#### INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

> vorgelegt von Diplom-Biologin Ivana Türbachova aus Prag

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2000

# Synthese des Hauptoberflächenproteins MSP-1 aus *Plasmodium falciparum* in *Toxoplasma gondii*: Untersuchungen zur Struktur und Funktion

Gutachter:

Prof. Dr. Hermann Bujard Prof. Dr. Hans-Ulrich Schairer Diese Arbeit wurde am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg in der Zeit von März 1996 bis Juni 2000 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Hermann Bujard angefertigt.

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Hermann Bujard, der mich nicht nur ein interessantes Thema und hervorragende Arbeitsbedingungen bot, sondern mich auch mit seiner Begeisterung für die Malariaforschung "infiziert" hat.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Dominique Soldati für ihre souveräne Betreuung.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Clemens Kocken für die anregende Zusammenarbeit bei der Aotus Immunisierungsstudie, bei Frau Judith Olek, die mein Deutsch druckreif gemacht hat und bei Familie Mach für die "psychologische Betreuung" bedanken.

Den jetzigen und früheren Kollegen sei nicht nur für wissenschaftliche Anregungen und Diskussionen, sondern auch für das Schaffen eines außergewöhnlich angenehmen Arbeitsklimas gedankt, das diese Zeit für mich unvergeßlich macht.

Und schließlich möchte ich mich bei Sven Olek bedanken, der für mein seelisches Wohlbefinden verantwortlich war

1. EINLEITUNG	1
1.1 Der Lebenszyklus von Plasmodium ssp. bietet mehrere Angriffspunkte für einer	n Malaria-
Impfstoff	
1.2 Die Pathogenese einer P. falciparum Infektion	
1.3 Malaria und die Entstehung einer Immunantwort	5
<ul> <li>1.4 Wie realistisch ist ein Impfstoff gegen Malaria?</li> <li>1.4.1 Ein Impfstoff gegen prä-erythrozytäre Stadien</li> <li>1.4.2 Ein Impfstoff gegen erythrozytäre Stadien</li> </ul>	<b></b>
1.5 Das MSP-1 aus <i>P. falciparum –</i> ein vielversprechender Impfstoff-Kandidat	
1.6 Die Invasion von Erythrozyten durch die Merozoiten	
1.7 Der in dieser Arbeit verwendete Empfängerorganismus für MSP-1: Toxoplasma	a gondii 19
1.8 Ziele der Arbeit	
2. ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN	23
2.1 Abkürzungen	
2.1.1 Einheiten	
2.1.2 Vorsätze	
2.1.3 Basen/Nukleoside 2.1.4 Nomenklatur der Aminosäuren nach IUPAC-IUB Vereinbarungen (1969)	
2.2 Definitionen	
3. MATERIAL	26
3.1 Laborausstattung	
3.2 Verbrauchsmaterial	
3.3 Chemikalien	
3.4 Radioisotope	
3.5 Enzyme	
3.6 Seren und Antikörperkonjugate	
3.7 Primer	
3.8 Plasmide	
3.10 Material für die Kultur von <i>E. coli</i>	
3.11 Puffer, Medien und Stammlösungen	
3.11.1 Material für molekularbiologische Standardtechniken	
3.11.2 Material für die Kultur von Toxoplasma gondii	

4. METHODEN	40
4.1 DNA-Transfer in <i>E. coli</i> Zellen	40
4.1.1 Herstellung von E. coli Zellen für die Elektroporation	
4.1.2 Elektroporation kompetenter E. coli Zellen	40
4.1.3 Herstellung kompetenter E. coli Zellen für die CaCl2-Methode	40
4.1.4 Herstellung kompetenter E. coli Zellen für die CaCl2-Methode (optimiertes Protokoll nach Inoue	et
al., 1990)	40
4.1.5 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E. coli Zellen nach der CaCl2-Methode	41
4.2.1 Schnellmethode zur Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E. coli Zellen	41
4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	41
4.2.1 Schnellmethode zur Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA aus E. coli Zellen ("mini-Prep").	41
4.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli Zellen über Anionenaustauscher-Chromatografie ("Ma	axi-
Prep")	42
4.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren	42
4.3.1 Extraktion von Proteinen aus DNA-Lösungen	42
4.3.1.1 Äquilibrierung des Phenols	42
4.3.1.2 Phenol- und Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren	42
4.3.2 Konzentrierung von Nukleinsäurelösungen	43
4.3.2.1 Reinigung von Glykogen als Fällhilfe	43
4.3.2.2 Konzentrierung von Nukleinsäurelösungen und Ethanolpräzipitation	43
4.3.3 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen	43
4.3.4 Elektroelution in "Hochsalz"	43
4.3.5 Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen (Silica-Adsorption)	44
4.3.6 Aufreinigung synthetisierter Oligonukleotide ("primer")	44
4.3.7 Aufreinigung von PCR-Produkten	44
4.4 Analyse von Plasmid-DNA	45
4.4.1 Restriktionanalyse	45
4.4.1.1 Partieller Restriktionsverdau	45
4.4.2 Analyse der DNA mittels Gel-Elektrophorese	45
4.4.2.1 Auftrennung hochmolekularer DNA und topologischer Isomere im Agarose-Gel	46
4.4.2.2 Auftrennung niedermolekularer dsDNA in nativen PAA-Gelen	46
4.4.2.3 Anfärben von DNA in Gelen mit Ethidium-Bromid	46
4.4.3 Enzymatische DNA-Sequenzierung nach Sanger	46
4.4.3.1 Gelelektrophoretische Analyse von DNA-Sequenzierungsansätzen	47
4.5 In vitro Modifikation und Rekombination von DNA	48
4.5.1 Dephosphorylierung der 5'Enden von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase	48
4.5.2 Phosphorylierung von 5'-hydroxylierten Enden durch Polynukleotidkinase	48
4.5.4 Kovalentes Verknüpfen von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	48
4.5.5 Enzymatische in vitro Amplifikation von DNA mittels Taq-Polymerase (PCR) (Saiki et al., 1988	) 48
4.5.6 Ortsspezifischer Nukleotidaustausch ("Site-directed Mutagenesis")	49
4.6 Chemische Synthese des MSP-1 vom Typ MAD20	50
4.6.1 Entwurf des <i>msp-1</i> Gens vom Typ MAD20	50
4.6.2 Entwurf und Synthese der Oligonukleotide	50
4.6.3 Chemische Synthese der dsDNA mittels asymmetrischer PCR mit einzelsträngigen Oligonukleot (Pan et al., 1999)	iden 51
47 Angles and Asferiais and ask and a features	<b>F</b> 4
4./ Analyse und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen	51

4.7.1 Analyse von Proteinen durch diskontinuierliche, denaturierende PAA-Gelelektrophorese (SI	DS-
PAGE)	51
4.7.2 Färbung von Proteinen in PAA-Gelen mit Coomassie-Blau	
4.7.3 Färbung von PAA-Gelen mit kolloidalem Coomassie	
4.7.4 Silberfärbung von PAA-Gelen nach Heukeshoeven	
4.7.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford (Bradford, 1976)	
4.7.6 Aufreinigung von rekombinanten Hexahis-MSP-1 Fragmenten aus E.coli	
4.7.6.1 Expression der MSP-1 Fragmente in <i>E.coli</i>	53
4.7.6.2 Herstellung des <i>E.coli</i> Lysates für die Proteinaufreinigung	53
4.7.6.3 Ni <sup>2+</sup> -Chelatchromatographie	
4.8 In vitro Kultur von Toxoplasma gondii	53
4.8.1 Wachstum von <i>T. gondii</i>	53
4.8.1.1 Parasitenstämme	53
4.8.1.2 Wirtszellen	54
4.8.1.3 Passage von <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten	54
4.8.1.4 Aufreinigung der Tachyzoiten	54
4.8.1.5 Einfrieren von T. gondii Tachyzoiten	54
4.8.1.6 Auftauen von <i>T.gondii</i> Tachyzoiten	55
4.9 DNA-Transfer in Toxoplasma gondii	55
4.9.1 Transiente Transfektion	55
4.9.2 Stabile Transfektion	55
4.9.3 Etablierung stabil transfizierter Parasitenlinien	55
4.9.3.1 CAT-Selektion	55
4.9.3.2 Die MPA/Xanthin Selektion	
4.10 Nachweis von <i>in vivo</i> synthetisierten Proteinen in <i>T. gondii</i>	56
4.10.1 Messen der CAT-Aktivität in stabilen Parasitenklonen	56
4.10.2 Bestimmung der ß-Galaktosidase Aktivität	
<ul><li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li><li>4.10.2.1 Enzymatische β-Galaktosidase Messung (Seeber and Boothroyd, 1996)</li></ul>	
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 56 57 57 57 58 58 58 58 58 58 58
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 56 57 57 58 58 58 58 58 58 58 58
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 56 57 57 58 58 58 58 58 58 58 58 58 58 58 59 59
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 56 57 57 58 58 58 58 58 58 59 59 59 59
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 56 57 57 57 58 58 58 58 58 58 58 58 58 59 59 59 59
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 56 57 57 58 58 58 58 58 58 58 59 59 59 59 59 59 59 59 59
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 56 57 57 58 58 58 58 58 58 59 59 59 59 59 59 59 59 59 59 59 59 59
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 56 57 57 57 58 58 58 58 58 58 58 58 59 59 59 59 59 59 60 60 60 60
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 56 57 57 58 58 58 58 58 58 59 59 59 59 59 59 60 60 60 60 60
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 56 57 57 58 58 58 58 58 58 58 59 59 59 59 59 59 59 60 60 60 60 60 60
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 56 57 57 58 58 58 58 58 58 59 59 59 59 59 59 59 60 60 60 60 60 60 60
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der ß-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 56 57 57 58 58 58 58 58 58 58 58 59 59 59 59 59 60 60 60 60 60 60 60 60 60
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 56 57 57 58 58 58 58 58 58 58 59 59 59 59 59 59 60 60 60 60 60 60 60 60 60
<ul> <li>4.10.2 Bestimmung der ß-Galaktosidase Aktivität</li></ul>	56 56 57 57 58 58 58 58 58 58 59 59 59 59 59 59 60 60 60 60 60 60 60 60 60 60 60 60 60

4.12.1 Immunogene Wirkung in der Maus	62
4.12.1.1 Immunisierung mit attenuierten, rekombinanten ts-4 Mutanten	
4.12.1.2 Immunisierung mit gereinigtem, rekombinantem MSP-1	
4.12.2 Immunisierungsversuche in Aotus-Affen	
4.13 Immunologische Methoden zur Analyse der Seren	63
4.13.1 IFA mit Plasmodium-infizierter Kultur.	63
4.13.2 "Enzyme linked immunosorbent Assay" (ELISA)	64
4.14 Analyse der Bindungsaffinität zwischen T. gondii und Erythrozyten	64
4.14.1 Mikroskopische Untersuchungen der Bindungsaffinität	64
4.14.2 Analyse der Bindungsaffinität mittels Durchflusszytometrie	65
4.14.2.1 Markierung der Erythrozyten mit Dil	65
4.14.2.2 Bindungsreaktion zwischen T. gondii und markierten Erythrozyten	65
4.14.2.3 Messung mit dem Durchflusszytometer	66
4.14.2.4 Trennung der Populationen mittels "Fluorescence-activated cell sorting" (FACS)	
5 EDCEDNISSE	67
5. EKGEDNISSE	0/
5.1 Entwurf, Synthese und Konstruktion des <i>msp-1d</i> Gens	67
5.1.1 Entwurf der synthetischen MSP-1D Kodierungssequenz	67
5.1.2 Synthese und Konstruktion des <i>msp-1d</i> Gens aus einzelnen Fragmenten	70
5.2 Charakterisierung des rekombinanten MSP-1F Proteins und seiner Fragmente aus 7	Γ.
gondii	75
5.2.1 Konstruktion von <i>T. gondii</i> spezifischen MSP-1F Expressionsvektoren	75
5.2.1.1 Konstruktion von Vektoren zur Synthese des MSP-190F Proteins in T. gondii	75
5.2.1.2 Konstruktion der <i>T. gondii</i> spezifischen Vektoren zur Synthese der Fragmente MSP-F42 MSP-F19	und 79
5.2.2 Etablierung von transgenen T. gondii-Linien	79
5.2.2.1 Etablierung von transgenen T. gondii-Linien zur Synthese von MSP-190F	
5.2.2.2 Etablierung von GFP-positiven <i>T. gondii</i> -Linien, die das MSP-190F sowie die Fragmente	MSP-
F19 und MSP-F42 produzieren.	83
5.2.2.3 Etablierung von attenuierten, temperatursensitiven ts-4 Mutanten, die das MSP-190F produzieren	
5.2.3 Aufreinigung des rekombinanten MSP-190F aus <i>T. gondii</i> mittels	
Immunaffinitätschromatographie	
5.2.4 Charakterisierung der in T. gondii synthetisierten Proteine	91
5.2.4.1 Analyse der rekombinanten Proteine im Bezug auf ihre subzelluläre Lokalisierung	
5.2.4.2 Analyse der Epitopkonservierung bei den verschiedenen MSP-190F Proteinen	
5.2.4.3 Nachweis der GPI-Verankerung mittels PI-PLC Behandlung in vivo	
5.2.4.4 Untersuchungen zur potentiellen Prozessierung des MSP-F42 Proteins	
5.3 Immunisierungsstudien mit MSP-1 in Tiermodellen	102
5.3.1 Immunogene Wirkung des in T. gondii hergestellten MSP-190F in der Maus	102
5.3.2 Analyse der MSP-1-vermittelten Immunantwort im Aotus Primatenmodell	106
5.3.2.1 Voruntersuchungen in Aotus Affen	106
5.3.2.2 Immunisierungsstudien von Aotus Affen mit nativen MSP-1: Cali 1993 und Cali 1995	108
5.3.2.3 Immunisierung von Aotus Affen mit rekombinanten MSP-190F aus T. gondii	
5.3.2.3.1 Immunisierung mit rekombinanten T. gondii Parasiten des avirulenten Stammes ts-4	110
5.3.2.3.2 Induktion der humoralen anti-MSP-1 Antwort nach einer Immunisierung mit heterol	log
hergestelltem MSP-190F, gereinigt aus T. gondii	112

5.3.2.3.3 Analyse der potentiellen Schutzwirkung des rekombinanten MSP-1 Proteins nach eine Infektion mit <i>P. falcinarum</i> des FVO Stammes	r 115
5.4 Untersuchung der Bindungsaffinität zwischen transgenen <i>T. gondii</i> und Erythrozyten.	120
5.4.1 Mikroskopische Untersuchungen	120
5.4.2 Quantitative Untersuchungen der Bindungsaffinität mit Hilfe von Durchflusszytometrie	122
5.4.2.1 Konstruktion des Reporter-Plasmids und Etablierung der transgenen T. gondii-Linie	122
5.4.2.2 Durchflusszytometrieanalyse der Bindungsexperimente	124
6. DISKUSSION	129
6.1 Entwurf und Konstruktion des synthetischen msp-1d Gens	129
6.1.1 Perspektiven, welche die Expression des synthetischen msp-1d Gens eröffnet	131
6.2 Toxoplasma gondii als ein Modellorganismus zur Expression von rekombinanten MSP	-
190F und seinen Fragmenten	132
6.2.1 Die plasmodialen Transportsignale sind funktionsfähig in <i>T. gondii</i>	133
6.2.1 Das rekombinante MSP-190F kann in seiner Gesamtlänge aus T. gondii gereinigt werden	135
6.2.4 Charakterisierung des rekombinanten MSP-190F und seiner Fragmente aus T. gondii	136
6.2.5 Findet die P. falciparum-spezifische sekundäre Prozessierung des MSP-F42 auch im T. gondii	
statt?	139
6.3 Das Immunisierungspotential des in T. gondii produzierten MSP-190F Proteins	141
6.3.1 Das MSP-190F aus T. gondii induziert eine spezifische, humorale Immunantwort in C57BL/6	
Mäusen	142
6.2.4 Die Wirkung des MSO-190F aus T. gondii im Aotus Immunisierungsmodell	144
6.4 MSP-1 und seine Fragmente vermitteln eine erhöhte Bindungsaffinität von	
rekombinanten T. gondii zur menschlichen Erythrozyten	148
7. ZUSAMMENFASSUNG	152
8. LITERATUR	153

Anhang

#### **1. EINLEITUNG**

Die ältesten Berichte über ein "tödliches Fieber" – höchstwahrscheinlich Malaria – sind so alt wie das geschriebene Wort, etwa 7 500 bis 8 000 Jahre. Der griechische Gelehrte Hippokrates beschrieb als erster – etwa fünfhundert Jahre v. Ch. – die charakteristischen Symptome der Malaria. Jahrhunderte später erklärte der Medizinische Almanach aus dem Jahre 1888 die Malaria für die Infektionskrankheit, der die meisten Menschenleben zum Opfer fallen.

Heute, mehr als hundert Jahre nach der Entdeckung des Malaria Erregers von Alphonse Laveran (Laveran, 1880) und der *Anopheles* Stechmücke als Überträger des Parasiten von Sir Donald Ross (Ross, 1897) ist die Malaria weiterhin eine der gefährlichsten Infektionskrankheiten der Welt. Sie fordert jährlich 1,5 – 2,7 Millionen Menschenleben, weitere 300 – 500 Millionen werden jedes Jahr infiziert (Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation, WHO, 1994). Von den vier humanpathogenen Erregern *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* und *P. ovale* ist fast ausschließlich *P. falciparum* für die tödlichen Infektionen verantwortlich.

Die Entdeckung der insektiziden Wirkung von DDT und die billige Produktion von anti-Malaria Medikamenten wie Quinin und Chloroquin führten dazu, dass die WHO 1955 ein weltweites Programm zur Ausrottung der Malaria in Angriff nahm. Diese Strategie war auch in einigen Regionen, wie z. B. Süd-Europa und Nord-Amerika erfolgreich. In dem am meisten von Malaria betroffenen Afrika, genauso wie in Latein-Amerika und den meisten asiatischen Ländern hatte sie sich jedoch nicht bewährt. Ganz im Gegenteil – die Krankheit tauchte in Gebieten auf, die bislang als Malaria-frei galten. Dieser Rückschlag ist zum einen auf die Entstehung von insektizidresistenten Moskitostämmen sowie chloroquinresistenten Parasiten zurückzuführen. Zum anderen sind es die unzureichende medizinische Pflege, die Migration der Populationen in die endemischen Gebiete, ökologische Veränderungen wie Waldrodungen und schließlich einige Fehleinschätzungen der epidemiologischen Situation, die dazu führten, dass das Ausrottungsprogramm 1972 von der WHO offiziell eingestellt wurde (Desowitz, 1991).

In den etwa 100 Ländern und Gebieten, die von Malaria betroffen sind, leben heute über 40% der Weltpopulation. Die ursprünglich noch weiter verbreitete Krankheit beschränkt sich heute vor allem auf das tropische Afrika südlich der Sahara (80% der Malariafälle), es folgen Indien, Brasilien, Afghanistan, Sri Lanka, Vietnam, Kambodscha und China (WHO, 1994). Die "Gesamtkosten" der Malaria – einschließlich der medizinischen Pflege, Produktivitätssenkung usw. – wurden alleine für Afrika im Jahr 1995 auf 1,8 Milliarden US-Dollar geschätzt (WHO).

Aus den Erkenntnissen der Vergangenheit Konsequenzen ziehend, gründeten die WHO und ihre Partner das "Roll Back Malaria" Programm zur Bekämpfung der Malaria. Zur Zeit verfolgt man – abgesehen von der Verwendung von den mit Insektizid imprägnierten Bettnetzen und der Weiterentwicklung des Gesundheitssystems in den betroffenen Ländern – drei verschiedene, wissenschaftliche Ansätze zur Bekämpfung der Malaria: (i) Die Herstellung einer gentechnisch veränderten *Anopheles* Mücke, die eine Resistenz den Parasiten gegenüber aufweist, (ii) die Entwicklung neuer Medikamente oder Insektizide und (iii) die Entwicklung eines Malaria-Impfstoffes.

Dem molekular-biologischen Fortschritt der letzten 15 Jahre verdanken wir das bessere Verständnis der Biologie der *Plasmodium ssp.*, der Pathogenese der Malaria sowie der Immunantwort bei Malariainfektionen. Entscheidende Schritte in der Malariaforschung waren die Etablierung der *in vitro* Kultur von *P. falciparum* Blutstadien (Trager and Jensen, 1976), die Klonierung und heterologe Expression verschiedener Parasitengene sowie die Methodik der transienten und der stabilen Transfektion vom *Plasmodium ssp.* (Goonewardene *et al.*, 1993; van Dijk *et al.*, 1995). Das fast abgeschlossene Sequenzierungsprojekt des *P. falciparum* Genoms – ein Teil des "Malaria Genome Project Consortium" – dient u.a. der Identifikation von neuen Antigenen oder metabolisch aktiven Enzymen, die für eine Impfstoffentwicklung bzw. als Angriffsziele für eine Chemotherapie geeignet wären.

In der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts wurde bewiesen, dass eine Immunisierung gegen Infektionskrankheiten wie Polio, Gelbfieber, Pocken und Masern sehr effektiv sein kann. So konzentrierte sich auch die Malaria Forschung auf die Entwicklung von Impfstoffen gegen Malaria. Der hoch komplexe Lebenszyklus der *Plasmodium ssp*. bietet mehrere Ebenen an, auf denen eine Vakzine wirkungsvoll eingreifen könnte.

# 1.1 Der Lebenszyklus von *Plasmodium ssp.* bietet mehrere Angriffspunkte für einen Malaria-Impfstoff

Das Immunsystem des Wirtes wird während der Infektion mit mehreren Entwicklungsstadien der *Plasmodium ssp.* konfrontiert, die sich morphologisch unterscheiden und eine stadiumspezifische Immunantwort induzieren.

Der Lebenszyklus der *Plasmodium ssp.* ist getrennt zwischen Wirt und Moskito-Vektor (Abb. 1.1). Der Mensch wird ausschließlich von den *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. mala-riae* infiziert, die jedoch wie alle anderen *Plasmodium ssp.* durch die Stechmücken der Gattung *Anopheles* übertragen werden. Von den 380 *Anopheles* Arten sind nur 60 in der Lage diese Transmission zu vollziehen.

Die Ansteckung erfolgt durch den Stich einer infizierten, weiblichen *Anopheles* Mücke, bei dem die Sporozoiten aus der Speicheldrüse des Moskitos in die menschliche Blutbahn gelangen. In den nachfolgenden 30 Minuten erreichen die Sporozoiten die Leber und invadieren die Hepatozyten. Innerhalb der Leberzelle laufen multiple, asexuelle Teilungen ab, die zur Entstehung von 10.000 bis 30.000 Merozoiten pro infiziertes Hepatozyt führen. Diese Phase dauert, abhängig von der *Plasmodium ssp.*, 2 - 10 Tage (für *P. falciparum* 5 – 6 Tage) und er-

möglicht den Wechsel vom Moskito-Vektor zum menschlichen Wirt. Die freigesetzten Merozoiten gelangen in die Blutbahn und dringen in die Erythrozyten ein, womit der sog. "erythrozytäre" Zyklus beginnt. Die intrazellulären Merozoiten sind zuerst ringförmig (Ring-Stadium) und wachsen über morphologisch unterschiedliche Trophozoiten-Stadien zum Schizonten heran. Nach mehreren Kernteilungen zerfällt der Schizont in 8 – 32 Merozoiten, die nach der Zerstörung der Erythrozytenmembran in der Blutbahn umgehend frische Erythrozyten infizieren. Dieser Zerfall, der mit Ausnahme vom P. falciparum synchron abläuft, wird von den pathophysiologischen Effekten begleitet, die sich durch die typische Fieberattacke äußern. Der intraerythrozytäre Zyklus dauert 48 Stunden mit der Ausnahme von der P. malariae Infektion, die durch einen 72-stündigen Zyklus gekennzeichnet ist. Um einen Wechsel zurück zu dem Moskito-Vektor zu ermöglichen, differenzieren einige Merozoiten zu den sexuellen Formen: Mikro- und Makrogamonten. Diese Geschlechtsformen können sich nicht im Menschen weiterentwickeln. Sie werden jedoch mit der nächsten Blutmahlzeit von einer weiblichen Anopheles Mücke aufgenommen, entwickeln sich im Moskitodarm zu Mikro- und Makrogameten und verschmelzen schließlich zu einem diploiden Ookineten (Zygote). Dieser durchbohrt die Magenwand, rundet sich ab und wächst an der Außenseite des Darmes zur Oozyste heran, in der sich die Sporozoiten bilden. Diese werden nach etwa zwei Wochen frei, wandern in die Speicheldrüse von Anopheles und können bei der nächsten Blutmahlzeit erneut den menschlichen Wirt infizieren.



Abbildung 1.1: Der Lebenszyklus von P. falciparum (nach Remane et al., 1985)

Da jede der verschiedenen Entwicklungsstadien ein Ziel für eine spezifische Immunantwort ist, kann diese auch gezielt durch einen Impfstoff induziert werden:

Ein Impfstoff gegen die sog. "prä-erythrozytären" Stadien sollte eine Immunantwort hervorrufen, die gegen die Antigene der von der Mücke injizierten Sporozoiten sowie gegen die Antigene der Leberstadien gerichtet ist. Dadurch wäre die Entwicklung zu den erythrozytären Stadien, die ausschließlich für die Krankheit verantwortlich sind, verhindert. Obwohl unterschiedliche Immun-Effektor-Mechanismen beteiligt sind, müsste der erzielte Immunschutz eine 100%-ige Effizienz erreichen; ein einziger Sporozoit, der diesen Mechanismus überleben würde, könnte Tausende von Merozoiten produzieren und damit den Schutz durchbrechen.

Obwohl gegen die erythrozytäre Formen gerichtete Impfstoffe möglicherweise einen völligen Immunschutz vermitteln könnten, wäre es bereits ein großer Fortschritt, wenn Krankheitssymptome reduziert oder verhindert werden könnten. Antikörper, die gegen Merozoiten gerichtet sind, könnten diese neutralisieren und die Invasion der Erythrozyten verhindern. Weiterhin ist es denkbar, dass infizierte Zellen lysiert werden oder dass zumindest ihre Sequestrierung (siehe unten) verhindert wird.

Ein weiteres Angriffsziel sind z. B. die Oberflächenantigene der sexuellen Stadien, d.h. der Gametozyten, Gameten und Zygote. Die Aufgabe des Impfstoffes auf der Basis solcher Antigene ist die Verhinderung der Malaria-Transmission durch den Moskito-Vektor. Diese Vakzine würde also altruistisch wirken; es entstünde kein Schutz in dem infizierten Individuum, sondern in der betroffenen Population.

Schließlich liegt ein vierter Ansatz in der Entwicklung von Impfstoffen, mit deren Hilfe die Vitalität bzw. Vektorkapazität der Moskitos reduziert werden könnte.

Ein idealer Malaria-Impfstoff würde gleichzeitig gegen mehrere Stadien eine Immunantwort hervorrufen. Deshalb werden Antigene der verschiedenen Stadien einzeln untersucht, um die wirkungsvollsten unter ihnen später in einem Mehrkomponentenimpfstoff zu kombinieren.

#### 1.2 Die Pathogenese einer P. falciparum Infektion

Während die Infektion mit den prä-erythrozytären Stadien meistens asymptomatisch verläuft, sind die asexuellen Blutstadien für die Krankheit und den Tod verantwortlich. Die Mechanismen der Malaria-Pathogenese sind noch nicht vollständig verstanden. Man erkennt verschiedene pathologische Muster (i) in Patienten, die in Gebieten mit niedriger Parasitemie leben, z. B. in Asien und Latein-Amerika. (ii) In kleinen Kindern in hoch endemischem Afrikas und (iii) in Föten afrikanischer Frauen während der ersten und der zweiten Schwangerschaft (Good *et al.*, 1998).

Fieberschübe und Schüttelfrost begleiten die schwere Form der Malaria. Diese Symptome treten zu dem Zeitpunkt der Erythrozyten-Ruptur auf und werden durch die Freisetzung der sog. "Malaria-Toxine" hervorgerufen, die ihrerseits die Zellen des Immunsystems zur vermehrten Produktion u. a. von Tumornekrosefaktor (TNF-) und Interleukin 1 (IL-1) stimulieren. Die Folge sind die immun-pathologischen Erscheinungen. TNF- spielt zusätzlich eine Rolle bei der Inhibition der Hämatopoese im Knochenmark und der Erythrophagozytose und trägt somit neben der direkten Zerstörung der Erythrozyten zu einer schweren Anämie bei (Clarke *et al.*, 1990; Jakobsen *et al.*, 1995).

Die Entwicklung der - wenn unbehandelt - meist tödlich endenden zerebralen Malaria wird ebenfalls von dem TNF- beeinflusst: In afrikanischen Kleinkindern (unter 5 Jahren) korrelieren die zirkulierenden TNF- Mengen mit dieser Form der Krankheit (Grau *et al.*, 1989). Die zerebrale Malaria wird jedoch primär durch die Sequestrierung der parasitierten Erythrozyten verursacht. Die Oberfläche der infizierten Zelle wird durch P. falciparum eigene Proteine so modifiziert, dass diese nun in der Lage sind, an Endothelzellen der inneren Organe (z. B. Hirn, Lunge, Leber und Niere) zu binden (für Übersicht siehe: Coppel et al., 1998a). Dank dieser Zytoadhärenz entgeht der parasitierte Erythrozyt der Eliminierung in der Milz (Howard and Gilladoga, 1989). Die molekulare Grundlage der Zytoadhärenz ist aufgeklärt und einige der Moleküle, die als Rezeptoren für die parasitierten Erythrozyten dienen, sind identifiziert, darunter CD36 (Oquendo et al., 1989), intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) (Berendt et al., 1989), vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1), E-Selektin (Ockenhouse et al., 1992), und Chondroitin-Sulfat A (Rogerson et al., 1995). Zusammen mit dem Phänomen der Rossettenbildung – einer Formation aus infizierten und nicht-infizierten Erythrozyten – ist dies die Hauptursache für die schwere zerebrale Malaria: Die Verstopfung der feinen Gehirnkapilaren, Blockierung der Blutzirkulation und lokale Entzündungsreaktionen führen zu schwersten neurologischen Symptomen und schließlich zu Koma und Tod. Weitere Todesursachen sind Nierenversagen, Hypoglykämie und Lungenödeme (Warrell, 1997).

Es sind also drei verschiedene Aspekte, die zu der klinischen Manifestation der Malaria führen: das exponentielle Wachstum der Parasiten in den Erythrozyten, die Modifikation der Erythrozytenoberfläche durch *P. falciparum* eigene Proteine und die begleitende Immunantwort gegen den Erreger.

#### 1.3 Malaria und die Entstehung einer Immunantwort

Bei vielen Infektionskrankheiten sowie viralen Infektionen reicht ein einmaliger Kontakt des Immunsystems des Wirtes mit dem Erreger, um eine lebenslange Immunität gegen eine erneute Infektion hervorzurufen. Solche sterile Immunität gibt es im Falle der Malaria nicht. Nach mehreren Jahren kontinuierlicher Konfrontation mit dem Erreger, in denen sowohl die Krankheit wie auch wiederholte Infektionen auftreten, entsteht eine nur teilweise effektive Immunität, bei der eine milde oder asymptomatische Form der Malaria, gekennzeichnet durch eine niedrige Parasitemie, zustandekommt. Als besonders gefährdet gelten schwangere Frauen, bei denen eine Immunosupression auftritt (Wegmann *et al.*, 1993) und Kinder, jünger als 5 Jahre, die keine mütterlichen Antikörper mehr haben und noch keinen eigenen Schutz entwikkelt haben (Marsh, 1993). Die natürlich gewonnene Immunität ist sehr kurzlebig und da ein regelmäßiger Kontakt mit dem Parasiten die Voraussetzung für ihr Bestehen ist (Hoffman *et al.*, 1987), wird sie nur bei der "semi-immunen" Population in den endemischen Gebieten beobachtet (Taylor-Robinson, 2000).

Der Unterschied zwischen der Immunität gegen eine bakterielle oder virale Infektion und Malaria kann auf den komplexen Lebenszyklus der *Plasmodium ssp.* zurückgeführt werden (Ramasamy, 1998). Das *P. falciparum* Genom enthält geschätzte 6000 – 7000 Gene, und viele der Antigene werden nur in einem spezifischen Lebenszyklus-Stadium produziert. Die immunologischen Mechanismen, die gegen die einzelnen Stadien gerichtet sind, wurden in den letzten Jahren teilweise aufgeklärt. Man unterscheidet prinzipiell zwischen einer Immunantwort gegen die prä-erythrozytäre und die erythrozytäre Stadien (Abbildung: 1.2).



Abbildung 1.2: Immunantwort gegen die verschiedenen Stadien des Plasmodium Parasiten (modifiziert nach Good and Doolan, 1999)

Die Tatsache, dass eine Immunisierung mit bestrahlten Sporozoiten eine sterile Immunität induzieren kann (Clyde *et al.*, 1975; Clyde *et al.*, 1973; Nussenzweig *et al.*, 1969; Rieckmann *et al.*, 1979), führte zu einer Fokussierung auf die durch die Sporozoiten und Leberstadien

induzierte Immunantwort (für Übersicht siehe: Hoffman, 1996a). Zuerst war man der Ansicht, dass vor allem neutralisierende Antikörper, die gegen die Sporozoiten-Antigene gerichtet sind, die protektive Rolle spielen und die Infektion der Leberzellen verhindern (Nussenzweig and Nussenzweig, 1989). Gegen eine rein humorale Immunantwort spricht die Tatsache, dass die Sporozoiten nur eine sehr kurze Zeit (2 – 30 Minuten) nach der Infektion für die Antikörper in der Blutbahn zugänglich sind; d.h. solche Antikörper müssten sehr effektiv und in einem hohen Titer zum Zeitpunkt der Infektion vorhanden sein. Mittlerweile wird allgemein akzeptiert, dass das *Plasmodium* Stadium innerhalb des Hepatozyten das Hauptziel des schützenden Immunmechanismus ist. Sowohl CD8<sup>+</sup> wie auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennen Peptide parasitären Ursprungs, die zusammen mit der MHC Klasse I und II Molekülen auf der Oberfläche der infizierten Leberzelle präsentiert werden (Hoffman, 1996b). Trotzdem ist die Protektion hauptsächlich auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellen zurückzuführen (Doolan *et al.*, 1996a) und sowohl Interferon- (IFN- ) wie auch Nitritoxid, Interleukin-12 (IL-12) und natürliche Killerzellen (NK) sind an diesem Mechanismus beteiligt (Good and Doolan, 1999).

Die Immunantwort gegen die asexuellen, erythrozytären Stadien ist gleichzeitig gegen mehrere Antigene gerichtet: Es sind zum einen die Antigene auf der Oberfläche des Merozoiten (Berzins, 1996) und zum anderen die sog. "Neoantigene" an oder auf der Oberfläche des infizierten Erythrozyten, die für die Zytoadhärenz und Rosettenbildung verantwortlich sind (Coppel *et al.*, 1998a).

Bereits das klassische Experiment von Cohen et al., (Cohen et al., 1961), in dem eine schützende Immunantwort durch den passiven Transfer von -Globulin von immunen Erwachsenen auf Kinder mit akuter Parasitemie erzielt werden konnte, belegt die Effektivität einer humoralen Immunantwort. Da jedoch die Analyse der Immunantwort im Menschen dank ihrer Komplexität sehr schwierig ist, stammen die meisten Daten aus Immunisierungsexperimenten in Tiermodellen. Diese zeigen, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die die Produktion von Antikörpern stimulieren, die Parasitemie unter Kontrolle halten können; jedoch ist der Beitrag der humoralen und der zellulären Immunantwort bei verschiedenen Plasmodium ssp. unterschiedlich (Good and Doolan, 1999). So wird z. B. eine Immunität gegen P. chabaudi Maus-Malaria hauptsächlich durch eine zelluläre Immunantwort, die gegen P. yoleii Maus-Malaria durch eine humorale Immunantwort vermittelt. Zusammenfassend haben solche Studien belegt, dass sowohl Antikörper wie auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen (und zwar als Effektor- und als Helper-Zellen) T-Zellen an der Entwicklung einer schützenden Immunantwort auch beim Menschen und maßgeblich beteiligt sind (Berzins, 1996). Die Rolle der CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der P. falciparum Infektion ist noch nicht im Detail verstanden worden, obwohl man zeigen konnte, dass diese Zellen das Wachstum des Parasiten in vitro inhibieren (Fell et al., 1994).

#### 1.4 Wie realistisch ist ein Impfstoff gegen Malaria?

Obwohl keine natürliche, sterile Immunität gegen Malaria induziert werden kann, beweisen unzählige Feldstudien sowie Immunisierungsversuche in Tiermodellen und mit Freiwilligen, dass die Hypothese eines effektiven Impfstoffes gegen Malaria berechtigt ist. Folgende Tatsachen sind der Anlass zum Optimismus:

(i). Der bereits erwähnte, passive Transfer von Seren Erwachsener mit erworbener Immunität auf akut erkrankte Kinder führt sowohl zu der Abnahme der Parasitemie als auch zum Rückgang der Krankheitssymptome (Cohen et al., 1961; Sabchareon *et al.*, 1991).

(ii). Immunisierung von Mäusen und von Freiwilligen mit lebenden, durch Bestrahlung attenuierten Sporozoiten schützt vor einer Infektion und induziert eine sterile Immunität gegen die prä-erythrozytären Stadien (für Übersicht siehe: Hoffman, 1996a; Sinnis and Nussenzweig, 1996).

(iii). Immunisierung von Affen mit einem Gemisch aus inaktivierten *P. knowlesi* Merozoiten und Freund'schem Adjuvans induziert eine schützende Immunantwort, die sich effizienter erwies als die nach einer natürlichen Infektion (Mitchell *et al.*, 1975).

