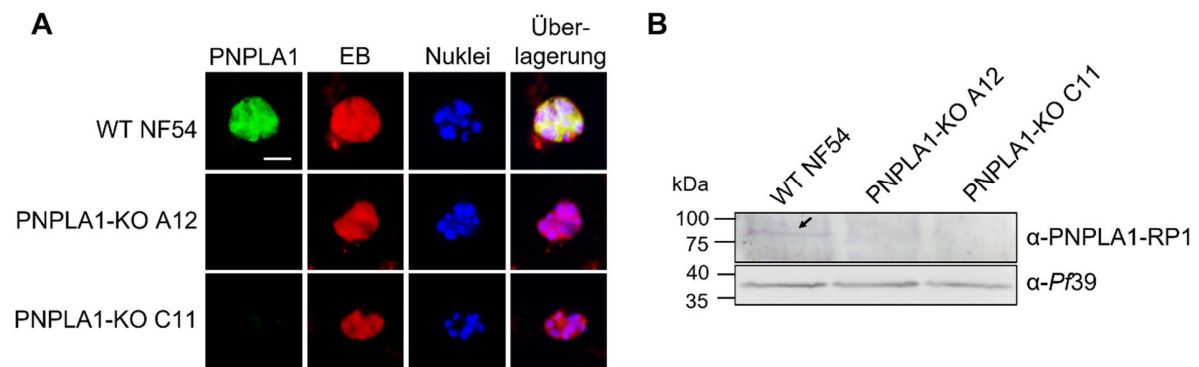


Abbildung 18 Verifizierung der PNPLA1-KO Linien mittels IFA und Western Blot-Analyse. (A) Die IFAs zeigen die PNPLA1-Expression in Schizonten der parentalen WT NF54 Linie sowie in Schizonten der PNPLA1-KO Linien A12 und C11. PNPLA1 wurde mittels α -PNPLA1-RP1-Antiserum immunmarkiert (grün). Die Schizonten wurden mit Hilfe von Evans Blue (EB) gegengefärbt (rot). Die Nuklei wurden mit Hoechst33342 visualisiert (blau). Der Maßstab beträgt 5 µm. (B) Die Western Blot-Analyse zeigt die Expression von PNPLA1 (~78 kDa) in asexuellen Blutstadien der parentalen WT NF54 Linie sowie in asexuellen Blutstadien der PNPLA1-KO Linien A12 und C11. PNPLA1 wurde mittels α -PNPLA1-RP1-Antiserum detektiert. Das konstant exprimierte ER-assoziierte Protein *Pf39* wurde als Referenzprotein mit spezifischem α -*Pf39*-Antiserum detektiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Ergebnisse (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Die Ergebnisse bestätigten zusammenfassend die erfolgreiche Generierung der PNPLA1-KO Zelllinien und dass in den A12 und C11-Isolaten keine Kontaminationen durch parentale WT NF54-Parasiten vorlagen.

III.6 Generierung einer PNPLA1-Knock-down-Mutante

Im Gegensatz zu dauerhaften Gen-Knock-out-Mutanten wird bei Knock-down-Mutanten die Proteinexpression nur vorübergehend durch die Zugabe eines Induktors herunterreguliert. Dies erlaubt zum einen das gezielte Herunterregulieren der Proteinexpression als auch die Charakterisierung essenzieller Gene, die nicht durch einen Knock-out ausgeschaltet werden

können. Die Generierung einer transienten PNPLA1-Knock-down-Mutante (PNPLA1-KD) erfolgte mit Hilfe des GlcN-Riboswitch-Systems (*glmS*), das auf einer Metabolit-abhängigen katalytisch aktiven RNA basiert. Die Herunterregulierung der Proteinexpression findet somit auf mRNA-Ebene statt. Dabei wird die für das *glmS*-Ribozym codierende DNA-Sequenz so in die 3'UTR des Zielgens eingebracht, dass bei der Transkription des Zielgens chimäre RNA gebildet wird, welches aus der codierenden RNA und dem Ribozym besteht. Wird der Induktor GlcN hinzugegeben, bindet dieser an das Ribozym. Durch die damit verbundene Konformationsänderung wird dieses aktiviert und spaltet in Folge dessen die mRNA katalytisch. Dies führt zum Verlust des Poly(A)-Schwanzes und das mRNA-Transkript degradiert aufgrund der verminderten Stabilität. Der Verlust der mRNA führt in Folge somit auch zur Herunterregulierung des durch das Zielgen codierten Proteins (Prommana *et al.*, 2013). Die PNPLA1-KD Mutante wurde mit Hilfe des pARL-HA-*glmS* Vektors generiert. Dieser enthält ein *hDHFR*-codierendes Gen (humane Dihydrofolatreduktase), welches eine Resistenz gegenüber der Chemikalie WR99210 vermittelt. Der Vektor integriert wie der zuvor beschriebene pCAM-BSD-KO Vektor mittels Einzelstrangüberlagerung in das Genom von *P. falciparum* (Abbildung 19). Hierfür wurde die 3'-Region des Zielgens in den Vektor kloniert. Hinter dem Gen befindet sich zusätzlich zur *glmS*-Ribozym-Sequenz eine Sequenz, die für einen dreifachen HA-Affinitätstag codiert. Dadurch entsteht nach der Integration des Vektorkonstrukts in den *pnpla1* Genlocus ein Fusionsgen, das für ein PNPLA1-HA Fusionsprotein codiert.

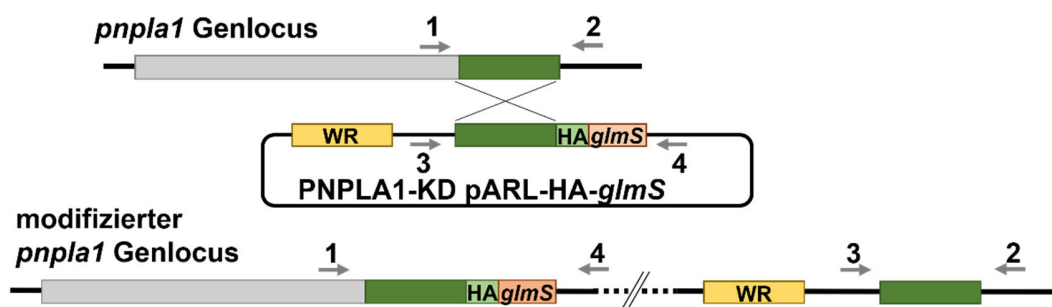


Abbildung 19 Schematische Darstellung der Integration des pARL-HA-*glmS* Vektors in das Genom von *P. falciparum* durch Einzelstrangüberlagerung. Das Schema stellt die Strategie zur Generierung einer PNPLA1-KD Mutante durch homologe Rekombination dar. Zur Selektion erfolgreich transfizierter Parasiten codiert der Vektor für die humane Dihydrofolatreduktase, die eine Resistenz gegenüber WR92210 vermittelt (gelb). Nach der Rekombination der homologen Bereiche in der 3'-Region des Zielgens (dunkel grün), wird das Zielgen mit einer Sequenz für einen HA-Affinitätstag (hell grün) sowie einer *glmS*-Ribozym-Sequenz (orange) markiert. Bei der Expression des Zielgens entsteht somit eine chimäre RNA. Das Ribozym in der 3'UTR kann durch den Induktor D-(+)-Glucosamin Hydrochlorid (GlcN) induziert werden und katalysiert die Degradierung der RNA (modifiziert nach Prommana *et al.*, 2013). Die nummerierten Pfeile markieren die Positionen der Oligonukleotide, die zum Plasmidnachweis sowie zur Verifizierung der Vektorintegration verwendet wurden (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Die 3'-Regionen wurden erfolgreich in den pARL-HA-*glmS* Vektor kloniert und asexuelle *P. falciparum* Kulturen, wie in Abschnitt II.2.1.4 beschrieben, mit den fertigen Vektorkonstrukten transfiziert. Die Selektion der Transfektanten erfolgte in WR99210-Zellkulturmedium. Die Vektorintegration wurde mittels diagnostischer PCR mit den in Abbildung 19 dargestellten Oligonukleotid-Kombinationen verifiziert. Als Negativkontrolle wurde gDNA der parentalen WT NF54 Linie verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung der diagnostischen PCRs ist in Abbildung 20A dargestellt und zeigt eine vollständige 5'- und 3'-Integration des PNPLA1-pARL-HA-*glmS*-Vektors, während der wildtypische *pnpla1*-Genlocus in der PNPLA1-KD Zelllinie nicht detektiert werden konnte. Zusätzlich zur 5'- und 3'-Integration konnte die nicht-integrierte episomale Plasmid-DNA nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle, bei der gDNA des parentalen WT NF54 als Matrize verwendet wurde, zeigte wie erwartet keine Integration, sondern es konnte lediglich der wildtypische *pnpla1* Genlocus detektiert werden. Zur weiteren Überprüfung der Integration wurden jeweils der 5'- und der 3'-Integrationslocus mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte sequenziert (vgl. Abbildung 62).

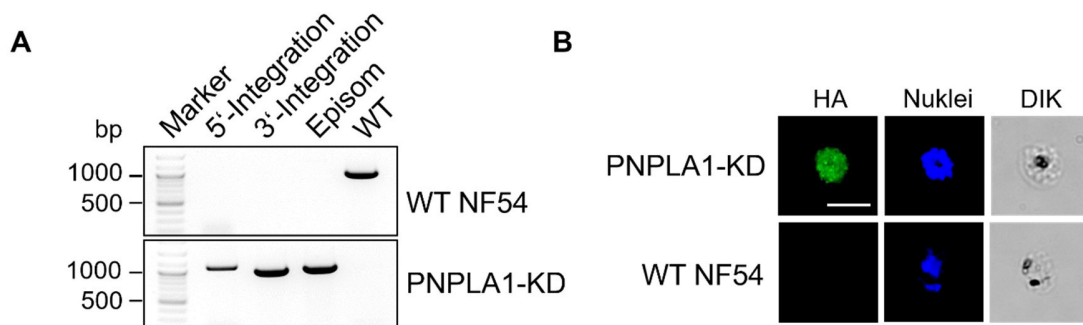


Abbildung 20 Diagnostische PCR zum Nachweis der Vektorintegration des pARL-HA-*glmS* Vektors in der PNPLA1-KD Linie sowie Nachweis der PNPLA1-HA Fusionsprotein-Expression mittels IFA. (A) Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der diagnostischen PCR. Als Matrize wurde gDNA der PNPLA1-KD Linie verwendet. Die gDNA der parentalen WT NF54 Linie diente als Negativkontrolle. Die Oligonukleotide 1 und 4 sowie 2 und 3 (vgl. Abbildung 19) wurden zum Nachweis der 5'-Integration (1124 bp) bzw. 3'-Integration (1019 bp) verwendet. Das episomale Plasmid wurde mit den Oligonukleotiden 3 und 4 (1079 bp) nachgewiesen, der wildtypische *pnpla1* Genlocus wurde mit den Oligonukleotiden 1 und 2 (1062 bp) amplifiziert. **(B)** Die IFAs zeigen die PNPLA1-HA Expression in Schizonten der parentalen WT NF54 Linie sowie in Schizonten der unbehandelten PNPLA1-KD Linie. PNPLA1-HA wurde mittels α -HA-Antiserum immunmarkiert (grün). Die Nuklei wurden mit Hoechst33342 visualisiert (blau). Der Maßstab beträgt 5 µm. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Die korrekte Integration des pARL-HA-*glmS*-Vektorkonstrukts in den *pnpla1*-Genlocus wurde im Weiteren mittels IFA bestätigt. Für die IFAs wurden Schizonten der PNPLA1-KD Zelllinie sowie der parentalen WT NF54 Linie auf Objektträgern fixiert, mit α -HA-spezifischem Antikörper immunmarkiert und die Zellkerne analog zu den vorherigen Experimenten mit Hoechst33342 visualisiert. In der unbehandelten PNPLA1-KD Zelllinie konnte das PNPLA1-HA-Fusionsprotein

mit einer zytoplasmatischen Lokalisation detektiert werden, während die Schizonten der parentalen WT NF54 Zelllinie keine HA-spezifische Markierung aufwiesen (Abbildung 20B).

Um die konditionelle Herunterregulierung der PNPLA1-Expression zu verifizieren, wurden asexuelle Kulturen der PNPLA1-KD Linie mit dem *glmS*-Ribozym-Induktor GlcN mit einer finalen Konzentration von 2,5 mM für 36 h behandelt und mit unbehandelten Kulturen verglichen. Die Lysate der asexuellen Kulturen wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das PNPLA1-HA Fusionsprotein mit α -HA-spezifischen Antikörpern im Western Blot immunodetektiert. Als Referenzprotein wurde das ER-assoziierte Protein *Pf39* durch *Pf39*-spezifisches Antiserum nachgewiesen (Abbildung 21A).

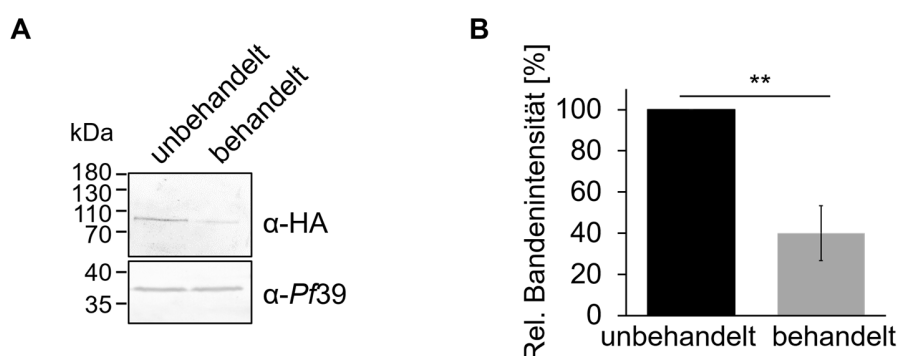


Abbildung 21 Western Blot-Analyse zum Nachweis der konditionellen Herunterregulierung der PNPLA1-Expression in der PNPLA1-KD Linie. (A) Die Western Blot-Analyse zeigt die Expression des PNPLA1-HA Fusionsprotein (~82,2 kDa) in asexuellen Blutstadien der unbehandelten PNPLA1-KD Kultur sowie in der parallel für 36 h mit 2,5 mM GlcN behandelten PNPLA1-KD Kultur im Vergleich zum konstant exprimierten Referenzprotein *Pf39*. PNPLA1-HA wurde mit Kaninchen α -HA Antiserum detektiert. Maus α -*Pf39*-Antiserum wurde zur Detektion des Referenzproteins *Pf39* verwendet. Die Western Blot-Analyse ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (B) Quantifizierung der Western Blot-Analysen. Die Intensitäten der PNPLA1-HA-spezifischen Banden wurden mittels *ImageJ* quantifiziert und auf die Intensitäten der *Pf39*-spezifischen Banden normiert. Die Bandenintensität der unbehandelten PNPLA1-KD Kultur wurde gleich 100% gesetzt und die Bandenintensität der mit 2,5 mM GlcN behandelten PNPLA1-KD Kultur wurde in Relation zur unbehandelten PNPLA1-KD Kultur angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Western Blot-Analysen. $**\leq 0,01$ (Student's t-test, modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

In dem Lysat der unbehandelten PNPLA1-KD Kultur konnte im Vergleich zur behandelten PNPLA1-Kultur (2,5 mM GlcN) eine wesentlich intensivere Bande für das PNPLA1-HA Fusionsprotein mit einer ungefähren Größe von 82,2 kDa detektiert werden, während die Banden für das *Pf39*-Referenzprotein eine ähnliche Bandenintensität aufwiesen (Abbildung 21A). Um die Unterschiede in der PNPLA1-Expression zwischen den mit 2,5 mM GlcN behandelten und unbehandelten Kulturen genauer zu quantifizieren, wurden die PNPLA1-HA spezifischen Bandenintensitäten mit Hilfe des Programms *ImageJ* gemessen und mit den jeweiligen *Pf39*-spezifischen Bandenintensitäten normalisiert. Die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten zeigte zusammenfassend, dass die Behandlung der PNPLA1-KD Linie mit 2,5 mM

GlcN zu einer signifikanten Reduktion der PNPLA1-Proteinexpression auf einen Wert von $40,0 \pm 13,41\%$ im Vergleich zu den unbehandelten PNPLA1-KD Kulturen führte (Abbildung 21B).

III.6.1 Expressionsanalyse von PNPLA1-HA in der PNPLA1-KD Linie

Die bisherigen Analysen haben gezeigt, dass PNPLA1 in allen untersuchten Stadien intrazellulär im Zytosol lokalisiert. In einem ersten Schritt sollte der HA-Affinitätstag, mit dem das endogene PNPLA1 in der PNPLA1-KD Linie markiert wurde, dazu verwendet werden, die Ergebnisse der RT-PCR Transkriptionsanalysen (vgl. Abschnitt III.3) sowie der bisherigen IFA-Expressionsanalysen (vgl. Abschnitt III.4) mittels weitergehender IFAs und Western Blot-Analysen unter Verwendung eines α -HA-spezifischen Antiserums zu verifizieren.

Die Ergebnisse der PNPLA1-HA Expressionsanalyse in der PNPLA1-KD Linie mittels IFA sind in Abbildung 22A dargestellt. Dabei wurde PNPLA1-HA mit Hilfe eines α -HA-spezifischen Antiserums immunmarkiert und ist in grün dargestellt. Die asexuellen Blutstadien wurden wie zuvor mittels Evans Blue gegengefärbt, während die Sexualstadien mit α -*Pfs230*-Antiserum zur Detektion des oberflächenständigen und Sexualstadien-spezifischen Proteins *Pfs230* immunmarkiert wurden (rot). Die Zellkerne wurden jeweils mit Hoechst33342 visualisiert und sind in blau dargestellt. Die IFAs zeigten, dass PNPLA1-HA durchgehend in den asexuellen Blut- und sexuellen Gametozytenstadien exprimiert wird und dabei im Zytosol lokalisiert. Auch in Gametozyten 30 min nach Aktivierung konnte PNPLA1-HA in den Parasiten detektiert werden. Um eine unspezifische Markierung auszuschließen, wurden zudem IFAs mit der parentalen WT NF54 Linie anstelle der PNPLA1-KD Kultur durchgeführt. In der WT NF54 Linie konnte erwartungsgemäß keine PNPLA1-HA spezifische Markierung detektiert werden (Abbildung 22B).

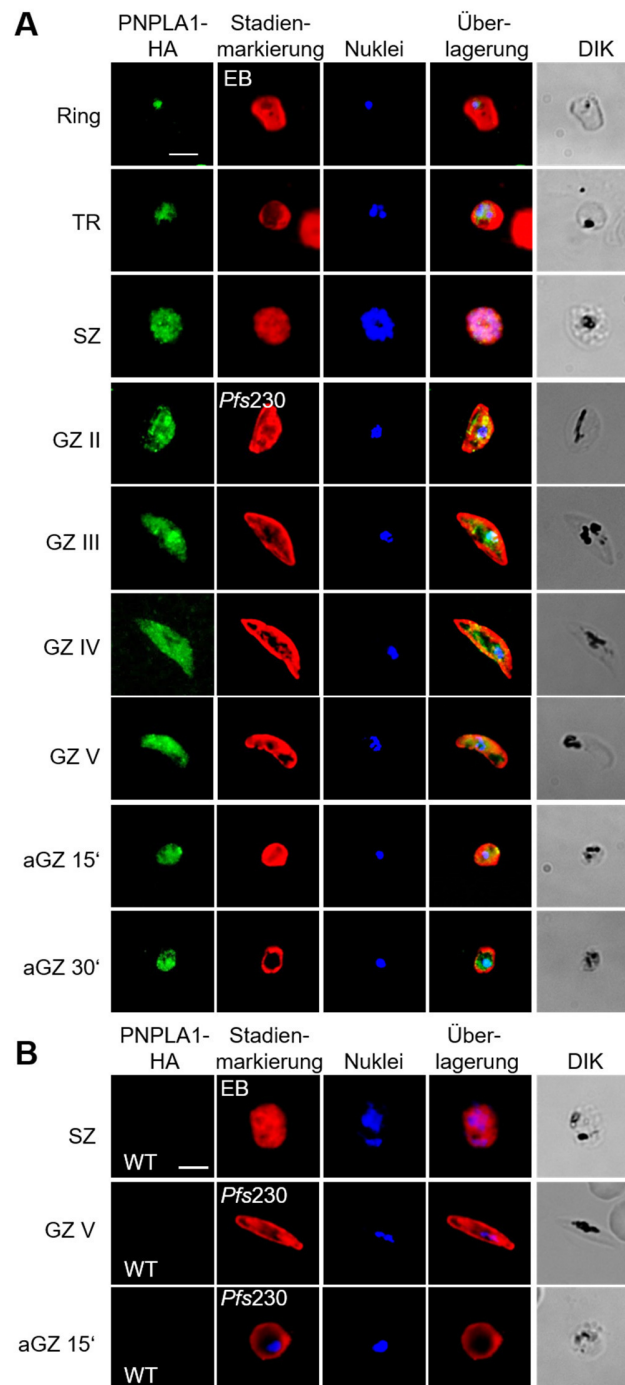


Abbildung 22 Expressionsanalyse von PNPLA1-HA in den Blut- und Sexualstadien der PNPLA1-KD Linie mittels IFA. (A) Nachweis der PNPLA1-HA Expression in Ringstadien, Trophozoiten (TR), Schizonten (SZ), in den Gametozytenstadien II-V (GZ II-V) sowie in aktivierten Gametozyten (aGZ) 15 und 30 min nach Aktivierung. PNPLA1-HA wurde mittels α -HA-spezifischem Antiserum immunmarkiert (grün). Die asexuellen Blutstadien wurden mit Hilfe von Evans Blue (EB) gegengefärbt, die Gametozyten wurden mittels α -*Pfs230*-Antiserum zur Detektion des Sexualstadien-spezifischen *Pfs230*-Proteins immunmarkiert (rot). Die Nuklei wurden mit Hoechst33342 visualisiert (blau). **(B)** Parasiten der parentalen WT NF54 Linie wurden als Negativkontrolle verwendet. Der Maßstab beträgt 5 μ m. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Ergebnisse. DIK, Differentialinterferenzkontrast (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019). Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Atscharah Panyot, im Rahmen ihrer während dieser Arbeit betreuten Masterarbeit, generiert; Eigenanteil: 50%.

Für die Expressionsanalyse mittels Western Blot-Analyse wurden Lysate von asexuellen Ring- und Trophozoitenstadien, von Schizonten, sowie von unreifen (Stadium II-IV), reifen (Stadium V) und aktivierten Gametozyten (30 min nach Aktivierung) der PNPLA1-KD Linie mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Fusionsprotein PNPLA1-HA mit Hilfe eines α -HA-spezifischem Antiserums detektiert. Lysate gemischter asexueller Blutstadien der parentalen WT NF54 Linie und Lysate nicht-infizierter Erythrozyten wurden hierbei als Negativkontrolle verwendet. Als Referenzprotein wurde das konstant exprimierte ER-assoziierte *Pf39*-Protein durch *Pf39*-spezifisches Antiserum nachgewiesen. Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse sind in Abbildung 23 dargestellt. Das PNPLA1-HA Fusionsprotein konnte durchgehend in den Lysaten der asexuellen und sexuellen Blutstadien bei einer erwarteten Größe von 82,2 kDa detektiert werden. Das PNPLA1-HA Fusionsprotein wurde dabei auch noch 30 min nach Aktivierung reifer Gametozyten in den Parasitenlysaten nachgewiesen. Hingegen konnte in den Lysaten nicht-infizierter Erythrozyten und der parentalen WT NF54 Linie keine PNPLA1-HA-spezifische Bande detektiert werden. Durch den Nachweis des konstant exprimierten Referenzproteins *Pf39* mit einer erwarteten molekularen Größe von ~39 kDa wurde die Integrität der verwendeten Lysate und die äquikonstante Beladung des Gels bestätigt.

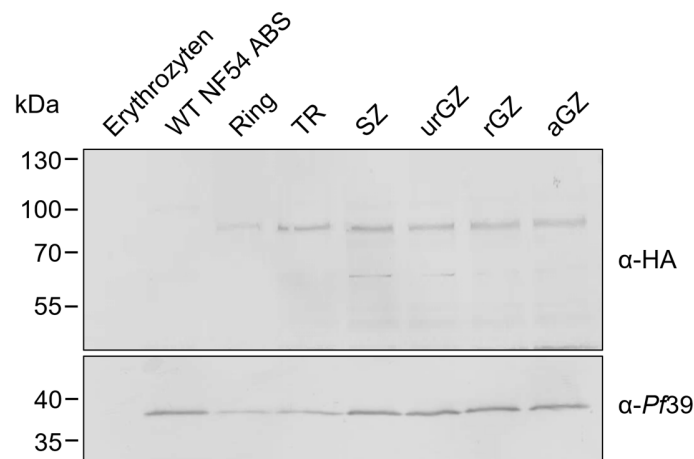


Abbildung 23 Expressionsanalyse von PNPLA1-HA in den Blut- und Sexualstadien der PNPLA1-KD mittels Western Blot-Analyse. Die Western Blot-Analyse zeigt die Expression des PNPLA1-HA Fusionsprotein (~82,2 kDa) in den Ringstadien, in Trophozoiten (TR), in Schizonten (SZ) sowie in unreifen Gametozyten (urGZ, Stadium II-IV), reifen (rGZ, Stadium V) und aktivierten Gametozyten (aGZ, 30 min nach Aktivierung) im Vergleich zum konstant exprimierten ER-assoziierten Protein *Pf39* (~39 kDa). PNPLA1-HA wurde mit Kaninchen α -HA-Antiserum und *Pf39* mit α -*Pf39*-Antiserum detektiert. Nicht-infizierte Erythrozyten und gemischte asexuelle Blutstadien (ABS) der parentalen WT NF54 Linie wurden als Negativkontrollen verwendet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Um die in den IFAs beobachtete zytoplasmische Lokalisation im Weiteren zu verifizieren, wurde die Lokalisation des PNPLA1-HA-Fusionsproteins durch Proteinfractionierung nach Grüning *et al.*

(2012) analysiert (vgl. Abschnitt II.4.6). Dabei werden die Proteine eines Zelllysats aufgrund ihrer proteinbiochemischen Eigenschaften und der damit verbundenen Löslichkeit in verschiedenen Puffern in unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt. Zur Proteinfractionierung wurden synchronisierte Schizonten der PNLA1-KD Zelllinie mittels Percoll®-Gradient angereichert, die Parasiten von den umgebenen Wirtszellmembranen mittels Saponin-Lyse befreit und die verschiedenen Proteine aufeinander folgend als lösliche Proteinfraction (Tris-HCl), als periphere Proteinfraction (Na_2CO_3), als integrale Proteinfraction (TX-100) und final als unlösliche Proteinfraction (Pellet) extrahiert. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen sind in Abbildung 24 dargestellt. Das Fusionsprotein PNPLA1-HA wurde dabei mit Hilfe des α -HA-spezifischen Antiserums ausschließlich in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen. Als Kontrollen für die Reinheit der unterschiedlichen Fraktionen wurden die vorwiegend im Zytosol vorliegende Protease Falcilysin (Weißbach *et al.*, 2017), das Zytoskelettelement AktinI (Baum *et al.*, 2008; Ngwa *et al.*, 2013), das ER-assoziierte Protein Pf39 (Templeton *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 2009), das mit Heterochromatin assoziierte nukleare Protein Heterochromatin-Protein 1 HP1 (Flueck *et al.*, 2009; Brancucci *et al.*, 2014) sowie das Transmembranprotein AMA1 (Peterson *et al.*, 1989; Boes *et al.*, 2015) verwendet. Das zytosolisch-exprimierte Falcilysin wurde wie erwartet vorwiegend in der löslichen Fraktion (Tris-HCl) auf einer Höhe von ~138 kDa detektiert, während das ER-assoziierte Pf39-Protein vorwiegend sowohl in der zytosolischen als auch peripheren Fraktion (Na_2CO_3) auf einer Höhe von ~39 kDa nachgewiesen wurde. Das im Nukleus lokalisierte Protein HP1 wurde erwartungsgemäß nicht in der zytosolischen, jedoch vorwiegend in der peripheren und unlöslichen Fraktion detektiert. Das Transmembranprotein AMA1 wurde erwartungsgemäß als Doppelbande mit einer molekularen Masse von ~66 kDa und ~88 kDa vorwiegend in der integralen Proteinfraction (TX-100) detektiert, während das Zytoskelettelement AktinI in allen, jedoch vorwiegend in den zytosolischen und unlöslichen Fraktionen auf einer Höhe von ~42 kDa nachgewiesen wurde. Das Strukturprotein AktinI kann als Zytoskelettelement sowohl als monomäres, globuläres Aktin, als auch als unlösliches, polymerisiertes Zytoskelettfilament vorliegen, weshalb die Detektion dieses Proteins in allen Fraktionen zu erwarten ist (Hliscs *et al.*, 2015).

Insgesamt deuten die Daten der IFAs, der Western Blot-Analysen sowie der zellulären Fraktionierung darauf hin, dass PNPLA1-HA in allen asexuellen und sexuellen Blutstadien exprimiert wird und dabei eine zytosolische Lokalisation aufweist.

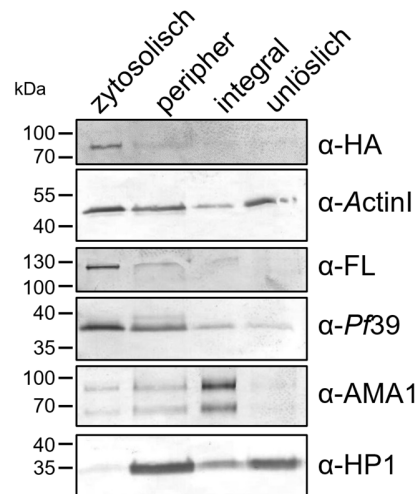


Abbildung 24 Proteinfraktionierung synchronisierter Schizonten der PNPLA1-KD Zelllinie zur proteinbiochemischen Analyse von PNPLA1-HA. Die Proteine synchronisierter Schizonten wurden durch Proteinfraktionierung nach Grüning *et al.* 2012 in eine zytosolische, periphere, integrale und unlösliche Proteinfraktion aufgetrennt und per Western Blot analysiert. Das Fusionsprotein PNPLA1-HA wurde mit α -HA-spezifischem Antikörper detektiert. Als Kontrollen für die Reinheit der unterschiedlichen Fraktionen wurden die vorwiegend im Zytosol vorliegende Protease Falcilysin (FL), das Zytoskelettelement ActinI, das ER-assoziierte Protein Pf39, das mit Heterochromatin assoziierte nukleare Protein Heterchromatin-Protein 1 (HP1) sowie das Transmembranprotein AMA1 verwendet. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

III.7 Phänotypische Charakterisierung der PNPLA1-KO Mutanten

Nachdem die Expression und zytosolische Lokalisation von PNPLA1 in den Blut- und Sexualstadien von *P. falciparum* gezeigt wurde, sollte PNPLA1 funktional durch die phänotypische Charakterisierung der PNPLA1-defizienten Zelllinien untersucht werden. Hierfür wurde sowohl die Morphologie als auch verschiedene Stadien im Lebenszyklus im Vergleich zum parentalen WT NF54 charakterisiert.

Im Zuge der phänotypischen Analyse der PNPLA1-KO Zelllinien wurde zunächst die Morphologie der PNPLA1-KO Mutanten in den asexuellen sowie sexuellen Blutstadien mit der parentalen WT NF54 Linie verglichen. Hierfür wurden Giemsa-gefärbte Blutaussstriche der verschiedenen Parasitenstadien angefertigt und mittels Hellfeldmikroskopie untersucht. Die Ergebnisse der morphologischen Analyse sind in Abbildung 25 exemplarisch für jedes Stadium der PNPLA1-KO A12 Zelllinie im Vergleich zur parentalen WT NF54 Linie dargestellt. Die Ringstadien zeigen jeweils die charakteristische Siegelring-Form, in denen der Zellkern als dunkelvioletter Punkt erkennbar ist und das Zytoplasma (violett/lila) die Nahrungsvakuole umschließt. In den

Trophozoitenstadien ist bereits das kristallisierte Hämoglobin-Abbauprodukt Hämozoin als schwarzer Punkt zu erkennen. Während der asexuellen Entwicklung durchläuft der Parasit während der Reifung zu Schizonten mehrere Zellteilungen, wobei sich der Parasit sichtlich vergrößert und zunehmend den Wirtserythrozyten fast vollständig einnimmt. In den reifen Schizonten sind kurz vor dem Austritt aus dem Wirtserythrozyten die ausdifferenzierten Merozoiten deutlich erkennbar. In den sexuellen Vorläuferstadien, den Gametozyten, ist das Zytoplasma wie bei den asexuellen Blutstadien hellviolett gefärbt und der Zellkern ist teilweise als violetter Punkt erkennbar. Dieser befindet sich in der räumlichen Nähe zu den deutlich erkennbaren schwarzen Hämozoin-Kristallen. Die Stadium II-Gametozyten charakterisieren sich durch die halbmondartige Form, während die Stadium III-Gametozyten eine etwas elongiertere Form mit abgerundeten Polen aufweisen. Die Stadium IV-Gametozyten zeigen eine langgezogene Form auf, die an den Enden spitz zulaufen. In den reifen Stadium V-Gametozyten sind diese spitz-zulaufenden Pole wieder abgerundet und der Parasit nimmt seine typische sichelförmige, *falcipare* Form an.

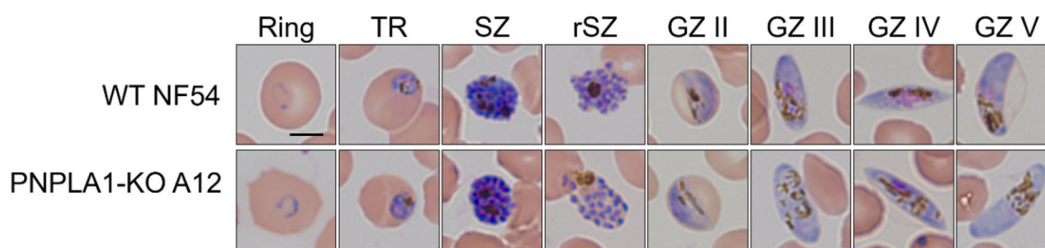


Abbildung 25 Morphologische Untersuchung von asexuellen und sexuellen Parasiten der PNPLA1-KO A12 Linie. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Giemsa-gefärbten Blutaussstriche zeigen beispielhaft die Morphologie von Ringstadien, Trophozoiten (TR), Schizonten (SZ), reifen Schizonten (rSZ) und Gametozyten Stadium II-V der PNPLA1-KO A12 Linie im Vergleich zur parentalen WT NF54 Linie. Der Größenmaßstab entspricht 5 µm (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

In den PNPLA1-KO Zelllinien konnte im Vergleich zur parentalen WT NF54 Linie kein Unterschied in der Morphologie der jeweiligen Parasitenstadien festgestellt werden. Sowohl die asexuellen Ring- und Trophozoitenstadien, die unreifen und reifen Schizonten als auch die Gametozytenstadien II-V wiesen in der PNPLA1-KO Linien die charakteristischen Eigenschaften für das jeweilige Stadium auf. Der Parasit war somit trotz des funktionalen Verlusts des PNPLA1-Proteins in der Lage die asexuelle Replikation vollständig zu durchlaufen sowie reife Gametozyten zu bilden.

III.7.1 Einfluss des PNPLA1-Funktionsverlusts auf die asexuelle Replikation

Anschließend sollte der Einfluss des PNPLA1-Funktionsverlusts auf die intraerythrozytäre Schizogonie im Detail untersucht werden. Zunächst wurde untersucht, ob die Gen-Disruption von *pnpla1* einen Einfluss auf die Anzahl der sich pro Schizont bildenden Tochter-Merozoiten hat. Hierfür wurden synchronisierte reife Schizonten auf einem Objektträger fixiert und die durchschnittliche Anzahl der sich pro Schizont gebildeten infektiösen Merozoiten, wie in Abschnitt II.2.1.15 beschrieben, mittels IFA quantifiziert. Um dabei lediglich einfach-infizierte Schizonten auszuwerten, wurden nur solche für die Quantifizierung eingeschlossen, die klar segmentierte Merozoiten mit geringer Überlappung und einzelne pigmentierte Hämozoïn-Kristalle aufwiesen. Insgesamt wurden pro Zelllinie die Anzahl der Merozoiten in 75 unterschiedlichen Schizonten quantifiziert. Im parentalen WT NF54 wurden pro Schizont durchschnittlich $18,4 \pm 3,12$ Merozoiten quantifiziert, während in der PNPLA1-KO A12 Zelllinie durchschnittlich $18,2 \pm 2,34$ Merozoiten und in der PNPLA1-KO C11 Zelllinie pro Schizont $18,5 \pm 2,86$ Merozoiten nachgewiesen werden konnten (Abbildung 26). Somit war kein signifikanter Unterschied in der sich pro Schizont bildenden Anzahl von Tochter-Merozoiten erkennbar.

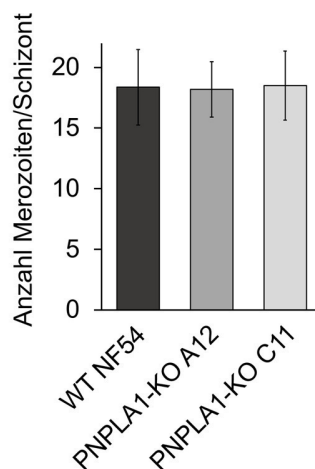


Abbildung 26 Quantifizierung der Tochter-Merozoiten in reifen Schizonten der PNPLA1-KO A12 und C11 Linien im Vergleich zum parentalen WT NF54. Die Anzahl der sich bildenden Merozoiten wurde mittels IFA analysiert. Dazu wurden die Nuklei der segmentierten Merozoiten mit Hoechst33342 visualisiert und pro Linie in 75 einfach-infizierten Schizonten quantifiziert. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die Anzahl der Merozoiten ist als Mittelwert plus Standardabweichung angegeben (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Zur weiteren Analyse wurde die intraerythrozytäre Replikation in synchronisierten Kulturen der PNPLA1-KO Linien A12 und C11 im Vergleich zum WT NF54 mittels regelmäßigen Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen über einen Zeitraum von 120 h untersucht (vgl. Abschnitt II.2.1.9). Die Ergebnisse der zeitlichen Zunahme der Parasitämie über zwei Replikationszyklen sind in

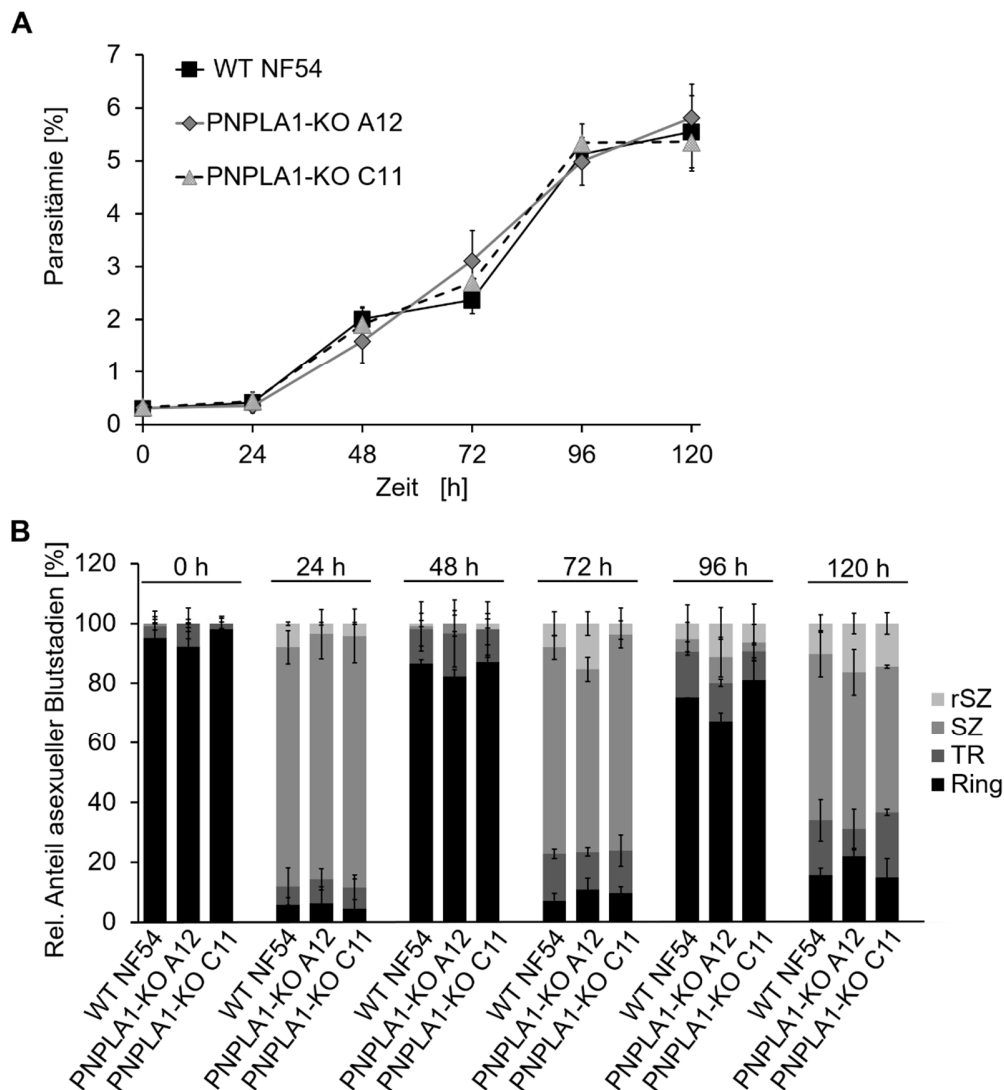


Abbildung 27 Phänotypische Charakterisierung der asexuellen Replikation der PNPLA1-KO A12 und C11 Mutanten im Vergleich zum parentalen WT NF54. (A) Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Parasitämie der PNPLA1-KO Mutanten im Vergleich zum parentalen WT NF54. Die synchronisierten Kulturen wurden mit einer Ausgangsparasitämie von 0,25% angeimpft und über einen Zeitraum von 120 h kultiviert. Pro Zeitpunkt wurde die Parasitämie in 10 Gesichtsfeldern im Triplikat mit Hilfe Giemsa-gefärbter Blutaussstriche quantifiziert. (B) Das Wachstum der PNPLA1-KO Mutanten im Vergleich zum parentalen WT NF54 wurde durch die Bestimmung der prozentualen Stadienzusammensetzung mit Hilfe Giemsa-gefärbter Blutaussstriche analysiert. Die asexuellen Blutstadien wurden in Ringstadien, Trophozoiten (TR), Schizonten (SZ) und reife Schizonten (rSZ) unterteilt. Für die Bestimmung der prozentualen Stadienzusammensetzung wurden 100 infizierte Erythrozyten im Triplikat analysiert. Die Ergebnisse in (A) und (B) sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Angegeben ist der jeweilige Mittelwert plus Standardabweichung (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Abbildung 27A dargestellt. Die Ausgangsparasitämie für die WT NF54 Linie und der PNPLA1-KO A12 und C11 Linien lagen bei 0,25% und stiegen im zeitlichen Verlauf auf $5,6 \pm 0,63\%$ in der WT NF54 Linie, $5,8 \pm 0,62\%$ in der PNPLA1-KO A12 Kultur bzw. $5,4 \pm 0,51\%$ in der PNPLA1-KO C11 Kultur. Hierbei konnte bei allen untersuchten Kulturen jeweils ein deutlicher Anstieg der Parasitämie nach 24 h und 72 h beobachtet werden. Zusätzlich zur Parasitämie wurde zudem die

prozentuale Stadienzusammensetzung in diesen Parasitenkulturen bestimmt. Die Einteilung der asexuellen Blutstadien erfolgte dabei in Ringe, Trophozoiten, Schizonten und reife Schizonten. Die Ergebnisse der prozentualen Stadienzusammensetzung im zeitlichen Verlauf sind in Abbildung 27B dargestellt. Durch die Synchronisation der Parasitenkulturen vor Beginn des Experiments lag der Anteil der Ringstadien in den untersuchten Kulturen bei >90%. Nach 24 h waren die Ringstadien größtenteils zu Schizonten gereift und der prozentuale Anteil der Schizonten lag bei $80,1 \pm 5,63\%$ in der WT NF54 Kultur, $82,2 \pm 8,22\%$ in der PNPLA1-KO A12 Kultur und $84,2 \pm 3,14\%$ in der PNPLA1-KO C11 Kultur. 48 h nach Versuchsbeginn waren erneut größtenteils Ringstadien in den Kulturen zu beobachten, wobei der prozentuale Anteil in der WT NF54 Kultur bei $86,6 \pm 1,31\%$, in der PNPLA1-KO A12 Kultur bei $82,2 \pm 2,42\%$ und in der PNPLA1-KO C11 Kultur bei $87,1 \pm 2,35\%$ lag. Auch in dem darauffolgendem Replikationszyklus war kein signifikanter Unterschied in den prozentualen Stadienzusammensetzungen der jeweiligen Kulturen zu erkennen. Insgesamt zeigen die Quantifizierung der sich pro Schizont bildenden Tochtermerozoiten sowie die Analyse der asexuellen Replikation, dass der Funktionsverlust des PNPLA1-Proteins keinen Einfluss auf die intraerythrozytäre Replikation hat.

III.7.2 Phänotypische Analyse der Gametozytogenese

Da gezeigt werden konnte, dass der Funktionsverlust des PNPLA1-Proteins keinen Einfluss auf die replikativen Blutstadien hat, wurde ferner der Einfluss des PNPLA1-Funktionsverlusts auf die Gametozytogenese, also die Gametozytenbildung sowie Gametozytenreifung, untersucht. Hierfür wurden synchronisierte Ringstadium-Kulturen der parentalen WT NF54 Kultur sowie der PNPLA1-KO Linien A12 und C11 auf eine Ausgangsparasitämie von 2% eingestellt und über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. Im zeitlichen Verlauf wurden zur Bestimmung der Gametozytämie regelmäßig Proben zur Anfertigung von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen im Triplikat entnommen (vgl. Abschnitt II.2.1.10). Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt. In der parentalen WT NF54 Kultur wurde an Tag 4 eine Gametozytämie von $3,2 \pm 0,11\%$ bestimmt, die im Versuchsverlauf auf einen Wert von $4,8 \pm 0,31\%$ angestiegen ist. Im Vergleich zum parentalen WT NF54 war die Gametozytämie in den beiden untersuchten PNPLA1-KO Parasitenlinien an Tag 4 signifikant niedriger mit Werten von $2,1 \pm 0,21\%$ in der PNPLA1-KO A12 Kultur bzw. $1,7 \pm 0,24\%$ in der PNPLA1-KO C11 Kultur. Im zeitlichen Verlauf nahm zwar auch in den PNPLA1-KO Kulturen die Gametozytämie zu, war aber auch an Tag 14 mit einer finalen Gametozytämie von $3,2 \pm 0,32\%$ (PNPLA1-KO A12) bzw. $2,2 \pm 0,14\%$ (PNPLA1-KO

C11) im Vergleich zur parentalen WT NF54 Kultur signifikant reduziert (Abbildung 28). Der PNPLA1-Funktionsverlust führte somit zu einer signifikant reduzierten Gametozytenbildung im Vergleich zum parentalen WT NF54.

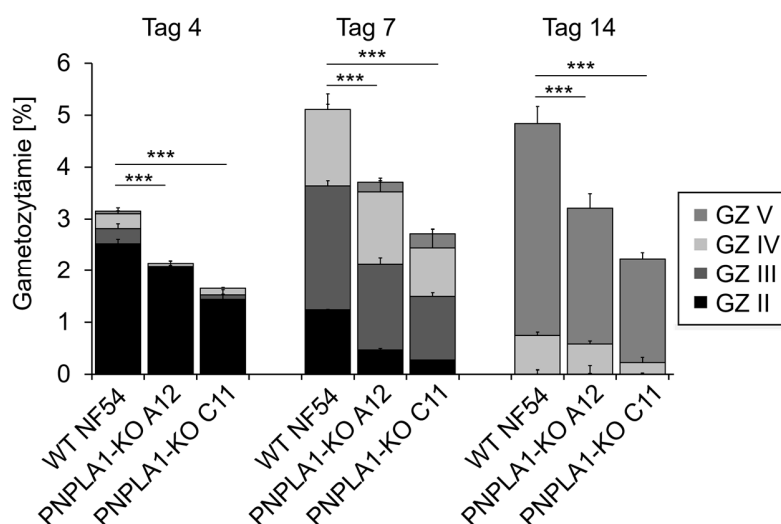


Abbildung 28 Phänotypische Charakterisierung der Gametozytenbildung in den PNPLA1-KO A12 und C11 Mutanten im Vergleich zum parentalen WT NF54. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Gametozytämie der PNPLA1-KO Mutanten im Vergleich zum parentalen WT NF54. Die synchronisierten Kulturen wurden mit einer Ausgangsparasitämie von 2,0% angeimpft und über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. Pro Zeitpunkt wurde die Gametozytämie in 10 Gesichtsfeldern im Triplikate mit Hilfe Giemsa-gefärbter Blutaussstriche quantifiziert. GZ, Gametozytenstadium II-V. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente. *** $p < 0,001$ (One-Way ANOVA mit Post-Hoc Bonferroni Multiple Comparison Test, modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Im Weiteren sollte neben der Gametozytenbildung auch die Gametozytenreifung im Detail untersucht werden. Hierfür wurde die Gametozytenbildung in den PNPLA1-KO Mutanten sowie im parentalen WT NF54, wie in Abschnitt II.2.1.9 beschrieben, mit LysoPC-defizientem Medium synchron induziert. Im Folgenden wurden die Kulturen für fünf Tage in GlcNAc-Zellkulturmedium zum Abtöten asexueller Parasiten und anschließend wieder in A⁺-Zellkulturmedium kultiviert (Fivelman *et al.*, 2007; Ngwa *et al.*, 2017). Im zeitlichen Verlauf von 13 Tagen wurden zur Bestimmung der Gametozytenreifung regelmäßig Proben zur Anfertigung von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen im Triplikate entnommen. Mit Hilfe dieser Blutaussstriche wurde der prozentuale Anteil der Gametozytenstadien II-V in jeweils 100 Parasiten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt. Während an Tag 5 nach der Gametozyteninduktion in den Kulturen vorwiegend Stadium II-Gametozyten detektiert werden konnten, wurde im zeitlichen Verlauf eine zunehmende Reifung der Kulturen beobachtet. An Tag 13 wurden ausschließlich Stadium IV- und

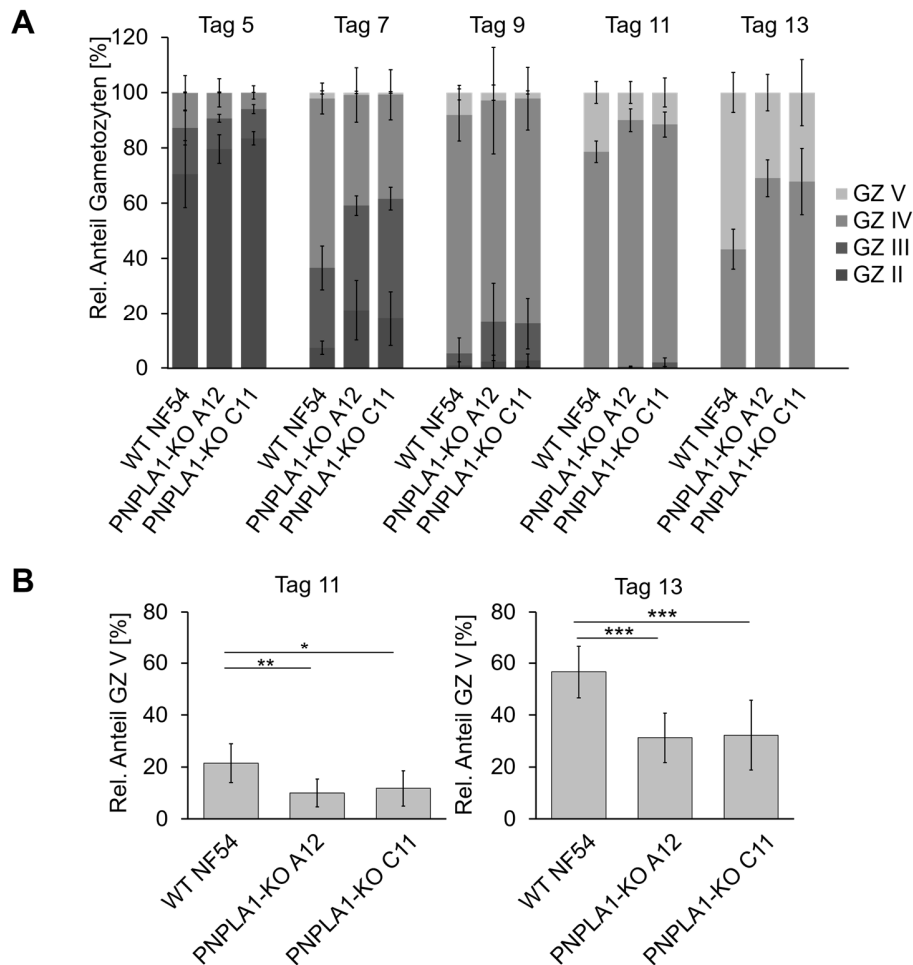


Abbildung 29 Phänotypische Charakterisierung der Gametozytenreifung in den PNPLA1-KO A12 und C11 Mutanten im Vergleich zum parentalen WT NF54. (A) Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Stadiumzusammensetzung der PNPLA1-KO Mutanten A12 und C11 im Vergleich zum WT NF54. Die Gametozytenbildung wurde, wie in Abschnitt II.2.1.10 beschrieben, mit LysoPC-defizientem Medium synchron induziert. Im Folgenden wurden die Kulturen für fünf Tage in GlcNAc-Zellkulturmedium zum Abtöten asexueller Parasiten und anschließend wieder in A+-Zellkulturmedium kultiviert (Fivelman *et al.*, 2007; Ngwa *et al.*, 2017). Im zeitlichen Verlauf von 13 Tagen wurden zur Bestimmung der Gametozytenstadien II-V regelmäßig Proben zur Anfertigung von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen im Triplikat entnommen. Der prozentuale Anteil der Gametozytenstadien wurde in jeweils 100 Parasiten bestimmt. **(B)** Der prozentuale Anteil der Stadium V-Gametozyten in den jeweiligen Kulturen ist für die Tage 11 und 13 verdeutlicht dargestellt. Die Ergebnisse in **(A)** und **(B)** sind repräsentativ für drei biologisch unabhängige Experimente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (One-Way ANOVA mit Post-Hoc Bonferroni Multiple Comparison Test). GZ, Gametozytenstadium II-V (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019). Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Atscharah Panyot, im Rahmen ihrer während dieser Arbeit betreuten Masterarbeit, generiert; Eigenanteil: 50%.