(iv). Schließlich ist es die Tatsache, dass die Menschen in endemischen Gebieten nach wiederholten Infektionen eine Immunität entwickeln können; Immune ältere Kinder sowie Erwachsene haben zwar eine Blutstadien-Infektion, bleiben in der Regel aber asymptomatisch. Man misst also die Immunität durch das Ausbleiben der Krankheit und nicht durch die Resistenz gegenüber einer neuen Infektion. In diesem Sinne ist es das Ziel einer Vakzine nicht vor der Infektion, sondern vor der Krankheit zu schützen (Miller and Hoffman, 1998).

Die Suche nach einem geeigneten Malaria Impfstoff ist jedoch auch weiterhin mit Problemen verbunden, die sich nicht auf ein bestimmtes Antigen beschränken. Im Wesentlichen sind es folgende Hindernisse:

(i). Die Ergebnisse der *in vitro* Experimente korrelieren oft nicht mit den Daten aus den Versuchen *in vivo*.

Die Identifikation und Erprobung von Impfstoff-Kandidaten wird durch das Fehlen geeigneter *in vitro* Testsysteme erheblich erschwert. So wird z. B. die Fähigkeit der Antikörper, eine Invasion von Hepatozyten durch die Sporozoiten zu verhindern, in dem sog. Sporozoiten-Invasion inhibierenden Assay (ISI) vermittelt (Hollingdale *et al.*, 1987); dieser Ansatz basiert jedoch auf lebendigen, aus der Speicheldrüse des Moskitos frisch isolierten Sporozoiten und ist deshalb mit technischen Schwierigkeiten verbunden. Druilhe und Mitarbeiter entwickelten eine Methode, in der die Fähigkeit der Antikörper, die Invasion der Erythrozyten durch Merozoiten bzw. die Entwicklung der Ring-Stadien zu inhibieren, gemessen wird, sog. "Antikörper abhängige, zelluläre Inhibierung" (ADCI) (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990); dabei führt die Zugabe von Monozyten zu dem Ansatz zum Abtöten der Parasiten. Darüber hinaus können Antigene auf ihre Stimulation der T-Zell Proliferation untersucht werden, doch ebenso proli-

ferieren T-Zellen von Personen, die nie mit *Plasmodium ssp.* infiziert waren (Zevering *et al.*, 1992).

(ii). Es stellt sich die Frage, in wieweit die Experimente in Tiermodellen auf den Menschen übertragen werden können.

Die Übertragbarkeit von Experimenten mit Labormäusen, die mit einer Nager-Malaria *wie P. yoleii, P. berghei* oder *P. chabaudi* infiziert worden sind, auf den Menschen, ist fraglich. *P. yoleii* und *P. berghei* invadieren z. B. im Gegensatz zu *P. falciparum* vorwiegend Retikulozyten (Shear, 1993). Die Maus-Erythrozyten besitzen zudem die für eine zytotoxische T-Zell Antwort benötigten MHC Klasse I Moleküle.

Abgesehen von den Schimpansen, die für Malaria Studien nicht verwendet werden, lassen sich noch die *Saimiri* und die *Aotus* Affen mit *P. falciparum* infizieren. Die *Saimiri* Affen müssen jedoch zuvor splenektomiert werden, und so gelten die *Aotus* Affen, genauer gesagt die *Aotus lemurinus griseimembra* mit dem Karyotyp II und III als das beste Tiermodell zum Studium einer Immunantwort, die mit der humanen Immunantwort vergleichbar ist (WHO, 1988). Doch auch bei diesen Affen verursachen nur einige *Plasmodium* Stämme nach einem längeren Adaptationsprozess reproduzierbare und in ihrer Virulenz kontrollierbare Infektionen.

Immunisierungsexperimente mit Freiwilligen sind letztendlich das beste Modell, obwohl auch hier einige Kompromisse eingegangen werden müssen. Während man bei einem humanen Experiment mit Sporozoiten-Impfstoff sofort nach dem Auftauchen der ersten Parasiten in der Blutbahn den Versuch abbrechen kann, muss bei einem Immunisierungsversuch mit einem Blutstadien-Impfstoff der Effekt der Immunisierung auf die Entwicklung der Parasitemie festgestellt werden. Wegen der Gefahr der schnellen Entstehung komatöser Zustände mit Todesfolge müssen solche Experimente jedoch bereits bei 0,05%-igen Parasitemie abgebrochen werden. Viele Impfstoffe, die zu einem späteren Zeitpunkt kontrollierend wirken und damit die Morbidität und Mortalität senken könnten, fallen durch dieses Raster (Institute of Medecine, 1991).

(iii). Das Fehlen von geeigneten Adjuvantien oder Trägersystemen für den Impfstoff behindert einen raschen Fortschritt.

Die Adjuvans-Frage ist noch nicht geklärt (siehe auch unten). Für die Mehrzahl der Experimente wurde das komplette Freund'sche Adjuvans verwendet, das aber wegen seiner umfangreichen Nebenwirkungen, wie z. B. der Bildung von Granulomen, Induktion von Autoimmunreaktionen und Plasmazelltumorbildungen für Studien im Menschen nicht in Frage kommt (Siddiqui *et al.*, 1978a). Da schon zwischen den verschiedenen Tierarten identische Adjuvantien unterschiedliche Wirkung haben, ist die Übertragbarkeit der Studien auf den Menschen ebenfalls schwierig. Als eine Alternative wird die Verwendung von verschieden Trägerorganismen bzw. die Immunisierung mit der den Antigen kodierenden Plasmid-DNA verfolgt (siehe auch unten; für Übersicht siehe (Taylor-Robinson, 2000). Einige rekombinante Lebendvakzinen wurden bereits experimentell untersucht, so z. B. *Salmonella typhimurium*  (Hohmann *et al.*, 1996), *Mycobacterium bovis* (Fuerst *et al.*, 1992), oder *Vaccinia* Viren (Ulaeto and Hruby, 1994).

(iv). Antigene Diversität und die Fähigkeit der *Plasmodien*, dem Immunsystem des Wirtes auszuweichen, erschweren ebenfalls die Entwicklung.

Nicht zuletzt stellt auch die hohe genetische Plastizität der Plasmodien ein Hindernis bei der Entwicklung des Malaria-Impfstoffes dar, die sich u. a. in dem Polymorphismus vieler Antigene äußert (Übersicht: Good et al., 1998). Häufig finden sich Abschnitte mit repetitiven Aminosäuresequenzen, die sich von Isolat zu Isolat unterscheiden. Die Rolle dieser Wiederholungssequenzen ist umstritten; zum einem werden sie als Liganden für die Rezeptoren der Wirtszellen angesehen, zum anderen könnte es sich um einen Immunevasionsmechanismus handeln, durch den der Wirt seine Immunantwort gegen weitgehend funktionslose Bereiche des Moleküls richtet. Sicher ist, dass diese "repeat"-Regionen die humorale Immunantwort besonders gut stimulieren, und dass bestimmte Aminosäuren vorzugsweise vorhanden sind. Die experimentell eindeutig nachgewiesene Rekombination (Walliker et al., 1987) führt im Zusammenhang mit diesem Antigenpolymorphismus zu einer "allelen Variation" und es wird angenommen, dass der immunologische Druck für die Selektion der natürlichen Varianten verantwortlich ist. Um dieses Problem zu umgehen, können zwei verschieden Strategien verfolgt werden: entweder alle bekannten, allelspezifischen Sequenzen des Antigens in einem Impfstoff zu kombinieren oder sich auf Epitope zu konzentrieren, die nicht polymorph sind. Obwohl konservierte Regionen nur selten immunogen sind, kann eine gegen diese Epitope gerichtete Immunantwort durchaus effizient sein (Sercarz et al., 1993). Handelt es sich hierbei z. B. um sog. kryptische T-Zell Epitope, ist es denkbar, dass diese in dem Kontext des Gesamtproteins nicht erkannt werden und deshalb auch nicht unter einem Druck des Immunsystems stehen und konserviert sind; werden sie nun jedoch in der Form von Peptiden präsentiert, sind sie in der Lage die T-Zell Proliferation zu induzieren.

Im Folgenden soll auf einige wichtige Arbeiten zur Impfstoffentwicklung gegen präerythrozytäre und erythrozytäre Stadien eingegangen werden. Die dritte Alternative – nämlich die Entwicklung einer die Transmission blockierenden Vakzine – soll nur kurz mit dem Verweis auf die entsprechenden Übersichtsartikel (Engers, 1998; Kaslow, 1996) kommentiert werden. Ein solcher Impfstoff soll die Produktion von Antikörpern induzieren, die den Lebenszyklus in dem Moskito unterbrechen. Mehrere Antigene der sexuellen Stadien wurden bezüglich ihres Immunisierungspotentials getestet, so vor allem das *P. falciparum* Oberflächenantigen P25 (Pfs 25), und zur Zeit sind neue Formulierungen für Feldstudien in Vorbereitung (Carter *et al.*, 2000).

#### 1.4.1 Ein Impfstoff gegen prä-erythrozytäre Stadien

Da eine Immunisierung mit bestrahlten Sporozoiten zwar vor einer Infektion schützt aber in größerem Maßstab nicht möglich ist, konzentrierte man sich auf die Suche von Antigenen, die einen vergleichbaren Schutz vermitteln könnten. Das erste Protein, das molekulargenetisch zugänglich und seitdem bezüglich seines Immunisierungspotentials ausgiebig untersucht wurde, ist das Circumsporozoiten-Protein (CSP) aus P. falciparum (Dame et al., 1984). Nachdem in Tiermodellen die schützende Wirkung von Antikörpern und Lymphozyten gegen das CSP gezeigt werden konnte (Charoenvit et al., 1991; Egan et al., 1987; Romero et al., 1989), wurden sowohl mit rekombinanten (Ballou et al., 1987) wie auch mit synthetischen (Herrington et al., 1987) CSP-Vakzinen klinische Immunisierungsstudien im Menschen durchgeführt. Diese Antigenpräparationen, mit Aluminiumhydroxid als Adjuvans, waren nicht besonders immunogen, und es wurde nur ein limitierter Schutz erreicht. Es folgten etwa 20 weitere, auf dem CSP basierende, klinische Studien (Phase I und II), ebenfalls mit einem begrenzten Erfolg. Mit einer neuen Formulierung des Antigens und unter Verwendung von komplexeren Adjuvantien konnte die Immunogenität gesteigert werden: die Immunisierung mit dem rekombinanten CSP, fusioniert mit dem S-Antigen des Hepatitis B Viruses (RTS,S) und formuliert im SBAS4 Adjuvans, induzierte einen hohen Antikörpertiter und schützte sechs von sieben immunisierten Freiwilligen vor der Infektion mit Sporozoiten (Stoute et al., 1998). Freiwillige, die mit RTS,S mit einem anderen Adjuvans immunisiert wurden, produzierten zwar eine vergleichbare Menge an Antikörpern, wurden jedoch nicht geschützt. Unter der Verwendung von Aluminiumhydroxid als Adjuvans wurde weder ein hoher Antikörpertiter noch ein Schutz gegen die Sporozoiten-Infektion erreicht. Ausgehend von diesem Experiment und Daten anderer scheint es also, dass ein hoher Antikörpertiter zwar notwendig, jedoch nicht ausreichend für die Protektion ist (Hoffman, 1996a).

Es wurden weitere, stadiumspezifische Antigene identifiziert (z. B. "sporozoit surface protein 2" SSP2: "liver stage antigen 1 und 3" (LSA-1 und 3), die ebenfalls ein Ziel einer schützenden Immunantwort sind (Übersicht siehe: Hoffman, 1996a). Keines dieser Antigene wurde bisher in einer Feldstudie bezüglich seines Immunisierungspotentials getestet.

Die Forschung konzentrierte sich auch auf die Entwicklung eines Impfstoffes, der in Menschen eine schützende, CD8+ T-Zell vermittelte Immunantwort induzieren würde, die als der dominante Immun-Effektor-Mechanismus gegen die prä-erythrozytäre Stadien postuliert wurde (siehe 1.3). Intramuskuläre Immunisierung mit rekombinanten, attenuierten Vaccinia Viren, die sieben verschiedene, leberspezifische Antigene exprimieren (NYVAC-Pf7), induzierte in einer klinischen Studie der Phase I und IIa zwar eine bescheidene zytotoxische T-Zell-Aktivität, aber eine minimale Protektion (Ockenhouse *et al.*, 1998). Eine Alternative ist die DNA-Immunisierung (für Übersicht siehe (Donnelly *et al.*, 1997), bei der die leberspezifische Antigene in Form von Plasmid DNA verwendet wurden. Solche Immunisierugsversuche in Mäusen resultierten in einer schützenden Immunantwort (Doolan et al., 1996a; Sedegah *et*  *al.*, 1994) und führten zu der Hoffnung, dass eine DNA-Immunisierung auch im Menschen die Protektion vermitteln kann (Hoffman *et al.*, 1997). Bisher konnte jedoch nur gezeigt werden, dass die Immunisierung von "naiven" Freiwilligen mit CSP kodierender Plasmid-DNA zu einer Induktion von Antigen spezifischen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedingter, zytotoxischer Immunantwort führen kann (Wang *et al.*, 1998).

#### 1.4.2 Ein Impfstoff gegen erythrozytäre Stadien

Wie bereits erwähnt, sind die asexuellen, erythrozytären Stadien das Ziel einer schützenden Immunantwort. Dies belegten die Resultate von passivem Transfer von immunen IgG, sowie auch die Befunde, denen zufolge eine experimentelle Immunisierung im Tiermodell eine Immunantwort induziert, die effektiver ist als die natürlich erworbene. Schließlich ist belegt, dass die Menschen in endemischen Gebieten eine "semi-Immunität" gegen die Blutstadien entwickeln können (siehe oben).

Die ersten Kandidaten für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen die erythrozytären Stadien wurden mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern identifiziert, die die Invasion *in vitro* inhibierten. Die Situation bei individuellen, asexuellen Antigenen, die mittlerweile als ein Impfstoff-Kandidat deklariert und in Immunisierungsstudien in Mäusen und Affen eingesetzt wurden, ist im Prinzip unüberschaubar geworden. Die Tabelle 1 erlaubt eine Übersicht über die wichtigsten Antigene der erythrozytären Stadien, die zur Zeit bezüglich ihres Immunisierungspotentials untersucht werden (Berzins, 1996; Taylor-Robinson, 2000).

Die Immunantwort richtet sich zu einem gegen die "Neoantigene" auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten (z. B. gegen PfEMP-1 und Pf332). Eine Immunisierung gegen solche Proteine könnte insbesondere die zerebrale Malaria verhindern und die Eliminierung der infizierten Erythrozyten durch die Milz fördern.

Zum anderen entsteht eine Immunantwort gegen die mit der Oberfläche des Merozoiten assoziierten Antigene. Dazu gehören die zwei viel versprechenden Kandidaten: Das apikale Merozoiten Antigen 1 (AMA-1) und das Merozoiten Oberflächenprotein 1 (MSP-1). Das AMA-1 ist in den Rhoptrien lokalisiert und kann nach der Ruptur des reifen Schizonten auf der Oberfläche des freien Merozoiten identifiziert werden (Narum and Thomas, 1994). Obwohl seine biologische Funktion nicht bekannt ist, nimmt man an, dass es bei der Invasion eine wichtige Rolle spielt. Diese Vermutung wird durch die Tatsache verstärkt, dass ein passiver Transfer von spezifischen anti-AMA-1 Antikörpern in *P. chabaudi* infizierter Maus bzw. in *P. knowlesi* infiziertem Affen zu einer schützenden Immunreaktion führt (Deans, 1984; Narum and Thomas, 1994; Thomas *et al.*, 1984). Zusätzlich schützt eine Immunisierung mit rekombinantem AMA-1 sowohl im Maus- als auch im Affenmodell vor einer Infektion mit den jeweiligen Blutstadien (Anders *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 1994; Crewther *et al.*, 1996; Deans *et al.*, 1988). Das Immunisierungspotential des MSP-1 Antigens wird im Detail in dem nächsten Kapitel 1.4 besprochen.

Schließlich richtet sich die Immunantwort auch gegen die "Exoantigene", also lösliche Proteine, die während der Ruptur der Erythrozyten ins Medium bzw. ins Plasma der infizierten Individuen abgegeben werden (z. B. HRP-2). Eine Immunisierung an der Basis solcher Moleküle könnte den Parasiten beeinträchtigen, wenn es sich um Substanzen handelt, die aus funktionellen Gründen abgegeben werden.

Antigen	MW(kDa)	Lokalisation	Funktion	Referenz
PfEMP1	250-300	RBC Oberfläche	Zytoadhärenz	(Baruch et al., 1995); (Su et al., 1995)
Pf332	750	RBC Oberfläche	NB	(Mattei et al., 1992)
Rosettin	22	RBC Oberfläche	Rosetting	(Helmby et al., 1993); (Wahlgren, 1994)
MSP-1	185-220	Mer. Oberfläche	NB	(Holder et al., 1985)
MSP-2	45	Mer. Oberfläche	NB	(Smythe et al., 1991)
SERP	113 o. 126	PV	Proteinase	(Delplace et al., 1987); (Knapp et al.,
				1989)
GLURP	220	PV	NB	(Borre et al., 1991)
RESA/Pf155	155	DG, RBC Skellet	NB	(Berzins et al., 1991); (Foley et al.,
				1991), (Ruangjirachuporn et al., 1992)
AMA-1	80	Rhoptrien	NB	(Peterson et al., 1989)
HRP-2	65-85	sekretorisch	NB	(Howard, 1988)

### Tabelle 1: Antigene der erythrozytären P. falciparum Stadien, die zur Zeit als ein Kandidat für die Entwicklung eines Mehrkomponentenimpfstoffes angesehen werden

Diese Tabelle erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Abkürzungen: PfEMP-1: "P. falciparum erythrocyte membrane Protein 1"; Pf332: "P. falciparum Antigen 332";

MSP-1 und 2: "merozoite surface protein 1 und 2"; SERP: "serin rich protein"; GLURP: "Glutamate rich protein"; RESA: "ring-infected erythrocyte surface antigene"; AMA-1: "apical merozoite antigene 1"; HRP-2: "histidine rich protein 2".

NB: nicht bekannt; RBC: "red blood cell" (Erythrozyt); PV: parasitophore Vakuole; Mer.: Merozoit; DG: Dichte Granula; MW: Molekulargewicht.

### 1.5 Das MSP-1 aus P. falciparum – ein vielversprechender Impfstoff-Kandidat

Das MSP-1 ist das Hauptoberflächenprotein von *Plasmodium* Merozoiten, dessen Homologe in allen soweit untersuchten *Plasmodium ssp.* identifiziert werden konnten. Die gesamte Kodierungssequenz ist für mehrere *P. falciparum* Isolate (Chang *et al.*, 1988; Holder *et al.*, 1985; Howard, 1988; Mackay *et al.*, 1985; Myler, 1989; Peterson *et al.*, 1988; Tanabe *et al.*, 1987; Weber *et al.*, 1986; Weber *et al.*, 1988) und *P. vivax* Isolate (del Portillo *et al.*, 1991; Gibson *et al.*, 1992) sowie für die Nager-Malaria Arten *P. yoleii* (Lewis, 1989), *P. chabaudi* (Deleersnijder *et al.*, 1990; McKean *et al.*, 1993) und *P. berghei* (Jennings *et al.*, 1998) bekannt.

Sequenzvergleiche zwischen den Genen mehrerer Laborstämme von *P. falciparum* führten dazu, dass Tanabe (Tanabe *et al.*, 1987) eine Blockstruktur des MSP-1 postulierten, die auf der Unterscheidung von hoch, mittel und schwach konservierten Abschnitten beruht (Abb.: 1.3).



Abbildung 1.3 Die Blockstruktur des MSP-1 aus P falciparum nach Tanabe (Tanabe et al., 1987) Der Grad der Konservierung (in % angegeben) bezieht sich auf einen Vergleich aller Sequenzen: H: hoch konserviert; M: mittel; N: niedrig. Die Striche zeigen die Rekombinationsorte an.

Die Struktur von MSP-1 wird aufgrund der Existenz von zwei unterschiedlichen Prototypen, die nach den repräsentativen Isolaten K1 und MAD20 benannt werden, als dimorph bezeichnet. Insgesamt unterscheidet Tanabe 17 Blöcke. Block 1 ist ein konservierter Bereich, dessen 19 aminoterminale Aminosäuren als Signalpeptidsequenz erkannt werden. Block 2 ist die einzige Ausnahme zu dem an sich strikten Dimorphismus; es existiert eine dritte Form, die ursprünglich in dem RO33 Isolat gefunden wurde (Peterson et al., 1988). Block 2 der beiden K1 und MAD20 Prototypen enthält die einzige "repeat"-Region des Proteins; die Aminosäuresequenz der Isolate RO33 und CSL-2 ist nicht repetitiv (Certa et al., 1987; Peterson et al., 1988a). Block 3 enthält einen stark konservierten Bereich, in dem nur einzelne Aminosäuren ein dimorphes Bild zeigen. Von Block 4 existieren drei verschiedene Sequenztypen. Die Blöcke 5-16 zeigen sowohl auf der DNA als auch auf der Proteinebene den typischen Dimorphismus. Mit heutigem Wissen lässt sich feststellen, dass nur der Block 2 im eigentlichen Sinne polymorph ist, was das Molekül zu einem interessanten Immunogen macht. Ob der Dimorphismus eine funktionelle Rolle spielt, etwa in Form einer Bindung an alternative Rezeptoren auf der Erythrozytenoberfläche (Deleersnijder et al., 1990; Mackay et al., 1985; Tanabe et al., 1987) oder ob es sich um einen Immunevasionsmechanismus handelt (Mackay et al., 1985; Tanabe et al., 1987) konnte noch nicht endgültig geklärt werden. Block 17 ist der stark konservierte C-Terminus des Moleküls. Er enthält 12 Cysteine, die Disulfidbrücken ausbilden, protektive Epitope mehrerer monoklonaler Antikörper und zwei EGF-ähnliche Domänen (Blackman *et al.*, 1991a). Die Blöcke 1, 3, 5, 7, 9, 12 und 17 sind sogar zwischen den verschiedenen *Plasmodium ssp.* gut konserviert (Cooper, 1993).

Obwohl das MSP-1 als ein Vorläuferprotein bereits in dem Leberstadium nachgewiesen werden kann, findet die Synthese hauptsächlich im späten Trophozoiten und im Schizonten statt. Das Protein wird auf verschiedene Weise posttranslational modifiziert (Holder, 1988a). Das N-terminale Signalpeptid wird nach der Translokation ins Endoplasmatische Retikulum proteolytisch abgespalten. Entgegen früheren Befunden (Dieckmann-Schuppert *et al.*, 1994; Pirson and Perkins, 1985) wird das Protein neuen Untersuchungen aus dem Labor von Dr. R. Schwarz zufolge – mit Ausnahme des Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Ankers (GPI-Ankers) – nicht glykosyliert (Dr. R. Schwarz, persönliche Mitteilung). Das Protein wird jedoch myrestyliert (Haldar *et al.*, 1985). Schließlich wird die C-terminale, hydrophobe Ankersignalsequenz abgespalten, durch den vorsynthetisierten GPI-Anker, dessen Struktur aufgeklärt wurde (Gerold *et al.*, 1996), ersetzt und auf der Plasmamembran verankert.

Wie bereits erwähnt, wird das MSP-1 als ein Vorläuferprotein mit dem Molekulargewicht von etwa 190 kDa synthetisiert (Holder and Freeman, 1982). Zum Ende der Schizogonie findet die primäre Prozessierung statt, bei der die vier Hauptfragmente entstehen: p83, p30, p38 und p42 (Nomenklatur nach Stafford et al., 1994). Diese Polypeptide sind in einem nicht kovalenten Komplex assoziiert, das durch das carboxyterminale p42 Fragment über den GPI-Anker in der Oberfläche verankert ist. Dieser Komplex besteht außer den MSP-1 eigenen Prozessierungsprodukten aus zwei weiteren Proteinen, p22 und p36 (McBride et al., 1982); soweit konnte nur das 22 kDa große Protein charakterisiert werden (Stafford et al., 1996). Während der Invasion der Erythrozyten findet die sekundäre Prozessierung statt (Blackman et al., 1991a; Blackman et al., 1991), bei der das p42 weiter gespalten wird: das N-terminale p29 bleibt weiterhin mit dem Komplex assoziiert und wird mit ihm zusammen aus der Oberfläche des Merozoiten entfernt (siehe Abb. 1.4). Das C-terminale p19 ist nach wie vor in der Plasmamembran verankert und kann in dem frisch infizierten Erythrozyten nachgewiesen werden (Blackman et al., 1990). Diese sekundäre Prozessierung ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Invasion; Antikörper, die diesen Schritt inhibieren, blockieren gleichzeitig die Invasion (Blackman et al., 1994). Die postulierten Proteasen, die diese Prozessierung katalysieren, wurden noch nicht identifiziert (Blackman et al., 1993; Cooper and Bujard, 1992a).

Endgültige Beweise, welche die Funktion des MSP-1 experimentell belegen würden, wurden noch nicht erbracht. Die Lokalisierung des Proteins auf der Oberfläche der Merozoiten und die invasionsinhibierende Wirkung monoklonaler Antikörper liefern Hinweise auf eine mögliche Rolle des MSP-1 bei der Erkennung und/oder Invasion von Erythrozyten (siehe Abschnitt 1.6).

Die Tatsache, dass das MSP-1 eine schützende Immunantwort gegen die *Plasmodium ssp.* Infektion in allen getesteten Tiermodellen induzieren kann, machte aus diesem Antigen im Laufe der letzten Jahre den führenden Kandidaten für die Entwicklung eines Malaria Impfstoffes gegen die erythrozytäre Stadien.

Als erstes wurde das MSP-1 Homolog gp230 aus *P. yoleii* identifiziert. Das aus den Merozoiten gereinigte Protein konnte in dem Mausmodell eine schützende Immunantwort induzieren (Holder and Freeman, 1981). Genauso vermittelte ein Transfer von monoklonalen Antikörpern gegen die jeweiligen MSP-1 Analoga einen Schutz gegen die Infektion in Mäusen (Holder and Freeman, 1981; Lew *et al.*, 1989; Ling *et al.*, 1997; Majarian *et al.*, 1984). *In vitro* wirkten MSP-1 spezifische Antikörper sowohl aus den Mäusen (Cooper *et al.*, 1992b) als auch aus dem Menschen (Brown *et al.*, 1986) invasionsinhibierend.

In Immunisierungsversuchen mit immunaffinitätsgereinigtem MSP-1 Protein in *Saimiri* und *Aotus* Affen konnte ein partieller Schutz gegen die sonst letale *P. falciparum* Infektion erzielt werden (Etlinger *et al.*, 1991; Perrin *et al.*, 1984). Das bis jetzt erfolgreichste Experiment ist die Immunisierung von *Aotus* Affen mit nativem MSP-1 Protein, bei dem alle drei Affen eine sterile Immunität entwickelten (Siddiqui *et al.*, 1987).

Die meisten Immunisierungsstudien wurden mit rekombinanten MSP-1 Fragmenten oder synthetischen Peptiden durchgeführt, da eine stabile Expression des Proteins in seiner vollen Länge in heterologen Expressionssystemen bis vor kurzem nicht möglich war (Sandhu and Kennedy, 1994). Die Forschung konzentrierte sich v. a. auf den konservierten C-Terminus des Proteins bzw. auf das Immunisierungspotential der Fragmente p42 und p19. So konnten Mäuse erfolgreich sowohl mit einem aus E. coli gereinigtem MSP-19 Protein, das mit Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert wurde (Daly and Long, 1993; Ling et al., 1994; Tian et al., 1996), als auch mit einem in Saccharomyces cerevisiae produziertem MSP-19 immunisiert werden (Hirunpetcharat et al., 1997). Ähnliche Immunisierungsstudien im Affenmodell erfolgten weniger erfolgreich (Etlinger et al., 1991; Herrera et al., 1992; Herrera et al., 1990; Holder et al., 1988). So wurde z. B. einer aus zwei verschiedenen Aotus Stämmen nach einer Immunisierung mit dem in Hefe exprimierten MSP-19 geschützt (Kumar et al., 1995). Die Wiederholung dieses Experiments zeigte, dass ein in Baculovirus exprimiertes MSP-42 eine schützende Immunantwort induzieren konnte (Chang et al., 1996), während ein aus E. coli gereinigtes MSP-42 bzw. MSP-19 (als Fusionsprotein mit GST) keine protektive Wirkung vermittelte (Burghaus et al., 1996; Kumar et al., 1995).

Auch im *Aotus* Immunisierungsmodell spielt das Adjuvans eine entscheidende Rolle bei der Induktion einer schützenden Immunantwort: ein MSP-19, exprimiert in *S. cerevisiae* als Fusion mit den universellen T-Helper-Zellen Epitopen des Tetanustoxoids (P30 und P2) induziert nur in der Kombination mit Freund´schem komplettem Adjuvans (FCA) eine Immunität (Kumar *et al.*, 2000). In Verbindung mit sechs weiteren Adjuvantien, die für humane Versuche verwendet werden könnten, wurde keine Protektion erzielt und nur ein reduzierter Antikörpertiter erreicht. Das schützende Potential dieses Fusionsproteins – ebenfalls in Kombination mit FCA – wurde auch von Egan (Egan *et al.*, 2000) beschrieben. In mehreren Studien, in denen die Seren von Erwachsenen aus endemischen Gebieten analysiert wurden, konnte eine Korrelation von erworbener Immunität mit einem hohen anti-MSP-1 Antikörpertiter festgestellt werden (Müller *et al.*, 1989; Riley *et al.*, 1992; Riley *et al.*, 1993). Solche humorale Immunantwort ist gerade bei den Kindern relativ kurzlebig, d.h. nach dem Beenden der saisonalen Malaria-Transmission fallen die Antikörpertiter ab (Früh *et al.*, 1991; Müller, 1989). Auch auf diesem Gebiet konzentriert sich die Mehrheit der Studien auf die Analyse des Antikörpertiters gegen das MSP-19, der ebenfalls – in den meisten Fällen – mit der Protektion gegen die klinische Malariafälle korreliert (Egan *et al.*, 1995; Egan *et al.*, 1996). Kontrovers dagegen sind die Berichte über die IgG Isotypen, die bei einer schützenden Immunantwort in den Seren solcher Personen vorwiegend identifiziert wurden. Den meisten Studien zufolge sind es die zytophilen Isotypen IgG1 und IgG3 (Aribot *et al.*, 1996; Bouharoun-Tayoun and Druilhe, 1992; Egan *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu berichten Aucan (Aucan *et al.*, 2000) von einer Korrelation zwischen einem hohen IgG2/IgG3 Titer und der Protektion. Allerdings sind die jeweiligen dominierenden Isotypen von dem Alter der getesteten Personen abhängig.

Mittlerweile wurde die Immunogenität eines auf dem MSP-1 Antigen basierenden Impfstoffes in mehreren humanen Feldstudien der Phase I uns II bestätigt (für Übersicht siehe: Engers, 1998; Keitel *et al.*, 1999). Daten bezüglich des Immunisierungspotentials einer solchen Vakzine stehen jedoch noch nicht zur Verfügung.

#### 1.6 Die Invasion von Erythrozyten durch die Merozoiten

In dem komplexen Lebenszyklus der *Plasmodien ssp.* gibt es drei verschiedene Stadien, die die Wirtszellen invadieren müssen: der Ookinet, der Sporozoit und der Merozoit. Diese Invasion ist ein aktiver Prozess, der an einer ungewöhnlichen, "gleitenden" Bewegungsart basiert. Obwohl die invasiven Stadien sowohl morphologisch als auch biochemisch unterschiedlich sind, gibt es eine Reihe von Merkmalen, die allen dreien gemeinsam sind, so z. B. die hoch konservierte, strukturelle Organisation des Zytoskeletts und der apikale Komplex, der aus Rhoptrien, Dichte Granula und Mikronemen besteht. Dieses Kapitel konzentriert sich auf die Invasion der Merozoiten in die Erythrozyten, bei der auch das MSP-1 Protein eine Rolle zu spielen scheint. Bezüglich der Invasion von Sporozoiten in die Hepatozyten und der Ookineten in die Speicheldrüsen des Moskitos sei auf entsprechende Übersichtsartikel verwiesen (Kappe *et al.*, 1999; Sinnis and Nussenzweig, 1996; Sinnis and Sim, 1997).

Der Invasionsprozess kann in vier Schritte unterteilt werden, an denen die unterschiedlichen Organellen des spezialisierten Apikalkomplexes maßgeblich beteiligt sind (Abb.: 1.4); (für Übersicht siehe: (Bannister and Dluzewski, 1990). Der erste Kontakt ist eine zufällige Bindung zwischen den Merozoiten und einer beliebigen Stelle der Erythrozytenoberfläche. Diese Berührung ist reversibel und der Parasit ist somit in der Lage, eine größere Fläche der Plasmamembran "abzutasten".

In dem zweiten Schritt wendet sich der Parasit mit seinem apikalen Ende der Oberfläche des Erythrozyten zu - ein Prozess, der als "Reorientierung" bezeichnet wird. Spezifische Rezeptoren und Liganden, die an dieser initialen Bindung und Erkennung beteiligt sind, wurden noch nicht identifiziert. Es ist jedoch naheliegend, dass Proteine auf der Plasmamembran des Merozoiten diese Rolle übernehmen können (z. B. MSP-1, siehe unten). Der Abstand zwischen beiden Zellen verringert sich (von 20-40 nm auf 4 nm) und dieser Kontakt gilt als der Auslöser der Mikronemen- und Rhoptrien-Sekretion. Einige dieser mikronemalen Proteine wurden als Liganden für diesen Bindungsschritt identifiziert, so das: "Erythrocyte binding Protein 175" aus P. falciparum (PfEBA-175; Sim et al., 1994), "Duffy binding Protein" aus P. vivax und P. knowlesi (DBP; Chitnis and Miller, 1994; Adams et al., 1990) und Proteine der MAEBL Familie in P. yoleii und P. berghei (Kappe et al., 1998). Die Bindung dieser Liganden an ihre Rezeptoren auf der Oberfläche des Erythrozyten führt zu dem nächsten Invasionsschritt, der Ausbildung einer sog. "moving junction". Diese Formation fängt an dem apikalen Ende des Merozoiten an und bewegt sich ringförmig um den aktiv invadierenden Parasiten bis zu dem posterioren Ende hin. Nach dem Beenden dieses Abschnittes befindet sich der Merozoit innerhalb des Erythrozyten und ist von der parasitophoren Vakuole umgeben (Übersicht in: Lingelbach and Joiner, 1998). Mit diesem letzten Schritt – der Ausbildung der PV – an dem die Proteine der Dichten Granula beteiligt sind, ist der Invasionsprozess abgeschlossen.



Abbildung 1.4: Der Invasionsprozess von Erythrozyten durch Merozoiten am Beispiel des P. knowlesi (modifiziert aus: Bannister and Dluzewski, 1990)

Abkürzungen: N: Nukleus; Mn: Mikronemen; mj: moving junction; PV: parasitophore Vakuole; Rh: Rhoptrien

Es wird angenommen, dass mindestens drei unterschiedliche Invasionswege in *P. falciparum* existieren: einer ist abhängig von Sialinsäure-Resten des Glykophorins A, der nächste von Glykophorin B und für den dritten wurden noch keine Rezeptormoleküle identifiziert. Das MSP-1 kann möglicherweise in einem Glykophorin-abhängigen Invasionsweg involviert sein: Die Daten von Perkins und Rocco (Perkins and Rocco, 1988) deuten auf eine Sialinsäure-abhängige Bindung von MSP-1 auf Erythrozyten hin, die durch Zugabe von löslichem Glykophorin kompetitiert werden konnte. Andererseits zeigten Herrera *et al.* (Herrera *et al.*, 1993) die Bindung von MSP-1 an Spektrin, ein Protein des erythrozytären Zytoskeletts. Die Tatsache, dass das C-terminale Fragment p19 zwei EGF-ähnlichen Domänen besitzt – die in der Natur weit verbreitet sind und an Erkennungsprozessen sowohl in der Lösung als auch bei Zellkontakten beteiligt zu sein scheinen (Laurence and Gusterson, 1990) – verstärkt die Annahme, dass das MSP-1 in dem initialen Schritt der Invasion beteiligt sein könnte.

Einige weitere Proteine, die auf der Oberfläche des Merozoiten lokalisiert sind und deshalb auch mit einem Rezeptor in Kontakt treten könnten sind identifiziert, darunter MSP-2, 4 und 5 (Übersicht siehe: Coppel et al., 1998a) Das AMA-1 ("apical membrane antigen 1") wird ebenfalls als Kandidat für einen Erythrozyten spezifischen Liganden angesehen.

# 1.7 Der in dieser Arbeit verwendete Empfängerorganismus für MSP-1: *Toxoplasma gondii*

1908 entdeckten die französischen Forscher Nicolle und Manceaux in dem nordafrikanischen Nagetier *Ctenodactylus gundi* einen bis dahin unbekannten, einzelligen Parasiten, und nannten ihm, wegen seiner gebogenen Form, *Toxoplasma* (griech. "toxon" = Bogen, "plasma" = Form) *gondii* (Nicolle C., 1908). Phylogenetisch gehört *T. gondii* genauso wie die *Plasmodium ssp.* zu dem Stamm der *Apicomplexa* und ist dank seiner einzigartigen Fähigkeit, fast jede kernhaltige Vertebratenzelle zu infizieren und lebenslang in seinem Wirt zu persistieren, der am weitesten verbreitete Vertreter dieses Stammes. Serologische Untersuchungen ergaben bei der Weltbevölkerung eine Durchseuchungsrate von etwa 10-25%; da die Prävalenz einer *Toxoplasma* Infektion jedoch regional, altersabhängig und ernährungbedingt unterschiedlich ist, schätzt man, dass etwa 46-73% der europäischen Bevölkerung infiziert ist.