V-Gametozyten beobachtet. Jedoch zeigte sich, dass die Gametozyten der parentalen WT NF54 Kultur schneller reiften und im Vergleich zu den beiden untersuchten PNPLA1-KO Mutanten einen höheren Anteil an Stadium V-Gametozyten aufwiesen (Abbildung 29A). Der prozentuale Anteil der Stadium V-Gametozyten in den jeweiligen Kulturen an Tag 11 und Tag 13 nach der Gametozyteninduktion ist in Abbildung 29B verdeutlicht dargestellt. Während an Tag 11 mit $21,4 \pm 7,53\%$ im Vergleich zu den PNPLA1-KO Mutanten A12 und C11 ($10,0 \pm 5,31\%$ bzw. $11,8 \pm 6,69\%$) bereits mehr Stadium V-Gametozyten in der parentalen WT NF54 Kultur detektiert

werden konnte, war der Unterschied an Tag 13 besonders deutlich ($56,7 \pm 10,1\%$ gegenüber $31,2 \pm 9,49\%$ bzw. $32,5 \pm 11,45\%$). Somit zeigte sich, dass der PNPLA1-Funktionsverlust sowohl zu einer reduzierten Gametozytenbildung als auch zu einer verlangsamten Gametozytenreifung führt.

III.7.3 Phänotypische Analyse der Gametogenese und Zygotenbildung

Neben der asexuellen Replikation und der Gametozytogenese wurde mit Hilfe der PNPLA1-KO Mutanten auch der Einfluss des funktionalen PNPLA1-Verlusts auf die Mikro- und Makrogametogenese sowie auf die anschließende Zygotenbildung untersucht. Zur Untersuchung der Gametogenese und Zygotenbildung wurden reife Gametozytenkulturen der jeweiligen Parasitenlinien, in denen ausschließlich Stadium V-Gametozyten beobachtet wurden, mittels Percoll®-Gradienten angereichert, mit nicht-infizierten-Erythrozyten auf eine 2%ige Gametozytämie bei einem 5%igen Hämatokrit eingestellt und *in vitro* aktiviert.

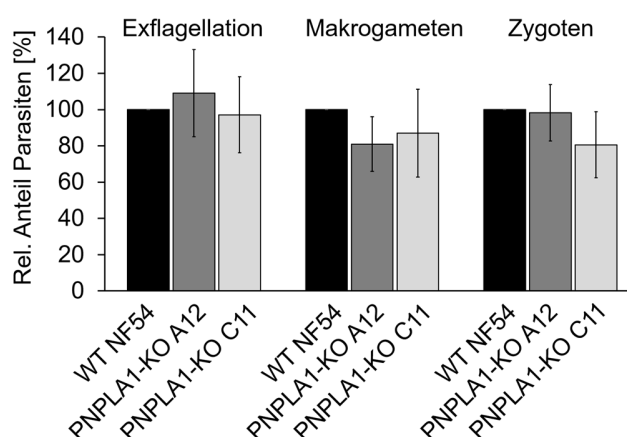


Abbildung 30 Untersuchung der *in vitro*-Mikro- und Makrogametogenese sowie der Zygotenbildung von reifen Gametozyten der PNPLA1-KO A12 und C11 Linien im Vergleich zum parentalen WT NF54. Reife Gametozytenkulturen der WT NF54 Linie sowie der PNPLA1-KO A12 und C11 Mutanten wurden auf eine 2%ige Gametozytämie bei einem Hämatokrit von 5% eingestellt und *in vitro* aktiviert. Zur Quantifizierung der Mikrogametogenese wurde 15 min nach Aktivierung die Anzahl der Exflagellationszentren in 30 Gesichtsfelder mittels Lichtmikroskopie in vier Replikaten bestimmt. Zur Quantifizierung der Makrogametogenese und Zygotenbildung wurden die Kulturen 30 min (Makrogameten) bzw. 6 h (Zygoten) nach Aktivierung fixiert und mit α -Pfs25-Antiserum immunmarkiert. Die Anzahl der Makrogameten bzw. Zygoten wurde mittels IFA in fünfmal 30 Gesichtsfeldern quantifiziert. Dargestellt ist der relative Anteil der Exflagellationszentren, Makrogameten und Zygoten in den PNPLA1-KO A12 und C11 Mutanten im Vergleich zum parentalen WT NF54 (100%). Die Ergebnisse sind als Mittelwert plus Standardabweichung von drei (Makrogameten, Zygoten) bis acht (Exflagellation) biologisch unabhängigen Experimenten angegeben (One-Way ANOVA mit Post-Hoc Bonferroni Multiple Comparison Test, modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Die Mikrogametogenese, die Fähigkeit männliche Gameten zu bilden, wurde mit Hilfe des Exflagellationsassays analysiert (vgl. Abschnitt II.2.1.12). Hierfür wurden 15 min nach Aktivierung der jeweiligen Gametozytenkultur die Exflagellationszentren in je 30 Gesichtsfeldern in je vier unabhängigen Replikaten quantifiziert. Die Ergebnisse der Exflagellationsassays sind in

Abbildung 30 dargestellt, wobei die Exflagellationsfähigkeit der PNPLA1-KO Mutanten relativ zum parentalen WT NF54 angegeben ist. Während die PNPLA1-KO Mutante A12 einen durchschnittlich geringfügig höheren relativen Anteil an Exflagellationszentren im Vergleich zum WT NF54 aufzeigte ($109,0 \pm 23,93\%$), wies die PNPLA1-KO Mutante eine geringfügig niedrigere mittlere Exflagellationsfähigkeit von $97,1 \pm 20,92\%$ auf. Diese leicht unterschiedlichen relativen Werte waren jedoch nicht signifikant (One-Way ANOVA mit Post-Hoc Bonferroni Multiple Comparison Test), weshalb der funktionale PNPLA1-Verlust keine Auswirkung auf die Mikrogametogenese hat.

Die Fähigkeit zur Makrogametogenese, die Bildung von weiblichen Gameten, wurde mittels IFA quantifiziert. 30 min nach der *in vitro* Aktivierung der jeweiligen Kulturen wurden diese auf IFA-Objektträgern geschichtet. Anschließend wurden die Makrogameten mit α -Pfs25-spezifischem Antiserum immunmarkiert und die Anzahl der Makrogameten in jeweils 1000 Erythrozyten in fünf Replikaten bestimmt. Die Quantifizierung der Makrogametenbildung ist in Abbildung 30 dargestellt, wobei die Anzahl der Makrogameten in den PNPLA1-KO Mutanten relativ zum parentalen WT NF54 (100%) angegeben sind. Der funktionale Verlust des PNPLA1-Proteins hatte keinen signifikanten Effekt auf die Fähigkeit zur Makrogametenbildung. Die PNPLA1-KO A12 Mutante zeigte dabei eine relative Fähigkeit zur Makrogametenbildung von $82,2 \pm 15,13\%$, die PNPLA1-KO C11 Mutanten von $87,3 \pm 24,26\%$.

Die Quantifizierung der relativen Zygotenbildung in den PNPLA1-KO Mutanten wurde analog zur Untersuchung der Makrogametogenese durchgeführt. Für die Untersuchung der Zygotenbildung wurden die Kulturen *in vitro* für 6 h aktiviert. Die Zygoten wurden anschließend α -Pfs25-spezifischem Antiserum immunmarkiert und im IFA quantifiziert, wobei nur solche Parasiten als Zygoten gezählt wurden, die vollständig abgerundet waren und eine randständige Pfs25-Markierung aufwiesen. Die Anzahl der Makrogameten wurde in jeweils 1000 Erythrozyten in fünf Replikaten bestimmt. Die Ergebnisse der Zygotenbildung sind in Abbildung 30 dargestellt. Auch hier konnte wie zuvor bei den Exflagellationsassays und bei der Untersuchung der Makrogametenbildung kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden PNPLA1-KO Mutanten und dem parentalen WT NF54 festgestellt werden. Die PNPLA1-KO A12 Mutante wies eine relative Zygotenbildung von $98,2 \pm 15,63\%$ auf, die PNPLA1-KO C11 Mutanten eine relative Zygotenbildung von $80,6 \pm 18,21\%$.

Zusammenfassend führte der PNPLA1-Funktionsverlust in den PNPLA1-KO Mutanten weder zu einer veränderten asexuellen Replikation oder zu einer inhibierten Gametogenese. Jedoch konnte beobachtet werden, dass die PNPLA1-Deletionsmutanten signifikant weniger Gametozyten bildeten. Auch führte der PNPLA1-Funktionsverlust zu einer verzögerten Reifung der Gametozyten.

III.8 Phänotypische Charakterisierung der PNPLA1-KD Mutante

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der dauerhafte PNPLA1-Funktionsverlust zu einer signifikant reduzierten Gametozytenbildung und zu einer verlangsamten Gametozytenreifung führt, sollten im Weiteren die bisherigen Ergebnisse mit der genierten PNPLA1-KD Mutante verifiziert werden. Für die phänotypische Analyse der PNPLA1-KD Mutanten wurde zunächst erneut die Morphologie der PNPLA1-KD Linie nach GlcN-induziertem Funktionsverlust des PNPLA1-Proteins untersucht. Im Vorfeld konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Zugabe des Induktors GlcN mit einer finalen Konzentration von 2,5 mM das *glmS*-Ribozym in der PNPLA1-KD Zelllinie aktiviert und durch die Degradierung der chimären *pnplA1-glmS*-RNA die endogene Expression des PNPLA1-Proteins um ~60% im Vergleich zur wildtypischen Expression reduziert wird (vgl. Abbildung 21). Zur Untersuchung der Morphologie wurden Giemsa-gefärbte Blutaussstriche der verschiedenen asexuellen und sexuellen Parasitenstadien angefertigt und mittels Hellfeldmikroskopie untersucht. Dabei wurden Parasiten der unbehandelten und mit 2,5 mM GlcN-behandelten Kulturen sowohl der PNPLA1-KD Linie als auch des parentalen NF54-Wildtyps untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 exemplarisch dargestellt. Sowohl die Ringstadien, die Trophozoiten, die unreifen und reifen Schizonten als auch die Gametozytenstadien II-V wiesen die in Abschnitt III.7 aufgeführten charakteristischen Eigenschaften für das jeweilige Parasitenstadium auf. Es konnte zwischen den behandelten und unbehandelten Kulturen kein Unterschied in der Morphologie festgestellt werden und der Parasit war trotz des induzierten PNPLA1-Funktionsverlusts in der Lage, die asexuelle Replikation vollständig zu durchlaufen sowie sich in reife Gametozyten zu differenzieren. In den parallel angefertigten Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen der parentalen WT NF54 Kultur konnte kein unspezifischer Effekt auf die Morphologie durch die GlcN-Behandlung beobachtet werden.

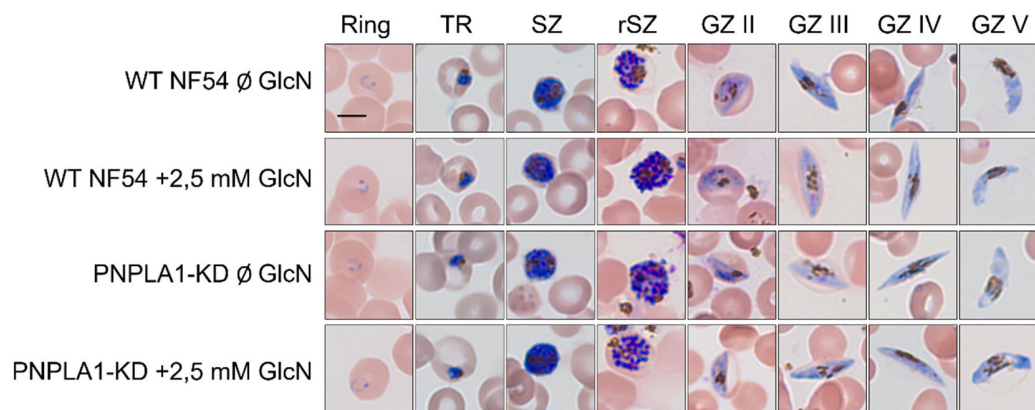


Abbildung 31 Morphologische Untersuchung von asexuellen und sexuellen Parasiten der PNPLA1-KD Linie. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Giemsa-gefärbten Blutausstriche zeigen beispielhaft die Morphologie von Ringstadien, Trophozoiten (TR), Schizonten (SZ), reifen Schizonten (rSZ) und Gametozyten Stadium II-V der mit 2,5 mM GlcN behandelten PNPLA1-KD Linie im Vergleich zur unbehandelten (Ø GlcN) PNPLA1-KD Kultur sowie zur behandelten und mit 2,5 mM GlcN behandelten parentalen WT NF54 Linie. Der Größenmaßstab entspricht 5 µm. GlcN, D-(+)-Glucosamin Hydrochlorid (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

III.8.1 Einfluss des konditionellen PNPLA1-Funktionsverlusts auf die asexuelle Replikation

Im Weiteren wurde wie zuvor bei den PNPLA1-KO Mutanten der Einfluss des PNPLA1-Funktionsverlust auf die replikativen Blutstadien im Detail untersucht. Für die detaillierte Untersuchung der asexuellen Replikation wurde die Zunahme der Parasitämie in synchronisierten Kulturen mittels regelmäßigen Blutausstrichen über einen Zeitraum von 120 h untersucht. Die Parasitämie in den jeweiligen Kulturen wurde zu Beginn mit synchronisierten Ringstadium-Parasiten auf einen Wert von 0,25% eingestellt. Die PNPLA1-KD Kultur wurde mit einer finalen Konzentration von 2,5 mM GlcN über den gesamten Versuchszeitraum behandelt und mit einer unbehandelten PNPLA1-KD Kultur hinsichtlich des Replikationsverhaltens verglichen. Um einen möglichen unspezifischen Nebeneffekt der GlcN-Behandlung auszuschließen, wurden weiterhin Kulturen des parentalen WT NF54 analog angesetzt und ausgewertet. Alle 24 h wurden Proben von den Kulturen im Triplikat zur Anfertigung von Giemsa-gefärbten Blutausstrichen entnommen. Mit Hilfe dieser Blutausstriche wurden zum einen die Parasitämie als auch die prozentualen Anteile der verschiedenen Entwicklungsstadien (Ringstadium, Trophozoiten, unreife Schizonten, reife Schizonten) quantitativ für die einzelnen Zeitpunkte bestimmt. Die Ergebnisse der Quantifizierung des erythrozytären Replikationsverhaltens sind in Abbildung 32 dargestellt. Die unbehandelte WT NF54 Kultur durchlief im Laufe des Versuchs zwei Replikationszyklen und die Parasitämie stieg nach 120 h von einem Ausgangswert von 0,25% auf einen finalen Wert von $4,9 \pm 0,62\%$. Die finale Parasitämie der mit 2,5 mM GlcN behandelten WT NF54 Kultur lag bei $5,3 \pm 0,51\%$, wodurch ein

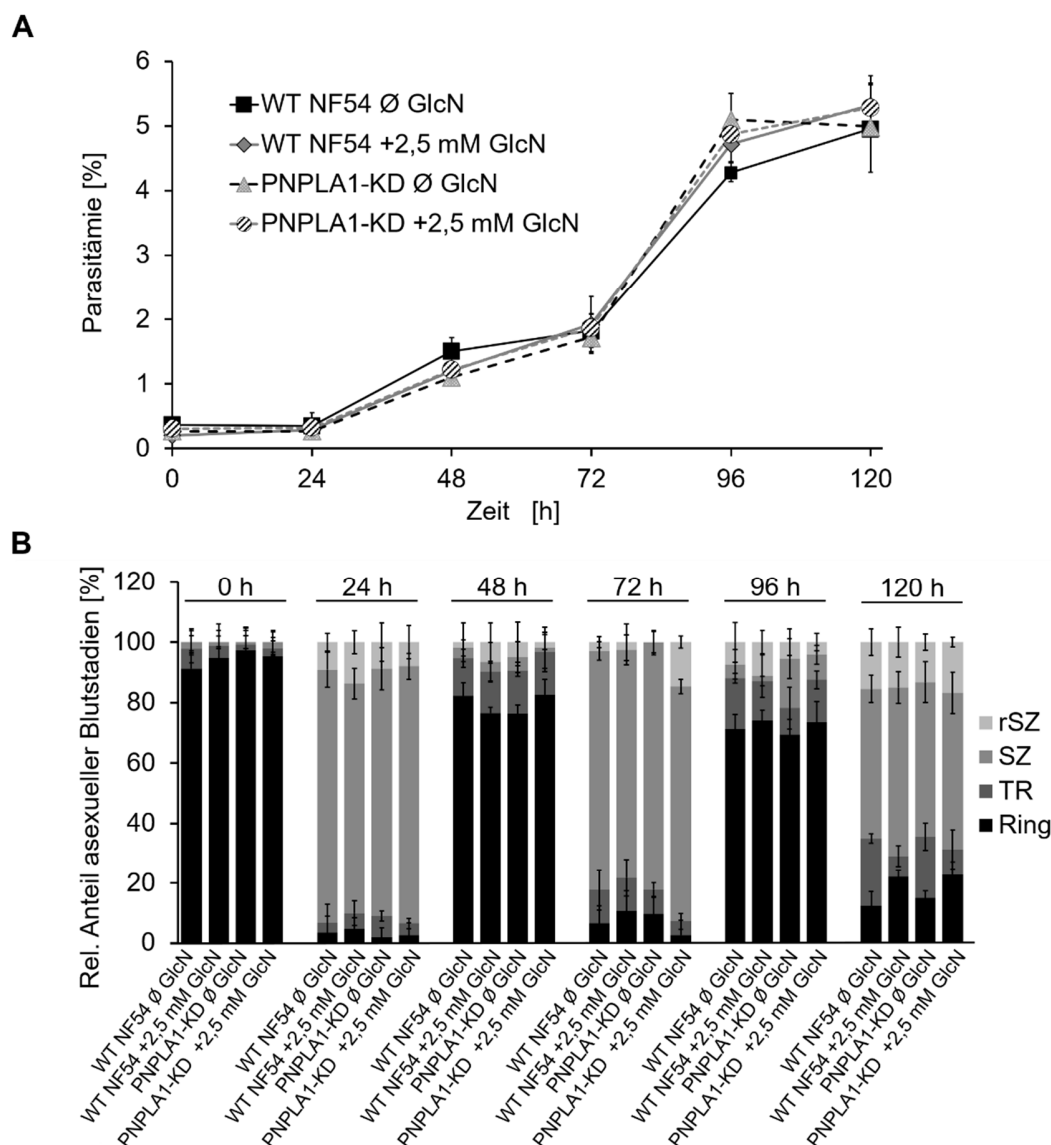


Abbildung 32 Phänotypische Charakterisierung der asexuellen Replikation nach konditionellem PNPLA1-Funktionsverlust. Die PNPLA1-Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 2,5 mM GlcN konditionell herunterreguliert. Die GlcN-Behandlung erfolgte bereits ein Replikationszyklus vor Ansetzen des Experiments. Die mit 2,5 mM GlcN behandelte PNPLA1-Kultur (+2,5 mM GlcN) wurde zur unbehandelten Kultur (Ø GlcN) verglichen. Um einen unspezifischen Effekt der GlcN-Behandlung auszuschließen, wurden parentale WT NF54 Kulturen analog angesetzt und ausgewertet. **(A)** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Parasitämie. Die synchronisierten Kulturen wurden mit einer Ausgangsparasitämie von 0,25% angeimpft und über einen Zeitraum von 120 h kultiviert. Pro Zeitpunkt wurde die Parasitämie in 10 Gesichtsfeldern im Triplikate mit Hilfe Giemsa-gefärbter Blutaussstriche quantifiziert. **(B)** Die prozentuale Stadienzusammensetzung in den jeweiligen Kulturen wurde mit Hilfe Giemsa-gefärbter Blutaussstriche für die einzelnen Zeitpunkte analysiert. Die asexuellen Blutstadien wurden in Ringstadien, Trophozoiten (TR), Schizonten (SZ) und reife Schizonten (rSZ) unterteilt. Für die Bestimmung der prozentualen Stadienzusammensetzung wurden 100 infizierte Erythrozyten im Triplikate analysiert. Die Ergebnisse in **(A)** und **(B)** sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Angegeben sind der jeweilige Mittelwert plus Standardabweichung. GlcN, D-(+)-Glucosamin Hydrochlorid (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

unspezifischer Nebeneffekt durch GlcN auf das Replikationsverhalten der Parasiten ausgeschlossen werden konnte. Die unbehandelte PNPLA1-KD Kultur durchlief ebenfalls im Laufe des Versuchs zwei Replikationszyklen und die Parasitämie stieg nach 120 h von einem

Ausgangswert von 0,25% auf einen finalen Wert von $5,0 \pm 0,65\%$. Die finale Parasitämie der behandelten PNPLA1-KD Kultur, bei der die PNPLA1-Expression durch die Zugabe von 2,5 mM GlcN konditionell herunterreguliert wurde, lag bei $5,3 \pm 0,46\%$. Es konnte daher hinsichtlich der Parasitämie kein signifikanter Unterschied in der intraerythrozytären Replikation zwischen den GlcN-unbehandelten und -behandelten Kulturen festgestellt werden (Abbildung 32A).

Zu Beginn des Versuchs konnten fast ausschließlich Ringstadien ($91,2 \pm 5,92\%$ bis $95,3 \pm 6,20\%$) in den Kulturen nachgewiesen werden, deren Anteil mit der Differenzierung der jeweiligen Parasiten innerhalb von 24 h abnahm. Nach 24 h überwogen in den Kulturen hauptsächlich Schizonten mit einem prozentualen Anteil zwischen $76,5 \pm 5,12\%$ bis $85,6 \pm 4,32\%$. Im weiteren Verlauf reiften die Schizonten heran und setzten neue Merozoiten frei, die im Folgenden neue Erythrozyten infizierten. Nach 48 h lag der prozentuale Anteil der Ringstadien in den Kulturen erneut zwischen $76,3 \pm 1,89\%$ und $82,6 \pm 5,09\%$. Auch in dem darauffolgendem Replikationszyklus war kein signifikanter Unterschied in der prozentualen Stadienzusammensetzung zwischen den unbehandelten und den mit 2,5 mM GlcN behandelten Kulturen erkennbar. Die Quantifizierung der einzelnen Replikationsstadien zeigte, dass der konditionelle Verlust von PNPLA1 nicht zu einer asynchronen Entwicklung führte und die Kulturen wiesen jeweils eine ähnliche prozentuale Stadienzusammensetzung auf (Abbildung 32B).

III.8.2 Phänotypische Analyse der Gametozytogenese in der PNPLA1-KD Mutante

Um die Bildung von Gametozyten nach dem konditionellem PNPLA1-Verlust in der PNPLA1-KD Mutante zu untersuchen, wurde die synchronisierte PNPLA1-KD Kultur auf eine Ausgangsparasitämie von 2,0% eingestellt und, wie in Abschnitt II.2.1.10 beschrieben, über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. Der konditionelle PNPLA1-KD Verlust wurde durch Zugabe von 2,5 mM GlcN induziert und der zeitliche Verlauf der Gametozytämie mit einer unbehandelten Kultur verglichen. Um einen möglichen unspezifischen Nebeneffekt der GlcN-Behandlung auszuschließen, wurden weiterhin WT NF54 Kulturen identisch angesetzt und ausgewertet. Die Ergebnisse der Quantifizierungen sind in Abbildung 33 zusammengefasst. Im Verlauf des Experiments konnte kein signifikanter Unterschied in der Gametozytämie zwischen den unbehandelten und mit 2,5 mM GlcN behandelten WT NF54 Kulturen beobachtet werden. Am Tag 5 nach Versuchsbeginn wies die unbehandelte WT NF54 Kultur eine Gametozytämie von $1,4 \pm 0,21\%$ auf, während die Gametozytämie der mit 2,5 mM GlcN behandelten WT NF54 Kultur

1,3 ± 0,19% betrug. Im Laufe des Versuchs nahm die Anzahl der Gametozyten in den Kulturen zu und die Gametozytämie erreichte in der unbehandelten WT NF54 Kultur einen finalen Wert von 2,1 ± 0,13% und in der mit 2,5 mM GlcN behandelten Kultur einen finalen Wert von 2,25 ± 0,3%. Jedoch wies die PNPLA1-KD Kultur nach konditionellem Verlust von PNPLA1 im Gegensatz zur unbehandelten Kultur bereits an Tag 5 eine signifikant reduzierte Gametozytämie auf. Während die Gametozytämie in der unbehandelten PNPLA1-KD Kultur ähnlich wie beim parentalen WT NF54 1,6 ± 0,32% betrug, wies die PNPLA1-KD Kultur nach konditionellem PNPLA1 Verlust lediglich eine Gametozytämie von 0,3 ± 0,29% auf. Zwar bildeten sich in der GlcN-behandelten Kultur im Verlauf des Experiments weitere Gametozyten, jedoch war die Gametozytämie auch an Tag 14 im Vergleich zur unbehandelten PNPLA1-KD Kultur signifikant um ~50% reduziert. Dabei erreichte die unbehandelte PNPLA1-KD Kultur eine Gametozytämie von 1,6 ± 0,14%, in der mit 2,5 mM GlcN behandelten Kultur stellte sich eine finale Gametozytämie von 0,78 ± 0,38% ein. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass der konditionelle Verlust von PNPLA1 wie zuvor in den PNPLA1-KO Mutanten zwar zu keinem veränderten asexuellen Replikationszyklus führt, die Kulturen jedoch nach konditionellem PNPLA1 Verlust eine signifikant reduzierte Anzahl Gametozyten bildeten.

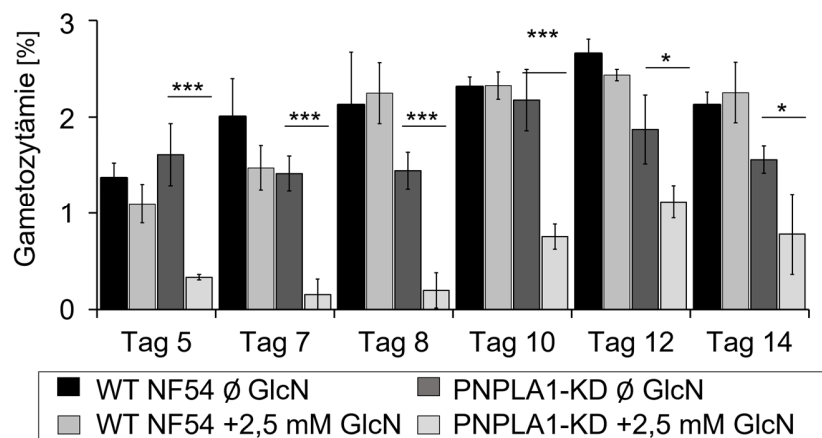


Abbildung 33 Phänotypische Charakterisierung der Gametozytenbildung nach konditionellem PNPLA1-Funktionsverlust. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Gametozytämie der PNPLA1-KD Mutante nach konditionellem PNPLA1-Funktionsverlust durch die Zugabe von 2,5 mM GlcN (+2,5 mM GlcN) im Vergleich zur unbehandelten PNPLA1-KD Kultur (Ø GlcN). Um einen unspezifischen Effekt der GlcN-Behandlung auszuschließen, wurden parentale WT NF54 Kulturen analog angesetzt und ausgewertet. Die synchronisierten Kulturen wurden mit einer Ausgangsparasitämie von 2,0% angeimpft und über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. Pro Zeitpunkt wurde die Gametozytämie in 10 Gesichtsfeldern im Triplikate mit Hilfe Giemsa-gefärbter Blutaussstriche quantifiziert. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente. GlcN, D-(+)-Glucosamin Hydrochlorid. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (One-Way ANOVA mit Post-Hoc Bonferroni Multiple Comparison Test, modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Die PNPLA1-KD Linie hat gegenüber den dauerhaften PNPLA1-KO Linien den Vorteil, dass der PNPLA1-Funktionsverlust konditionell durch den Induktor GlcN zu einem beliebigen Zeitpunkt induziert werden kann. Daher wurde die PNPLA1-KD Mutante in einem weiteren Experiment dazu verwendet, um zu untersuchen, ob die reduzierte Gametozytenbildung nach PNPLA1-Funktionsverlust auf eine veränderte Gametozyteninduktion oder eher auf eine inhibierte frühe Gametozytenreifung zurückzuführen ist. Dafür wurden synchronisierte PNPLA1-KD und WT NF54 Kulturen auf eine Ausgangsparasitämie von 2,0% eingestellt und wie in Abschnitt II.2.1.10 beschrieben kultiviert. Sobald die Kulturen eine Parasitämie von 10,0% erreicht hatten (überwiegend Ringstadien), wurde die Gametozytenbildung durch die Zugabe lysierter Erythrozyten induziert (Schneweis *et al.*, 1991; Ngwa *et al.*, 2017). Anschließend wurden die Kulturen zum Abtöten asexueller Parasitenstadien für fünf Tage in GlcNAc-Zellkulturmedium und im Folgenden in A+-Zellkulturmedium kultiviert (Fivelman *et al.*, 2007; Ngwa *et al.*, 2017). Die Zugabe von 2,5 mM GlcN zum Induzieren des konditionellen PNPLA1-Funktionsverlusts in der PNPLA1-KD Kultur erfolgte entweder wie beschrieben vor und während der Zugabe oder nach dem Entfernen der lysierten Erythrozyten (vgl. Abschnitt II.2.1.10). Um einen möglichen unspezifischen Nebeneffekt der GlcN-Behandlung auszuschließen, wurden weiterhin WT NF54 Kulturen identisch angesetzt und ausgewertet. Die Quantifizierung der resultierenden Gametozytämie ist in Abbildung 34 zusammengefasst. Wie zuvor konnte in den WT NF54 Kulturen kein signifikanter Unterschied in der Gametozytämie durch die Zugabe von 2,5 mM GlcN beobachtet werden. In der WT NF54 Kultur lag die Gametozytämie zwischen $1,8 \pm 0,15\%$ und $2,0 \pm 0,21\%$, unabhängig davon, ob die Kulturen vor oder nach Zugabe lysierter Erythrozyten mit 2,5 mM GlcN behandelt wurden. Auch in der mit 2,5 mM GlcN behandelten PNPLA1-KD Kultur, in der die PNPLA1-Proteinexpression nach der Gametozyteninduktion mit lysierten Erythrozyten konditionell herunterreguliert wurde, konnte kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten PNPLA1-KD Kultur beobachtet werden. Die Gametozytämie lag hierbei zwischen $1,9 \pm 0,24\%$ und $2,0 \pm 0,18\%$. Es wurde jedoch eine signifikant reduzierte Gametozytämie in der mit 2,5 mM GlcN behandelten PNPLA1-KD Kultur beobachtet, in der die PNPLA1-Proteinexpression vor und während der Gametozyteninduktion mit lysierten Erythrozyten konditionell durch GlcN-Behandlung herunterreguliert wurde. In der mit 2,5 mM GlcN behandelten PNPLA1-KD Kultur lag die Gametozytämie zwischen $0,7 \pm 0,19\%$ und $1,1 \pm 0,11\%$ im Gegensatz zur Gametozytämie zwischen $1,9 \pm 0,19\%$ und $1,9 \pm 1,8\%$ in der unbehandelten PNPLA1-KD Kultur.

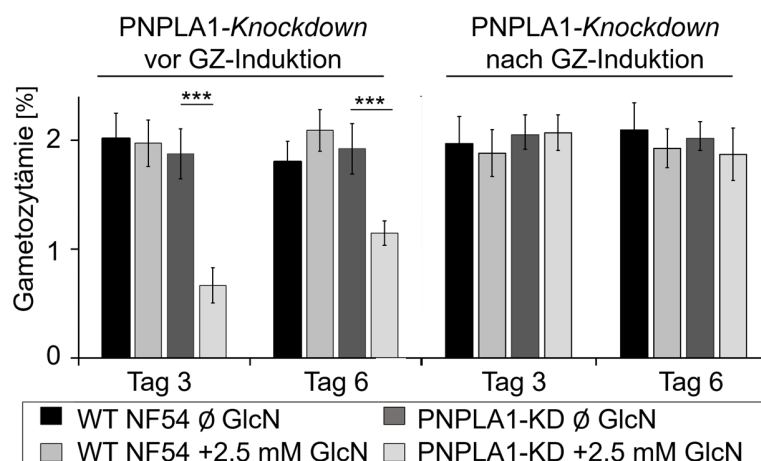


Abbildung 34 Phänotypische Charakterisierung der Gametozytenbildung nach konditionellem PNPLA1-Funktionsverlust vor und nach der Gametozyteninduktion. Synchronisierte PNPLA1-KD Kulturen wurden mit einer Ausgangsparasitämie von 2,0% angeimpft. Bei einer Parasitämie von 10,0% wurde die Gametozytenbildung durch die Zugabe lysierter Erythrozyten für 24 h induziert (Schneweis *et al.*, 1991; Ngwa *et al.*, 2017). Anschließend wurden die Kulturen zum Abtöten asexueller Parasitenstadien für fünf Tage in GlcNAc-Zellkulturmedium und im Folgenden in A+-Zellkulturmedium kultiviert (Fivelman *et al.*, 2007; Ngwa *et al.*, 2017). Die Zugabe von 2,5 mM GlcN (+2,5 mM GlcN) zur PNPLA1-KD Kultur zum Induzieren des konditionellen PNPLA1-Funktionsverlusts erfolgte entweder vor und während der Zugabe (links) oder nach dem Entfernen (rechts) der lysierten Erythrozyten (vgl. Abschnitt II.2.1.10). Die Gametozytämie ist im Vergleich zur unbehandelten PNPLA1-KD-Kultur (Ø GlcN) dargestellt. Um einen unspezifischen Effekt der GlcN-Behandlung auszuschließen, wurden parentale WT NF54 Kulturen analog angesetzt und ausgewertet. Pro Zeitpunkt wurde die Gametozytämie in 10 Gesichtsfeldern im Triplikate mit Hilfe Giemsa-gefärbter Blutaussstriche quantifiziert. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente. GlcN, D-(+)-Glucosamin Hydrochlorid. *** $p < 0,001$ (One-Way ANOVA mit Post-Hoc Bonferroni Multiple Comparison Test, modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Insgesamt führte der konditionell induzierte PNPLA1-Funktionsverlust in der PNPLA1-KD Mutante, wie zuvor in den PNPLA1-KO Mutanten beobachtet, nicht zu einer veränderten asexuellen Replikation. Jedoch konnte gezeigt werden, dass der induzierte PNPLA1-Funktionsverlust zu einer signifikant reduzierten Gametozytenbildung in der PNPLA1-KD Linie führt. Ein unspezifischer Effekt durch die GlcN-Behandlung konnte dabei durch die entsprechenden WT NF54-Kontrollen, die jeweils analog angesetzt und ausgewertet wurden, ausgeschlossen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die beobachtete reduzierte Gametozytämie nach induziertem PNPLA1-Funktionsverlust auf eine veränderte Gametozyteninduktion, nicht jedoch auf eine inhibierte Gametozytenreifung zurückzuführen ist.

III.9 Einfluss von LysoPC-defizientem Medium auf die Gametozyteninduktion in den PNPLA1-KO und -KD Mutanten

In ihrer kürzlich veröffentlichten Studie konnten Brancucci *et al.* (2017) zeigen, dass die Gametozyteninduktion in *P. falciparum* durch das Serum-freie Medium -SerM signifikant erhöht ist. Das -SerM Medium enthält neben anderen Komponenten lediglich die für den Lipidmetabolismus essentiellen Fettsäuren Palmitinsäure und Ölsäure (Mi-Ichi *et al.*, 2006, 2007).

Der beobachtete Effekt auf die Gametozyteninduktion konnte allein durch die Zugabe von LysoPC oder Cholin, Ausgangssubstrate für die plasmodiale PC-Synthese, revertiert werden (Brancucci *et al.*, 2017). So konnten die Serumbestandteile LysoPC und Cholin als erste definierte Umweltsignale identifiziert werden, die die Gametozytenbildung entweder bei Limitierung induzieren oder, wenn diese im Überschuss vorhanden sind, inhibieren (vgl. Abschnitt I.3.1). In einem weiteren Schritt sollte daher untersucht werden, wie sich die LysoPC-Limitierung auf die Gametozytenbildung bei gleichzeitigem PNPLA1-Funktionsverlust auswirkt. Daher wurden die oben beschriebenen Experimente zur phänotypischen Charakterisierung der Gametozytenbildung in den PNPLA1-KO Mutanten und der PNPLA1-KD Linie mit LysoPC-defizientem Medium wiederholt. Für die Untersuchung der Gametozytenbildung unter LysoPC-limitierenden Bedingungen in den PNPLA1-KO Linien wurden die konsekutiv synchronisierten Kulturen auf eine Parasitämie von 1,0% bei einem Hämatokrit von 5% eingestellt (vgl. Abschnitt I.3.1). 28 ± 2 h.p.i. wurden die Kulturen für 22 h zur Bildung von Gametozyten mit -SerM-Medium induziert (Brancucci *et al.*, 2015, 2017). Die weitere Kultivierung erfolgte für fünf Tage in GlcNAc-Zellkulturmedium zum Abtöten asexueller Parasiten (Fivelman *et al.*, 2007; Ngwa *et al.*, 2017). Kulturen, die anstelle von -SerM-Medium mit -SerM+LysoPC-, -SerM+Cholin- oder -SerM+Serum-Medium induziert wurden, dienten als Kontrollen. Fünf Tage nach der Gametozyteninduktion wurde die Gametozytämie in den jeweiligen Kulturen mit Hilfe von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen bestimmt (vgl. Abschnitt II.2.1.10). Die Ergebnisse sind in Abbildung 35A dargestellt. In der WT NF54 Kultur konnte erwartungsgemäß mit einer finalen Gametozytämie von $1,8 \pm 0,15\%$ eine signifikant erhöhte Gametozytenbildung unter LysoPC-limitierenden Bedingungen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollmedien ($0,4 \pm 0,25\%$, $0,5 \pm 0,21\%$ bzw. $0,5 \pm 0,28\%$) beobachtet werden. Die PNPLA1-KO Mutanten hingegen bildeten mit einer finalen Gametozytämie zwischen $0,8 \pm 0,17\%$ (PNPLA1-KO A12) und $1,0 \pm 0,26\%$ (PNPLA1-KO C11) im Vergleich zum parentalen WT NF54 erneut signifikant weniger Gametozyten, wenn diese mit LysoPC-defizientem Medium zur Bildung von Gametozyten induziert wurden.

Auch in der unbehandelten PNPLA1-KD Kultur (ohne Zugabe von GlcN) bildeten sich mit einer finalen Gametozytämie von $1,9 \pm 0,08\%$ unter LysoPC-limitierenden Bedingungen im Vergleich zu den Kontrollmedien -SerM+LysoPC ($1,1 \pm 0,05\%$) und -SerM+Cholin ($1,1 \pm 0,04\%$) signifikant mehr Gametozyten (Abbildung 35B). Wurde die PNPLA1-Proteinexpression hingegen konditionell durch die Zugabe von 2,5 mM GlcN herunterreguliert, konnte im Vergleich zur

unbehandelten PNPLA1-KD Kultur eine signifikant reduzierte Gametozytenbildung beobachtet werden. Mit einer finalen Gametozytämie von $0,9 \pm 0,06\%$ bildeten sich in der GlcN behandelten PNPLA1-KD Kultur unter LysoPC-limitierenden Bedingungen etwa gleich viele Gametozyten wie in den entsprechenden Kontrollmedien ($1,1 \pm 0,11\%$ bzw. $1,1 \pm 0,12\%$).

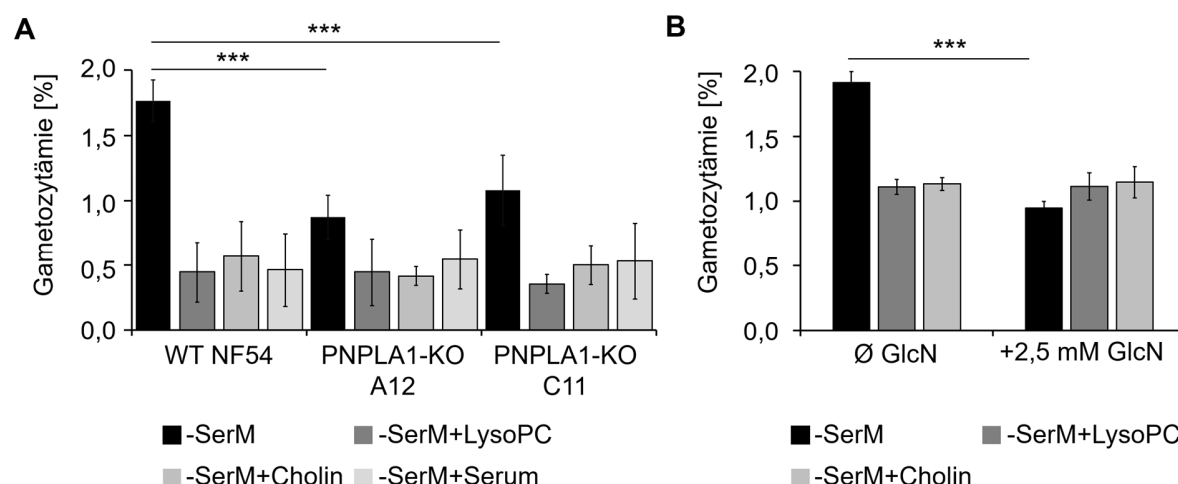


Abbildung 35 Gametozyteninduktion in den PNPLA1-KO und PNPLA1-KD Mutanten mit LysoPC-defizientem Medium. Konsekutiv synchronisierte Kulturen der (A) PNPLA1-Deletionsmutanten PNPLA1-KO A12 und C11 und der parentalen WT NF54 Linie sowie (B) der PNPLA1-KD Linie ohne (Ø GlcN) oder mit (+2,5 mM GlcN) GlcN-Behandlung wurden auf eine Parasitämie von 1,0% eingestellt und 28 ± 2 h.p.i. für 22 h mit -SerM-Medium zur Bildung von Gametozyten induziert. Die weitere Kultivierung erfolgte für fünf Tage in GlcNAc-Zellkulturmedium zum Abtöten asexueller Parasiten. -SerM+LysoPC-, -SerM+Cholin- und -SerM+Serum-Medium wurden als Kontrollen verwendet. Fünf Tage nach der Gametozyteninduktion wurde die Gametozytämie in 10 Gesichtsfeldern im Triplikate mit Hilfe Giemsa-gefärbter Blutaussstriche quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert plus Standardabweichung. Die Ergebnisse in (A) und (B) sind repräsentativ für je drei unabhängige Experimente. *** $p < 0,001$ (One-Way ANOVA mit Post-Hoc Bonferroni Multiple Comparison Test, modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

III.10 Vergleichende Transkriptanalyse zwischen WT NF54 und den PNPLA1-KO Linien

Neben einer signifikanten Erhöhung der Gametozyten-Bildung konnte zudem durch Brancucci *et al.* (2017) gezeigt werden, dass die Limitierung des Serumbestandteils LysoPC unmittelbar zu metabolischen und transkriptionellen Veränderungen innerhalb des Parasiten führt. Mit Hilfe von RNA-Gesamt-Transkription-Sequenzierungen wurden insgesamt 342 Gene identifiziert, die unter LysoPC-limitierenden Bedingungen transkriptionell hochreguliert sind, sowie 45 Gene, die unter LysoPC-limitierenden Bedingungen transkriptionell herunterreguliert sind. Neben Genen wie *ap2-g* und *gdl1*, die essenziell für die Einleitung der Gametozytogenese im Parasiten sind (vgl. Abschnitt I.3.1), konnte insbesondere auch eine Hochregulierung von Lipidstoffwechsel-assoziierten Genen gezeigt werden. Dazu zählen Gene, die für Enzyme wie EK, PMT oder für Methyl-donorproteine wie S-Adenosylmethionin-Synthase (SAMS) oder die S-Adenosylmethionin

Methyltransferase (SAMMT) codieren. Bei der Limitierung der Ausgangssubstrate Cholin und LysoPC versucht der Parasit möglicherweise dadurch die PC-Synthese über Ethanolamin und Serin zu kompensieren und die Membranhomöostase aufrechtzuerhalten.

In einem nächsten Schritt sollte daher im Rahmen dieser Arbeit per qRT-PCR untersucht werden, wie sich der PNPLA1-Funktionsverlust auf die Regulation unterschiedlicher Gene unter LysoPC-limitierenden Bedingungen auswirkt. Zur Vorbereitung der quantitativen *real-time*-RT-PCR wurden konsekutiv synchronisierte Parasiten (vgl. Abschnitt II.2.1.8) der parentalen WT NF54 Linie sowie der generierten PNPLA1-KO Linien A12 und C11 28 ± 2 h.p.i entweder mit -SerM (Gametozytogenese induzierende Bedingungen) oder mit -SerM+LysoPC (nicht-induzierende Bedingungen) kultiviert (Brancucci *et al.*, 2017). 48 ± 2 h.p.i wurden die Zellen pelletiert und zur Isolation der Gesamt-RNA in vorgewärmtes TRIzol® aufgenommen. Die isolierte RNA wurde im Folgenden in cDNA umgeschrieben und zunächst per semiquantitativer RT-PCR auf ihre Reinheit überprüft. Zur Verifizierung der Stadienspezifität wurden die Transkripte der Gene *amal* und *ccp2* amplifiziert. Das Gen *amal* codiert für das apikale Membrantigen 1, welches vorwiegend in Schizonten exprimiert wird (Peterson *et al.*, 1989). Das Gen *ccp2* hingegen codiert für das Gametozyten-spezifische Protein CCp2 (Pradel *et al.*, 2004). Als Ladekontrolle wurde das für die Fructose-bisphosphat-Aldolase codierende Gen *aldolase* verwendet. Um eine Kontamination der verwendeten cDNA mit gDNA auszuschließen, wurden die RNA-Isolate zusätzlich ohne Zugabe der reversen Transkriptase (-RT) in cDNA umgeschrieben und auf *aldolase*-Transkript untersucht. Die Ergebnisse der Reinheitskontrollen sind in Abbildung 36A dargestellt. Während sowohl für *aldolase* als auch für *amal* gleichmäßige cDNA-Mengen nachgewiesen werden konnten, wurden in den *ccp2*- und -RT-Kontrollen erwartungsgemäß kein Transkript detektiert.

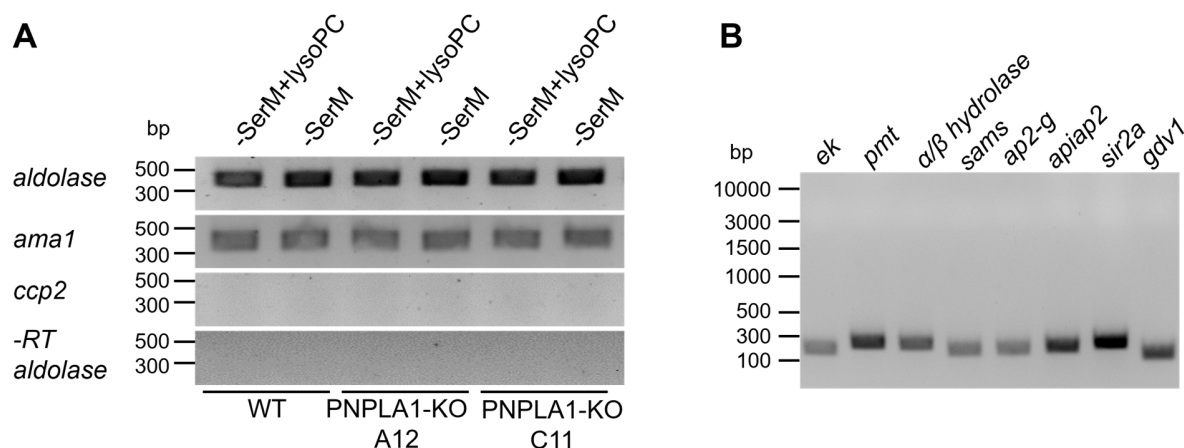


Abbildung 36 Reinheitskontrollen für die qRT-PCRs. (A) RT-PCRs zur Überprüfung der cDNA aus induzierten (-SerM) und nicht-induzierten (-SerM+LysoPC) Schizonten (48 ± 2 h.p.i.) der WT NF54 und PNPLA1-KO Linien A12 und C11. Die Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Das konstant exprimierte Referenzgen *aldolase* (378 bp) wurde als Ladekontrolle verwendet. Das in asexuellen Blutstadien exprimierte *ama1*-Gen (407 bp) sowie das Gametozyten-spezifische *ccp2*-Gen (286 bp) wurden als Stadien-spezifische Kontrollen verwendet. Eine potenzielle Kontamination der generierten cDNA mit gDNA wurde durch eine -RT (ohne reverse Transkriptase)-Kontrolle und der Amplifikation des *aldolase*-Gens (378 bp) ausgeschlossen. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige RNA-Isolationen. (B) Überprüfung der Spezifität der verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 10) für die spätere qRT-PCR. *α/β hydrolase* (243 bp), *ap2-g* (198 bp), *apiap2* (210 bp), *ek* (203 bp), *gdv1* (153 bp), *pmt* (250 bp), *sams* (197 bp), *sir2a* (238 bp). bp, Basenpaare. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Für die qRT-PCR-Analyse wurden acht Gene ausgewählt, die unter LysoPC-limitierenden Bedingungen transkriptionell hochreguliert sind. Vier der acht ausgewählten Gene codieren dabei für in der Gametozytogenese involvierte Transkriptionsfaktoren (*ap2-g*, *apiap2*, *gdv1*, *sir2a*), die übrigen vier Gene codieren hingegen für Enzyme, die mit dem Lipidmetabolismus assoziiert sind (*ek*, *pmt*, *sams*, *α/β hydrolase*). Vor der Durchführung der qRT-PCR wurde die Spezifität der Oligonukleotide (Tabelle 10) per konventioneller *GoTaq*®-PCR getestet. Die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte sind in Abbildung 36B dargestellt. Alle verwendeten Oligonukleotid-Kombinationen zeigten eine hohe Spezifität und es konnten keine weiteren, unspezifischen PCR-Produkte detektiert werden.

Per qRT-PCR wurde anschließend die Transkription der ausgewählten Gene mit den entsprechenden Oligonukleotiden amplifiziert, wobei die cDNA der induzierten (-SerM) und nicht-induzierten (-SerM+LysoPC) WT NF54 und PNPLA1-KO Kulturen als Matrice verwendet wurde. Die Ct-Werte wurden mit Hilfe des endogenen Kontrollgens, welches für die Seryl tRNA-Ligase (PF3D7_0717700) codiert, normalisiert. Um die Transkription der Gene unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen zu vergleichen, ist in Abbildung 37 das relative Verhältnis der Genexpression unter induzierenden zu nicht-induzierenden Bedingungen in den jeweiligen Zelllinien dargestellt. In der WT NF54 Linie konnte für alle untersuchten Gene unter LysoPC-

limitierenden (-SerM) Bedingungen erwartungsgemäß eine etwa 1,7-5,6-fache Hochregulierung der Genexpression im Vergleich zu nicht-limitierenden Bedingungen (-SerM+LysoPC) festgestellt werden. Während in den PNPLA1-KO Linien A12 und C11 für einige Gene eine ähnlich starke Hochregulierung detektiert werden konnte wie in der parentalen WT NF54 Linie (z.B. für *α/β hydrolase*, *ek* und *sir2a*), wurden für die Gene *ap2-g* und *pmt* im Vergleich zum parentalen WT NF54 signifikant reduzierte Transkriptlevel unter LysoPC-limitierenden Bedingungen detektiert. Für *ap2-g* lag das Verhältnis der Genexpression im WT NF54 bei $2,9 \pm 0,32$ im Gegensatz zu $2,2 \pm 0,14$ im PNPLA1-KO A12 und $1,9 \pm 0,16$ im PNPLA1-KO C11. Für *pmt* lag das Verhältnis der Genexpression im WT NF54 bei $3,2 \pm 0,17$ im Gegensatz zu $1,5 \pm 0,60$ im PNPLA1-KO A12 und $1,8 \pm 0,27$ im PNPLA1-KO C11.

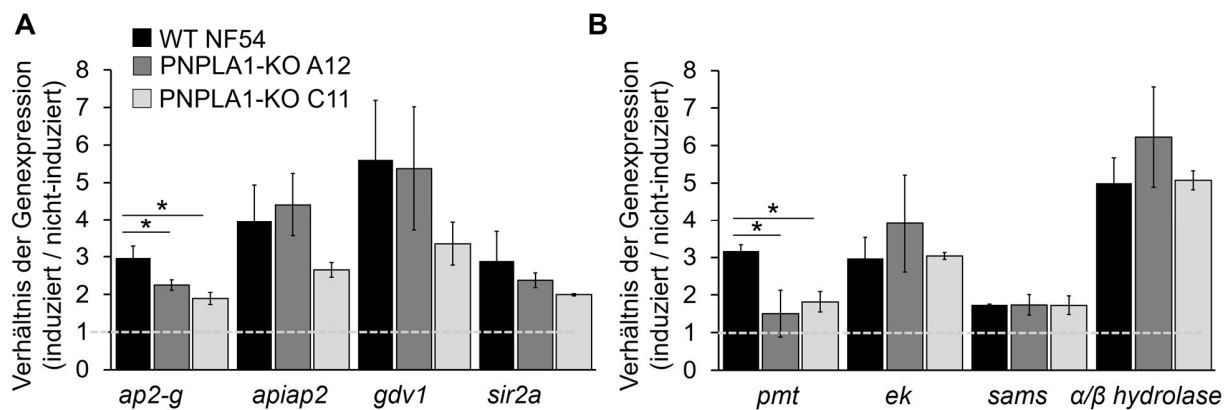


Abbildung 37 Vergleichende qRT-PCR zur Untersuchung der Regulation ausgewählter Gene unter LysoPC-limitierenden Bedingungen in der WT NF54 Linie und in den PNPLA1-KO Linien A12 und C11. Für die vergleichende Analyse wurden acht Gene ausgewählt, die unter LysoPC-limitierenden Bedingungen (-SerM, Gametozytogenese-induzierend) hochreguliert sind, davon vier Gene, die für in der Gametozytogenese involvierte Transkriptionsfaktoren codieren (A), und vier Gene, die für Lipidmetabolismus-assoziierte Enzyme/Proteine codieren (B). Die Transkriptmengen wurden 48 ± 2 h.p.i unter induzierenden (-SerM) und nicht-induzierenden Bedingungen (-SerM+LysoPC) gemessen. Die Transkriptmengen wurden mit Hilfe der 2-^{-ΔΔCT}-Methode berechnet und die Ct-Werte anhand der Ct-Werte des *Seryl tRNA-Ligase*-Gens (PF3D7_0717700) als Referenz normalisiert. Die Messungen wurden pro Linie und cDNA-Isolat im Triplikat durchgeführt. Dargestellt ist das Verhältnis der Genexpression unter induzierenden (-SerM) und nicht-induzierenden (-SerM+LysoPC) Bedingungen als Mittelwert mit Standardabweichung von drei biologisch unabhängigen Experimenten. * p < 0,05 (One-Way ANOVA mit Post-Hoc Bonferroni Multiple Comparison Test). *ap2-g*, Transkriptionsfaktor mit AP2 Domäne; *apiap2*, Transkriptionsfaktor mit AP2 Domäne; *ek*, Ethanolamin Kinase; *gdv1*, gametocyte development protein 1; *pmt*, Phosphoethanolamin-Methyltransferase; *sams*, S-Adenosylmethionin Synthetase; *sir2a*, Transkription-regulatorisches Protein Sir2A (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Insgesamt deuten die in III.9 und III.10 aufgeführten Ergebnisse darauf hin, dass durch LysoPC-limitierende Bedingungen zwar auch in den PNPLA1-defizienten Parasiten die Gametozytenbildung induziert wird. Jedoch reagierten die PNPLA1-defizienten Parasiten im Vergleich zum parentalen WT NF54 weniger sensitiv auf diese veränderten Umweltfaktoren, was zu einer signifikant geringeren Gametozytenbildung und somit zu einer geringeren absoluten Gametozytämie führte.

III.11 Der antiplasmodiale Effekt von Phospholipase-Inhibitoren

Durch die phänotypischen Charakterisierungen der PNPLA1-KO und -KD Mutanten konnte gezeigt werden, dass der PNPLA1-Funktionsverlust weder Einfluss auf die replikativen Blutstadien noch auf die im Anschluss an die Transmission stattfindende Gametogenese hat. Jedoch zeigten die bisherigen Versuche dieser Arbeit, dass der PNPLA1-Funktionsverlust zu einer signifikant verminderten Gametozytogenese führt. Diese Ergebnisse sollten im Weiteren durch eine chemische *loss-of-function* Studie unter der Verwendung von Phospholipase-spezifischen Inhibitoren verifiziert werden. Es sind eine Vielzahl kommerzieller Phospholipase-Inhibitoren verfügbar, die Phospholipasen kompetitiv und reversibel hemmen können. Da PNPLA1 durch die *in silico*-Analyse als Ca^{2+} -unabhängige PLA_2 annotiert worden ist (vgl. Abschnitt III.2), wurden für die chemischen *loss-of-function* Studien lediglich PLA_2 -spezifische Inhibitoren ausgewählt. Die in dieser Arbeit getesteten Inhibitoren sind in Tabelle 2 aufgeführt.

III.11.1 Der Einfluss von Phospholipase-Inhibitoren auf die asexuelle Replikation

Zunächst wurde der Einfluss des chemisch induzierten Funktionsverlusts auf die asexuelle Replikation von *P. falciparum* mittels Malstat-Assay untersucht. Asexuelle WT NF54 Kulturen wurden, wie in Abschnitt II.2.1.16 beschrieben, für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Phospholipase-Inhibitoren kultiviert. Im Anschluss wurde die Viabilität der Parasiten indirekt über die Aktivität der Laktatdehydrogenase mittels Malstat-Assays (vgl. Abschnitt II.2.1.16) ermittelt. Die so bestimmten antiplasmodialen IC_{50} - und IC_{90} -Konzentrationen der Phospholipase-Inhibitoren sind in Tabelle 22 aufgeführt. Als Negativkontrolle wurde eine 1%ige DMSO Lösemittelkontrolle verwendet, als Positivkontrolle wurde der Inhibitor Chloroquin eingesetzt. Während in der Lösemittelkontrolle kein inhibitorischer Effekt detektiert werden konnte, ergab sich für die Positivkontrolle Chloroquin ein durchschnittlicher IC_{50} von $12,1 \pm 1,19 \text{ nm}$ und ein durchschnittlicher IC_{90} von $108,4 \pm 10,74 \text{ nm}$ ($n=3$). Für den Inhibitor 2,4'-Dibromoacetophenon (4-BPB) konnte der höchste antiplasmodiale Effekt gemessen werden, wobei ein IC_{50} -Wert von $5,6 \pm 0,82 \text{ }\mu\text{M}$ und ein IC_{90} -Wert von $50,6 \pm 7,43 \text{ }\mu\text{M}$ bestimmt wurden. Der zweithöchste antiplasmodiale Effekt der getesteten Inhibitoren wurde für N-(p-Amylcinnamoyl) Anthranilsäure (ACA) mit einem IC_{50} von $9,8 \pm 1,81 \text{ }\mu\text{M}$ und einem IC_{90} Wert von $78,3 \pm 3,04 \text{ }\mu\text{M}$ bestimmt ($n=3$). Die beiden übrigen Inhibitoren, ASB14780 ($\text{IC}_{50}=56,9 \pm 8,85 \text{ }\mu\text{M}$, $\text{IC}_{90}=512,3 \pm 79,62 \text{ }\mu\text{M}$) und Bromoenol-Lacton ($\text{IC}_{50}=85,9 \pm 11,29 \text{ }\mu\text{M}$, $\text{IC}_{90}=773,3 \pm 101,62 \text{ }\mu\text{M}$) zeigten dagegen nur einen moderaten antiplasmodialen Effekt.

Tabelle 22 Ergebnisse der Malstat-Assays zum Test der antiplasmodialen Wirkung von Phospholipase-Inhibitoren auf die asexuelle Replikation von *P. falciparum*. Angegeben sind die IC₅₀- und IC₉₀-Konzentrationen von Chloroquin sowie der getesteten Phospholipase-Inhibitoren als Mittelwert mit Standardabweichung. Jeder Inhibitor wurde in drei biologisch unabhängigen Replikaten mit je drei technischen Replikaten getestet (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Inhibitor	IC ₅₀	IC ₉₀
Chloroquin	12,1 ± 1,19 nm	108,9 ± 10,74 nm
2,4'-Dibromoacetophenon (4-BPB)	5,6 ± 0,82 µM	50,6 ± 7,43 µM
Bromoenol-Lacton	85,9 ± 11,29 µM	773,3 ± 101,62 µM
ASB14780	56,9 ± 8,85 µM	512,3 ± 79,62 µM
N-(p-Amylcinnamoyl) Anthranilsäure (ACA)	9,8 ± 1,81 µM	78,3 ± 3,04 µM

III.11.2 Der Einfluss von Phospholipase-Inhibitoren auf die Gametozytenbildung

Im nächsten Schritt sollte der Effekt der chemischen Inhibition von Phospholipasen auf die Gametozytenbildung untersucht werden. Dafür wurden die parentale WT NF54 Kultur sowie die PNPLA1-KO Kulturen A12 und C11, wie in Abschnitt II.2.1.8 beschrieben, durch mehrere konsekutive Sorbitol-Behandlungen synchronisiert und 28 ± 2 h.p.i. für 22 h mit LysoPC-defizientem -SerM-Medium kultiviert. Gleichzeitig wurden die Kulturen entweder mit der IC₅₀-Konzentration des 4-BPB Inhibitors oder als Negativkontrolle mit einer äquivalenten Menge des Lösemittels DMSO behandelt. Anschließend wurden die Kulturen für fünf Tage in GlcNac-Zellkulturmedium zum Abtöten der asexuellen Parasitenstadien kultiviert. Fünf Tage nach der Gametozyteninduktion mit -SerM-Medium wurde in den jeweiligen Kulturen mit Hilfe von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen die Gametozytämie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38A dargestellt. In der WT NF54 Kultur konnte eine durchschnittliche Gametozytämie von $1,9 \pm 0,14\%$ detektiert werden, während in den PNPLA1-KO-Kulturen A12 und C11 wie zuvor eine signifikant reduzierte Gametozytämie von $1,2 \pm 0,30\%$ bzw. $1,3 \pm 0,24\%$ beobachtet wurde. Die gleichzeitige Behandlung mit dem Inhibitor 4-BPB führte in der WT NF54 Linie zu einer signifikant reduzierten Gametozytämie von $0,8 \pm 0,36\%$. Dahingegen konnte in den PNPLA1-KO Linien A12 und C11 kein additiver Effekt mit der 4-BPB-Behandlung beobachtet werden. Die Kulturen wiesen nach der Inhibitor-Behandlung zwar eine leicht reduzierte, jedoch nicht signifikante finale Gametozytämie im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen auf ($0,7 \pm 0,21\%$ bzw. $0,9 \pm 0,32\%$). In allen Versuchen konnte kein unspezifischer Effekt durch das Lösemittel DMSO beobachtet werden (Abbildung 38).

Ein ähnliches Ergebnis konnte in der PNPLA1-KD Kultur beobachtet werden, in der die PNPLA1 Expression konditionell durch die Behandlung mit 2,5 mM GlcN herunterreguliert wurde (Abbildung 38B). Während in den ausschließlich mit -SerM induzierten Kulturen eine durchschnittliche Gametozytämie von $1,6 \pm 0,33\%$ beobachtet wurde, wiesen die gleichzeitig mit dem Inhibitor 4-BPB behandelten Kulturen eine signifikant reduzierte Gametozytämie von $0,7 \pm 0,02\%$ auf. In den Kulturen, in denen die PNPLA1-Expression konditionell durch die Behandlung mit 2,5 mM GlcN herunterreguliert wurde, konnte im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen eine signifikant reduzierte Gametozytämie von $0,8 \pm 0,11\%$ (-SerM+2,5 mM GlcN) beobachtet werden. Jedoch konnte mit einer finalen Gametozytämie von $0,8 \pm 0,05\%$ erneut kein additiver Effekt durch die zusätzliche Behandlung mit dem 4-BPB gezeigt werden (-SerM+4-BPB+2,5 mM GlcN).

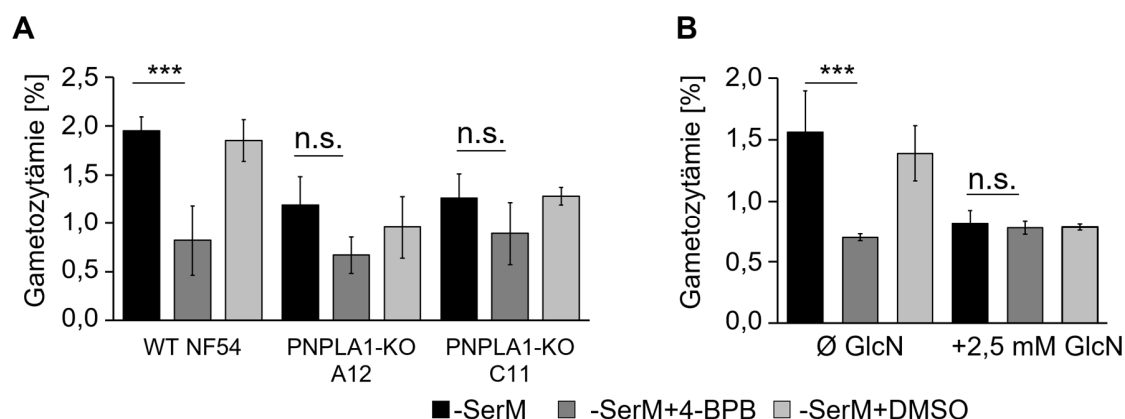


Abbildung 38 Einfluss des Phospholipase-Inhibitors 4-BPB auf die Gametozyteninduktion in *P. falciparum*. (A) Konsekutiv synchronisierte WT NF54 und PNPLA1-KO A12 und C11 Kulturen wurden 28 ± 2 h.p.i. für 22 h mit LysoPC-defizientem -SerM Medium zur Induktion der Gametozytogenese kultiviert. Gleichzeitig wurden die Kulturen entweder mit dem Inhibitor 4-BPB ($IC_{50} = 5,6 \pm 0,82 \mu M$) oder mit dem Lösemittel DMSO (1% v/v) behandelt. Die finale Gametozytämie wurde nach fünf Tagen GlcNac Behandlung (zum Abtöten asexueller Parasiten) ausgewertet. Angegeben ist der Mittelwert plus Standardabweichung von drei unabhängigen biologischen Replikaten. (B) Der Effekt des Phospholipase-Inhibitors 4-BPB wurde wie in (A) in der PNPLA1-KD Linie getestet. Die PNPLA1-Expression wurde konditionell mit 2,5 mM GlcN herunterreguliert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei (A) bzw. zwei (B) unabhängige Experimente. *** $p < 0,001$ (One-Way ANOVA mit Post-Hoc Bonferroni Multiple Comparison Test). 4-BPB, 2,4'-Dibromoacetophenon; GlcN, D-(+)-Glucosamin Hydrochlorid; -SerM, LysoPC-defizientes Medium zur Induktion der Gametozytenbildung (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass 4-BPB die Aktivität von PNPLA1 spezifisch während der Gametozyteninduktion inhibiert und der zuvor gezeigte Einfluss des PNPLA1-Funktionsverlust auf die Gametozyteninduktion durch chemische Inhibitoren gemimt werden kann.

III.11.3 Der Einfluss von Phospholipase-Inhibitoren auf die Gametozytenreifung

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss der Phospholipase-Inhibitoren auf die Gametozytenreifung mittels Gametozyten-Toxizitäts-Assay untersucht (vgl. Abschnitt II.2.1.11). Hierfür wurde eine WT NF54 Kultur entsprechend Abschnitt II.2.1.1 kultiviert. Sobald mit Hilfe von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen die ersten Stadium II-Gametozyten in den Kulturen detektiert werden konnten, wurde die Kultur aufgeteilt und in eine 24-Kavität-Mikrotiterplatte überführt, wobei für jeden zu testenden Inhibitor ein Gesamtvolumen von 1 ml pro Kavität im Triplikat vorgelegt wurde. Ebenfalls wurden für die entsprechende Negativ-Lösemittelkontrolle (DMSO) sowie für die Epoxomicin-Positivkontrolle entsprechende Kulturen vorgelegt. Epoxomycin ist ein Proteasom-Inhibitor, der zuvor in DMSO verdünnt wurde (Czesny *et al.*, 2009). Die Kulturen wurden anschließend für 48 h mit den in Tabelle 22 angegebenen Inhibitor-Konzentrationen für 4-BPB und ACA kultiviert, für die Positivkontrolle wurde eine finale Konzentration von 60 nM Epoximicin verwendet. Die Analyse der Gametozyten-Entwicklung erfolgte an Tag 10 nach Versuchsbeginn. Dabei wurde jeweils sowohl die finale Gametozytämie als auch der relative Anteil der Stadium IV- und Stadium V-Gametozyten bestimmt. Die

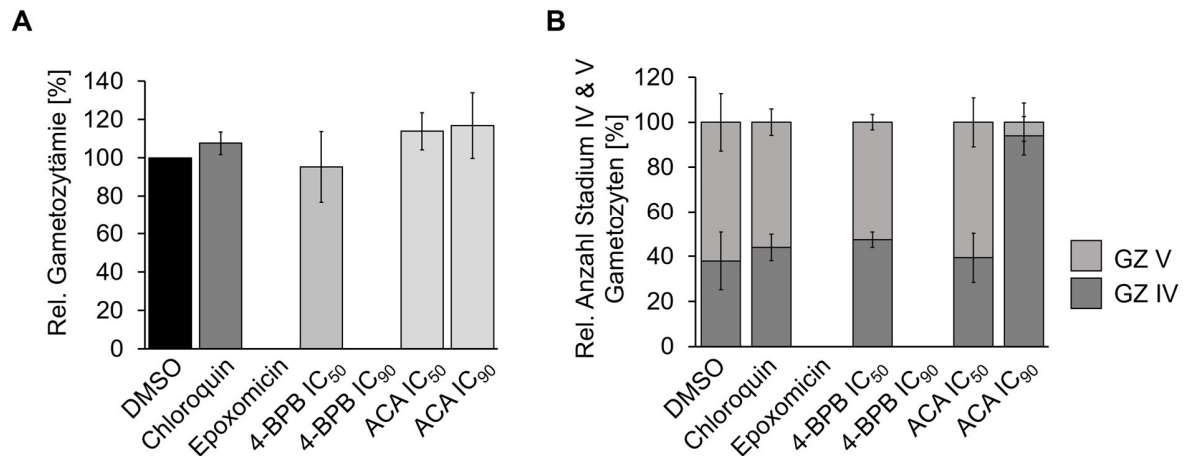


Abbildung 39 Einfluss von Phospholipase-Inhibitoren auf die Gametozytenentwicklung von *P. falciparum*. Der Effekt von 4-BPB und ACA auf die Entwicklung der Gametozyten der WT NF54 Linie wurde durch den Gametozyten-Toxizitäts-Assay analysiert. Unreife Stadium II-Gametozyten wurden für 48 h mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt. Die Gametozytämie (**A**) sowie der relative Anteil der Stadium IV- und V-Gametozyten (**B**) wurden an Tag 10 mit Hilfe Giemsa-gefärbter Blutaussstriche in je 1000 Erythrozyten evaluiert. Der Proteasom-Inhibitor Epoxomicin (60 nM) wurde als Positivkontrolle verwendet, das Lösemittel DMSO (1% v/v) und Chloroquin (12,1 nM) wurden als Negativkontrolle verwendet. Die Lösemittelkontrolle wurde als 100% festgelegt. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen biologischen Replikaten, wobei jedes biologische Replikat in drei technischen Replikaten wiederholt wurde. 4-BPB, 2,4'-Dibromoacetophenon ($IC_{50}=5,6 \pm 0,82 \mu M$, $IC_{90}=50,6 \pm 7,43 \mu M$); ACA, N-(p-Amylcinnamoyl) Anthranilsäure ($IC_{50}=9,8 \pm 1,81 \mu M$, $IC_{90}=78,3 \pm 3,04 \mu M$); DMSO, Dimethylsulfoxid. Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Atscharah Panyot, im Rahmen ihrer während dieser Arbeit betreuten Masterarbeit, generiert; Eigenanteil: 50% (teilweise modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt. Die Behandlung der Kulturen mit den IC₅₀-Konzentrationen von 4-BPB und ACA führte zu einer unveränderten Gametozytämie und relativen Verteilung der Stadium IV- und V-Gametozyten im Vergleich zur Lösemittel- und Chloroquin-Negativkontrolle (Abbildung 39A). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der Kulturen mit der IC₉₀-Konzentration von 4-BPB zu einem vollständigen Absterben der Gametozyten, da bei der Auswertung an Tag 10 keine Gametozyten mehr in den Kulturen detektiert werden konnten. Die Behandlung der Kulturen mit der IC₉₀-Konzentration von ACA führte zwar zu einer unveränderten Gametozytämie im Vergleich zu den Lösemittel- und Chloroquin-Negativkontrollen, allerdings wurde an Tag 10 eine signifikant reduzierte Anzahl an Stadium V-Gametozyten detektiert (Abbildung 39B). In der Epoxomicin-Positivkontrolle war die Bildung von Gametozyten erwartungsgemäß vollständig inhibiert (Czesny *et al.*, 2009; Aminake *et al.*, 2011).

III.11.4 Der Einfluss von Phospholipase-Inhibitoren auf die Gametogenese

Abschließend wurde auch der Effekt der Phospholipase-Inhibitoren auf die Gametogenese bzw. auf die Bildung männlicher Mikrogameten untersucht. Dazu wurden reife Gametozyten der WT NF54 Linie für 15 min bei 37°C mit den IC₅₀-Konzentrationen des 4-BPB-Inhibitors bzw. des ACA-Inhibitors inkubiert. Im Anschluss an die Inhibitor-Behandlung wurden die Gametozyten *in vitro* mit 100 µM XA bei RT aktiviert und die Anzahl der sich bildenden Mikrogameten im Exflagellationsassay lichtmikroskopisch bestimmt (vgl. Abschnitt II.2.1.12). 1%iges DMSO wurde als Lösemittel-Negativkontrolle verwendet, der Inhibitor Tosyl-L-lysyl-Chlormethylketon-Hydrochlorid (TLCK) mit einer finalen Konzentration von 30 µM wurde als Positivkontrolle verwendet. TLCK ist ein Cystein/Serin Protease-Inhibitor, der die Gametogenese von *P. falciparum* inhibiert (Rupp *et al.*, 2008). Die Ergebnisse der Exflagellations-Inhibitions-Analyse sind in Abbildung 40 dargestellt, wobei die Anzahl der Mikrogameten in den mit den Inhibitoren behandelten Kulturen in Relation zur Anzahl der Mikrogameten (100%) in der Lösemittelkontrolle gesetzt wurde. Die Behandlung mit dem 4-BPB-Inhibitor führte sowohl bei der Verwendung der IC₅₀- als auch der IC₉₀-Konzentration zu einer signifikant reduzierten Anzahl an Exflagellationszentren. Bei der IC₅₀-Konzentration war die relative Anzahl der Exflagellationszentren auf $39,4 \pm 12,09\%$ reduziert, bei der Verwendung der IC₉₀ Konzentration konnte sogar eine Reduktion der Exflagellationszentren auf $3,1 \pm 1,52\%$ ermittelt werden. Nach der Behandlung mit dem ACA-Inhibitors war die Anzahl der Exflagellationszentren auf $89,5 \pm 6,51\%$ (IC₅₀) und $54,5 \pm 9,87\%$ (IC₉₀) reduziert. In der Positivkontrolle mit dem TLCK-

Inhibitor war die Bildung der Mikrogameten wie zu erwarten nahezu vollständig inhibiert (Rupp *et al.*, 2008; Ngwa *et al.*, 2017).

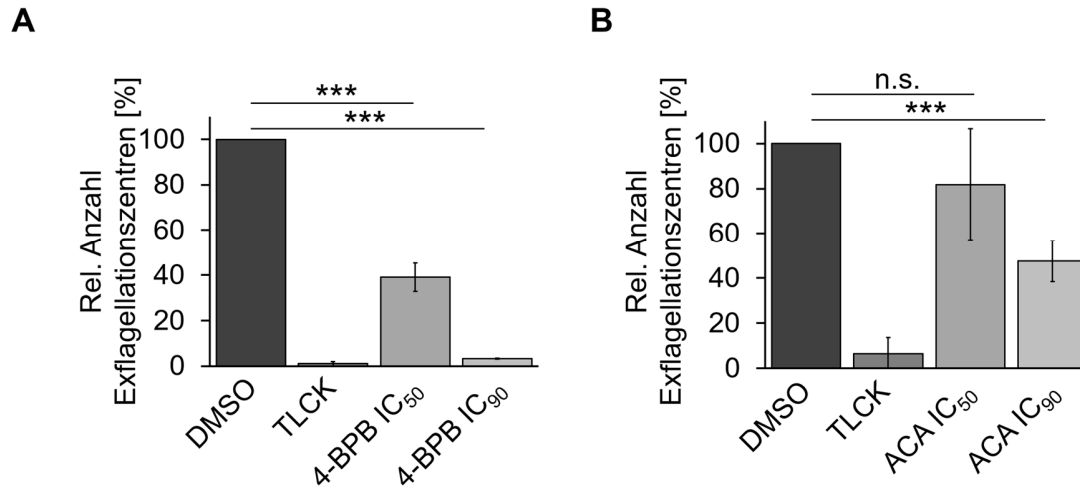


Abbildung 40 Einfluss von Phospholipase-Inhibitoren auf die Bildung von Mikrogameten in *P. falciparum*. Reife Stadium V-Gametozyten der WT NF54 Linie wurden mit den IC₅₀- und IC₉₀-Konzentrationen der Inhibitoren 4-BPB (**A**) und ACA (**B**) für 15 min inkubiert und anschließend *in vitro* aktiviert. Die Anzahl der Mikrogameten in den mit den Inhibitoren behandelten Kulturen wurde in Relation zur Anzahl der Mikrogameten in der DMSO-Lösemittelkontrolle (100%) gesetzt. Der Cystein/Serin-Protease Inhibitor TLCK (30 µM) wurde als Positivkontrolle verwendet. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen biologischen Replikaten. n.s., nicht signifikant; *** p < 0,001 (One-Way ANOVA mit Post-Hoc Bonferroni Multiple Comparison Test). 4-BPB, 2,4'-Dibromoacetophenon (IC₅₀=5,6 ± 0,82 µM, IC₉₀=50,6 ± 7,43 µM); ACA, N-(p-Amylcinnamoyl) Anthranilsäure (IC₅₀=9,8 ± 1,81 µM, IC₉₀=78,3 ± 3,04 µM); DMSO, Dimethylsulfoxid; TLCK, Na-Tosyl-L-Lysine Chlormethylketon-Hydrochlorid. Die Ergebnisse wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Sofia Basova generiert; Eigenanteil: 70%.

III.12 Funktionale Charakterisierung von PNPLA1 durch episomale Überexpression

In den folgenden Experimenten sollte zum einen mit Hilfe der episomalen Expression eines PNPLA1-GFP Fusionsproteins PNPLA1 weiter charakterisiert werden, zum anderen sollte überprüft werden, ob der funktionale Verlust von PNPLA1 und der daraus resultierende Phänotyp durch die Komplementation revertiert werden kann. Für die episomale Expression wurde der pARLII-GFP Vektor in zwei Variationen verwendet: Im pARLII-*crt*-GFP Vektor (Abbildung 58) ist die episomale Expression des Zielproteins unter der Kontrolle des *crt*-Promoters, der in *P. falciparum* die Expression des *Chloroquin Resistenz Transporter*-Proteins reguliert und hauptsächlich in asexuellen, aber auch minimal in sexuellen Blutstadien aktiv ist (Przyborski *et al.*, 2005; Spork *et al.*, 2009; Külzer *et al.*, 2010). Im pARLII-*fnpa*-GFP Vektor (Abbildung 59) ist die episomale Expression des Zielproteins unter der Kontrolle des Gametozyten-spezifischen *fnpa*-Promotors, der in *P. falciparum* die Expression des *PfFNPA* Proteins reguliert (Pradel *et al.*, 2004; Bennink *et al.*, 2018). Das Zielprotein wird in beiden Variationen episomal als Fusionsprotein mit

einem C-terminalen GFP-Tag (*green fluorescent protein*) exprimiert, wobei der Vektor nicht in das Genom von *P. falciparum* integriert. Die beiden Vektoren sowie die Transkriptionsdaten für *crt* und *fnpa* sind in Abbildung 41 schematisch dargestellt. Für die Klonierung der Vektor-Konstrukte wurde plasmidiale cDNA als Matrize verwendet. Nach der Klonierung wurden die generierten Konstrukte zur Überprüfung der Integrität sequenziert und per Transfektion in *P. falciparum* eingebracht. Die so generierten Zelllinien werden im Folgenden als *crt*- bzw. *fnpa*-PNPLA1-GFP/WT bezeichnet. Nach dem Anwachsen der Kulturen wurden die Transfektanten auf DNA-Ebene hinsichtlich der erfolgreichen Plasmid-Aufnahme sowie auf Protein-Ebene hinsichtlich der Stadien-spezifischen PNPLA1-GFP Expression verifiziert.

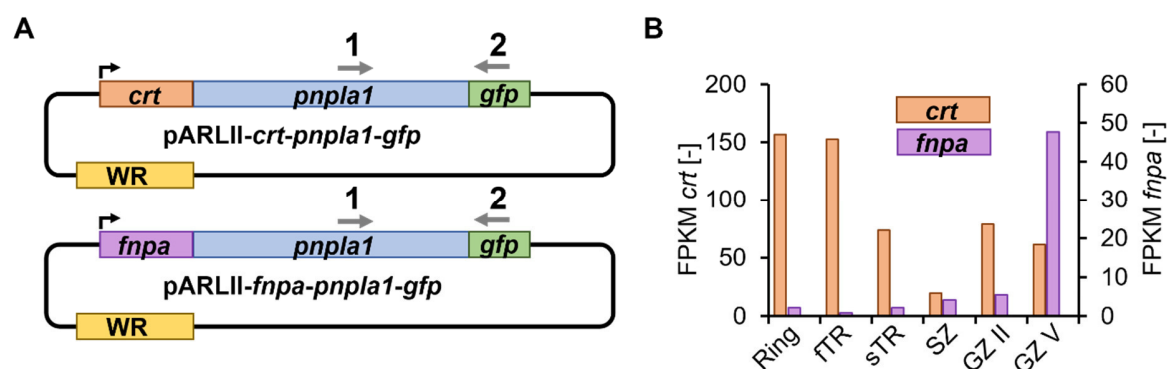


Abbildung 41 Schematische Darstellung des pARLII-*crt-pnpla1-gfp*- sowie des pARLII-*fnpa-gfp*-Vektors für die episomale Expression von PNPLA1-GFP. (A) Der episomale Vektor integriert nicht in das Genom von *P. falciparum*. Die zur Analyse der Plasmidaufnahme verwendeten Oligonukleotide sind mit nummerierten Pfeilen angedeutet (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019). (B) Transkriptionsdaten für *crt* und *fnpa* in den asexuellen und sexuellen Blutstadien von *P. falciparum* laut der *Plasmodium* Datenbank PlasmoDB (López-Barragán *et al.*, 2011; Lasonder *et al.*, 2016). *crt*, Promotor für den Chloroquin Resistenz Transporter (PF3D7_0709000); *fnpa*, Promotor für das FNPA Protein (PF3D7_1451600); FPKM, Angabe zum Transkriptionslevel (engl. *fragments per kilobase of exon model per million mapped reads*); *gfp*, Gensequenz für grün-fluoreszierendes Protein; GZ II/V, Gametozyten Stadium II/V; SZ, Schizont; (f/s)TR, (früher/später) Trophozoit; WR, Gen für die humane Dihydrofolatreduktase (hDHFR), das eine Resistenz gegenüber WR92210 vermittelt.

III.12.1 Verifizierung der pARLII-*crt-fnpa-pnpla1-gfp* Plasmidaufnahme

Die erfolgreiche Plasmid-Aufnahme der *crt*-/*fnpa*-PNPLA1-GFP/WT Linien wurde mittels diagnostischer PCR verifiziert. Dazu wurde die parasitäre DNA aus gemischten asexuellen Kulturen der jeweiligen Transfektanten und des parentalen WT NF54 isoliert und das Vorhandensein des jeweiligen Vektors mit Hilfe der in Tabelle 12 angegebenen Oligonukleotid-Kombinationen überprüft (vgl. Abbildung 41A). Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und sind in Abbildung 42 dargestellt. Während in der WT NF54-Kontrolle das entsprechende Fragment nicht detektiert werden konnte, wurde in den *crt*-/*fnpa*-PNPLA1-GFP/WT Linien eine erfolgreiche Plasmid-Aufnahme bestätigt (1108 bp). Die für die

Transfektion verwendeten Plasmide wurden zusätzlich als Matrize verwendet und dienten als Positivkontrolle der diagnostischen PCR.

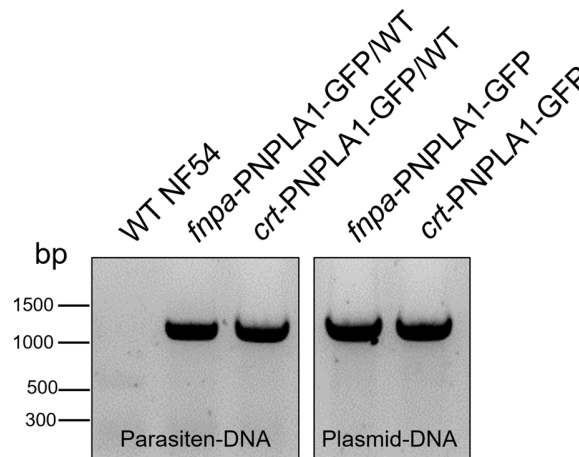


Abbildung 42 Diagnostische PCR zum Nachweis der Plasmidaufnahme in den *crt-fnpa*-PNPLA1-GFP/WT Linien. Die parasitäre Gesamt-DNA wurde aus gemischten asexuellen Kulturen des parentalen WT NF54 sowie aus den beiden *crt-fnpa*-PNPLA1-GFP Linien isoliert und die pARLII-*crt-fnpa-pnplA1-gfp* Vektorkonstrukte mittels diagnostischer PCR nachgewiesen (1108 bp). Die für die Transfektion verwendeten Vektorkonstrukte wurden als Positivkontrolle verwendet (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019). Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Atscharah Panyot, im Rahmen ihrer während dieser Arbeit betreuten Masterarbeit, generiert; Eigenanteil: 35%.

III.12.2 Verifizierung der PNPLA1-GFP Expression auf Proteinebene

Im Weiteren wurde die Stadien-spezifische Expression des PNPLA1-GFP Proteins via Western Blot-Analyse und Lebendmikroskopie nachgewiesen. Für die Verifizierung der Proteinexpression via Western Blot-Analyse wurden Lysate von asexuellen Blutstadien der *crt*-PNPLA1-GFP/WT und der WT NF54 Linien als auch von Stadium V-Gametozyten der *fnpa*-PNPLA1-GFP/WT und der WT NF54 Linien generiert und per SDS-PAGE aufgetrennt. Das Lysat nicht-infizierter Erythrozyten wurde als Negativkontrolle verwendet, das Lysat einer asexuellen 7-Helix-1-GFP-Parasitenkultur wurde freundlicherweise von Frau Dr. Bennink zur Verfügung gestellt und als Positivkontrolle eingesetzt. Die GFP-Fusionsproteine wurde mit Hilfe eines α -GFP-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse sind in Abbildung 43 dargestellt. In den Lysaten der asexuellen Kulturen konnte für *crt*-PNPLA-GFP/WT eine spezifische Bande bei ~105 kDa detektiert werden, während keine Banden in dem Lysat der parentalen WT NF54 Linie detektiert wurden. 7-Helix-1-GFP wurde erwartungsgemäß auf einer Höhe von ~104 kDa detektiert, während in dem Lysat der nicht-infizierten Erythrozyten keine GFP-spezifische Bande nachgewiesen werden konnte. In den Lysaten der Gametozyten-Kulturen wurde in dem Lysat der *fnpa*-PNPLA1-GFP/WT Linie eine spezifische Bande auf der Höhe von

~105 kDa detektiert, nicht jedoch in dem Lysat der parentalen WT NF54 Linie. Die Integrität der verwendeten Lysate als auch die gleichmäßige Beladung wurden mittels des konstant exprimierten Referenzproteins *Pf39* durch eine entsprechende Bande auf einer Höhe von ~39 kDa demonstriert.

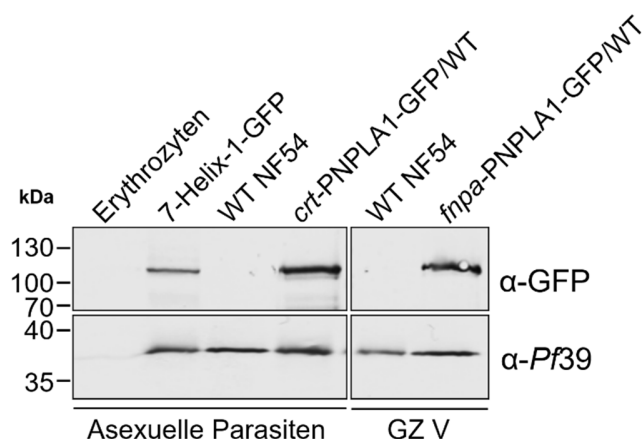


Abbildung 43 Western Blot-Analyse zur Verifizierung der episomalen Expression des PNPLA1-GFP Proteins in den *crt*-/*fnpa*-PNPLA1-GFP/WT Linien. Die Western Blot-Analyse zeigt die Expression des PNPLA1-GFP Proteins (~105 kDa) in asexuellen Blutstadien der *crt*-PNPLA1-GFP Linie und in Stadium V-Gametozyten der *fnpa*-PNPLA1-GFP Linie im Vergleich zum konstant exprimierten *Pf39* Referenzprotein (~39 kDa). Nicht-infizierte Erythrozyten und Parasiten der parentalen WT NF54 Linie wurden als Negativkontrolle verwendet, Lysat einer 7-Helix-1-GFP Linie (freundlicherweise von Frau Dr. Bennink zur Verfügung gestellt) wurde als Positivkontrolle verwendet (~104 kDa). Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Eigenanteil: 35%.

Zur Verifizierung der *crt*-/*fnpa*-PNPLA1-GFP/WT Linien via Lebendmikroskopie wurde die Eigenfluoreszenz des GFP-Tags genutzt. Hierfür wurden gemischte asexuelle Blutstadien oder gemischte Gametozyten-Kulturen (Stadium II-V) für 5 min bei 37°C mit Hoechst33342 inkubiert und anschließend auf einen Objektträger gegeben. Zur Visualisierung der Fluoreszenz wurden die Parasiten mit einem Deckglas abgedeckt und lichtmikroskopisch unter der Anregung mit Licht mit einer Wellenlänge von 340 nm (Hoechst33342) bzw. 488 nm (GFP) ausgewertet. Die Parasiten selbst wurden durch den Differentialinterferenzkontrast (DIK) dargestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44A dargestellt. Für die *crt*-PNPLA1-GFP Linie konnte die stärkste Fluoreszenz in den asexuellen Ring- und Trophozystenstadien detektiert werden, während die asexuellen Schizonten sowie die Gametozyten Stadium II-V eine wesentlich schwächere Fluoreszenz aufwiesen. Dies stimmt mit den auf der *Plasmodium*-Datenbank PlasmoDB hinterlegten Transkriptionsdaten für das CRT Protein unter der Kontrolle des *crt*-Promoters überein (vgl. Abbildung 41B). Der *fnpa*-Promoter der *fnpa*-PNPLA1-GFP/WT Linie ist nur in den Gametozytenstadien aktiv (vgl. Abbildung 41B). In der Lebensmikroskopie der *fnpa*-PNPLA1-GFP Linie wurde daher die Expression des Fusionsproteins ausschließlich in den Gametozytenstadien detektiert, nicht jedoch

in den asexuellen Parasitenstadien. In der WT NF54 konnte erwartungsgemäß keine GFP-Expression detektiert werden (Abbildung 44B). Sowohl unter der Kontrolle des *crt*-Promoters als auch unter der Kontrolle des *fnpa*-Promoters konnte für das PNPLA1-GFP-Protein eine zytosolische Lokalisation beobachtet werden, was die vorherigen IFA-Ergebnisse bestätigt (vgl. Abbildung 14).

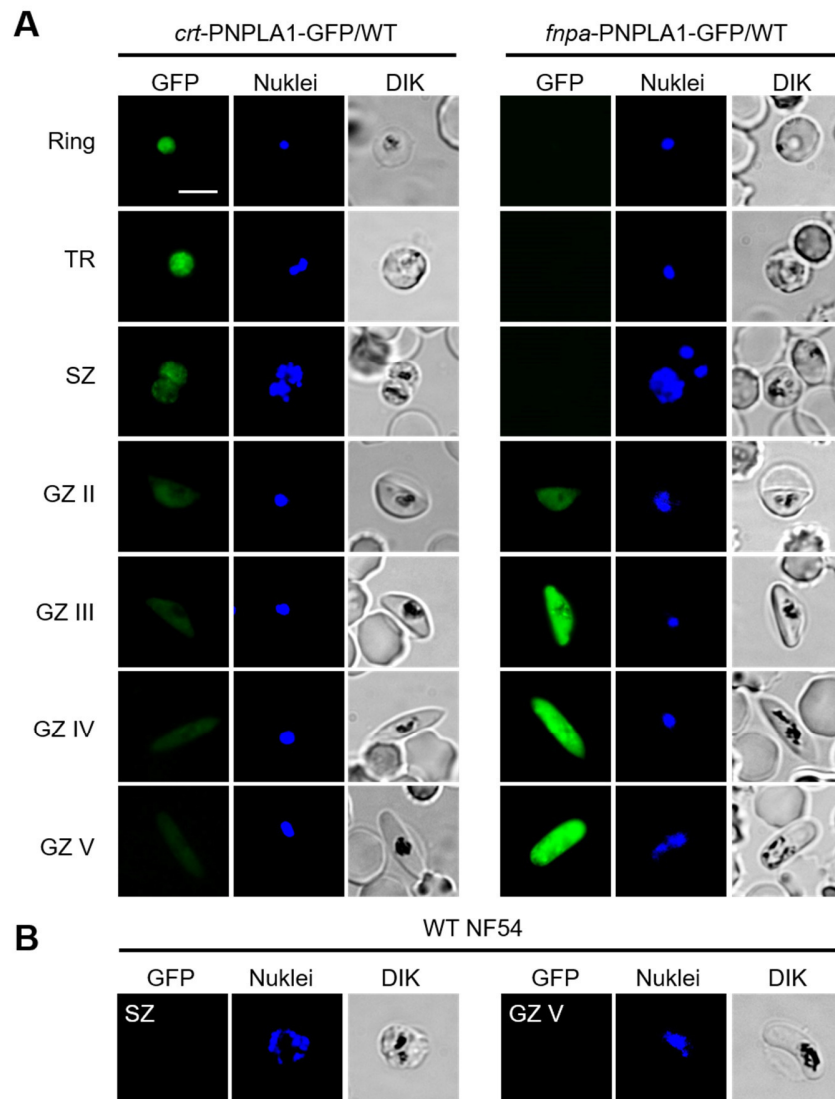


Abbildung 44 Verifizierung der *crt*-*fnpa*-PNPLA1-GFP/WT Linien mittels Lebendmikroskopie. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen die Fluoreszenz der PNPLA1-GFP Proteine in den asexuellen und sexuellen Blutstadien der *crt*-PNPLA1-GFP/WT (links) und in der *fnpa*-PNPLA1-GFP/WT Linie (rechts). Die Fluoreszenz der GFP-markierten Fusionsproteine wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und ist in grün dargestellt. Die Nuklei wurden mit Hoechst33342 visualisiert und sind in blau dargestellt. **(B)** Die asexuellen und sexuellen Blutstadien der parentalen WT NF54 Linie zeigen keine GFP-spezifische Fluoreszenz. Der Größenmaßstab entspricht 5 µm. DIK, Differentialinterferenzkontrast; GFP, grün-fluoreszierendes Protein. Die Ergebnisse in **(A)** und **(B)** sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente (teilweise modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019). Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Atscharah Panyot, im Rahmen ihrer während dieser Arbeit betreuten Masterarbeit, generiert; Eigenanteil: 35%.

III.13 Phänotypische Analyse der *crt-/fnpa*-PNPLA1-GFP/WT Linien

Nach der erfolgreichen Generierung der *crt-/fnpa*-PNPLA1-GFP/WT Linien mit anschließender Verifizierung der episomalen Expression auf Proteinebene, sollte zunächst der Einfluss der episomalen PNPLA1-Expression auf mögliche morphologische Veränderungen während der asexuellen Replikation und der Gametozytogenese untersucht werden. Daher wurden von den verschiedenen Stadien Giemsa-gefärbte Blutaussstriche angefertigt und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Die Ergebnisse sind beispielhaft für jedes Stadium in Abbildung 45 dargestellt. Die morphologische Untersuchung zeigt, dass die episomale Expression des PNPLA1-Proteins keinen Einfluss auf die Morphologie der asexuellen und sexuellen Blutstadien hat und der Parasit in der Lage ist sich in reife Stadium V-Gametozyten zu differenzieren.

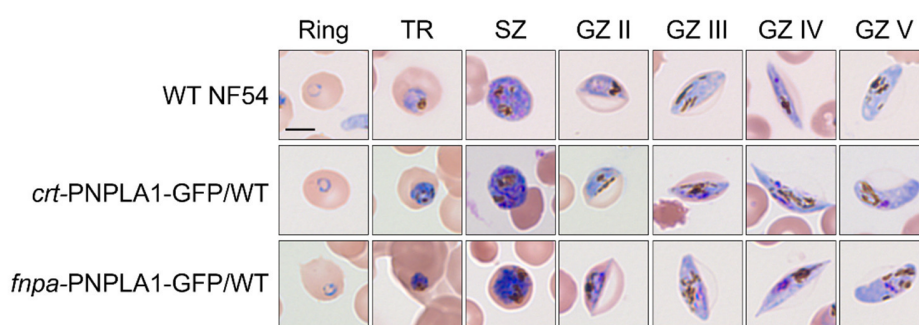


Abbildung 45 Morphologische Untersuchung von asexuellen und sexuellen Parasiten der *crt-/fnpa*-PNPLA1-GFP/WT Linien. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Giemsa-gefärbten Blutaussstriche zeigen die Morphologie von Ringstadien, Trophozoiten (TR), Schizonten (SZ) und Gametozyten Stadium II-V der *crt*-PNPLA1-GFP/WT und *fnpa*-PNPLA1-GFP/WT Linien im Vergleich zur parental WT NF54 Linie sowie. Der Größenmaßstab entspricht 5 μ m (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019). Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Atscharah Panyot, im Rahmen ihrer während dieser Arbeit betreuten Masterarbeit, generiert; Eigenanteil: 35%.

Da der Funktionsverlust von PNPLA1 zu einer signifikant verringerten Bildung von Gametozyten führt, sollte im Folgenden der Einfluss der episomalen PNPLA1-Expression auf die Gametozytenbildung genauer untersucht werden. Daher wurden konsekutiv synchronisierte Kulturen der WT NF54 Linie sowie der *crt-/fnpa*-PNPLA1-GFP/WT Linien wie zuvor beschrieben 28 ± 2 h.p.i. für 22 h mit -SerM-Medium induziert und im Weiteren zum Abtöten der asexuellen Parasitenstadien für fünf Tage mit GlcNac-Medium kultiviert (vgl. Abschnitt II.2.1.10). Die Gametozytämie der jeweiligen Kulturen wurde nach fünf Tagen quantifiziert und in Abbildung 46 vergleichend dargestellt. Während in der WT NF54 und in der *fnpa*-PNPLA1-GFP/WT mit $1,4 \pm 0,22\%$ bzw. $1,4 \pm 0,26\%$ eine ähnliche Anzahl von Gametozyten gebildet wurde, konnte in der *crt*-PNPLA1-GFP/WT eine signifikant erhöhte Gametozytämie beobachtet werden. Bei einer finalen Gametozytämie von $2,9 \pm 0,34\%$ hatten sich etwa doppelt so viele Gametozyten gebildet

wie in der WT NF54-Kontrolllinie. In der *crt*-PNPLA1-GFP/WT Linie wird das PNPLA1-Protein in den asexuellen Parasiten episomal unter der Kontrolle des *crt*-Promoters überexprimiert, was die potenzielle Funktion in der Gametozyteninduktion unterstreicht.