Dementsprechend gehört die durch die *T. gondii* hervorgerufene Toxoplasmose zu den häufigsten parasitären Infektionskrankheiten. Die akute Infektion bei immunkompetenten Menschen verläuft in der Regel mild und ohne klinische Symptome; nur in einigen Fällen kommt es zur Schwellung der Lymphdrüsen, zu Fieber, Kopfschmerzen und Müdigkeit, selten Retinochoroiditis (Frenkel, 1988). Die Toxoplasmose wird durch eine heftige zellvermittelte Immunantwort kontrolliert, die fähig ist, die infizierten Zellen sowie die Parasiten abzutöten (Übersicht siehe: Kasper and Boothroyd, 1992). Nach Abklingen der akuten Infektion bildet der Parasit Gewebezysten, die lebenslang im Wirt verbleiben und die weder von dem Immunsystem des Wirtes erkannt noch durch medikamentöse Behandlung eliminiert werden können. Aufmerksamkeit erweckte *T. gondii* als Verursacher von opportunistischen Infektionen bei immundefizienten Personen wie z. B. bei AIDS Patienten (Luft and Remington, 1992) oder Patienten, die Immunsuppressiva erhalten (Israelski and Remington, 1993). Bei diesen Patienten kommt es zur Reaktivierung der chronischen Infektion. Die Folge sind Läsionen im Gehirn und Encephalitis (Ammassari *et al.*, 1996). Solche Patienten müssen dauerhaft medikamentös behandelt werden (kombinierte Gabe der Antifolate Pyrimethamin und Sulfadiazin) (Brooks, 1987). Bei einer Sulfadiazin-Unverträglichkeit können alternativ Clindamycin oder Atovaquone verwendet werden. Eine weitere Risikogruppe sind Frauen, die während der Schwangerschaft eine Erstinfektion durchmachen, da eine diaplazentare Übertragung des Parasiten auf den Fötus möglich ist. Dies kann zu schwerer Schädigung des Neugeborenen bis hin zum Abort führen (Desmonds *et al.*, 1974).

Auch der Lebenszyklus von *T. gondii* ist sehr komplex und beinhaltet drei unterschiedliche Formen: Sporozoiten (Endstadien der sexuellen Replikation), Tachyzoiten und Bradyzoiten (Übersicht siehe: Dubey, 1977). Er umfaßt eine asexuelle Vermehrung im Zwischenwirt und eine nicht obligate, sexuelle Vermehrung, die nur in Katzen und katzenartigen Tieren (Feliden) stattfinden kann (Dubey *et al.*, 1970; Frenkel, 1970).

Die Infektion erfolgt oral, durch den Verzehr von nicht ausreichend gegartem, zystenhaltigem Fleisch, durch mit Oozysten verunreinigten Lebensmitteln oder durch direkten Kontakt mit Katzenkot. In der akuten Phase unmittelbar nach der Infektion vermehrt sich der Erreger als schnell proliferierender Tachyzoit, der seine Wirtszelle in wenigen Tagen lysiert. Über infizierte Zellen des Immun- und Blutsystems kommt es zu einer raschen Verbreitung des Parasiten in viele innere Organe. Um der Immunantwort des Wirtes zu entgehen, differenzieren die Tachyzoiten zu einer antigenisch unterschiedlichen Form, den langsam wachsenden Bradyzoiten. Diese Dauerstadien befinden sich in intrazellulären Zysten, die lebenslang im Wirt verbleiben (vorwiegend im Gehirn, Auge, Skelett- und Herzmuskulatur). Diese Zysten sind auch die Ursache für einen periodischen, natürlichen "boost" des Immunsystems (McLeod and Remington, 1977) sowie für die Reinfektion bei immundefizienten Personen. Gelangen diese Gewebezysten in den Endwirt (wie z. B. die Katze), kann die sexuelle Vermehrung stattfinden.

Neben seiner einfachen Kultivierbarkeit hat sich *T. gondii* vor allem durch die Existenz zahlreicher Methoden zur genetischen Manipulation als ein Modellorganismus für die Gruppe der *Apicomplexa* etabliert (Boothroyd *et al.*, 1994; Boothroyd *et al.*, 1995; Donald and Roos, 1993; Soldati and Boothroyd, 1993); (siehe auch Diskussion 6.2). Die Tatsache, dass die Toxoplasmose einen hohen Schaden in der Viehzucht verursacht, motivierte die Forschung zu der Entwicklung eines Impfstoffes für die Landwirtschaft. So wird Immunisierung von Schafen mit lebenden, attenuierten *T. gondii* Tachyzoiten des Stammes S48 mittlerweile kommerziell in Europa und Neu Seeland durchgeführt (Buxton *et al.*, 1991). Trotzdem ist ein Ansatz solcher avirulenten T. *gondii* Mutanten für eine Immunisierung im Menschen nicht denkbar; das Risiko, dass pathogene Revertanten entstehen, kann nicht ausgeschlossen werden.

Wie alle apikomlexen Parasiten besitzt auch*T. gondii* drei Arten von sekretorischen Vesikeln: Rhoptrien, Mikroneme und dichte Granula. Die Sekretion der Proteine aus den Mikronemen erfolgt bei dem Kontakt des Parasiten mit der Wirtszelle (Carruthers and Sibley, 1997). Das sog. "capping"-Modell beschreibt die mögliche Funktion dieser Proteine bei der initialen Bindung an die Wirtszelle und der Invasion (Russell, 1983; Sibley *et al.*, 1998). Die Sekretion aus den Rhoptrien in die entstehende parasitophore Vakuole (PV) folgt rasch auf die Ausschüttung der Mikronemen und ist beendet, wenn der Parasit vollständig in die Zelle eingedrungen ist. Schließlich, nachdem die PV bereits ausgebildet ist, setzt die Sekretion der Dichten Granula ein (Carruthers and Sibley, 1997) und es wird angenommen, dass die darin erhaltenen Proteine eine Rolle bei der Modifikation der PV zu einem metabolisch aktiven Kompartiment spielen.

*T. gondii* besitzt genauso wie die übrigen Parasiten des Stammes *Apicomplexa* keine Zilien oder Flagellen sondern zeigt eine ungewöhnliche Art der Fortbewegung: das Gleiten auf festen Substraten ("gliding motility"). In Falle von *T. gondii* konnte gezeigt werden, dass die Bewegung und das Eindringen in die Zelle von einem Aktin-Myosin-Zytoskelett des Parasiten angetrieben wird (Dobrowolski and Sibley, 1997). Zur Bindung an die Wirtszelle und zur Übertragung der mechanischen Kraft wird ein Transmembranprotein in der Plasmamembran des Parasiten benötigt. Diese Funktion scheinen die Adhäsine der TRAP-Familie zu übernehmen: das in den Sporozoiten von *Plasmodium ssp.* identifizierte Thrombospondin-related anonymous Protein (TRAP), das in den *Plasmodium ssp.* Ookineten exprimierte Circumsporozoite- and TRAP-related Protein (CTRP) und das MIC2 Protein aus *T. gondii*. Für diese Hypothese spricht die Mikronemen- und Oberflächenlokalisation dieser Proteine (Rogers *et al.*, 1992), der Aufbau der adhäsiven Domänen sowie der Phänotyp der TRAP und CTRP "Knock-out"-Mutanten in *P. berghei* (Dessens *et al.*, 1999; Sultan *et al.*, 1997; Yuda *et al.*, 1999).

#### 1.8 Ziele der Arbeit

Obwohl es allgemein akzeptiert wird, dass das MSP-1 einer der meistversprechenden Kandidaten für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen Malaria ist und wahrscheinlich bei der Invasion der Erythrozyten, also bei einem essentiellen Schritt in dem Lebenszyklus der Plasmodien ssp. eine wichtige Rolle spielt, konnten die endgültigen Beweise noch nicht erbracht werden. Diese Arbeit, deren grundlegender Baustein die Tatsache ist, dass eine stabile Expression des *msp-1* Gens sowie die Produktion des MSP-1 Proteins in ihrer gesamten Länge in einem heterologen Expressionssystem möglich ist, beschäftigt sich mit beiden Phänomenen. Die Verwendung von *Toxoplasma gondii* für die Produktion vom MSP-1 sowie seiner Cterminalen Fragmente soll die Konservierung der antigenen Epitope in einer möglichst natürlichen Umgebung gewährleisten.

Nach einer Charakterisierung der heterolog hergestellten Proteine soll das Immunisierungspotential des MSP-1 sowohl im Maus- als auch im Affenmodell untersucht werden. Die Analyse der Seren während und nach der Immunisierung soll neue Erkenntnisse über den noch nicht im Detail verstanden Mechanismus liefern, der die Entwicklung einer spezifischen, humoralen Immunantwort begleitet.

Weiterhin soll eine Methode etabliert werden, die es uns erlauben würde, eine potentielle, MSP-1-vermittelte Affinität von transgenen *T. gondii* an Erythrozyten zu binden, zu bestimmen.

Schließlich soll eine modifizierte Kodierungssequenz des *msp-1d* Gens entworfen werden, die die chemische Synthese dieses MSP-1 vom Prototyp MAD20 ermöglichen würde. Die Verfügbarkeit beider Prototypen wird in naher Zukunft sowohl homologe wie auch heterologe Immunisierungsexperimente ermöglichen.

# 2. ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN

#### 2.1 Abkürzungen

	anti
АА	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AMA-1	Apical Merozoite Antigen 1"
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
Bis-AA	N N`-Methylen-Bisacrylamid
BSA	Rinder-Serumalbumin (Bovine serum albumine")
C-terminal	Karboxyterminal
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CM	Chloramphenicol
CSP	Circumsporozoite Protein"
СТР	Cytosintrinhosnhat
ddXTP	2' 3'-Dideoxyribonukleotide
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	doppelsträngige DNA
DOC	Desoxycholat
dXTP	2'-Desoxycholat
DTT	Dithiothreital
E coli	Escherichia coli
E. CON	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	Endermaler Wachstumsfaktor
EUI FLISA	enzyme linked immunosorbent assay"
GST	Glutathion-S-Transferase
FtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ECA	Freund'sche Adiuvanz komplett
FCS	Fötales Kölberserum (Fetal calf serum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
HEDES	A(2  Hydroxyethyl) 1 piperazin ethanculfonsäure
IFA	Indirakte Immunfluoreszenz (Indirect Immunfluorescence Assay")
ні л	human laukocyte antigene"
In	Immunoglobulin
Ig II	Interleukin
IPTG	Isopropyl-thio_D-Galaktonyranosid
Kan	Kanamycin
I B-Medium	Luria-Broth Medium
m A K	Monoklonaler Antikörper
MCS	multiple cloping site"
MHC	major histocompability complex"
MOPS	Mornholinopropansulfonsäure
MSP_1	Major Surface Protein 1"
MW	"major Surface From F
N-terminal	Aminoterminal
NRT	n-Nitrotetrazoliumblauchlorid
	P Throwna Donaliona demond

NC	Nitrozellulose
NP 40	Nonident P 40
NTP	Ribonukleotidtriphosphate
OD	Optische Dichte
ori	"origin of Replication" (Replikations-Ursprung)
р	Plasmid
P.falciparum	Plasmodium falciparum
PAA	Polyacrylamid
PAGE	PAA-Gelelektrophorese
PBS	"Phosphate buffered saline" (isotonischer Phosphatpuffer)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pН	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> Ionenkonzentration
POD	Peroxidase
Poly(A)	Polyadenylierungssignal
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP II	Eukaryont. RNA-Polymerase II
RNase A	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannte
ssDNA	Einzelsträngige DNA
ТА	Tris-Acetat
Tab.	Tabelle
TBS	"Tris buffered saline"
TBST	"Tris buffered saline" + Tween 20
T. gondii	Toxoplasma gondii
TEMED	Triethylmethylethyldiamin
TRAP	"Thrombospondin related anonymous protein"
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TX 100	TritonX 100
TX 114	TritonX 114
ÜN	Über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
Vol.	Volumen
z. B.	zum Beispiel
wt	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-Galaktopyranosid

#### 2.1.1 Einheiten

#### 2.1.2 Vorsätze

А	Ampere	k	kilo	$10^{3}$
Bp	Basenpaar(e)	m	milli	10-3
Ci	Curie	μ	mikro	10-6
cpm	Zählimpulse pro Minute	n	nano	10-9
Da	Dalton	р	piko	$10^{-12}$
g	Gramm/Erdanziehunskraft	f	femto	10-15
h	Stunde(n) (lat. "hora")			
kD	Kilodalton			
1	Liter			
М	molar (mol/l)	2.1.3 Ba	sen/Nuk	leoside
min	Minute(n)			
Mol	ca. 6,023 x 10 <sup>23</sup> Moleküle	А	Adenin/2	Adenosin
S	Sekunde(n)	С	Cytosin/	Cytidin
U	Einheit der Enzymaktivität ("unit")	G	Guanin/	Guanosin
Upm	Umdrehungen pro Minute	Т	Thymin/	Thymidin
V	Volt	U	Uracil/U	Iridin

Ala	А	Alanin	Leu	L	Leuzin
Arg	R	Arginin	Lys	Κ	Lysin
Asn	Ν	Asparagin	Met	М	Methionin
Asp	D	Asparaginsäure	Phe	F	Phenylalanin
Cys	С	Cystein	Pro	Р	Prolin
Gln	Q	Glutamin	Ser	S	Serin
Glu	E	Glutaminsäure	Thr	Т	Threonin
Gly	G	Glyzin	Trp	W	Tryptophan
His	Н	Histidin	Tyr	Т	Tyrosin
Ile	Ι	Isoleuzin	Val	V	Valin

#### 2.1.4 Nomenklatur der Aminosäuren nach IUPAC-IUB Vereinbarungen (1969)

#### 2.2 Definitionen

In dieser Arbeit wurden zum Teil englische Fachausdrücke beibehalten, da entweder keine sinnvolle, oder nur eine umständliche Übersetzung ins Deutsche möglich ist.

"blocking"	Absättigung unspezifischer Bindungsstellen
"blot"	Transfer von Protein, DNA oder RNA auf Membranen
"boost"	Wiederholte Immunisierung mit dem gleichen Antigen
"challenge"	experimentelle Infektion nach einer Immunisierung
"knob"	Elektronendichte Ausstülpungen der Erythrozytenmembran
"maxiprep"	Schnellmethode zur Plasmid-DNA-Isolierung und Aufreinigung aus
	E.coli mit hoher DNA-Ausbeute
"miniprep"	Schnellmethode zur Plasmid-DNA-Isolierung und Aufreinigung aus
	E.coli mit geringer DNA-Ausbeute
"multiple cloning site"	DNA-Region, die die Erkennungssequenzen für mehrere Restriktionsendonukleasen
	umfaßt
"pellet"	Sediment
"primer"	ss-DNA, die nach Paarung mit dem komplementären DNA-Strang bei der enzymati-
	schen DNA-Synthese als Startstelle dient
"priming"	Erstkontakt des Immunsystems mit einem Immunogen
"tandem repeat"	sich wiederholendes, lückenloses Sequenzmotiv
"western blot"	Proteintransfer vom PAA-Gelen auf Nitrozellulose-Filter

## **3. MATERIAL**

#### 3.1 Laborausstattung

Analytische Waage AE 163 und HK 60 Mettler AG, Greifensee, Schweiz Brutschrank B5060 EC/CO<sub>2</sub> Heraeus GmbH, Hanau Computer-Hardware: MacIntosh SE / 30 & II, Laserwriter Plus Scanner Studioscan AGFA Adobe Photoshop 5.0 Adobe Systems Inc., USA Computer-Software Canvas 3.5.5 Deneba Software Inc., Miami, USA Cell Quest Becton Dickinson Cricket Graph III Cricket Software, Malvon, PA, USA **DNAStar** DNAStar Inc., USA DNA Strider 2.0 Commisariat a l'Energie Atomique, France EndNote Plus 3.0 Niles&Associates Inc., CA, USA Microsoft Corporation, CA, USA Excel 4.0 Signal Analytics Inc., CA, USA IPLabs 3.0 MS Word 5.1 Microsoft Corporation, CA, USA Jingdong Liu; Salt Lake City, USA MacPlasmap 2.05 Netscape Navigator 4 Netscape Communications Corp., USA Oligo 4.0-s National Biosciences, Inc., MN, USA Durchlichtmikroskop Leitz, Wetzlar BTX; San Diego, USA Elektro Cell Manipulator 600 Elektrophoreseapparaturen EMBL, Heidelberg Elektroelutionsapparatur ZMBH, Heidelberg Bio-Rad Laboratories, München ELISA Reader FACScan Becton Dickinson FACSCalibur Becton Dickinson Feinwaage Sartorius, Göttingen Filmentwicklungsmachine 9432/101 Agfa-Gevaert; Frankfurt Fluoreszenzmikroskop Leitz DMR Leica; Wetzlar FluoroImager SI Molecular Dynamics GmbH, Krefeld Gasbrenner GASI 3.340 Schütt, Göttingen Gefrierschrank -80° C Labotech Gelltrockner Modell 1125 B Berthold GmbH, Wildbad Grobwaage Typ 1474 Mettler, Göttingen Kassetten für Autoradiographie Goos; Heidelberg Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B, RC-3B DuPont, Bad Homburg Labor pH-Meter Knick Leuchtplatte Rex Messinstrumentebau GmbH, Erlangen Lichtmikroskop Labovert Leitz; Wetzlar Magnetrührer Bachofer; Degerschlacht Mikrowellenherd Phillips Mini Protein-Gelelektrophoreseapparatur Mini-Protean II Bio-Rad Laboratories; München Netzgerät ECPS 3 000/150 Pharmacia, Dübendorf, Schweiz Netzgerät LKB 2103 & 2197 LKB, Bromma, Schweden Peristaltikpumpe Perex 10202 LKB, Bromma, Schweden Pipetman Gilson P2, P20, P200, P1000 Abimed; Düsseldorf Pipettierhilfe R.301 Tecnomara, Zürich PhosphoImager BAS1000 Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan Phosphoimager-Kassetten + Screens Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan Refrigerated Condension Trap Bachofer, Reutlingen Rotoren SS-34, GSA, GS-3, SA 600 DuPont, Bad Homburg Scintillationszähler LS 6000 IC Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA Schüttelinkubator Infors AG, Basel, Schweiz Schüttler Eppendorf 5432 Migge, Heidelberg Bachofer, Reutlingen Speed-Vac-Concentrator Savant Spektrophotometer Ultrospect III Pharmatia Steril-Werkbank BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH Stickstofftank BT 40 L`air Liquide

Thermocycler OmniGene Thermoschüttler ISF-1-V Tischschüttelinkubator Typ 82/180 Tischzentrifuge, Biofuge A Transluminator UVF Ultrazentrifuge TLA 100 UV-Handlampe Typ 70 481 Vakuumpumpe, Beta Videosystem CS 1 Vortex-Genie Wasserbad, U3/7A Wasserbad, 1002 Zellkulturzentrifuge Romanta Zentrifuge Mikrorapid K

#### 3.2 Verbrauchsmaterial

3MM Chromatographiepapier 4 Fast Flow, Sepharose Protein A beads Acrylamidlösung 40% Colloidal Blue Staining Kit Coomassi Blue ELISA 96 well plates Eppendorf-Reaktionsgefäße 3810 Photomaterialien Farbumkehrfilm Fujichrome P1600D und Provia 400 Medical X-Ray Film Hyperfilm-ECL Handschuhe Glovex Nickel-Agarose Nitrozellulosefilter BA, 0,45 um Objektträger Objektträger für IFA Pipettenspitzen für P2, P20, P200 Pipettenspitzen für P1000 Quiagensäulen QIAquick-spin PCR Reinigungssäulen **Ouarzglas-Küvetten** Zellkulturschalen 3001/3004 Zellkulturschalen 10cm Zellkulturverbrauchsmaterial (Plastik)

- Hybaid; Teddington, GB Adolf Kühner AG; Schweiz Infors AG, Basel, Schweiz Heraeus Christ AG, Zürich, Schweiz Herolab; Wiesloch Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA Reichelt, Heraeus Christ AG, Zürich, Schweiz Cybertech; Berlin Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz Julabo, Seelbach GFL, Burgwedel Hettich; Tuttlingen Hettich, Tuttlingen
- Vetter, St.Leon-Rot Pharmacia, Schweden AppliChem, Darmstadt Novex, USA Serva, Heidelberg Nunc GmbH Eppendorf, Hamburg
- Fuji Photo-Film GmbH; Düsseldorf Fuji Photo-Film GmbH; Düsseldorf Amersham Beiersdorf, Hamburg Qiagen, Heidelberg Schleicher und Schüll; Dassel Menzel Glässer, über Migge; Heidelberg Hölzer; Dorfen Abimed; Düsseldorf Bayer; Mannheim Qiagen; Hilden Qiagen; Hilden Hellma, München **Becton Dickinison** Greiner; Frickenhausen Falcon; Heidelberg Greiner; Frickenhausen Nunc GmbH

#### 3.3 Chemikalien

Nicht aufgeführte Chemikalien waren von der Qualität p.A. und wurden von der Firma Merck AG, Darmstadt, Fluka AG, Buchs, Schweiz bzw. Neu-Ulm, Cartl Roth GmbH, Karlsruhe bezogen.

Acrylamid Agarose Ampicillin Aprotinin Bacto-Agar Bacto-Trypton BCIP BM Chemiluminescence Blotting Substrat Bromphenolblau Serva, Heidelberg Life Technologies; Scotland Sigma; Deisenhofen Sigma, Heidelberg Difco Labs, Detroit USA Difco Labs, Detroit USA AppliChem, Darmstadt

Boehringer, Mannheim Serva, Heidelberg
Caesiumchlorid Chloramphenicol Complete Mini Proteaseinhibitoren DiI C<sub>16</sub> DMEM DMP DMSO DTT ECL Western Blotting Detection Kit **EDTA** Ethidiumbromid FCS Formaldehyd Gentamycin Glycin Glutamin Glutaraldehyd Glykogen IPTG NBT NP-40 Magermilchpulver Pepstatin p-Nitrophenyl-Sulfat PMSF Protein-Standard QuickChange<sup>TM</sup> site-directed Mutagenesis Kit SDS TEMED TLCK Tris Triton X-100 Triton X 114 Tween 20 X-Gal Vectashield

#### 3.4 Radioisotope

[<sup>32</sup>P]-ATP (5000 Ci/mmol) [<sup>32</sup>P]-dATP (3000 Ci/mmol) [<sup>32</sup>P]-dCTP (3000 Ci/mmol) [<sup>35</sup>S]-dATP (1000 Ci/mmol) [<sup>35</sup>S]-dCTP (1000 Ci/mmol) L-[4,5-3H] Leuzin (141Ci/mmol)

#### 3.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP) Ampli*Taq* DNA Polymerase DNase I *Pfu* Turbo DNA Polymerase PNK Proteinkinase K Restriktionsendonukleasen

RNase A T<sub>7</sub> DNA Polymerase T<sub>4</sub> DNA-Ligase

Roth. Karlsruhe Serva, Heidelberg Boehringer, Mannheim Molecular Probes, Göttingen Eurobio Sigma, Deideshofen Sigma, Deisenhofen Serva, Heidelberg Amersham Serva, Heidelberg Serva, Heidelberg Gibco BRL, Eggenstein Marc, Darmsatdt Eurobio Roth, Karlsruhe Gibco BRL, Eggenstein Sigma, Deideshofen Boehringer; Mannheim AppliChem, Darmstadt AppliChem, Darmstadt Sigma, Deideshofen Glücksklee Sigma, Deideshofen Sigma, Deideshofen Sigma, Deideshofen Sigma, Deideshofen Stratagene, Heidelberg Serva, Heidelberg Serva, Heidelberg Sigma, Heidelberg Roth, Karlsruhe Serva, Heidelberg Serva, Heidelberg Serva; Heidelberg Serva, Heidelberg Vector Laboratories; Burlingame, CA

> Amersham&Buchler, Frankfurt/Main Amersham&Buchler, Frankfurt/Main Amersham&Buchler, Frankfurt/Main Amersham&Buchler, Frankfurt/Main Amersham&Buchler, Frankfurt/Main Amersham&Buchler, Frankfurt/Main

Boehringer, Mannheim Perklin-Elmers Serva, Heidelberg Stratagene, Heidelberg Biolabs; Schwalbach Boehringer, Mannheim Pharmacia, Freiburg New England Biolabs; Schwalbach Serva, Heidelberg Pharmacia, Freiburg Boehringer, Mannheim PI-PLC (aus Bacillus cereus)

Trypsin

#### 3.6 Seren und Antikörperkonjugate

Boehringer, Mannheim Molecular Probes, Göttingen Gibco BRL, Eggenstein

mAk 5.2	Dr. G. Hui, University of Hawaii, Honolulu, USA
-F4 - 7	Dr. E. Grondahl, ZMBH
mAk Tg 4.9	Dr. J.Schwartman, Charlottesville, USA
mAk DG 52	Dr. L. H. Kasper,
$mAk 9E_{10}$	Dr. D. Soldati, ZMBH
anti-ß-Galaktosidase IgG aus Maus	Promega, Mannheim
anti-Ty1-Tag IgG aus Maus (BB2)	Keith Gull, Manchester, UK
-Kanninchen IgG FITC-Konjugat	Dianova, Hamburg
-Kanninchen IgG Rhodamin-Konjugat	Dianova; Hamburg
-Kanninchen IgG POD-Konjugat	Promega, USA
-Maus IgG Alexa 594	Molecular Probes, Göttingen
-Maus IgG Alexa 488	Molecular Probes, Göttingen
-Maus IgG FITC-Konjugat	Becton-Dickinson, Heidelberg
-Maus IgG Rhodamin-Konjugat	Becton-Dickinson; Heidelberg
-Maus IgG POD-Konjugat	Promega, USA
-Mensch IgG AP-Konjugat	Promega, USA

Folgende monoklonale Antikörper gegen das MSP-1 Protein wurden freundlicherweise von Prof. Dr. JanaMcBride; Edinburgh, Scotland, zur Verfügung gestellt:mAk6.1, 7.1, 9.2, 9.5, 9.8, 10.3, 12.2, 12.4, 13.2, 15.2, 17.1, 17.2,

6.1, 7.1, 9.2, 9.5, 9.8, 10.3, 12.2, 12.4, 13.2, 15.2, 17.1, 17.2, 31.1

### 3.7 Primer

msp-42s	5` CCAATGCATGCTGTCACTCCTT 3′
msp-19s	5° CCAATGCATAACATCTCCCAGC 3′
$P_{20}A$	5` CAAGCAACAGCGGAACAA 3'
PfGPImut1/sense	5` TTGCTCCAGCTCTAATTTCCTGGGCATCTCCT 3′
PfGPImut2/antisense	5` AGGAGATGCCCAGGAAATTAGAGCTGGAGCAA 3´
$T_3$ (erweitert)	5` ATTAACCCTCACTAAAGGGAACA 3'
T <sub>7</sub>	5` AATACGACTCACTATAG 3´
Ea	5` GGTGCTGGGAGATTTCCAGCATGCCCTG 3′
Ē	5` CAGGGCATGCTGGAAATCTCCCAGCACC 3´
Pa	5` GGTGCTGGGAGATGGGCAGCATGCCCTG 3'
P <sub>s</sub>	5` CAGGGCATGCTGCCCATCTCCCAGCACC 3'
PvDBPs	5` CCGATGCATACGATCTCTAGTGCTATT 3'
PvDBPas	5` GGTATGCATTGTCACAACTTCCTGAGT 3′

#### 3.8 Plasmide

pPf-1 pE190A pE190D pDS56RBSII,6xHis pSP 130-2 ppT 190 p5RepPR3/GFP/HX pminHXGPRT ploxHXlacZ/ pTub8MycGFP pTub5/CAT pTub8/CAT pS-Gal1/loxTub/CAT Dr. Pan, W.; ZMBH Dr. Burghaus, P., ZMBH Dr. Burghaus, P., ZMBH Dr. D. Stüber, Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz I. Jecmik, ZMBH I. Jecmik, ZMBH M. Soete, AG Soldati, ZMBH Dr. D. Soldati, ZMBH S. Brecht, AG Soldati, ZMBH Dr. D. Soldati, ZMBH Dr. D. Soldati, ZMBH S. Brecht, AG Soldati, ZMBH

pHVDR22 pSP/Ty-1Pv19GPI	Ch. Chitnis, NIH, Maryland C. Fernadez,ZMBH
3.9 Biologische Materialien	
Bakterienstämme : E. coli DH5 :	K12F <sup>-</sup> , thr1, leu6, proA2, his4, thi1, argE3, lacY1, galK2, ara14, xyl5, mtl1, tsx33, strA31, sup37 <sub>am</sub>
E. coli XL1 blue 2:	recA1, endA1, gyrA96, thi1, hsdR17, supE44, relA1, lac, (F´proAB, laqi9, Z M15, Tn10)
<i>E. coli</i> SG13009: Kanam	ycin und Ampicillin-resistent, Lac-Repressor konstitutiv exprimiert
Toxoplasma gondii Kultur:	
Wirtszellen:	Vero-Zellen (green african monkey kidney cells) HFF (human foreskin fibroblast)
T. gondii Stämme:	RH (Sabin, 1941) RH- <i>hxgprt</i> Mutante (Donald et al., 1996). ts-4 attenuierte Mutante (Pfefferkorn, 1976)

SAG-1<sup>-</sup> Mutante (Kasper, 1987)

# 3.10 Material für die Kultur von E. coli

<u>Antibiotikastammlösungen:</u>	
Ampicillin (Na-Salz)	): $50 \text{ mg/ml in H}_2\text{O}$
Kanamycin:	25 mg/ml in Ethanol
Chloramphenicol :	10 mg/ml in Ethanol
LB-Medium:	1% Bacto-Trypton
	0,5% Hefeextrakt
	0,5% NaCl
LB-Platten:	LB-Medium
	1,2% Bacto-Agar

# 3.11 Puffer, Medien und Stammlösungen

# 3.11.1 Material für molekularbiologische Standardtechniken

Transformationslösungen (E.coli):

Ca <sup>2+</sup> Puffer:	10mM K-Acetat, pH 6,4
Puffer zur Lagerung von " Ca <sup>2+</sup> -Zellen" (-80°C):	10mM K-Acetat, PH 6,4 50mM CaCl <sub>2</sub> 20% Glycerin
Transformationspuffer:	50mM MgCl <sub>2</sub> 10mM CaCl <sub>2</sub> 2,5% PEG 6000

Tbjab Transformationspuffer:	10mM PIPES 15mM CaCl <sub>2</sub>
Einfriermedium:	10% DMSO
Lösungen für die "miniprep"-Meth	ode
Lösung I:	50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
Lösung II:	0.2 M NaOH 1% SDS
Lösung III:	3 M K-Acetat, pH 4.8 (eingestellt mit Eisessig)
RNase A Stammlösung:	10mg/ml
Tris-EDTA-Puffer (TE):	10mM Tris/HCL, pH 8,0 1mM EDTA
Lösungen für die "maxiprep"-Meth	node
Resuspensionspuffer:	50mM Tris-HCL pH 8,0 10mM EDTA 100µg/ml RNase A
Lysispuffer:	200mM NaOH 1% SDS
Neutralisationspuffer:	3 M K-Acetat, pH 5,5
Äquilibrierungspuffer:	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% EtOH 0,15% Triton X-100
Waschpuffer:	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% EtOH
Elutionspuffer:	1,25 M NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 15% EtOH
<u>Lösungen für Dideoxysequenzieru</u> (Fa. Pharmacia LKB)	ngen
Hybridisierungspuffer:	280mM Tris/HCl, pH 7,5 100mM MgCl <sub>2</sub> 350mM NaCl 150mM DTT
Markierungspuffer:	je 2,0 µM dATP, dCTP, dGTP, und dTTP
Terminationsmix :	je 150 μM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in 40 mM Tris/HCL pH 7,5, 10 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM NaCl

A-Mix:	Terminationsmix + 15 $\mu$ M ddATP
C-Mix:	$Terminationsmix + 15 \ \mu M \ ddCTP$
G-Mix:	Terminationsmix + 15 $\mu$ M ddGTP
T-Mix:	$Terminationsmix + 15 \ \mu m \ ddTTP$
Stopp-Lösung:	95% entionisiertes Formamid 20 mM EDTA 0,05% Xylencyanol FF 0,05% Bromphenolblau

# Reaktionspuffer für Enzyme

CIP-Reaktionspuffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0
CIP-Verdünnungspuffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 mM ZnCl <sub>2</sub> 40% Glyzerin
Ligase-Puffer:	20 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM DTT 0,6 mM ATP
PI-PLC-Puffer:	20 mM Tris pH 7,5 1 mM EDTA 0,01% Na-Azid 50% Glycerol
PNK-Puffer:	50 mM Tris-HCl, pH 9,0 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM 2-Mercaptoethanol
Hybridisierung-Puffer (10x):	1,5 M KCl

Puffersystem für Restriktionsendonukleasen der Fa. Boehringer, MA (10x) Bei abweichenden Bedingungen wurden die Herstellerangaben befolgt.