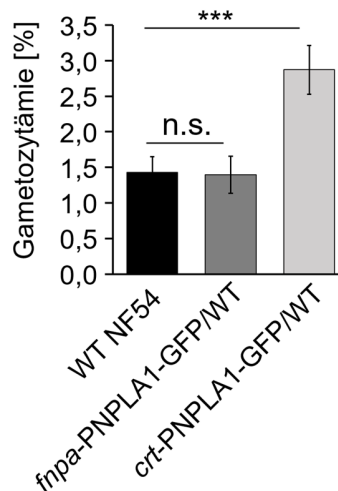


Abbildung 46 Einfluss der episomalen PNPLA1-GFP Expression auf die Gametozyteninduktion. Synchronisierte Kulturen mit 1%iger Parasitämie der WT NF54 Linie sowie der *crt*/*fnpa*-PNPLA1-GFP/WT Linien wurden 28 ± 2 h.p.i. für 22 h mit -SerM induziert und im Weiteren zum Abtöten der asexuellen Parasitenstadien für 5 Tage mit GlcNac-Medium kultiviert. Die Gametozytämie wurde an Tag fünf nach der Induktion mit dem LysoPC-defizientem Medium mit Hilfe Giemsa-gefärbter Blutaussstriche quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei biologisch unabhängigen Replikaten. n.s., nicht signifikant; *** $p < 0,001$ (One-Way ANOVA mit Post-Hoc Bonferroni Multiple Comparison Test, modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019). Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Atscharah Panyot, im Rahmen ihrer während dieser Arbeit betreuten Masterarbeit, generiert; Eigenanteil: 35%.

III.14 Komplementation der PNPLA1-KO Mutanten durch episomale Expression von PNPLA1-GFP

III.14.1 Verifizierung der PNPLA1-KO (*crt*/*fnpa*Komp) Linien

Da ein signifikanter Effekt der episomalen PNPLA1-Expression auf die Gametozytenbildung beobachtet werden konnte, sollte ferner überprüft werden, ob der PNPLA1-Funktionsverlust in den PNPLA1-KO Linien und der daraus resultierende Phänotyp durch Komplementation revertiert werden kann. Daher wurden die pARLII-*crt*/*fnpa*-*pnplA1*-*gfp* Vektor-Konstrukte zusätzlich per Transfektion in die PNPLA1-KO C11 Linie eingebracht. Die so generierten Linien werden im Folgenden den jeweiligen Stadien-spezifischen Promotoren entsprechend als PNPLA1-KO (*crt*Komp) bzw. PNPLA1-KO (*fnpa*Komp) bezeichnet. Die erfolgreiche Plasmidaufnahme wurde mittels diagnostischer PCR verifiziert. Für die diagnostischen PCRs wurden die in Tabelle 12 aufgeführten Oliogonukleotide verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-

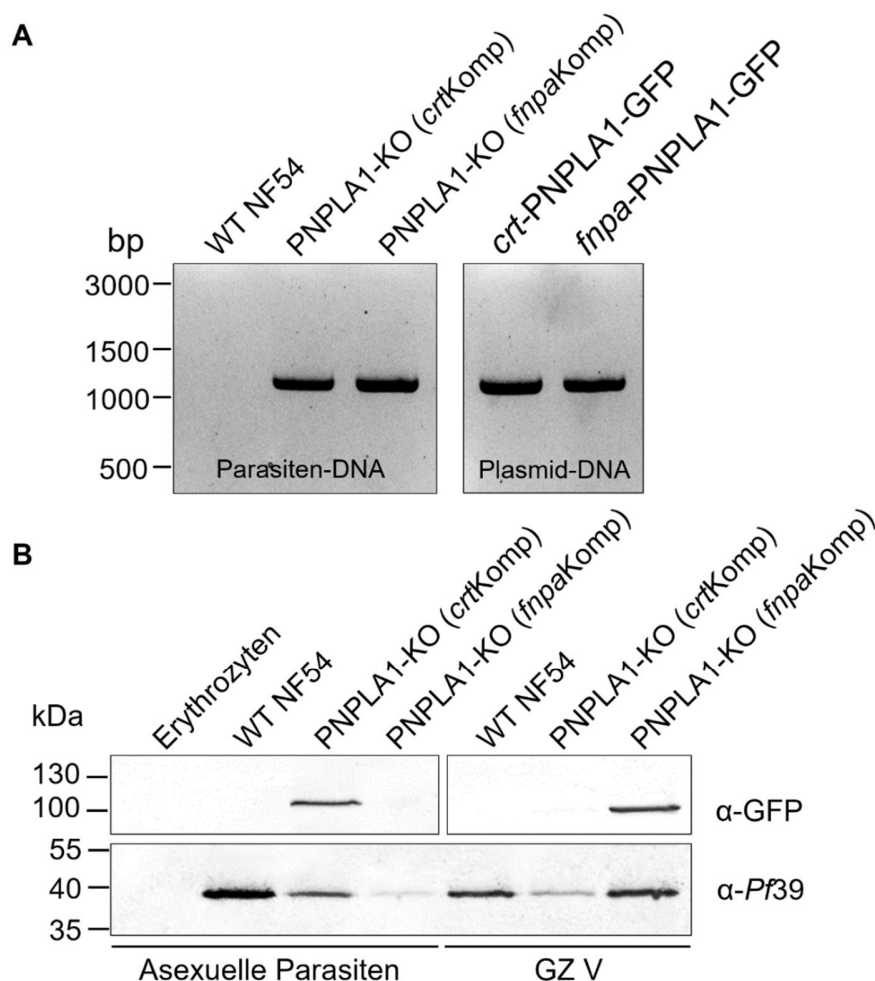


Abbildung 47 Verifizierung der PNPLA1-KO (*crt/fnpaKomp*) Linien auf DNA- und Proteinebene. (A) Diagnostische PCR zum Nachweis der Plasmidaufnahme in den PNPLA1-KO (*crt/fnpaKomp*) Linien. Die parasitäre Gesamt-DNA wurde aus gemischten asexuellen Kulturen des parentalen WT NF54 sowie aus den beiden PNPLA1-KO (*crt/fnpaKomp*) Linien isoliert und die *pARLII-crt/fnpa-pnpla1-gfp* Vektorkonstrukte nachgewiesen (1108 bp). Die für die Transfektion verwendeten Vektorkonstrukte wurden als Positivkontrolle verwendet. **(B)** Western Blot-Analyse zur Verifizierung der episomalen Expression des PNPLA1-GFP Proteins (~105 kDa) in asexuellen Blutstadien der PNPLA1-KO (*crtKomp*) Linie und in Stadium V-Gametozyten der PNPLA1-KO (*fnpaKomp*) Linie im Vergleich zum konstant exprimierten Pf39 Referenzprotein (~39 kDa). Nicht-infizierte Erythrozyten und Parasiten der parentalen WT NF54 Linie wurden als Negativkontrolle verwendet. Die Ergebnisse in **(A)** und **(B)** sind repräsentativ für je zwei biologisch unabhängige Replikate. GZ, Stadium V-Gametozyten (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019). Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Atscharah Panyot, im Rahmen ihrer während dieser Arbeit betreuten Masterarbeit, generiert; Eigenanteil: 35%.

Produkte ist in Abbildung 47A dargestellt und zeigt sowohl für die PNPLA1-KO (*crtKomp*) als auch für die PNPLA1-KO (*fnpaKomp*) Zelllinie eine spezifische Episom-Bande bei 1108 bp, jedoch erwartungsgemäß nicht für die WT NF54 Linie. Im Folgenden wurden von der WT NF54 Linie und von den *crt/fnpa*-Komplementations-Linien Lysate asexueller Blutstadien als auch von Stadium V-Gametozyten angefertigt und für die Western Blot-Analyse per SDS-PAGE aufgetrennt. Das Lysat nicht-infizierter Erythrozyten wurde als Negativkontrolle verwendet. Die

GFP-Fusionsproteine wurden wie zuvor mit Hilfe eines α -GFP-spezifischen Antikörpers immundetektiert. Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse sind in Abbildung 47B dargestellt. In den Lysaten der asexuellen Kulturen konnte für die PNPLA1-KO (*crtKomp*) Linie eine spezifische Bande bei ~105 kDa detektiert werden, während keine Banden in den asexuellen Lysaten der WT NF54 Linie oder der PNPLA1-KO (*fnpaKomp*) Linie detektiert wurden. In den Lysaten der Gametozyten-Kulturen konnte hingegen erwartungsgemäß die episomale Expression des PNPLA1-GFP Proteins lediglich in der PNPLA1-KO (*fnpaKomp*) Linie nachgewiesen werden, nicht jedoch in der WT NF54 Linie oder in der PNPLA1-KO (*crtKomp*) Linie. Die Integrität der verwendeten Lysate wurde mittels des konstant exprimierten Referenzproteins *Pf39* durch eine entsprechende Bande auf einer Höhe von ~39 kDa demonstriert. Die Western Blot-Analyse verifiziert somit die Stadien-spezifische Expression des PNPLA1-GFP Proteins in den PNPLA1-KO (*crt/fnpaKomp*) Linien.

III.14.2 Phänotypische Analyse der PNPLA1-KO (*crt/fnpaKomp*) Linien

Abschließend sollte untersucht werden, ob der funktionale Verlust von PNPLA1 und die daraus resultierende verringerte Gametozyten-Bildung durch Komplementation revertiert werden kann. Für die Analyse der sich bildenden Gametozyten wurden synchronisierte Kulturen der WT NF54 Linie sowie der PNPLA1-KO (*crtKomp*) und PNPLA1-KO (*fnpaKomp*) Linien, wie in Abschnitt II.2.1.10 beschrieben, 28 ± 2 h.p.i. für 22 h mit -SerM-Medium induziert und die Gametozytämie nach der Behandlung mit GlcNac-Medium zum Abtöten der asexuellen Parasitenstadien quantifiziert. Wie in Abbildung 48 dargestellt, stellte sich in der WT NF54 Linie eine finale Gametozytämie von $1,6 \pm 0,17\%$ ein. Dagegen konnte in der PNPLA1-KO (*fnpaKomp*) Linie im Vergleich zum WT NF54 eine um ~50% signifikant reduzierte Gametozytämie von $0,8 \pm 0,08\%$ beobachtet werden.

Demnach konnte der in den PNPLA1-KO Linien beobachtete Phänotyp durch die episomale PNPLA1-Expression unter der Kontrolle des Gametozyten-spezifischen *fnpa*-Promoters nicht wiederhergestellt werden. Die episomale PNPLA-Expression unter der Kontrolle des asexuellen-spezifischen *crt*-Promoters stellte hingegen den Phänotyp wieder vollständig her und es konnten in der komplementierten PNPLA1-KO (*crtKomp*) Linie mit $2,3 \pm 0,17\%$ sogar signifikant mehr Gametozyten im Vergleich zur WT NF54 Linie beobachtet werden.

Die Ergebnisse aus Abschnitt III.12 und III.14 zusammenfassend führt die episodale PNPLA1-Expression in asexuellen Parasitenstadien zu einer erhöhten Bildung von Gametozyten und kann den in den PNPLA1-KO Linien beobachteten Phänotyp vollständig komplementieren.

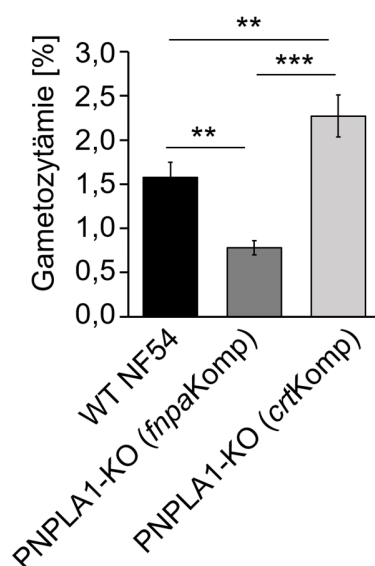


Abbildung 48 Phänotypische Analyse der PNPLA1-KO (*crt/fnpaKomp*) Linien hinsichtlich der Gametozyteninduktion. Synchronisierte Kulturen mit 1%iger Parasitämie der WT NF54 Linie sowie der PNPLA1-KO (*crt/fnpaKomp*) Linien wurden 28 ± 2 h.p.i. für 22 h mit -SerM induziert und im Weiteren zum Abtöten der asexuellen Parasitenstadien für 5 Tage mit GlcNac-Medium kultiviert. Die Gametozytämie wurde an Tag fünf nach der Induktion mit dem LysoPC-defizientem Medium mit Hilfe Giemsa-gefärbter Blutausstriche quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei biologisch unabhängigen Replikaten. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (One-Way ANOVA mit Post-Hoc Bonferroni Multiple Comparison Test, modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019). Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Atscharah Panyot, im Rahmen ihrer während dieser Arbeit betreuten Masterarbeit, generiert; Eigenanteil: 45%.

III.15 Vergleichende Lipidomanalyse der PNPLA1-KO Mutanten

Der Lipidstoffwechsel, also der Lipidanabolismus und -katabolismus, sowie seine Regulation sind für *Plasmodium* während seines Lebenszyklus essenziell. Insbesondere während der asexuellen Replikation in den Erythrozyten ist der Erreger auf eine ausbalancierte Regulation der Phospholipidsynthese angewiesen (vgl. Abschnitt I.4.2). In ihrer kürzlich veröffentlichten Studie konnten Brancucci *et al.* (2017) zudem zeigen, dass die Limitierung des Serumbestandteils LysoPC, ein Ausgangssubstrat für die PC-Synthese, zur Einleitung der Gametozytogenese führt und konnten somit die Wechselwirkung zwischen Lipidmetabolismus und epigenetischer Regulation der sexuellen Differenzierung belegen (vgl. Abschnitt I.3.1). Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass Parasiten, in denen PNPLA1 funktional ausgeschaltet ist, eine signifikant reduzierte Anzahl von Gametozyten bilden. Da Phospholipide wie PC, PE und PS das potenzielle Substrat von PNPLAs darstellen, sollte die Auswirkung des PNPLA1-Funktionsverlusts auf die Lipidzusammensetzung sowie der chemisch-strukturellen Diversität der Lipide in den Parasiten

mittels Lipidomanalyse untersucht werden. Für die Lipidomanalyse wurde asexuelle, konsekutiv synchronisierte Ringstadien (10 ± 2 h.p.i.) der parentalen WT NF54 Linie sowie der PNPLA1-KO Linien A12 und C11 verwendet (vgl. Abschnitt II.2.1.8). Um ausschließlich die Lipide der Parasiten zu messen, wurden diese zunächst durch Saponin-Behandlung von den umgebenen Erythrozyten freigesetzt (vgl. Abschnitt II.5.1). Um eine vollständige Lyse der Erythrozyten zu validieren und auszuschließen, dass die Proben durch residuale Erythrozytenmembranen kontaminiert waren, wurden die Kulturen vor und nach der Saponin-Behandlung mittels Hellfeld-Mikroskopie und Giemsa-gefärbter Blutausstriche untersucht. Die beispielhaften lichtmikroskopischen Aufnahmen der Giemsa-gefärbten Parasitenkulturen jeweils vor und nach der Saponin-Behandlung sind in Abbildung 49 dargestellt. Durch die mikroskopische Begutachtung der Kulturen konnte eine vollständige Lyse der umgebenen Erythrozyten verifiziert werden. Um eine potenzielle veränderte Lipid-Zusammensetzung durch die Verwendung asynchroner Kulturen auszuschließen, wurde die Synchronisation ferner mittels vergleichender qRT-PCRS validiert. Dafür wurde von einem Teil der für die Lipidomanalyse verwendeten Parasitenkulturen die Gesamt-RNA isoliert (vgl. Abschnitt II.3.2). Die RNA wurde in cDNA

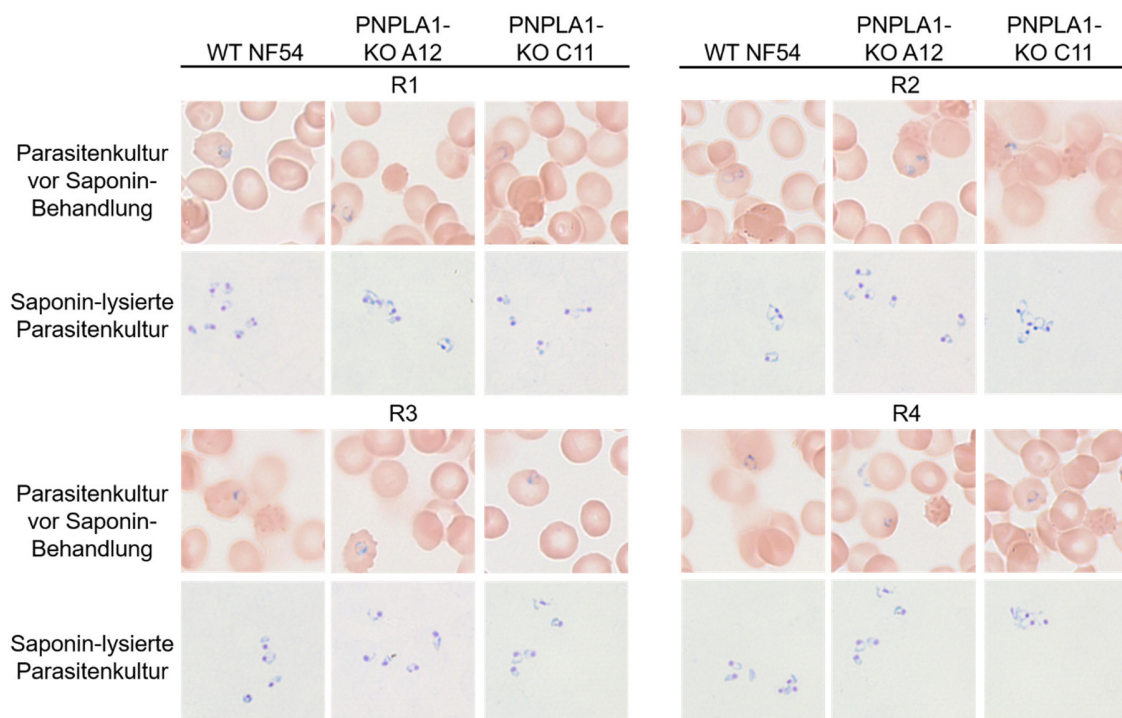


Abbildung 49 Morphologische Untersuchung der für die Lipidomanalyse verwendeten Ringstadium-Parasiten. Für die Lipidomanalyse wurden die konsekutiv synchronisierten Ringstadium-Parasiten (10 ± 2 h.p.i.) mittels Saponin-Behandlung von den umgebenen Erythrozyten freigesetzt. Die Giemsa-gefärbten Blutausstriche zeigen beispielhaft die Ringstadium-Kulturen der parentalen WT NF54 Linie sowie der PNPLA1-KO Mutanten A12 und C11 vor und nach der Saponin-Behandlung. R1-4, biologisches Replikat 1-4 (modifiziert nach Flammersfeld et al., 2019).

umgeschrieben (vgl. Abschnitt II.3.3) und zunächst per semiquantitativer RT-PCR auf ihre Reinheit überprüft (Abbildung 50A). Zur Bestätigung der Stadienspezifität wurden die Transkripte der Gene *rex1* und *ccp2* amplifiziert. Das Gen *rex1* kodiert für das Ringstadien-spezifische Protein Ring-Exported Protein 1 (Hawthorne *et al.*, 2004), wohingegen *ccp2* für das Gametozyten-spezifische Protein CCp2 codiert (Pradel *et al.*, 2004). Die gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCRs ist in Abbildung 50A dargestellt. In der RT-PCR wurde lediglich *rex1* erfolgreich amplifiziert, was der Reinheit der Ringstadien-RNA bestätigt. Als Ladekontrolle wurde das konstant exprimierte Gen *aldolase* amplifiziert. Um eine Kontamination der verwendeten cDNA mit gDNA auszuschließen, wurden die RNA-Isolate zusätzlich ohne Zugabe der reversen Transkriptase (-RT) in cDNA umgeschrieben und auf *aldolase*-Transkript untersucht. In den -RT-Kontrollen konnte erwartungsgemäß, wie in der *ccp2*-Kontrolle, kein Transkript detektiert werden (Abbildung 50A).

Mit Hilfe der qRT-PCRs wurde anschließend die Transkription der Ringstadien-spezifischen Gene *rex1* (Hawthorne *et al.*, 2004) und *sbp1* (Blisnick *et al.*, 2000) vergleichend untersucht, um die synchrone Differenzierung der verwendeten Kulturen zu verifizieren. Als Positiv-Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte *Housekeeping*-Gen *gapdh* (PF3D7_1462800) verwendet, welches für das Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase codiert. Als Kontrolle für den PNPLA1-KO wurde zusätzlich das *pnpla1*-Gen amplifiziert. Für die qRT-PCR wurden die ausgewählten Gene mit Hilfe der entsprechenden Oligonukleotide (Tabelle 10) amplifiziert, wobei die zuvor generierte cDNA der parentalen WT NF54 Linie sowie der PNPL1-KO Mutanten A12 und C11 der einzelnen, für die Lipidomanalyse verwendeten biologischen Replikate als Matrize verwendet wurden. Die Transkriptmengen wurden mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001), die Ct-Werte anhand der Ct-Werte des endogenen Kontrollgens, welches für die Seryl tRNA-Ligase (PF3D7_0717700) codiert, normalisiert und das Verhältnis der Genexpression der PNPLA1-KO Mutanten zum parentalen WT NF54 gebildet. Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen der einzelnen für die Lipidomanalyse verwendeten Replikate sind in Abbildung 50B dargestellt. Sowohl für die Ringstadien-spezifischen Gene *rex1* und *sbp1* als auch für das Gen *gapdh* konnten im Vergleich zum parentalen WT NF54 keine abweichenden Transkriptmengen detektiert werden, was die Synchronisation und den gleichen Differenzierungszeitpunkt der verwendeten Parasitenkulturen verifiziert. Während in der parentalen WT NF54 Linie erwartungsgemäß *pnpla1*-Transkript detektiert werden konnte, wurde kein Transkript in den PNPLA1-KO Mutanten A12 und C11 detektiert. Letztere Kontrolle

verifiziert zusätzlich, dass die verwendeten Lysate der PNPLA1-KO Kulturen nicht durch parentale WT NF54 Parasiten kontaminiert und frei von Revertanten waren.

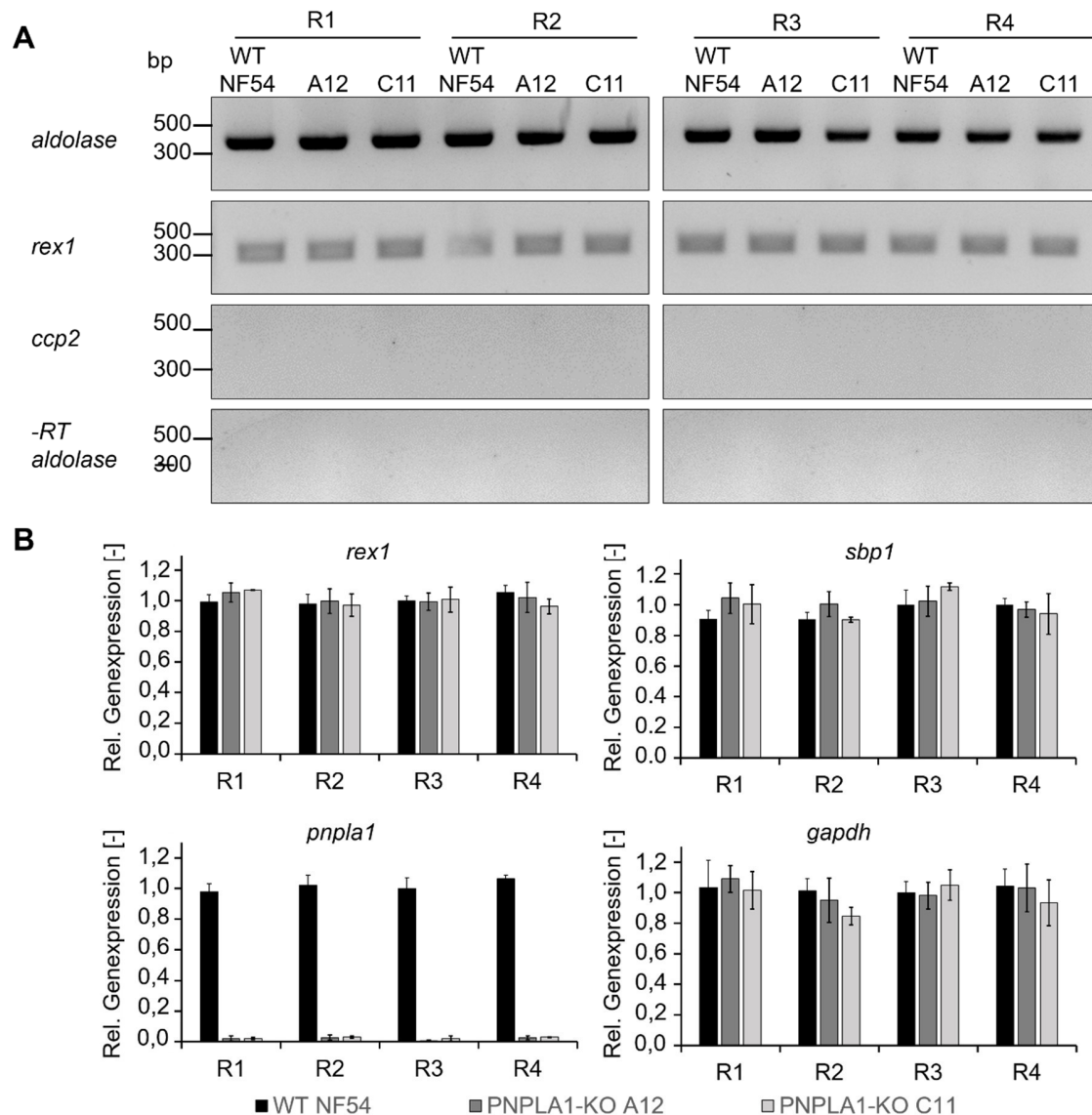


Abbildung 50 Transkriptanalyse der für die Lipidomanalyse verwendeten Ringstadium-Parasiten. (A) Überprüfung der Reinheit der Ringstadium-Parasiten mittels diagnostischer RT-PCR. Von einem Teil der für die Lipidomanalyse verwendeten Ringstadium-Parasiten wurde die Gesamt-RNA zur Herstellung von cDNA isoliert. Die Transkriptanalyse von *rex1* (342 bp; spezifisch für Ringstadien) und *ccp2* (286 bp; spezifisch für Gametozytenstadien) wurde durchgeführt, um die Reinheit der Ringstadium-Parasiten nachzuweisen. Das konstant exprimierte Referenzgen *aldolase* (378 bp) wurde als Ladekontrolle verwendet. Eine potenzielle Kontamination der generierten cDNA mit gDNA wurde durch eine -RT (ohne reverse Transkriptase)-Kontrolle und der Amplifikation des *aldolase*-Gens (378 bp) ausgeschlossen. (B) Um die Synchronisation der verwendeten Ringstadium-Parasiten zu validieren, wurden die Transkriptmengen ausgewählter Gene in den Ringstadien der parentalen WT NF54 Linie sowie in den PNPLA1-KO Mutanten A12 und C11 gemessen und verglichen. Das Gen *gapdh* wurde als Positivkontrolle verwendet, das *pnpla1*-Transkript wurde zur Verifizierung der PNPLA1-KOs gemessen. Die Transkriptmengen der Ringstadien-spezifischen Gene *rex1* und *sbp1* wurden zur Validierung der Synchronisation gemessen. Die Transkriptmengen wurden mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001) und die Ct-Werte anhand der Ct-Werte des *Seryl tRNA-Ligase*-Referenzgens (PF3D7_0717700) normalisiert. Die Transkript-Expression der entsprechenden Gene in den WT NF54 Kulturen wurde auf 100% gesetzt. Die Messungen wurden für jedes der vier unabhängigen biologischen Replikate (R1-4) im Triplikat durchgeführt. *gapdh*, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; *rex1*, ring-exported protein 1; *sbp1*, skeleton binding protein 1(modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

Nachdem die Synchronisation und Reinheit der einzelnen Replikate verifiziert werden konnten, wurden die Gesamtlipide der Parasiten mittels Chloroform-Methanol-Extraktion nach Amiar *et al.* (2016) isoliert. Die Lipidgemische wurden durch eine zwei-dimensionale Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die einzelnen Lipidspots wurden nach Methanolyse mit Hilfe einer GC-MS-Analyse qualifiziert und quantifiziert. Als Kontrollen wurden interne Lipidstandards mitgeführt (vgl. Abschnitt II.5.1). Die Lipidomanalyse wurde für jede Zelllinie in vier unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt. Die Ergebnisse der Lipidomanalyse sind in Abbildung 51 dargestellt, wobei die strukturellen Hauptlipide LPI, PI, PS SM, PC, PE, PG und Lysobisphosphatsäure (LBPA) untersucht wurden. In Abbildung 51A ist der normalisierte Fettsäuregehalt in mol pro 10^8 Parasiten angegeben. Während der Fettsäuregehalt in der parentalen WT NF54 Linie bei $19,0 \pm 1,31$ mol/ 10^8 Zellen lag, war dieser in den PNPLA1-defizienten PNPLA1-KO Linien mit $27,4 \pm 3,05$ mol/ 10^8 Zellen bzw. $29,44 \pm 6,16$ mol/ 10^8 Zellen leicht, aber nicht signifikant erhöht.

Die erhöhte Fettsäurekonzentration spiegelte sich auch in der Phospholipidzusammensetzung wider und zeigte für die meisten untersuchten Phospholipide erhöhte Konzentrationen. So lag die Konzentration für PE und PG in der parentalen WT NF54 Linie bei $4,1 \pm 0,31$ nmol/ 10^8 Zellen, in den PNPLA1-defizienten Linien A12 und C11 leicht erhöht bei $6,7 \pm 1,27$ nmol/ 10^8 Zellen bzw. bei $6,18 \pm 1,15$ nmol/ 10^8 Zellen. Für das strukturelle Hauptphospholipid PC hingegen konnten in der WT Linie mit $9,8 \pm 0,79$ nmol/ 10^8 Zellen signifikant weniger Phospholipide als in den PNPLA-KO Linien A12 und C11 ($13,0 \pm 1,41$ nmol/ 10^8 Zellen bzw. $14,4 \pm 2,98$ nmol/ 10^8 Zellen) nachgewiesen werden (Abbildung 51B). Die erhöhten Phospholipidkonzentrationen in den PNPLA1-defizienten Linien hatten hingegen keinen Einfluss auf die relative Anzahl der Phospholipide in den Parasitenmembranen, möglicherweise um die Membranintegrität aufrecht zu erhalten. PC war mit relativen Anteilen von $51,8 \pm 2,18$ Mol% in der parentalen WT NF54 Linie bzw. $49,3 \pm 4,21$ Mol% (PNPLA1-KO A12) und $51,8 \pm 3,82$ Mol% (PNPLA1-KO C11) erwartungsgemäß das strukturelle Hauptphospholipid, gefolgt von PE mit relativen Konzentrationen zwischen $22,1 \pm 2,51$ Mol% (WT NF54), $23,0 \pm 2,50$ Mol% (PNPLA1-KO A12) und $20,9 \pm 2,25$ Mol% (PNPLA1-KO C11) (Abbildung 51C). Lediglich für LBPA konnte mit relativen Lipidkonzentrationen von $3,4 \pm 1,23$ Mol% (PNPLA1-KO A12) und $1,8 \pm 0,80$ Mol% (PNPLA1-KO C11) weniger Lipide im Vergleich zum parentalen WT NF54 nachgewiesen werden ($7,4 \pm 1,88$ Mol%), jedoch waren auch diese Werte nicht signifikant. Die Lipidextraktionen sowie

die Lipidomanalysen wurde von Prof. Dr. Cyrille Botté und Dr. Yoshiki Yamaro-Botté (ApicoLipid Team, Insitute for Advanced Biosciences, La Tronce, F) durchgeführt.

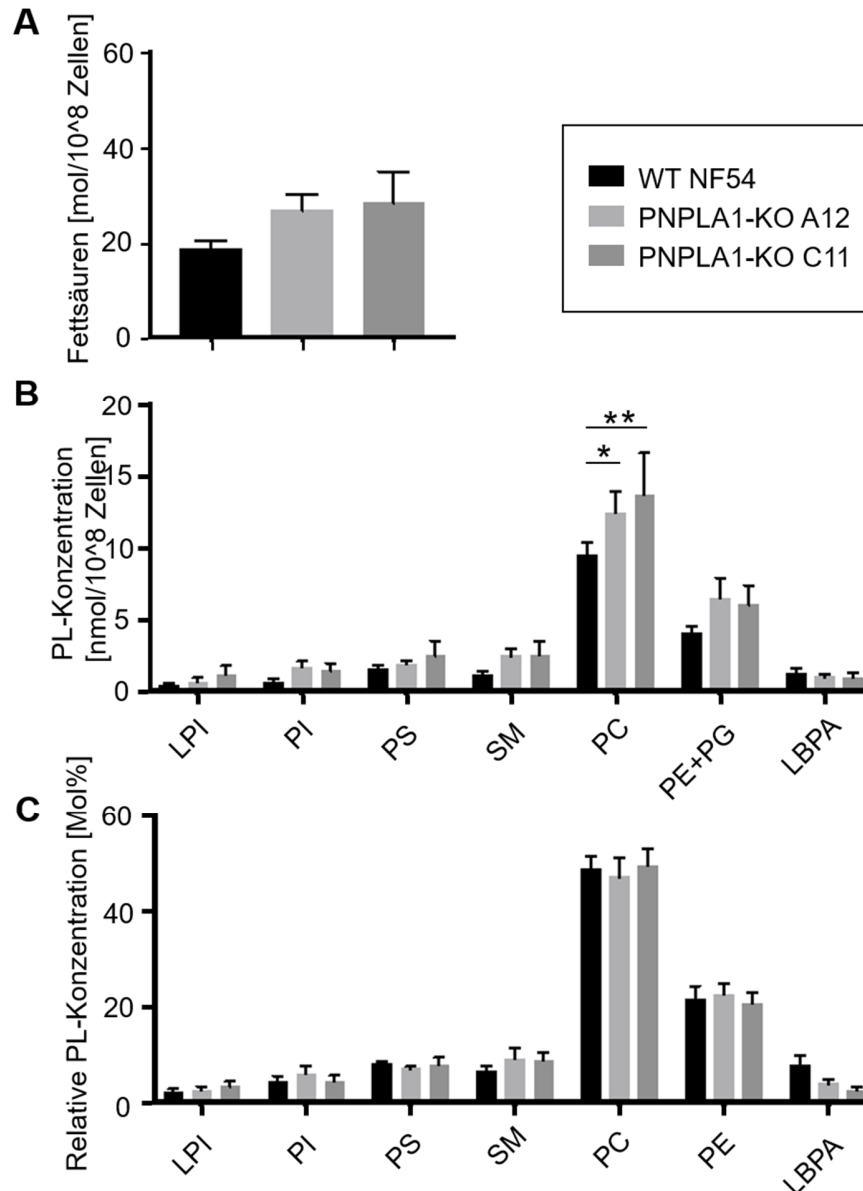


Abbildung 51 Lipidomanalyse der Gesamtlipide in der parentalen WT NF54 Linie sowie in den PNPLA1-KO Mutanten A12 und C11. Konsekutiv synchronisierte Ringstadien der parentalen WT NF54 Linie sowie der PNPLA1-KO Linien A12 und C11 wurden durch Saponin-Behandlung von den umgebenen Erythrozyten freigesetzt und die Gesamtlipide, wie in Abschnitt II.5.1 beschrieben, für die Lipidomanalyse extrahiert und analysiert. **(A)** Dargestellt ist der Fettsäuregehalt in mol pro 10⁸ Zellen. **(B)** Dargestellt ist die Phospholipid (PL)-Konzentration in nmol pro 10⁸ Zellen. *p < 0,05, ** p < 0,01 (Two-Way ANOVA mit Post-Hoc Bonferroni Multiple Comparison Test). **(C)** Dargestellt ist die relative PL-Konzentration in Mol%. Die Lipidomanalysen in **(A)** bis **(C)** wurden pro Linie mit vier biologisch unabhängigen Replikaten durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert plus Standardabweichung. LBPA, Lysobisphosphatsäure; LPI, Lysophosphatidylinositol; PC, Phosphatidylcholin; PE, Phosphatidylethanolamin; PG, Phosphatidylglycerol; PI, Phosphatidylinositol; PS, Phosphatidylserin; SM, Sphingomyelin (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019). Die Lipidextraktionen und Lipidomanalysen wurde von Prof. Dr. Cyrille Botté und Dr. Yoshiki Yamaro-Botté (ApicoLipid Team, Insitute for Advanced Biosciences, La Tronce, F) durchgeführt; Eigenanteil 25% (Vorbereitung und Kontrolle des verwendeten Probenmaterials).

III.16 *In vitro*-Analyse der katalytischen Aktivität von PNPLA1

In einem finalen Schritt sollte die enzymatische Aktivität sowie die Substratspezifität von PNPLA1 nachgewiesen werden. Hierfür wurde das Codon-optimierte *pnpla1*-Gen (vgl. Sequenz Abbildung 53) in den kommerziellen pGEX-6P-1 Expressionsvektor kloniert. Als Negativkontrolle für die spätere Analyse der lipolytischen Aktivität wurden zudem *active site* Mutanten generiert. Hierfür wurde das Codon für das katalytische Serin im GX SXG-Konsensusmotiv (AS-Position 383) mittels Orts-gerichteter Mutagenese-PCR im Austausch gegen Alanin mutagenisiert. Zusätzlich wurden zwei Doppelmutanten generiert, in denen zusätzlich entweder das Codon für das katalytische Aspartat in AS-Position 531 oder das Codon für das Aspartat in AS-Position 487 (ein weiteres potenzielles katalytisches Asparat) mittels Orts-gerichteter Mutagenese PCR im Austausch gegen Alanin mutagenisiert wurden (vgl. Abschnitt II.3.5). Der pGEX-6P-1-Leervektor wurde als weitere Kontrolle verwendet. Die korrekte Klonierung sowie die Mutagenese-PCR Reaktionen wurden mittels Sequenzierung überprüft. Die Proteine wurden anschließend, wie in Abschnitt II.4.1 beschrieben, als GST-Fusionsproteine heterolog in *E. coli* BL21 CodonPlus®-(DE3)-RIL-Expressionszellen exprimiert. Die erfolgreiche Expression der rekombinanten Proteine in äquivalenten Mengen ist in Abbildung 52A dargestellt. Die rekombinant exprimierten Proteine wurden anschließend, wie in Abschnitt II.5.2 beschrieben, aus den Expressionszellen freigesetzt und zur Beurteilung der lipolytischen Aktivität mit den Testsubstraten PI, PC, LysoPC, PG und LysoPG inkubiert. Die Hydrolyseprodukte, freie Fettsäuren, wurden mit dem kommerziellen NEFA-Kit (Wako Chemikals, Neuss, D) analysiert, wobei sich der Farbumschlag der kolorimetrischen NEFA-Reaktion direkt linear zur Phospholipaseaktivität verhält und photometrisch bestimmt werden kann. Die Ergebnisse der Messung zur lipolytischen Aktivität nach einer Reaktionszeit von 22 h sind in Abbildung 52B dargestellt. Zwar konnten für alle Testsubstrate nach der Hydrolysereaktion freie Fettsäuren mit Hilfe des NEFA-Kits detektiert werden, jedoch wurden diese auch im nahezu gleichem Maße in den entsprechenden Mutagenese-, pGEX-6P-1-Leervektor- und Puffer-Negativkontrollen detektiert (Abbildung 52B). Daher sind die detektierten freien Fettsäuren vermutlich eher auf eine spontane Hydrolyse der Testsubstrate oder auf eine Phospholipase-spezifische Aktivität in den *E. coli* Zelllysaten zurückzuführen als auf eine PNPLA1-spezifische Aktivität. Zusammenfassend konnte somit *in vitro* keine Aktivität für PNPLA1 nachgewiesen werden. Die Analysen zur lipolytischen Aktivität von PNPLA1 wurden durch Prof. Dr. Antje Flieger und Dr. Philipp Auraß (Robert-Koch Institut, Werningerode, D) durchgeführt.

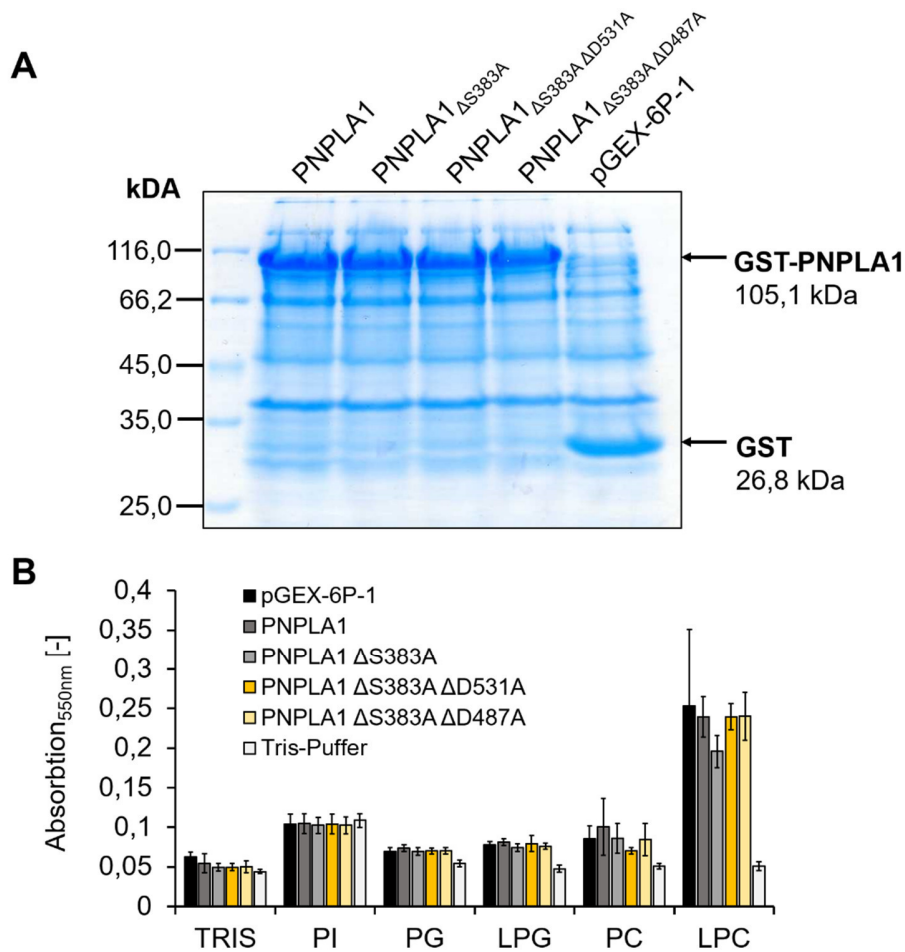


Abbildung 52 In vitro-Analyse der katalytischen Aktivität von PNPLA1. (A) Rekombinante Proteinexpression des PNPLA1-Volllängeprotein mit N-terminalem GST-Tag (RP3, vgl. Abbildung 10). Als Negativkontrollen für die spätere *in vitro*-Analyse der katalytischen PNPLA1-Aktivität wurden mittels Orts-gerichteter Mutagenese die *active site* Mutanten PNPLA1 Δ S383A, PNPLA1 Δ S383A Δ D531A und PNPLA1 Δ S383A Δ D487A generiert. Der pGEX-6P-1 Leervektor diente als zusätzliche Kontrolle. (B) Bestimmung der katalytischen Aktivität mit den exprimierten rekombinanten Proteinen mit ausgewählten Testsubstraten. Die Hydrolyseprodukte, freie Fettsäuren, wurden mit dem kolorimetrischen NEFA-Kit (Wako Chemicals, Neuss, D) quantifiziert, wobei sich der Absorptionswert proportional zur katalytischen Aktivität verhält. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. LPC, Lysophosphatidylcholin; LPG, Lysophosphatidylglycerol; PC, Phosphatidylcholin; PG, Phosphatidylglycerol; PI, Phosphatidylinositol; pGEX-6P-1, Expressionsvektor; PI, Phosphatidylinositol. Die Analyse der katalytischen Aktivität wurde von Prof. Dr. Antje Flieger und Dr. Philipp Auraß (Robert-Koch Institut, Werningerode, D) durchgeführt; Eigenanteil: 40% (Klonierung, Mutagenisierung und Vorbereitung der rekombinanten Proteine).

IV. Diskussion

Parasitäre Erkrankungen sind auch heute noch, in Zeiten von rasantem medizinischem Fortschritt und technischen Weiterentwicklungen, eine Geißel der Menschheit. Besonders in den Entwicklungsländern, in denen aufgrund von ökonomischen Hindernissen, schlechter Infrastruktur und mangelnden finanziellen Mitteln unzureichende Bekämpfungsmaßnahmen durchgeführt werden, sind viele Menschen unmittelbar von Parasitosen betroffen. Die Tropenkrankheit Malaria zählt dabei neben AIDS und Tuberkulose weiterhin zu den gefährlichsten Infektionskrankheiten der Welt (WHO World Malaria Report, 2019). Während seines komplexen Lebenszyklus ist der obligat intrazellulär lebende Malariaerreger *P. falciparum* auf die Neogenese und die Modellierung zahlreicher Membranen, wie z.B. die PVM, die PPM oder die Membranen für die Kompartimentierung, angewiesen. Ein Hauptbestandteil biologischer Membranen sind Phospholipide, amphipathische Moleküle, die aus einem Glycerin-Grundgerüst, einem hydrophilen Kopf sowie hydrophoben Kohlenwasserstoffketten aufgebaut sind. Während die in der Phospholipid-Synthese und -Akquirierung involvierten Enzyme in der Vergangenheit im Detail untersucht und als Zielstrukturen für Chemotherapeutika diskutiert worden sind, wurden die plasmodialen Phospholipasen bislang kaum experimentell untersucht (zusammengefasst in Wilson und Knoll, 2018; Flammersfeld *et al.*, 2018). Die lipolytischen Enzyme wurden hingegen bereits in zahlreichen anderen, intrazellulär-lebenden Pathogenen als wichtige Virulenzfaktoren identifiziert und wirken im Allgemeinen auf zwei verschiedene Arten: Zum einen katalysieren sie den hydrolytischen Abbau der amphipathischen Phospholipide und sind somit maßgeblich an dem Abbau und dem Durchdringen von Wirtszellmembranen beteiligt. Zum anderen können die Reaktionsprodukte als *second messenger* wirken und Signalwege, Entzündungskaskaden, den Membrantransport sowie die Zellproliferation beeinflussen (zusammengefasst in Côtes *et al.*, 2008; Djordjevic, 2010; van der Meer-Janssen *et al.*, 2010; Kuhle und Flieger, 2013; Flores-Díaz *et al.*, 2016). So konnte die hämolytische und zytotoxische Wirkung der Phospholipasen beispielsweise für das humanpathogene Bakterium *L. pneumophila*, den Erreger der Legionärskrankheit, und *T. gondii*, den Auslöser der Toxoplasmose, nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt I.4.4, zusammengefasst in Kim und Weiss, 2004; Lang und Flieger, 2011). In *Plasmodium* wurden bislang lediglich die zwei Phospholipasen PI-PLC und PbPL eingehender experimentell untersucht, welchen wichtige Funktionen in der Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktion bzw. beim Durchdringen von Wirtszellmembranen zugeschrieben wurden (vgl. Abschnitt I.4.5, zusammengefasst in Flammersfeld *et al.*, 2018). Das Ziel der vorliegenden Arbeit

war es daher, ein tiefergehendes Verständnis über die Funktion und Wirkungsweise von Phospholipasen in *Plasmodium* zu erhalten und die biologische Relevanz dieser Proteinklasse beispielhaft anhand der funktionalen Charakterisierung der als PNPLA1 bezeichneten Phospholipase zu demonstrieren.

IV.1 *In silico*-Analysen

Um eine detaillierte Charakterisierung von Phospholipasen in *Plasmodium* zu ermöglichen, sollte im Zuge der vorliegenden Arbeit zunächst eine Übersicht über alle durch *P. falciparum* codierten Phospholipasen erstellt werden. Mittels Datenbankanalyse unter der Verwendung klassifizierter Phospholipasen-Domänen konnten insgesamt 22 Gene identifiziert werden, die für putative Phospholipasen codieren. Im Vergleich dazu codiert das Genom des gram-negativen Bakteriums *L. pneumophila* beispielsweise für insgesamt 19 putative Phospholipasen, die als sezernierte, zellassoziierte oder membranständige Enzyme entscheidend bei der Etablierung der Krankheit, der Beeinflussung der Signaltransduktion und der Lyse von Phagosomen- und Wirtszellmembran beteiligt sind (zusammengefasst in Kuhle und Flieger, 2013). Die vermeintlich hohe Anzahl von Phospholipasen, die im Genom von *P. falciparum* codiert werden, ist daher nicht überraschend. Für die meisten der in *Plasmodium* identifizierten Phospholipasen konnte in funktionalen Genomstudien keine essenzielle Funktion während der erythrozytären Replikation gezeigt werden (Gomes *et al.*, 2015; Bushell *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018). Die reine Anzahl der durch *Plasmodium* codierten Phospholipasen unterstreicht jedoch die Wichtigkeit dieser Enzyme für den Parasiten, deutet aber gleichzeitig auf ein hohes Maß an Redundanz dieser Proteine hin. Da Phospholipasen potenziell wichtige Funktionen beim Durchdringen von Wirtszellmembranen, in der Signaltransduktion, in der Membran-Remodellierung sowie in der Zellproliferation einnehmen, codiert *Plasmodium* daher möglicherweise für mehrere Phospholipasen mit überlappenden, redundanten oder synergistischen Funktionen (zusammengefasst in Wilson und Knoll, 2018; Flammersfeld *et al.*, 2018). Ein Beispiel für die funktionale Redundanz von Phospholipasen wurde bereits in dem gram-positiven Bakterium *Listeria* beschrieben: Während der Funktionsverlust einzelner Phospholipasen nur moderate Auswirkungen auf die Infektiosität in Mäusen hatte, führten Doppel-KO-Mutanten zu einer bis zu 500-fachen Reduktion der Infektiosität (Smith *et al.*, 1995; Poussin *et al.*, 2009). Für die funktionale Charakterisierung der plasmodialen Phospholipasen könnte sich daher die Generierung von Mehrfach-KO-Mutanten als notwendig

erweisen, um durch phänotypische Auswirkungen Rückschlüsse auf die jeweilige Funktionalität ziehen zu können.

Interessanterweise codieren Organismen, die in enger Assoziation mit eukaryontischen Wirtszellen leben, z.B. symbiontisch-lebende Mikroorganismen oder Pathogene, für eine signifikant höhere Anzahl PNPLAs als sich frei vermehrende Mikroorganismen (zusammengefasst in Banerji und Flieger, 2004; Kienesberger *et al.*, 2008). Dies könnte darauf hindeuten, dass PNPLAs eine besonders wichtige Funktion bei der Etablierung einer Wirts-Pathogen-Interaktion aufweisen. Da diese positive Korrelation jedoch weitestgehend noch nicht verstanden ist, waren insbesondere die plasmodialen PNPLAs für eine detaillierte Analyse interessant. In dieser Arbeit wurde die durch PF3D7_0209100 codierte PNPLA im Detail charakterisiert, die als erste in *Plasmodium* charakterisierte PNPLA als PNPLA1 bezeichnet wurde. Die *in silico*-Analysen von PNPLA1 zeigten, dass PNPLA1 Orthologe mit hoher Homologie (60-67%) in anderen *Plasmodium*-Arten aufweist. Insbesondere die funktionalen Domänen wiesen dabei ein hohes Maß an Homologie auf. Daher scheint das *pnplal*-Gen in den verschiedenen Arten hoch konserviert zu sein, was dessen wichtige Funktion im Lebenszyklus des Erregers unterstreicht. Generell sind Modellierungen gut dazu geeignet, um eine erste Idee über die Funktions- und Wirkungsweise eines Proteins innerhalb einer Zelle zu erhalten (zusammengefasst in Folador *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Modellierung der PNPLA1-3D-Struktur zeigte die Verwendung der Kristallstruktur der humanen Ca^{2+} -unabhängigen $\text{PLA}_2\beta$ 6AUN die höchste Konfidenz. Für diese wurden zahlreiche unterschiedliche Funktionen und Substratspezifitäten beschrieben. So ist $\text{PLA}_2\beta$ u.a. in Makrophagen in der Aufrechterhaltung der Membran-Homöostase oder in neurogenerativen Erkrankungen wie Parkinson involviert (Hazen und Gross, 1991; Ackermann *et al.*, 1995; Kauther *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2012; Malley *et al.*, 2018). Die Modellierung zeigte die vermeintlichen AS-Seitenreste der für PNPLAs typischen Serin-Aspartat-Diade in einer engen räumlichen Nähe (Hirschberg *et al.*, 2001; Rydel *et al.*, 2003), was eine gute Annäherung an die tatsächliche Tertiärstruktur von PNPLA1 bedeuten könnte. Die 3D-Modellierung zeigte jedoch bezüglich des *C-Scores* und des *Identity*-Werts einen moderaten Vertrauensgrad (Yang *et al.*, 2015), daher lassen sich keine 100%igen Rückschlüsse auf die tatsächliche Funktion bzw. lipolytische Aktivität von PNPLA1 ziehen. Da beispielsweise die für $\text{PLA}_2\beta$ vorhergesagte ATP- und Calmodulin-Bindungsstelle in PNPLA1 *in silico* nicht identifiziert werden konnte, sollten modellierte Daten immer experimentell validiert werden (zusammengefasst in Birkholtz *et al.*, 2008; Folador *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Mouchlis und Dennis, 2016).