Puffer A:	330 mM Tris-Ac, pH 7,9 100 mM Mg-Ac 660 mM K-Ac 5 mM Dithiothreitol
Puffer B:	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM MgCl <sub>2</sub> 1 M NaCl 10 mM Mercaptoethanol
Puffer L:	100 mM Tris-HCl, pH 7,5 100 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM Dithiothreitol
Puffer M:	100 mM Tris-HCL, pH 7,5 100 mM MgCl <sub>2</sub> 500 mM NaCl 10 mM Dithiothreiol

Puffer H:	500 mM Tris-HCl, pH 7,5 100 mM MgCl <sub>2</sub> 1 M NaCl
PCR-Puffer	
Reaktionspuffer für <i>Taq</i> -DNA Polymerase:	500 mM KCl 100 mM Tris/HCl, pH 8,3 15 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mg/ml Gelatine
MgCl <sub>2</sub> -Stammlösung:	10 mM in H <sub>2</sub> O
dNTP-Mix:	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, pH 7,5
Lösungen für die Agarose-Gelelek	trophorese von DNA
Loening-Puffer:	36 mM Tris-HCl 30 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 mM EDTA; pH 7.8
Probenpuffer für Agarose-und PA	A- Gele zur Auftrennung von ds-DNA: 6% Saccharose 0,01% SDS 0.02% Bromphenolblau 0.02% Orange G 0.02% Xylencyanol FF
Ethidiumbromid:	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Lösungen für die PAA-Elektropho	rese von DNA
AA-Stammlösungen:	
Native Gele:	30% AA, 0,8% Bis-AA, filtriert & entgast
Denaturierende Gele:	40% AA, 2% Bis-AA, 8,3M Harnstoff, filtriert & entgast
Aufreinigungsgel für Oligonukleotide:	20% PAA, 1% Bis-AA, 8,3 M Harnstoff
Präparative PAA-Gel (50 ml):	10 ml 30% PAA 2,5 ml 20x TA 100 μl TEMED 200 μl APS ad 50 ml H <sub>2</sub> O
Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE):	40 mM Tris/HCl, pH 8,3 20 mM Na-Acetat 2 mM EDTA
Tris-Borat-EDTA Puffer (TBE):	90 mM Tris, pH 8,3 90 mM Borsäure 2 mM EDTA

Formamid-Probenauftragspuffer:	95% Formamid
	1xTBE
	0,01% Bromphenolblau
	0,01% Xylencyanol FF

Lösungen für die Isolierung von DNA Fragmenten

3 M Na-Acetat 0,02% Bromphenolblau

Laufpuffer:

0,5x TBE

# Isolierung aus Agarose Gelen

Silica (Sigma S-5631):	100 mg/ml in 3 M NaI
Resuspensionspuffer:	6 M NaI
Wasch-Puffer:	30 mM NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 7,6 2,5 mM EDTA 50% v/v EtOH

# Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Proteinen

PAA-Stammlösung:	30% PAA, 0,8% Bis-AA im Wasser
4x "Upper" Tris:	500 mM Tris pH 6,8 0.4% SDS
4x "Lower" Tris:	1.5 M Tris pH 8,8 0.4% SDS
Proteingel-Laufpuffer:	33 mM Tris-HCl, pH 6,8 190 mM Glycin 0.1% SDS
Transfer-Puffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0.01% SDS (10% Methanol)
Sammelgel 3% (10 ml):	1 ml PAA 1 ml 4x "Upper" Tris Puffer 8 ml Wasser 20 μl TEMED 20 μl APS
Trenngel 8% (20 ml):	5,4 ml PAA 5 ml 4x "Lower" Tris Puffer 20 μl TEMED 100 μl APS

Probenauftragspuffer (zur Auftren	nung von Proteinen): 3% SDS 25% "Upper"-Tris 20% Glycerin 0.02% Bromphenolblau 3% -Mercapto-Ethanol
Bradfordlösung:	0,1mg Coomassie Brillant Blue G250/ml in 8.5% $\rm H_3PO_4$ und 5% EtOH, filtriert.
Coomassie- Färbung	
Coomassie-Färbelösung:	50% EtOH 10% Essigsäure 40% H <sub>2</sub> O dest. 0,25% Serva Blue R
Entfärbelösung für Coomassie:	40% EtOH 10% Essigsäure 50% $H_2O$
Silberfärbung nach Heukeshoven (	(modifiziert)
Fixierlösung 1:	30% EtOH 10% Essigsäure
Fixierlösung 2:	$\begin{array}{c} 30\% \ EtOH\\ 0,5M \ Na-Acetat\\ 0,2\% \ Na_2S_2O_3x \ 5 \ H_2O\\ 0,5\% \ Glutaraldehyd \end{array}$
Färbelösung:	0,1% AgNO <sub>3</sub> 0,02% Formaldehyd
Entwicklerlösung:	3% Na <sub>2</sub> C O <sub>3</sub> 0,02% Formaldehyd
Stopplösung:	1% Glycin
Fixierlösung 2, Färbelösung und E	ntwicklerlösung werden frisch angesetzt.
Färbung mit kolloidalem Coomass	ie mit "Colloidal Blue Staining Kit"
Färbelösung (200 ml):	<ul> <li>110 ml H<sub>2</sub>0<sub>bidest</sub></li> <li>40 ml Methanol</li> <li>40 ml ,,Stainer A"</li> <li>10 ml ,,Stainer B" (vor Gebrauch schütteln)</li> </ul>
Fixierlösung:	40% Methanol 10% Essigsäure
Lösungen für Immunoblot	
Transfer-Puffer:	0,01% SDS 25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol

TBST-Puffer:	TBS mit 0,2% Tween20
TBS-Puffer:	150 mM NaCl 10 mM Tris, pH 8,0
Absättigungspuffer:	5% Magermilchpulver 0,02% $NaN_3$ , in TBST
AP-Puffer:	5 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM NaCl 100 mM Tris, pH 9,5
NBT-Stammlösung:	50 mg/ml in 80% DMF
BCIP-Stammlösung:	25 mg/ml in 80% DMF
AP-Substratmix:	66 µl BCIP und 66 µl NBT/10ml AP-Puffer
"Stripping"-Puffer:	0,1% SDS 1% Tween 20 0,2 M Glycin, pH 2,2

# Lösungen für die Proteinaufreinigung über Ni<sup>2+</sup>-Chelatchromatographie

Lysepuffer:	Puffer A Proteaseinhibitor-Mix
Puffer A:	6M Guanidinhydrochlorid 100 mM NaH <sub>2</sub> PO4 10 mM Tris, pH 6,8
Puffer B:	8 M Harnstoff 100 mM NaH2PO4 10 mM Tris, pH 8
Puffer C:	8 M Harnstoff 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris, pH 6,3
Puffer für Harnstoffgradienten:	500 mM NaCl 20% Glycerin 50 mM Tris, pH 7,4 1 M-6M Harnstoff, in Schritten von 0,5 M Proteaseinhibitor-Mix
Elutionspuffer:	300 mM NaCl 10% Glycerin 50 mM Tris, pH 7 Imidazol (20 mM, 100 mM, 250 mM, 500 mM) Proteaseinhibitor-Mix
Proteaseinhibitor-Mix (Endkonzentrationen):	5 mM PMSF 1 μM Leupeptin 1 μM Pepstatin 0,1 ng/ml Chymostatin 0,1 μM Aprotinin 100 μM TLCK/HCl

Lösungen für die Proteinaufreinigung aus Toxoplasma gondii

Vorbereitung der Säule:	
NET-Puffer:	150 mM NaCl 5 mM EDTA 50 mM Tris, pH 7,4
Borax-Puffer:	50 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> , pH 9,0
Ethanolamin-Lösung:	0,3 M Ethanolamin, pH 8,0
Immunaffinitätschromatographie: TNET-Puffer:	1% TritonX100 150 mM NaCl 5 mM EDTA 50 mM Tris, pH 7,4
TNET+NaCl-Puffer:	1% TritonX100 650 mM NaCl 5 mM EDTA 50 mM Tris, pH 7,4
NET pH6,8-Puffer:	150 mM NaCl 5 mM EDTA 50 mM Tris, pH 6,8
"Enzyme linked immunosorbent A	ssay" (ELISA)
Karbonatpuffer:	0,2 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,2 M NaHCO <sub>3</sub> Vor Gebrauch 17 ml der 0,2 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 8 ml der 0,2 M NaHCO <sub>3</sub> zusammen mischen ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O, pH 10,6
Blockpuffer:	TBS mit 1% Magermilchpulver 0,02% Azid
Substratpuffer:	4,8 ml Diethanolamin 250 μl 2 M MgCl <sub>2</sub> ad 500 ml H <sub>2</sub> O, pH 9,5 mit HCl einstellen
Färbereagenz:	15 min vor Gebrauch 1 mg/ml p-Nitrophenyl-Phosphat im Substratpuffer
Stopplösung:	0,1 M EDTA
Lösungen für die Markierung von I	Erythrozyten mit DiIC <sub>16</sub>
Markierungspuffer	100 mM Sucrose 20 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
DiI C <sub>16</sub> Stammlösung	2,5 mg/ml in 100% EtOH

# 3.11.2 Material für die Kultur von Toxoplasma gondii

T. gondii Medium:	Dulbecco´s MEM 2,2 g/l Na-Bicarbonat 1% Glutamin 10% FCS
Antibiotika: Gentamycin:	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Lösungen für die Transfektion von	<u>T. gondii</u>
Elektroporationspuffer:	120 mM KCl 0,15 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,6 25 mM HEPES pH 7,6 2 mM EDTA 5 mM MgCl <sub>2</sub>
vor Gebrauch komplementieren:	2 mM ATP 5 mM Glutathion
Lösungen für die Proteinextraktion	aus T.gondii
Lysis-Puffer (1x RIPA):	150 mM NaCl 1% NP40 0,5% DOC 0,1% SDS 50 mM Tris pH 8,0 1 mM EDTA
TBS-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl
Einfrieren von intrazellulären Para	siten
Lösung 1:	DMEM mit 50% FCS
Lösung 2:	DMEM mit 20% DMSO
Lösungen für Indirekte Immunfluo	reszenz
Fixierungslösung :	3% Paraformaldehyd 0,05% Glutaraldehyd in 1x PBS
Neutralisierungslösung:	0,1 Glycin in 1x PBS
Permeabilisierungs- und Inkubations-Lösung:	1% BSA 0,1% Triton X 100 in 1x PBS
Blockierungslösung:	0,2% Triton X-100 2% BSA in 1x PBS
Waschlösung:	0,1M Glycin in 1x PBS

# Lösungen für ß-Galaktosidase-Färbung

Lösungen für enzymatise	che β-Galaktosidase-Färbung:
Assay-Puffer:	100 mM HEPES, pH 8,0
	$1 \text{ mM MgSO}_4$
	1% Triton X-100
	5 mM DTT
	1,7 mM 4-methyl-Umbelliferyl-B-D-Galaktopyranosid

Stopp-Puffer:

500 mM Glycin, pH 11,2

Lösungen für X-Gal-Färbung: Fixierlösung:

2% Formaldehyd 0,2% Glutaraldehyd 2 mM MgCl<sub>2</sub>

Färbelösung:

100 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,3 1,3 mM MgCl<sub>2</sub> 3 mM K<sub>4</sub>(FeCN<sub>6</sub>) 3 mM K<sub>3</sub>(FeCN<sub>6</sub>) 0,02% Triton X-100 0,04% Deochycholat

in 1x PBS

0,02% Triton X-100 0,04% Deoxycholat

25 mM EDTA

# 4. METHODEN

### 4.1 DNA-Transfer in E. coli Zellen

#### 4.1.1 Herstellung von E. coli Zellen für die Elektroporation

Von einer Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird zunächst eine Übernachtkultur (ÜNK) in 10 ml LB-Medium angesetzt. 200 ml LB-Medium werden 1 : 40 mit ÜNK angeimpft und die Zellkultur wird bis  $OD_{600} = 0,6$  (2x10<sup>8</sup> Zellen/ml) gewachsen. In beiden Fällen erfolgt die Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator (180 Upm). Nach Erreichen der gewünschten OD wird die Kultur für 15 min auf Eis gestellt. Die Zellen werden 5 min mit 6000 Upm (GS-3 Rotor) bei 4°C abzentrifugiert und anschließend in 200 ml MilliQ-Wasser (4°C, autoklaviert) resuspendiert. Dieser Schritt wird einmal wiederholt, bevor die Zellen in 10% iger Lösung von DMSO in MilliQ-Wasser (4°C, steril) aufgenommen werden. Nach dem 40 µl der Zellen in der Elektroporation getestet wurden, aliquotiert man sie in gewünschter Weise (z.B. je 200 µl, Achtung: blaue Spitze abschneiden um Scherung der Zellen zu vermeiden!). Nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff erfolgt die Lagerung bei -80°C.

#### 4.1.2 Elektroporation kompetenter E. coli Zellen

Die Zellen werden auf Eis aufgetaut. Je 40 µl der Zellen werden mit ca. 1 µg DNA gelöst, in Wasser gemischt und in Elektroporationsküvetten (Biorad, 2mm Ø) blasenfrei gefüllt. Die Elektroporation erfolgt bei einem Resistenzwiderstand von 72 Ohm und 2 kV (BTX 600 Electro Cell Manipulator). Unter diesen Bedingungen stellt sich die Zeit automatisch auf 0,3 msec. Auf die Zellen werden sofort 300 µl LB-Medium gegeben, danach werden sie mit einer Pasteurpipette in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach 1h Inkubation bei 37°C werden sie auf entsprechende Medien ausplattiert (ausreichende Menge sind schon 100 µl der Zellsuspension, der Rest kann ÜN bei 4°C aufbewahrt werden). Routinemäßige Elektroporationseffizienzen liegen je nach *E. coli*-Stamm zwischen  $5x10^8$  und  $5x10^9$ /µg DNA (Dower *et al.*, 1988).

#### 4.1.3 Herstellung kompetenter E. coli Zellen für die CaCl<sub>2</sub>-Methode

Ausgehend von einer Einzelkolonie des entsprechenden Bakterienstammes wird eine ÜNK in 5 ml LB-Medium angeimpft. 500 ml LB-Medium, das 15mM MgCl<sub>2</sub> enthält, werden 1 : 500 mit der ÜNK angeimpft und die Zellkultur bis zu einer  $OD_{600} = 0,4$  bei 37°C im Schüttelinkubator (180 Upm) inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wird ausschließlich bei 4°C bzw. auf Eis gearbeitet und alle benutzten Lösungen und Behälter werden auf 4°C vorgekühlt. Die Zellen werden 15-20 min auf Eis abgekühlt und in Zentrifugenbecher überführt. Es folgt die Zentrifugation bei 2000g für 15 min. Das Zellsediment wird langsam in 200 ml steril filtrierter, 100mM CaCl<sub>2</sub> Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 2000g) werden die Zellen in 5 ml CaCl<sub>2</sub> Lösung resuspendiert und 20-24 h ins Eisbad gestellt. Danach werden die Zellen durch vorsichtige Zugabe von sterilem Glycerin (Endkonzentration von 10%) resuspendiert. Aliquots von je 0,2 ml werden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

# 4.1.4 Herstellung kompetenter E. coli Zellen für die CaCl<sub>2</sub>-Methode (optimiertes Protokoll nach Inoue et al., 1990)

Von einer Einzelkolonie des entsprechenden Bakterienstammes wird zunächst eine Übernachtkultur (ÜNK) in 5 ml LB-Medium angesetzt. Mit 2 ml dieser ÜNK werden 500 ml LB-Medium angeimpft, bei 18°C in einem Schüttler inkubiert und bis  $OD_{600}$ =0,6 aufgewachsen (ca. 40 h). Nach Erreichen der erforderlichen Zelldichte wird die Bakterienkultur 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend werden die Zellen in der Kühlzentrifuge sedimentiert (5 min, 5000 Upm, 4°C). Der Überstand wird verworfen, die sedimentierten Zellen werden vorsichtig in 100 ml eiskalter TBjab Lösung/2% (v/v) DMSO resuspendiert und danach erneut abzentrifugiert. Schließlich werden die Zellen in 80 ml eiskalter TBjab Lösung (ohne DMSO) vorsichtig resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut in der Kühlzentrifuge pelletiert und das Sediment in 18,6 ml eiskalter TBjab Lösung aufgenommen. Danach werden zur Zellsuspension 1,4 ml kaltes DMSO gegeben (Endkonzentration 7%), die Bakterien für 10 min auf Eis stehen gelassen, schließlich in Aliquots zu 200 µl portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Bem.: Es empfiehlt sich, alle Arbeiten im Kühlraum durchzuführen und vorgekühlte Materialien und Lösungen zu verwenden. Die auf diese Weise präparierten Zellen verfügen erfahrungsgemäß über eine Transformationseffizienz von  $\sim 1 \times 10^9$  Transformanten pro 0,2 ml Zellsuspension und 1µg superhelikaler Plasmid-DNA.

# 4.1.5 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E. coli Zellen nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode

Zur Transformation werden die kompetenten Zellen auf Eis langsam aufgetaut und je 80  $\mu$ l zur ebenfalls vorgekühlten DNA-Lösung gegeben (etwa 0,1pmol Plasmid-DNA eines Ligierungsansatzes oder 0,01pmol superhelikale DNA in max. Volumen von 10  $\mu$ l im Wasser). Der Transformationsansatz wird 45 min auf Eis inkubiert. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz folgt ein Hitzeschock für 2 min bei 37°C und eine anschließende Inkubation für 1 min auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium werden die Zellen für 45 min bei 37°C gehalten. Jeweils 80 - 200  $\mu$ l werden auf selektive Medien ausplattiert und bei 37°C solange inkubiert, bis Bakterienkolonien sichtbar sind (gewöhnlich ÜN). Die Transformationseffizienz ist stark vom Bakterienstamm abhängig. Sie wird mit 1ng superhelikaler Plasmid-DNA (4Kb) ermittelt und beläuft sich auf 1x10<sup>3</sup> - 3x10<sup>4</sup> Transformanten pro Gesamtansatz.

#### 4.1.6 Schnellmethode zur Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E. coli Zellen

Dieses einfache und schnelle Transformationsprotokoll beschrieben von Pope&Kent (Pope and Kent, 1996), reduziert das Standardverfahren der Transformation (s.o.) auf nur wenige Minuten. Die DNA wird dabei mit 200 µl Zellsuspension (siehe Abschnitt 4.1.5.) gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wird der Transformationsansatz auf einem selektiven LB-Agar, der auf 37°C vorgewärmt wurde, ausplattiert.

Bem.: Die hier beschriebene Schnellmethode zur Transformation von CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Zellen zeigt eine etwa 3-fach niedrigere Transformationseffizienz, wenn die verwendete Plasmid DNA einen Kanamyzin-Resistenzmarker trägt. Im Gegensatz zur Selektion mittels Ampizillin-, Tetrazyklin- oder Chloramphenicol-Resistenzmarkern erfordert die Transformation mit einer Kanamyzin-Resistenz offensichtlich eine "Erholungsphase" der Zellen.

#### 4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli

#### 4.2.1 Schnellmethode zur Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA aus E. coli Zellen ("Mini-Prep")

Die hier beschriebene Präparationsmethode ist abgeleitet von der Orginalvorschrift Birnboin und Doly (Birnboim and Doly, 1979). Das Prinzip sei im Folgenden erläutert.

Die Zellen werden durch Detergenzeinwirkung und osmotischen Schock aufgebrochen. Danach erfolgt die alkalische Denaturierung der Nukleinsäuren. Wird anschließend der pH-Wert erniedrigt, so kommt es zur Renaturierung der Nukleinsäuren. Dabei findet eine intermolekulare Renaturierung der chromosomalen *E. coli* DNA statt, die zur Ausbildung einer hochmolekularen, netzartigen Struktur führt, während die Plasmid-DNA aufgrund der topologischen Verknüpfung der Einzelstränge intramolekular renaturiert. Proteine werden durch SDS denaturiert. Zelltrümmer, Membranteile, denaturierte Proteine und chromosomale DNA können anschließend durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA und RNA abgetrennt werden.

Die Präparation sei in Kurzform für 5 ml ÜNK dargestellt, sie erfolgt bei RT, soweit nicht anders angegeben.

Nach zweimaligem Abzentrifugieren der Zellen in 1,5 ml Eppendorfröhrchen (5 min, 8000 Upm, Tischzentrifuge) wird das Bakteriensediment in 100  $\mu$ l Lösung I aufgenommen und auf dem Vortex gemischt. Der Zugabe von 200  $\mu$ l Lösung II, mischen und Inkubation für 3,5-4 min auf Eis folgt die Zugabe von 150  $\mu$ l Lösung III und mischen auf dem Vortex. Die Probe wird abzentrifugiert (10 min, 13000 Upm, Tischzentrifuge, 4°C) und der Überstand in ein neues Eppendorfröhrchen vorsichtig überführt. Es wird 1 ml von reinem Ethanol zum Überstand zugegeben und die Probe wird für 30 min bei –20°C inkubiert. Es folgt die Sedimentation der ausgefallenen Nukleinsäuren (5 min, 13000 Upm, Tischzentrifuge). Anschließend wird der Nukleinsäurepellet in 1 ml 4°C kaltem und 80% igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren (5 min, 13000 Upm, Tischzentrifuge) wird der Überstand verworfen und das Pellet im "Speed-Vac"-Konzentrator getrocknet. Das getrocknete Sediment wird in 50  $\mu$ l 1/4 x TE-Puffer aufgenommen.

Die Ausbeute an Plasmid-DNA beträgt je nach Kopienzahl des Plasmids in der Zelle ausgehend von 5 ml ÜNK etwa 3-5pmol.

Von der "Mini-Prep" DNA sind 5  $\mu$ l für die Restriktionsanalyse bzw. zur Charakterisierung in Agarose-Gelen ausreichend. Die vorhandene RNA wird durch Zugabe von RNAse A (Endkonzentration 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l) und Inkubation der Probe für 15 min bei 37°C verdaut.

# 4.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli Zellen über Anionenaustauscher-Chromatografie ("Maxi-Prep")

Die präparative Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen erfolgt nach einem modifizierten Protokoll der von Birnboim&Doly (Birnboim and Doly, 1979) beschriebenen Methode in Kombination mit einer Säulenchromatographie. Aufgrund ihrer Ladung lässt sich DNA über eine Anionen-Austauscher-Matrix reinigen. Zu diesem Zweck werden vorgepackte, kommerziell erhältliche Säulen (modifiziertes Silicagel) verwendet. Auf diese wird das Bakterienlysat in Gegenwart von 1M NaCl aufgetragen und anschließend gewaschen. Unter den gewählten Bedingungen bindet nur die Plasmid-DNA an die Matrix und restliche zelluläre Komponenten lassen sich dadurch entfernen. Die Plasmid-DNA wird durch die Erhöhung der Salzkonzentration eluiert und anschließend präzipitiert.

Die Aufreinigung wird wie folgt durchgeführt:

500 ml der ÜNK werden sedimentiert (5 min, 5000 Upm, Rotor GS-3) und das Bakteriensediment wird in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Es werden 10 ml Puffer P2 zugegeben und die Probe wird vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P3 erfolgt das Mischen durch Invertieren des Gefäßes. Die Suspension wird für 20 min bei 4°C und 15000g sedimentiert. (Der Zentrifugationsschritt sollte wiederholt werden, wenn der Überstand nicht klar ist). Eine entsprechende Säule (z.B. QIAGEN-tip-500) wird mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert und der Überstand des letzten Schritts auf die äquilibrierte Säule geladen. Nach Durchlauf des Bakterienlysates wird die Säule mit 30 ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wird anschließend durch 15 ml Puffer QF eluiert und gesammelt. Durch Zugabe von 0,7fachem Volumen Isopropanol wird die DNA gefällt. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation (12000 Upm, 20 min bei 4°C im Sorvall HB-4 Rotor) gesammelt und anschließend mit 80% igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen der DNA im "Speed-Vac"-Konzentrator erfolgt das Lösen der DNA in einem geeigneten Volumen TE-Puffer.

Die so gewonnene DNA ist von einer Qualität, die ihren Einsatz bei der Transfektion eukaryotischer Zellen ermöglicht.

# 4.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

#### 4.3.1 Extraktion von Proteinen aus DNA-Lösungen

Zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen versetzt man diese mit dem gleichen Volumen an äquilibriertem Phenol.

# 4.3.1.1 Äquilibrierung des Phenols

Phenol muss vor Gebrauch äquilibriert bzw. sein pH-Wert eingestellt werden, zusätzlich wird es durch Zusatz von Antioxidantien haltbar gemacht.

Phenol bei 65°C schmelzen, 0,1 g 8-Hydroxyquinolin / 100 ml hinzufügen (Gelbfärbung). Mit jeweils dem gleichen Volumen 1M Tris/HCl, pH 8,0 solange ausschütteln, bis der pH-Wert der wässrigen Oberphase im neutralen Bereich liegt (pH 6,5-7,5). Zuerst mit 1x Vol. 0,1M Tris/HCl, pH 8,0, 0,2% 2-Mercaptoethanol äquilibrieren, bevor es mit 1x Vol. 10mM Tris/HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, 0,2% 2-Mercaptoethanol erneut äquilibriert wird.

Nach dem letzten Äquilibrierungsschritt ist die wässrige Phase zu belassen. Die Lagerung erfolgt lichtgeschützt bei 4°C.

#### 4.3.1.2 Phenol- und Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Nukleinsäurelösungen mit hohem Proteinanteil oder mit schwer zu inaktivierenden Enzymen (RNAse A) werden mit reinem Phenol extrahiert. In der Regel genügt allerdings eine Phenol/Chloroform -Extraktion, bei der auf die nachfolgende Chloroform-Extraktion verzichtet werden kann.

Zur Extraktion werden die DNA-Lösungen mit dem gleichen Volumen an Phenol bzw. Phenol / Chloroform versetzt. Zur Vermeidung von Verlusten sollte, wenn möglich, bereits vor der Extraktion 1/10 Volumen vom 3M K-Acetat zugefügt werden. Beide Phasen werden durch kräftiges Schütteln gemischt und danach zur Phasentrennung zentrifugiert (Tischzentrifuge, 5min, 13000 Upm). Die wässrige Oberphase wird abgenommen und bei Bedarf (sichtbare Interphase denatuierter Proteine) erneut extrahiert. Da zur weiteren Verwendung die DNA von Phenolresten befreit werden muss, erfolgt danach eine Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, gleiches Volumen). Anschließend wird eine Ethanolfällung durchgeführt und die DNA in einem gewünschtem Volumen 1x TE-Puffer aufgenommen.

# 4.3.2 Konzentrierung von Nukleinsäurelösungen

#### 4.3.2.1 Reinigung von Glykogen als Fällhilfe

Glykogen aus Austern wird in 1xPBS gelöst und 30 min mit 10  $\mu$ g/ml DNAse I in Gegenwart von 8mM MgCl<sub>2</sub> bei 37°C inkubiert. Es folgt eine Proteinkinase-K Behandlung (100  $\mu$ g/ml in Gegenwart von 0,1% SDS bei 50°C) und 2-Phenol sowie 1-Phenol/Chloroform-Extraktion. Die wässrige Phase wird 2x4 h gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Aus dem Lyophylisat wird eine Stammlösung von 100 mg/ml in MilliQ-Wasser hergestellt.

#### 4.3.2.2 Konzentrierung von Nukleinsäurelösungen und Ethanolpräzipitation

Lösungen mit sehr geringer Nukleinsäurekonzentration können durch Gefriertrocknen konzentriert werden, wobei darauf zu achten ist, dass je nach Salzgehalt der Anfangslösung relativ hohe Salzkonzentrationen auftreten können, die die nachfolgenden Reaktionen mit dieser DNA behindern könnten. Alternativ können Trägersubstanzen (tRNA, Glykogen) zugemischt werden, die eine anschließende Konzentrierung der DNA durch Ethanolpräzipitation erlauben. Bei der Ethanolpräzipitation wird die Nukleinsäurelösung zunächst mit 1/10 Volumen 3M Kaliumacetat versetzt, bevor das 2,5-3fache Volumen an –20°C kaltem Ethanol zugesetzt wird. Aus dieser nun ca.70% igen Ethanollösung fallen die Nukleinsäuren als Kaliumsalze aus. Zur quantitativen Fällung aus Lösungen mit geringer Nukleinsäurekonzentration (weniger als 10 µg/ml) werden diese 20 min bei –80°C eingefroren und langsam wieder aufgetaut. Nach Abzentrifugieren der Nukleinsäuren (Tischzentrifuge, 10min, 13000 Upm, 4°C) wird das Sediment mit 80% igem Ethanol gewaschen und im "Speed-Vac"-Konzentrator 1-2 min getrocknet. Die DNA kann dann in einem beliebigen Volumen 1xTE-Puffer oder Wasser aufgenommen werden.

#### 4.3.3 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen

Gemäß dem Lambert-Beer´schen Gesetz ist die Konzentration einer Lösung direkt proportional zu ihrer Extinktion bzw. Absorption. Diese Relation macht man sich bei der spektralphotometrischen Quantifizierung von wässrigen Nukleinsäurelösungen zu Nutze.

Von einer Verdünnung der gereinigten Nukleinsäure wird im Spektralphotometer die Absorption bei 260nm (Absorptionsmaxima der Nukleinsäuren) und bei 280nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Die Messung erfolgt in 500  $\mu$ l Quarz-Küvetten. Es gilt folgende Relation zwischen gemessener Absorption und Konzentration der Nukleinsäure:

 $\begin{array}{ll} dsDNA: & 1 \ OD_{260} = 50 \ \mu g/ml \\ ssDNA: & 1 \ OD_{260} = 40 \ \mu g/ml \\ ssOligonukleotide: & 1 \ OD_{260} = 30 \ \mu g/ml \end{array}$ 

Ein Maß für die Verunreinigung mit Protein liefert das Verhältnis  $OD_{260}$ /  $OD_{280}$ . Dieses sollte für proteinfreie Nukleinsäurelösungen 1,7-1,9 betragen.

#### 4.3.4 Elektroelution in "Hochsalz"

Elektroelution eignet sich für die Isolierung der DNA-Fragmente aus PAA-Gelen. Gegenüber Agarose-Gelen bietet die Verwendung von PAA-Gelen zur präparativen Isolierung von DNA-Restriktionsfragmenten den Vorteil, dass "Verunreinigungen" von superhelikaler Plasmid-DNA nicht in die PAA-Matrix eindringen. Somit kann störende ccc-Plasmid-DNA quantitativ von den zu isolierenden DNA-Restriktionsfragmenten abgetrennt werden.

Die betreffende DNA-Bande wird nach EtBr-Färbung mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in die "Salzfalle", einer speziell für die Elektroelution angefertigten Apparatur gegeben. Dabei wird die DNA bei geringer Ionenstärke (1/2x TBE-Puffer, 180 V) aus dem Gelstück eluiert und wandert in ein sogenanntes "Hochsalzkissen" (75  $\mu$ l an 3M Na-Acetat, angefärbt mit Bromphenolblau). Hier erfolgt ein Ladungsausgleich, wodurch die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA soweit reduziert ist, dass sie an der der Kathode zugewandten Seite des Salzkissens akkumuliert. Die Elution wird, abhängig von der Größe des DNA-Fragments, zweimal für 15-45 min durchgeführt. Dabei wird das Eluat (200  $\mu$ l) jeweils mit einer 1 ml Spritze (wobei die Spitze der Kanüle abgeschnitten wurde) entnommen. Aus dieser Lösung wird die DNA mit 2,5fachem Volumen Ethanol gefällt, mit 80% igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem adäquaten Volumen an TE-Puffer aufgenommen. Elutionen radioaktiv markierter DNA-Fragmente zeigten, dass Moleküle kleiner 200Bp praktisch quantitativ, Fragmente bis 1000Bp zu > 80% eluiert werden können.

#### 4.3.5 Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen (Silica-Adsorption)

Für die DNA-Isolierung können mehrere Materialien, z. B. Glasmatrizen oder Ionenaustauschharze angewendet werden. In dieser Arbeit erfolgte die Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen über eine Silica-Matrix (Boyle, 1995).

Die Silica-Matrix (Sigma S-5631) wird in 1xPBS gelöst (100 mg/ml). Die Lösung wird für 2 h bei RT inkubiert, damit die Silica-Partikel sedimentieren können. Der Überstand, der die feinen Teilchen des Matrix-Materials enthält, wird vorsichtig entfernt, und das Verfahren wird einmal wiederholt. Nach einer Zentrifugation (2000g, 2 min) wird das Silica-Sediment in 3M NaI resuspendiert (Endkonzentration 100 mg/ml) und als DNA-Bindungsmatrix benutzt. Die Bindungskapazität pro mg Silikat beträgt 4-5 µg DNA. Die Methode sei wie folgt kurz beschrieben :

Die DNA-Bande wird aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten und das Gelstück gewogen. Es werden zwei Volumenanteile von 6M NaI bezüglich des Gelstückgewichts und die Silica-Matrix (per 100 mg Gelmaterial 10 µl Silica-Matrix) zugegeben. Das Gelstück wird für 15 min bei 55°C im Heizblock unter gelegentlichem Mischen geschmolzen. Die Probe wird für 10 sec bei RT und 12000 Upm in der Tischzentrifuge sedimentiert. Das

Silica-Sediment, das die gebundene DNA enthält, wird in 500 µl Waschpuffer resuspendiert. Nach einer Zentrifugation von 10sec bei RT und 12000 Upm in der Tischzentrifuge wird dieser Waschschritt einmal wiederholt. Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes wird das Silica-Sediment in "Speed-Vac" Konzentrator getrocknet und die gereinigte DNA in 1xTE-Puffer (20-30 µl) aufgenommen.

#### 4.3.6 Aufreinigung synthetisierter Oligonukleotide ("primer")

Die Oligonukleotidlösung aus der Synthese wird mit 1xTE-Puffer auf 300 µl Vol. aufgefüllt. Verbleibendes Trägermaterial wird durch eine kurze Zentrifugation in der Tischzentrifuge abgetrennt und der Überstand mit 3 µl 1M MgCl<sub>2</sub>, 50 µl 3M Na-Acetat, pH 5,2 und 900 µl 100% EtOH gemischt, 5 min bei RT inkubiert und gefällt. Nach 5 min Zentrifugation wird das Sediment in 80% EtOH gewaschen, in "Speed-Vac" Konzentrator getrocknet, danach in 300 µl 1xTE-Puffer gelöst und die Oligonukleotidkonzentration photometrisch bestimmt. DNA-Oligonukleotide enthalten nach der Synthese nicht nur das gewünschte Produkt, sondern auch Nebenprodukte, die durch eine Gelelektrophorese abgetrennt werden. Hierzu ist es notwendig, intramolekulare Sekundärstrukturbereiche der Oligonukleotide aufzulösen, da diese das Laufverhalten in einem Gel beeinflussen. Polyacrylamidgele (15-20% PAA mit 8,3M Harnstoff, Vernetzungsgrad 40 : 1, Dicke 2,5 mm, 1xTBE-Puffer) werden für mindestens 1 h bei 25 V/cm "vorelektrophoresiert". Den Proben wird das 1,5fache Vol. an FA-Probenpuffer zugegeben. In der Regel wird der Lauf bei 25 V/cm für 1-2 h durchgeführt. Die Oligonukleotide werden durch Auflegen des Gels auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte und Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht sichtbar gemacht. Die Bande der entsprechenden Größe wird aus dem PAA-Gel herausgeschnitten. Aus ihr wird das Oligonukleotid 20 min bei 150 V in der Salzfalle (4.3.4) eluiert, die oligonukleotidhaltige Salzlösung (100 µl) mit einer Kanüle entnommen und dieser Schritt noch einmal wiederholt. Anschließend werden die Oligonukleotide durch Zugabe von 100% EtOH gefällt und in 1x TE-Puffer aufgenommen.

#### 4.3.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Nach der PCR müssen nicht eingebaute Nukleotide, "primer" und Enzyme vom Produkt abgetrennt werden. Dies kann durch eine PAA-Gelelektrophorese und die nachfolgende Isolierung der gewünschten Bande mittels Elektroelution erfolgen. Bei Verwendung von Agarose-Gelen werden häufig Kontaminationen der Agarose mit eluiert, die die anschließende enzymatische Behandlung der DNA behindern können. Alternativ kann die Reinigung über eine Säulenchromatographie erfolgen.

Verwendet wurden vorgepackte Zentrifugationssäulen der Fa. Qiagen ("QIAquick-spin PCR Purification Kit"). Zur Reinigung werden 0,5 ml des Puffers PB zum PCR-Ansatz gegeben und auf die Säule geladen. Eine vorherige Extraktion des Mineralöls ist nicht nötig. Die Säule wird für 60 sec bei 13000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und das Eluat verworfen. Die gebundene DNA wird mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und die Säule, wie oben beschrieben, zweimal zentrifugiert, um den Puffer restlos zu entfernen. Die Säule wird in ein frisches Eppendorfröhrchen überführt und die DNA mit 50 µl 1xTE-Puffer durch eine weitere Zentrifugation eluiert.

# 4.4.1 Restriktionanalyse

μg S Bp K

Die Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen dient u.a. der Analyse von Plasmiden, und im präparativen Maßstab zur Gewinnung von DNA-Fragmenten zur *in vitro*-Rekombination neuer Plasmide. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische dsDNA-Sequenzen erkennen und beide Stränge schneiden. Dabei unterscheidet man zwischen Restriktionsendonukleasen vom Typ I, II und III. Für die molekularbiologische Forschung sind hauptsächlich Typ II-Restriktionsendonukleasen von Interesse. Restriktionsendonukleasen des Typ II sind Enzyme, die 4-, 5-, 6- oder 8-Bp lange, spezifische DNA-Sequenzen erkennen und dort beide Stränge der DNA schneiden. Dabei entstehen 5'-phosphorylierte und 3'-hydroxylierte Enden. Auf diese Weise ist es möglich, DNA-Moleküle sequenzspezifisch zu fragmentieren. Grundsätzlich benötigt jedes Restriktionsenzym individuelle Reaktions-bedingungen zur Hydrolyse, die vom Vertreiber angegeben werden. Besitzen mehrere Restriktionsenzyme gleiche Anforderungen hinsichtlich der Reaktionsbedingungen, so kann eine DNA gleichzeitig mit einer Mischung dieser Enzyme fragmentiert werden. Analytisch werden etwa 0,1pmol der Plasmid-DNA fragmentiert. Das Ansatzvolumen ist abhängig von der Menge an Restriktionsenzym, die eingesetzt werden soll, da die Glycerinkonzentration (Restriktionsenzym-Lagerpuffer enthalten bis zu 50% Glycerin) im Ansatz 10% nicht überschreiten sollte. Die Menge an eingesetztem Restriktionsenzym pro Ansatz berechnet sich nach folgender Formel:

	µl einzusetzendes Enzym =	µg x 50000 x S
		Bp x K x S*
=	Menge der zu schneidenden DN	А
=	Anzahl der Schnittstellen des Er	nzyms in der DNA
=	Länge der DNA in Basenpaaren	
=	Konzentration des Enzyms (U/µ	1)

S\* = Anzahl der Schnittstellen des Enzyms im -Genom

Die Inkubationszeit liegt bis auf wenige Ausnahmen wie PacI (ÜN) zwischen 0,5 h und 2 h. Bei Fragmentierung von "Mini-Prep"-DNA muss infolge des großen Anteils an RNA dem Ansatz zusätzlich RNAse A (25 µg/ml in der Endkonzentration) zugegeben werden. Hitzelabile Restriktionsenzyme werden durch 5-minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert, während hitzestabile Restriktionsenzyme über eine Phenol / Chloroform-Extraktion entfernt werden.

# 4.4.1.1 Partieller Restriktionsverdau

Durch Zugabe von EtBr zu dem Restriktionsansatz kann ein unvollständiger Verdau der DNA erzielt werden. Dies kann bei solchen Klonierungsansätzen hilfreich sein, bei denen das Fragment mit einem Restriktionsenzym verdaut werden soll, das mehr als einmal in der Sequenz schneidet. Es werden 30ng DNA/µl Endvolumen mit der äquimolaren Menge von 30ng/µl EtBr und 0,2U/µl der Restriktionsendonuklease (in Wasser mit 1x Restriktionspuffer) für 1h bei 37°C inkubiert. EtBr wird mittels Extraktion mit gesättigtem Butanol (1:1 in Wasser) entfernt und die DNA vor der weiteren Analyse mittels EtOH-Fällung gereinigt.

# 4.4.2 Analyse der DNA mittels Gel-Elektrophorese

Durchlaufen Nukleinsäuren im elektrischen Feld eine Trägermatrix (Gel) so werden sie infolge ihres konstanten Ladungs-Masse-Verhältnisses proportional zum Molekulargewicht, bzw. ihrer topologischen Form aufgetrennt. Je nach Art der Auftrennung, die man erreichen möchte, hat man die Möglichkeit zwischen verschiedenen Gelsystemen (Agarose-Gele, PAA-Gele) zu wählen, sowie durch Änderung der Polymerisationsbedingungen verschiedene Vernetzungs-grade im Gel zu erzeugen.

Das parakristalline Maschensystem der Agarose-Gele erlaubt die Auftrennung hochmolekularer DNA (einige 100 bis mehrere 1000 Basenpaare). Die Maschendichte wird von der Agarosekonzentration bestimmt, die zwischen 0,5 und 2,5% variiert werden kann.

Die durch Polymerisation entstandene, kovalent verknüpfte Matrix der Polyacrylamid-Gele erlaubt die Auftrennung kleinerer DNA-Moleküle (Oligonukleotide bis Fragmente von wenigen kBp). Bei diesem Gelsystem beeinflussen sowohl die Acrylamidkonzentration, als auch der Vernetzungsgrad seine Auflösungseigenschaften.

Die Herstellung, Verwendung und Behandlung der verschiedenen Gelsysteme ist prinzipiell von Sambrook et al., (Sambrook et al., 1989) beschrieben.