IV.2 PNPLA1 wird in den Blut- und Sexualstadien von *P. falciparum* exprimiert

Die Funktion von PNPLA1 in *P. falciparum* wurde bislang nicht eingehender untersucht. Daher wurden zunächst Expressions- und Lokalisationsstudien in den Blut- und Sexualstadien von *P. falciparum* durchgeführt. Die Expressionsstudie mittels semiquantitativer RT-PCRs zeigte, dass *pnpla1* durchgängig in den asexuellen Replikationsstadien transkribiert wird. Auch in den Gametozytenstadien und 15 min nach Aktivierung der Gametozyten konnte *pnpla1*-Transkript detektiert werden. Die Ergebnisse der RT-PCRs stimmen mit den auf der PlasmoDB-Datenbank publizierten Transkriptionsanalysen überein (López-Barragán *et al.*, 2011; Lasonder *et al.*, 2016). Um die Expression auf Proteinebene zu untersuchen, wurden anschließend IFA- und Western Blot-Analysen. Die Analysen verifizierten die durchgängige Expression in den Blut- und Sexualstadien, wobei PNPLA1 eine gleichmäßige zytosolische Lokalisation in allen untersuchten Stadien von *P. falciparum* zeigte. Dabei wurde keine Markierung spezifischer Strukturen, wie z.B. eine Membran-ständige oder granuläre Lokalisation, beobachtet. Zudem konnte gezeigt werden, dass die PNPLA1-Expression in Gametozyten nicht geschlechtsspezifisch vorliegt, sondern dass PNPLA1 gleichermaßen in männlichen und weiblichen Gametozyten exprimiert wird. Die zytosolische Lokalisation von PNPLA1 wurde ferner mit Hilfe einer biochemischen Analyse mittels Proteinfractionierung nach Grüning *et al.* (2012) gezeigt, wobei PNPLA1 ausschließlich in der zytosolisch, löslichen Proteinfraction detektiert wurde.

Durch eine SMART-Analyse (engl. *simple modular architecture research tool*) konnte innerhalb des PNPLA1 kein Signalpeptid oder eine Transmembrandomäne identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Sequenzen werden jedoch in der Regel für den Eintritt in das sekretorische System oder für Verankerungen in Membranen benötigt (zusammengefasst in Przyborski und Lanzer, 2005; de Koning-Ward *et al.*, 2016; Przyborski *et al.*, 2016), weshalb eine zytosolische Lokalisation zu erwarten gewesen wäre. Im Gegensatz zu PNPLA1 lokalisiert die in Abschnitt I.4.5 beschriebene PbPL beispielsweise an der Oberfläche von Sporozoiten (Bhanot *et al.*, 2005). PbPL weist zwar keine Transmembrandomäne auf und interagiert vermutlich über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Lipiddoppelschicht der Sporozoitenmembran, jedoch konnte für dieses Protein ein Signalpeptid für den Eintritt in das sekretorische System identifiziert werden (Bhanot *et al.*, 2005).

IV.3 Die Rolle von PNPLA1 in der Gametozyteninduktion

Die funktionale Charakterisierung von PNPLA1 in den Blut- und Gametozytenstadien des Parasiten erfolgte zunächst mit Hilfe konventioneller *Knock-out*-Mutanten, welche mittels reverser Genetik mit dem pCAM-BSD-KO-Vektor generiert wurden. Der pCAM-BSD-KO Vektor integriert über homologe *single-crossover* Rekombination in das Genom von *P. falciparum* und führt zu einem dauerhaften Funktionsverlust des Zielproteins (Mamoun *et al.*, 1999; Sidhu *et al.*, 2005; Dorin-Semblat *et al.*, 2007). Für die funktionale Charakterisierung wurden die Parasitenlinien PNPLA1-KO A12 und C11 mittels Monoklonalisierung isoliert. Die vollständige und korrekte Integration wurde jeweils mittels diagnostischer Integrations-PCR und per Sequenzierung der 5'- bzw. 3'-*pnpla1*-Integrationsloci verifiziert. Die Abwesenheit von PNPLA1 wurde ferner mittels IFA und Western Blot nachgewiesen. Die so erfolgreich generierten PNPLA1-KO Mutanten A12 und C11 wurden anschließend phänotypisch charakterisiert. Es zeigte sich, dass der PNPLA1-Funktionsverlust keinen Einfluss auf die replikativen Blutstadien hat. Die PNPLA1-defizienten Linien bildeten pro Schizont eine gleiche Anzahl von Tochtermerozoiten und im Vergleich zum parental WT NF54 konnte kein Unterschied in der zeitlichen Zunahme der Parasitämie beobachtet werden. Auch eine Anomalie in der Morphologie oder eine veränderte intraerythrozytäre asexuelle Differenzierung konnte nicht beobachtet werden. Eine nicht essenzielle Funktion von PNPLA1 für die intraerythrozytäre Schizogonie stimmt mit publizierten Daten funktioneller *Knock-out*-Screen Daten überein, in denen das Genom von *Plasmodium* mittels Hochdurchsatz-reverser Genetik hinsichtlich seiner Funktionalität untersucht wurde (Gomes *et al.*, 2015; Bushell *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018). Die Tatsache, dass PNPLA1-defiziente Linien generiert werden konnten, dies jedoch im Falle einer essenziellen Funktion des Zielproteins in der Regel nicht mit konventionellen *Knock-out*-Strategien erreicht werden kann, unterstreicht die nicht-essenzielle Funktion von PNPLA1 in den replikativen Blutstadien (Birnbbaum *et al.*, 2017).

Zudem war der Parasit trotz PNPLA1-Funktionsverlust weiterhin in der Lage, Gametozyten zu bilden und sich in reife Stadium V-Gametozyten zu differenzieren. Jedoch wurde beobachtet, dass die PNPLA1-defizienten Linien im Vergleich zum parental WT NF54 eine signifikant reduzierte Anzahl Gametozyten bildeten. Auch die Gametozytenreifung, also die Differenzierung von Stadium I- zu Stadium V-Gametozyten, war in den PNPLA1-defizienten Linien signifikant verzögert und im Gametozytenentwicklungsassay konnten 13 Tage nach der Gametozyteninduktion ~50% mehr reife Stadium V-Gametozyten in der parental WT NF54 Linie detektiert werden.

Bisherige Studien haben gezeigt, dass in *P. falciparum* die Bildungsrate von Gametozyten stark variieren kann. Dies trifft nicht nur auf verschiedene WT-Isolate und Zelllinien zu, sondern kann auch unter einzelnen klonalen Linien variieren (Kafsack *et al.*, 2014; Brancucci *et al.*, 2015; zusammengefasst in Josling *et al.*, 2018; Ngotho *et al.*, 2019). Um einen PNPLA1-spezifischen Effekt in der Gametozytenbildung zu verifizieren, wurde daher weiterhin mittels reverser Genetik eine PNPLA1-*Knock-down* Linie generiert. Eine *Knock-down* Parasitenlinie hat gegenüber eines dauerhaften Gen *Knock-outs* den Vorteil, dass der Funktionsverlust konditionell durch einen Induktor induziert werden kann. Dies erlaubt nicht nur die Untersuchung essenzieller Gene, sondern ermöglicht auch die phänotypische Charakterisierung einer vollständig isogenen Zelllinie (Armstrong und Goldberg, 2007; Augagneur *et al.*, 2012; Pino *et al.*, 2012; Prommana *et al.*, 2013). Die PNPLA1-KD Linie wurde mit dem pARL-HA-*glmS* Vektor generiert, der wie der pCAM-BSD-KO Vektor über homologe *single-crossover* Rekombination in das Genom von *P. falciparum* integriert. Das Zielgen wird dabei mit der Sequenz für einen dreifachen HA-Affinitätstag sowie einer *glmS*-Sequenz im 3'UTR markiert (Prommana *et al.*, 2013). Dadurch entsteht bei der Expression des Gens chimäre RNA, die bei Zugabe des *glmS*-Induktors GlcN und die damit einhergehende Aktivierung des Ribozyms degradiert wird (Winkler *et al.*, 2004; Watson und Fedor, 2011). Somit kann die Proteinexpression konditionell ausgeschaltet bzw. herunterreguliert werden. Die vollständige und korrekte Integration des pARL-HA-*glmS* wurde mittels diagnostischer Integrations-PCR und per Sequenzierung der 5'- bzw. 3'- *pnplal*-Integrationsloci verifiziert. Im Weiteren wurde die Expression des PNPLA1-HA-Fusionsproteins in der transgenen PNPLA1-KD Linie mittels IFA und Western Blot-Analysen gezeigt. Die Behandlung mit dem Induktor GlcN mit einer finalen Konzentration von 2,5 mM führte im Vergleich zur unbehandelten Kultur zu einer um ~60% reduzierten PNPLA1-Expression. Ein Protein-KD führt oft nicht zu einer vollständigen Reduktion der Proteinexpression und die Effektivität der Herunterregulierung hängt unter anderem vom Expressionslevel des endogenen Proteins ab (Dvorin *et al.*, 2010; Farrell *et al.*, 2012; Prommana *et al.*, 2013). Um eine weitere Reduktion der PNPLA1-Expression zu erzielen, könnte möglicherweise die GlcN-Konzentration weiter erhöht werden. Jedoch weist GlcN bei höheren Konzentrationen eine Toxizität gegenüber den replikativen Blutstadien auf, was zu fehlerhaften Interpretationen eines potenziellen Phänotyps nach einer GlcN-Behandlung führen könnte (Naik *et al.*, 2003; Prommana *et al.*, 2013). Um einen unspezifischen Effekt durch die Behandlung mit GlcN auszuschließen, wurden daher in allen Versuchen mit der PNPLA1-KD

Linie entsprechende WT NF54-Kontrollen mit und ohne GlcN-Behandlung parallel mit ausgewertet.

Auch in der PNPLA1-KD Linie konnte wie zuvor keine Veränderung der Morphologie oder ein Einfluss auf die asexuelle Replikation nach GlcN-induziertem PNPLA1-Funktionsverlust beobachtet werden. Jedoch wurde wie zuvor in den PNPLA1-KO Linien auch in der PNPLA1-KD Mutanten eine signifikant reduzierte Gametozytenbildung beobachtet und nach induziertem PNPLA1-Verlust bildeten sich erneut signifikant weniger Gametozyten. Auch konnte gezeigt werden, dass die verringerte Gametozytenbildung auf einen konditionellen PNPLA1-Funktionsverlust vor der Gametozyteninduktion zurückzuführen ist. Wurde die PNPLA1-Expression hingegen erst nach der Gametozyteninduktion konditionell herunterreguliert, konnte keine Veränderung in der finalen Gametozytämie beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass PNPLA1 in die Gametozyteninduktion selbst involviert ist und nicht in die frühe Gametozytenentwicklung. Um diese Hypothese weiter zu belegen, wurde der Effekt der episomalen Überexpression von PNPLA1-GFP untersucht. Dabei wurde das PNPLA1-GFP Protein nicht unter der Kontrolle des endogenen Promoters exprimiert, sondern entweder unter der Kontrolle des exogenen *crt*-Promoters oder des exogenen *fnpa*-Promoters. Der *crt*-Promoter des CRT-Proteins ist dabei vorwiegend in asexuellen Blutstadien aktiv (Przyborski *et al.*, 2005; Spork *et al.*, 2009; Külzer *et al.*, 2010), während der *fnpa*-Promoter des FNPA-Proteins ausschließlich in den Sexualstadien aktiv ist (Pradel *et al.*, 2004; Bennink *et al.*, 2018). Die Stadien-spezifische Expression konnte sowohl auf genomischer Ebene als auch auf Proteinebene verifiziert werden. Die phänotypische Analyse der Überexpressionsmutanten zeigte, dass die episomale Überexpression in den asexuellen Stadien im Vergleich zum parentalen WT NF54 zu einer signifikanten Erhöhung der Gametozytenbildungsrate führte, während die episomale Überexpression in den Gametozytenstadien unter der Kontrolle des *fnpa*-Promoters keinen veränderten Phänotyp hinsichtlich der Gametozytenbildung aufwies. In Protein- Funktionsstudien ist die Komplementierung eines KO-Phänotyps ein guter Beleg für die Signifikanz der erzielten Ergebnisse (Bansal *et al.*, 2017; Bennink *et al.*, 2018; zusammengefasst in Limenitakis und Soldati-Favre, 2011). Daher wurden die generierten Vektorkonstrukte weiterhin dazu verwendet, den PNPLA1-KO Phänotyp durch Komplementation zu verifizieren. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die episomale Expression von PNPLA1-GFP unter der Kontrolle des *fnpa*-Promoters keinen Einfluss auf die Gametozytenbildung hat, während die episomale Expression von PNPLA1-GFP in asexuellen Blutstadien der PNPLA1-KO Linie zu einer vollständigen Revertierung des KO-

Phänotyps führte. Im Vergleich zum parentalen WT NF54 bildete der PNPLA1-KO mit episomaler PNPLA1-GFP-Expression unter Kontrolle des *crt*-Promoters nicht mehr wie zuvor weniger, sondern signifikant mehr Gametozyten. Diese Ergebnisse verdeutlichten die Signifikanz der zuvor erzielten Ergebnisse und belegen, dass PNPLA1 eine wichtige Funktion in der Gametozyteninduktion einnimmt.

Die molekularen Mechanismen, welche zur Gametozyteninduktion führen, waren lange Zeit gänzlich unbekannt. Beispielsweise wurden Stress des ERs (Chaubey *et al.*, 2014), der Einsatz von Malaria-Medikamenten (Buckling *et al.*, 1999), das Alter der Wirtszellen (Peatey *et al.*, 2013) oder die Konzentration von Parasiten-induzierten extrazellulären Vesikeln (Mantel *et al.*, 2013; Regev-Rudzki *et al.*, 2013) als ursächliche Stressfaktoren diskutiert, welche die Sexualphase des Parasiten einleiten (zusammengefasst in Talman *et al.*, 2004; Baker, 2010; Josling *et al.*, 2018). Im Jahr 2014 wurde der Transkriptionsfaktor AP2-G als transkriptioneller Schlüsselfaktor der sexuellen Differenzierung identifiziert (Kafsack *et al.*, 2014; Sinha *et al.*, 2014). AP2-G, dessen Transkription während der asexuellen Replikation in der Regel durch die HDac2 und HP1 epigenetisch inhibiert ist (vgl. Abbildung 3), induziert nach Expression eine Signalkaskade, die im nächsten Replikationszyklus zur Differenzierung der Parasiten zu Gametozyten führt (Coleman *et al.*, 2014; Filarsky *et al.*, 2018; Usui *et al.*, 2019; zusammengefasst in Rea *et al.*, 2018). Der *ap2-g* Genlocus wird durch die Freisetzung von HP1 und die daraus resultierende Chromatindekondensation aktiviert (zusammengefasst in Rea *et al.* 2018). Externe Stimuli bzw. Faktoren, welche die Transkription von AP2-G, die anschließende Signalkaskade und somit die Differenzierung zu Gametozyten induzieren, waren bis vor kurzem jedoch nicht bekannt. In ihrer kürzlich veröffentlichten Arbeit postulierten Brancucci *et al.* (2017), dass der exogene Wirtsfaktor LysoPC bei der Induktion der Differenzierung zu Gametozyten eine wichtige Rolle spielt (Brancucci *et al.*, 2017). Ist LysoPC in dem den Parasiten umgebenen humanen Serum nicht limitiert, bleibt die Expression des Transkriptionsfaktors AP2-G und somit die Differenzierung zu Gametozyten inhibiert. Liegt hingegen eine Limitierung von LysoPC vor, wird der Transkriptionsfaktor AP2-G exprimiert und die Gametozytenbildung induziert (Brancucci *et al.*, 2017). Die Autoren schlossen dabei einen Rezeptor-induzierten Signalweg aus und postulierten einen direkten Zusammenhang zwischen dem LysoPC-Metabolismus und der Gametozyten-Differenzierungsrate (Brancucci *et al.*, 2017). Eine Erhöhung der Gametozytenbildung durch LysoPC-defizientes Medium im Vergleich zu Kontrollbedingungen konnte im Rahmen dieser Arbeit verifiziert werden. Jedoch wurde beobachtet, dass die PNPLA1-defizienten Parasiten

weniger sensitiv auf diese veränderten Umweltfaktoren reagierten und auch unter diesen Bedingungen im Vergleich zum parentalen WT NF54 signifikant weniger Gametozyten bildeten.

Wie das LysoPC-Level detektiert und in die Aktivierung der AP2-G Expression umgewandelt wird, ist bislang jedoch nicht verstanden. LysoPC wird aus dem Serum durch den Parasiten als Ausgangssubstrat für die Synthese von PC und deren Intermediärmetaboliten im Kennedy-Syntheseweg aufgenommen (Brancucci *et al.*, 2017; Wein *et al.*, 2018). Ist das Ausgangssubstrat LysoPC limitierend, wird PC hauptsächlich via Trimethylierung von P-Etn zu P-Cho synthetisiert, wobei entweder Ethanolamin (aus dem Serum) oder Serin (aus dem Hämoglobinabbau) als Ausgangssubstrate dienen (Brancucci *et al.*, 2017, 2018; Wein *et al.*, 2018). In diesem Syntheseschritt ist das Enzym PMT involviert (vgl. Abbildung 5), dessen Expression unter LysoPC-limitierenden Bedingungen transkriptionell hochreguliert wird (Brancucci *et al.*, 2017). Die Trimethylierung ist dabei ein S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängiger Syntheseschritt, bei dem durch die Methyltransferase PMT Methylgruppen vom Methyl donor SAM auf P-Etn übertragen werden (Pessi *et al.*, 2004). Eine durch die LysoPC-Limitierung induzierte Aktivitätserhöhung von PMT würde daher im Umkehrschluss bedeuten, dass dem Parasiten weniger SAM-vermittelte Methylgruppen zur Verfügung stehen, die im Nukleus z.B. für Histonmethylierungen bzw. für die epigenetische, transkriptionelle Inaktivierung von *ap2-g* benötigt werden (Li *et al.*, 2011; zusammengefasst in Llinás, 2017; Wong *et al.*, 2017; Zhang, 2018). Dies wäre ein potenzieller direkter Link zwischen dem LysoPC-Metabolismus, der indirekten transkriptionellen Aktivierung von AP2-G und der damit einhergehenden Bildung von Gametozyten (zusammengefasst in Llinás, 2017). So konnten Brancucci *et al.* (2017) durch RNA-Sequenzierungen zeigen, dass die Limitierung von LysoPC zum einen zu der oben beschriebenen epigenetischen Aktivierung der *ap2-g*-Transkription und weiterer Gametozytogenese-assoziierten Transkriptionsfaktoren führt. Zum anderen kompensiert der Parasit die fehlenden PC-Ausgangssubstrate LysoPC und Cholin durch transkriptionelle Hochregulierung Lipid-assoziiierter Enzyme wie PMT, EK und SAMS, um ausreichend PC über die alternativen Ausgangssubstrate Ethanolamin und Serin synthetisieren zu können. Von den durch Brancucci *et al.* (2017) identifizierten 342, unter LysoPC-limitierenden Bedingungen transkriptionell hochregulierten Genen wurden daher im Rahmen dieser Arbeit acht Gene ausgewählt, um deren Transkription in den PNPLA1-KO Linien vergleichend zum WT NF54 mittels quantitativer *real time*-PCR zu untersuchen. Vier der ausgewählten Gene codierten dabei für in die Gametozytogenese involvierte Transkriptionsfaktoren (*ap2-g*, *apiap2*, *gdv1*, *sir2a*). Die übrigen vier codierten für Enzyme, die

mit dem Lipidmetabolismus assoziiert sind. In der vergleichenden Transkriptionsanalyse konnte die durch Brancucci *et al.* (2017, 2018) gezeigte Hochregulierung dieser Gene unter LysoPC-limitierenden Bedingungen verifiziert werden. Die Gene wiesen im Vergleich zu nicht-limitierenden Bedingungen eine erwartete transkriptionelle Hochregulierung um das 1,7-5,6-fache auf (Brancucci *et al.*, 2017, 2018). Allerdings konnte in den PNPLA1-KO Linien für die Gene *ap2-g* und *pmt* im Vergleich zum WT NF54 eine signifikant weniger stark ausgeprägte Hochregulierung beobachtet werden. Die reduzierte Hochregulierung des Transkriptionsfaktors *ap2-g* stimmt dabei mit dem beobachteten PNPLA1-KO Phänotyp überein, bei dem im Vergleich zum parentalen WT NF54 eine reduzierte Gametozytenbildung beobachtet werden konnte. Die veränderte Hochregulierung von *pmt* ließ auf einen möglichen veränderten Lipidmetabolismus in den PNPLA1-KO Linien schließen. Auch konnte durch Brancucci *et al.* (2017) gezeigt werden, dass die Hochregulierung von *pmt* nicht nur eine metabolische Antwort auf die LysoPC-Limitierung darstellt, sondern auch dass sich der Parasit durch die transkriptionelle Hochregulierung von *pmt* auf einen veränderten Lipidmetabolismus während der Gametozytogenese vorbereitet. Während PMT für die asexuelle Replikation des Parasiten unter LysoPC-defizienten Bedingungen essenziell ist, weisen PMT-defiziente Parasiten keine veränderte Gametozytenbildung auf. Da die Aufnahme von LysoPC in den Gametozytenstadien signifikant reduziert ist, sind PMT-defiziente Parasiten jedoch in der Gametozytenreifung und in der Transmission inhibiert (Pessi *et al.*, 2004; Bobenchik *et al.*, 2010, 2013; Brancucci *et al.*, 2018). Interessanterweise weist der Nagetier-Malariaerreger *P. berghei* kein PMT-Homolog auf und ist gleichzeitig bezüglich der Gametozyteninduktion nicht LysoPC-sensitiv. *P. berghei* scheint daher die Gametozyteninduktion anders zu regulieren als der humanpathogene Malariaerreger *P. falciparum* (Brancucci *et al.*, 2017). Die chemische Inhibition von CK, dem ersten Enzym im Kennedy-Syntheseweg, führt hingegen auch bei nicht-limitierenden LysoPC-Bedingungen zur unmittelbaren Aktivierung der *ap2-g* Transkription und somit zur Induktion der Gametozytenbildung. Dies deutet darauf hin, dass ein der CK-Reaktion nachgeschalteter Syntheseschritt oder ein Metabolit des Kennedy-Synthesewegs für die Aktivierung der *ap2-g*-Transkription verantwortlich ist (Brancucci *et al.*, 2018), was den potenziellen Zusammenhang der für PNPLA1 vorhergesagten enzymatischen Reaktion und einer reduzierten Gametozytenbildung nach PNPLA1-Funktionsverlust unterstreicht (vgl. Abbildung 5). Der veränderte Lipidmetabolismus aufgrund des PNPLA1-Funktionsverlusts würde dabei den Wechsel vom asexuellen Replikationszyklus ins infektiöse Gametozytenstadium verhindern.

Um die Auswirkungen des PNPLA1-Funktionsverlusts auf einen veränderten Lipidmetabolismus zu überprüfen, sollte die Lipidzusammensetzung sowie die chemisch strukturelle Diversität der Lipide in den PNPLA1-KO Linien im Vergleich zum parentalen WT NF54 mittels Lipidomanalyse untersucht werden. Die Lipidomanalyse wurde mit synchronisierten, asexuellen Ringstadien nach einem validierten Protokoll durchgeführt (Ramakrishnan *et al.*, 2012; Amiar *et al.*, 2016). Die in der Lipidomanalyse quantifizierten Lipide stimmten dabei mit der erwarteten relativen Zusammensetzung der strukturellen Hauptphospholipide überein, wobei PC, PE und PG als die quantitativ häufigsten Phospholipide detektiert wurden (Beaumelle und Vial, 1988; Botté *et al.*, 2013; Gulati *et al.*, 2015; zusammengefasst nach Déchamps *et al.*, 2010; Flammersfeld *et al.*, 2018). Jedoch wurde beobachtet, dass die PNPLA1-defizienten Linien zum einen einen erhöhten Fettsäuregehalt im Vergleich zum parentalen WT NF54 aufwiesen. Zum anderen konnte in den PNPLA1-KO Linien im Vergleich zum WT NF54 eine signifikant höhere PC-Konzentration detektiert werden. Die erhöhte Phospholipidkonzentration in den PNPLA1-defizienten Linien hatte hingegen keinen Einfluss auf die relative Phospholipidzusammensetzung in den Parasitenmembranen, möglicherweise um die Membranintegrität aufrecht zu erhalten. Ein ähnlicher Phänotyp, die Deregulierung der Phospholipid-Homöostase nach induziertem PLA₂-Funktionsverlust, konnte zuvor in anderen Organismen wie z.B. Algen- oder HeLa-Zellen beobachtet werden (Hermansson *et al.*, 2016; Shin *et al.*, 2019). So führte beispielsweise der *Knock-down* verschiedenster PNPLAs in HeLa-Zellen mittels RNA-Interferenz zu einer bis zu 30-50%igen Reduktion der katabolischen Degradierung von PC, PE und PS (Hermansson *et al.*, 2016). Gleichzeitig waren die Zellen im Zellzyklus beim Übergang von der G₀/G₁- in die S-Phase inhibiert, weshalb die Autoren einen regulatorischen Zusammenhang zwischen dem Phospholipidkatabolismus und der Regulation des Zellzyklus postulierten (Hermansson *et al.*, 2016).

PC ist ein Substrat von Patatin-ähnlichen Phospholipasen, die durch die Hydrolyse von PC eine freie Fettsäure und LysoPC freisetzen. Umgekehrt ist LysoPC nicht nur ein Reaktionsprodukt von Patatin-ähnlichen Phospholipasen, sondern kann auch direkt als Substrat für jene dienen (Tamura *et al.*, 2004; zusammengefasst in Flammersfeld *et al.*, 2018). In diesem Zusammenhang wurde im Phospholipidmetabolismus von *P. falciparum* die Hydrolyse von PC in LysoPC sowie von PE in LysoPE als PNPLA-abhängiger Reaktionsschritt hypothetisch vorhergesagt (mpmp.huji.ac.il, vgl. Abbildung 5). Aus den Daten der quantitativen *real time*-PCR sowie aus der vergleichenden Lipidomanalyse kann somit geschlussfolgert werden, dass der PNPLA1-Funktionsverlust in den

Parasiten zu einer Akkumulierung von PC und möglicherweise PE, PS und PG führt. Aufgrund der dadurch induzierten Veränderung im Lipidmetabolismus, beispielsweise durch eine veränderte Expression und Aktivität von PMT, verbleiben die PNPLA1-defizienten Parasiten weiterhin im asexuellen Replikationszyklus. Um diese Hypothese weiter zu validieren, sollte in folgenden Studien das Transkriptionsprofil in den PNPLA1-defizienten Zellen detaillierter und für eine größere Anzahl von Genen untersucht werden. Dies könnte mit Hilfe weiterer vergleichender quantitativer *real time*-PCRs oder, wie in Brancucci *et al.* (2018) und Poran *et al.* (2017) beschrieben, mit Hilfe von Einzelzell-RNA-Sequenzierungen untersucht werden. Darüber hinaus könnten weitergehende Lipidomanalysen, beispielsweise mit anderen asexuellen Stadien oder unter Einbeziehung der PNPLA1-Überexpressionsmutanten, tiefer gehende Einblicke in die Funktion des plasmodialen Lipidmetabolismus sowie dessen Link zur Gametozyteninduktion geben.

Auch sollten zukünftige Studien untersuchen, wie *Plasmodium* die Verfügbarkeit von Nährstoffen misst und diese Umweltsignale intrazellulär verarbeitet. So konnte beispielsweise in einer kürzlich erschienenen Studie durch Mancio-Silva *et al.* (2017) gezeigt werden, dass in *Plasmodium* die Verfügbarkeit seiner hauptsächlichen Energiequelle, Glucose, positiv mit der Anzahl der Tochtermerozoiten und somit mit der Virulenz korreliert. Dahingegen konnte kein Zusammenhang zwischen der kalorischen Restriktion und Gametozytenbildung bzw. Transmission gezeigt werden (Brancucci *et al.*, 2017). Daher ist in diesem Zusammenhang besonders interessant, wie *Plasmodium* die Lipidzusammensetzung und -homöostase seiner Membranen, den Phospholipidmetabolismus sowie den Transport und die Sortierung von Lipiden misst bzw. reguliert. In vergangenen Studien wurde dies, im Gegensatz zu im Phospholipidmetabolismus involvierten Enzymen, kaum experimentell untersucht (Olayioye *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2016; zusammengefasst in van Meer *et al.*, 2008).

IV.4 Die Rolle von PNPLA1 in der Gametogenese

In der kürzlich durch Singh *et al.* (2019) veröffentlichten Studie, in der ebenfalls PNPLA1 experimentell untersucht wurde (dort als *PfPAT1* bezeichnet), konnten die Autoren die in dieser Studie beobachtete durchgängige, zytosolische Expression von PNPLA1/*PfPAT1* in den Blut- und Sexualstadien verifizieren. Auch die nicht-essenzielle Funktion von PNPLA1/*PfPAT1* während der asexuellen Replikation stimmt mit den in dieser Studie erhobenen Daten überein. Jedoch postulierten Singh *et al.* (2019), dass PNPLA1/*PfPAT1* nicht in der Gametozytogenese involviert ist, sondern dagegen eine wichtige Rolle in der Gametogenese spielt. In ihrer Studie zeigten die

Parasiten nach konditionellem PNPLA1/*Pf*PAT1-Funktionsverlust eine um ~50% reduzierte Gametogenese nach Aktivierung der Gametozyten. Dies äußerte sich in einer inhibierten Abrundung nach Aktivierung der Gametozyten, einem verzögerten Austritt aus der Wirtszelle, einer gestörten Exflagellation und damit einhergehend in einer reduzierten Anzahl sich bildender Oozysten im Moskito. Der Funktionsverlust inhibierte zudem die Sekretion von PPLP2, einem Perforin-ähnlichen Protein, das eine Schlüsselfunktion bei dem Wirtszellenaustritt der Gametozyten spielt (Deligianni *et al.*, 2013; Wirth *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2019). PPLP2 lokalisiert in intrazellulären Vesikeln, die etwa fünf Minuten nach der Aktivierung reifer Gametozyten an die Plasmamembran verlagert werden. PPLP2 wird aus Zellaustrittsvesikeln in die Wirtszelle entlassen und ist dort an der Permeabilisierung der Erythrozytenmembran und der damit einhergehenden Freisetzung des Erythrozytenzytoplasmas beteiligt ist (Deligianni *et al.*, 2013; Wirth *et al.*, 2014; zusammengefasst in Bennink *et al.*, 2016). Daher vermuteten die Autoren, dass die PLA₂-Aktivität von PNPLA1/*Pf*PAT1 wichtig für die Verschmelzung von Zellaustrittsvesikeln während des Wirtszellenaustritts ist. Die Aktivität von PNPLA1/*Pf*PAT1, so die Autoren, induziert möglicherweise durch die Synthese und Freisetzung von Fettsäuren wie Arachidonsäure die SNARE-vermittelte (engl. *soluble NSF attachment protein* [*SNAP*] *receptor*) Verschmelzung von Zellaustrittsvesikeln mit Membranen (Latham *et al.*, 2006; García-Martínez *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2019; zusammengefasst in Balsinde, 2002; Burke und Dennis, 2009; Dabral und Coorsen, 2017). Auch wenn die lipolytische Aktivität plasmodialer Phospholipasen, im Konglomerat mit der Aktivität Poren-formender Proteine und Proteasen, eine hypothetische Funktion während der Gametogenese spielt (zusammengefasst in Flammersfeld *et al.*, 2018; Flieger *et al.*, 2018), konnte eine entsprechende Aktivität für PNPLA1 in Rahmen dieser Studie nicht gezeigt werden. In den von uns erhobenen Daten zeigte *Plasmodium* auch nach PNPLA1-Funktionsverlust keine Veränderung in der Gametogenese, was mit Hilfe der PNPLA1-KO Mutanten *in vitro* anhand des Exflagellationsassays, der Makrogameten- sowie Zygotenbildung gezeigt wurde. Daher ist die durch Singh *et al.* (2019) beobachtete Inhibition der Gametogenese nach PNPLA1/*Pf*PAT1-Funktionsverlust möglicherweise eher auf die durch uns beschriebene verringerte Gametozytenbildung und die verzögerte Gametozytenreifung zurückzuführen. Beispielsweise konnte durch uns in den PNPLA1-KO Kulturen im Vergleich zum parentalen WT NF54 eine um ~50% geringe Anzahl reifer Gametozyten am Ende des Gametozytenentwicklungsassay beobachtet werden. Diese Werte stimmen in etwa mit der um ~50% inhibierten Gametogenese, die durch Singh *et al.* (2019) nach PNPLA1/*Pf*PAT1-Funktionsverlust beobachtet wurde, überein. Um

diese Hypothese zu verifizieren, könnten die durch Singh *et al.* (2019) beschriebenen Experimente mit Gametozytenkulturen durchgeführt werden, die durch eine längere Kultivierungszeit ausschließlich reife Stadium V-Gametozyten enthalten. Die genaue Reifungsdauer der Gametozyten, mit denen Singh *et al.* (2019) ihre Versuche durchgeführt haben, ist in der von ihnen veröffentlichten Studie nicht ersichtlich. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Untersuchung der Gametogenese wurden hingegen ausschließlich reife Gametozytenkulturen verwendet, die über einen Zeitraum ≥ 14 Tage zu reifen Stadium V-Gametozyten gereift waren, was die sichtlich unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte.

IV.5 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von PNPLA1

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zudem auch die hydrolytische Aktivität und Substratspezifität von PNPLA1 evaluiert werden, um so Rückschlüsse auf Stoffwechselwege, Funktionsweise und eine potenzielle hämolytische Aktivität von PNPLA1 innerhalb des Parasiten zu ziehen (Hirschberg *et al.*, 2001; Banerji *et al.*, 2005; zusammengefasst in Lang und Flieger, 2011). Hierfür wurde PNPLA1 als Volllänge-GST-Fusionsprotein rekombinant mit Hilfe des pGEX-6P-1 in *E. coli* exprimiert. Zusätzlich zu dem PNPLA1 Wildtypprotein wurden mittels Orts-gerichteter Mutagenese Mutanten generiert, die im aktiven Zentrum (Serin-Aspartat-Diade) der PNPLA-Domäne mutagenisiert waren. Zum einen wurde das Serin im GX SXG-Konsensusmotiv gegen Alanin ausgetauscht und zusätzlich Doppelmутanten generiert, in denen neben dem katalytischen Serin entweder das Aspartat in AS-Position 531 oder das Aspartat in AS-Position 489 gegen Alanin ausgetauscht wurden. Das so hergestellte PNPLA1-Volllängeproteine und die *active site* Mutanten wurden im Folgenden zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität mit den Testsubstraten PI, PC, LysoPC, PG und LysoPG inkubiert und die hydrolytischen Aktivitäten über die frei-werdenden Fettsäuren quantifiziert. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde in der Vergangenheit schon für zahlreiche andere Phospholipasen die hydrolytische Aktivität nachgewiesen, wie z.B. für *L. pneumophila*-spezifische Phospholipasen (Bender *et al.*, 2009; Broich *et al.*, 2006). Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aktivitätsbestimmung wurde jedoch in den Negativkontrollen (Leervektor- und Pufferkontrolle) sowie in den *active site* Mutanten eine ähnlich hohe Konzentration freier Fettsäuren bestimmt wie im nicht-mutagenisierten PNPLA1-Volllängeprotein. Demnach konnte keine PNPLA1-spezifische *in vitro*-Aktivität nachgewiesen werden. Die gemessenen freien Fettsäuren könnten entweder auf eine spontane Hydrolyse der Testsubstrate oder auf eine Verunreinigung durch Phospholipase-spezifische Aktivität aus den

E. coli Expressionszellen zurückzuführen sein. Des Weiteren ist es möglich, dass PNPLA1 eine andere Substratspezifität aufweist als die verwendeten Testsubstrate. Dies könnten beispielsweise andere Phospholipide an sich oder Phospholipide mit spezifischen Längen- oder Sättigungsverhältnissen der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten sein (Sahonero-Canavesi *et al.*, 2016). Auch ist es möglich, dass der N-terminale GST-Affinitätstag des rekombinanten PNPLA1-Fusionsprotein die Phospholipaseaktivität sterisch inhibiert oder zu einer Fehlfaltung und somit zum Funktionsverlust von PNPLA1 führt (zusammengefasst in Kimple *et al.*, 2013). Für PNPLAs anderer Organismen konnte jedoch gezeigt werden, dass diese oft nicht *per se* aktiv sind, sondern in der Regel eine Aktivierung benötigen. Dies können zum einen bestimmte Kofaktor-Proteine oder Metallionen sein (Aurass *et al.*, 2013; Lucas *et al.*, 2014), eine Protease-vermittelte proteolytische Aktivierung (Lang *et al.*, 2012, 2017) oder eine Aktivierung durch Oligomerisierung oder Deoligomerisierung (Dekker *et al.*, 1997; Dekker *et al.*, 1999; Kuhle *et al.*, 2014). Dies könnte erklären, weshalb in den Experimenten keine *in vitro*-Aktivität des rekombinanten PNPLA1 nachgewiesen werden konnte. Eine Aktivierung durch einen oder mehrere *Plasmodium*-spezifische Faktoren sollte daher in zukünftigen Studien eingehender untersucht werden, z.B. durch Zugabe von *Plasmodium*-Zelllysaten zu den Reaktionsansätzen. Im Weiteren sollte eine breitere Testsubstratauswahl getestet werden.

In ihrer kürzlich veröffentlichten Studie konnten Singh *et al.* (2019) hingegen eine PNPLA1/*Pf*PAT1-spezifische Aktivität nachweisen. Für die Untersuchung der hydrolytischen Aktivität wurde anstelle von rekombinantem PNPLA1 das endogene PNPLA1/*Pf*PAT1 mittels Immunopräzipitation aus dem Lysat reifer Stadium V-Gametozyten angereichert. Für die Immunopräzipitation wurde eine PNPLA1/*Pf*PAT1-HA Linie verwendet, in der PNPLA1/*Pf*PAT1 mit einem HA-Affinitätstag markiert wurde. Zusätzlich wurden in dieser Linie mittels homologer Rekombination *loxP*-Stellen eingebracht, mit denen nach Zugabe des Induktors Rapamycin das für die funktionelle PNPLA1/*Pf*PAT1-Domäne codierende Exon3 konditionell aus dem Genom entfernt wird und der PNPLA1-Funktionsverlust konditionell induziert werden kann (Collins *et al.*, 2013; Knuepfer *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2019). PNPLA1/*Pf*PAT1-HA wurde anschließend mit Hilfe α -HA-spezifischer Antikörper aus dem Lysat reifer Gametozyten immunopräzipitiert, wobei die Kulturen entweder zuvor mit Rapamycin zur Induktion des PNPLA1-Funktionsverlust inkubiert wurden oder unbehandelt waren. Nach der Immunopräzipitation wurde das angereicherte PNPLA1 mit dem PC-Derivat L- α -Dipalmitoyl Phosphatidylcholin [2-palmitoyl-1- ^{14}C] inkubiert und die hydrolytische Aktivität über die frei-werdende ^{14}C -markierte Palmitinsäure quantifiziert.

So konnte für die angereicherte endogene PNPLA1/P β PAT1 eine PC-spezifische Aktivität gezeigt werden, während in den entsprechenden Kontrollen keine frei-werdenden Fettsäuren detektiert wurden (Singh *et al.*, 2019). Das endogene PNPLA1-HA wurde aus nicht aktivierten, reifen Gametozyten in der Gegenwart von Protease- und Phosphatase-Inhibitoren immunopräzipitiert. Da keine weiteren Faktoren hinzugegeben wurden, und PNPLA1 sowohl in den asexuellen Blut- und unreifen Gametozytenstadien exprimiert wird, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die gezeigte PNPLA1/P β PAT1-Aktivität auch in den vorangehenden asexuellen Blut- und unreifen Gametozytenstadien (Stadium II-IV) vorhanden ist. Die gezeigte Aktivität sollte daher in zukünftigen Studien mit der in dieser Studie generierten PNPLA1-HA Linie oder den *crt-/fnpa*-PNPLA1-GFP-Überexpressionsmutanten mit einem ähnlichen experimentellen Aufbau verifiziert werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie keine PNPLA1-spezifische Aktivität nachgewiesen werden, jedoch deuten sowohl die Daten der Lipidomanalyse als auch die Ergebnisse von Singh *et al.* (2019) auf eine PC-spezifische Aktivität in den Blut- und Sexualstadien hin.

IV.6 Inhibitorstudien

In der vorliegenden Arbeit wurde auch der Einfluss Phospholipase-spezifischer Inhibitoren auf die Blut- und Sexualstadien von *P. falciparum* untersucht. Da der Fokus dieser Arbeit auf der funktionalen Charakterisierung der Ca²⁺-unabhängigen PLA₂ PNPLA1 lag, wurden für diese Studie lediglich PLA₂-spezifische Inhibitoren ausgewählt. Für die Untersuchung der antiplasmodialen Wirkung auf die replikativen Blutstadien wurden die Inhibitoren Bromoenol-Lacton (Paliege *et al.*, 2012; Pattabiraman *et al.*, 2012), ASB14780 (Kanai *et al.*, 2016), ACA (Harteneck *et al.*, 2007) und 4-BPB verwendet (Marchi-Salvador *et al.*, 2009; Ravindran *et al.*, 2009). Der höchste antiplasmodiale Effekt konnte dabei für den irreversiblen PLA₂-Inhibitor 4-BPB detektiert werden. Die Wirkung von 4-BPB wurde zuvor schon in einer anderen Studie im Stamm der *Apicomplexa*, in *T. gondii*, untersucht. In *Toxoplasma* konnte, wie in *Plasmodium*, PLA₂-Aktivität detektiert werden (Saffer und Schwartzman, 1991; Zidovetzki *et al.*, 1993; Cassaing *et al.*, 2000). Die Behandlung von *Toxoplasma* mit dem PLA₂-Inhibitor 4-BPB führte dabei zu einer Konzentrations-abhängigen Inhibition der Wirtszelleninvasion und Sekretion der Rhoptrien, ohne dabei den Parasiten metabolisch zu inhibieren (Saffer *et al.*, 1989; Thardin *et al.*, 1993; Marin *et al.*, 1996; Ravindran *et al.*, 2009). Zudem führte 4-BPB zur vollständigen Inhibition der PLA₂-Aktivität in *Toxoplasma*-Zelllysaten (Marin *et al.*, 1996). Ein Einfluss von 4-BPB auf die

Mikronemen-Sekretion konnte hingegen nicht detektiert werden (Ravindran *et al.*, 2009). In der Studie von Ravindran *et al.* (2009) schlossen die Autoren jedoch nicht aus, dass 4-BPB auch mit anderen, nicht-PLA₂-Proteinen reagiert bzw. diese durch Bindung an Cystein oder Histidin-Seitenketten sterisch inhibiert (Ravindran *et al.*, 2009).

Neben dem Einfluss auf die asexuelle Replikation des Malariaerregers, wurde auch die Wirkung der Phospholipase-Inhibitoren auf die Gametozyten-Induktion, auf die Gametozytenreifung sowie auf die Exflagellation untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit 4-BPB die Gametozytenbildung signifikant reduziert. Die Gametozytenbildung war dabei in einem ähnlichen Maße reduziert wie in den PNPLA1-defizienten Parasitenlinien. Da kein signifikanter additiver Effekt auf die Bildung der Gametozyten in den PNPLA1-defizienten Parasitenlinien nach der Inhibitor-Behandlung beobachtet werden konnte, ist diese nachgewiesene Reduktion wahrscheinlich auf eine spezifische Inhibition von PNPLA1 durch 4-BPB zurückzuführen. Daher kann geschlussfolgert werden, dass der PNPLA1-KO Phänotyp durch die Behandlung mit dem Inhibitor 4-BPB gemimt werden kann, auch wenn die anschließende Viabilität der Parasiten nicht getestet worden ist.

Im Gametozyten-Toxizitätsassay konnte lediglich bei erhöhten Inhibitor-Konzentrationen (IC₉₀) ein Einfluss auf die Gametozytenentwicklung im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen beobachtet werden. Während die Gametozyten nach der Behandlung mit 4-BPB (IC₉₀) vollständig abgestorben waren, zeigten die Gametozyten nach der Behandlung mit ACA (IC₉₀) eine signifikant verzögerte Reifung. Möglicherweise ist dies auf eine starke Beeinträchtigung der Viabilität der Gametozyten bei erhöhten Inhibitorkonzentrationen zurückzuführen. Bei den niedrigeren Inhibitorkonzentration (IC₅₀) konnte hingegen kein Effekt auf die Gametozytenreifung beobachtet werden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen mit den PNPLA1-defizienten Parasitenlinien, in denen neben einer verringerten Gametozytenbildung auch eine verzögerte Gametozytenreifung beobachtet wurde. Eine Erklärung für diesen Unterschied liegt dabei vermutlich im experimentellen Aufbau, da im Gametozyten-Toxizitätsassay die Parasiten lediglich für 48 h mit dem Inhibitor behandelt wurden, während in den PNPLA1-defizienten Linien ein dauerhafter Funktionsverlust gegeben ist. Um den Einfluss der Phospholipase-Inhibitoren auf die Gametozytenreifung weiter zu untersuchen, könnte der beschriebene Toxizitäts-Assay mit einem abgeänderten Protokoll bei verlängerter Inhibitor-Inkubationszeit durchgeführt werden.

Im Gegensatz zum Exflagellationsassay mit den PNPLA1-defizienten Parasitenlinien, konnte nach der Inhibitorbehandlung mit den PLA₂-spezifischen Inhibitoren 4-BPB und ACA auch eine signifikant reduzierte Mikrogametenbildung beobachtet werden. Da der Funktionsverlust von PNPLA1, wie zuvor beschrieben, keinen Einfluss auf die Gametogenese hat, ist die beobachtete, durch 4-BPB und ACA inhibierte Gametogenese möglicherweise auf die Inhibierung einer anderen Phospholipase zurückzuführen. In dem Genom von *Plasmodium* wurden insgesamt 22 Phospholipasen identifiziert. Diese könnten durch eine Membran-lytische Aktivität potenziell in die Gametogenese involviert sein und im Konglomerat mit Perforinen und Proteasen den Wirtszellenaustritt der Gametozyten unterstützen (zusammengefasst in Flammersfeld *et al.*, 2018; Flieger *et al.*, 2018). Diese Hypothese könnte in zukünftigen Studien unter der Verwendung weiterer Phospholipase-Inhibitoren oder mittels reverser Genetik und der Deletion weiterer Phospholipasen untersucht werden.

Zusammenfassend konnte in allen untersuchten Blut- und Sexualstadien eine Wirkung von Phospholipase-Inhibitoren gezeigt werden, was die wichtige Funktion von Phospholipasen in *Plasmodium* unterstreicht. Auch der zuvor gezeigte Einfluss des PNPLA1-Funktionsverlusts auf die Gametozytenbildung konnte durch den Inhibitor 4-BPB spezifisch gemimt werden, was die Signifikanz der erzielten Ergebnisse unterstreicht. In zukünftigen Studien sollte die Spezifität der Inhibitoren *in vitro* mit rekombinanten Proteinen verifiziert und weitere, potente Inhibitoren mit einem Wirkungsbereich in nanomolaren Mengen identifiziert werden.

IV.7 Phospholipasen als potenzielles Wirkstoffziel

Die zentralen, lipidmetabolischen Stoffwechselfunktionen in *P. falciparum* bestehen aus einer Kombination aktiver Aufnahme lipidbiosynthetischer Ausgangssubstrate aus Wirtsressourcen, *de novo* Synthese, Katabolismus und Recycling/Umstrukturierung von Lipiden. Aufgrund der plasmodialen Auxotrophie gegenüber zahlreichen Fettsäuren und Lipiden wurden daher die Lipidbiosynthese und die dabei involvierten Transporter und Enzyme bereits in zahlreichen Studien als potenzielle Wirkstoffziele diskutiert (zusammengefasst in Mitamura und Palacpac, 2003; Vial und Ben Mamoun, 2005; Ben Mamoun *et al.*, 2010; Coppens, 2013; Ramakrishnan *et al.*, 2013). Dahingegen wurden Phospholipasen wegen des bis dato mangelnden Verständnisses über ihre genauen Funktionen in *Plasmodium* bislang nur unzureichend als potenzielle Angriffspunkte für Antimalaria-Chemotherapeutika untersucht (zusammengefasst in Flammersfeld *et al.*, 2018). So konnte für die zuvor beschriebene Sphingomyelin-

Phosphodiesterase *PfNMS* eine Sphingomyelinase-, PLC- und Lysophospholipase C-spezifische Aktivität nachgewiesen werden. In der Regel hydrolysieren Sphingomyelinasen die Phosphodiesterbindung in Sphingomyelin und setzen dabei Ceramid und Phosphorylcholin frei. Die genaue Stoffwechsel-physiologische und pathologische Funktion von *PfNMS* in *Plasmodium* ist dagegen nicht bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass das lipolytische Enzym im Katabolismus von aus dem Wirt stammenden Sphingomyelin zu Ceramiden beteiligt ist, die wiederum den Zellzyklus modulieren können und für die *de novo* Synthese von parasitärem Sphingomyelin verwendet werden. Scyphostatin, ein Sphingomyelinase-Inhibitor, hemmt *in vitro* nachweislich die Aktivität rekombinant exprimierter *PfNMS* und ist in der Lage, die asexuelle Replikation mit einem IC_{50} -Wert von $\sim 4 \mu M$ zu inhibieren (Hanada *et al.*, 2002). Die wichtige Funktion von Sphingomyelinasen als Virulenzfaktoren wurde auch in anderen pathogenen Mikroorganismen gezeigt, beispielsweise in *Bacillus cereus* (Oda *et al.*, 2012, 2014), *Staphylococcus aureus* (Hayashida *et al.*, 2009; Huseby *et al.*, 2010; Katayama *et al.*, 2013) oder *Listeria ivanovii* (Gonzalez-Zorn *et al.*, 1999). So zeigte der Sphingomyelinase-Inhibitor SMY-540 eine stark hemmende Wirkung auf *B. cereus* und führte zu einer reduzierten Letalität von *B. cereus*-infizierten Mäusen (Oda *et al.*, 2014). SMY-540 wurde mittels rationalem Design auf Grundlage dreidimensionaler Strukturanalysen entwickelt und wird als potenzielles, antibakterielles Therapeutikum für die adjuvante Chemotherapie diskutiert (Oda *et al.*, 2014).

Auch in der antimykotischen Therapie erfahren Phospholipase-hemmende Wirkstoffe zunehmendes Interesse. In opportunistischen Pilzen wie *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* oder *Aspergillus fumigatus* spielen Phospholipasen ebenfalls eine wichtige Rolle als Virulenzfaktoren und wurden als potenzielle Angriffspunkte für Chemotherapeutika evaluiert (zusammengefasst in Hossain und Ghannoum, 2000; Neely und Ghannoum, 2000; Djordjevic, 2010). So sind beispielsweise PLB-exprimierende *Candida* Stämme in der Lage, tief in das submukosale Gewebe und die Magenschleimhaut (Mukosa) einzudringen, während PLB-defiziente *Candida* Stämme nicht invasiv sind (Mukherjee *et al.*, 2001). Die Behandlung mit synthetischen, lipophile Betablocker-Strukturen aufweisenden Phospholipase-Inhibitoren in Kombination mit Fluconazol, ein zu den Triazyolderivaten zählendes Antimykotikum, konnte die Gewebspenetration wirksam hemmen und führte zum Überleben von Mäusen, die mit einer letalen Dosis *C. albicans* infiziert wurden (Hänel *et al.*, 1995). PLB-spezifische Aktivität stellt auch für *C. neoformans*, dem Erreger der Kryptokokkose, einen wichtigen Virulenzfaktor dar. So ist die als *CnPLb1* bezeichnete PLB wichtig für das Überleben

von *C. neoformans* in Makrophagen und wurde als potenzielles Wirkstoffziel evaluiert. Allerdings zeigten die bisher getesteten Wirkstoffe auf Basis von Pyridiniumverbindungen keine ausreichende antimykotische Wirkung (zusammengefasst in Djordjevic, 2010).

Neben ihrer Rolle als Virulenzfaktoren verschiedener pathogener Mikroorganismen werden Phospholipasen auch in Verbindungen mit Zivilisationskrankheiten wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Atherosklerose, aber auch mit Immunerkrankungen oder Krebs in Verbindung gebracht (zusammengefasst in Scott *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2012; Quach *et al.*, 2014; Leslie, 2015). So ist beispielsweise die Expression von sPLAs bei Brust-, Lungen- und Prostatakrebs im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe signifikant erhöht (Yamashita *et al.*, 1993, 1994; Sved *et al.*, 2004; Denizot *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2015). Die Krankheits-assoziierte Aktivität von Phospholipasen stellt daher ein attraktives Wirkstoffziel, z.B. in der Krebstherapie, dar (zusammengefasst in Marks *et al.*, 2000; Wang und Dubois, 2006; Cummings, 2007). Obwohl bereits eine große Vielfalt unterschiedlichster Phospholipase-Inhibitoren identifiziert worden ist (zusammengefasst in Farooqui *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2005; Kokotou *et al.*, 2017), sind die molekularen Wirkungsmechanismen sowie deren potenzielle Toxizität auf gesundes, menschliches oder tierisches Gewebe bislang nur unzureichend verstanden (zusammengefasst in Laye und Gill, 2003; Cummings, 2007; Garcia-Garcia und Serruys, 2009). Eine besondere Herausforderung bei der Entwicklung Phospholipase-spezifischer Chemotherapeutika stellt dabei die große Bandbreite der einzelnen Phospholipase-Isoformen sowie deren physiologische Funktion in der Homöostase gesunder Zellen dar (zusammengefasst in Balsinde *et al.*, 1999; Cummings, 2007).

Zusammenfassend stellen die beschriebenen Phospholipasen, insbesondere die in dieser Arbeit untersuchte PNPLA1, vielversprechende und potenzielle Zielstrukturen für Antimalaria-Chemotherapeutika dar. Zukünftige Studien sollten daher die genaue Funktion von Phospholipasen in *Plasmodium* im Hinblick auf Wachstum, Proliferation und Virulenz eingehender untersuchen. Insbesondere die Aufklärung ihrer dreidimensionalen Strukturen, das tiefgehende Verständnis ihrer molekularen Funktion und das Aufdecken ihrer Unterschiede zu Wirts-Phospholipasen sind die Basis für die rationale Entwicklung zukünftiger Chemotherapeutika.

V. Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig eine der vier PNPLAs in *Plasmodium* experimentell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Funktionsverlust der zytosolisch exprimierten PNPLA1 zu einer signifikant reduzierten Gametozytenbildung sowie zu einer

verzögerten Entwicklung der fünf Reifestadien führt. Insbesondere im Kontext aktueller Studien zur Gametozytogenese deuten die gezeigten Daten darauf hin, dass der PNPLA1-Funktionsverlust die Gametozytenbildung indirekt über einen veränderten Lipidmetabolismus negativ beeinflusst. Die genaue Funktion von PNPLA1, und ob tatsächlich die Gametozytenbildung oder die sehr frühe Gametozytenreifung durch den Funktionsverlust beeinflusst ist, konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden. Diese Frage sollte mit weitergehenden Untersuchungen, z.B. in vergleichenden IFAs mittels früher Gametozytenmarker wie *Pfs16*, im Detail untersucht werden.

Zukünftige Studien sollten auch untersuchen, auf welche Weise PNPLA1 im Phospholipidmetabolismus involviert ist und der Parasit die Phospholipidsättigung seiner Membranen misst, reguliert und in das Signal zur Gametozytenbildung umwandelt. In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, inwieweit die Aktivität weiterer Phospholipidmetabolismus-assoziiierter Enzyme wie EK, CK, PMT, CEPT oder SAMS die Gametozytenbildung beeinflussen. Die (zusätzliche) funktionale Deletion dieser Enzyme mit anschließender phänotypischer Charakterisierung und vergleichender Lipidom- sowie Transkriptomanalysen sollen darüber Aufschluss geben.

Zwingend notwendig ist auch die Bestimmung der enzymatischen Aktivität und Substratspezifität von PNPLA1. Zukünftige Studien sollten daher untersuchen, ob das rekombinante PNPLA1 *Plasmodium*-spezifische Faktoren, beispielsweise die Zugabe von *Plasmodium*-Zelllysate, zur Aktivierung benötigt. Auch könnten die mutagenen PNPLA1-Linien, in denen PNPLA1 entweder mit einem dreifachen HA-Affinitätstag markiert oder episomal überexprimiert wurde, zur Immunopräzipitation des endogenen PNPLA1 und anschließender Aktivitätsbestimmung verwendet werden. Außerdem sollen die Lipidomanalysen ausgeweitet und weitere asexuelle und sexuelle Stadien hinsichtlich ihrer Phospholipidkomposition vergleichend untersucht werden. Insbesondere der reverse Effekt, die episodale Überexpression von PNPLA1, kann dabei Aufschluss über die Funktion von PNPLA1 im Phospholipidmetabolismus und den gezeigten Link zur Gametozytenbildung liefern. Durch die Aufdeckung veränderter Intermediärmetabolitenkonzentrationen in Kombination mit der PNPLA1-Substratspezifität können so Rückschlüsse auf einen potenziellen Link zwischen Gametozytenbildung und Phospholipidmetabolismus gezogen werden.

Um den molekularen Zusammenhang zwischen der PNPLA1-spezifischen Aktivität und der transkriptionellen Regulation der Gametozytenbildung weiter zu untersuchen, werden weitere,

umfangreiche Transkriptom-Untersuchungen durchgeführt. Dafür werden die Transkriptionsprofile zwischen der parental WT NF54 Linie und den PNPLA1-KO Linien weiter im Detail untersucht, wobei eine größere Anzahl von Genen, insbesondere solcher, die für Transkriptionsfaktoren oder für Lipidmetabolismus-assoziierte Enzyme codieren, vergleichend untersucht wird. Ferner werden die Transkriptionsprofile der transgenen Überexpressionslinien vergleichend zur WT NF54 Linie untersucht. Diese Experimente werden entweder mit der in dieser Arbeit beschriebenen *real-time*-PCR oder mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierungen durchgeführt.

Die Ergebnisse der Inhibitor-Studien deuten auf eine vielfältige Funktion von Phospholipasen im Lebenszyklus von *P. falciparum* hin. Daher werden zum einen weitere Phospholipaseinhibitoren hinsichtlich ihrer antiplasmodialen Wirkung untersucht. Zum anderen sollen weitere Phospholipasen mittels reverser Genetik funktional deletiert werden, um die transgenen Parasitenlinien anschließend phänotypisch zu charakterisieren. Um ein mögliches Zusammenspiel und eine synergistische Funktion zwischen mehreren lipolytischen Enzymen aufzudecken, sollen Parasiten generiert und analysiert werden, in denen bestimmte Phospholipasen gemeinsam ausgeschaltet wurden. Dabei steht insbesondere die funktionale Deletion weiterer PNPLAs in den PNPLA1-defizienten Linien im Fokus, um einen potenziellen additiven Effekt auf eine veränderte Gametozytenbildung zu untersuchen.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse dieser Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Funktion und Wirkungsweise von Phospholipasen im Lebenszyklus des humanpathogenen Malariaerregers *P. falciparum*. Weitergehende Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die molekularen Mechanismen der sexuellen Differenzierung zu entschlüsseln und so neue potenzielle Angriffsziele für Chemotherapeutika zu identifizieren.

VI. Abkürzungsverzeichnis

4-BPB	2,4'-Dibromoacetophenon
ABS	gemischte <i>P. falciparum</i> asexuelle Blutstadien
ACA	N-(p-Amylcinnamoyl) Anthranilsäure
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
APAD	3-Acetylpyridin-Adenin-Dinukleotid
APS	Ammonium Persulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Bovines Serumalbumin, Protein aus Rinderblutserum
BSD	Blasticidin
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CEPT	Cholin/Ethanolamin-Phosphotransferase
CK	Cholinkinase
C-terminal	am Carboxyende
DAG	Diacylglycerol
DEPC-H ₂ O	Diethyldicarbonat-behandeltes H ₂ O
dH ₂ O	destilliertes H ₂ O
DIK	Differentialinterferenzkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoryribonukleinsäure
dNTP	Desoxyrinukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EB	Evans Blue
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Ethanolaminkinase
ER	endoplasmatisches Retikulum
Etn	Ethanolamin
fw	<i>forward</i>
GC-MS-Analyse	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GlcN	D-(+)-Glucosamin Hydrochlorid
GlcNac	N-Acetyl-D-Glucosamin
<i>glmS</i>	GlcN-aktiviertes Ribozym

GPCR	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor
GST	Glutathion S-Transferase
GXSXG	Glycin-X-Serin-Glycin-Konsensusmotiv
GZ	Gametozyt
h	Stunden
hDHFR	Humanes Dihydrofolatreduktase Resistenzgen
HA	Affinitätstag mit Ursprung im humanen Influenza Hemagglutinin
h.p.i.	<i>hours post-invasion</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IFA	Immunofluoreszenzassay
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
HEPES	N'-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kb	Kilobasen, Längeneinheit für Nukleinsäuren
kDa	Kilodalton, atomare Molekül-Masseneinheit
KD	<i>Knock-down</i> Mutante
KO	<i>Knock-out</i> Mutante
LB	<i>lysogeny broth</i> , Nährmedium
LBPA	Lysobisphosphatsäure
LDH	Laktatdehydrogenase
LysoPC	Lysophosphatidylcholin
LysoPI	Lysophosphatidylinositol
MBP	Maltose-bindendes Protein
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Mol%	Molprozent
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>neutral goat serum</i> , neutrales Ziegen Serum
n.s.	nicht signifikant
N-terminal	am Aminoende
OD	Optische Dichte
ori	<i>origin of replication</i> , Replikationsursprung
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
p.a.	<i>pro analysi</i> , Reinheitsbezeichnung
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaledehyd
pH	neg. dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PI	Phosphatidylinositol

PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PL	Phospholipase
PMT	Phosphoethanolamin-Methyltransferase
PNPLA	Patatin-ähnliche Phospholipase
PS	Phosphatidylserin
PVM	parasitophore Vakuolenmembran
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> -RT-PCR, quantitative Echtzeit-RT-PCR
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	rekombinantes Protein
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI Medium	<i>Rowell Park Memorial</i> -Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
SAMS	S-Adenosylmethionin-Synthase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i> , Nährmedium
SM	Sphingomyelin
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
<i>sn</i>	stereospezifische <i>sn</i> -Konfiguration
SZ	Schizont
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TBSM	TBS-Milchpulver
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TLCK	N α -Tosyl-L-Lysine Chlormethylketon-Hydrochlorid, Inhibitor
TR	Trophozoit
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
TVN	tubovesikulares Netzwerk
ÜN	über Nacht
UTR	<i>untranslated region</i> , nicht-translatierter Bereich
UV	Ultraviolettes Licht
vol%	Volumenprozent
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
XA	<i>xanthurenic acid</i> , Xanthrensäure
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung

VII. Literaturverzeichnis

- Abbott, C.M., Proud, C.G. (2004). Translation factors: In sickness and in health. *Trends Biochem. Sci.* **29**: 25–31.
- Ackermann, E.J., Conde-Frieboes, K., Dennis, E.A. (1995). Inhibition of macrophage Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones. *J. Biol. Chem.* **270**: 445–450.
- Acquah, F.K., Adjah, J., Williamson, K.C., Amoah, L.E. (2019). Transmission-Blocking Vaccines: Old Friends and New Prospects. *Infect. Immun.* **87**: e00775-18.
- Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., Buchrieser, C. (2007). *Legionella pneumophila* — a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**: 432–448.
- Aloulou, A., Rahier, R., Arhab, Y., Noiriél, A., Abousalham, A. (2018). Phospholipases: An Overview. In *Lipases and Phospholipases. Methods in Molecular Biology*. Sandoval G. (eds). Humana Press, New York, USA. pp. 69–105.
- Aloulou, A., Rodriguez, J.A., Fernandez, S., van Oosterhout, D., Puccinelli, D., Carrière, F. (2006). Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**: 995–1013.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403–410.
- Alves, E., Bartlett, P.J., Garcia, C.R.S., Thomas, A.P. (2011). Melatonin and IP_3 -induced Ca^{2+} release from intracellular stores in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* within infected red blood cells. *J. Biol. Chem.* **286**: 5905–5912.
- Aly, A.S.I., Vaughan, A.M., Kappe, S.H.I. (2009). Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 195–221.
- Amiar, S., MacRae, J.I., Callahan, D.L., Dubois, D., van Dooren, G.G., Shears, M.J., Cesbron-Delauw, M.-F., Maréchal, E., McConville, M.J., McFadden, G.I., Yamaro-Botté, Y., Botté, C.Y. (2016). Apicoplast-Localized Lysophosphatidic Acid Precursor Assembly Is Required for Bulk Phospholipid Synthesis in *Toxoplasma gondii* and Relies on an Algal/Plant-Like Glycerol 3-Phosphate Acyltransferase. *PLOS Pathog.* **12**: e1005765.
- Aminake, M.N., Schoof, S., Sologub, L., Leubner, M., Kirschner, M., Arndt, H.-D., Pradel, G. (2011). Thiostrepton and Derivatives Exhibit Antimalarial and Gametocytocidal Activity by Dually Targeting Parasite Proteasome and Apicoplast. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 1338–1348.
- Ancelin, M.L., Parant, M., Thuet, M.J., Philippot, J.R., Vial, H.J. (1991). Increased permeability to choline in simian erythrocytes after *Plasmodium knowlesi* infection. *Biochem. J.* **273**: 701–709.
- Ancelin, M.L., Vial, H.J. (1986). Several lines of evidence demonstrating that *Plasmodium falciparum*, a parasitic organism, has distinct enzymes for the phosphorylation of choline and ethanolamine. *FEBS Lett.* **202**: 217–223.
- Andreadaki, M., Hanssen, E., Deligianni, E., Claudet, C., Wengelnik, K., Mollard, V., McFadden, G.I., Abkarian, M., Braun-Breton, C., Siden-Kiamos, I. (2018). Sequential Membrane Rupture and Vesiculation during *Plasmodium berghei* Gametocyte Egress from the Red Blood

- Cell. *Sci. Rep.* **8**: 3543.
- Ansorge, I., Jeckel, D., Wieland, F., Lingelbach, K. (1995). *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes utilize a synthetic truncated ceramide precursor for synthesis and secretion of truncated sphingomyelin. *Biochem. J.* **308**: 335–341.
- Armstrong, C.M., Goldberg, D.E. (2007). An FKBP destabilization domain modulates protein levels in *Plasmodium falciparum*. *Nat. Methods* **4**: 1007–1009.
- Arpigny, J.L., Jaeger, K.E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* **343**: 177–183.
- Augagneur, Y., Wesolowski, D., Tae, H.S., Altman, S., Ben Mamoun, C. (2012). Gene selective mRNA cleavage inhibits the development of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 6235–6240.
- Aurass, P., Schlegel, M., Metwally, O., Harding, C.R., Schroeder, G.N., Frankel, G., Flieger, A. (2013). The *Legionella pneumophila* Dot/Icm-secreted effector PlcC/CegC1 together with PlcA and PlcB promotes virulence and belongs to a novel zinc metallophospholipase C family present in bacteria and fungi. *J. Biol. Chem.* **288**: 11080–92.
- Aurrecoechea, C., Brestelli, J., Brunk, B.P., Dommer, J., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gingle, A., Grant, G., Harb, O.S., Heiges, M., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J.C., Kraemer, E., Li, W., Miller, J. a., Nayak, V., Pennington, C., Pinney, D.F., Roos, D.S., Ross, C., Stoeckert, C.J., Treatman, C., Wang, H. (2009). PlasmoDB: A functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Res.* **37**: 539–543.
- Baer, K., Klotz, C., Kappe, S.H.I., Schnieder, T., Frevert, U. (2007). Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog.* **3**: e171.
- Baker, D.A. (2010). Malaria gametocytogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **172**: 57–65.
- Balla, T. (2013). Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol. Rev.* **93**: 1019–137.
- Balsinde, J. (2002). Roles of various phospholipases A₂ in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling. *Biochem. J.* **364**: 695–702.
- Balsinde, J., Balboa, M.A., Insel, P.A., Dennis, E.A. (1999). Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**: 175–89.
- Bancells, C., Llorà-Batlle, O., Poran, A., Nötzel, C., Rovira-Graells, N., Elemento, O., Kafsack, B.F.C., Cortés, A. (2019). Revisiting the initial steps of sexual development in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Microbiol.* **4**: 144–154.
- Banerji, S., Aurass, P., Flieger, A. (2008). The manifold phospholipases A of *Legionella pneumophila* – Identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**: 169–181.
- Banerji, S., Bewersdorff, M., Hermes, B., Cianciotto, N.P., Flieger, A. (2005). Characterization of the major secreted zinc metalloprotease- dependent glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase, PlaC, of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **73**: 2899–909.
- Banerji, S., Flieger, A. (2004). Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology* **150**: 522–525.
- Bansal, A., Molina-Cruz, A., Brzostowski, J., Mu, J., Miller, L.H. (2017). *Plasmodium falciparum*

- Calcium-Dependent Protein Kinase 2 Is Critical for Male Gametocyte Exflagellation but Not Essential for Asexual Proliferation. *MBio* **8**: e01656--17.
- Barman, A., Gohain, D., Bora, U., Tamuli, R. (2018). Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi. *Microbiol. Res.* **209**: 55–69.
- Baum, J., Gilberger, T.-W., Frischknecht, F., Meissner, M. (2008). Host-cell invasion by malaria parasites: insights from *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Trends Parasitol.* **24**: 557–63.
- Baunaure, F., Eldin, P., Cathiard, A.-M., Vial, H. (2003). Characterization of a non-mitochondrial type I phosphatidylserine decarboxylase in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **51**: 33–46.
- Beard, C.B., Benedict, M.Q., Primus, J.P., Finnerty, V., Collins, F.H. (1995). Eye Pigments in Wild-Type and Eye-Color Mutant Strains of the African Malaria Vector *Anopheles gambiae*. *J. Hered.* **86**: 375–380.
- Beaumelle, B.D., Vial, H.J. (1988). Uninfected red cells from malaria-infected blood: alteration of fatty acid composition involving a serum protein: an in vivo and in vitro study. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **24**: 711–718.
- Ben Mamoun, C., Prigge, S.T., Vial, H. (2010). Targeting the Lipid Metabolic Pathways for the Treatment of Malaria. *Drug Dev. Res.* **71**: 44–55.
- Bender, J., Rydzewski, K., Broich, M., Schunder, E., Heuner, K., Flieger, A. (2009). Phospholipase PlaB of *Legionella pneumophila* Represents a Novel Lipase Family. *J. Biol. Chem.* **284**: 27185–27194.
- Bennink, S., Kiesow, M.J., Pradel, G. (2016). The development of malaria parasites in the mosquito midgut. *Cell. Microbiol.* **18**: 905–918.
- Bennink, S., Pradel, G. (2019). The molecular machinery of translational control in malaria parasites. *Mol. Microbiol.* In print.
- Bennink, S., von Bohl, A., Ngwa, C.J., Henschel, L., Kuehn, A., Pilch, N., Weißbach, T., Rosinski, A.N., Scheuermayer, M., Repnik, U., Przyborski, J.M., Minns, A.M., Orchard, L.M., Griffiths, G., Lindner, S.E., Llinás, M., Pradel, G. (2018). A seven-helix protein constitutes stress granules crucial for regulating translation during human-to-mosquito transmission of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog.* **14**: e1007249.
- Beraldo, F.H., Mikoshiba, K., Garcia, C.R.S. (2007). Human malarial parasite, *Plasmodium falciparum*, displays capacitative calcium entry: 2-aminoethyl diphenylborinate blocks the signal transduction pathway of melatonin action on the *P. falciparum* cell cycle. *J. Pineal Res.* **43**: 360–364.
- Berjeaud, J.-M., Chevalier, S., Schlusshuber, M., Portier, E., Loiseau, C., Aucher, W., Lesouhaitier, O., Verdon, J. (2016). *Legionella pneumophila*: The Paradox of a Highly Sensitive Opportunistic Waterborne Pathogen Able to Persist in the Environment. *Front. Microbiol.* **7**: 486.
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**: 11–21.
- Bezzine, S., Koduri, R.S., Valentin, E., Murakami, M., Kudo, I., Ghomashchi, F., Sadilek, M., Lambeau, G., Gelb, M.H. (2000). Exogenously Added Human Group X Secreted

- Phospholipase A₂ but Not the Group IB, IIA, and V Enzymes Efficiently Release Arachidonic Acid from Adherent Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **275**: 3179–3191.
- Bhanot, P., Schauer, K., Coppens, I., Nussenzweig, V. (2005). A surface phospholipase is involved in the migration of *Plasmodium* sporozoites through cells. *J. Biol. Chem.* **280**: 6752–6760.
- Biagini, G.A., Pasini, E.M., Hughes, R., De Koning, H.P., Vial, H.J., O'Neill, P.M., Ward, S.A., Bray, P.G. (2004). Characterization of the choline carrier of *Plasmodium falciparum*: a route for the selective delivery of novel antimalarial drugs. *Blood* **104**: 3372–3377.
- Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A.E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R.E., Morris, H.R. (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* **392**: 289–292.
- Billker, O., Shaw, M.K., Margos, G., Sinden, R.E. (1997). The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro. *Parasitology* **115**: 1–7.
- Birkholtz, L., van Brummelen, A.C., Clark, K., Niemand, J., Maréchal, E., Llinás, M., Louw, A.I. (2008). Exploring functional genomics for drug target and therapeutics discovery in *Plasmodia*. *Acta Trop.* **105**: 113–123.
- Birnbaum, J., Flemming, S., Reichard, N., Soares, A.B., Mesén-Ramírez, P., Jonscher, E., Bergmann, B., Spielmann, T. (2017). A genetic system to study *Plasmodium falciparum* protein function. *Nat. Methods* **14**: 450–456.
- Blisnick, T., Morales Betoulle, M. E., Barale, J.-C., Uzureau, P., Berry, L., Desroses, S., Fujioka, H., Mattei, D., Braun Breton, C. (2000). Pfsbp1, a Maurer's cleft *Plasmodium falciparum* protein, is associated with the erythrocyte skeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* **111**: 107–121.
- Bobenchik, A.M., Augagneur, Y., Hao, B., Hoch, J.C., Ben Mamoun, C. (2011). Phosphoethanolamine methyltransferases in phosphocholine biosynthesis: functions and potential for antiparasite therapy. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**: 609–619.
- Bobenchik, A.M., Choi, J.-Y., Mishra, A., Rujan, I.N., Hao, B., Voelker, D.R., Hoch, J.C., Ben Mamoun, C. (2010). Identification of inhibitors of *Plasmodium falciparum* phosphoethanolamine methyltransferase using an enzyme-coupled transmethylation assay. *BMC Biochem.* **11**: 4.
- Bobenchik, A.M., Witola, W.H., Augagneur, Y., Nic Lochlainn, L., Garg, A., Pachikara, N., Choi, J.-Y., Zhao, Y.O., Usmani-Brown, S., Lee, A., Adjalley, S.H., Samanta, S., Fidock, D.A., Voelker, D.R., Fikrig, E., Ben Mamoun, C. (2013). *Plasmodium falciparum* phosphoethanolamine methyltransferase is essential for malaria transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 18262–7.
- Boes, A., Spiegel, H., Edgue, G., Kapelski, S., Scheuermayer, M., Fendel, R., Remarque, E., Altmann, F., Maresch, D., Reimann, A., Pradel, G., Schillberg, S., Fischer, R. (2015). Detailed functional characterization of glycosylated and nonglycosylated variants of malaria vaccine candidate PfAMA1 produced in *Nicotiana benthamiana* and analysis of growth inhibitory responses in rabbits. *Plant Biotechnol. J.* **13**: 222–234.
- Botté, C.Y., Yamaryo-Botté, Y., Rupasinghe, T.W.T., Mullin, K.A., MacRae, J.I., Spureck, T.P., Kalanon, M., Shears, M.J., Coppel, R.L., Crellin, P.K., Marechal, E., McConville, M.J., McFadden, G.I. (2013). Atypical lipid composition in the purified relict plastid (apicoplast)

- of malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 7506–7511.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Brancucci, N.M.B., Bertschi, N.L., Zhu, L., Niederwieser, I., Chin, W.H., Wampfler, R., Freymond, C., Rottmann, M., Felger, I., Bozdech, Z., Voss, T.S. (2014). Heterochromatin Protein 1 Secures Survival and Transmission of Malaria Parasites. *Cell Host Microbe* **16**: 165–176.
- Brancucci, N.M.B., De Niz, M., Straub, T.J., Ravel, D., Sollelis, L., Birren, B.W., Voss, T.S., Neafsey, D.E., Marti, M. (2018.) Probing *Plasmodium falciparum* sexual commitment at the single-cell level. *Wellcome Open Res.* **3**: 70.
- Brancucci, N. M.B., Gerdt, J.P., Wang, C., De Niz, M., Philip, N., Adapa, S.R., Zhang, M., Hitz, E., Niederwieser, I., Boltryk, S.D., Laffitte, M.-C., Clark, M.A., Grüning, C., Ravel, D., Blancke Soares, A., Demas, A., Bopp, S., Rubio-Ruiz, B., Conejo-Garcia, A., Wirth, D.F., Gendaszewska-Darmach, E., Duraisingh, M.T., Adams, J.H., Voss, T.S., Waters, A.P., Jiang, R.H.Y., Clardy, J., Marti, M. (2017). Lysophosphatidylcholine Regulates Sexual Stage Differentiation in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell* **171**: 1532-1544.
- Brancucci, N.M.B., Goldowitz, I., Buchholz, K., Werling, K., Marti, M. (2015). An assay to probe *Plasmodium falciparum* growth, transmission stage formation and early gametocyte development. *Nat. Protoc.* **10**: 1131–1142.
- Bridges, J.P., Ikegami, M., Brilli, L.L., Chen, X., Mason, R.J., Shannon, J.M. (2010). LPCAT1 regulates surfactant phospholipid synthesis and is required for transitioning to air breathing in mice. *J. Clin. Invest.* **120**: 1736–1748.
- Broich, M., Rydzewski, K., McNealy, T.L., Marre, R., Flieger, A. (2006). The global regulatory proteins LetA and RpoS control phospholipase A, lysophospholipase A, acyltransferase, and other hydrolytic activities of *Legionella pneumophila* JR32. *J. Bacteriol.* **188**: 1218–26.
- Bruce, M.C., Alano, P., Duthie, S., Carter, R. (1990). Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology* **100**: 191–200.
- Bruntz, R.C., Lindsley, C.W., Brown, H.A. (2014). Phospholipase D Signaling Pathways and Phosphatidic Acid as Therapeutic Targets in Cancer. *Pharmacol. Rev.* **66**: 1033–1079.
- Buckling, A., Ranford-Cartwright, L.C., Miles, A., Read, A.F. (1999). Chloroquine increases *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis in vitro. *Parasitology* **118**: 339–346.
- Burda, P.C., Roelli, M.A., Schaffner, M., Khan, S.M., Janse, C.J., Heussler, V.T. (2015). A *Plasmodium* phospholipase is involved in disruption of the liver stage parasitophorous vacuole membrane. *PLoS Pathog.* **11**: e1004760.
- Burke, J.E., Dennis, E.A. (2009). Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* **50**: S237–S242.
- Bushell, E., Gomes, A.R., Sanderson, T., Anar, B., Girling, G., Herd, C., Metcalf, T., Modrzynska, K., Schwach, F., Martin, R.E., Mather, M.W., McFadden, G.I., Parts, L., Rutledge, G.G., Vaidya, A.B., Wengelnik, K., Rayner, J.C., Billker, O. (2017). Functional Profiling of a *Plasmodium* Genome Reveals an Abundance of Essential Genes. *Cell* **170**: 260-272.
- Calderone, R.A., Fonzi, W.A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **9**: 327–335.

- Carey, A.F., Singer, M., Bargieri, D., Thiberge, S., Frischknecht, F., Ménard, R., Amino, R. (2014). Calcium dynamics of *Plasmodium berghei* sporozoite motility. *Cell. Microbiol.* **16**: 768–783.
- Carper, M.J., Zhang, S., Turk, J., Ramanadham, S. (2008). Skeletal Muscle Group VIA Phospholipase A₂ (iPLA₂β): Expression and Role in Fatty Acid Oxidation. *Biochemistry* **47**: 12241–12249.
- Cassaing, S., Fauvel, J., Bessi res, M.-H., Guy, S., S gu la, J.-P., Chap, H. (2000). *Toxoplasma gondii* secretes a calcium-independent phospholipase A₂. *Int. J. Parasitol.* **30**: 1137–1142.
- Chaubey, S., Grover, M., Tatu, U. (2014). Endoplasmic Reticulum Stress Triggers Gametocytogenesis in the Malaria Parasite. *J. Biol. Chem.* **289**: 16662–16674.
- Chen, S.C., Wright, L.C., Santangelo, R.T., Muller, M., Moran, V.R., Kuchel, P.W., Sorrell, T.C. (1997). Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **65**: 405–411.
- Cole, L.K., Vance, J.E., Vance, D.E. (2012). Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**: 754–761.
- Coleman, B.I., Skillman, K.M., Jiang, R.H.Y., Childs, L.M., Altenhofen, L.M., Ganter, M., Leung, Y., Goldowitz, I., Kafsack, B.F.C., Marti, M., Llinás, M., Buckee, C.O., Duraisingh, M.T. (2014). A *Plasmodium falciparum* Histone Deacetylase Regulates Antigenic Variation and Gametocyte Conversion. *Cell Host Microbe* **16**: 177–186.
- Collins, C.R., Das, S., Wong, E.H., Andenmatten, N., Stallmach, R., Hackett, F., Herman, J.-P., M ller, S., Meissner, M., Blackman, M.J. (2013). Robust inducible Cre recombinase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* enables efficient gene deletion within a single asexual erythrocytic growth cycle. *Mol. Microbiol.* **88**: 687–701.
- Coppens, I. (2013). Targeting lipid biosynthesis and salvage in apicomplexan parasites for improved chemotherapies. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 823–835.
- Côtes, K., Bakala N’goma, J.C., Dhouib, R., Douchet, I., Maurin, D., Carrière, F., Canaan, S. (2008). Lipolytic enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**: 741–9.
- Cowman, A.F., Crabb, B.S. (2006). Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell* **124**: 755–766.
- Crabb, B.S., Rug, M., Gilberger, T.-W., Thompson, J.K., Triglia, T., Maier, A.G., Cowman, A.F. (2004). Transfection of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods Mol Biol* **270**: 263–276.
- Cummings, B.S. (2007). Phospholipase A₂ as targets for anti-cancer drugs. *Biochem. Pharmacol.* **74**: 949–959.
- Cuzick, A., Stirling, F.R., Lindsay, S.L., Evans, T.J. (2006). The Type III Pseudomonal Exotoxin U Activates the c-Jun NH₂-Terminal Kinase Pathway and Increases Human Epithelial Interleukin-8 Production. *Infect. Immun.* **74**: 4104–4113.
- Czesny, B., Goshu, S., Cook, J.L., Williamson, K.C. (2009). The Proteasome Inhibitor Epoxomicin Has Potent *Plasmodium falciparum* Gametocytocidal Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 4080–4085.
- Dabral, D., Coorssen, J.R. (2017). Phospholipase A₂: Potential roles in native membrane fusion.

- Int. J. Biochem. *Cell Biol.* **85**: 1–5.
- de Koning-Ward, T.F., Dixon, M.W.A., Tilley, L., Gilson, P.R. (2016). *Plasmodium* species: master renovators of their host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 494–507.
- De Maria, L., Vind, J., Oxenbøll, K.M., Svendsen, A., Patkar, S. (2007). Phospholipases and their industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 290–300.
- De Niz, M., Burda, P.-C., Kaiser, G., del Portillo, H.A., Spielmann, T., Frischknecht, F., Heussler, V.T. (2016). Progress in imaging methods: insights gained into *Plasmodium* biology. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**: 37–54.
- De Niz, M., Meibalan, E., Mejia, P., Ma, S., Brancucci, N.M.B., Agop-Nersesian, C., Mandt, R., Ngotho, P., Hughes, K.R., Waters, A.P., Huttenhower, C., Mitchell, J.R., Martinelli, R., Frischknecht, F., Seydel, K.B., Taylor, T., Milner, D., Heussler, V.T., Marti, M. (2018). *Plasmodium* gametocytes display homing and vascular transmigration in the host bone marrow. *Sci. Adv.* **4**: eaat3775.
- Déchamps, S., Maynadier, M., Wein, S., Gannoun-Zaki, L., Maréchal, E., Vial, H.J. (2010). Rodent and nonrodent malaria parasites differ in their phospholipid metabolic pathways. *J. Lipid Res.* **51**: 81–96.
- Déchamps, S., Shastri, S., Wengelnik, K., Vial, H.J. (2010). Glycerophospholipid acquisition in *Plasmodium* – A puzzling assembly of biosynthetic pathways. *Int. J. Parasitol.* **40**: 1347–1365.
- Dekker, N., Tommassen, J., Lustig, A., Rosenbusch, J.P., Verheij, H.M. (1997). Dimerization Regulates the Enzymatic Activity of *Escherichia coli* Outer Membrane Phospholipase A. *J. Biol. Chem.* **272**: 3179–3184.
- Dekker, N., Tommassen, J., Verheij, H.M. (1999). Bacteriocin Release Protein Triggers Dimerization of Outer Membrane Phospholipase A In Vivo. *J. Bacteriol.* **181**: 3281.
- Delagebeaudeuf, C., Gassama-Diagne, A., Nauze, M., Ragab, A., Li, R.Y., Capdevielle, J., Ferrara, P., Fauvel, J., Chap, H. (1998). Biochemical characterization and cloning of guinea pig intestinal phospholipase B. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **859**: 192–193.
- Delagebeaudeuf, C., Gassama, A., Collet, X., Nauze, M., Chap, H. (1996). Guinea pig intestinal phospholipase B: protein expression during enterocyte maturation and effects of N-oligosaccharide removal on enzymatic activities and protein stability. *Biochim. Biophys. Acta* **1303**: 119–126.
- Deligianni, E., Morgan, R.N., Bertuccini, L., Wirth, C.C., Silmon de Monerri, N.C., Spanos, L., Blackman, M.J., Louis, C., Pradel, G., Siden-Kiamos, I. (2013). A perforin-like protein mediates disruption of the erythrocyte membrane during egress of *Plasmodium berghei* male gametocytes. *Cell. Microbiol.* **15**: 1438–1455.
- Denizot, Y., Chianéa, T., Labrousse, F., Truffinet, V., Delage, M., Mathonnet, M. (2005). Platelet-activating factor and human thyroid cancer. *Eur. J. Endocrinol.* **153**: 31–40.
- Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V., Kokotos, G. (2011). Phospholipase A₂ Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chem. Rev.* **111**: 6130–6185.
- Djordjevic, J.T. (2010). Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Front. Microbiol.* **1**: 1–13.

- Dorin-Semblat, D., Quashie, N., Halbert, J., Sicard, A., Doerig, Caroline, Peat, E., Ranford-Cartwright, L., Doerig, Christian (2007). Functional characterization of both MAP kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by reverse genetics. *Mol. Microbiol.* **65**: 1170–1180.
- Dvorin, J.D., Martyn, D.C., Patel, S.D., Grimley, J.S., Collins, C.R., Hopp, C.S., Bright, A.T., Westenberger, S., Winzeler, E., Blackman, M.J., Baker, D.A., Wandless, T.J., Duraisingh, M.T. (2010). A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. *Science* **328**: 910–912.
- Dyer, M., Day, K. (2000). Expression of *Plasmodium falciparum* trimeric G proteins and their involvement in switching to sexual development. *Mol. Biochem. Parasitol.* **108**: 67–78.
- Eksi, S., Haile, Y., Furuya, T., Ma, L., Su, X., Williamson, K.C. (2005). Identification of a subtelomeric gene family expressed during the asexual–sexual stage transition in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **143**: 90–99.
- Eksi, S., Morahan, B.J., Haile, Y., Furuya, T., Jiang, H., Ali, O., Xu, H., Kiattibutr, K., Suri, A., Czesny, B., Adeyemo, A., Myers, T.G., Sattabongkot, J., Su, X., Williamson, K.C. (2012). *Plasmodium falciparum* Gametocyte Development 1 (*Pfgdv1*) and Gametocytogenesis Early Gene Identification and Commitment to Sexual Development. *PLoS Pathog.* **8**: e1002964.
- Elabbadi, N., Ancelin, M.L., Vial, H.J. (1997). Phospholipid metabolism of serine in *Plasmodium*-infected erythrocytes involves phosphatidylserine and direct serine decarboxylation. *Biochem. J.* **324**: 435–445.
- Elmendorf, H.G., Haldar, K. (1994). *Plasmodium falciparum* exports the Golgi marker sphingomyelin synthase into a tubovesicular network in the cytoplasm of mature erythrocytes. *J. Cell Biol.* **124**: 449–462.
- Elmendorf, H.G., Haldar, K. (1993). Identification and localization of ERD2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: separation from sites of sphingomyelin synthesis and implications for organization of the Golgi. *EMBO J.* **12**: 4763–73.
- Esposito, A., Choimet, J.-B., Skepper, J.N., Mauritz, J.M.A., Lew, V.L., Kaminski, C.F., Tiffert, T. (2010). Quantitative Imaging of Human Red Blood Cells Infected with *Plasmodium falciparum*. *Biophys. J.* **99**: 953–960.
- Farn, J.L., Strugnell, R.A., Hoyne, P.A., Michalski, W.P., Tennent, J.M. (2001). Molecular Characterization of a Secreted Enzyme with Phospholipase B Activity from *Moraxella bovis*. *J. Bacteriol.* **183**: 6717.
- Farooqui, A.A., Litsky, M.L., Farooqui, T., Horrocks, L.A. (1999). Inhibitors of intracellular phospholipase A₂ activity: their neurochemical effects and therapeutic importance for neurological disorders. *Brain Res. Bull.* **49**: 139–53.
- Farrell, A., Thirugnanam, S., Lorestani, A., Dvorin, J.D., Eidell, K.P., Ferguson, D.J.P., Anderson-White, B.R., Duraisingh, M.T., Marth, G.T., Gubbels, M.-J. (2012). A DOC2 Protein Identified by Mutational Profiling Is Essential for Apicomplexan Parasite Exocytosis. *Science* **335**: 218–221.
- Filarsky, M., Fraschka, S.A., Niederwieser, I., Brancucci, N.M.B., Carrington, E., Carrió, E., Moes, S., Jenoe, P., Bártfai, R., Voss, T.S. (2018). GDV1 induces sexual commitment of malaria parasites by antagonizing HP1-dependent gene silencing. *Science* **359**: 1259–1263.

- Fivelman, Q.L., McRobert, L., Sharp, S., Taylor, C.J., Saeed, M., Swales, C.A., Sutherland, C.J., Baker, D.A. (2007). Improved synchronous production of *Plasmodium falciparum* gametocytes in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.* **154**: 119–123.
- Flammersfeld, A., Lang, C., Flieger, A., Pradel, G. (2018). Phospholipases during membrane dynamics in malaria parasites. *Int. J. Med. Microbiol.* **308**: 129–141.
- Flammersfeld, A., Panyot, A., Yamaryo-Botté, Y., Aurass, P., Przyborski, J.M., Flieger, A., Botté, C., Pradel, G. (2020). A patatin-like phospholipase functions during gametocyte induction in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell. Microbiol.* **22**: e13146.
- Flieger, A., Frischknecht, F., Häcker, G., Hornef, M.W., Pradel, G. (2018). Pathways of host cell exit by intracellular pathogens. *Microb. Cell* **5**: 525–544.
- Flieger, A., Rydzewski, K., Banerji, S., Broich, M., Heuner, K. (2004). Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of *Legionella pneumophila*, plaB, exhibiting hemolytic activity. *Infect. Immun.* **72**: 2648–58.
- Flores-Díaz, M., Monturiol-Gross, L., Naylor, C., Alape-Girón, A., Flieger, A. (2016). Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**: 597–628.
- Flueck, C., Bartfai, R., Volz, J., Niederwieser, I., Salcedo-Amaya, A.M., Alako, B.T.F., Ehlgen, F., Ralph, S.A., Cowman, A.F., Bozdech, Z., Stunnenberg, H.G., Voss, T.S. (2009). *Plasmodium falciparum* heterochromatin protein 1 marks genomic loci linked to phenotypic variation of exported virulence factors. *PLoS Pathog.* **5**: e1000569.
- Folador, E., de Oliveira Junior, A., Tiwari, S., Jamal, S., Ferreira, R., Barh, D., Ghosh, P., Silva, A., Azevedo, V. (2015). *In Silico* Protein-Protein Interactions: Avoiding Data and Method Biases Over Sensitivity and Specificity. *Curr. Protein Pept. Sci.* **16**: 689–700.
- Francis, S.E., Sullivan, D.J., Goldberg, D.E. (1997). Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**: 97–123.
- Frankel, M.B., Mordue, D.G., Knoll, L.J. (2007). Discovery of parasite virulence genes reveals a unique regulator of chromosome condensation 1 ortholog critical for efficient nuclear trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 10181–10186.
- Fraschka, S.A., Filarsky, M., Hoo, R., Niederwieser, I., Yam, X.Y., Brancucci, N.M.B., Mohring, F., Mushunje, A.T., Huang, X., Christensen, P.R., Nosten, F., Bozdech, Z., Russell, B., Moon, R.W., Marti, M., Preiser, P.R., Bartfai, R., Voss, T.S. (2018). Comparative Heterochromatin Profiling Reveals Conserved and Unique Epigenome Signatures Linked to Adaptation and Development of Malaria Parasites. *Cell Host Microbe* **23**: 407–420.
- Garcia-Garcia, H.M., Serruys, P.W. (2009). Phospholipase A₂ inhibitors. *Curr. Opin. Lipidol.* **20**: 327–332.
- García-Martínez, V., Villanueva, J., Torregrosa-Hetland, C.J., Bittman, R., Higdon, A., Darley-Usmar, V.M., Davletov, B., Gutiérrez, L.M. (2013). Lipid Metabolites Enhance Secretion Acting on SNARE Microdomains and Altering the Extent and Kinetics of Single Release Events in Bovine Adrenal Chromaffin Cells. *PLoS One* **8**: e75845.
- Gaspar, A.H., Machner, M.P. (2014). VipD is a Rab5-activated phospholipase A₁ that protects *Legionella pneumophila* from endosomal fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 4560–4565.

- Gerold, P., Schwarz, R.T. (2001). Biosynthesis of glycosphingolipids *de-novo* by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **112**: 29–37.
- Gillrie, M.R., Ho, M. (2017). Dynamic interactions of *Plasmodium* spp. with vascular endothelium. *Tissue Barriers* **5**: e1268667.
- Goh, Y.S., McGuire, D., Rénia, L. (2019). Vaccination With Sporozoites: Models and Correlates of Protection. *Front. Immunol.* **10**: 1227.
- Gomes, A.R., Bushell, E., Schwach, F., Girling, G., Anar, B., Quail, M.A., Herd, C., Pfander, C., Modrzynska, K., Rayner, J.C., Billker, O. (2015). A genome-scale vector resource enables high-throughput reverse genetic screening in a malaria parasite. *Cell Host Microbe* **17**: 404–413.
- Gonzalez-Zorn, B., Dominguez-Bernal, G., Suarez, M., Ripio, M.-T., Vega, Y., Novella, S., Vazquez-Boland, J.-A. (1999). The *smcL* gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. *Mol. Microbiol.* **33**: 510–523.
- Grüning, C., Heiber, A., Kruse, F., Flemming, S., Franci, G., Colombo, S.F., Fasana, E., Schoeler, H., Borgese, N., Stunnenberg, H.G., Przyborski, J.M., Gilberger, T.-W., Spielmann, T. (2012). Uncovering Common Principles in Protein Export of Malaria Parasites. *Cell Host Microbe* **12**: 717–729.
- Grzelczyk, A., Gendaszewska-Darmach, E. (2013). Novel bioactive glycerol-based lysophospholipids: new data - new insight into their function. *Biochimie* **95**: 667–79.
- Gulati, S., Ekland, E.H., Ruggles, K.V., Chan, R.B., Jayabalasingham, B., Zhou, B., Mantel, P.-Y., Lee, M.C.S., Spottiswoode, N., Coburn-Flynn, O., Hjelmqvist, D., Worgall, T.S., Marti, M., Di Paolo, G., Fidock, D.A. (2015). Profiling the Essential Nature of Lipid Metabolism in Asexual Blood and Gametocyte Stages of *Plasmodium falciparum*. *Cell Host Microbe* **18**: 371–381.
- Hall, B.G. (2013). Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 1229–1235.
- Hamilton, W.L., Amato, R., van der Pluijm, R.W., Jacob, C.G., Quang, H.H., Thuy-Nhien, N.T., Hien, T.T., Hongvanthong, B., Chindavongsa, K., Mayxay, M., Huy, R., Leang, R., Huch, C., Dysoley, L., Amaratunga, C., Suon, S., Fairhurst, R.M., Tripura, R., Peto, T.J., Sovann, Y., Jittamala, P., Hanboonkunupakarn, B., Pukrittayakamee, S., Chau, N.H., Imwong, M., Dhorda, M., Vongprommek, R., Chan, X.H.S., Maude, R.J., Pearson, R.D., Nguyen, T., Rockett, K., Drury, E., Gonçalves, S., White, N.J., Day, N.P., Kwiatkowski, D.P., Dondorp, A.M., Miotto, O. (2019). Evolution and expansion of multidrug-resistant malaria in southeast Asia: a genomic epidemiology study. *Lancet Infect. Dis.* **19**: 943–951.
- Hanada, K., Palacpac, N.M.Q., Magistrado, P. a, Kurokawa, K., Rai, G., Sakata, D., Hara, T., Horii, T., Nishijima, M., Mitamura, T. (2002). *Plasmodium falciparum* phospholipase C hydrolyzing sphingomyelin and lysocholinephospholipids is a possible target for malaria chemotherapy. *J. Exp. Med.* **195**: 23–34.
- Hänel, H., Kirsch, R., Schmidts, H.-L., Kottmann, H. (1995). New systematically active antimycotics from the beta-blocker category. *Mycoses* **38**: 251–264.
- Harteneck, C., Frenzel, H., Kraft, R. (2007). N-(p-amylocinnamoyl)anthranilic acid (ACA): a

- phospholipase A₂ inhibitor and TRP channel blocker. *Cardiovasc. Drug Rev.* **25**: 61–75.
- Hawking, F., Wilson, M.E., Gammage, K. (1971). Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **65**: 549–559.
- Hawthorne, P. L., Trenholme, K. R., Skinner-Adams, T. S., Spielmann, T., Fischer, K., Dixon, M. W. A., Ortega, M.R., Anderson, K.L., Kemp, D.J., Gardiner, D. L. (2004). A novel *Plasmodium falciparum* ring stage protein, REX, is located in Maurer's clefts. *Mol. Biochem. Parasitol.* **136**: 181–189.
- Hayashida, A., Bartlett, A.H., Foster, T.J., Park, P.W., Reinisch, C., Romisch, J., Wiedermann, C., Hub, E., Rot, A., Schutze, S., Gulbins, E., Uhlig, S., Fosheim, G., McDougal, L., Carey, R., Fridkin, S. (2009). *Staphylococcus aureus* beta-toxin induces lung injury through syndecan-1. *Am. J. Pathol.* **174**: 509–18.
- Hazen, S.L., Gross, R.W. (1991). ATP-dependent regulation of rabbit myocardial cytosolic calcium-independent phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **266**: 14526–34.
- Hermansson, M., Hänninen, S., Hokynar, K., Somerharju, P. (2016). The PNPLA-family phospholipases involved in glycerophospholipid homeostasis of HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**: 1058–1065.
- Hilbi, H., Jarraud, S., Hartland, E., Buchrieser, C. (2010). Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. *Mol. Microbiol.* **76**: 1–11.
- Hill, R.J., Ringel, A., Knuepfer, E., Moon, R.W., Blackman, M.J., van Ooij, C. (2016). Regulation and Essentiality of the StAR-related Lipid Transfer (START) Domain-containing Phospholipid Transfer Protein PFA0210c in Malaria Parasites. *J. Biol. Chem.* **291**: 24280–24292.
- Hiller, M., Lang, C., Michel, W., Flieger, A. (2018). Secreted phospholipases of the lung pathogen *Legionella pneumophila*. *Int. J. Med. Microbiol.* **308**: 168–175.
- Hiraoka, M., Abe, A., Lu, Y., Yang, K., Han, X., Gross, R.W., Shayman, J.A., 2006. Lysosomal Phospholipase A₂ and Phospholipidosis. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 6139–6148.
- Hirschberg, H.J., Simons, J.W., Dekker, N., Egmond, M.R. (2001). Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5037–44.
- Hishikawa, D., Hashidate, T., Shimizu, T., Shindou, H. (2014). Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *J. Lipid Res.* **55**: 799–807.
- Hliscs, M., Millet, C., Dixon, M.W., Siden-Kiamos, I., McMillan, P., Tilley, L. (2015). Organization and function of an actin cytoskeleton in *P. lasmodium falciparum* gametocytes. *Cell. Microbiol.* **17**: 207–225.
- Hossain, M.A., Ghannoum, M.A. (2000). New investigational antifungal agents for treating invasive fungal infections. *Expert Opin. Investig. Drugs* **9**: 1797–813.
- Huseby, M.J., Kruse, A.C., Digre, J., Kohler, P.L., Vocke, J.A., Mann, E.E., Bayles, K.W., Bohach, G.A., Schlievert, P.M., Ohlendorf, D.H., Earhart, C.A. (2010.) Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 14407–14412.