# 4.4.2.1 Auftrennung hochmolekularer DNA und topologischer Isomere im Agarose-Gel

Agarose-Gele finden Verwendung zur Auftrennung hochmolekularer DNA (>1000Bp). Man stellt dabei die topologische Form und die Größe von Plasmid-DNA fest. Normalerweise wird eine 0,8% ige Agarosesuspension in 1/2x Loening-Puffer angesetzt und durch Kochen im Mikrowellenherd gelöst . Nachdem die Lösung auf ca. 50-60°C abgekühlt ist, wird sie in eine mit einem "Kamm" bestückte Flachgelapparatur gegossen. Nach Erstarren der Lösung überschichtet man das Gel mit 1/2x Loening-Puffer (ca. 2-3 mm) und entfernt den Kamm. In die Aussparungen, die der Kamm hinterlassen hat, werden die Proben aufgetragen, welche zuvor mit 1/10 des Volumens mit DNA-Auftragspuffer (10fach konzentriert) gemischt wurden. Dies erleichtert auf Grund des hohen Saccharosegehalts (6%) das Auftragen der Proben. Darüber hinaus erlauben die im Auftragspuffer enthaltenen Farbmarker eine Kontrolle der während der Elektrophorese zurückgelegten Laufstrecke. Für 0,8% ige Gele gilt, dass Orange G an der Lauffront wandert, während Xylencyanol etwa mit einem DNA-Molekül der Größe von 2kBp komigriert. Die Elektrophorese wird bei 5-10 V/cm in einer Flachgelapparatur über die erforderliche Zeit durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wird die DNA im Agarose-Gel für 20 min in Ethidiumbromidlösung (1  $\mu$ g/ml) angefärbt und kann im UV-Licht (250-360 nm) sichtbar gemacht und photographiert werden. Die Nachweisgrenze liegt dabei bei 20 ng pro "DNA-Bande".

#### 4.4.2.2 Auftrennung niedermolekularer dsDNA in nativen PAA-Gelen

Zur Analyse von DNA-Fragmenten von 40 bis 2000Bp werden 4-8% ige PAA-Gele mit einem Vernetzungsgrad von 30:0,8 (AA:Bis-AA) in 1xTA-Puffer benutzt. Zur Einleitung der Polymerisation werden der Acrylamidlösung nacheinander 0,2% TEMED (als Radikal-stabilisator) und 0,4% APS (als Radikalstarter, 10% in H<sub>2</sub>O) zugegeben. Danach wird die Lösung zügig und blasenfrei zwischen zwei Glasplatten gegossen (Polymerisierungszeit ca. 30 min). Die Dicke der Gele beträgt in der Regel 1,0mm für analytische, und 2,5 mm für präparative Gele. Den Proben wird 1/10 Volumen DNA-Probenauftragspuffer zugegeben. Die Elektrophorese wird in einer Vertikalgelapparatur und wird mit 15 V/cm durchgeführt. In 6% PAA-Gelen wandert Xylencyanol mit DNA-Fragmenten von 250bp, Bromphenolblau mit DNA-Fragmenten von 70bp und Orange G kurz vor der Lauffront.

#### 4.4.2.3 Anfärben von DNA in Gelen mit Ethidium-Bromid

Das Verfahren ist für Agarose- und PAA-Gele identisch. Ethidium-Bromid (EtBr ) interkaliert in Nukleinsäuren und kann durch Bestrahlung mit ultrakurzwelligem Licht zur Fluoreszenz angeregt werden (optimale Intensität bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 254 nm).

Das Gel wird für 10-30 min in einer EtBr-Lösung (1 µg/ml) angefärbt. Unspezifisch in das Gel eingelagertes EtBr wird durch 10-30 minütiges Waschen in Wasser entfernt. Auf einer UV-Platte (Wellenlänge 203 nm) wird die angefärbte DNA sichtbar gemacht und kann unter Verwendung eines UV- und eines Orange-Filters photographisch dokumentiert werden.

#### 4.4.3 Enzymatische DNA-Sequenzierung nach Sanger

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine modifizierte Dideoxy-Kettenterminationsmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) angewandt. Es handelt sich um eine Entwicklung der Fa. Pharmacia LKB (<sup>T7</sup>Sequencing Kit, Nr. 27 1682-01). Die Methode beruht auf einer *in vitro* Replikation der DNA mit der DNA-Polymerase des Bakteriophagen T7. Das Prinzip sei im Folgenden kurz erläutert:

Eine DNA-Matritze wird in vier verschiedenen Ansätzen sequenziert, dabei wird jedem Ansatz neben den vier 2'Deoxynukleotiden (dXTPs) je ein 2',3'Dideoxynukleotid (ddXTP) in einer relativ geringen Konzentration zugesetzt. Der statistische Einbau eines Dideoxynukleotids führt zum nukleotidspezifischen Abbruch der Vermehrung. Diese Reaktion liefert somit eine Population von Molekülen statistischer Größe. Allen Molekülen gleicher Größe ist gemeinsam, dass sie mit dem gleichen Dideoxynukleotid enden. Durch Vergleich der vier Ansätze mittels gelelektrophoretischer Auftrennung (4.4.3.1) kann nun jeder Position des vermehrten Moleküls ein ganz bestimmtes Nukleotid zugeordnet werden. Als Matrize wird in dieser Methode superhelikale Doppelstrang-DNA verwendet (ccc-Plasmide aus "Mini-Prep"). Um die Reaktion sequenzspezifisch innerhalb des Plasmids zu starten, wird ein kurzes, synthetisches Oligonukleotid ("Primer") mit entsprechend komplementärer Sequenz hybridisiert. Um eine Analyse durch Autoradiographie zu ermöglichen, ist in jeder Reaktion <sup>35</sup>S-dATP zur radioaktiven Markierung der Produkte enthalten. Die Reaktionen in Eppendorfröhrchen bzw. Mikrotestplatten durchgeführt werden. Die Sequenzierung wird nach folgendem Protokoll durchgeführt :

- a) Alkalische, irreversible Denaturierung:
- Mischen von 1,5-2,0 µg DNA (z.Bsp. aus "Mini-Prep") in 8 µl Wasser mit 2 µl 2M NaOH.
- Inkubation für 10 min bei RT.
- Zugabe von 3 µl 3M NaAc, pH 4,5, 7 µl Wasser und 75 µl Ethanol zum Fällen der DNA,
- Inkubation bei -80°C für 30min.
- Abzentrifugieren (Tischzentrifuge, 13000 Upm, 10 min, 4°C), Waschen des Sediments mit 80% igen Ethanol, erneutes Abzentrifugieren (s.o.), Trocknen im "Speed-Vac" Konzentrator und Aufnehmen des Präzipitats in 10 μl sterilem Wasser.
- b) Hybridisieren der "Primer":
- Zugabe von 2 μl "Primer" (1pmol) und 2 μl Hybridisierungspuffer, Inkubation zuerst für 20 min bei 37°C, dann 10 min bei RT.
- c) Sequenzier-Reaktion:
- Verdünnen der T7- DNA-Polymerase auf 1,5 U/µl (1:10) in "T7"-Verdünnungspuffer.
- Vorlegen von je 2,5 μl des nukleotidspezifischen Reaktionsmix "Short" in die vier farbigen Reaktionsröhrchen und Vorwärmen auf 37°C.
- Starten der Reaktion durch Zugabe von 3 µl "Markierungsmix" A, 0,5-1 µl <sup>35</sup>S-dATP
- $(5-10 \ \mu\text{Ci})$  und 2  $\mu$ l T7-Polymerase, Mischen und kurz abzentrifugieren, Inkubation für 5 min bei RT. d) Polymerisations-Reaktion:
- Zugabe von je 4,5 μl der Sequenzier-Reaktion in die vorgewärmten Röhrchen mit dem Reaktionsmix "Short", Mischen durch Auf- und Abpipettieren, Inkubation bei 37°C für 5 min.
- e) Terminations-Reaktion:
- Beenden der Reaktion durch Zugabe von je 5 µl Stopplösung, Mischen durch Auf- und Abpipettieren
- Inkubation bei 80°C für 2 min.
- Auftragen der radioaktiven Reaktionsgemische auf ein Sequenziergel oder Aufbewahren bei -20°C.

#### 4.4.3.1 Gelelektrophoretische Analyse von DNA-Sequenzierungsansätzen

Bei der Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977) entstehen radioaktiv markierte ssDNA-Produkte, die entsprechend ihrer Länge durch Gelelektrophorese aufgetrennt werden.

Zur elektrophoretischen Analyse einzelsträngiger DNA ist es notwendig, dem Gelsystem denaturierende Agenzien wie Harnstoff hinzuzufügen. Diese interagieren mit Wasserstoffbrücken gepaarter Basen und lösen dadurch Sekundärstrukturen auf, die das Laufverhalten von einzelsträngigen Nukleinsäuren entscheidend beeinflussen. Die niedrige Ionenstärke des Gelsystems stellt für den elektrischen Strom einen erheblichen Widerstand dar; die dadurch entstehende Wärme begünstigt zusätzlich das Aufschmelzen von Sekundärstrukturen.

Radioaktiv markierte ssDNA Produkte aus Sequenzierreaktionen (4.4.3) werden wie folgt analysiert:

Es werden 6% ige PAA-Gele mit 8,3 M Harnstoff verwendet (Vernetzungsgrad: 30:0.8, Dicke: 0,3 mm, 1x TBE-Puffer). Die Gelmatrix wird gewöhnlich kovalent an die Rückenplatte ("nicht-Ohrenplatte") gebunden. Dazu wird diese mit Methacryloxypropyltrimethoxy-Silan wie folgt behandelt:

Die Glasplatte wird mit 70% igem Ethanol gründlich gereinigt. Die Platte wird mit 150 µl Essigsäure (10%) und 15 µl Silan in 15 ml Ethanol abgerieben und mit der Silanlösung unter dem Abzug benetzt. Nach 10 min wird die Glasplatte mit VE-Wasser gewaschen und getrocknet.

Zum leichteren Abheben der Öhrenplatte wird diese mit einer 2% igen Dichlor-Dimethylsilan-Lösung (in Chloroform) behandelt. Überschüssige Silanlösung wird durch Waschen mit VE-Wasser entfernt. Das Gel wird bei 25 V/cm vorelektrophoresiert, um es auf seine "Betriebstemperatur" (60-80°C) zu bringen. Die Taschen des Gels müssen vor dem Auftragen der Proben mit Laufpuffer ausgespült werden, da aus dem Gel diffundierender Harnstoff das Beladen des Gels und dadurch die Auftrennung ungünstig beeinflusst. Die Elektrophorese erfolgt bei 25 V/cm für 1-3 h in 1x TBE-Puffer.

Nach Beendigung der Elektrophorese wird die Ohrenplatte entfernt und die DNA im Gel durch 20minütige Inkubation in 10% iger Essigsäure fixiert. Anschließend wird 30 min gewässert, um den Harnstoff aus dem Gel zu waschen. Danach wird das Gel auf der Glasplatte im Mikrowellenherd getrocknet (30 min, auf Stufe "Auftauen"). Die Gele werden durch den Wasserentzug sehr dünn, was zu einer Verschärfung der Banden aufgrund der geringeren Streuung/Absorption der β-Strahlung führt. Die Autoradiographie erfolgt bei Verwendung von <sup>35</sup>S ohne Intensivierungsfolie bei RT.

# 4.5 In vitro Modifikation und Rekombination von DNA

#### 4.5.1 Dephosphorylierung der 5 Enden von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase

Zur Vermeidung unerwünschter Ligierungen (z.B. Religation geschnittener Vektoren), entfernt man das 5'-Phosphat der DNA und erzeugt "freie" 5'-hydroxylierte Enden. Hierbei werden

0,1-10pmol DNA bei 37°C für 30 min im Volumen von 50 µl mit 0,5U alkalischer Phosphatase inkubiert (Pufferbedingungen nach Herstellerangaben).

Bevor die Fragmente für die Ligierung eingesetzt werden können, muss das Enzym durch Phenol-Extraktion und anschließendes Ausfällen der DNA entfernt werden.

#### 4.5.2 Phosphorylierung von 5'-hydroxylierten Enden durch Polynukleotidkinase

Das Enzym Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert die Übertragung der terminalen Phosphatgruppe von ATP auf das 5'-OH Ende von DNA-Fragmenten und einzelsträngigen Oligonukleotiden. Für eine quantitative Phosphorylierung verwendet man einen 3-5fachen molaren Überschuß an ATP gegenüber den Nukleinsäure-Enden, stellt die Pufferbedingungen des 20 µl Ansatzes durch Zugabe von 10-fach konzentriertem PNK-Puffer ein und inkubiert bei 37°C für 20 min. Die eingesetzte Menge PNK beträgt 10U/20µl. Nach Beendigung der Reaktion wird das Volumen mit TE-Puffer auf 100 µl erhöht und eine Phenol-Extraktion durchgeführt. Die phosphorylierten Fragmente werden mit Ethanol präzipitiert, gewaschen und in entsprechendem Puffer aufgenommen.

# 4.5.3 Auffüllen von 5'-überhängenden, bzw. Entfernen von 3'-überhängenden, einzelsträngigen DNA-Enden durch T4 DNA-Polymerase

Für bestimmte Anwendungen, z. B. der Ligierung von DNA-Fragmenten mit nicht kompatiblen Enden, ist es notwendig, doppelsträngige und glatte Enden ("blunt ends") zu erzeugen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu das Enzym DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4 verwendet. Das Enzym besitzt zwei unterschiedliche Aktivitäten: In der Gegenwart von Deoxyribonukleosidtriphosphaten (dXTP) katalysiert es die Polymerisation an verkürzten Hydroxylenden von DNA-Fragmenten. Dadurch lassen sich 5'-überhängende, einzelsträngige DNA-Enden zu doppelsträngigen, glatten Enden auffüllen.

In Abwesenheit von dXTPs besitzt die Polymerase eine sehr aktive, einzelstrangspezifische 3'-5'-Exonukleaseaktivität, wodurch sich 3'-überhängende Enden entfernen lassen. Die Reaktion findet in einem Volumen von 20-50 µl 1xT4-Reaktionspuffer für 30 min bei 37°C statt. Zur Auffüllreaktion werden dem Ansatz 0,1pmol dNTPs zugegeben.

### 4.5.4 Kovalentes Verknüpfen von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Das Enzym DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphoryltermini doppelsträngiger DNA.

Eine Einheit des Enzyms (1U) ist definiert als die Ligasemenge, die notwendig ist, um die Konversion von 1nmol <sup>32</sup>P<sub>i</sub> in ATP bei 37°C in 20 min zu katalysieren (Weiss-Unit).

Die Menge an Ligase im jeweiligen Reaktionsansatz hängt von mehreren Faktoren ab, z. B. der Natur der zu

ligierenden DNA-Fragmente ("blunt"-Enden oder Enden mit 3′- oder 5′-Überhängen), der Stabilität der Wasserstoffbrücken-Struktur, der Inkubationstemperatur und der Konzentration von DNA-Fragmenten.

In dieser Arbeit wurden alle Ligierungsansätze in 10  $\mu$ l oder 15  $\mu$ l Endvolumen durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen werden mit 10x Ligase-Puffer eingestellt. Die Ligasekonzentration liegt bei 10U/ml. Die Menge an eingesetzter DNA bei Fragmentligierungen kann zwischen 0,05 und 2pmol liegen. Für Klonierungen wird das Insert in einem 3-5fachen Überschuß bezüglich des Plasmids eingesetzt. Die Inkubation erfolgt bei 16°C ÜN. Für die Elektroporation wird die DNA mit Ethanol gefällt, zweimal mit 80% igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20  $\mu$ l Wasser aufgenommen. Davon werden 1-5  $\mu$ l für die Elektroporation eingesetzt (Siehe 4.1.2). Für eine Transformation mittels der Kalzium-Chlorid-Methode kann die DNA direkt aus dem Ligationsansatz (1-10  $\mu$ l) verwendet werden.

#### 4.5.5 Enzymatische in vitro Amplifikation von DNA mittels Taq-Polymerase (PCR) (Saiki et al., 1988)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann selektiv eine DNA-Sequenz *in vitro* amplifiziert werden. Die Synthese wird dabei an zwei "Primern" gestartet, die so gewählt sind, dass sie den zu amplifizierenden Bereich

flankieren. Die PCR wird in einem sog. "Thermocycler" durchgeführt und besteht prinzipiell aus drei Schritten, deren einzelne Parameter für die jeweiligen "Template-Primer"-Kombinationen individuell optimiert werden müssen.

Der initiale Prozess ist die thermische Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge bei über 90°C für 15 Sek. bis 2 min. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes auf 45-65°C können die Primer sequenzspezifisch an die DNA-Matrize hybridisieren. Schließlich erfolgt beim Temperaturoptimum der thermostabilen DNA-Polymerase (72-74°C) die DNA-Neusynthese ausgehend von den 3'-OH-Enden der beiden einhybridisierten Primer.

Dieser Zyklus wird je nach den Erfordernissen 7-35-mal wiederholt. Das amplifizierte DNA-Fragment wird final durch Gel-Elektrophorese und anschließender Elution gereinigt. Alternativ können kommerziell erhältliche "Kits" zur Aufreinigung von PCR-Produkten verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zur Isolierung und Klonierung bekannter DNA-Sequenzen benutzt. Die verwendeten Primer besaßen Schnittstellen für Restriktionsenzyme, wodurch sich DNA-Fragmente mit definierten Enden erzeugen ließen.

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden in Rahmen dieser Arbeit folgende Bedingungen gewählt:

Reaktionsvolumen	100 µI
Plasmid DNA-Matrize	0,05pmol/µl
"Primer"	je 30pmol/µl
Taq-Polymerase	1U
Nukleotide (dXTP`s)	je 200µM
Puffer	50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8,3
MgCl <sub>2</sub>	2mM
Die Reaktion erfolgt in 0,5 ml Eppendorf-Ge	efäßen nach folgendem Zyklus(25x):
Denaturieren der DNA	10 sec, 95°C
Hybridisieren der "Primer"	20 sec, 55°C
Elongation	1 min, 72°C
Nach 25 Zultion wind die Desition dunch	ning 5 min Inkubation bai 72°C abased

Nach 25 Zyklen wird die Reaktion durch eine 5 min Inkubation bei 72°C abgeschlossen und anschließend ein Aliquot der Reaktion (5-10µl) elektrophoretisch in einem kleinen Agarose-Gel (0,8%) analysiert.

#### 4.5.6 Ortsspezifischer Nukleotidaustausch ("Site-directed Mutagenesis")

Diese Methode der *in vitro* Mutagenese (ausgehend von QuickChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit Protokoll von Stratagene, Katalognummer: 200518) erlaubt einen schnellen Nukleotidaustausch in beliebiger dsDNA. Für jede Reaktion, die zum Nukleotidaustausch führen soll, müssen zwei individuelle, zu einander komplementäre, mutagenisierende Oligonukleotide entworfen werden. Bei dem Entwurf der Mutageneseoligonukleotide sind folgende Regeln unbedingt zu beachten:

Die Länge der spezifischen Oligonukleotide liegt zwischen 25 und 45Bp. Die Schmelztemperatur  $(T_m)$  der Oligonukleotide muss mindestens 78°C erreichen und wird nach folgender Formel berechnet:

 $T_m = 81,5 + 0,41 \ (\% GC) - 675/N - \% mismatch$ 

N steht für die Länge des Oligonukleotides (in Bp).

Die eigentliche Mutation (Deletion oder Insertion) liegt in der Mitte des Oligonukleotides, wird also auf jeder Seite von 10-15Bp flankiert, die zu der Matrize-DNA komplementär sind und mit ihr zu 100% übereinstimmen. Der GC Gehalt des Oligonukleotides sollte mindestens 40% betragen. Verwendung von Oligonukleotiden, die mittels FPLC oder PAGE gereinigt wurden, steigert beträchtlich die Effizienz der Mutagenesereaktion.

Die Matrizen-DNA wird ausgehend von den mutagenisierenden Oligonukleotiden während der Amplifikation mit der *PfuTurbo* DNA-PolymeraseII vermehrt. Nach dieser PCR entstehen neue DNA-Moleküle, die im Unterschied zu der Matrizen-DNA semimethyliert bzw. unmethyliert sind. Der Verdau mit der DpnI Restriktionsendonuklease (Erkennungssequenz: 5'-Gm6ATC-3'), die spezifisch nur methylierte und semimethylierte DNA-Sequenzen schneidet, führt zu einem Verdau der aus *E.coli* stammenden Matrizen-DNA und somit zur gleichzeitigen Selektion der mutierten, PCR-synthetisierten DNA.

Die PCR wird in folgender Zusammensetzung vorbereitet:

Puffer	5 µl
DNA-Plasmid	5-50 ng
Oligonukleotide	je 125 ng
dNTP Mix	200µM
ddH <sub>2</sub> O	ad 50µl
PfuTurbo	2,5U

Die Anzahl der Zyklen sowie die Polymerisationszeit sind abhängig vom Typ der einzuführenden Mutation bzw. von der Länge des zu amplifizierenden Plasmids. Es gilt:

Punktmutation	-	12 Zyklen	
Einfacher Aminosäur	eaustausch	16 Zyklen	
Mehrfache Aminosäu	redeletion/Insertion	18 Zyklen	
Der initialen thermise	chen Denaturierung der DI	NA $(95 {}^{\rm O}\text{C}, 30 \text{sec})$ folgen:	
12-18 Zyklen	95°C	30 sec	
	55°C	1 min	
	68°C	2 min/kb des zu amplifizierenden Plasmids	
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	

Die Reaktion wird durch Abkühlung des Ansatzes auf ca. 37°C beendet, indem das Reaktionsgefäß für etwa 2 min auf Eis gelegt wird.

Dem abgekühlten Reaktionsansatz werden 10U des DpnI Restriktiosenzymes zugegeben und mittels vorsichtigen Ab- und Aufpipettieren gemischt. Die folgende einstündige Inkubation bei 37°C ermöglicht den Restriktionsverdau des parentalen, nicht mutierten DNA Stranges.

 $1 \mu$ l des Reaktionsansatzes ist ausreichend für die Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen (siehe 4.1.5) mit der zu erwartenden Anzahl von 50 bis 800 Kolonien. Laut Angaben des Herstellers beträgt die Effizienz 80%.

# 4.6 Chemische Synthese des MSP-1 vom Typ MAD20

#### 4.6.1 Entwurf des msp-1 Gens vom Typ MAD20

Als Ausgang für die synthetische DNA Sequenz des MSP1 Proteins vom Typ MAD20 wird die Aminosäuresequenz des MSP1 vom 3D7 *P. falciparum* Isolat gewählt. Die Aminosäuresequenz wird unter Verwendung einer Kodonhäufigkeit, wie sie im menschlichen Genom vertreten ist, mit Hilfe des Zufall-Prinzip-Generators zurück in die DNA Sequenz übersetzt. Dadurch kommt es zwangsläugig zu einer Reduktion des A+T Gehaltes der plasmodialen DNA. Sequenzen, die einen vorzeitigen Transkriptions- oder TranslationsStopp bedeuten können, als Spleiß-Donor oder -Akzeptor Signale erkannt werden ebenso wie interne Promotoren, GC-reiche Regionen und Shine-Dalgano Sequenzen werden durch Mutationen zerstört.

Folgende Sequenzen werden durch Mutationen der einzelnen Basen entfernt:

1). Spleiß-Signale (mit dem Motiv MRGGUNVR oder YNCAGG; M=A/C, R=A/G, V=Alles außer T, N=beliebiges Nukleotid).

2). Methylierungssignale (GATC für *dam*-Methylase, CCAGG und CCTGG für *dcm*-Methylase und AA( $N_6$ )GTGC und GCAC( $N_6$ )GTT für *EcoK*-Methylase).

3). Shine-Dalgano Konsensussequenzen (GAGGAG(N<sub>9</sub>)ATG).

Die Programme zur Analyse der entworfenen Sequenz sind Teil der "Genetics Computer Group Program Collection" (Devereux *et al.*, 1984). Konsensussequenzen für Intron/Exon Grenzen, potentielle prokaryotische Promotoren und poly(A) Signale werden mit Hilfe vom "Find Patterns", Terminatorsequenzen mit Hilfe des "Terminator" Programms identifiziert. "Stemloop" Programm wird benutzt, um lange "inverted repeats" zu erkennen, die zur Bildung von stabilen sekundären Strukturen führen könnten. Diese Sequenzmotive werden ebenfalls durch Austausch mit alternativen Kodons zerstört.

Gleichzeitig wird das Muster der Restriktionsendonukleasenschnittstellen modifiziert. Erkennungssequenzen von solchen Restriktionsendonukleasen werden entfernt, die nur einmal in der *msp-1d* Sequenz schneiden und die nicht für die Klonierung der einzelnen Fragmente verwendet werden. Mehrmals vorkommende Erkennungssequenzen, die für die Klonierungsstrategie benötigt werden, werden auf die Anzahl von 1 reduziert. Mit Hilfe des "Map" Programms (Funktion "Silent") werden kryptische Erkennungssequenzen von einmal schneidenden Restriktionsendonukleasen identifiziert, durch Nukleotidaustausch eingeführt und für die Klonierung der Fragmente verwendet.

Die 5186Bp lange DNA Sequenz wird in 5 Hauptfragmente unterteilt, die mit den Prozessierungsprodukten p83, p30, p38, p29 und p19 ganz oder fast identisch sind. Das p83 muss dabei aus drei, das p38 aus zwei Subfragmenten zusammengesetzt werden. Die Fragmente p30, p38, p29 und p19 werden an ihren 5' Enden durch eine zusätzliche BamHI Schnittstelle und an ihren 3' Enden durch zwei Terminationskodon und eine ClaI Schnittstelle modifiziert. Das p83 erhält an seinem 5' Ende eine MluI Schnittstelle, das 3' Ende ist mit den anderen Fragmenten identisch.

#### 4.6.2 Entwurf und Synthese der Oligonukleotide

Ein limitierender Faktor der chemischen Gensynthese ist die Länge der Oligonukleotide, die die Grenze von 120 Basen nicht überschreiten sollte. Bei dieser maximalen Oligonukleotidlänge kann man von einem bis zu 50% fehlerfreien PCR-Produkt ausgehen.

Die entworfenen Oligonukleotide werden mit Hilfe vom Oligo 4.0s Programm analysiert. Die Überlappungsregion zweier aufeinander folgender Oligonukleotide beträgt im Durchschnitt 18 Basen. Es ist wichtig auf die interne Stabilität der Oligonukleotide zu achten, die nicht kleiner als G $\geq$ -8 kcal/mol sein sollte. Falsche Hybridisierungsstellen, die länger als 7 Nukleotide sind und mit Hilfe der Funktion "False Priming site" erkannt werden, werden eliminiert.

Die Oligonukleotide werden am Applied Biosystems 394 Synthesizer in der Zusammenarbeit mit der Oligonukleotidsyntheseeinheit des ZMBH nach Standartprotokoll synthetisiert.

Um ein möglichst fehlerfreies PCR-Produkt zu bekommen, ist eine sorgfältige Reinigung der Nukleotide erforderlich. In der Regel wird die Hälfte des Syntheseproduktes über 10-20% igen denaturierenden PAA-Gel gereinigt (siehe 4.3.6). Die Hauptproduktbande mit der zu erwartenden Länge wird herausgeschnitten und 2x20 min bei 150 V aus dem Gel eluiert (siehe 4.3.4).

# 4.6.3 Chemische Synthese der dsDNA mittels asymmetrischer PCR mit einzelsträngigen Oligonukleotiden (Pan et al., 1999)

Die chemische Synthese der DNA erfolgt nach der in unserer Arbeitsgruppe etablierten Synthese mittels asymmetrischer PCR mit einzelsträngigen Oligonukleotiden (Pan et al., 1999). So kann ausgehend von 8 bis zu 120 Basen langen Oligonukleotiden nach mehreren PCR-Schritten mit insgesamt 25 Amplifikationszyklen ein im Durchschnitt 800Bp langes DNA Fragment aus dem PCR Ansatz gereinigt, kloniert und sequenziert werden. Fehlerfreie Fragmente werden schließlich für das Zusammensetzen der MSP1 Kodierungssequenz verwendet.

Ausgehend in der Regel aus 8 synthetischen Oligonukleotiden (O1-O8) werden gleichzeitig vier PCR-Ansätze vorbereitet. Pro Ansatz werden jeweils zwei aufeinander folgende Oligonukleotide im Konzentrationsverhältnis von 5:1 (für die Oligonukleotidpaare: O1/O2 und O5/O6) bzw. 1:5 (O3/O4 und O7/O8) kombiniert, um das asymmetrisch zu amplifizierende Produkt zu erreichen.

PCR Zusammensetzung:

Puffer	5 µl	
O1 (bzw. O4, O5, O8)	25pmol	
O2 (bzw. O3, O6, O7)	5pmol	
Taq Polymerase	2,5 U	
dNTP Mix	200µM	
H <sub>2</sub> 0	add 50 µl	
Die Reaktionsbedingungen für 5 Zy	klen der Amplifika	ation:
Denaturierung	95°C	10 sec
Hybridizierung	55°C	30 sec
Polymerisation	72°C	60 sec

Nach dem letzten Amplifikationszyklus werden die Ansätze O1/O2 mit O3/O4 und O5/O6 mit O7/O8 (je 25 µl) im Verhältnis 1:1 gemischt und die nächsten 5 Zyklen der Amplifikation unter den gleichen Bedingungen gestartet.

Um das notwendige Zwischenprodukt zu erhalten, werden die Produkte aus den letzten 5 Amplifikationszyklen erneut im Verhältnis 1:1 gemischt. Diesen Ansätzen werden zusätzlich 20pmol von den terminalen O1 bzw. O8 zugegeben, um die asymmetrischen Oligo-nukleotidverhältnisse erneut zu etablieren, und die Anzahl der Zyklen erhöht sich auf 8. Durch das Mischen der Produkte aus der letzten Reaktion (Verhältnis 1:1, je 25 µl) erreicht man nach abschließenden 12 Amplifikationszyklen das gewünschte Fragment.

Dieses Fragment wird in einem 1,5–2% igem Agarose-Gel von den anderen PCR-Zwischenprodukten getrennt und aus dem Gel eluiert (siehe 4.3.5). Das gereinigte Fragment wird mit den für die Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen verdaut. Um einen effizienten Verdau des PCR-Produktes zu erreichen, wird die doppelte Menge an Restriktionsenzym verwendet als unter 4.4.1 angegeben und die Reaktion wird über Nacht inkubiert. Das geschnittene Fragment wird aus dem Restriktionansatz mit Hilfe vom Ethanol gefällt (4.3.2.2). Für die Ligation wird das Insert in einem dreifachen Überschuß zu dem gleichartig geschnittenen Vektor pPf1 zugegeben. Für die anschließende Sequenzierung wurden die  $T_3$  und  $T_7$  Sequenzierprimer verwendet.

#### 4.7 Analyse und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

#### 4.7.1 Analyse von Proteinen durch diskontinuierliche, denaturierende PAA-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine besitzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung kein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis. Durch Erhitzen wird die Polypeptidkette entfaltet, und durch Anlagerung des stark ionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) wird die Eigenladung des Proteins überdeckt. Dies führt zu einem annähernd linearen Laufverhalten bezüglich des Molekulargewichts. Die Gelelektrophorese wird, um scharfe Proteinbanden zu erreichen, in einem zweistufigen PAA-Gel durchgeführt, das sich durch einen pH-Sprung an der Grenze des relativ großporigen Sammelgels (3%, pH 6,8) zu dem darunterliegenden, engporigen Trenngel (8-12,5%, pH 8,8) auszeichnet. Der Fokussierungseffekt wird durch das pH-unabhängige Laufverhalten des "Leit-Ions" CI<sup>\*</sup>gegenüber dem pH-abhängigen Laufverhalten des "Folge-Ions" Glycin bewirkt (Laemmli, 1970) Analytische Proteingele werden in einer Dicke von 1 mm hergestellt. Im Sammelgel wird eine Spannung von 8 V/cm, und im Trenngel von 20 V/cm angelegt. Vor dem Erhitzen (6 min, 100°C) wird den Proben der Proteinauftragspuffer zugegeben. Bromphenolblau im Auftragspuffer ermöglicht es, den Verlauf der Elektrophorese zu verfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils 20 μl der Probe auf das PAA-Gel geladen (Abweichungen sind im Text angegeben). Da die Anwesenheit von reduzierenden Reagenzien, z. B. β-Mercaptoethanol oder DTT, die Konformation von Proteinen mit internen Disulfidbrücken stark beeinflusst, wurden im Rahmen dieser Arbeit SDS-PAGE sowohl unter reduzierenden (mit DTT oder β-Mercaptoethanol) als auch unter nichtreduzierenden Bedingungen durchgeführt. Dies kann sich auf das Laufverhalten im PAA-Gel und besonders auf die spezifische Erkennung durch Antikörper auswirken.

#### 4.7.2 Färbung von Proteinen in PAA-Gelen mit Coomassie-Blau

Zum Nachweis der Proteine wird das Trenngel 20-60 min bei RT in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Danach wird es mit Wasser abgespült und in Entfärberlösung gelegt. Unter mehrmaligem Wechsel der Entfärberlösung wird das Gel nun 1-12 h bei RT entfärbt und anschließend 1 h in Wasser gewaschen. Die Nachweisgrenze für Proteine liegt bei dieser Methode bei 100-200 ng Protein pro Bande.

#### 4.7.3 Färbung von PAA-Gelen mit kolloidalem Coomassie

Das Gel wird für 2-3 h in 40% Methanol, 10% Essigsäure fixiert. Die Inkubation in Färbelösung erfolgt ÜN, mindestens jedoch für 3 Stunden, unter ständigem Schwenken bei RT. Durch mehrmaliges Waschen mit bidestilliertem Wasser wird das Gel entfärbt. Es sollte eine runde Schale verwendet werden. Die Empfindlichkeit liegt bei ca. 10 ng Protein pro Bande und ist damit etwa 10-mal höher als bei der herkömmlichen Coomassie-Färbung.

#### 4.7.4 Silberfärbung von PAA-Gelen nach Heukeshoeven

Das Gel wird 1 h (oder ÜN) in Fixierlösung 1 geschwenkt. Nach 30 min Behandlung mit Fixierlösung 2 wird das Gel viermal je 15 min mit  $H_2O$  gewaschen. Es folgt eine 30 min Inkubation in der Färbelösung. Reste der Färbelösung werden durch kurzes Schwenken in  $H_2O$  und in Entwicklerlösung (je 20 sec) entfernt. Das Gel wird nun solange in der Entwicklerlösung geschwenkt, bis die Banden ausreichend geschwärzt sind. Dies kann je nach aufgetragener Proteinmenge 20 sec bis 10 min dauern. Die Reaktion wird durch mehrmaliges Waschen mit Stopplösung beendet. Mit der Silberfärbung können 1 bis 10 ng Protein pro Bande sichtbar gemacht werden.

#### 4.7.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford (Bradford, 1976)

Proteine ergeben mit Coomassie Brillant Blue G250 eine blaue Farbreaktion. Die Intensität der Färbung entspricht der Menge an Protein in einer Probe und kann durch die Messung der OD bei 595nm und den Vergleich mit einer Eichkurve bestimmt werden.

Die Proteinlösung wird in 100  $\mu$ l Wasser (max. 10  $\mu$ l) verdünnt. Es werden 900  $\mu$ l Bradford-Reagenz zugegeben und für 20-30 min bei RT inkubiert. Die Messung der OD<sub>595</sub> erfolgt in Photometer. Die Proteinkonzentration wird durch den Vergleich mit einer Eichkurve (versch. BSA-Konzetrationen) vermittelt.

#### 4.7.6 Aufreinigung von rekombinanten Hexahis-MSP-1 Fragmenten aus E.coli

In Rahmen dieser Arbeit werden rekombinante Fragmente des synthetischen *msp-1f* Gens des FCB-1 Stammes von *P. falciparum* (Pan et al., 1999) unter renaturierenden Bedingungen aus *E. coli* gereinigt. Der Expressionsvektor pDS56 enthält N-terminal zu den zu exprimierenden MSP-1 Fragmenten 6 Histidine (His)<sub>6</sub>, die die Aufreinigung der in *E. coli* synthetisierten Proteine mittels Ni<sup>2+</sup>-Chelatchromatographie ermöglichen (Hochuli *et al.*, 1988).

Die gereinigten MSP-1 Fragmente entsprechen den natürlichen Prozessierungsprodukten vom MSP-1 Protein und werden für die Analyse der Immunseren mittels ELISA (siehe 4.13.2) verwendet.

# 4.7.6.1 Expression der MSP-1 Fragmente in E.coli

Die MSP-1 Fragmente tragenden Expressionsvektoren der pDS56-Familie werden in die Lac-Repressor exprimierende Bakterienzellinie *E.coli SG13009* transformiert. Ausgehend von einzelnen Klonen mit den entsprechenden Plasmiden werden Kulturen angesetzt, bei 37°C unter starkem Schütteln hochgewachsen und in der frühen log-Phase ( $OD_{600} = 0,2$ ) mit IPTG (1mM) induziert. Nach Inkubation bei 37°C unter starkem Schütteln für weitere 3-4 h werden die Bakterienzellen 20 min bei 6000g und 4°C sedimentiert. Das Sediment kann bei  $-20^{\circ}$ C aufbewahrt oder unmittelbar für die Herstellung des *E. coli* Lysates verwendet werden.

#### 4.7.6.2 Herstellung des E.coli Lysates für die Proteinaufreinigung

Für die Aufreinigung von p83, p30, p42 und p19 werden je 100 ml, für p38 1 L Bakterienkultur verwendet. Das Sediment (siehe 4.7.6.1) wird auf Eis in 5 ml Puffer A (mit Proteaseinhibitor-Mix von Boehringer) aufgenommen. Die Zellen werden durch wiederholtes Einfrieren (-20°C) und Auftauen und durch kurzes Sonifizieren (5 x 5 sec, 50% Leistung, kontinuierlicher Schall, auf Eis) aufgeschlossen. Ungelöstes Material wird durch Zentrifugation für 30 min bei 70000 Upm, 4°C, in der Ultrazentrifuge (Rotor TLA 100.2) sedimentiert. Das Lysat wird unmittelbar auf die Ni<sup>2+</sup>-Chelatsäule aufgetragen oder bei -80°C aufbewahrt.