- Idro, R., Marsh, K., John, C.C., Newton, C.R.J. (2010). Cerebral Malaria: Mechanisms of Brain Injury and Strategies for Improved Neurocognitive Outcome. *Pediatr. Res.* **68**: 267–274.
- Ifediba, T., Vanderberg, J.P. (1981). Complete in vitro maturation of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Nature* **294**: 364–366.
- Ikadai, H., Shaw Saliba, K., Kanzok, S.M., McLean, K.J., Tanaka, T.Q., Cao, J., Williamson, K.C., Jacobs-Lorena, M. (2013). Transposon mutagenesis identifies genes essential for *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: E1676–E1684.
- Istivan, T.S., Coloe, P.J. (2006). Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology* **152**: 1263–74.
- Istvan, E.S., Mallari, J.P., Corey, V.C., Dharia, N. V, Marshall, G.R., Winzeler, E.A., Goldberg, D.E. (2017). Esterase mutation is a mechanism of resistance to antimalarial compounds. *Nat. Commun.* **8**: 14240.
- Jackson, K.E., Klonis, N., Ferguson, D.J.P., Adisa, A., Dogovski, C., Tilley, L. (2004). Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **54**: 109–122.
- Janse, C.J., van der Klooster, P.F., van der Kaay, H.J., van der Ploeg, M., Overdulve, J.P. (1986). DNA synthesis in *Plasmodium berghei* during asexual and sexual development. *Mol. Biochem. Parasitol.* **20**: 173–182.
- Javanmardi, F., Emami, A., Pirbonyeh, N., Keshavarzi, A., Rajaei, M. (2019). A systematic review and meta-analysis on Exo-toxins prevalence in hospital acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Infect. Genet. Evol.* **75**: 104037.
- Jenkins, C.M., Mancuso, D.J., Yan, W., Sims, H.F., Gibson, B., Gross, R.W. (2004). Identification, Cloning, Expression, and Purification of Three Novel Human Calcium-independent Phospholipase A₂ Family Members Possessing Triacylglycerol Lipase and Acylglycerol Transacylase Activities. *J. Biol. Chem.* **279**: 48968–48975.
- Jenkins, C.M., Yan, W., Mancuso, D.J., Gross, R.W. (2006). Highly selective hydrolysis of fatty acyl-CoAs by calcium-independent phospholipase A₂β. Enzyme autoacylation and acyl-CoA-mediated reversal of calmodulin inhibition of phospholipase A₂ activity. *J. Biol. Chem.* **281**: 15615–24.
- Joice, R., Nilsson, S.K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., Seydel, K.B., Bertuccini, L., Alano, P., Williamson, K.C., Duraisingh, M.T., Taylor, T.E., Milner, D.A., Marti, M. (2014). *Plasmodium falciparum* transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Sci. Transl. Med.* **6**: 244–244.
- Josling, Gabrielle A, Williamson, K.C., Llinás, M. (2018). Regulation of Sexual Commitment and Gametocytogenesis in Malaria Parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **72**: 501–519.
- Kaelin, W.G., Krek, W., Sellers, W.R., DeCaprio, J.A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C.S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P.J., Blunar, M.A., Livingston, D.M., Flemington, E.K. (1992). Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* **70**: 351–364.
- Kafsack, B.F.C., Rovira-Graells, N., Clark, T.G., Bancells, C., Crowley, V.M., Campino, S.G., Williams, A.E., Drought, L.G., Kwiatkowski, D.P., Baker, D.A., Cortés, A., Llinás, M. (2014). A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria

- parasites. *Nature* **507**: 248–252.
- Kanai, S., Ishihara, K., Kawashita, E., Tomoo, T., Nagahira, K., Hayashi, Y., Akiba, S. (2016). ASB14780, an Orally Active Inhibitor of Group IVA Phospholipase A₂, Is a Pharmacotherapeutic Candidate for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **356**: 604–14.
- Katayama, Y., Baba, T., Sekine, M., Fukuda, M., Hiramatsu, K. (2013). Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **195**: 1194–203.
- Kauther, K.M., Höft, C., Rissling, I., Oertel, W.H., Möller, J.C. (2011). The PLA₂G6 gene in early-onset Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **26**: 2415–2417.
- Kebaier, C., Vanderberg, J.P., 2010. Initiation of *Plasmodium* sporozoite motility by albumin is associated with induction of intracellular signaling. *Int. J. Parasitol.* **40**: 25–33.
- Kent, R.S., Modrzynska, K.K., Cameron, R., Philip, N., Billker, O., Waters, A.P. (2018). Inducible developmental reprogramming redefines commitment to sexual development in the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat. Microbiol.* **3**: 1206–1213.
- Kienesberger, P.C., Oberer, M., Lass, A., Zechner, R. (2008). Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J. Lipid Res.* **50**: 63–68.
- Kimple, M.E., Brill, A.L., Pasker, R.L. (2013). Overview of affinity tags for protein purification. *Curr. Protoc. protein Sci.* **73**: 9.9.1–9.9.23.
- Kitsioulis, E., Nakos, G., Lekka, M.E. (2009). Phospholipase A₂ subclasses in acute respiratory distress syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**: 941–953.
- Knapp, B., Hundt, E., Küpper, H.A. (1990). *Plasmodium falciparum* aldolase: gene structure and localization. *Mol. Biochem. Parasitol.* **40**: 1–12.
- Knuepfer, E., Napiorkowska, M., van Ooij, C., Holder, A.A. (2017). Generating conditional gene knockouts in *Plasmodium* – a toolkit to produce stable DiCre recombinase-expressing parasite lines using CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.* **7**: 3881.
- Koduri, R.S., Grönroos, J.O., Laine, V.J.O., Le Calvez, C., Lambeau, G., Nevalainen, T.J., Gelb, M.H. (2002). Bactericidal Properties of Human and Murine Groups I, II, V, X, and XII Secreted Phospholipases A₂. *J. Biol. Chem.* **277**: 5849–5857.
- Kokotou, M.G., Limnios, D., Nikolaou, A., Psarra, A., Kokotos, G. (2017). Inhibitors of phospholipase A₂ and their therapeutic potential: an update on patents (2012–2016). *Expert Opin. Ther. Pat.* **27**: 217–225.
- Kooijman, E.E., Burger, K.N.J. (2009). Biophysics and function of phosphatidic acid: A molecular perspective. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**: 881–888.
- Kooijman, E.E., Chupin, V., Fuller, N.L., Kozlov, M.M., de Kruijff, B., Burger, K.N.J., Rand, P.R. (2005). Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry* **44**: 2097–102.
- Koressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R., Remm, M. (2018). Primer3 masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics* **34**: 1937–1938.
- Koressaar, T., Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program

- Primer3. *Bioinformatics* **23**: 1289–1291.
- Kramer, R.M., Sharp, J.D. (1997). Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂). *FEBS Lett.* **410**: 49–53.
- Ku, B., Lee, K.-H., Park, W.S., Yang, C.-S., Ge, J., Lee, S.-G., Cha, S.-S., Shao, F., Heo, W. Do, Jung, J.U., Oh, B.-H. (2012). VipD of *Legionella pneumophila* Targets Activated Rab5 and Rab22 to Interfere with Endosomal Trafficking in Macrophages. *PLoS Pathog.* **8**: e1003082.
- Kuehn, A., Pradel, G. (2010). The Coming-Out of Malaria Gametocytes. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**: 976827.
- Kuhle, K., Flieger, A. (2013). *Legionella* Phospholipases Implicated in Virulence. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. pp. 175–209.
- Kuhle, K., Krausze, J., Curth, U., Rössle, M., Heuner, K., Lang, C., Flieger, A. (2014). Oligomerization Inhibits *Legionella pneumophila* PlaB Phospholipase A Activity. *J. Biol. Chem.* **289**: 18657–18666.
- Külzer, S., Rug, M., Brinkmann, K., Cannon, P., Cowman, A., Lingelbach, K., Blatch, G.L., Maier, A.G., Przyborski, J.M. (2010). Parasite-encoded Hsp40 proteins define novel mobile structures in the cytosol of the *P. falciparum*-infected erythrocyte. *Cell. Microbiol.* **12**: 1398–1420.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**: 1870–1874.
- LaCount, D.J., Vignali, M., Chettier, R., Phansalkar, A., Bell, R., Hesselberth, J.R., Schoenfeld, L.W., Ota, I., Sahasrabudhe, S., Kurschner, C., Fields, S., Hughes, R.E. (2005). A protein interaction network of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **438**: 103–107.
- Lambeau, G., Gelb, M.H. (2008). Biochemistry and Physiology of Mammalian Secreted Phospholipases A₂. *Annu. Rev. Biochem.* **77**: 495–520.
- Lambros, C., Vanderberg, J.P. (1979). Synchronization of *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stages in Culture. *J. Parasitol.* **65**: 418–420.
- Lang, C., Flieger, A. (2011). Characterisation of *Legionella pneumophila* phospholipases and their impact on host cells. *Eur. J. Cell Biol.* **90**: 903–912.
- Lang, C., Hiller, M., Flieger, A. (2017). Disulfide loop cleavage of *Legionella pneumophila* PlaA boosts lysophospholipase A activity. *Sci. Rep.* **7**: 16313.
- Lang, C., Rastew, E., Hermes, B., Siegbrecht, E., Ahrends, R., Banerji, S., Flieger, A. (2012). Zinc Metalloproteinase ProA Directly Activates *Legionella pneumophila* PlaC Glycerophospholipid:cholesterol Acyltransferase. *J. Biol. Chem.* **287**: 23464–23478.
- Lasonder, E., Rijpmma, S.R., van Schaijk, B.C.L., Hoeijmakers, W.A.M., Kensche, P.R., Gresnigt, M.S., Italiaander, A., Vos, M.W., Woestenenk, R., Bousema, T., Mair, G.R., Khan, S.M., Janse, C.J., Bártfai, R., Sauerwein, R.W. (2016). Integrated transcriptomic and proteomic analyses of *P. falciparum* gametocytes: molecular insight into sex-specific processes and translational repression. *Nucleic Acids Res.* **44**: 6087–6101.
- Latham, C.F., Osborne, S.L., Cryle, M.J., Meunier, F.A. (2006). Arachidonic acid potentiates exocytosis and allows neuronal SNARE complex to interact with Munc18a. *J. Neurochem.* **100**: 1543–54.

- Laye, J., Gill, J.H. (2003). Phospholipase A₂ expression in tumors: a target for therapeutic intervention? *Drug Discov. Today* **8**: 710–716.
- Lee, R.S., Waters, A.P., Brewer, J.M. (2018). A cryptic cycle in haematopoietic niches promotes initiation of malaria transmission and evasion of chemotherapy. *Nat. Commun.* **9**: 1689.
- Lehane, A.M., Saliba, K.J., Allen, R.J., Kirk, K. (2004). Choline uptake into the malaria parasite is energized by the membrane potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**: 311–317.
- Leslie, C.C. (2015). Cytosolic phospholipase A₂: physiological function and role in disease. *J. Lipid Res.* **56**: 1386–1402.
- Lev, S. (2004). The role of the Nir/rdgB protein family in membrane trafficking and cytoskeleton remodeling. *Exp. Cell Res.* **297**: 1–10.
- Lévêque, M.F., Berry, L., Yamaryo-Botté, Y., Nguyen, H.M., Galera, M., Botté, C.Y., Besteiro, S. (2017). TgPL2, a patatin-like phospholipase domain-containing protein, is involved in the maintenance of apicoplast lipids homeostasis in *Toxoplasma*. *Mol. Microbiol.* **105**: 158–174.
- Levine, N.D. (1970). Taxonomy of the sporozoa. *J. Parasitol.* **56**: 208–209.
- Li, C., Ching Han Chang, C., Nagel, J., Porebski, B.T., Hayashida, M., Akutsu, T., Song, J., Buckle, A.M. (2016). Critical evaluation of *in silico* methods for prediction of coiled-coil domains in proteins. *Brief. Bioinform.* **17**: 270–282.
- Li, Y., Na, K., Lee, H.-J., Lee, E.-Y., Paik, Y.-K. (2011). Contribution of sams-1 and pmt-1 to lipid homeostasis in adult *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem.* **149**: 529–538.
- Limenitakis, J., Soldati-Favre, D. (2011). Functional genetics in *Apicomplexa*: Potentials and limits. *FEBS Lett.* **585**: 1579–1588.
- Lio, Y.-C., Dennis, E. (1998). Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of Group VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta* **1392**: 320–332.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Llinás, M. (2017). Less Lipid, More Commitment. *Cell* **171**: 1474–1476.
- López-Barragán, M.J., Lemieux, J., Quiñones, M., Williamson, K.C., Molina-Cruz, A., Cui, K., Barillas-Mury, C., Zhao, K., Su, X. (2011). Directional gene expression and antisense transcripts in sexual and asexual stages of *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics* **12**: 587.
- Lu, C.-S., Lai, S.-C., Wu, R.-M., Weng, Y.-H., Huang, C.-L., Chen, R.-S., Chang, H.-C., Wu-Chou, Y.-H., Yeh, T.-H. (2012). PLA₂G6 mutations in PARK14-linked young-onset parkinsonism and sporadic Parkinson's disease. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **159**: 183–191.
- Lu, T., Ito, M., Tchoua, U., Takemori, H., Okamoto, M., Tojo, H. (2001). Identification of Essential Residues for Catalysis of Rat Intestinal Phospholipase B/Lipase. *Biochemistry* **40**: 7133–7139.
- Lucas, M., Gaspar, A.H., Pallara, C., Rojas, A.L., Fernandez-Recio, J., Machner, M.P., Hierro, A. (2014). Structural basis for the recruitment and activation of the *Legionella* phospholipase VipD by the host GTPase Rab5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: E3514–E3523.
- Maguire, P.A., Sherman, I.W. (1990). Phospholipid composition, cholesterol content and

- cholesterol exchange in *Plasmodium falciparum*-infected red cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**: 105–112.
- Mahmoudi, S., Keshavarz, H. (2017). Efficacy of phase 3 trial of RTS, S/AS01 malaria vaccine: The need for an alternative development plan. *Hum. Vaccin. Immunother.* **13**: 2098–2101.
- Makler, M.T., Piper, R.C., Milhous, W.K. (1998). Lactate dehydrogenase and the diagnosis of malaria. *Parasitol. Today* **14**: 376–377.
- Malley, K.R., Koroleva, O., Miller, I., Sanishvili, R., Jenkins, C.M., Gross, R.W., Korolev, S. (2018). The structure of iPLA2 β reveals dimeric active sites and suggests mechanisms of regulation and localization. *Nat. Commun.* **9**: 765.
- Mamoun, C.B., Gluzman, I.Y., Goyard, S., Beverley, S.M., Goldberg, D.E. (1999). A set of independent selectable markers for transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 8716–8720.
- Mancio-Silva, L., Slavic, K., Grilo Ruivo, M.T., Grosso, A.R., Modrzynska, K.K., Vera, I.M., Sales-Dias, J., Gomes, A.R., MacPherson, C.R., Crozet, P., Adamo, M., Baena-Gonzalez, E., Tewari, R., Llinás, M., Billker, O., Mota, M.M. (2017). Nutrient sensing modulates malaria parasite virulence. *Nature* **547**: 213–216.
- Mantel, P.-Y., Hoang, A.N., Goldowitz, I., Potashnikova, D., Hamza, B., Vorobjev, I., Ghiran, I., Toner, M., Irimia, D., Ivanov, A.R., Barteneva, N., Marti, M. (2013). Malaria-Infected Erythrocyte-Derived Microvesicles Mediate Cellular Communication within the Parasite Population and with the Host Immune System. *Cell Host Microbe* **13**: 521–534.
- Marchi-Salvador, D.P., Fernandes, C.A.H., Silveira, L.B., Soares, A.M., Fontes, M.R.M. (2009). Crystal structure of a phospholipase A₂ homolog complexed with p-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1794**: 1583–1590.
- Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C.J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zheng, C., Geer, L.Y., Bryant, S.H. (2017). CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* **45**: D200–D203.
- Marin, J.G., Bonhomme, A., Guenounou, M., Pinon, J. (1996). Role of interferon-gamma against invasion by *Toxoplasma gondii* in a human monocytic cell line (THP1): involvement of the parasite's secretory phospholipase A₂. *Cell Immunol* **169**: 218–25.
- Marks, F., Müller-Decker, K., Fürstenberger, G. (2000). A causal relationship between unscheduled eicosanoid signaling and tumor development: cancer chemoprevention by inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Toxicology* **153**: 11–26.
- Maury, E., Prévost, M.C., Nauze, M., Redoulès, D., Tarroux, R., Charvéron, M., Salles, J.P., Perret, B., Chap, H., Gassama-Diagne, A. (2002). Human epidermis is a novel site of phospholipase B expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**: 362–369.
- McDermott, M., Wakelam, M.J., Morris, A.J. (2004). Phospholipase D. *Biochem. Cell Biol.* **82**: 225–253.
- McMorran, B., Town, L., Costelloe, E., Palmer, J., Engel, J., Hume, D., Wainwright, B. (2003). Effector ExoU from the type III secretion system is an important modulator of gene expression

- in lung epithelial cells in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infect. Immun.* **71**: 6035–6044.
- Meyer, M.C., Rastogi, P., Beckett, C.S., McHowat, J. (2005). Phospholipase A₂ inhibitors as potential anti-inflammatory agents. *Curr. Pharm. Des.* **11**: 1301–1312.
- Mi-Ichi, F., Kano, S., Mitamura, T. (2007). Oleic acid is indispensable for intraerythrocytic proliferation of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* **134**: 1671–1677.
- Mi-Ichi, F., Kita, K., Mitamura, T. (2006). Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilize a broad range of serum-derived fatty acids with limited modification for their growth. *Parasitology* **133**: 399–410.
- Mitamura, T., Hanada, K., Ko-Mitamura, E.P., Nishijima, M., Horii, T. (2000). Serum factors governing intraerythrocytic development and cell cycle progression of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Int.* **49**: 219–29.
- Mitamura, T., Palacpac, N.M.Q. (2003). Lipid metabolism in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: Possible new targets for malaria chemotherapy. *Microbes Infect.* **5**: 545–552.
- Modrzynska, K., Pfander, C., Chappell, L., Yu, L., Suarez, C., Dundas, K., Gomes, A.R., Goulding, D., Rayner, J.C., Choudhary, J., Billker, O. (2017). A Knockout Screen of ApiAP2 Genes Reveals Networks of Interacting Transcriptional Regulators Controlling the *Plasmodium* Life Cycle. *Cell Host Microbe* **21**: 11–22.
- Montoya, J., Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet* **363**: 1965–1976.
- Mordue, D.G., Scott-Weathers, C.F., Tobin, C.M., Knoll, L.J. (2007). A patatin-like protein protects *Toxoplasma gondii* from degradation in activated macrophages. *Mol. Microbiol.* **63**: 482–496.
- Morgan, C.P., Insall, R., Haynes, L., Cockcroft, S. (2004). Identification of phospholipase B from *Dictyostelium discoideum* reveals a new lipase family present in mammals, flies and nematodes, but not yeast. *Biochem. J.* **382**: 441–449.
- Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C.R., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., Rodríguez, A. (2001). Migration of *Plasmodium* Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science* **291**: 141–144.
- Mouchlis, V.D., Dennis, E.A. (2016). Membrane and inhibitor interactions of intracellular phospholipases A₂. *Adv. Biol. Regul.* **61**: 17–24.
- Muhia, D.K., Swales, C.A., Deng, W., Kelly, J.M., Baker, D.A. (2001). The gametocyte-activating factor xanthurenic acid stimulates an increase in membrane-associated guanylyl cyclase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **42**: 553–560.
- Mukherjee, P.K., Seshan, K.R., Cole, G.T., Ghannoum, M.A., Leidich, S.D., Chandra, J. (2001). Reintroduction of the PLB1 gene into *Candida albicans* restores virulence *in vivo*. *Microbiology* **147**: 2585–2597.
- Murakami, M., Sato, H., Miki, Y., Yamamoto, K., Taketomi, Y. (2015). A new era of secreted phospholipase A₂. *J. Lipid Res.* **56**: 1248–1261.
- Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Hirabayashi, T., Yamamoto, K. (2011). Recent progress in phospholipase A₂ research: From cells to animals to humans. *Prog. Lipid Res.* **50**: 152–192.

- Nagai, K., Thøgersen, H.C. (1987). Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **153**: 461–481.
- Naik, R.S., Krishnegowda, G., Gowda, D.C. (2003). Glucosamine Inhibits Inositol Acylation of the Glycosylphosphatidylinositol Anchors in Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **278**: 2036–2042.
- Neely, M.N., Ghannoum, M.A. (2000). The Exciting Future of Antifungal Therapy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**: 897–914.
- Ngotho, P., Soares, A.B., Hentzschel, F., Achcar, F., Bertuccini, L., Marti, M. (2019). Revisiting gametocyte biology in malaria parasites. *FEMS Microbiol. Rev.* **43**: 401–414.
- Ngwa, C.J., Kiesow, M.J., Papst, O., Orchard, L.M., Filarsky, M., Rosinski, A.N., Voss, T.S., Llinás, M., Pradel, G. (2017). Transcriptional Profiling Defines Histone Acetylation as a Regulator of Gene Expression during Human-to-Mosquito Transmission of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**: 320.
- Ngwa, C.J., Scheuermayer, M., Mair, G.R., Kern, S., Brühl, T., Wirth, C.C., Aminake, M.N., 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**: 256.
- Obaldia, N., Meibalan, E., Sa, J.M., Ma, S., Clark, M.A., Mejia, P., Moraes Barros, R.R., Otero, W., Ferreira, M.U., Mitchell, J.R., Milner, D.A., Huttenhower, C., Wirth, D.F., Duraisingh, M.T., Wellems, T.E., Marti, M. (2018). Bone Marrow Is a Major Parasite Reservoir in *Plasmodium vivax* Infection. *MBio* **9**: e00625-18.
- Oda, M., Hashimoto, M., Takahashi, M., Ohmae, Y., Seike, S., Kato, R., Fujita, A., Tsuge, H., Nagahama, M., Ochi, S., Sasahara, T., Hayashi, S., Hirai, Y., Sakurai, J. (2012). Role of Sphingomyelinase in Infectious Diseases Caused by *Bacillus cereus*. *PLoS One* **7**: e38054.
- Oda, M., Imagawa, H., Kato, R., Yabiku, K., Yoshikawa, T., Takemoto, T., Takahashi, H., Yamamoto, H., Nishizawa, M., Sakurai, J., Nagahama, M. (2014). Novel inhibitor of bacterial sphingomyelinase, SMY-540, developed based on three-dimensional structure analysis. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **29**: 303–310.
- Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., Peter Slotte, J. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* **41**: 66–97.
- Olayioye, M.A., Buchholz, M., Schmid, S., Schöffler, P., Hoffmann, P., Pomorski, T. (2007). Phosphorylation of StarD10 on serine 284 by casein kinase II modulates its lipid transfer activity. *J. Biol. Chem.* **282**: 22492–22498.
- Paliege, A., Roeschel, T., Neymeyer, H., Seidel, S., Kahl, T., Daigeler, A.L., Mutig, K., Mrowka, R., Ferreri, N.R., Wilson, B.S., Himmerkus, N., Bleich, M., Bachmann, S. (2012). Group VIA phospholipase A₂ is a target for vasopressin signaling in the thick ascending limb. *Am. J. Physiol. Physiol.* **302**: F865–F874.
- Pankhaniya, R.R., Tamura, M., Allmond, L.R., Moriyama, K., Ajayi, T., Wiener-Kronish, J.P., Sawa, T. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* causes acute lung injury via the catalytic activity of the patatin-like phospholipase domain of ExoU. *Crit. Care Med.* **32**: 2293–2299.
- Panyot, A. (2019). Funktionale Charakterisierung der Patatin-artigen Phospholipase PNPLA1 in den Blutstadien des humanpathogenen Malariaerregers *P. falciparum*. Masterarbeit.

- Park, J.B., Lee, C.S., Jang, J.-H., Ghim, J., Kim, Y.-J., You, S., Hwang, D., Suh, P.-G., Ryu, S.H. (2012). Phospholipase signalling networks in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**: 782–792.
- Pattabiraman, P.P., Lih, F.B., Tomer, K.B., Rao, P.V. (2012). The role of calcium-independent phospholipase A₂γ in modulation of aqueous humor drainage and Ca²⁺ sensitization of trabecular meshwork contraction. *Am. J. Physiol. Physiol.* **302**: C979–C991.
- Peatey, Christopher L, Dixon, M.W.A., Gardiner, D.L., Trenholme, K.R. (2013). Temporal evaluation of commitment to sexual development in *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* **12**: 134.
- Peatey, Christopher L., Watson, J.A., Trenholme, K.R., Brown, C.L., Nielson, L., Guenther, M., Timmins, N., Watson, G.S., Gardiner, D.L. (2013). Enhanced Gametocyte Formation in Erythrocyte Progenitor Cells: A Site-Specific Adaptation by *Plasmodium falciparum*. *J. Infect. Dis.* **208**: 1170–1174.
- Pessi, G., Kociubinski, G., Mamoun, C.B. (2004). A pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *Plasmodium falciparum* involving phosphoethanolamine methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 6206–6211.
- Peterson, M.G., Marshall, V.M., Smythe, J.A., Crewther, P.E., Lew, A., Silva, A., Anders, R.F., Kemp, D.J. (1989). Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3151–3154.
- Phillips, R.M., Six, D.A., Dennis, E.A., Ghosh, P. (2003). In Vivo Phospholipase Activity of the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU and Protection of Mammalian Cells with Phospholipase A₂ Inhibitors. *J. Biol. Chem.* **278**: 41326–41332.
- Pino, P., Sebastian, S., Kim, E.A., Bush, E., Brochet, M., Volkmann, K., Kozlowski, E., Llinás, M., Billker, O., Soldati-Favre, D. (2012). A Tetracycline-Repressible Transactivator System to Study Essential Genes in Malaria Parasites. *Cell Host Microbe* **12**: 824–834.
- Ponnudurai, T., Leeuwenberg, A.D., Meuwissen, J.H. (1981). Chloroquine sensitivity of isolates of *Plasmodium falciparum* adapted to in vitro culture. *Trop. Geogr. Med.* **33**: 50–54.
- Poran, A., Nötzel, C., Aly, O., Mencia-Trinchant, N., Harris, C.T., Guzman, M.L., Hassane, D.C., Elemento, O., Kafsack, B.F.C. (2017). Single-cell RNA sequencing reveals a signature of sexual commitment in malaria parasites. *Nature* **551**: 95–99.
- Poussin, M.A., Leitges, M., Goldfine, H. (2009). The ability of *Listeria monocytogenes* PI-PLC to facilitate escape from the macrophage phagosome is dependent on host PKCβ. *Microb. Pathog.* **46**: 1–5.
- Pradel, G. (2007). Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies. *Parasitology* **134**: 1911–1929.
- Pradel, G., Hayton, K., Aravind, L., Iyer, L.M., Abrahamsen, M.S., Bonawitz, A., Mejia, C., Templeton, T.J. (2004). A Multidomain Adhesion Protein Family Expressed in *Plasmodium falciparum* Is Essential for Transmission to the Mosquito. *J. Exp. Med.* **199**: 1533–1544.
- Prommana, P., Uthaipibull, C., Wongsombat, C., Kamchonwongpaisan, S., Yuthavong, Y., Knuepfer, E., Holder, A.A., Shaw, P.J. (2013). Inducible Knockdown of Plasmodium Gene Expression Using the glmS Ribozyme. *PLoS One* **8**: e73783.
- Przyborski, J.M., Lanzer, M., 2005. Protein transport and trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Parasitology* **130**, 373–88.

- Przyborski, J.M., Miller, S.K., Pfahler, J.M., Henrich, P.P., Rohrbach, P., Crabb, B.S., Lanzer, M. (2005). Trafficking of STEVOR to the Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *EMBO J.* **24**: 2306–2317.
- Przyborski, J.M., Nyboer, B., Lanzer, M. (2016). Ticket to ride: export of proteins to the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte. *Mol. Microbiol.* **101**: 1–11.
- Quach, N.D., Arnold, R.D., Cummings, B.S. (2014). Secretory phospholipase A₂ enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochem. Pharmacol.* **90**: 338–348.
- Raabe, A., Berry, L., Sollelis, L., Cerdan, R., Tawk, L., Vial, H.J., Billker, O., Wengelnik, K. (2011). Genetic and transcriptional analysis of phosphoinositide-specific phospholipase C in *Plasmodium*. *Exp. Parasitol.* **129**: 75–80.
- Raabe, A., Wengelnik, K., Billker, O., Vial, H.J. (2011). Multiple roles for *Plasmodium berghei* phosphoinositide-specific phospholipase C in regulating gametocyte activation and differentiation. *Cell. Microbiol.* **13**: 955–966.
- Rabin, S.D.P., Veessenmeyer, J.L., Bieging, K.T., Hauser, A.R. (2006). A C-terminal domain targets the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU to the plasma membrane of host cells. *Infect. Immun.* **74**: 2552–61.
- Ramakrishnan, S., Docampo, M.D., MacRae, J.I., Pujol, F.M., Brooks, C.F., van Dooren, G.G., Hiltunen, J.K., Kastaniotis, A.J., McConville, M.J., Striepen, B. (2012). Apicoplast and Endoplasmic Reticulum Cooperate in Fatty Acid Biosynthesis in Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **287**: 4957–4971.
- Ramakrishnan, S., Serricchio, M., Striepen, B., Bütikofer, P. (2013). Lipid synthesis in protozoan parasites: A comparison between kinetoplastids and apicomplexans. *Prog. Lipid Res.* **52**: 488–512.
- Ramanadham, S., Ali, T., Ashley, J.W., Bone, R.N., Hancock, W.D., Lei, X. (2015). Calcium-independent phospholipases A₂ and their roles in biological processes and diseases. *J. Lipid Res.* **56**: 1643–1668.
- Ravindran, S., Lodoen, M.B., Verhelst, S.H.L., Bogyo, M., Boothroyd, J.C. (2009). 4-Bromophenacyl Bromide Specifically Inhibits Rhoptry Secretion during *Toxoplasma* Invasion. *PLoS One* **4**: e8143.
- Rea, E., Le Roch, K.G., Tewari, R. (2018). Sex in *Plasmodium falciparum*: Silence Play between GVD1 and HP1. *Trends Parasitol.* **34**: 450–452.
- Regev-Rudzki, N., Wilson, D.W., Carvalho, T.G., Sisquella, X., Coleman, B.M., Rug, M., Bursac, D., Angrisano, F., Gee, M., Hill, A.F., Baum, J., Cowman, A.F. (2013). Cell-Cell Communication between Malaria-Infected Red Blood Cells via Exosome-like Vesicles. *Cell* **153**: 1120–1133.
- Rhee, S.G. (2001). Regulation of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 281–312.
- Riggs, P. (2001). Expression and Purification of Maltose-Binding Protein Fusions. In *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, pp. 16.6.1–16.6.14.
- Roberts, M.F. (1996). Phospholipases: structural and functional motifs for working at an interface. *FASEB J.* **10**: 1159–1172.

- Rontein, D., Nishida, I., Tashiro, G., Yoshioka, K., Wu, W.-I., Voelker, D.R., Basset, G., Hanson, A.D. (2001). Plants Synthesize Ethanolamine by Direct Decarboxylation of Serine Using a Pyridoxal Phosphate Enzyme. *J. Biol. Chem.* **276**: 35523–35529.
- Rowe, J.A., Claessens, A., Corrigan, R.A., Arman, M. (2009). Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev. Mol. Med.* **11**: e16.
- RTS,S Clinical Trials Partnership (2015). Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet* **386**: 31–45.
- Rug, M., Maier, A.G. (2013). Transfection of *Plasmodium falciparum*. *Methods Mol. Biol.* **923**: 75–98.
- Rupp, I., Bosse, R., Schirmeister, T., Pradel, G. (2008). Effect of protease inhibitors on exflagellation in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **158**: 208–212.
- Russo, I., Oksman, A., Vaupel, B., Goldberg, D.E., 2009. A calpain unique to alveolates is essential in *Plasmodium falciparum* and its knockdown reveals an involvement in pre-S-phase development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 1554–1559.
- Rydel, T.J., Williams, J.M., Krieger, E., Moshiri, F., Stallings, W.C., Brown, S.M., Pershing, J.C., Purcell, J.P., Alibhai, M.F. (2003). The Crystal Structure, Mutagenesis, and Activity Studies Reveal that Patatin Is a Lipid Acyl Hydrolase with a Ser-Asp Catalytic Dyad. *Biochemistry* **42**: 6696–6708.
- Saadatnia, G., Golkar, M. (2012). A review on human toxoplasmosis. *Scand. J. Infect. Dis.* **44**: 805–814.
- Saffer, L., Krug, S.L., Schwartzman, J. (1989). The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Am J Trop Med Hyg* **40**: 145-149.
- Saffer, L., Schwartzman, J. (1991). A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. *J Protozool* **38**: 454-460.
- Sahonero-Canavesi, D.X., Zavaleta-Pastor, M., Martínez-Aguilar, L., López-Lara, I.M., Geiger, O. (2016). Defining Substrate Specificities for Lipase and Phospholipase Candidates. *J. Vis. Exp.* **117**: e54613.
- Saliba, A.M., Nascimento, D.O., Silva, M.C.A., Assis, M.C., Gayer, C.R.M., Raymond, B., Coelho, M.G.P., Marques, E.A., Touqui, L., Albano, R.M., Lopes, U.G., Paiva, D.D., Bozza, P.T., Plotkowski, M.C. (2005). Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Cell. Microbiol.* **7**: 1811–1822.
- Salinas, N.D., Tang, W.K., Tolia, N.H. (2019). Blood-Stage Malaria Parasite Antigens: Structure, Function, and Vaccine Potential. *J. Mol. Biol.* **431**: 4259-4280.
- Sato, H., Feix, J.B., Hillard, C.J., Frank, D.W. (2005). Characterization of phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III cytotoxin, ExoU. *J. Bacteriol.* **187**: 1192–1195.
- Sato, H., Frank, D.W. (2004). ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol. Microbiol.* **53**: 1279–90.
- Sato, H., Frank, D.W., Hillard, C.J., Feix, J.B., Pankhaniya, R.R., Moriyama, K., Finck-Barbançon, V., Buchaklian, A., Lei, M., Long, R.M., Wiener-Kronish, J., Sawa, T. (2003). The

- mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J.* **22**: 2959–2969.
- Schaloske, R.H., Dennis, E.A. (2006). The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**: 1246–1259.
- Schmiel, D.H., Miller, V.L. (1999). Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect.* **1**: 1103–1112.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**: 671–675.
- Schneweis, S., Maier, W.A., Seitz, H.M. (1991). Haemolysis of infected erythrocytes: a trigger for formation of *Plasmodium falciparum* gametocytes? *Parasitol. Res.* **77**: 458–460.
- Schrag, J.D., Cygler, M. (1997). Lipases and α/β hydrolase fold. *Methods Enzymol.* **284**: 85–107.
- Schunder, E., Adam, P., Higa, F., Remer, K.A., Lorenz, U., Bender, J., Schulz, T., Flieger, A., Steinert, M., Heuner, K. (2010). Phospholipase PlaB is a new virulence factor of *Legionella pneumophila*. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**: 313–323.
- Scott, K.F., Sajinovic, M., Hein, J., Nixdorf, S., Galettis, P., Liauw, W., de Souza, P., Dong, Q., Graham, G.G., Russell, P.J. (2010). Emerging roles for phospholipase A₂ enzymes in cancer. *Biochimie* **92**: 601–610.
- Senda, K., Yoshioka, H., Doke, N., Kawakita, K., 1996. A Cytosolic Phospholipase A₂ from Potato Tissues Appears to Be Patatin. *Plant Cell Physiol.* **37**: 347–353.
- Shaver, C.M., Hauser, A.R. (2004). Relative Contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to Virulence in the Lung. *Infect. Immun.* **72**: 6969–6977.
- Sherling, E.S., van Ooij, C. (2016). Host cell remodeling by pathogens: the exomembrane system in *Plasmodium*-infected erythrocytes. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**: 701–721.
- Shewry, P.R. (2003). Tuber storage proteins. *Ann. Bot.* **91**: 755–769.
- Shin, Y.S., Jeong, J., Nguyen, T.H.T., Kim, J.Y.H., Jin, E., Sim, S.J. (2019). Targeted knockout of phospholipase A₂ to increase lipid productivity in *Chlamydomonas reinhardtii* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **271**: 368–374.
- Shohdy, N., Efe, J.A., Emr, S.D., Shuman, H.A. (2005). Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 4866–4871.
- Sidhu, A.B.S., Valderramos, S.G., Fidock, D.A. (2005). *pfmdr1* mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **57**: 913–926.
- Silvestrini, F., Alano, P., Williams, J.L. (2000). Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* **121**: 465–471.
- Silvestrini, F., Lasonder, E., Olivieri, A., Camarda, G., van Schaijk, B., Sanchez, M., Younis Younis, S., Sauerwein, R., Alano, P. (2010). Protein Export Marks the Early Phase of Gametocytogenesis of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell. Proteomics* **9**: 1437–1448.

- Simon, N., Scholz, S.M., Moreira, C.K., Templeton, T.J., Kuehn, A., Dude, M.-A., Pradel, G. (2009). Sexual stage adhesion proteins form multi-protein complexes in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **284**: 14537–14546.
- Sinden, R.E., Talman, A., Marques, S.R., Wass, M.N., Sternberg, M.J. (2010). The flagellum in malarial parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 491–500.
- Singer, A.G., Ghomashchi, F., Le Calvez, C., Bollinger, J., Bezzine, S., Rouault, M., Sadilek, M., Nguyen, E., Lazdunski, M., Lambeau, G., Gelb, M.H. (2002). Interfacial Kinetic and Binding Properties of the Complete Set of Human and Mouse Groups I, II, V, X, and XII Secreted Phospholipases A₂. *J. Biol. Chem.* **277**: 48535–48549.
- Singh, P., Alaganan, A., More, K.R., Lorthiois, A., Thiberge, S., Gorgette, O., Guillotte Blisnick, M., Guglielmini, J., Aguilera, S.S., Touqui, L., Singh, S., Chitnis, C.E. (2019). Role of a patatin-like phospholipase in *Plasmodium falciparum* gametogenesis and malaria transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**: 17498–17508.
- Singh, S., Alam, M.M., Pal-Bhowmick, I., Brzostowski, J.A., Chitnis, C.E. (2010). Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. *PLoS Pathog.* **6**: e1000746.
- Sinha, A., Hughes, K.R., Modrzynska, K.K., Otto, T.D., Pfander, C., Dickens, N.J., Religa, A.A., Bushell, E., Graham, A.L., Cameron, R., Kafack, B.F.C., Williams, A.E., Llinás, M., Berriman, M., Billker, O., Waters, A.P. (2014). A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in *Plasmodium*. *Nature* **507**: 253–257.
- Sitkiewicz, I., Stockbauer, K.E., Musser, J.M. (2007). Secreted bacterial phospholipase A₂ enzymes: better living through phospholipolysis. *Trends Microbiol.* **15**: 63–69.
- Smith, G.A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N.C., Portnoy, D.A., Goldfine, H. (1995.) The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* **63**: 4231–4237.
- Smith, T.G., Lourenço, P., Carter, R., Walliker, D., Ranford-Cartwright, L.C. (2000.) Commitment to sexual differentiation in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* **121**: 127–33.
- 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**: 897–912.
- Solyakov, L., Halbert, J., Alam, M.M., Semblat, J.-P., Dorin-Semblat, D., Reininger, L., Bottrill, A.R., Mistry, S., Abdi, A., Fennell, C., Holland, Z., Demarta, C., Bouza, Y., Sicard, A., Nivez, M.-P., Eschenlauer, S., Lama, T., Thomas, D.C., Sharma, P., Agarwal, S., Kern, S., Pradel, G., Graciotti, M., Tobin, A.B., Doerig, C. (2011). Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.* **2**: 565.
- Soupene, E., Fyrst, H., Kuypers, F.A. (2008). Mammalian acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 88–93.
- Soupene, E., Kuypers, F.A. (2015). Ligand binding to the ACBD6 protein regulates the acyl-CoA transferase reactions in membranes. *J. Lipid Res.* **56**: 1961–1971.
- Spillman, N.J., Dalmia, V.K., Goldberg, D.E. (2016). Exported Epoxide Hydrolases Modulate Erythrocyte Vasoactive Lipids during *Plasmodium falciparum* Infection. *MBio* **7**: e01538-16.

- Spork, S., Hiss, J.A., Mandel, K., Sommer, M., Kooij, T.W.A., Chu, T., Schneider, G., Maier, U.G., Przyborski, J.M. (2009). An Unusual ERAD-Like Complex Is Targeted to the Apicoplast of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot. Cell* **8**: 1134–1145.
- Stirling, F.R., Cuzick, A., Kelly, S.M., Oxley, D., Evans, T.J. (2006). Eukaryotic localization, activation and ubiquitinylation of a bacterial type III secreted toxin. *Cell. Microbiol.* **8**: 1294–1309.
- Sved, P., Scott, K.F., McLeod, D., King, N.J.C., Singh, J., Tsatralis, T., Nikolov, B., Boulas, J., Nallan, L., Gelb, M.H., Sajinovic, M., Graham, G.G., Russell, P.J., Dong, Q., 2004. Oncogenic Action of Secreted Phospholipase A₂ in Prostate Cancer. *Cancer Res.* **64**: 6934–6940.
- Talman, A.M., Domarle, O., McKenzie, F., Arie, F., Robert, V. (2004). Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* **3**: 24.
- Talman, A.M., Paul, R.E.L., Sokhna, C.S., Domarle, O., Arie, F., Trape, J.-F., Robert, V. (2004). Influence of chemotherapy on the *Plasmodium* gametocyte sex ratio of mice and humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **71**: 739–744.
- Tamura, M., Ajayi, T., Allmond, L.R., Moriyama, K., Wiener-Kronish, J.P., Sawa, T. (2004). Lysophospholipase A activity of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**: 323–331.
- Templeton, T.J. (2009). The varieties of gene amplification, diversification and hypervariability in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **166**: 109–116.
- Templeton, T.J., Fujioka, H., Aikawa, M., Parker, K.C., Kaslow, D.C. (1997). *Plasmodium falciparum* Pfs40, renamed Pf39, is localized to an intracellular membrane-bound compartment and is not sexual stage-specific. *Mol. Biochem. Parasitol.* **90**: 359–365.
- Templeton, T.J., Keister, D.B., Muratova, O., Procter, J.L., Kaslow, D.C. (1998). Adherence of erythrocytes during exflagellation of *Plasmodium falciparum* microgametes is dependent on erythrocyte surface sialic acid and glycophorins. *J. Exp. Med.* **187**: 1599–1609.
- Thardin, J., M'Rini, C., Beraud, M., Vandaele, J., Frisach, M. (1993). Eicosanoid production by mouse peritoneal macrophages during *Toxoplasma gondii* penetration: role of parasite and host cell phospholipases. *Infect. Immun.* **61**: 1432–1441.
- Tian, J., Tang, B., Shi, C., Lv, Z., Li, K., Yu, R., Shen, L., Yan, X., Guo, J. (2012). Analysis of PLA₂G6 gene mutation in sporadic early-onset parkinsonism patients from Chinese population. *Neurosci. Lett.* **514**: 156–158.
- Tiburcio, M., Niang, M., Deplaine, G., Perrot, S., Bischoff, E., Ndour, P.A., Silvestrini, F., Khattab, A., Milon, G., David, P.H., Hardeman, M., Vernick, K.D., Sauerwein, R.W., Preiser, P.R., Mercereau-Puijalon, O., Buffet, P., Alano, P., Lavazec, C. (2012). A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Blood* **119**: e172–e180.
- Tischer, M., Pradel, G., Ohlsen, K., Holzgrabe, U. (2012). Quaternary Ammonium Salts and Their Antimicrobial Potential: Targets or Nonspecific Interactions? *Chem Med Chem* **7**: 22–31.
- Tobin, C.M., Knoll, L.J. (2012). A patatin-like protein protects *Toxoplasma gondii* from degradation in a nitric oxide-dependent manner. *Infect. Immun.* **80**: 55–61.
- Tobin Magle, C., Pittman, K.J., Moser, L.A., Boldon, K.M., Knoll, L.J. (2014). A toxoplasma

- patatin-like protein changes localization and alters the cytokine response during toxoplasmic encephalitis. *Infect. Immun.* **82**: 618–625.
- Tokumasu, F., Crivat, G., Ackerman, H., Hwang, J., Wellems, T.E. (2014). Inward cholesterol gradient of the membrane system in *P. falciparum*-infected erythrocytes involves a dilution effect from parasite-produced lipids. *Biol. Open* **3**: 529–541.
- Trager, W., Gill, G.S. (1992). Enhanced gametocyte formation in young erythrocytes by *Plasmodium falciparum* in vitro. *J. Protozool.* **39**: 429–432.
- Tran, P.N., Brown, S.H.J., Rug, M., Ridgway, M.C., Mitchell, T.W., Maier, A.G. (2016). Changes in lipid composition during sexual development of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* **15**: 73.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G. (2012). Primer3: new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **40**: e115.
- Usui, M., Prajapati, S.K., Ayanful-Torgby, R., Acquah, F.K., Cudjoe, E., Kakaney, C., Amponsah, J.A., Obboh, E.K., Reddy, D.K., Barbeau, M.C., Simons, L.M., Czesny, B., Raiciulescu, S., Olsen, C., Abuaku, B.K., Amoah, L.E., Williamson, K.C. (2019). Publisher Correction: *Plasmodium falciparum* sexual differentiation in malaria patients is associated with host factors and GDV1-dependent genes. *Nat. Commun.* **10**: 2740.
- Vaid, A., Sharma, P. (2006). PfPKB, a protein kinase B-like enzyme from *Plasmodium falciparum*: II. Identification of calcium/calmodulin as its upstream activator and dissection of a novel signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **281**: 27126–27133.
- Vaid, A., Thomas, D.C., Sharma, P. (2008). Role of Ca²⁺/calmodulin-PfPKB signaling pathway in erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **283**: 5589–5597.
- van der Meer-Janssen, Y.P.M., van Galen, J., Batenburg, J.J., Helms, J.B. (2010). Lipids in host–pathogen interactions: Pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Prog. Lipid Res.* **49**: 1–26.
- van der Pluijm, R.W., Imwong, M., Chau, N.H., Hoa, N.T., Thuy-Nhien, N.T., Thanh, N.V., Jittamala, P., Hanboonkunupakarn, B., Chutasmit, K., Saelow, C., Runjarern, R., Kaewmok, W., Tripura, R., Peto, T.J., Yok, S., Suon, S., Sreng, S., Mao, S., Oun, S., Yen, S., Amaratunga, C., Lek, D., Huy, R., Dhorda, M., Chotivanich, K., Ashley, E.A., Mukaka, M., Waithira, N., Cheah, P.Y., Maude, R.J., Amato, R., Pearson, R.D., Gonçalves, S., Jacob, C.G., Hamilton, W.L., Fairhurst, R.M., Tarning, J., Winterberg, M., Kwiatkowski, D.P., Pukrittayakamee, S., Hien, T.T., Day, N.P., Miotto, O., White, N.J., Dondorp, A.M. (2019). Determinants of dihydroartemisinin-piperaquine treatment failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study. *Lancet. Infect. Dis.* **19**: 952–961.
- van der Veen, J.N., Kennelly, J.P., Wan, S., Vance, J.E., Vance, D.E., Jacobs, R.L. (2017). The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1859**: 1558–1572.
- van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 112–124.
- van Schaijk, B.C.L., Kumar, T.R.S., Vos, M.W., Richman, A., van Gemert, G.-J., Li, T., Eappen, A.G., Williamson, K.C., Morahan, B.J., Fishbaugher, M., Kennedy, M., Camargo, N., Khan,

- S.M., Janse, C.J., Sim, K.L., Hoffman, S.L., Kappe, S.H.I., Sauerwein, R.W., Fidock, D.A., Vaughan, A.M. (2014). Type II Fatty Acid Biosynthesis Is Essential for *Plasmodium falciparum* Sporozoite Development in the Midgut of *Anopheles* Mosquitoes. *Eukaryot. Cell* **13**: 550–559.
- Vance, J.E. (2008). Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *J. Lipid Res.* **49**: 1377–1387.
- Vance, J.E., Tasseva, G. (2013). Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**: 543–554.
- Vanderberg, J.P., Frevert, U. (2004). Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. *Int. J. Parasitol.* **34**: 991–996.
- VanRheenen, S.M., Luo, Z.-Q., O'Connor, T., Isberg, R.R. (2006). Members of a *Legionella pneumophila* Family of Proteins with ExoU (Phospholipase A) Active Sites Are Translocated to Target Cells. *Infect. Immun.* **74**: 3597–3606.
- Vaughan, A.M., Kappe, S.H.I. (2012). Malaria vaccine development: Persistent challenges. *Curr. Opin. Immunol.* **24**: 324–331.
- Vaughan, A.M., O'Neill, M.T., Tarun, A.S., Camargo, N., Phuong, T.M., Aly, A.S.I., Cowman, A.F., Kappe, S.H.I. (2009). Type II fatty acid synthesis is essential only for malaria parasite late liver stage development. *Cell. Microbiol.* **11**: 506–520.
- Vial, H.J., Ancelin, M.L. (1992). Malarial lipids. An overview. *Subcell. Biochem.* **18**: 259–306.
- Vial, H.J., Ben Mamoun, C. (2005). *Plasmodium* Lipids: Metabolism and Function. In *Molecular Approaches to Malaria*. Sherman I. (eds). ASM Press, Washington, USA, pp. 327–352.
- Vial, H.J., Eldin, P., Tielens, A.G.M., Van Hellemond, J.J. (2003). Phospholipids in parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* **126**: 143–154.
- Vial, H.J., Philippot, J.R., Wallach, D.F.H. (1984). A reevaluation of the status of cholesterol in erythrocytes infected by *Plasmodium knowlesi* and *P. falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **13**: 53–65.
- Vielemeyer, O., McIntosh, M.T., Joiner, K.A., Coppens, I. (2004). Neutral lipid synthesis and storage in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **135**: 197–209.
- Wang, D., Dubois, R.N. (2006). Prostaglandins and cancer. *Gut* **55**: 115–22.
- Wang, Y., Geer, L.Y., Chappey, C., Kans, J.A., Bryant, S.H. (2000). Cn3D: sequence and structure views for Entrez. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 300–302.
- Watson, P.Y., Fedor, M.J. (2011). The glmS riboswitch integrates signals from activating and inhibitory metabolites in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**: 359–363.
- Wein, S., Ghezal, S., Buré, C., Maynadier, M., Périgaud, C., Vial, H.J., Lefebvre-Tournier, I., Wengelnik, K., Cerdan, R. (2018). Contribution of the precursors and interplay of the pathways in the phospholipid metabolism of the malaria parasite. *J. Lipid Res.* **59**: 1461–1471.
- Weißbach, T., Golzmann, A., Bennink, S., Pradel, G., Ngwa, C.J. (2017). Transcript and protein expression analysis of proteases in the blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Exp. Parasitol.* **180**: 33–44.

- White, N.J., Pukrittayakamee, S., Hien, T.T., Faiz, M.A., Mokuolu, O.A., Dondorp, A.M. (2014). Malaria. *Lancet* **383**: 723–735.
- Williams, J.L. (1999). Stimulation of *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis by conditioned medium from parasite cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 7–13.
- Williamson, K.C. (2003). Pfs230: from malaria transmission-blocking vaccine candidate toward function. *Parasite Immunol.* **25**: 351–359.
- Wilson, K.L., Flanagan, K.L., Prakash, M.D., Plebanski, M. (2019). Malaria vaccines in the eradication era: current status and future perspectives. *Expert Rev. Vaccines* **18**: 133–151.
- Wilson, S.K., Knoll, L.J. (2018). Patatin-like phospholipases in microbial infections with emerging roles in fatty acid metabolism and immune regulation by *Apicomplexa*. *Mol. Microbiol.* **107**: 34–46.
- Winkler, W.C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J.A., Breaker, R.R. (2004). Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* **428**: 281–286.
- Winstead, M. V, Balsinde, J., Dennis, E.A. (2000). Calcium-independent phospholipase A₂: structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1488**: 28–39.
- Wirth, C.C., Bennink, S., Scheuermayer, M., Fischer, R., Pradel, G. (2015). Perforin-like protein PPLP4 is crucial for mosquito midgut infection by *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **201**: 90–99.
- Wirth, C.C., Glushakova, S., Scheuermayer, M., Repnik, U., Garg, S., Schaack, D., Kachman, M.M., Weißbach, T., Zimmerberg, J., Dandekar, T., Griffiths, G., Chitnis, C.E., Singh, S., Fischer, R., Pradel, G. (2014). Perforin-like protein PPLP2 permeabilizes the red blood cell membrane during egress of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Cell. Microbiol.* **16**: 709–733.
- Wirth, C.C., Pradel, G. (2012). Molecular mechanisms of host cell egress by malaria parasites. *Int. J. Med. Microbiol.* **302**: 172–178.
- Witola, W.H., El Bissati, K., Pessi, G., Xie, C., Roepe, P.D., Mamoun, C. Ben (2008). Disruption of the *Plasmodium falciparum* PfPMT Gene Results in a Complete Loss of Phosphatidylcholine Biosynthesis via the Serine-Decarboxylase-Phosphoethanolamine-Methyltransferase Pathway and Severe Growth and Survival Defects. *J. Biol. Chem.* **283**: 27636–27643.
- Wolf, M.J., Gross, R.W. (1996). Expression, Purification, and Kinetic Characterization of a Recombinant 80-kDa Intracellular Calcium-independent Phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **271**: 30879–30885.
- Wong, C.C., Qian, Y., Yu, J. (2017). Interplay between epigenetics and metabolism in oncogenesis: mechanisms and therapeutic approaches. *Oncogene* **36**: 3359–3374.
- World Health Organisation (2019). World Malaria Report 2019.
- Wu, Y., Kirkman, L.A., Wellems, T.E. (1996). Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 1130–1134.
- Yamashita, S.-I., Yamashita, J.-I., Sakamoto, K., Inada, K., Nakashima, Y., Murata, K., Saishoji, T., Nomura, K., Ogawa, M. (1993). Increased expression of membrane-associated

- phospholipase A₂ shows malignant potential of human breast cancer cells. *Cancer* **71**: 3058–3064.
- Yamashita, S., Yamashita, J., Ogawa, M. (1994). Overexpression of group II phospholipase A₂ in human breast cancer tissues is closely associated with their malignant potency. *Br. J. Cancer* **69**: 1166–70.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **12**: 7–8.
- Yu, M., Kumar, T.R.S., Nkrumah, L.J., Coppi, A., Retzlaff, S., Li, C.D., Kelly, B.J., Moura, P.A., Lakshmanan, V., Freundlich, J.S., Valderramos, J.-C., Vilcheze, C., Siedner, M., Tsai, J.H.-C., Falkard, B., Sidhu, A. bir S., Purcell, L.A., Gratraud, P., Kremer, L., Waters, A.P., Schiehser, G., Jacobus, D.P., Janse, C.J., Ager, A., Jacobs, W.R., Sacchettini, J.C., Heussler, V., Sinnis, P., Fidock, D.A. (2008). The Fatty Acid Biosynthesis Enzyme FabI Plays a Key Role in the Development of Liver-Stage Malarial Parasites. *Cell Host Microbe* **4**: 567–578.
- Zhang, C., Li, Z., Cui, H., Jiang, Y., Yang, Z., Wang, X., Gao, H., Liu, C., Zhang, S., Su, X.-Z., Yuan, J. (2017). Systematic CRISPR-Cas9-Mediated Modifications of *Plasmodium yoelii* ApiAP2 Genes Reveal Functional Insights into Parasite Development. *MBio* **8**: e01986-17
- Zhang, C., Yu, H., Xu, H., Yang, L. (2015). Expression of secreted phospholipase A₂-Group IIA correlates with prognosis of gastric adenocarcinoma. *Oncol. Lett.* **10**: 3050–3058.
- Zhang, M., Wang, C., Otto, T.D., Oberstaller, J., Liao, X., Adapa, S.R., Udenze, K., Bronner, I.F., Casandra, D., Mayho, M., Brown, J., Li, S., Swanson, J., Rayner, J.C., Jiang, R.H.Y., Adams, J.H. (2018). Uncovering the essential genes of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by saturation mutagenesis. *Science* **360**: eaap7847.
- Zhang, N. (2018). Role of methionine on epigenetic modification of DNA methylation and gene expression in animals. *Anim. Nutr.* **4**: 11–16.
- Zhu, W., Banga, S., Tan, Y., Zheng, C., Stephenson, R., Gately, J., Luo, Z.-Q. (2011). Comprehensive Identification of Protein Substrates of the Dot/Icm Type IV Transporter of *Legionella pneumophila*. *PLoS One* **6**: e17638.
- Zhu, W., Hammad, L.A., Hsu, F., Mao, Y., Luo, Z.-Q. (2013). Induction of caspase 3 activation by multiple *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates. *Cell. Microbiol.* **15**: 1783–1795.
- Zidovetzki, R., Sherman, I.W., O'Brien, L. (1993). Inhibition of *Plasmodium falciparum* Phospholipase A₂ by Chloroquine, Quinine, and Arteether. *J. Parasitol.* **79**: 565.
- Zuegge, J., Ralph, S., Schmuker, M., McFadden, G.I., Schneider, G. (2001). Deciphering apicoplast targeting signals-feature extraction from nuclear-encoded precursors of *Plasmodium falciparum* apicoplast proteins. *Gene* **280**: 19–26.

VIII. Anhang

ATGAGCGACGATGATGACAAGATCTATATCTATAGCGACCTGTTTCAGCAAAAACCTTTAGC
GACGACGAAAAAGATGATAGCTATGAACGTGAGAAACAGGTTTATAGCGGTAGCGAAAC
CCAGAATGCAGAAAACGAATATAGCAAACCTGCGTGACAGAAATAGCACCATCTGAACAA
CTATTTTCGACAACGACAACATCAAGAACGTGCAAAATCTGAAAAGCAATGATCCGGACCA
GATTGATCTGATTCTGTTTCCGGTGAACAAGAACTATTACATGAACCTGTTTGATGGCCA
GCTGATCGAAAACATTCATAGCATTAACTGCGCAAGCCGTTTCTATGCCATTTATGTG
GAAAATAACAACAACAGCAAATGGGACGGTATCTATTTTGGTCTGAGCCGTATGCAGGTT
GAGCTGGATTATAAACTGATCACCAAAAAGAACAAGACGGTGGCGAATATGAAAAACGT
AATACCAGCAGCTATGATAACACCGAAAGCGTTGAGAATACCGTTGGTAGTGAAAAAGAA
GAAACCGAGAACAAAAATGAGGAAACCAGCAACTATAACAGCAACCTGAACAACGAGAT
CAACAAGATCTGCAAATATAACCTGGATCAGACCGATATTCTGCTGGATGATAGCAATAGC
GAACGTCGTCGTAATAGCAAATCAAGATCAAGAACACCAACTATTATGATAACCTGATGC
TGCAGAACAAAGTACACCAATAGCATTCTGTATGATGACGACGACGATAAGAATAACACAG
AAACCTATACCTGCACCTTCAAAACCGAAGATCAGATTCGTGTTCCGAGCCAGAAAAAAA
AGTATATCTACCTGTACAACAAATATGATAACGCGACCCTGGATCTGAATGTGCATACCTAT
ATGAGCCTGGGTATGTCCATTCTGTGTAAATATTCTCTGCTGTACTGCGGCAAATACAATC
ATATTCGCGTGATCCGTATACGCCGTTCAAAAAACCGGTGAGCATTCTGAGCCTGGATG
GTGGTGGTATCCTGACCATTAGCACCTGCTGGTTCTGAATCGTCTGGAAGCAGAACTG
CGTAAAGAAATTGGTAGCGACGATATCAAACCTGATCGATTGCTTTGATATGGTTTGTGGCA
CCAGTGCCGGTGGTCTGATTAGCCTGGCACTGCTGCGTGAAATTGATCTGCAGGATGTG
AGCAATATGTGGCCGAGCACCATCAAAAAAGTGTTTGAAGGTAATCGCAACATCATCAGC
GGCATCTTTTTTGAAGGCTATGATGTGAACAACGTGAAAGATGTTTTTCTGGAACGCATG
GGCAACAAATTTATGAGCAGCTACAAAAAATTCTATTGCTTTGTTACCGCCACCGACGTTA
AACACAAACCGTATAAACTGTTCCCTGATCCGCAATTACACCCACAAATACAACAGTATTAA
CGCCGAAAGCTATGACGGCATTAAACAAAGTTCCGCTGTGGCTGGCAGCATGGGCCACC
GCAAGCGCACCGACCTATCTGAAAGGTCCGAGCGCAGAAGATATCAAAAAACTGGGCAT
TAATATCAAACCCGAAATCCATCTGGTGGATGGTGCACCTGAAAGCAAGCAATCCGGCACT
GATTGCACTGGAAGAATGTGCACGTCTGAATAACAAAAATCTGAGCACCTTCATCAAAGA
GGATCTGGATACCCTGGTTAGCATTGGCACCGGTCAGGTTCCGACCAAACCTGACCCAGA
GCGGTGCAAGCAGCAAAAGCGCAAGCACCTTTGAAATTCTGATTAATAGCACCCATCTG
CTGACCCGTGCAAATGATACCCATCGTGAAGTGCTGCAGCGTCTGGCAGATCGTGAAAA
TACCTATTTTCGTTTTAACGTGCCGCATATCGGCGATATTGAAATCGATAGCCAGGATGTT
CGTGATTTTGACCTGATTAGCAAAGCAACCCAGGATTACCTGTTTCGATGAGAAATTCTAT
GAAATTAAACGCCTGGCACATAAGCTGGCCAATAACTATATTCGCAGCAAATACCTGTAA

Abbildung 53 *pnplA1*-Gensequenz Codon-optimiert für die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* Zellen.

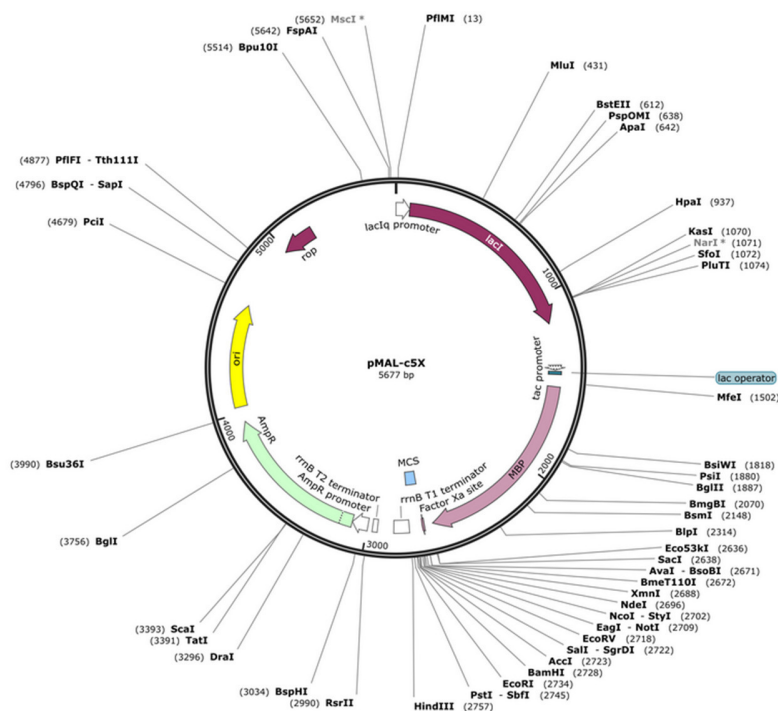


Abbildung 54 Schematische Darstellung der Vektorkarte des pMAL-c5x Expressionsvektors für die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* Zellen.

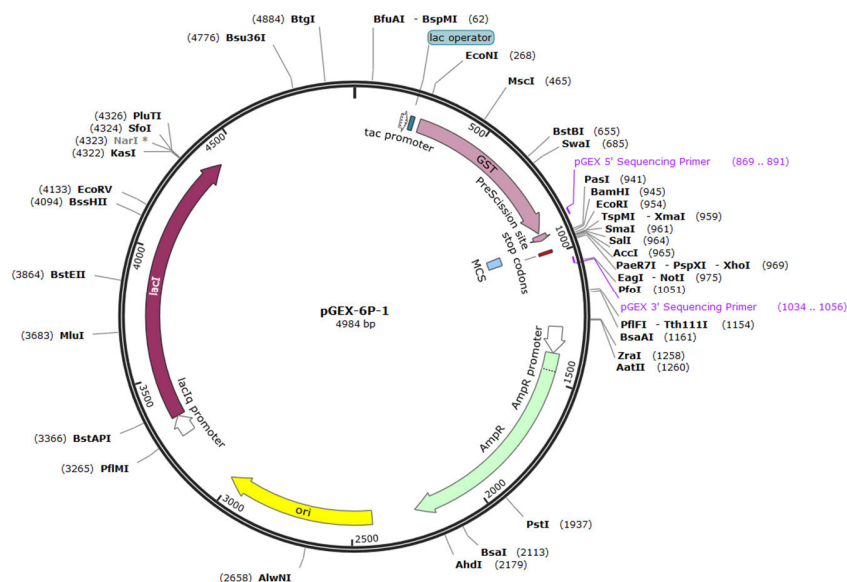


Abbildung 55 Schematische Darstellung der Vektorkarte des pGEX-6P-1 Expressionsvektors für die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* Zellen.

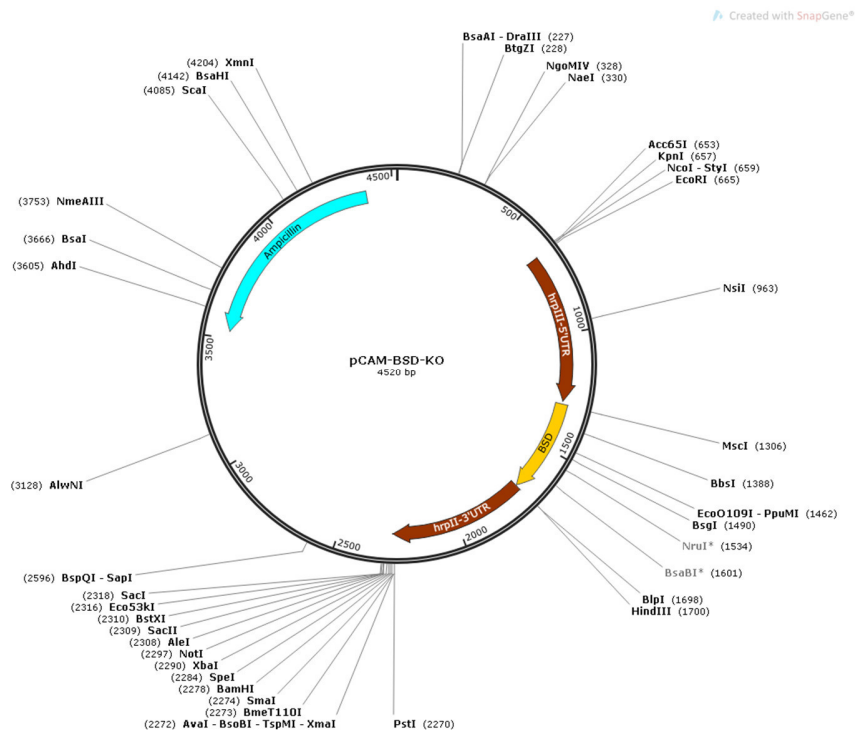


Abbildung 56 Schematische Darstellung der Vektorkarte des pCAM-BSD-KO Vektors zur Generierung von *P. falciparum* Knock-out-Mutanten.

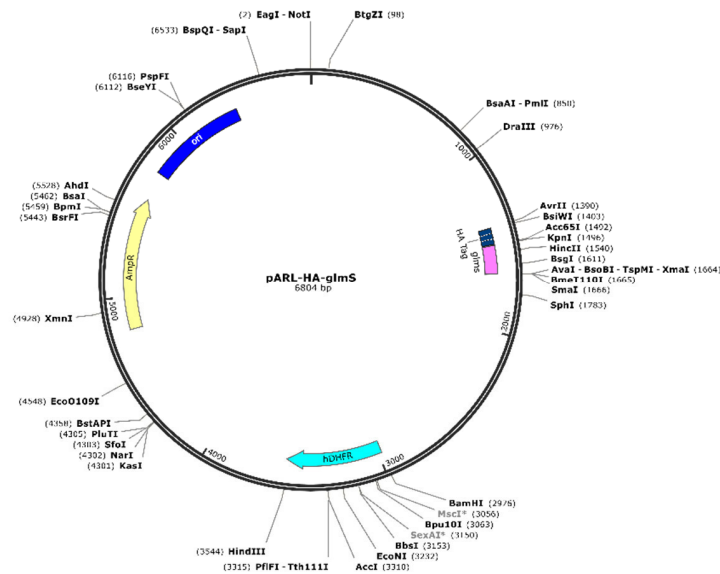


Abbildung 57 Schematische Darstellung der Vektorkarte des pARL-HA-glmS Vektors zur Generierung von *P. falciparum* Knock-down-Mutanten.

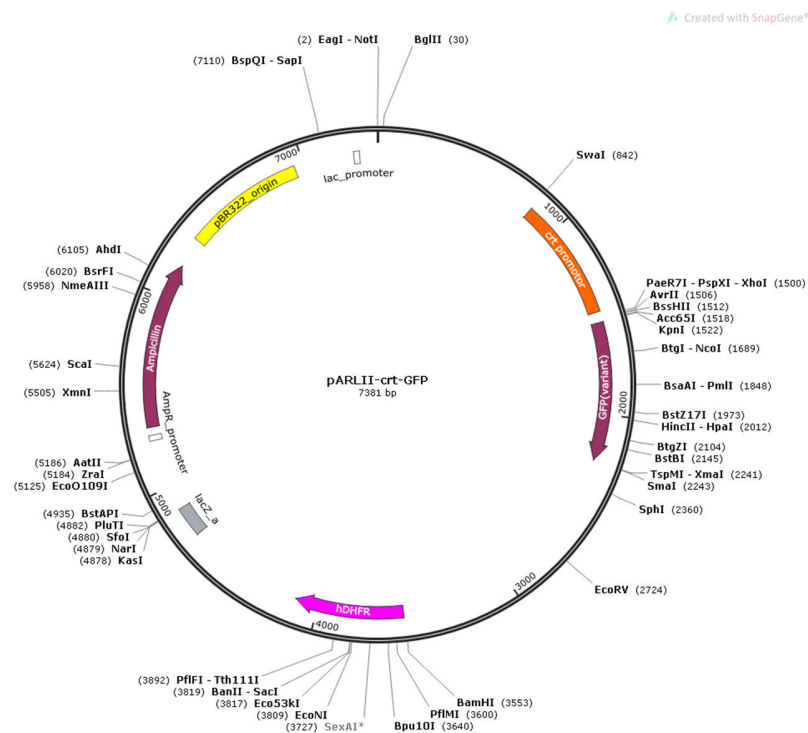


Abbildung 58 Schematische Darstellung der Vektorkarte des pARLII-*crt*-GFP Vektors zur episomalen Protein-Überexpression in *P. falciparum*. Die Expression des Zielgens befindet sich unter der Kontrolle des *crt*-Promotors.

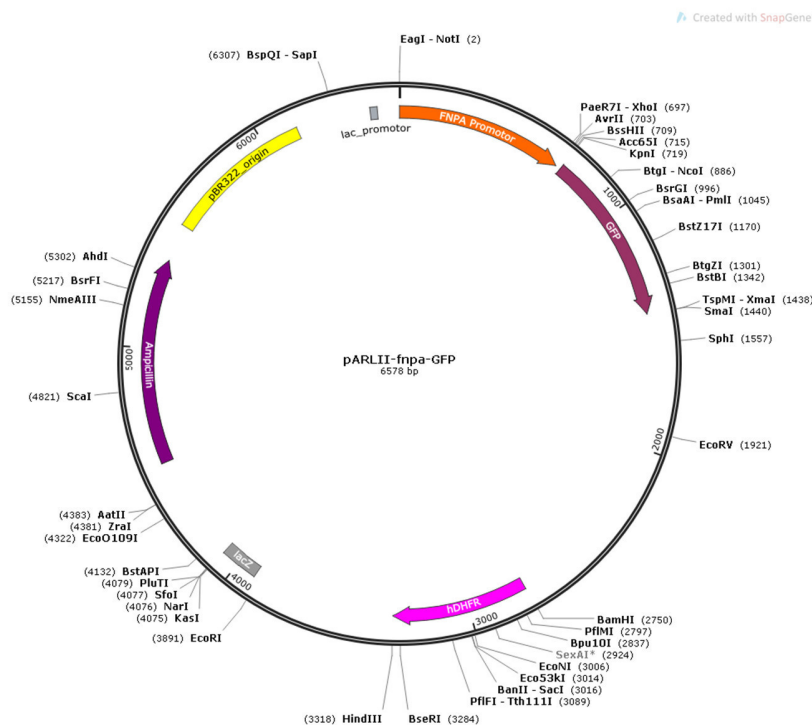


Abbildung 59 Schematische Darstellung der Vektorkarte des pARLII-*fnpp*-GFP Vektors zur episomalen Protein-Überexpression in *P. falciparum* Gametozytenstadien. Die Expression des Zielgens befindet sich unter der Kontrolle des *fnpp*-Promotors.

Tabelle 23 Putative lipolytische Enzyme in *P. falciparum* 3D7 sowie deren orthologe Proteine in *P. berghei* (PBANKA), *P. vivax* Stamm P01 (PVP01) und *P. knowlesi* Stamm h (PKNH). FPKM, Angabe zum Transkriptionslevel, engl. *fragments per kilobase of exon model per million mapped reads*; AS, Aminosäuren; GZII/V, Gametozyten Stadium II/V; ID, Identifikationsnummer; Ident., Identität; LCAT, Lecithin:Cholesterol Acyltransferase; LPLA, Lysophospholipase A; MW, Molekulargewicht; PLA, Phospholipase A; OK, Ookineten Stadium; PI-PLC, Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C; SMPD, Sphingomyelin Phosphodiesterase; R, Ringstadium; SP, Sporozoitenstadium; SZ, Schizontenstadium; TR, Trophozoitenstadium. Die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Gabriele Pradel; Eigenanteil: 50% (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2018).

¹www.plasmodb.org/plasmo/ (Aurrecochea *et al.*, 2009)

²Tabelle „Transkriptom 7 sexueller und asexueller Parasitenstadien in *P. falciparum* 3D7; www.plasmodb.org/plasmo/ (López-Barragán *et al.*, 2011; Lasonder *et al.*, 2016)

³www.plasmogem.sanger.ac.uk/phenotypes (Gomes *et al.*, 2015; Bushell *et al.*, 2017)

Gen-ID ¹	Protein	EC-Nr.	Länge [AS]	MW [kDA]	Transkript. Maximum ²	FPKM Wert	Gen-ID ¹ PBANKA	Ident. [%]	PlasmoGEM KO-Phänotyp/ rel. Wachstumsrate ³	Gen-ID ¹ PVP01	Ident. [%]	Gen-ID ¹ PKNH	Ident. [%]	Referenz
PF3D7_0102400	LPLA	3.1.1.5	383	44,4	GZV	88,52	1220300	41,7	Øessenziell/ 1,09	1034300	44,56	1324900	41,78	Aurrecochea <i>et al.</i> , 2009
PF3D7_0209100	PNPLA ₂	3.1.1.4	679	78,3	TR	70,53	0306200	59,97	ØPhänotyp/ -	0415700	62,21	0412000	62,91	-
PF3D7_0218600	PNPLA ₂	3.1.1.4	2380	283,6	TR	150,22	0315300	31,4	ØPhänotyp/ -	0406400	27,5	0402300	29,23	LaCount <i>et al.</i> , 2005
PF3D7_0629300	LCAT	2.3.1.43	863	99,2	SP	1692,09	1128100	31,4	Øessenziell/ 0,97	1120200	37,54	1120200	37,89	Bhanot <i>et al.</i> , 2005; Burda <i>et al.</i> , 2015
PF3D7_0702200	LPLA	3.1.1.5	424	49,2	R	58,26	1220300	38,85	Øessenziell/ 1,09	1034300	44,92	0108400	45,31	Templeton, 2009
PF3D7_0709700	LPLA	3.1.1.5	368	42,4	GZV	1278,86	1220300	55,73	Øessenziell/ 1,09	0110100	56,62	0108400	56,02	Istvan <i>et al.</i> , 2017
PF3D7_0731800	LPLA	3.1.1.5	675	78,4	GZV/OK	39,27/ 44,30	Ø	-	-	1225900	25,48	1271900	27,05	Silvestrini <i>et al.</i> , 2010; Zuegge <i>et al.</i> , 2001
PF3D7_0814400	PLA1	3.1.1.32	679	80,8	SP	123,71	1423100	63,58	Significant niedriger/ 0,92	1425900	64,26	1425800	63,58	-
PF3D7_0924000	PNPLA ₂	3.1.1.4	1292	151,5	SZ	168,90	0824900	49,34	Øessenziell/ 0,69	0722500	46,52	0722000	47,88	-
PF3D7_0936700	LPLA	3.1.1.5	432	49,6	R	6,94	1220300	40,77	Øessenziell/ 1,09	1034300	45,02	1401500	46,33	-
PF3D7_0937200	LPLA	3.1.1.5	357	40,8	GZII/GZV	18,51/ 14,13	1220300	41,69	Øessenziell/ 1,09	1034300	50,96	1324900	45,89	Templeton, 2009
PF3D7_1001400	LPLA	3.1.1.5	921	107,7	R	115,24	Ø	-	-	1225900	28,44	1271900	28,91	Spillman <i>et al.</i> , 2016
PF3D7_1001600	Acyl-glycerol Lipase	3.1.1.23	763	88,6	TR	514,27	Ø	-	-	1225900	25,95	1271900	29,06	Spillman <i>et al.</i> , 2016

Gen-ID ¹	Protein	EC-Nr.	Länge [AS]	MW [kDA]	Transkript. Maximum ²	FPKM Wert	Gen-ID ¹ PBANKA	Ident. [%]	PlasmoGEM KO-Phänotyp/ rel. Wachstums- rate ³	Gen-ID ¹ PVP01	Ident. [%]	Gen-ID ¹ PKNH	Ident. [%]	Referenz
PF3D7_1013500	PI-PLC	3.1.4.11	1385	164,2	TR/GZV/ OK	27,06/ 22,04/ 17,35	1211900	61,01	essenziell / 0,00	0813600	60,28	0813300	61,46	Raabe <i>et al.</i> , 2011
PF3D7_1038900	LPLA	3.1.1.5	359	41,8	GZV/OK	21,17/ 16,63	1220300	43,65	Øessenziell/ 1,09	1034300	48,63	0516400	45,55	Istvan <i>et al.</i> , 2017
PF3D7_1126600	PLA1	3.1.1.32	682	81,1	OK	119,31	0921800	32,21	Øessenziell/ 1,01	0927300	31,31	0924500	35,71	-
PF3D7_1238600	SMPD	3.1.4.12	393	46,0	SZ	144,62	1453100	42,28	ØPhänotyp/ -	1456700	32,78	1458400	35,13	Hanada <i>et al.</i> , 2002
PF3D7_1252600	LPLA	3.1.1.5	453	52,9	R	34,57	1220300	47,37	Øessenziell/ 1,09	1034300	49,64	1324900	45,56	Istvan <i>et al.</i> , 2017; LaCount <i>et al.</i> , 2005
PF3D7_1358000	PNPLA ₂	3.1.1.4	2012	238,2	SZ	69,48	1134300	45,23	essenziell / 0,24	1113900	43,85	1113500	46,31	-
PF3D7_1401500	LPLA	3.1.1.5	373	43,7	R/TR/ GCV	12,12/ 16,41/ 12,77	1220300	47,63	Øessenziell/ 1,09	1034300	51,3	1324900	48,81	Istvan <i>et al.</i> , 2017
PF3D7_1476700	LPLA	3.1.1.5	353	41,4	GZV	705,31	1220300	42,97	Øessenziell/ 1,09	1034300	44,48	1324900	43,01	-
PF3D7_1476800	LPLA	3.1.1.5	371	42,7	GZV	44,75	1220300	39,21	Øessenziell/ 1,09	1034300	45,65	1324900	41,91	-

<i>P. falciparum</i>	1	msddd-kiiyisdlfsknfsdde-kdd---syerekq---v-----y-----sgse-t---qhaeneysklraqnstilnnyfdndniknvenl
<i>P. knowlesi</i>	1	mndeee-riymysdifshglsggehsdd---tgerekk---ktqkkknknl-----kdnn-i---kngeneysklraenstilnnyfdvdpiksfspq
<i>P. berghei</i>	1	msngedgnimysdlfnslsdne-nen---iyeedikknv-----y-----tndgyl---qhgeneysklraenstilnnyfnnehikhsdhd
<i>P. vivax</i>	1	mndeee-riymyhdifshslsggee-nsd---ggerekr---k-----iqkkkkklsdsn-l---kngeneysklraetstilndyfd-----veps
<i>P. malariae</i>	1	mndddg-kvviysdlftanfssdde-kdddydtiekek-k-----k-----isse-ddalkngeneysrlraenstilnnyfnneniknfnnn
<i>P. ovalae</i>	1	msddddekiiyisdlftkkftdde-kdd---iyekek-k-----k-----aysd-egiltkgeneysklraetstilnnyfydenlknsqnd
<i>P. falciparum</i>	74	ks-ndpd-----qidlilfpvnknymnfdgqqliehihsiklrkagfaylvnnnnskwdgiyfglsrmqveldykli--tkkn---kdg-----
<i>P. knowlesi</i>	82	vv-nael-----hsdflqfpqnnehtlnifdgeltqhkhsvqlrkpgfyicyvnnnnskwdsiyfglskmqvevnyklipqneen---atq-----
<i>P. berghei</i>	80	tn-ants-----wndiifpvnkkytlklfegelesenkhtiklrkngfyicalennndgkwdtiyfglskmqielisykli--vkensineeg-----
<i>P. vivax</i>	75	rc-fnpeggeaslenldflqfpqnkeqtlidfdgeltgnkhsvqlrkpgfyicyvnnnnskwdsiyfglskmqvelnykli--lqde---ekapggkaee
<i>P. malariae</i>	80	nhmnstr-----hdevtifptnkcyvnlfdgelvenrtiklkkagfyiclenynsskwgiylglskiqvelnykli--lpnd---nns-----
<i>P. ovalae</i>	78	dm-rntl-----ygdvisfplkknsvlfdgelndnkhsvklrksgfyiclennnaskwdsiyfglskiqvelnykli--vrnd---ide-----
<i>P. falciparum</i>	135	-----geyekrntssy-----dnetsvqn---t-vgsekeete-----nkneet-----
<i>P. knowlesi</i>	165	-----gkaqernkeafgkpgqrkkspsanqkeeeqdlstdvppddnddddhdq---ddvekegeesdvdvveekgekrepm-----
<i>P. berghei</i>	164	-----kgkakehtrn-----dqtsilgk---n-kqssneenn-----ksipee-----
<i>P. vivax</i>	169	rcrraargkpgqrkrqvad-----rrceeeeee-g-geeedgeeee-----daddeadeadedadeydegydg
<i>P. malariae</i>	162	-----eqfegsn---ny-----vnkemidnykkm-vhdsdeenn-----iikqy-----
<i>P. ovalae</i>	159	-----elyerrntes-----ediehfdn---v-tngdreedy-----nksehi-----
<i>P. falciparum</i>	190	-----snynslnnneinkickynldqtdilld---ds-nser--rr-n-----skfikntnyydnlm---lqnkytnsilydddddknntet
<i>P. knowlesi</i>	237	-----tmekelnldsricnfnfdqtdilf---ds-keikntkh-m-----nnikgrnkncynnlr---vknkkkesalfe--enktntes
<i>P. berghei</i>	198	-----insidvdelidmyrfsfekseekfdekitds-mkgr--sn-niisnknklknknshhynnm---mknkynslvh---dnhtiet
<i>P. vivax</i>	228	dankrddplttasahlsdeiskickfnfaqtgdpf---ds-kerrnpkq-i---skmkgrkksyddqlrekprkkkkkkkesalfe--enktntes
<i>P. malariae</i>	199	-----psplslndeineickynleqtnimvd---et-sdqk---kkncc---nkftknahyygppm---aankygssvf---dnnntstet
<i>P. ovalae</i>	194	-----ddsksnindeveickfnleqterille---etvdsdpk--rs-s-----skfkvkdtttynnst---vrdkygptvfneen---nntet
<i>P. falciparum</i>	263	ytctfktedqirvpsqkkkyiylknkydnatldlnvhtymslgmsilckysllycgkynhiprdpytpfrkpvsielsldgggiltistlivlnrieaer
<i>P. knowlesi</i>	310	fscftfnnedqirvsskkkkyvlyllynsansmhlhlnvstcmslgmtleecryglycgkynqipddpytpfrkpvsielsldgggilamstlivlnrieaer
<i>P. berghei</i>	277	frctfnneskivrसानकkyiylskdpdtylnifvrthmalgmcmckysllycgkgnkipddpytpfrkpvsielsldggvlatstlivlnrieaer
<i>P. vivax</i>	315	ftctfhsenqirvsskkkkyvymynksansmhlhlnvstcmslgmslqcrlyglycgkyhqiprdpytpfrkpvsielsldgggilamstlivlnrieaer
<i>P. malariae</i>	270	ftctfnnedqirvpsqkkkkyiylfnktentltditvtgymslgmsvlckyllycgkynqnpdpytpfrkpvsielsldaggilslstlivlnrieaer
<i>P. ovalae</i>	265	ftcafnnedqirvpsqkkkkyiylfnksentltditvrtymslgmalqcygvlycgkhhkiprdphapfrkpvsielsldgggilamstlivlnrieaer
<i>P. falciparum</i>	363	keigsddiklclcfdmvvgtsaggllslallleidldqvnmmwpsitikkvfegnrniisgilfegydnvkvdlfemknkfmsyykkyofvfatdvk
<i>P. knowlesi</i>	410	kvignddvklidcfdmvvgtsaggllslallkqmgldrdvtnllpsmqlkfvgnrniisgilfegydnvkvdlfemklgtmmsyykkyofvfatdvk
<i>P. berghei</i>	377	kelgndtinlidcfdmvvgtsaggllslalllegyslgeisallpfimektfegnrniisgilfegydnvkvdlfemhignkflascknlycfvfatdvk
<i>P. vivax</i>	415	keignddvklidcfdmvvgtsaggllslallkemglrdvtnllpsmqlkfegnrniisgilfegydnvkvdlfemkigrfmsshkrvyofvfatdvk
<i>P. malariae</i>	370	keigsndvklidcfdmvvgtsaggllslmlrevglqeimleakafegsrniisgilfegydnvkvdlfemkighnsmasyknyofvfatdvk
<i>P. ovalae</i>	365	keigsddvklidcfdmvvgtsaggllitlmlleigigieirviftnmkkifeggnliisgilfegydnivkvdlfemhfgnallvsvyknvyofvfatdvk
<i>P. falciparum</i>	463	hnpykflflrnythkynsinaesydginkvpwlaawatasaptylkgpssedikklgfaikpeihlvdgalkasnpallaleecarlennknlstfiked
<i>P. knowlesi</i>	510	hnpykflflrnythkynaingesyeginkfpwlaawatasaptylkgpssedmdklgfaikpeihlvdgalkasnpallaleecarlennknlstfiked
<i>P. berghei</i>	477	hnpykflflrnythkynaingesygglnkiplwlaawatasaptylkgpneddfkkygfaikpeihlvdgalkasnpallaleecarlennkalpnfhdd
<i>P. vivax</i>	515	hnpykflflrnythkynaingesyeginkvpwlaawatasaptylkgpssedikklgfaikpeihlvdgalkasnpallaleecarlennknlstfiked
<i>P. malariae</i>	470	hnpykflflrnythkynaingesyeginkvpwlaawatasaptylkgpssedikklgfaikpeihlvdgalkasnpallaleecarlennknlstfiked
<i>P. ovalae</i>	465	hnpykicllrnythkynaingesyeginkvpwlaawatasaptylkgpssedfkkkgfaikpeihlvdgalkasnpallaleecarlennknlstfiked
<i>P. falciparum</i>	563	ldtlvsigtgqvptklqtgsa--sgksastfeillinsthlltrandthrevlqladrentyfrfnvpnigdiidsqdvrdfdliakatrlyldekfyk
<i>P. knowlesi</i>	610	ldtlvisigtgkspklqtgsaa--sgksastfeiliinsahltrandthrevlqlsdrentyfrfnvpnigdinidsqdvrdfdliakatrlyldekfyk
<i>P. berghei</i>	577	ldtlvsigtgkspklqtgsndskstastfeillinsahltrandthrevlhwlskentyrfrfnvpnigdinidsrntndfdliakatrlyldekfyk
<i>P. vivax</i>	615	ldtlvsigtgkspklqtgsa--sgksastfeillinsahltrandthrevlqlsdrentyfrfnvpnigdiidsqdvrdfdliakatrlyldekfyk
<i>P. malariae</i>	570	ldtlvsigtgkspklqtgsdf--sgksastfeillinsthllstrandthrevlqlsdrentyfrfnvpnigdinidsqdvrdfdliakatrlyldekfyk
<i>P. ovalae</i>	565	ldtlvsigtgkspklqtgsqt--nsksastfeillinsthlltrandthrevlqlsdcentyfrfnvpnigdiidsqdvrdfdliakatrlyldekfyk
<i>P. falciparum</i>	662	ikrlahklannyirsyl
<i>P. knowlesi</i>	709	ikrlahklannyirsyl
<i>P. berghei</i>	677	ikylvrklannyirsyl
<i>P. vivax</i>	714	ikrlahklannyirsyl
<i>P. malariae</i>	669	ikrlahklannyirsyl
<i>P. ovalae</i>	664	ikrlahklannyirsyl

Abbildung 60 Multiples Sequenz-Alignment von PNPLA1 und ausgewählter homologer Proteine in anderen *Plasmodium*-Arten auf Basis der linearen Aminosäuresequenzen. Die homologen Proteine in anderen *Plasmodium*-Arten wurden mit dem NCBI Local Alignment Search Tool (BLAST) identifiziert. Regionen mit einer Sequenzhomologie von $\geq 60\%$ sind in rot markiert. Das im GXSXG-Konsensusmotiv eingebettete katalytische Serin sowie der Bereich, der das putative katalytische Aspartat beinhaltet, sind in grün gekennzeichnet. Das multiple Sequenz-Alignment wurde mit der *Clone Manager 9 Software* generiert. *Plasmodium falciparum*, PF3D7_0209100; *Plasmodium ovalae*, PocGH01_04020900; *Plasmodium malariae*, PMUG01_04023000; *Plasmodium knowlesi*, PKNH_0412000; *Plasmodium vivax*, PVP01_0415700; *Plasmodium berghei*, PBANKA_0306200 (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

A ...TAAAAATGTAGAAAATCTTAAATCTAATGATCCTGATCAAATTGATCTCATATTATTTCTGTAAATAAAATTATTATATGAATTTATTTGATGGACAATTAATTGAAAAATATACATTCCATAAACTAAGAAAAGCTGGATTTTATGCTATCTATGTGGAAAATAATAACAATGTAAAAATTAATATATATATATATATATTGTACCTGAACATTTTCATTATTTATTTATTTTATTTTACCTGACCAGTTCATAATTATTTAGTTTTTTTTTTTTTTTTTACCTGACCAGTTCATTATTTATTTAGTATTTATTTTATTTATCTGTTTATGATTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGAGTAAATGGGATGGTATCTACTTTGGCTTGTCAGAAATGTCAGGTGGAGTTAGATTACAAGCTTATAACAAAAAAGAATAGGATGGTGGCGAATATGAAAAGAGAAACAC TTCAAGTTATGATAATACAGAAAGTGACAAAACAC TG TAGGTAGTGA AAAAGAAGAAAC TGAAAA TAAGAA TGAGAAACAAG TAA TTATAATTCGAATTTAAATAATGAATAAAATAAAATATGTAAATATAATTTATGATCAAACTATATATTACTAGATGATAGTAAATTCAGAGAGAAGAAGAAATAGTAAATTTAAAAATAAAAAATAC TAA TTATTATGATAATTTAATGTTGCAAAATAATAACGAATTC TATTTATATGATGATGATGATGATAAAAAATAACAGAAACGATACATGTACGTTCAAAACAGAAGATCAAATAAGAGTTCCATCCAAAAAAGTACATATATTTATAATAATAATATGATAATGCAACACTAGATTTAAATGTGCATACATATATGCTTTAGGCA TGAGTATCTTATGTAAATATTCGTTGCTTTATTTGTTGGA TAA GCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAACAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA AAGCCTGGGG GCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCG....

B ...GTATCTTTAATTTATTATGTATATATAAAAAATACTTACAATTTTATTAATAAAACAATATATGTTTATTAATT CATGTTTTGTAATTTATGGGATAGCGATTTTTTTACTGTCTGTATTTTCTTTTTAATTATGTTTTAATTGTATTTTATTTTATTATTGTTCTTTTTATAGTATTATTTAAAACAAAATGATTTTCTAAGAAGCTTATAATAATAATAATAATAATTTTAAATAAAAAATTATTTATCTTTTACAATATGAACATAAAGTACAACATTAATATATAGCTTTTAAATTTTTTATTCCTAATCATGTAAATCTTAAATTTTCTTTTTAAACATATGTTAAATATTTTCTCATTATATATAAGAACATATTTATTAAGTGCAGCCCGGGGATCCAGAAATGTCAGGTGGAGTTAGATTACAAGCTTATAACAAAAAAGAATAAGGATGGTGGCGAATATGAAAAGAGAAACAC TTCAAGTTATGATAATACAGAAAGTGACAAAACACTGTAGGTAGTGAAAAGAGAAGAAAC TGAAAA TAAGAA TGAGAAACAAG TAA TTATAATTCGAATTTAAATAATGAAAATAAAATAAAATATGTAATTTATGATCAAACTGATATATTACTAGATGATAGTAATCTGAGAGAAGAAGAAATAGTAAATTTAAAAATAAAAAATACTAATTATTATGATAATTTAATGTTGCAAAATAAATATACGAATTCATATTATATGATGATGATGATGATAAAAAATAACAGAAACGTATACATGTACGTTCAAAACAGAAGATCAAATAAGAGTTCCATCCAAAAAAGTACATATATTTATATAATAAATATGATAATGCAACACTAGATTTAAATGTGCATACATATATGTCTTTAGGCATGAGTATCTTATGTAATATTCGTTGCTTTATTGTGGAAAGTATAATCATATCCCCAGGGACCCCTACACACCCCTTTAAAAAACCGTAAACAAAAAATAAAAAATAAATAAATACATATCTGTATACATATATATATATATATATATTTCTCTCCTTTTGTAGAGTTTCCATTTTGTGCTGGACGGAGGGGGCATATTGACCATATCAACATTACTTGTTTTAAACAGATTAGAAGCGGAGCTACGAAAAGAAATAGGAAGTGACGACATAAAATTAATAGATTGTTTTGATATGGTATGCGGTACAAGCGCCGGTGGTTAATAAG...

Abbildung 61 Sequenzierung der Integrationsloci der PNPLA1-KO Linien. Dargestellt ist die Sequenzierung des 5'-Integrationslocus (**A**) sowie des 3'-Integrationslocus (**B**). Die Sequenzen, die der homologen Sequenz auf dem Integrationsvektor entsprechen, sind mit grünen Buchstaben gekennzeichnet; Sequenzen, die dem wildtypischen *pnplal*-Genlocus entsprechen, sind mit schwarzen Buchstaben gekennzeichnet; Sequenzen, die der pCAM-BSD Vektor-Sequenz entsprechen, sind mit grauen Buchstaben gekennzeichnet; blau markierte Sequenzen stellen Oligonukleotidsequenzen dar, die zur Amplifikation der Integrationsloci verwendet wurden; orange markierte Sequenzen stellen die Sequenzierungs-Oligonukleotide dar. Das Stopp-Codon ist rot markiert. Die unterstrichenen Sequenzen wurden durch Sequenzierung bestätigt. Die Sequenzen sind in 5'→3'-Orientierung dargestellt (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

A ...CTTTATTGTGGAAAGTATAATCATATCCCCAGGGACCCCTACACACCCTTTAAAAAACCGTAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAATAAAATACATATCTGTATACATATATATATATATATATTTCT
 CTCCTTTTGTAGAGTTTCCATTTTGTGCGTGGACGGAGGGGGCATATTGACCATATCAACATTAC
 TTGTTTTAAACAGATTAGAAGCGGAGCTACGAAAAGAAATAGGAAGTGACGACATAAAATTAATA
 GATTGTTTTGATATGGTATGCGGTACAAGCGCCGGTGGTTTAATAAGTCTAGCTTTATTAAGAGA
 GATCGATTTACAGGATGTTAGTAATATGTGGCCAAGTACTATAAAAAAGGTTTTGAAGGAAA
 TCGAAATATAATAAGTGGTATATTTTTGAAGGATATGATGTAAATAATGTGAAAGATGTATTT
 TTGGAACGTATGGGAAATAAAATTTATGCTTCATATAAAAAATTTTATTGTTTTGTAAACAGCAA
 CTGATGTAAACATAAGCCATATAAAATTTTAAATTAGAAAATTATACGCATAAAATAAATTC
 AATTAATGCTGAATCATATGATGGTATTAATAAAGTTCCTTATGGCTAGCTGCA TGGGCAACT
 GCTTCGCAACCAACATATTTAAAAGGACCAAGTGCCGAAGATATTA AAAAGTTGGGAATTAAT
 AAAAAACCAGAAAACATTTAGTAGATGGTGC TTTAAAAGCAAGTAATCCAGCTTTGATTGCTT
 TAGAAGAA GTGCAAGATTAACAATAAAAAATTTATCTACATTTATTAAGAGGATTTAGATAC
 ATTAGTATCTATAGGGACGGGTCAAGGTGCTTAC TAAATTAACACAATCTGGTGCAAGTAGTAA
 ATCAGCTTCAACC TTTGAAATATTAATTAATTC TACTAC TTAATAACAAGAGCAAATGACACT
 CATAGGGAAGTATTACAACGTTTAGCTGACCGAGAAAAATACATATTTTAGATTTAATGTTCCAC
 ATATAGGTGATATAGAAAATAGATAGTCAGGATGTGCGTGATTTTGATTTAATACTAAGGCCAA
 CTCAAGATTATTTATTTGATGAAAAATTTTATGAAATTA AAAAGGTTAGCTCACAAGTTAGCAAA
 TAATTACATACGTTCAAAATATCTACCTAGGATGTACCCGTACGACGTCCCGGACTACGCTGG
 CTATCCCTATGATGTGCCCCGATTATGCGTATCCTTACGATGTTCCAGATTATGCCGAGCTCTAAG
 GTACCTAATTATAGCGCCCGAACTAAGCGCCCGGAAAAAGGCTTAGTTGACGAGGATGGAGGT
 TATCGAATTTTCGGCGGATGCCTCCCGGCTGAGTGTGCAGATCACAGCCGTAAGGATTTCTTCA
 AACCAAGGGGTGACTCCTTGAACAAAGAGAAATCACATGATCTCCCGGTCGAGGGATATGG
 CAGCTTAATGTTCTGTTTTCTTATTTATATATTTATACCAATTGATTGATTTATAACTGTAAAAAT
 GTGTATGTTGTGTCATATTTTTTTGTGCATGCATGCATGTAAATAGCTAAAATTATGAACA
 TTTTATTTTTGTTTCAGAAAAAAAACTTTACACACATAAAATGGCTAGTATGAATAGCCATATT
 TTATATAAATTAATCCTATGAATTTATGACCATATTA AAAATTTAGATATTTATGGAACATAATAT
 GTTTGAAACAAT...

B ...TCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGC
 TCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCA
 ATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTT
 CCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCA
 CCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT
 TTCACACAGGAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACT
 CGCGGCCGCAAGGATGTTAGTAATATGTGGCCAAGTACTATAAAAAAGGTTTTTGAAGGAA
 ATCGAAATATAATAAGTGGTATATTTTTGAAGGATATGATGTAAATAATGTGAAAGATGTATT
 TTTGGAACGTATGGGAAATAAAATTTATGCTTCATATAAAAAATTTTATTGTTTTGTAAACAGCAA
 CTGATGTAAACATAAGCCATATAAAATTTTAAATTAGAAAATTATACGCATAAAATAAATTC
 AATTAATGCTGAATCATATGATGGTATTAATAAAGTTCC TTTATGGCTAGCTGCA TGGGCAACT
 GCTTCGCAACCAACATATTTAAAAGGACCAAGTGCCGAAGATATTA AAAAGTTGGGAATTAAT
 AAAAAACCAGAAAACATTTAGTAGATGGTGC TTTAAAAGCAAGTAATCCAGCTTTGATTGCTT
 TAGAAGAA GTGCAAGATTAACAATAAAAAATTTATCTACATTTATTAAGAGGATTTAGATAC
 ATTAGTATCTATAGGGACGGGTCAAGGTGCC TACTAAATTAACACAATCTGGTGCAAGTAGTAA
 ATCAGCTTCAACC TTTGAAATATTAATTAATTC TACTAC TTAATAACAAGAGCAAATGACACT
 CATAGGGAAGTATTACAACGTTTAGCTGACCGAGAAAAATACATATTTTAGATTTAATGTTCCAC
 ATATAGGTGATATAGAAAATAGATAGTCAGGATGTGCGTGATTTTGATTTAATACTAAGGCCAA
 CTCAAGATTATTTATTTGATGAAAAATTTTATGAAATTA AAAAGGTTAGCTCACAAGTTAGCAAA
 TAATTACATACGTTCAAAATATCTATAAAAAAGAGGTAGCATATAAATATGTAATTATTTGTAA
 GCTTATTATTTAAAAAATATATAATATGTGATGATTATTAATTCAAATTTTAACCTAGATAAACAA
 AAATAAAATAAAATAAAAAAAAATAATATATATATATATATATGATTATTATAAAGAGAAAAA
 GAGAGAACAGTGTTCTTTTTCTTTTTCTTTTTCTTTTTTA...

Abbildung 62 Sequenzierung der Integrationsloci der PNPLA1-KD Linie. Dargestellt ist die Sequenzierung des 5'-Integrationslocus (A) sowie des 3'-Integrationslocus (B). Die Sequenzen, die der homologen Sequenz auf dem Integrationsvektor entsprechen, sind mit grünen Buchstaben gekennzeichnet; Sequenzen, die dem wildtypischen *pnpl1*-Genlocus entsprechen, sind mit schwarzen Buchstaben gekennzeichnet; Sequenzen, die der pARL-HA-*gls* Vektor-Sequenz entsprechen, sind mit grauen Buchstaben gekennzeichnet; blau markierte Sequenzen stellen Oligonukleotidsequenzen dar, die zur Amplifikation der Integrationsloci verwendet wurden; orange markierte Sequenzen stellen die Sequenzierungs-Oligonukleotide dar. Die unterstrichenen Sequenzen wurden durch Sequenzierung bestätigt. Die Sequenzen sind in 5'→3'-Orientierung dargestellt (modifiziert nach Flammersfeld *et al.*, 2019).

IX. Publikationsliste

Flammersfeld, A., Panyot, A., Yamaro-Botté, Y., Aurass, P., Przyborski, J.M., Flieger, A., Botté, C., Pradel, G. (2019). A patatin-like phospholipase functions during gametocyte induction in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cellular Microbiology* **22**: e13146.

Flammersfeld, A., Lang, C., Flieger, A., Pradel, G. (2018). Phospholipases during membrane dynamics in malaria parasites. *International Journal of Medical Microbiology* **308**: 129-141.

Rosa, T. F., **Flammersfeld, A.***, Ngwa, C. J., Kiesow, M., Fischer, R., Zipfel, P. F., Skerka, C., Pradel, G. (2016). The *Plasmodium falciparum* blood stages acquire factor H family proteins to evade destruction by human complement. *Cellular Microbiology* **18**: 573-590.

*Ko-Erstautor

Schnitzler, A.C., Salla, S., Hamsley, N., **Flammersfeld, A.**, Fuest, M., Walter P., Hermel, M. (2016). Role of the Endothelial Layer in the Deswelling Process of Organ-Cultured Human Corneas Before Transplantation. *Cornea* **35**: 1216-1221.

Fuest, M., Salla, S., Walter, P., Plange, N., Kuerten, D., **Flammersfeld, A.**, Hermel, M. (2016). Comparison of Gebauer SLc and Moria CBm Carriazo-Barraquer ALK Microkeratomes for Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty Preparation. *Current Eye Research* **41**: 343-349.