#### 4.7.6.3 Ni<sup>2+</sup>-Chelatchromatographie

Als Säulenmaterial wurde die Ni-NTA Agarose der Firma Qiagen verwendet. Nitrilotriacetatsäure (NTA) bindet 4 der 6 Bindungsstellen in dem Koordinationszentrum des Ni-Ions so, dass die zwei übrig gebliebenen Stellen nun mit dem (His)<sub>6</sub> interagieren können. Die hohe Konzentration des NTA-Ligands an der Oberfläche der Sepharose<sup>R</sup>CL-6B-Kügelchen ermöglicht eine Bindungskapazität von 5-10 mg des (His)<sub>6</sub>-Proteins pro 1 ml Ni-NTA Agarosematerials.

Die Affinitätssäule mit Ni-NTA Agarose (1 ml) wird mit mindestens 5 Bettvolumen Puffer A äquilibriert. Anschließend lässt man das Zellextrakt bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min für mehrere Stunden (auch ÜN) bei 4°C über die Säule zirkulieren. Unspezifisch gebundene Proteine werden mit 5 Säulenvolumen Puffer A und je 5 Säulenvolumen Puffer B und Puffer C ausgewaschen. Die an der Säule gebundenen Proteine werden durch Waschen mit einem reversen Harnstoffgradienten (6M - 1M Harnstoff, je 1 Säulenvolumen) renaturiert. Die Elution erfolgt durch 3 Säulenvolumen 20mM, 2 Säulenvolumen 100mM, 4 Säulenvolumen 250mM und 4-6 Säulenvolumen 500mM Imidazollösung. Es werden Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Zur Lagerung (bei 4°C) wird die Säule mit mindestens 5 Säulenvolumen Puffer A äquilibriert. Zur Kontrolle der Chromatographie werden je 10  $\mu$ l der Elutions-Fraktionen elektrophoretisch überprüft. Die entsprechenden Banden können mit Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden.

### 4.8 In vitro Kultur von Toxoplasma gondii

#### 4.8.1 Wachstum von T. gondii

#### 4.8.1.1 Parasitenstämme

Für die stabile Transfektion wurden vier verschiedene Stämme verwendet.

RH Stamm (Sabin, 1941): Dieser virulente Stamm zeichnet sich durch eine hohe Vermehrungsrate (Generationsdauer 6h), gute Produktivität und effiziente Lyse der Wirtszellen aus, und erlaubt dadurch die Isolation vieler Tachyzoiten mit geringer Kontamination durch Wirtszellmaterial.

RH-*hxgprt*<sup>-</sup> Stamm (Pfefferkorn and Borotz, 1994): Diese Hypoxanthin-xanthin-guaninphosphorybosyltransferase-defiziente Mutante des RH Stammes ermöglicht eine schnelle und effektive Mycophenolsäure(MPA)/Xanthin Selektion der Transfektanten (Donald *et al.*, 1996) (siehe 4.9.3.2).

Ts-4 Stamm (Pfefferkorn and Pfefferkorn, 1976) ist eine temperatur-sensitive, avirulente Mutante des RH Stammes, die im Rahmen dieser Arbeit für alle Immunisierungsversuche verwendet wurde. Die sich langsam vermehrende ts-4 Mutanten sind bei 37°C nicht mehr in der Lage zu wachsen und müssen bei 34°C kultiviert werden. Dieser attenuierte, nicht-persistierende Stamm ist unfähig, die Dauerform des Parasiten, den Bradyzoiten, zu bilden. Der ts-4 Stamm ist jedoch genetisch nicht charakterisiert und darf nicht für humane Versuche eingesetzt werden.

SAG-1<sup>-</sup>-Mutante des RH Stammes ist eine Mutante, die nach einer chemischen Mutagenese isoliert wurde (Kasper, 1987). Diese Mutante synthetisiert eine reduzierte Menge an SAG-1, das nicht mit mAk gegen das wt SAG-1 reagiert.

# 4.8.1.2 Wirtszellen

*T. gondii*-Tachyzoiten infizieren adherente Wirtszellen viel effizienter als Zellen, die in Suspension wachsen. In dieser Arbeit wurden die Parasiten in HFF-Zellen ("human foreskin fibroblasts") kultiviert; nur zur Gewinnung großer Mengen von Parasiten-Material für einzelne Versuche wurden Vero-Zellen ("green african monkey kidney cells") benutzt. Diese wachsen in bis zu vier Zellschichten übereinander und ermöglichen dadurch eine höhere Parasitenproduktion über längere Zeit.

Die HFF-Zellen haben mehrere Vorteile: beim Kontakt mit den Nachbarzellen kommt es zur Hemmung des Zellwachstums, so dass sich eine konfluente, einschichtige Kultur bildet. Die Morphologie der Zellen - große, flache Zellen mit fester Plasmamembran - erlaubt mehrere Zyklen der Parasitenvermehrung bevor es zur Lyse der Wirtszelle kommt. Dadurch erhält man einen hohen Parasitentiter und eine nahezu vollständig lysierte Wirtszellkultur mit sehr geringen Verunreinigungen.

Die Passage von HFF-Zellen erfolgt mittels Trypsinbehandlung. Dies sei für eine  $T_{25}$ -Kulturflasche kurz erläutert:

Das alte Medium wird abgesaugt. Die Zellen werden zweimal mit 1 ml 0,05% Trypsinlösung, 2mM EDTA in 1xPBS gewaschen. Es folgt eine Inkubation für 2-3 min im Brutschrank, bis sich die adhärenten Zellen vom Boden ablösen. Die Zellen werden im vorgewärmte modifizierten Eagle's Medium (MEM) mit 10% hitzeinaktivierten FCS aufgenommen, mit einer Dichte von ca. 2000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf neue Kulturflaschen verteilt und bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Kultur ist nach ca. 5 Tagen konfluent, d.h. ihre Zelldichte beträgt  $3x10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>.

# 4.8.1.3 Passage von T. gondii-Tachyzoiten

Die komplette Lyse einer konfluenten HFF-Kultur aus einer  $25\text{cm}^2$ -Kulturflasche (T<sub>25</sub>) ergibt ca.  $5\times10^7$  -  $1\times10^8$ Tachyzoiten des RH-Stammes. Nach der Lyse der Wirtszellen sterben Tachyzoiten innerhalb von 10 h, falls ihnen keine neuen Wirtszellen zur Verfügung stehen. Deswegen sollten die extrazellulären Parasiten möglichst schnell zur Inokulation verwendet werden. Tachyzoiten des RH-Stamms aus 1 ml Inokulum (ca.  $5\times10^6$  Parasiten) zerstören eine einschichtige HFF-Kultur innerhalb von zwei Tagen. Mit 0,1 ml Inokulum des RH Stamm hingegen wird eine komplette Lyse der Wirtszellen erst innerhalb von etwa 3-4 Tagen erreicht.

Das Parasitenwachstum innerhalb der parasitophoren Vakuole der Zelle kann im Phasen-Kontrast-Mikroskop verfolgt werden. Die Generationszeit des intrazellulären Tachyzoits beträgt 6-12 h (abhängig von Parasitenstamm) und es bilden sich Vakuolen mit 2,4,8, u.s.w. Parasiten. Die Zeit zwischen Infektion und Lyse ist von den Wirtszellen abhängig, in HFF-Zellen kommt es zur Freisetzung der Parasiten nach 7 Teilungsrunden, d.h. man findet 2<sup>7</sup> Parasiten/Vakuole.

#### 4.8.1.4 Aufreinigung der Tachyzoiten

Für die Passage der Parasiten benutzt man eine lysierte Wirtszellkultur, ohne dass eine zusätzliche Aufreinigung notwendig ist. Für die Transfektion oder Klonierung werden jedoch rein extrazelluläre, gereinigte Tachyzoiten benötigt. Dafür wird die Zellsuspension 1-2-mal durch eine 10-ml-Spritze mit Kanüle Gr. 17 gezogen. Die Scherkräfte, die dabei entstehen, brechen die eventuell noch vorhandenen intakten Wirtszellen auf und setzen die viel kleineren intrazellulären Tachyzoiten frei. Die Tachyzoiten sind ca. 6  $\mu$ m lang und ca. 2  $\mu$ m im Durchmesser und können dementsprechend mittels Filtration durch einen Polycarbonat-Filter (3  $\mu$ m Porendurchmesser, Nucleopore) als Einzellsuspension gewonnen werden. Aggregierte Parasiten und Zelltrümmer bleiben im Filter zurück.

#### 4.8.1.5 Einfrieren von T. gondii Tachyzoiten

Für das Einfrieren verwendet man intrazelluläre Parasiten. Dazu werden die infizierten HFF-Zellen einer  $T_{25}$ Flasche abgelöst (siehe 6.1.3.) und in der Flasche auf Eis gestellt. Die weiteren Schritte seien hier kurz dargestellt:

Nach Zugabe von 750 µl DMEM mit 50% FCS werden die abgelösten Zellen für 5 min auf Eis inkubiert. Es werden 750 µl vorgekühltem DMEM mit 20% DMSO zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellen werden in 1,5 ml Einfrierröhrchen überführt und langsam eingefroren (Einfrieren bei -70°C für 24 h). Die Lagerung erfolgt bei -180°C im flüssigen Stickstoff.

#### 4.8.1.6 Auftauen von T.gondii Tachyzoiten

Die eingefrorenen Parasiten werden im Einfrierröhrchen bei 37°C im Wasserbad kurz aufgetaut (ca. 40 sec). Die Parasiten werden in 15 ml konische Zentrifugationsröhrchen mit 10 ml Medium überführt und für 15 min bei 1500g abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes werden die Parasiten in 10 ml frischen Medium resuspendiert. Es folgt die Inokulation der Parasiten in konfluente HFF-Kultur.

### 4.9 DNA-Transfer in Toxoplasma gondii

#### 4.9.1 Transiente Transfektion

Die Parasiten werden mittels Elektroporation mit Plasmid-DNA transfiziert (Soldati and Boothroyd, 1993) Frisch geerntete, extrazelluläre Parasiten werden abzentrifugiert (8 min, 1000 Upm, Zellkulturzentrifuge). Die sedimentierten Parasiten werden in 5 ml Elektroporationspuffer (van den Hoff *et al.*, 1992) resuspendiert und erneut für 8 min und 1000 Upm in der Zellkulturzentrifuge sedimentiert. Das Parasitensediment wird in 700 µl komplementiertem Elektroporationspuffer resuspendiert. Es folgt die Zugabe von 150 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA gelöst in sterilem Wasser das Überführen der Suspension in 2 mm Ø Elektroporationsküvetten. Die Elektroporation erfolgt bei 2,0 kV, Resistenzwiderstand 48 , Pulszeit 0,4 msec (diese Bedingungen sind das Resultat einer Optimierung mit dem BTX 600 Electro Cell Manipulator). Transferierte Parasiten werden unmittelbar nach der Elektroporation in frische Wirtszellen inokuliert.

Anhand der vorliegenden Daten über CAT-Aktivität in transienten Transfektionen (Soldati and Boothroyd, 1993) werden die transfizierten Parasiten 20-24 h nach der Elektroporation geerntet, um die Expression der transfizierten DNA zu messen.

#### 4.9.2 Stabile Transfektion

Für viele biologische Fragestellungen ist es nötig, über Zelllinien zu verfügen, die eine oder mehrere Kopien eines fremden Gens samt geeigneter Regulationselemente in ihrem Genom integriert tragen und dieses exprimieren. Die Integration von linearisierter Plasmid-DNA erfolgt wahrscheinlich ungerichtet und statistisch über das Genom verteilt. Die Anzahl der Kopien pro Genom ist dabei variabel. Essentiell für die Methode ist, dass man über einen geeigneten Marker verfügt, mit dem man auf die das Gen enthaltenden Zellen selektionieren kann. Gebräuchlich ist hierbei die Arbeit mit toxischen Substanzen und die Komplementation von Stoffwechseldefekten. Das resistenzvermittelnde Gen kann sich entweder auf dem gleichen Plasmid wie das zu exprimierende Gen befinden oder es wird ein so hoher Überschuß an dem zu transfizierenden Plasmid kotransfiziert, dass jede Zelle, die den Marker im Genom trägt, auch das zu untersuchende Gen enthalten sollte.

Die zu transfizierende Plasmid-DNA und der Kotransfektionvektor, werden vor der Elektroporation mit einem Restriktionsenzym linealisiert, welches vor dem Promotor des zu exprimierenden Gens schneidet (REMI - Restriction Enzyme Mediated Insertion, Black *et al.*, 1995). Die verwendeten Expressions- und Selektionsvektoren wurden mit BamHI (1U/1µg Plasmid DNA) linealisiert.

Für stabile Transfektion wird das gleiche Protokoll wie für eine transiente Transfektion verwendet, jedoch mit folgenden Abweichungen :

Die Transfektion erfolgt mit 100 µg der zu transfizierenden, linealisierten Plasmid-DNA und 10 µg linealisierten Selektionsvektor in 100 µl sterilem Wasser. Dem Elektroporationsansatz werden 100U BamHI zugegeben.

#### 4.9.3 Etablierung stabil transfizierter Parasitenlinien

#### 4.9.3.1 CAT-Selektion

Für die stabile Transfektion von sowohl wt RH Parasiten und PLK-Mutante wie auch von ts-4 Mutante wurde ein die Chloramphenicolresistenz vermittelnder Selektionsvektor für die Kotransfektion benutzt.

Nach der Elektroporation (siehe 4.9.1) werden die Parasiten in Selektionsmedium mit 20mM Chloramphenicol inkubiert (Kim *et al.*, 1993). Diese Antibiotikumskonzentration ist für die Selektion der transfizierten Parasiten ausreichend und zeigt nur minimale toxische Effekte auf die HFF Wirtszellen (Soldati *et al.*, 1993). Die Parasiten gehen durch 20-25 Teilungen (etwa 7-8 Tage), bevor die Selektion wirksam wird. Ab diesem Zeitpunkt sterben alle diejenigen Parasiten ab, welche den Selektionsvektor nicht funktionell in ihr Genom integriert haben (normalerweise mehr als 90%).

Parasitenklone werden isoliert durch limitierte Verdünnung der Kultur in 96er Mikrotiterplatten mit konfluenten HFF-Kulturen.

Die 96er Mikrotiterplatten werden wie folgt inokuliert:

In jede Vertiefung werden 150  $\mu$ l des Mediums vorgelegt. In der ersten Reihe wird das Medium entfernt und pro Vertiefung werden 180  $\mu$ l extrazelluläre, frisch lysierte Parasiten aus der T<sub>25</sub>-Kultur pipettiert. Mit einer Multipipette werden jeweils 30  $\mu$ l des durchgemischten Mediums von der vorhergehenden Reihe in die nächste transferiert. Die 96er Mikrotiterplatten dürfen für die nächsten 6-8 Tage nicht bewegt werden, bis einzelne Parasitenklone als Plaques im Mikroskop erkennbar sind. Nur die Parasiten aus einzelnen Plaques werden geerntet und in eine 24-Lochplatte inokuliert. Nach zusätzlichen 4-6 Tagen können diese stabilen Klone auf die Expression der rekombinanten Proteine getestet werden.

Die Etablierung eines stabilen Parasitenklones ist abhängig von der Wachstumsrate der Parasiten und dauert ab dem Tag der Elektroporation bis zur ersten Analyse ca. drei Wochen.

#### 4.9.3.2 Die MPA/Xanthin Selektion

Stabile Transfektion der *hxgprt* Mutante mit einem den *hxgprt*-Gen tragenden Kotransfektionsvektor ermöglicht eine anschließende Selektion mit MPA (25 µg/ml) und Xanthin (50 µg/ml), die bereits nach 2-4 Tagen abgeschlossen werden kann (Donald et al., 1996). Die *hxgprt* Mutante wurde von Pfefferkorn und Borotz, 1994 nach einer chemischen Mutagenese isoliert. Das nicht-essentielle HXGPRT spielt eine Rolle in der Purinsynthese ausgehend von IMP (Inositolmonophosphat) bzw. Hypoxanthin. Die MPA dient als Inhibitor der IMP-Dehydrogenase und blockiert dabei die Guaninsynthese aus AMP (Adenosylmonophophat). Für die Selektion der Revertanten wird Xanthin als Substrat für HXGPRT zugegeben. Protokoll für diese Selektion: siehe 4.9.3.1.

#### 4.10 Nachweis von in vivo synthetisierten Proteinen in T. gondii

#### 4.10.1 Messen der CAT-Aktivität in stabilen Parasitenklonen

Insertion des Chloramphenicol-Acetyltranferase-Gens (*cat*-Gen) als Selektionsmarker in das Genom von *T. gondii* führt zur stabilen Produktion des CAT-Proteins. Das Antibiotikum Chloramphenicol (CM) bindet an die 50S Untereinheit des Ribosoms und inhibiert dadurch die Proteinsynthese. Die Wirkung des CAT-Enzyms beruht auf seiner Fähigkeit, in Anwesenheit von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) das CM zu mono- und diacetylieren. Dadurch wird das Antibiotikum inaktiviert und ist nicht mehr in der Lage, an die ribosomale Untereinheit zu binden. Die Proteinextrakte der transfizierten Zellen werden mit nicht-markiertem CM und radioaktiv markiertem Acetyl-CoA inkubiert. Das CAT-Enzym katalysiert die Übertragung der radioaktiv markierten Acetylgruppe des Acetyl-CoA auf das CM. Der Reaktionsansatz wird mit Scintillationsflüssigkeit (Econofluor) überschichtet, acetyliertes CM diffundiert in die organische Phase (gebildet durch Econofluor) und kann im Scintillation-Zähler gemessen werden. Acetyl-CoA und nicht acetyliertes CM bleiben in der wässrigen Phase zurück.

Die Aktivität des CAT-Enzyms wird nach folgendem Protokoll gemessen:

Die Zellextrakte werden mittels wiederholtem Einfrieren/Auftauen der Zellen hergestellt (4.11.2.3). Parasiten einer vollständig lysierten  $T_{25}$ -Kultur werden geerntet, in 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und für 10 min bei 1500 Upm in der Zellkulturzentrifuge sedimentiert. Das Sediment wird in 1 ml 1xPBS resuspendiert, in 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt und für 1 min, 13000 Upm in der Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment in 100 µl 0,25M Tris-HCl, pH 7,8 resuspendiert. Es folgen drei weitere Einfrier-/Auftau-Zyklen (Eintauchen in flüssigen Stickstoff, nachfolgende Inkubation für 5 min bei 37°C) und die Zentrifugation für 4 min, 13000 Upm, in der Tischzentrifuge. Der Überstand wird in neues Eppendorfröhr-chen überführt und kann bei -20°C bis zu der Messung aufbewahrt werden. Pro Reaktionsansatz werden 200 µl 1,25mM CM, 100mM Tris/HCl, pH 7,8 in Wasser vorbereitet (Reaktionsmix). In 7 ml Scintillationsröhrchen werden 20 µl des Zellextrakts mit 30 µl 100mM Tris/HCl, pH 7,8 gemischt. Es folgt die Zugabe von 200 µl des zuvor vorbereiteten Reaktionsmixes. Die Initiation der Enzymreaktion wird eingeleitet durch die Zugabe von 0,1 µCi <sup>14</sup>C-Acetyl-CoA (Endkonzentration 0,1M Acetyl-CoA). Die Proben werden vorsichtig mit 4 ml Econofluor überschichtet und für 30 min bei RT inkubiert. Die Messung der Radioaktivität erfolgt in Beckmann Scintillation-Zähler für 0,1 min.

#### 4.10.2 Bestimmung der ß-Galaktosidase Aktivität

#### 4.10.2.1 Enzymatische β-Galaktosidase Messung (Seeber and Boothroyd, 1996)

Das Prinzip dieser Methode besteht in der Spaltung des Substrats 4-Methyl-Umbelliferyl-\u00b3-D-Galaktopyrtanosid (MUG) in ein Produkt, dessen Fluoreszenz in einem Fluoreszenzphotometer gemessen werden kann. Diese Spaltungsreaktion wird durch die \u00b3-Gal-Aktivität des Parasitenlysates bewirkt. Die Methode wird nach folgendem Protokoll durchgeführt: Die Parasiten werden 10 min bei 1500 Upm zentrifugiert. Das Sediment wird in 1 ml 1 x PBS resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und erneut zentrifugiert (Tischzentrifuge, 8000 Upm, 10 min.). Die Parasiten werden lysiert, indem das Sediment in 300  $\mu$ l des Lysepuffers gelöst wird. Es folgt eine Inkubation von 1 h bei 50°C, bei der die endogene ß-Galaktosidase inaktiviert wird. Anschließend wird für 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert, und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. 150  $\mu$ l des Überstandes werden mit 150  $\mu$ l des Lysepuffers, der 1,7mM MUG enthält, gemischt. Direkt im Anschluß wird ein Aliquot zur Bestimmung des Nullwertes entnommen und mit 5 x Stopp-Puffer gemischt. Der Ansatz wird bei 50°C inkubiert, und es werden in regelmäßigen Zeitintervalen Aliquots entnommen. Die Reaktion wird durch Zugabe vom Stopp-Puffer beendet. Vor der Messung werden die Proben in 1 x Stopp-Puffer 1:100 verdünnt. Die Messung der Proben erfolgt im Fluoreszenzphotometer bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge von 355nm. Gemessen wird emittiertes Licht der Wellenlänge von 460nm.

# 4.10.2.2 X-Gal Färbung (in situ -Gal Färbung)

Diese Methode macht es möglich, einzelne Parasiten in fixierten Zellkulturen auf die Expression der ß-Galaktosidase zu überprüfen. Das Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-D-Galaktopyranosid (X-Gal) wird durch die ß-Galaktosidase-Aktivität zu einem blauen Präzipitat umgesetzt, wodurch ß-gal-exprimierende Parasiten erkennbar werden.

Die mit Parasiten infizierte HFF-Kultur wird mit Fixierlösung für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit X-Gal-Färbelösung (ohne X-Gal) gewaschen. Die Färbung erfolgt durch Zugabe der Färbelösung mit X-Gal (100 µg/ml) und Inkubation für ca. 1 h bei 37°C.

# 4.10.3 "Immunoblot" zur Identifikation von Proteinen (Tobwin et al., 1979)

Der Transfer der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf einen Nitrozellulose-Filter (NC-Filter) findet in einer speziellen, vertikalen Blot-Apparatur statt. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladene Proteine aus dem Gel in Richtung Anode auf den NC-Filter und werden dort festgehalten. Die einzelnen Komponenten werden wie folgt von der Anode zur Kathode hin angeordnet :

#### + Anode+ Schaumstoff 1 Lage 3MM Chromatographiepapier Nitrozellulose-Filter PAA-Trenngel 1 Lage 3MM Chromatographiepapier Schaumstoff - Kathode -

Der Elektrotransfer erfolgt in 1x Transferpuffer bei 300 mA für 2 h (alternativ: 100 mA, ÜN). Die auf dem NC-Filter immobilisierten Proteine können durch immunologische Methoden sichtbar gemacht werden. Zuerst bindet ein Primärantikörper an das nachzuweisende Protein. In einem zweiten Schritt erfolgt die Reaktion mit einem Sekundärantikörper. Dieser bindet spezifisch an den Fc-Teil des Primärantikörpers. An ihn ist das Enzym Peroxidase (POD) oder alkalische Phosphatase (AP) kovalent gebunden. Dies erlaubt bei Substratzugabe einen Nachweis des Proteins auf dem NC-Filter.

Das Prinzip der Luminol-Chemilumineszenzreaktion beruht auf der Emission von Photonen der Wellenlänge 425 nm bei der enzymatischen Umsetzung des Phtalhydrazides mit Wasserstoffperoxid durch POD zum entsprechenden Phtalat, Wasser und Stickstoff. Das emittierte Licht wird durch den Sensibilisator 4-Iodophenol verstärkt und kann mit einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Für die Reaktion wurde der "BM Chemiluminescence Kit" der Fa. Boehringer, Mannheim benutzt.

Wird als Sekundärantikörper das AP-Konjugat verwendet, entsteht aus den Substraten Nitrotetrazoiliumchloridblau (NBT) und Bromchlorindolylphosphat (BCIP) dank der AP-Aktivität ein schwarz-violetter Niederschlag, welcher auf der Membran sichtbar wird.

Nach dem Transfer der Proteine wird der NC-Filter wie folgt weiter behandelt:

Die restlichen Proteinbindungsstellen des NC-Filters werden durch das Schwenken in einem Absättigungspuffer (für 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C) blockiert. Nach kurzem Waschen in 1x TBST wird die Membran mit Primärantikörper (verdünnt im Absättigungspuffer) überschichtet und bei RT für 1 h auf dem Schüttler oder stehend ÜN bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen des NC-Filters (dreimal für je 10 min in 1x TBST) folgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper-Konjugat (schwenkend für 30-90 min bei RT). Die Membran wird 3-4-mal für 10 min in 1x TBST gewaschen. Während des letzten Waschens wird die Reaktionslösung für die Chemilumineszenz anhand der Herstellersangaben bzw. die Entwicklungslösung für die AP-vermittelte Reaktion (AP-Puffer mit NBT und BCIP) vorbereitet.

- Die Chemilumineszenzreaktion wird unmittelbar vor dem Auflegen des ECL-Hyperfilmes

durchgeführt; dabei wird der NC-Filter für 1 min in der Reaktionslösung inkubiert. Anschließend wird die NC-Membran mit Klarsichtfolie bedeckt und ein ECL-Hyperfilm aufgelegt. Die Expositionszeiten sind von der Stärke des Signals abhängig. Die Filme werden sofort in der Filmentwicklungsmaschine entwickelt.

- Wurde ein Sekundärantikörper-AP-Konjugat für die Reaktion angesetzt, sollte nach 1-10 min eine Färbung der Membran zu erkennen sein, und die Reaktion kann durch mehrmaliges Waschen mit Wasser (oder 20mM EDTA in PBS) gestoppt werden. Die Membran kann zwischen zwei Stücken 3MM Chromatographiepapier getrocknet werden.

#### 4.10.4 Nachweis von Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz (IFA)

Durch Immunfluoreszenz kann die Expression und die zelluläre Lokalisierung eines Proteins in fixierten Zellen oder Geweben unmittelbar durch Betrachtung unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Nach der Vorbehandlung der Zellen (Fixieren / Permeabilisieren) werden sie mit einem, für das zu untersuchende Protein spezifischen Antikörper behandelt. In einem zweiten Schritt wird an dem ersten ein zweiter Antikörper gebunden, an den ein Fluoreszenzfarbstoff (FITC oder Rhodaminderivat) gekoppelt ist. Durch Betrachtung unter UV-Licht durch einen Filter der entsprechenden Wellenlänge kann man die fluoreszierenden Immunkomplexe in den Zellen erkennen. Die Methode wird kurz dargestellt:

Die HFF-Kultur wird mit extrazellulären *T.gondii* Tachyzoiten inokuliert und so lange inkubiert, bis sich Parasitenrosetten in 4-8-Parasitenstadium gebildet haben (nach ca.24h).

Die Schale mit infizierten HFF wird zweimal in 1xPBS gewaschen, und die Zellen werden 20 min bei RT in Fixierlösung fixiert. Es folgt eine Inkubation mit 0,1M Glycin für 3 min, um den Überschuß an Fixierungslösung zu neutralisieren. Die Permeabilisierung der Wirtszellen und der intrazellulären Parasiten findet mit 0,2% Triton X-100 in 1xPBS für 20 min bei RT statt. Die unspezifischen Bindestellen werden durch 20 min Inkubation in 0,2% Triton X100, 2% BSA in 1xPBS bei RT abgesättigt. Nach der Inkubation mit dem ersten Ak verdünnt in Inkubationslösung für 1 h bei RT folgt das Waschen dreimal für 5 min im Waschpuffer. Nach der Inkubation mit dem zweiten Ak (FITC- oder Rhodamin-Konjugat, bzw. Alexa 594-Konjugat) verdünnt 1 : 3500 in Inkubationslösung für 45 min bei RT, folgt erneut das Waschen dreimal für 5 min in Waschpuffer und einmal in 1xPBS.

Nachdem die Präparate vollständig bei RT getrocknet sind, werden diese in Vectashield eingebettet und können nun unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Die Proben sind mehrere Wochen im Dunklen bei 4°C haltbar.

#### 4.10.4.1 IFA mit extrazellulären Parasiten

Für gewisse Fragestellungen, wie z.B. den Nachweis eines Proteins auf der Oberfläche des Parasiten, ist es notwendig, extrazelluläre Parasiten mittels IFA zu analysieren. In diesem Falle ist ein zusätzlicher Schritt erforderlich, der die Haftung der Parasiten auf einem Deckglas ermöglicht. Dafür werden aus frisch lysierten Wirtszellen geerntete Parasiten in 500 µl PBS resuspendiert und vor der Fixierung in eine Kulturplatte überführt, die pro Schale ein vorgelegtes Deckglas enthält. Die anschließende Zentrifugation der Kulturplatte bei 2000g für 10 min (in der Zentrifuge Sigma 4-15, Qiagen) bewirkt die Haftung der Parasiten auf dem Deckglas. Die Methode wird - wie unter 4.10.4 beschrieben - durchgeführt.

#### 4.10.5 Metabolische Markierung der in T. gondii synthetisierten Proteine

Um die Synthese eines Proteins innerhalb der Zelle zu jedem beliebigen Zeitpunkt nachzuweisen, bedient man sich der Methode der metabolischen Markierung. Dabei werden die radioaktiv markierten Aminosäuren oder Bausteine der Aminosäuren während der Inkubation mit lebendigen, zu markierenden Zellen, in die neusynthetisierten Proteine eingebaut und können anschließend mittels Autoradiographie erfasst werden.

#### 4.10.5.1 Metabolische Markierung mit <sup>3</sup>H-Leu

Pro Ansatz werden  $1x10^8$  bis  $5x10^8$  Parasiten verwendet. Idealerweise geht man von einer hochinfizierten HFF-Kultur aus, die kurz nach der Zugabe des Markierungsmediums lysiert wird. Die Kultur wird einmal mit Leucindepletiertem Medium gewaschen. Die Reaktion erfolgt in Leu<sup>-</sup> Medium, das mit 100 µCi von <sup>3</sup>H-Leu pro  $1x10^8$ Parasiten komplementiert wurde im Inkubatorschrank. Nach 12-20 h werden die markierten, extrazellulären Parasiten sedimentiert, 1x in PBS gewaschen (Achtung: radioaktiver Abfall!) und im Rahmen dieser Arbeit für Immunopräzipitation (4.10.6) oder Behandlung mit PI-PLC (4.11.3.1) verwendet.

# 4.10.6 Immunopräzipitation der radioaktiv markierten Proteine

Immunopräzipitation ist eine der meist verwendeten immunochemischen Methoden zur Reinigung und Analyse von löslichen Proteinen. Limitierende Faktoren sind zum einen die Menge des zu präzipitierenden Proteins und zum anderen die Affinität des Antikörpers zu seinem Antigen. Die Methode verlangt die Bildung von Antigen/Antikörper-Komplexen in Lösung mit relativ niedrigen Konzentrationen an Antigenen. Für die anschließende Detektion des Antigens ist eine Antikörperaffinität von mindestens 10<sup>7</sup>/mol die Voraussetzung.

Zuerst wird das markierte Protein mittels Lyse aus den Zellen extrahiert. Das Parasitensediment wird in 500 µl RIPA-Puffer gelöst und für 10 min auf Eis lysiert (siehe 4.11.2.1). Es folgt eine Zentrifugation für 25 min bei 4°C und 12000g. Das markierte Protein befindet sich im Lysatüberstand, dem die mAk zugegeben werden. Die Menge des anzusetzenden Antikörpers wurde in Vorexperimenten ermittelt. Gereinigte mAk (DG 52 und 5.2) wurden 1:1000 angesetzt, der mAk 5.2-Hybridomaüberstand wurde 1:1 zugegeben. Um die Bildung des Immunkomplexes zu erlauben, wird der Ansatz für 1 h bei RT unter ständigem Überschlagen inkubiert. Die Zugabe von Sepharose-A-Protein Partikel (40 µl) ermöglicht die Adsorption des Komplexes an die feste Matrix. Dieser Schritt wird 2 h bei RT oder ÜN bei 4°C und unter ständigem Überschlagen durchgeführt. Die Partikel mit gebundenen Immunkomplexen werden kurz sedimentiert (30sec bei 4000g) und anschließend in zwei Waschritten von dem nicht-gebunden Protein getrennt (erstes Waschen mit 1 ml RIPA-Puffer, zweites Waschen mit 1 ml PBS). Die sedimentierte Probe wird in Proteinauftragspuffer resuspendiert, gekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wird getrocknet und die radioaktiv markierten Proteine mittels Autoradiographie nachgewiesen.

# 4.11 Aufreinigung und Analyse der in T. gondii synthetisierten Proteine

#### 4.11.1 Aufreinigung des rekombinanten MSP-1 aus T. gondii mittels Immunaffinitätschromatographie

Bei diesem Typ der Adsorptionschromatographie wird das aufzureinigende Protein hochspezifisch und reversibel von seinem Ligand (monoklonaler Antikörper) adsorbiert, der mit einer nicht löslichen Matrix (Sepharose-Protein A) kovalent verbunden ist.

#### 4.11.1.1 Vorbereitung der Immunaffinitätssäule mit mAk 5.2

Für ein Säulenvolumen von 1 ml werden 1,5 ml Sepharose-Protein A Suspension zweimal mit NET-Puffer, pH 7,4 gewaschen. Dabei wird das Chromatographiematerial in der Tischzentrifuge für 10sec bei 4000 Upm sedimentiert und in 500  $\mu$ l NET Puffer aufgenommen, bevor es für mindestens 1 h bei RT unter ständigem Schütteln mit 50 ml Hybridoma Überstand inkubiert wird. Die Sepharose-Matrix mit den gebundenen Antikörpern wird für 5 min bei 1000 Upm in der Zellkulturzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wird bei 4°C aufbewahrt und kann mehrmals verwendet werden. Nach zweimaligem Waschen mit je 15 ml von Na-Borat pH 9 wird das Sediment in 15 ml Borax-Puffer aufgenommen. Die kovalente Verknüpfung von Protein A mit den Antikörpern wird durch 20mM DMP vermittelt, das als Pulver zugegeben wird. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT unter ständigem Schütteln wird das Material für 5 min bei 1000 Upm sedimentiert. Es empfiehlt sich, vor und nach der Kopplung Aliquots zu je 150  $\mu$ l (entspricht 10  $\mu$ l Säulenmaterial) zu entnehmen, um die Kopplung durch SDS-PAGE überprüfen zu können. Nach einmaligem Waschen wird die beladene Sepharose in 15 ml 0,2M Ethanolamin, pH 8,0 aufgenommen und für 2 h inkubiert. Nach Sedimentation bei 1000 Upm und einmaligem Waschen wird das Säule überführt. Die Säule wird bei 4°C aufbewahrt .

#### 4.11.1.2 Herstellung des Parasitenextraktes für die Aufreinigung

Das nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen der Parasiten gewonnene Sediment (siehe 4.11.2.3) wird auf Eis aufgetaut und in 5 x Vol. eiskalten TNET mit Proteaseinhibitoren aufgenommen. Nach einer kurzen Ultraschallbehandlung (5 x 5 sec, 50% Leistung, kontinuierlicher Schall, auf Eis) wird der Extrakt für mindestens 30 min auf Eis inkubiert und anschließend in der Ultratischzentrifuge für 30 min bei 70 000 Upm im TLA 100.2 Rotor bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird unmittelbar auf die Immunaffinitätssäule aufgetragen (bei 4°C) oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

# 4.11.1.3. Immunaffinitätschromatographie von rekombinanten MSP-1

Die Immunaffinitätsmatrix mit mAk 5.2 wird mit mindestens 5 Bettvolumen TNET-Puffer äquilibriert. Anschließend lässt man den Parasitenextrakt bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min für mehrere Stunden (auch ÜN) bei 4°C über die Säule zirkulieren. Unspezifisch gebundene Proteine werden mit 5 Säulenvolumen TNET-Puffer, gefolgt von 5 Säulenvolumen TNET+NaCl-Puffer und 2 Säulenvolumen NET, pH 6,8 ausgewaschen. Die Elution erfolgt durch 16x500  $\mu$ l 0,1M Glycin-Lösung, pH 2,5. Die Fraktionen werden sofort durch Sammeln in einem vorgelegten Volumen von 1M Tris, pH 8,0 (90  $\mu$ l Tris/500 $\mu$ l Fraktion) neutralisiert und bei -80°C eingefroren. Vor der Lagerung wird die Säule mit mindestens 5 x Vol. TNET äquilibriert.

# 4.11.2 Herstellung der Parasitenextrakte zur Proteinanalyse

# 4.11.2.1 Herstellung der RIPA Extrakte

RIPA-Puffer ist ein detergenzhaltiger Puffer und seine Wirkung beruht auf der Zerstörung der Zellmembranen. Dadurch werden Proteine freigesetzt, die sich nach Zentrifugation im Überstand des Lysates befinden.

Die frisch lysierte  $T_{25}$ -Zellkultur wird in 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und für 10 min bei RT und 1000g in der Zellkulturzentrifuge sedimentiert. Das Sediment wird mit 1 ml 1xPBS gewaschen, in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt und für 30 sec bei RT und 9000g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach dem Lösen des Sediments in 20 µl Wasser werden 20 µl 1xRIPA-Puffer zugegeben und auf Eis für 10 min unter gelegentlichem Mischen inkubiert.

Es folgt eine Zentrifugation für 20-30 min bei 4°C und 10000g in der Tischzentrifuge.

Nach dem vorsichtigen Überführen des Überstandes in neues Eppendorfröhrchen wird dem Extrakt 2x Proteinauftragspuffer zugegeben. So behandelte Proben können bei -20°C aufbewahrt werden.

# 4.11.2.2 Herstellung von Triton X 114 Extrakten

Diese Methode (Brusca and Radolf, 1994) ermöglicht die Identifikation und Isolation von Membranproteinen und die Unterscheidung zwischen Transmembran- und GPI-verankerten Proteinen ausgehend von deren amphiphilen Domänen.

Triton X 114 ist ein nicht-ionisches, nicht-denaturierendes Detergenz, das eine Trennung in 3 Phasen ermöglicht: eine detergenzhaltige Phase mit unlöslichen Zellbestandteilen (Phase 1), eine wässrige Phase mit löslichen Zellbestandteilen (Phase 2) und eine detergenzhaltige Phase mit löslichen Zellbestandteilen (Phase 3).

Im allgemeinen befinden sich GPI-verankerte Proteine sowohl in Phase 2 als auch in Phase 3, sekretierte Proteine in Phase 2, Transmembranproteine in Phase 3.

#### 4.11.2.2.1 Präkondensation des Triton X 114

1,5 g Triton X 114 (TX114) werden in 50 ml TBS gelöst. Die Lösung wird 5 min auf Eis inkubiert, bis sie klar wird. Anschließendes Erwärmen für 5 min bei 37°C verursacht eine Trübung der Lösung. Die trübe Lösung wird für 10min, bei RT und 1000g sedimentiert. Die obere Phase wird entfernt, die untere Phase mit dem gleichen Volumen eisgekühltem TBS resuspendiert. Diese Kondensationsschritte werden 3-mal wiederholt. Die Detergenzphase enthält dann ca. 12% TX114 und kann in Aliquots bei -20°C gelagert werden.

#### 4.11.2.2.2 Trennen der Phasen

Die Methode wird für eine  $T_{25}$ -Kultur wie folgt beschrieben. Die geernteten Zellen werden in 1xPBS gewaschen und in 1 ml eisgekühltem TBS resuspendiert. Der Zugabe von 1/10 Vol. präkondensiertem TX114 folgt die Lyse der Zellen für 20 min auf Eis.

Die Probe wird für 10 min bei 4°C und 13000 Upm in der Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand (Ü1) wird in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und das Sediment ohne Resuspension mit 0,5 ml TBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wird der Überstand verworfen und das Sediment als <u>Phase 1</u> aube-wahrt.

Der Überstand Ü1 wird für 5 min bei 30°C inkubiert (Eintrübung). Die Phasen werden mittels Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 3000g in die obere wässrige Phase (A) und die untere detergente TX114-Phase (D) getrennt. Die obere wässrige Phase (A) wird in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und nach einer Zugabe von 1/10 Vol. präkondensierten TX114 für 5 min auf Eis inkubiert. Danach folgen 5 min bei 30°C. Die Phasen werden mittels Zentrifugation (10 min, 4°C, 3000g) getrennt, und das Verfahren wird 1-2-mal wiederholt. Die untere

TX114-Phase kann verworfen werden oder, wenn quantitative Analysen es erfordern, mit der zuerst gewonnen TX114-Phase (D) gemischt werden. Die obere wässrige Phase wird als Phase 2 aufbewahrt.

Untere TX114-Phase (D) wird 2-3-mal mit 0,5 ml TBS extrahiert. Einer Inkubation für 5 min auf Eis folgt auch hier eine zweite Inkubation für 5 min bei 30°C. Die Trennung der Phasen geschieht mittels Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 13000 Upm in der Tischzentrifuge. Die obere wässrige Phase kann verworfen oder mit der wässrigen Phase des vorhergegangenen Schrittes (A) gemischt werden, wenn quantitative Analysen es erfordern. Die untere TX114-Phase wird als <u>Phase 3</u> aufbewahrt.

Die Proteine der Phasen 2 und 3 werden mit Aceton gefällt. Dabei werden den Proben 2-5 Vol. von -20°C kaltem 100% igem Aceton zugegeben . Die Fällung erfolgt für mindestens 2 h bei -20°C. Danach werden die Proben für 10 min bei 13000 Upm in der Tischzentrifuge sedimentiert und mit 100% igem Aceton gewaschen. Das Sediment wird vorsichtig in "Speed-Vac" Konzentrator getrocknet und in Proteinauftragspuffer resuspendiert.

#### 4.11.2.3 Proteinextraktion mittels wiederholtem Einfrieren und Auftauen der Zellen

Diese Methode beruht auf einem Aufbrechen der Zellmembranen ohne Zusatz von Detergenzien. Dementsprechend bleiben membranverankerte Proteine mit Membrantrümmern nach Zentrifugation im Sediment, wohingegen lösliche sekretierte Proteine im Überstand vorliegen.

Die frisch lysierte Zellkultur aus einer  $T_{25}$ -Flasche wird zentrifugiert (10 min, 1500 Upm, Zellkulturzentrifuge) und im 1x PBS gewaschen. Das Sediment wird in 100 µl 1xPBS resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Auftauen erfolgt bei 37°C im Wasserbad. Das Verfahren wird zweimal wiederholt. Es folgt eine Zentrifugation für 20 min bei 4°C (13000 Upm, Tischzentrifuge). Der Überstand wird in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und, genauso wie das Sediment, mit Proteinauftragspuffer versetzt.

#### 4.11.2.4 Natrium-Karbonat-Proteinextraktion

Nach dem mehrmaligen Einfrieren und Auftauen der Zellen (siehe 4.11.2.3) bleiben sowohl die peripheren als auch die integralen Membranproteine mit den Membrantrümmern im Sediment zurück. Durch Zugabe von 0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,5, werden die elektrostatischen Protein-Protein-Wechselwirkungen zerstört, die hydrophoben Wechselwirkungen bleiben jedoch weitgehend erhalten. Nach einer Zentrifugation befinden sich peripher assoziierte Proteine im Überstand, dagegen bleiben membranintegrierte Proteine im Sediment zurück.

Die Methode wird für eine T<sub>25</sub>-Kultur wie folgt beschrieben :

Einfrieren/Auftauen der Zellen siehe 4.11.2.3. Der Überstand wird verworfen, das Membransediment in 1 ml eisgekühlten 0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11,5, resuspendiert. Der Inkubation für 15 min auf Eis folgt eine Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 55000 Upm in der Ultrazentrifuge (Rotor TLA 100.2). Das Sediment wird in Proteinprobenauftragspuffer aufgenommen, nachdem der Überstand in Eppendorfröhrchen überführt war. Die Proteine werden mit 1/10Vol. 100% iger Trichloressigsäure (TCA) für 10 min auf Eis gefällt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 13000 Upm in der Tischzentrifuge wird das Sediment mit 1 ml Aceton gewaschen, im "Speed-Vac"-Konzentrator getrocknet und im Proteinauftragspuffer resuspendiert.

#### 4.11.3 Nachweis der GPI-Verankerung mittels PI-PLC aus Bacillus cereus

Die Behandlung mit Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) wird als Standardmethode zum Nachweis einer GPI-Verankerung der Proteine angewendet (Ferguson and Williams, 1988). Die PI-PLC setzt die GPI-verankerten Proteine aus den Membranen frei, indem sie die Bindung zwischen Diacylglycerol und Phosphoglycolipid mit dem kovalent gebundenen Protein hydrolytisch spaltet (Futerman *et al.*, 1985).

Die PI-PLC Behandlung kann sowohl mit radioaktiv markierten wie auch unmarkierten Parasiten erfolgen. Eine frisch lysierte Parasitenkultur aus einer  $T_{75}$ -Flasche wird einmal in PBS gewaschen und in 1000 µl PBS mit Proteasen-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette für 10 ml Lösung, Boehringer, Nr.: 1836153) resuspendiert. 500 µl werden mit 2U der PI-PLC (Molecular Probes) in PI-PLC Puffer (20mM Tris, 1mM EDTA, 0,01% Na-Azid, 50% Glycerol, pH 7,5) gemischt, den restlichen 500 µl wird die gleiche Menge des PI-PLC Puffers zugesetzt. Beide Ansätze werden für 45 min bei 4°C unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Dabei werden GPI-verankerte Proteine aus der Oberfläche durch die PI-PLC in den Überstand freigesetzt. Wird eine metabolisch markierte Parasitenkultur behandelt, werden die Proteine in den Überständen mittels anschließender Immunopräzipitation (4.10.6) und Autoradiographie nachgewiesen. Handelt es sich um eine nicht-markierte Kultur, werden die Ansätze sedimentiert (25 min, 4°C, 12000g) und die Proteine im Überstand mit 1/10 Volumen 100% iger TCA präzipitiert (10 min auf Eis). Zur Kontrolle wird auch das Sediment in 500 µl RIPA-Puffer lysiert (10 min auf Eis) und die freigesetzten Proteine aus dem Überstand präzipitiert. Nach dem Waschen mit Aceton werden die Proteine in Proteine in Proteine in 500 µl RIPA-Puffer lysiert (10 min auf Eis) und die freigesetzten Proteine aus dem Überstand präzipitiert. Nach dem Waschen mit Aceton werden die Proteine in Proteine in Proteine in Proteine in Blot analysiert.

#### 4.12 Immunisierungsstudien im Tiermodell

Um die Immunogenität und gegebenenfalls die protektive Wirkung des rekombinanten, in *T. gondii* hergestelltem MSP-1 Proteins zu untersuchen, wurden Immunisierungsstudien im Tiermodellen durchgeführt. Das Mausemodell ist im Vergleich zum Affenmodell nicht durch die Anzahl der Versuchstiere limitiert, kann jedoch nicht für protektive Immunisierungsstudien verwendet werden.

Reine Proteine sind sehr wenig oder gar nicht immunogen und werden deshalb in Immunisierungsstudien häufig in einer Mischung mit einem Adjuvans verabreicht. In beiden Tiermodellen wurden zwei verschiedene Antigenpräparationen eingesetzt: Das aus *T. gondii* mittels Immunaffinitätschromatographie (4.11.1) gereinigte MSP-190F gemischt mit einem Adjuvans und der rekombinante, attenuierte *T. gondii* ts4-Stamm als ein lebender Trägerorganismus des MSP-190F Antigens. Das an sich immunogene *T. gondii* übernimmt die Rolle des Adjuvants und gewährleistet eine ausreichende Präsentation des Antigens dem Immunsystems des Wirtes (Sayles and Johnson, 1996).

#### 4.12.1 Immunogene Wirkung in der Maus

#### 4.12.1.1 Immunisierung mit attenuierten, rekombinanten ts-4 Mutanten

Um zu zeigen, dass der attenuierte ts-4 Stamm als ein Trägerorganismus für das rekombinante MSP-1 in einem Tiermodell geeignet ist, wurden Mäuse mit lebendigen, transgenen ts-4 Mutanten infiziert. Mäuse, für die eine wt-*T. gondii* Infektion letal verläuft, können mit diesem avirulenten, nicht persistierenden ts-4 Stamm infiziert werden (Sayles and Johnson, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Mäusestämme für die Immunisierungsexperimente verwendet: BALB/c und der transgene A2K<sup>b</sup> Stamm. Der A2K<sup>b</sup> Stamm trägt das humane HLA-A2.1 Allel und präsentiert ein MHC-I Hybrid-Molekül, dessen Epitop-präsentierende Domäne aus dem menschlichen HLA-A2.1 besteht (Mäuse bezogen von der Firma Harlan Sprague, Indianapolis, USA).

Für die Immunisierung werden frische, extrazelluläre ts-4 Mutanten verwendet. Die Parasiten werden einmal in PBS gewaschen und ausgezählt. Für die erste Impfung werden pro Maus  $5x10^4$  Parasiten in 250 µl sterilem PBS intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die immunisierte Gruppe (mindestens drei Mäuse) wird mit der transgenen ts-4 Linie infiziert, während der Kontrollgruppe die ts-4 Mutanten bzw. PBS injiziert wird. Die Impfung wird zweimal mit einer höheren Dosis an Parasiten wiederholt. Die erste Wiederholung (1. "boost") erfolgt nach 3-4 Wochen mit  $1x10^5$  Parasiten, gefolgt von der zweiten Wiederholung (2. "boost") nach weiteren 2-3 Wochen mit  $1x10^6$  Parasiten. Die Serokonversion der immunisierten Gruppe wird mittels IFA und Western Blots mit *P.falciparum*-Lysat oder rekombinanten MSP-1F Fragmenten verfolgt.

#### 4.12.1.2 Immunisierung mit gereinigtem, rekombinantem MSP-1

Aus ca.  $5x10^9$  extrazellulären transgenen*T. gondii* Parasiten wurden wie unter 4.11.1 beschrieben ca. 5 µg des MSP-190F Proteins in seiner Gesamtlänge gereinigt. Das gereinigte Protein wurde mit 100% iger TCA präzipitiert, mit Ethanol gewaschen und nach vollständigem Trocknen in 225 µl physiologischer Kochsalzlösung (120mM NaCl) mit 50mM TRIS/HCl, 1% SDS, pH 8 aufgenommen. Es wurden drei Aliquots mit je 75 µl (entspricht 1,6 µg gereinigte MSP-190F) und 2 µg Adjuvanspeptid (Sigma, A9519) vorbereitet, die bis zur Immunisierung bei –20°C aufbewahrt wurden.

Vor der Immunisierung wird ein Aliquot mit gleichem Volumen (75  $\mu$ l) von unvollständigem Freundsche Adjuvans (iFA, inkomplete Freund's Adjuvans; Sigma, F5506) gemischt. Es soll sich eine Öl-in-Wasser Emulsion bilden, in der das Protein, also die wässrige Phase, gelöst wird. Dafür ist es notwendig, die wässrige Phase solange unter Druck in die Öl-Phase zu spritzen, bis ein fester, weißer Schaum entsteht.

Für die Immunisierung mit gereinigtem MSP-190F wurden BALB/c Mäuse verwendet. Die Kontrollmaus wird mit einer 1:2 Lösung von 120mM NaCl mit 50mM TRIS/HCl, 1%SDS, pH8, 2 µg Adjuvanspeptid und iFA injiziert. Wie in 4.12.1.1 beschrieben, werden die Mäuse insgesamt dreimal immunisiert und deren Seren mittels Western Blots und IFA analysiert.

#### 4.12.2 Immunisierungsversuche in Aotus-Affen

Bestimmte *Aotus*-Affen gelten als das beste Tiermodell zum Studium der humanen anti-Malaria Immunantwort. In Rahmen dieser Arbeit werden *Aotus* Affen mit verschiedenen MSP-1 Präparationen immunisiert und anschließend mit einem im Bezug auf MSP-1 homologen *P. falciparum* Stamm infiziert. Die Immunseren werden mittels ELISA analysiert (4.13.2). Die Entwicklung der Parasitemie wird in regelmäßigen Abständen mit Hilfe von mikroskopischen Untersuchungen der Blutausstriche ermittelt. Die Immunisierungsstudie wurde in Zusammenarbeit mit dem Biomedical Primate Research Centre (BPRC), Rijswijk, Holland durchgeführt.

In einem Vorexperiment mit drei *Aotus azarae boliviensis* (Protokollnummer: PT 238.640) wird der für die Studie vorgesehene rekombinante ts-4 Stamm getestet. Am Tag 0 werden  $1x10^6$  lebendige transgene ts-4, gelöst in 0,5 ml PBS, subcutan (s.c.) in die narkotisierten Versuchstiere injiziert. Während der ganzen Versuchsdauer werden täglich Körpertemperatur und das Wohlbefinden der Tiere dokumentiert. Am Tag 7 erfolgt der erste und am Tag 14 der zweite "boost" mit jeweils  $5x10^6$  transgene ts-4 Mutanten (s.c.). Am Tag 28 werden je 2 ml Blut entnommen, aus dem die Seren für die Analyse mittels ELISA gewonnen werden. Nach Beenden des Vorversuches (Tag 42) werden die Tiere ausgeblutet, und die Organe auf ungewöhnliche Veränderungen untersucht.

In der Immunizierungsstudie (PT 256.663) werden 8 *Aotus lemurinus griseimembra* verwendet, die nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen geteilt werden: vier Affen in der immunisierten Gruppe, die mit rekombinanten ts-4 infiziert werden und drei Affen in der Kontrollgruppe, die mit ts-4 infiziert werden. Ein Affe dient als Donoraffe für die Infektion mit *P. falciparum* Merozoiten.

Bei der ersten Immunisierung (Tag 0) werden pro Affe 5x10<sup>6</sup> lebendige ts-4 (in 0,5 ml PBS) in der Kontrollgruppe bzw. rekombinante ts-4 in der immunisierten Gruppe s.c. injiziert. Es werden je 3 ml Blut entnommen, aus dem die Präimmunseren gewonnen werden (Serum s<sub>0</sub>). Am Tag 14 wird 0,5 ml Blut für die ELISA Analyse entnommen (s<sub>1</sub>). Die zweite Immunisierung erfolgt am Tag 21 und die dritte am Tag 35 mit jeweils 5x10<sup>6</sup> lebendigen Parasiten in 0,5 ml PBS. Am Tag 35 wird zusätzlich 0,5 ml Blut entnommen (s<sub>2</sub>) genauso wie am Tag 42 (s<sub>3</sub>). Nach einem weiteren Monat (Tag 73) erfolgt die Proteinimmunisierung mit dem MSP-190F, gereinigt aus rekombinanten T. gondii mittels Immunaffinitätschromatographie (siehe 4.11.1). Die Formulierung des Antigens erfolgt unmittelbar vor der Immunisierung nach folgendem Protokoll: 350 µl des SBAS2 Adjuvans (SmithKline Beecham) werden mit 275 µl der Proteinpräparation (entspricht etwa 9 µg volle Länge MSP-1 in PBS, pH 7,5) versetzt und vorsichtig mit Hilfe von Vortex gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wird das Mischen einmal wiederholt. Als Kontrolle wird das SBAS2 nach dem gleichen Protokoll mit PBS versetzt. Nachdem den Tieren Blut zur Analyse der Seren (s<sub>4</sub>) abgenommen wird, werden 500 µl der Mischung den Affen intramuskulär (i.m.) injiziert. Nach einer weiteren Woche (Tag 80) erfolgt die Blutabnahme für die sofortige Analyse der Seren (s<sub>5</sub>). Ein effizienter Antikörpertiter (ELISA-Titer größer als 1:5000) ist die Bedingung für die Fortsetzung des Experiments. Ist dieser Wert erreicht, wird der Donoraffe mit einem eingefroren Stock von P. falciparum des FVO Stammes intravenös (i.v.) infiziert (Tag 85). Die Entwicklung der Parasitemie wird täglich bis zu dem Zeitpunkt verfolgt, an dem der Affe eine hohe Parasitemie mit Ringstadien der Plasmodien entwikkelt. An diesem Tag (Tag 94) werden dem Affen 5 ml Blut entnommen, die zur Infektion der Versuchstieren verwendet werden. Die infizierten Erythrozyten werden ausgezählt und die Versuchsaffen mit je 1x10<sup>5</sup> P. falciparum des FVO Stammes i.v. infiziert. Vorab werden Blutproben zur Gewinnung der Seren (s<sub>6</sub>) entnommen. Die Entwicklung der Parasitemie wird sorgfältig verfolgt, indem täglich 1-2-mal Fingerblutprobe für die mikroskopische Analyse genommen wird. Erreicht ein Tier eine Parasitemie von 5%, wird es unmittelbar mit Mefloquine (25mg/5ml PBS) behandelt. Nach dem Beenden des Versuches (Tag 115) wird noch einmal Blut für die Analyse der Seren entnommen (s7) und alle Tiere mit Mefloquine (25mg/5ml PBS) und Pyrimethamine (1mg/kg Körpergewicht) behandelt.

#### 4.13 Immunologische Methoden zur Analyse der Seren

#### 4.13.1 IFA mit Plasmodium-infizierter Kultur

Um die Kreuzreaktivität der Antikörpern aus den Seren der immunisierten Mäuse mit dem nativen MSP-1 zu untersuchen, wurden die Immunseren mittels IFA (siehe 4.10.4) an einer mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten-Kultur getestet. Die dazu notwendigen Ausstriche von infizierten Erythrozyten, vorbereitet als ein Blutausstrich auf einem Objektträger, können über mehrere Wochen, geschützt vor dem Austrocknen mit Parafilm, bei 4°C gelagert werden.

Jeder Ausstrich kann für mehrere Proben gleichzeitig benutzt werden. Dazu werden mit Hilfe eines sog. "Pap Pen's", eine Art Klebstoffstift, mehrere Kreise auf dem Objektträger gezeichnet, die jeweils ein begrenztes Feld für minimale Mengen (20 µl) von Inkubationslösungen darstellen. Während der Inkubationszeiten befinden sich die Proben in einer Feuchtkammer (bestehend aus einer Plastikschale mit mehreren Lagen von feuchten Papiertüchern, überdeckt mit Parafilm), um die Austrocknung der Proben zu vermeiden.

Die infizierte Kultur in den eingekreisten Flächen wird 10 min in 1% igem Formaldehyd in PBS fixiert. Es folgt die Permeabilisierung mit 0,05% Saponin in PBS für 20 min und die anschließende Blockierung mit 0,1% Gelatine und 0,01% Saponin in PBS für 30 min. Die Seren werden in 0,01% Saponin/PBS verdünnt und für 1 h bei RT mit den Proben in der Feuchtkammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 50 µl 0,01% Saponin/PBS verdünnt) für 1 h bei RT mit den sekundärer Antikörper (FITC konjugierter anti-Maus IgG, 1:1000 in 0,01% Saponin/PBS verdünnt) für 1 h zugegeben. Die Proben werden gewaschen (siehe oben) und ohne Trocknen in Vectashield eingebettet.
#### 4.13.2 "Enzyme linked immunosorbent Assay" (ELISA)

Die ELISA-Technik macht es möglich, die Sensitivität und die Spezifität der Bindung von Antikörpern an ihr Antigen zu erfassen und je nach Fragestellung zum Nachweis und Quantifizierung von Antigenen oder Antikörpern dienen.

Zuerst wird das Antigen auf einer festen Phase (Polystyrol) immobilisiert. Anschließende Inkubation mit den Seren, welche in einer Verdünnungsreihe angesetzt werden und die Antigen-spezifische Antikörper enthalten, ermöglicht die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Die gebundenen Antikörper werden von enzymatisch markiertem, sekundärem Antikörper erkannt (indirekter ELISA Test). Die Menge des gebundenen markierten Antikörpers bestimmt die Stärke des Signals.

Als Antigene wurden entweder die rekombinanten, aus E. coli gereinigten MSP-1 Fragmente p83, p30, p38, p42 und p19 oder ein T. gondii-Parasitenlysat verwendet. In Vorversuchen wurde die optimale Menge des einzusetzenden Antigens bestimmt, welche zu einer Absättigung der Bindestellen der festen Matrize führt (für MSP-1 Fragmente 100-200ng/100µl). Das Antigen wird im Karbonatpuffer gelöst und die Platten mit je 100 µl Antigenlösung/Vertiefung beschichtet. Nach einer Inkubation von 2 h bei RT und 2 h bei 4°C ist das Antigen auf dem Polystyrolboden der Platten nicht-kovalent gebunden. Das nicht gebundene Antigen wird in zwei Waschschitten mit je 200 µl Waschpuffer (1xTBST) entfernt. Um die unspezifischen Bindungen zu blockieren, werden die Platten mit 100 µl Blockpuffer (1% Magermilchpulver in TBS) pro Vertiefung bei RT für 1 h inkubiert. Anschließend werden die Platten erneut gewaschen (siehe oben) und mit den Seren (in einer Verdünnungsreihe mit dem Blockpuffer) beschichtet. Die Verdünnungsreihe wird wie folgt direkt in den Platten angesetzt: in die erste Reihe werden je 200 µl der Ausgangsverdünnung vorgelegt, der Rest der Platte wird mit je 100 µl Blockierungspuffer beschichtet. Mit einer 12-Kanal-Pipette werden aus der ersten Reihe je 100 µl der Lösung herausgenommen und mit den 100 µl Lösung der darauf folgenden Reihe durch mehrmaliges Ab- und Aufpipettieren gemischt. So entsteht reihenweise eine 1:2 Verdünnung der Ausgangskonzentration der Serumantikörpern. Ausgehend von einer 1:1000 Verdünnung wird in der letzten Reihe der Platte die 1:128 000 Verdünung erreicht. Die erste Spalte jeder Platte dient bei der Messung als Blindwert zur Äquilibrierung des Gerätes und wird deshalb nur mit Blockpuffer gefüllt. Es folgt eine Inkubation ÜN bei 4°C. Am nächsten Tag werden die Platten viermal mit je 200 ul TBST/Vertiefung gewaschen und mit dem sekundären Antikörper beschichtet. Hierbei handelt sich um ein humanes IgG (H+L Kette) AP-Konjugat (1:3500 in Blockpuffer verdünnt). Nach einer Stunde bei RT werden die Platten zweimal mit TBST und zweimal mit Substratpuffer gewaschen (siehe oben). Die Farbreaktion wird katalysiert durch die AP, die ihr Substrat p-Nitrophenyl-phosphat zu einem farbigen Endprodukt hydrolisiert. Das p-Nitrophenyl-phosphat wird zu diesem Zweck in einer Konzentration von 1 mg/ml im Substratpuffer gelöst und mit dem Ansatz für 1h bei RT und in Dunkelheit inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von je 100 µl 0,1M EDTA gestoppt, und die Intensität des Farbsignals bei 405 nm im ELISA-Gerät photometrisch bestimmt.

#### 4.14 Analyse der Bindungsaffinität zwischen T. gondii und Erythrozyten

#### 4.14.1 Mikroskopische Untersuchungen der Bindungsaffinität

Um die Interaktion zwischen *T. gondii* und den Erythrozyten mit Hilfe des Mikroskops untersuchen zu können, ist es von Vorteil, einen der Partner vor der gemeinsamen Inkubation in der Kulturschale zu immobilisieren. Sinnvoller ist dabei die Bindung von Erythrozyten, die dank ihrer Größe die Entstehung einer Monoschicht aus Zellen ermöglichen.

In Bindungsexperimenten werden frische Erythrozyten der Blutgruppe A<sup>+</sup> verwendet, die entweder direkt von einem Blutspender (Vollblut) stammen oder von der Heidelberger Blutbank bezogen werden. Die Erythrozyten werden zweimal mit PBS gewaschen (je in 50 ml 1xPBS resuspendiert, sedimentiert für 15 min bei 3000g). Die Zentrifuge soll langsam abgebremst werden, deshalb wird die Bremse auf Stufe 3 eingestellt.

Um die Bindung der Erythrozyten an das Plastikmaterial zu erleichtern, werden zuerst die Kontaktflächen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dieses Molekül mit seinen polykationischen Eigenschaften ermöglicht die Interaktion mit den Anionen der Zelloberfläche, was zur Adhäsion der Erythrozyten an das Plastikmaterial führt. Die Kulturschale (6 cm  $\Delta$ ) wird mit 1 ml 0,1% Poly-L-Lysin in 5% (w/v) Natrium Hydrogenkarbonat/H<sub>2</sub>O für 30 min beim ständigen Schütteln und bei RT inkubiert. Die Schale wird anschließend zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gründlich gewaschen und vollständig bei RT getrocknet. Mit Poly-L-Lysin beschichtete Schalen sollen innerhalb von 24 h verwendet werden.

Pro Ansatz wird die vorbehandelte Schale mit 10<sup>9</sup> gewaschenen, frischen Erythrozyten in 0,25% BSA/PBS für 1 h bei RT inkubiert. Der Überschuß an nicht gebundenen Zellen wird in drei Waschschritten, zweimal mit PBS und einmal mit 0,25% BSA/PBS, entfernt. Nun werden etwa 10<sup>8</sup> extrazellulären, frisch aufbereitete Parasiten in 0,25% BSA/PBS zugegeben. Der Ansatz wird für mindestens 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um das Setzen der Parasiten und gegebenenfalls die Bindung an die Erythrozyten zu erlauben. Nach dieser Inkubation werden die Schalen sehr vorsichtig dreimal mit PBS gewaschen. Die zurückgehaltenen Parasiten (falls – Galaktosidase positiv) können mittels in situ -Gal Färbung (4.10.2.2) sichtbar gemacht und unter dem Mikroskop analysiert werden.

#### 4.14.2 Analyse der Bindungsaffinität mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse einzelner Zellen in einer heterogenen Zellpopulation. Für jede Zelle wird durch die Anregung mittels eines Laserstrahls die unterschiedliche Lichtstreung und die Fluoreszenz gemessen. In einem Durchflusszytometer erfassen sensitive Verstärker sowohl das Streulicht, das Informationen über die Größe und Granularität der Zellen gibt, als auch die Fluoreszenzemission. Die Fluoreszenz entsteht, wenn ein durch eine bestimmte Lichtwellenlänge angeregtes Molekül zurück in seinen Normalzustand fällt und die dabei entstandene Energie in Form von Licht freigesetzt wird.

Wird eine Population von Zellen analysiert, die mit einem fluoreszierendem Molekül markiert ist (z. B. Green fluorescent protein, GFP), werden die Daten in Form eines Histogramms erfasst, in dem die Fluoreszenzintensität versus die Zellzahl dargestellt werden. Werden mehrere Fluoreszenzmarker in der Messung angesetzt, ist die Analyse der Daten mittels eines Quadrant-Diagramms sinnvoll, in dem die Population mit der Fluoreszenz 1 (unterer rechter Quadrant) gegen die Population mit der Fluoreszenz 2 (oberer linker Quadrant) dargestellt wird. Diese Analyse ermöglicht eine weitere Unterteilung der beiden Populationen in eine dritte Population, welche die Fluoreszenzmerkmale beider Populationen trägt, also doppelt positiv ist (oberer rechter Quadrant). Die Anzahl der markierten Zellen wird in % angegeben.

Um die Frage der möglichen Bindung von rekombinanten *T. gondii* Parasiten an die menschlichen Erythrozyten quantitativ zu beantworten, wurden GFP-posititven *T. gondii* Linien etabliert, die das GFP konstitutiv exprimieren. Diese können in einer Durchflusszytometrieanalyse als eine Population mit der Fluoreszenz 1 (GFP) dargestellt werden. In den Bindungsexperimenten werden die GFP-positiven Parasiten mit Erythrozyten inkubiert, welche ihrerseits mit einem rot-fluoreszierenden Farbstoff markiert werden (DiIC<sub>16</sub>) und in der Durchflusszyto-metrieanalyse als die Population mit der Fluoreszenz 2 erscheinen.

#### 4.14.2.1 Markierung der Erythrozyten mit DiI

Als Fluoreszenzmarker für die Erythrozyten wurde das langkettige Dialkylcarbocyanin  $\text{DiIC}_{16}$  der Firma Molecular Probes (D-384) gewählt. Die Alkylkette dient als lipophiler Träger des Farbstoffmoleküls, das in die Plasmamembran der Zellen eingebaut und mittels lateraler Diffusion verbreitet wird. Die Fluoreszenz des Farbstoffes ist in wässriger Umgebung schwach, erhöht sich jedoch extrem nach dem Einbau in Lipidmembranen. Die Absorption des  $\text{DiIC}_{16}$  liegt bei 549 nm, die Emission bei 565 nm.

Für die Markierungsreaktion werden frische, gewaschene Erythrozyten verwendet (siehe 4.14.1). Nach dem letzten Waschschritt werden die Zellen in 5 ml Markierungspuffer resuspendiert und mit  $10\mu$ M DiIC<sub>16</sub> Endkonzentration für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Die markierten Zellen werden für 10 min bei 2000g sedimentiert, zweimal mit PBS gewaschen und entweder für eine direkte Messung in 2%-igem Formaldehyd/PBS aufgenommen, oder im DMEM resuspendiert, in der Neubauerkammer gezählt und für das Bindungsexperiment verwendet.

#### 4.14.2.2 Bindungsreaktion zwischen T. gondii und markierten Erythrozyten

Für die Bindungsreaktion werden frisch aus HFF-Kultur lysierte, GFP-positive Parasiten verwendet. Die extrazellulären Parasiten werden zweimal mit 5 ml PBS gewaschen, in DMEM resuspendiert und in der Neubauerkammer gezählt. Pro Ansatz werden in der Regel  $10^7$  markierte Erythrozyten mit  $2x10^7$  transgenen Parasiten in 150 µl DMEM in 96-Lochplatten im Zellkulturschrank inkubiert. Nach mindestens 4 h werden die Ansätze vorsichtig mit einer Pipette in 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, mit PBS auf 15 ml aufgefüllt und für 10 min bei 2000g sedimentiert (Zentrifugenbremse auf Stufe 3). Dieser Schritt wird einmal wiederholt. Für die Durchflusszytometriemessung werden die Proben in 3 ml 2% Formaldehyd/PBS aufgenommen.

#### 4.14.2.3 Messung mit dem Durchflusszytometer

Die Messungen wurden mit dem FACScan der Firma Becton Dickinson durchgeführt. In eigenen Vorexperimenten wurden folgende Gerätebedingungen für die Messung der Doppelfluoreszenz ermittelt:

Parameter	Detektor V	/oltage A	mpGain	Mod	us	
P1	FSC	E	00	1,49	Lin	ı
P2	SSC	3	95	1,16	Lin	l
P3	FL1	6	70	1,00	Log	g
P4	FL2	6	60	1,00	Log	g
P5	FL3	5	35	1,00	Log	g
Grenzparameter: Kompensation:	F F F	FSC FL1 – 2,39 FL2 – 28,2	% FL2 2% FL1			

Die Messung wird jeweils nach max. 50 000 gemessenen Ereignissen beendet und mit Hilfe von Quadrant-Statistik ausgewertet (Angaben in %).

#### 4.14.2.4 Trennung der Populationen mittels "Fluorescence-activated cell sorting" (FACS)

Die Fähigkeit eines Durchflusszytometers, markierte Zellen von nicht markierten physisch zu trennen (zu sortieren), ermöglicht eine Anreicherung und die anschließende Analyse der getrennten Population. Solche Geräte sind darauf spezialisiert, seltene Ereignisse innerhalb einer großen Population zu identifizieren und von der Masse trennen. Das Prinzip beruht auf einer Abweichung von geladenen Teilchen (einzelne Zellen in winzigen Flüssigkeitströpfchen) im elektrostatischen Feld. Die Tröpfchen, welche die markierten Zellen enthalten, werden geladen und können während der Wanderung durch ein elektrostatisches Feld von den nicht geladenen Teichen getrennt werden.

Mit Hilfe des FACS-Gerätes (FACScalibur, Becton Dickinson) wurden die verschiedenen Populationen mit den Fluoreszenzen 1, 2 und 3 (siehe 4.12.2) getrennt isoliert und unter dem Fluoreszenzmikroskop einzeln analysiert. Im FACScalibur erfolgt der Sortiervorgang nicht via elektrostatischen Aufladung einzelner Tröpfchen, sondern via der Umleitung des gesamten Flüsssigkeitsstrahles. Dadurch wird das Volumen stark erhöht, weshalb der Zellkonzentrator angeschlossen werden muss.

## **5. ERGEBNISSE**

#### 5.1 Entwurf, Synthese und Konstruktion des msp-1d Gens

Der hohe A+T Gehalt des *P. falciparum* Genoms, der in nicht kodierenden Sequenzen 90% und in Kodierungssequenzen 75% erreicht, macht es unmöglich, längere Gene stabil in *E. coli* zu klonieren, bzw. zu propagieren. Für das MSP-1 vom *P. falciparum* des FCB-1 Stammes (MSP-1F) konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion des A+T Gehaltes seiner Kodierungssequenz von 74% auf 55% unter Verwendung einer Kodonhäufigkeit wie sie im menschlichen Genom gefunden wird, diese Problematik überwindet und eine Expression des MSP-1 in seiner Gesamtlänge in heterologen Expressionssystemen ermöglicht (Pan *et al.*, 1999).

Im Hinblick auf die in unserem Labor geplanten Immunisierungsversuche mit rekombinanten MSP-1 Proteinen soll auch der zweite MSP-1 Prototyp, der MAD20, entworfen und synthetisiert werden. Als Grundlage für das Design der synthetischen DNA Sequenz vom Typ MAD20 wurde die 1720 Aminosäuren lange Sequenz des MSP-1 vom *P. falciparum* 3D7 Isolat gewählt.

### 5.1.1 Entwurf der synthetischen MSP-1D Kodierungssequenz

Die Aminosäuresequenz vom MSP-1 des *P. falciparum* 3D7 Isolat wurde unter Verwendung der Kodons der kodierenden Sequenzen des humanen Genoms (Gribskov *et al.*, 1984) zurück in die DNA Sequenz übersetzt. Dadurch entstand das synthetische, 5160Bp lange *msp-1d* Gen, dessen A+T Gehalt von ursprünglichen 73% auf 54,6% reduziert wurde. Alle Sequenzen, die während der Synthese, Klonierung und Expression des Gens in heterologen Expressionssystemen problematisch sein könnten, wurden durch Mutationen der einzelnen Nukleotide zerstört, ohne die Aminosäuresequenz des Proteins zu verändern. Dazu gehören vor allem Sequenzen, die einen vorzeitigen Transkriptions- oder Translationsstopp verursachen können, als Spleiß-Donor oder –Akzeptor-Signale erkannt werden ebenso wie Konsensussequenzen von internen prokaryontischen Promotoren, poly(A) Signalen, GC-reichen Regionen und Shine-Dalgano Sequenzen (siehe Methoden 4.6.1).

Tabelle 2 zeigt die endgültige Zusammensetzung der Kodons in der synthetischen MSP-1D Sequenz im Vergleich zu humanen Kodierungssequenzen und zum wildtyp MSP-1D Gen. Auffallend ist die starke Präferenz der A/T-haltigen Kodons in der Sequenz des nativen *msp-1d* Gens.

Häufigkeit der Kodons in %									
AS	Kodon	MSP-1D nativ	MSP-1D synth.	Humane Sequenz	AS	Kodon	MSP-1D nativ	MSP-1D synth.	Humane Sequenz
Ala	GCA	53	21	23	Leu	СТА	3	11	7
	GCC	8	42	40		CTC	6	20	20
	GCG	2	6	10		CTG	Õ	46	41
	GCT	37	31	27		CTT	14	6	13
						TTA	70	9	7
Arg	AGA	65	22	20		TTG	7	8	13
8	AGG	4	9	20				-	
	CGA	9	4	11	Lys	ААА	85	43	42
	CGC	0	9	19	_ <b>j</b> ~	AAG	15	57	58
	CGG	Õ	43	21				-	
	CGT	22	13	9	Met	ATG	100	100	100
Asn	AAC	21	65	54	Phe	TTC	34	70	55
	AAT	79	35	46		TTT	66	30	45
Asp	GAC	15	60	53	Pro	CCA	61	30	28
~ P	GAT	85	40	47		CCC	6	42	32
						CCG	3	9	11
Cvs	TGC	10	70	55		CCT	30	19	28
- ) -	TGT	90	30	45					
					Ser	AGC	5	28	24
Gln	CAA	97	25	26		AGT	32	12	15
	CAG	3	75	74		TCA	33	10	15
						TCC	9	22	22
Glu	GAA	94	45	42		TCG	0	5	6
	GAG	6	55	58		TCT	21	23	18
Gly	GGA	43	25	25	Thr	ACA	57	22	28
•	GGC	7	30	34		ACC	10	44	36
	GGG	3	34	24		ACG	3	13	12
	GGT	47	11	17		ACT	30	21	24
His	CAC	29	68	59	Trp	TGG	0	0	100
	CAT	71	32	41	1				
					Tyr	TAC	18	63	56
Ile	ATA	36	14	15		TAT	82	37	44
	ATC	7	58	49					
	ATT	57	28	36	Val	GTA	61	9	12
						GTC	5	28	24
						GTG	1	53	46
						GTT	33	10	18

## Tabelle 2: Die Kodonzusammensetzung des synthetischen msp-1d Gens im Vergleich zu dem nativen msp-1d Gen und humanen Kodierungssequenzen.

Die Kodonkomposititon der synthetischen MSP-1D Sequenz wurde mit Hilfe vom Zufall-Prinzip-Generator der Zusammensetzung der in humanen Kodierungssequenzen verwendeten Kodons angepaßt. Um die Reduktion des A+T Gehaltes des wt msp-1d Gens zu erreichen wurden in 1414 Positionen einzelne Basenpaare ausgetauscht.

Gleichzeitig wurden durch Nukleotidaustausche neue Erkennungssequenzen für Restriktionsnukleasen eingeführt, die in der *msp-1d* Gesamtsequenz nur einmal schneiden. Diese machten es möglich, das *msp-1d* Gen aus einzelnen Fragmenten zusammenzusetzen, die mit den natürlichen MSP-1D Prozessierungsprodukten identisch sind, bzw. sich von diesen nur um 1 bis 2 AS unterscheiden. Ausgehend von der Nomenklatur von Stafford et al. (Stafford *et al.*, 1994), wurden an den natürlichen Prozessierungsstellen oder in deren Nähe Schnittstellen für die folgenden Restriktionsendonukleasen verwendet (Abbildung 1): EaeI (Position 2159) trennt das p83 mit dem Unterschied von einer AS vom p30, AatII in Position 2727 ermöglicht eine mit dem natürlichen Prozessierungsprodukt identische Trennung des p30 vom p38. BstEII (Position 3966) bildet die Spaltungsstelle zwischen p38 und p42, die sich von der natürlich vorkommenden um zwei AS unterscheidet. Die sekundäre Prozessierungsstelle, an der das native p42 zu p29 und p19 gespalten wird, wird mit dem Unterschied von einer AS vom SspI Schnittstelle in Position 4819 gebildet.



#### Abbildung 1.: Schematische Darstellung der synthetischen msp-1d Kodierungssequenz.

Das in A dargestellte MSP-1D Protein besteht aus 1720 Aminosäuren einschließlich der Signalpeptidsequenz (SP) und GPI-Verankerungssequenz (GA). Konservierte Regionen sind in weiß, dimorphe Regionen in grau dargestellt. Die oligomorphen Blöcke II und IV sind mit Streifenmuster gekennzeichnet. Die oberen Pfeile zeigen die Spaltungsstellen, an denen das MSP-1D Protein in seine natürliche Prozessierungsprodukte gespalten wird (Stafford et al., 1994). In der synthetischen DNA Sequenz wurden an diesen Positionen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen eingeführt, die in der msp-1d Kodierungssequenz nur einmal schneiden. Diese Schnittstellen, deren Positionen durch die unteren Pfeile dargestellt werden, ermöglichten die Zusammensetzung des msp-1d Gens aus einzelnen Fragmenten ohne die Aminosäuresequenz des Gesamtproteins zu verändern. Die Positionen der Spaltungsstellen, die durch diese Restriktionsendonukleasen kreiert wurden, sind entweder identisch mit den natürlich vorkommenden Prozessierungsstellen oder unterscheiden sich um 1- 2 AS von ihnen. Die Größe der einzelnen Fragmente (in Bp), die für die Konstruktion des msp-1d Gens verwendet wurden, ist in **B** angegeben.

Zuletzt wurden die Enden der MSP-1D kodierenden Sequenz erweitert. Außerhalb des offenen Leserahmens wurde eine MluI Restriktionsschnittstelle am 5´ Ende und zwei Stoppkodons, gefolgt von einer ClaI Erkennungssequenz am 3´ Ende hinzugefügt.

## 5.1.2 Synthese und Konstruktion des msp-1d Gens aus einzelnen Fragmenten

Die synthetische *msp-1d* Sequenz wurde aus fünf sich überlappenden Fragmenten zusammengesetzt (*msp1d-83* bis *msp1d-19*), die den natürlichen Prozessierungsprodukten p83 bis p19 entsprechen. Um diese Fragmente einzeln klonieren zu können, wurden auch deren 5´ und 3´ Enden erweitert. Die 3´ Enden aller Fragmenten erhielten zwei Terminationskodons und eine ClaI Schnittstelle. Mit Ausnahme des *msp1d-83*, der wie das *msp1-d* eine zusätzliche MluI Schnittstelle trägt, wurden die 5´ flankierenden Sequenzen durch das Einführen von einer BamHI Erkennungssequenz modifiziert (Abbildung 2).

Diese Änderungen ermöglichten so die Klonierung des *msp1d-83* Fragments, wie auch später des *msp-1d* Gens, über die MluI und ClaI Schnittstelle in den Klonierungsvektor pPf1 (pBluescript SK<sup>+</sup> mit einer modifizierten multiplen Klonierungsstelle). Die restlichen Fragmente wurden über die BamHI und ClaI Schnittstellen in das pPf1 eingeführt. Aus den daraus resultierenden Vektoren (mit der Nomenklatur pPf1/*msp1d-83* bis pPf1/*msp1d-19*) wurden die Fragmente, deren Sequenz durch doppelsträngige Sequenzierung überprüft wurde, über die *msp-1d* spezifischen Schnittstellen isoliert und für die Zusammensetzung des *msp-1d* Gens verwendet (siehe unten). Dabei flankieren die Erkennungsstellen für BamHI bzw. MluI und ClaI die kodierenden Sequenzen und ermöglichen so die Subklonierung der jeweiligen Fragmente, z. B. in ein prokaryotischen Expressionsvektorsystem (modifiziert aus: Lutz and Bujard, 1997).

Die Synthese der einzelnen Fragmente beruht auf einer asymmetrischen PCR mit einzelsträngigen, sich überlappenden Oligonukleotiden (Pan *et al.*, 1999), und ist im Detail in der Doktorarbeit von W. Pan beschrieben.

Die Synthese der fünf Hauptfragmente, die für die Konstruktion des *msp-1d* Gens in seiner Gesamtlänge verwendeten wurden, wird im Folgenden dargelegt.



#### Abbildung 2.: Klonierungsstrategie für die Zusammensetzung des msp-1d Gens aus einzelnen Fragmenten

Es wurden 5 Fragmente synthetisiert (msp1d-83 - msp1d-19), die den natürlichen Prozessierungsprodukten entsprechen. Das msp1d-83 musste dabei aus 3 Fragmenten (msp1d-83 *I-III*), das msp1d-38 aus 2 Fragmenten (msp1d-38 *I-II*) zusammengesetzt werden. Die dafür verwendeten, internen Schnittstellen sind mit den nach oben gerichteten Pfeilen gekennzeichnet. Außerhalb des offenen Leserahmens der jeweiligen Fragmente wurden folgende Modifikationen vorgenommen: das 5' Ende des msp1d-83 erhielt eine zusätzliche MluI (o) Restriktionsstelle, während die 5' Enden der restlichen Fragmente durch die Zugabe einer BamHI (Viereck) Erkennungssequenz erweitert wurden. Die 3' Enden aller Fragmente erhalten zwei Stoppkodons gefolgt von einer ClaI (schwarzes o) Schnittstelle. Die nach unten zeigende Pfeile markieren die Positionen der einmal schneidenden Restriktionsendonukleasen, die für die Fusion der einzelnen Fragmente zum msp1-d Gen in seiner Gesamtlänge verwendet wurden. Die EaeI Schnittstelle wurde für die Zusammensetzung des Zwischenproduktes (msp1d-83 und msp1d-30 angesetzt. Für die Konstruktion des msp1d-42 Fragments wurde mittels eines SspI Schnittes die msp1d-29 Sequenz mit der msp1d-38 und msp1d-42 über eine BstEII Schnittstelle. Zuletzt wurden beide Zwischenprodukte über ein AatII Schnitt zu dem msp1-d Gen zusammen kloniert.

Die den Signalpeptid kodierende Sequenz gehört dem *msp1d-83* Fragment an, während die GPI-Verankerungssequenz von dem *msp1d-19* Fragment kodiert wird.

## Synthese von msp1d-83

Um eine möglichst fehlerfreie Synthese der dsDNA zu gewährleisten, wurde die 2164Bp lange *msp1d-83* Sequenz in drei kürzere Fragmente unterteilt, die jeweils aus 8 Oligonukleotiden einzeln synthetisiert wurden: *msp1d-83* I, *msp1d-83* II und *msp1d-83* III. Diese sind über interne Erkennungssequenzen von einmal schneidenden Restriktionsnukleasen voneinander getrennt. Eine StyI Schnittstelle trennt das 730Bp lange *msp1d-83* I vom *msp1d-83* II (618Bp), und eine BsaI Erkennungssequenz ermöglicht die Trennung des *msp1d-83* II von dem nachfolgenden *msp1d-83* III Fragment (816Bp). Um die Klonierung der einzelnen Fragmente in das pPf1 Vektor zu ermöglichen, wurden deren 3<sup>-</sup> Enden mit zwei Terminationskodons und einer ClaI Schnittstelle versehen. Die Fragmente *msp1d-83* II und *msp1d-83* III wurden zusätzlich durch eine BamHI Erkennungssequenz am 5' Ende erweitert.

Die beiden kürzeren Fragmente *msp1d-83* I und *msp1d-83* II wurden von W. Pan bereitgestellt. Nach einer Sequenzierung von mehreren Klonen war es möglich, das *msp1d-83* II Fragment als eine fehlerfreie Sequenz zu isolieren, während das längere *msp1d-83* I Fragment aus zwei fehlerfreien Blöcken zusammengesetzt wurde. Als problematisch erwies sich die Synthese des *msp1d-83* III. Aufgrund von mehreren Deletionen und/oder Substitutionen in allen sequenzierten Klonen musste die 816Bp lange Sequenz aus drei fehlerfreien Blöcken zusammengestellt werden.

Anschließend wurden aus den Vektoren pPf1/*msp1d-83* I-III folgende Restriktionsfragmente isoliert: MluI-StyI (*msp1d-83* I), StyI-BsaI (*msp1d-83* II) und BsaI-ClaI (*msp1d-83* III). Diese wurden mit dem MluI-ClaI geschnittenen pPf1 Vektor in einer Ligationsreaktion kombiniert, was zu dem gewünschten Plasmid mit der Nomenklatur pPf1/*msp1d-83* führte. Die Sequenz des *msp1d-83* Fragments wurde durch Sequenzierreaktion bestätigt.

## Synthese von msp1d-30

Das 568Bp lange *msp1d-30* Fragments wurde ausgehend von 8 Oligonukleotide von Ch. Berberich synthetisiert und kloniert. Das resultierende Plasmid wurde pPf1/*msp1d-30* genannt. Nach der Sequenzanalyse von vier verschieden Klonen konnte eine fehlerfreie *msp1d-30* Sequenz identifiziert werden.

## Synthese von msp1d-38

Die 1239Bp lange *msp1d-38* Sequenz wurde vor der Synthese in zwei Fragmente geteilt, *msp1d-38* I und *msp1d-38* II. Diese wurden durch eine interne XhoI Restriktionsstelle voneinander getrennt. Beide Fragmente erhalten die für die Klonierungsstrategie notwendige Modifikationen am 5' und 3' Ende (d.h. zusätzliche BamHI Schnittstelle am 5' Ende und zwei Stoppkodons und eine ClaI Erkennungssequenz am 3' Ende). Das *msp1d-38* I Fragment (547Bp) konnte fehlerfrei synthetisiert werden (Ch. Berberich), während die *msp1d-38* II Sequenz (692Bp) aus zwei verschiedenen Blöcke zweier Klone zusammengesetzt werden musste (ebenfalls von Ch. Berberich bereitgestellt).

Die *msp1d-38* Sequenz wurde aus zwei Fragmenten zusammengesetzt, die aus pPf1/*msp1d-38* I und pPf1/*msp1d-38* II isoliert wurden. Dazu wurde das pPf1/*msp1d-38* I Plasmid mit Bam-HI-XhoI und das pPf1/*msp1d-38* II Plasmid mit XhoI-ClaI geschnitten und die entsprechende Fragmente in den mit BamHI-ClaI verdauten pPf1 Vektor kloniert. Der daraus resultierende Vektor wurde pPf1/*msp1d-38* genannt und dessen Insert durch Sequenzanalyse verifiziert.

### Synthese von msp1d-29

Für die Synthese des 853Bp langen *msp1d-29* Fragmentes wurden 12 Oligonukleotide entworfen. Die Synthese der Gesamtsequenz von *msp1d-29* aus einzelsträngigen Oligonukleotiden erfolgte in zwei Schritten. Ein erster PCR-Ansatz, ausgehend von 8 aufeinander folgenden Oligonukleotiden wie unter 4.6.3 beschrieben, führte zur Synthese eines Zwischenproduktes von ca. 550Bp. Die vier folgenden Oligonukleotide wurden zu einem zweiten Zwischenprodukt von ca. 350Bp amplifiziert. Beide PCR-Zwischenprodukte wurden anschließend über ein 2%igen Agarosegel gereinigt und in dem zweiten Syntheseschritt unter Verwendung von terminalen Primer amplifiziert. Diese gleichzeitige Zugabe von je 20pmol der endständigen Oligonukleotide gewährleistete die Wiederherstellung der asymmetrischen Verhältnisse. Nach 25 Amplifikationszyklen konnte das *msp1d-29* Fragment aus dem 2%igen Agarosegel isoliert und über eine BamHI-ClaI vermittelte Fragmentierung mit dem gleichartig geschnittenen pPf1 Vektor ligiert werden.

Um eine fehlerfreie *msp1d-29* Sequenz zu rekonstruieren, mussten Fragmente aus drei verschieden pPf1/*msp1d-29* Klonen miteinander kombiniert werden.

## Synthese von msp1d-19

Das 341Bp lange *msp1d-19* Fragment wurde aus vier einzelsträngigen Oligonukleotiden synthetisiert. Nur der 5' Terminus wurde durch eine zusätzliche BamHI Schnittstelle modifiziert, denn die Stoppkodons und eine ClaI Erkennungssequenz am 3' Ende der synthetischen Sequenz bereits vorhanden waren. Nach der Sequenzierung von drei pPf1/*msp1d-19* Klonen konnte eine fehlerfreie Sequenz identifiziert werden.

## Die Zusammensetzung des msp1-d Gens aus den einzelnen Fragmenten

Die Konstruktion der vollständigen *msp1-d* Sequenz erfolgte in vier Schritten (Abbildung 2). Zuerst wurde das *msp1d-42* Gen (1194Bp) aus den Fragmenten *msp1d-29* und *msp1d-19* hergestellt (Carmen Fernandez). Dafür wurde das Plasmid pPf1/*msp1d-29* mit BamHI-SspI und das pPf1/*msp1d-19* mit SspI-ClaI Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die so gewonnenen Fragmente wurden für die Ligation mit dem Vektor pPf1, dass mit BamHI-ClaI verdaut wurde, verwendet. Das daraus resultierende Plasmid wurde pPf1/*msp1d-42* benannt.

In einem zweiten Schritt wurde der *msp1d-42* Fragment mit dem *msp1d-38* fusioniert. Dafür wurde das Plasmid pPf1/*msp1d-42* mit den Restriktionsendonukleasen BstEII und ClaI verdaut und das BstEII-ClaI Fragment isoliert. Dieser wurde zusammen mit dem BamHI-BstEII Fragment, der aus dem Plasmid pPf1/*msp1d-38* gewonnen wurde, und mit dem BamHI-ClaI geschnittenen Vektor pPf1 zusammen ligiert. Dies führte zu dem Plasmid pPf1/*msp1d-38*+42 (Carmen Fernandez).

In einem weiteren Ansatz wurden die kodierenden Sequenzen von *msp1d-83* und *msp1d-30* zu einem Fragment fusioniert (N. Westerfeld). Dazu wurden das Plasmid pPf1/*msp1d-83* mit den Restriktionsenzymen MluI-EaeI und das pPf1/*msp1d-30* mit EaeI-ClaI verdaut. Die re-

sultierenden Fragmente wurden in den MluI-ClaI geschnitten Vektor pPf1 inseriert. Das daraus hervorgegangene Plasmid wurde pPf1/*msp1d-83+30* genannt.

Schließlich wurden die beiden Teile des *msp-1d* Gens, nämlich die Fragmente *msp1d-83+30* und *msp1d-38+42*, in einem letzten Schritt miteinander fusioniert (N. Westerfeld). Dies wurde ermöglicht durch die in beiden Fragmenten vorhandene AatII Restriktionsstelle. So wurden aus dem Vektor pPf1/*msp1d-83+30* der entsprechende MluI-AatII Fragment und aus dem Vektor pPf1/*msp1d-38+42* der AatII-ClaI Fragment isoliert. Der Vektor pPf1 wurde mit MluI und ClaI Restriktionsendonukleasen verdaut und für die Ligation mit den Fragmenten verwendet. Das resultierende Plasmid wurde pPf1/*msp1-d* benannt.

Das synthetische *msp-1d* Gen, das durch Sequenzanalyse verifiziert wurde, kodiert für das 1720 Aminosäuren lange MSP-1D Protein des 3D7 Isolats von *P. falciparum*, inklusiv Signalpeptid- und GPI-Verankerungssequenz. Obwohl das *msp-1d* kodierende Polynukleotid 5160Bp lang ist, besteht die zu synthetisierende Sequenz, in Folge der Erweiterungen der 5' und 3' Enden, aus 5186Bp.

Die Gesamtsequenz des synthetisierten msp-1d Gens ist im Anhang I aufgeführt.

## 5.2 Charakterisierung des rekombinanten MSP-1F Proteins und seiner Fragmente aus *T. gondii*

Die chemische Synthese der kodierenden Sequenz vom MSP-1F aus *P. falciparum* Stamm FCB-1 (K1 Prototyp) ermöglichte die Produktion des rekombinanten Proteins in seiner Gesamtlänge sowie seiner Fragmente in heterologen Expressionssystemen wie *Escherichia coli* und Säugetierzellen (Pan *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde der Ansatz, *Toxoplasma gondii* als ein geeignetes Expressionssystem für den synthetischen *msp-1f* Gen und seine Fragmente zu verwenden (Jecmik, 1996), weiter verfolgt. Wir haben uns darauf konzentriert, die Schutzwirkung des in den *T. gondii* Tachyzoiten synthetisierten MSP-190F Proteins im *Aotus* Primatenmodell zu untersuchen und weitere Einblicke in die potentielle Funktion des MSP-1 *in vivo* zu bekommen.

Voraussetzung für diese komplexen Experimente ist ein gut definiertes, rekombinantes Protein, das in einer möglichst nativen Konformation vorliegt. Die richtige Faltung des Proteins wird dabei unter anderem durch seine posttranslationelle Modifikationen beeinflusst. Deshalb waren wir daran interessiert, transgene *T. gondii*- Linien herzustellen, die rekombinantes MSP-190F oder dessen Fragmente über ein GPI-Anker verankert auf der Oberfläche exponieren. Die in diesen Parasitenlinien synthetisierte MSP-190F, sowie die Fragmente MSP-F42 und MSP-F19, wurden bezüglich ihrer intrazellulären Lokalisation, Membranverankerung und Konformation in diesem Teil der vorliegenden Arbeit analysiert.

## 5.2.1 Konstruktion von T. gondii spezifischen MSP-1F Expressionsvektoren

Für den intrazellulären Transport des MSP-1 zu der Plasmamembran von *Plasmodium ssp.* und für die Verankerung des Proteins in der Oberfläche des Parasiten sind mindestens zwei gut charakterisierte Transportsignale notwendig: das N-terminale aus 19 Aminosäuren bestehende Signalpeptid und die C-terminale 18 Aminosäuren lange GPI-Anker-Signalsequenz. Die beiden Transportsignale werden von der synthetischen *msp-1f* Gensequenz kodiert (Pan *et al.*, 1999).

## 5.2.1.1 Konstruktion von Vektoren zur Synthese des MSP-190F Proteins in T. gondii

Als Grundlage für die Konstruktion eines *T. gondii* spezifischen Expressionsvektores, der die Transkription der *msp-1f* Gesamtsequenz, einschließlich der *P. falciparum* eigenen Transportsignalsequenzen ermöglicht, diente das Plasmid ppT 190 (Jecmik, 1996). In diesem Vektor steht das *msp-1f* Gen unter der Kontrolle des Tubulin-1 Promotors ( $P_{tub-1}$ ) von *T. gondii*. Dem

Gen folgt das Polyadenylierungssignal der 3' UTR des *sag-1* Gens. Allerdings führt eine Mutation in der GPI-Anker-Signalsequenz (Deletion des Adenins an der Position 5907,  $A_{5907}$ ) zur Verschiebung des Leserasters und daher zu einem vorzeitigen Stopp der Translation. Es wird eine verkürzte Version der GPI-Anker-Signalsequenz synthetisiert, die aus 8 anstatt aus 18 Aminosäuren besteht.

Um die Synthese einer vollständigen GPI-Anker-Signalsequenz zu ermöglichen, wurde das Adenin an der Position 5907 mittels ortsspezifischer Mutagenese eingeführt. Als Matrize-DNA diente der Vektor ppT 190. Dafür wurden zwei mutagenisierende, 32Bp lange Oligonukleotide entworfen (PfGPImut1: sense Orientierung, und PfGPImut2: antisense Orientierung), die eine 31Bp lange Sequenz erkennen, in deren Mitte sich das zu inserierende A<sub>5907</sub> befindet. Die Mutagenese ist abhängig von dem Typ der einzuführenden Mutation und der Länge des zu amplifizierenden Plasmids (siehe 4.5.6). Hier wurden 16 Amplifikationszyklen gewählt und eine Elongationszeit von 17 min.

Die Insertion des  $A_{5907}$  wurde durch Sequenzanalyse bestätigt und der resultierende Vektor ppT 190GPI genannt (Abbildung 5.3A). Das synthetische *msp-1f* Gen kodiert für das 1639 Aminosäuren lange MSP-1 Protein des FCB-1 Isolats von *P. falciparum* (Heidrich *et al.*, 1989; Pan *et al.*, 1995).



#### Abbildung 5.3.: T. gondii spezifische MSP-190F Expressionsvektoren

A zeigt eine graphische Darstellung des Vektors ppT 190GPI. Das *msp-1f* Gen (4917Bp), einschließlich der *P. falciparum* eigenen Signalpeptidsequenz (SP<sub>P.f.</sub>) und GPI-Anker-Signalsequenz (GPI<sub>P.f.</sub>), steht unter der Kontrolle des Promotor des *tubulin-1* Gens aus *T. gondii* (P<sub>tub-1</sub>). Dem Gen folgt die 3` nicht translatierte Region des *sag-1* Gens (SAG-1 3´ UTR), die das Polyadenylierungssignal beinhaltet. In **B** ist das Plasmid pSP 190GPI dargestellt. Die *msp-1f* Kodierungssequenz ist mit den Transportsignalsequenzen des SAG-1 Proteins aus *T. gondii* fusioniert (SP<sub>T.g.</sub> und GPI<sub>T.g.</sub>) und wird von dem Promotor des *sag-1* Gens (P<sub>sag-1</sub>) aus transkribiert. Die SAG-1 3´ UTR ist mit der in A dargestellten Sequenz identisch. Relevante Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind in

beiden Plasmiden eingezeichnet. Beide Vektoren tragen den identischen ColE1 Replikationsursprung für die Vermehrung in *E. coli* und das *bla* Gen, das für die ampizillinresistenzvermittelnde ß-Laktamase kodiert.

In der Literatur habe ich keine Daten gefunden, inwieweit *P. falciparum* eigene Transportsignale in dem artfremden Organismus *T. gondii* als solche erkannt werden. Aus diesem Grund wurde ein zweites Konstrukt hergestellt, in dem das MSP-1F Protein mit den Transportsignalsequenzen des *T. gondii* SAG-1 Proteins fusioniert wurde. Das 30kD große SAG-1 Protein (Surface Antigen-1) ist das Hauptoberflächenprotein der *T. gondii* Tachyzoiten (Burg *et al.*, 1988). Sein N-terminales Signalpeptid (30 Aminosäuren lang, Abb. 5.4) und die C-terminale GPI-Anker-Signalsequenz (bestehend aus 31 Aminosäuren, Abb. 5.4) gewährleisten den Transport des Antigens zur Plasmamembran und seine Verankerung mittels eines GPI-Ankers.

Diese *T. gondii* spezifischen Transportsignale sollen für die Fusion mit dem synthetischen *msp-1f* Gen verwendet werden. Als Grundlage diente der Vektor pSP 130-2 (Jecmik, 1996), in dem das 5' terminale Fragment des *msp-1f* Gens (3114Bp) unter der Kontrolle des *sag-1* Promotors steht. Dieses *msp-1f* Fragment enthält außerdem die authentische SAG-1 Signalpeptidsequenz und die GPI-Anker-Signalsequenz des SAG-1 Proteins. Die Expression dieser *msp-1f* Sequenz resultiert in einem ca. 130kD großen Protein (MSP-F130), das die 1038 N-terminalen Aminosäuren des MSP-1F repräsentiert. Die Fusionsstelle zwischen der Gensequenz vom MSP-F130 und der GPI-Anker-Signalsequenz ist durch eine PstI Restriktionsstelle charakterisiert. Über diese Schnittstelle wurde die MSP-F130 Gensequenz mit der 1692Bp langen Sequenz, die für den fehlenden C-Terminus vom MSP-1F Protein (564 Aminosäuren) kodiert, vervollständigt.

Dazu wurde der Vektor pSP 130-2 mit dem PstI Restriktionsenzym linearisiert und mit Hilfe von alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Die fehlende kodierende Sequenz des C-Terminus vom *msp-1f* wurde aus dem Vektor pE190D gewonnen. In diesem Vektor besitzt das *msp-1f* Gen an seinem 3' Ende die GPI-Anker-Signalsequenz des Decay Accelerating Factor (DAF), wobei die GPI-Anker-Signalsequenz durch eine NsiI Schnittstelle getrennt ist (Burghaus *et al.*, 1999). Da das zu isolierende Fragment zwei Schnittstellen für PstI besitzt, wurde zuerst ein partieller Verdau mit PstI durchgeführt (siehe Methoden 4.4.1.1), um die unvollständig geschnittene DNA anschließend mit dem Restriktionsenzym NsiI zu verdauen. Aus diesem Ansatz konnte das 1694Bp lange PstI/NsiI Fragment isoliert und in den mit PstI linearisierten pSP 130-2 Vektor ligiert werden, da die NsiI Schnittstelle des *msp-1f* Fragments mit der PstI Schnittstelle des linearisierten Vektors kompatibel ist.

Das resultierende Plasmid wurde pSP 190GPI genannt, durch Restriktionsanalyse überprüft und ist in Abbildung 5.3B dargestellt. Das synthetische *msp-1f* Gen kodiert für das 1601 Aminosäuren lange MSP-1 Protein des FCB-1 Stammes von *P. falciparum*, welches N- terminal mit dem SAG-1 Signalpeptid und C-terminal mit der SAG-1 GPI-Verankerungssequenz fusioniert ist.

Abbildung 5.4A zeigt die Modifizierung der Aminosäuresequenz beider Termini. Die SAG-1 Transportsignale wurden um die Aminosäuren erweitert, die für die korrekte Prozessierung des SAG-1 Proteins notwendig sind. Deshalb folgt dem Signalpeptid ein Serin, während der N-Terminus der GPI-Signalsequenz von zwei Alaninen flankiert wird (Burg *et al.*, 1988). Die Aminosäuren, die weder zu der SAG-1 noch zu der MSP-190F Aminosäurensequenz gehören, sind durch die Schnittstellen der für die Subklonierung des Gens verwendeten Restriktionsendonukleasen entstanden.



#### Abbildung 5.4.: Die N- und C-terminalen Sequenzen der MSP-1F Fusionsproteine

Das N-terminale Signalpeptid und die C-terminale GPI-Signalsequenz des SAG-1 Proteins von *T. gondii* (Burg *et al.*, 1988) wurden mit dem 190kD großen MSP-1F Protein des FCB-1 Isolates von *P. falciparum* (Heidrich *et al.*, 1989; Pan *et al.*, 1995) (**A**), bzw. mit den 42kD und 19kD großen Prozessierungsprodukten (Stafford *et al.*, 1994) des gleichen Proteins (**B**) fusioniert. Alle drei Proteine, die anhand ihres Molekulargewichtes als 190, 42 und 19 bezeichnet werden, sind von der synthetischen *msp-1f* Sequenz (Pan *et al.*, 1999) kodiert. Die eingerahmten authentischen Transportsignale des SAG-1 Proteins sind in allen Konstrukten um die Aminosäuren erweitert, die aus der SAG-1 Proteinsequenz stammen und die für die korrekte Prozessierung des Proteins notwendig sind (Burg *et al.*, 1988). Es handelt sich um ein Serin am C-Terminus des Signalpeptides bzw. um zwei Alanine am N-Terminus der GPI-Verankerungssequenz (Fett gedruckt). Die Pfeile markieren die Prozessierungsstellen, an denen die Transportsignale abgespalten werden. In Kursivschrift sind die Aminosäuren dargestellt, die durch die für die Klonierungsstrategie notwendige Modifikation der Kodierungssequenz entstanden sind.

# 5.2.1.2 Konstruktion der T. gondii spezifischen Vektoren zur Synthese der Fragmente MSP-F42 und MSP-F19

Auf der Basis des Vektors pSP 190GPI wurden Plasmide konstruiert, die für die Expression der Gene *msp-f42* und *msp-f19* verwendet wurden. Die resultierenden Proteine sind in ihrer Sequenz mit den authentischen Prozessierungsprodukten des MSP-1F Proteins identisch und werden in den *T. gondii* spezifischen Expressionsvektoren von den Transportsignalsequenzen des SAG-1 Proteins flankiert.

Ausgehend von der Nomenklatur nach Miller et al., 1994, ist der N-Terminus des MSP-F42 durch Alanin an der Position 1349 (Ala<sub>1349</sub>) und der N-Terminus des MSP-F19 von Asparagin an der Position 1631 ( $Asn_{1631}$ ) definiert. Für jedes Fragment wurde ein spezifischer Primer entworfen, der die Amplifikation der betreffenden Kodierungssequenz aus dem Vektor pSP 190GPI mittels PCR ermöglicht. Beide Primer, msp19s und msp42s, kodieren zusätzlich zu den ersten 13 Basen des jeweiligen Fragments für eine NsiI Schnittstelle am 5´ Ende des PCR-Produktes. Unter Verwendung von T<sub>3</sub> als antisense Primer wurden PCR-Produkte amplifiziert. Diese kodieren für das jeweilige Fragment, welches von der GPI-Anker-Signalsequenz und der 3´ UTR des *sag-1* aus *T. gondii* flankiert ist.

Für die Klonierung wurden die amplifizierten Fragmente, sowie der Vektor pSP 190GPI mit den Restriktionsendonukleasen Nsil und BamHI verdaut. Die BamHI Schnittstelle flankiert in allen Konstrukten das 3' Ende der 3' UTR vom SAG-1. Die Nsil Schnittstelle in dem Vektor trennt die Signalpeptidsequenz des SAG-1 von dem *msp1-f* Gen. Durch die Nsil/BamHI vermittelte Ligation entstanden die Vektoren pSP42GPI und pSP19GPI, in denen die Fragmente MSP-F42 bzw. MSP-F19 mit dem Signalpeptid und der GPI-Verankerungssequenz des SAG-1 Proteins vom *T. gondii* fusioniert wurden. Die terminalen Sequenzen beider Fusionsproteine sind in Abbildung 5.4B im Detail dargestellt.

## 5.2.2 Etablierung von transgenen T. gondii-Linien

Um die rekombinanten Proteine in *T. gondii* synthetisieren und charakterisieren zu können, wurde für jedes MSP-1F Konstrukt mindestens eine transgene *T. gondii* Linie etabliert. Die stabile Transfektion der Tachyzoiten mittels Elektroporation erfolgte durch sog. REMI-Methode ("RestriktionEnzyme Mediated Integration"), bei der die Effizienz der Integration vom Fremd-DNA in das Genom dank einer Anregung des DNA-Reparatursystems gesteigert wird (Black *et al.*, 1995). Der für die anschließende Selektion der stabilen Transfektanten notwendige Selektionsmarker wird von einem Plasmid kodiert, das mittels Kotransfektion mit in das Genom integriert wurde. Alle Selektionsplasmide stammen aus dem Labor von Dr. Soldati und sind in 3.6 aufgeführt.

## 5.2.2.1 Etablierung von transgenen T. gondii-Linien zur Synthese von MSP-190F

Der für diese Arbeit relevante Unterschied zwischen den Konstrukten ppT 190GPI und pSP 190GPI ist der unterschiedliche Ursprung der Transportsignalsequenzen, die das *msp-190f* Gen flankieren. Werden diese Signale richtig prozessiert, wird das rekombinante MSP-1 Protein auf der Oberfläche der transgenen *T. gondii* Parasiten lokalisiert und durch einen GPI-Anker in der Plasmamembran verankert. Aus diesem Grunde wurde für jedes Konstrukt eine stabile *T. gondii*-Linie etabliert und im Bezug auf die subzelluläre Lokalisierung des rekombinanten MSP-190F untersucht.

Zur Kontrolle wurde auch das Konstrukt ppT 190, das für eine unvollständige GPI-Verankerungssequenz des MSP-1 aus *P. falciparum* kodiert, zur Herstellung einer transgenen *T. gondii*-Linie verwendet.

Für die Transfektion wurde die *hxgprt* Mutante gewählt, die eine schnelle, MPA/Xanthinvermittelte Selektion der Transfektanten ermöglicht (Donald *et al.*, 1996). Die Vektoren ppT 190 und ppT 190GPI (je 100 µg) sowie der für die Kotransfektion verwendete Selektionsplasmid pminHXGPRT (15 µg für jeden Ansatz) wurden mit BamHI linearisiert. Das gleiche Restriktionsenzym (100U) wurde auch für die Elektroporation mittels REMI verwendet.

Der Vektor pSP 190GPI (100 μg) wurde vor der Elektroporation ebenfalls mit BamHI linearisiert. Als Kotransfektionsvektor wurde in diesem Falle das Plasmid loxHXlacZ/ verwendet, das zusätzlich zu den *hxgprt*-Selektionsmarker für das *lacZ* Gen kodiert. Die Transfektanten, die dieses Konstrukt funktionell integriert haben, können nach der MPA/Xanthin Selektion durch β-Galaktosidase Färbung visualisiert werden. Der Vektor loxHXlacZ/ wurde mit SacII linearisiert, und die Elektroporation erfolgte in Gegenwart vom BamHI.

Jede der drei Transfektionen führte nach einer MPA/Xanthin Selektion und anschließender Klonierung der stabilen Transfektanten mittels limitierter Verdünnung zur Etablierung einer transgenen *T. gondii*-Linie, die das rekombinante MSP-190F in seiner Gesamtlänge exprimiert.

Ausgehend von den unterschiedlichen MSP-190F Konstrukten (Abbildung 5.5) wurde folgende Nomenklatur für die transgenen *T. gondii*-Linien verwendet: Die aus der Transfektion mit dem Vektor ppT 190 resultierende Parasitenlinie wurde Pf190 genannt (Abb. 5.5A), da nur die aus *P. falciparum* stammende Signalpeptidsequenz vollständig erhalten ist. Analog dazu wurde die aus der Transfektion mit dem Vektor ppT 190GPI hervorgegangene *T. gondii*-Linie Pf190Pf genannt (Abb. 5.5B), da beide Transportsignale von der authentischen *P. falciparum* Sequenzen in vollständig kodiert werden. Die Linie, die nach der Transfektion mit dem Vektor pSP 190GPI etabliert wurde, trägt den Namen Tg190Tg (Abb. 5.5C), da beide Transportsignale von den *T. gondii* eigenen Sequenzen kodiert wurden.

Die Expression des rekombinanten MSP-190F Proteins in den transgenen *T. gondii*-Linien wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz (IFA) mit dem MSP-1 spezifischen mAk 5.2

analysiert (Abbildung 5.5). Die verschiedenen Transportsignale führen zum signifikanten Unterschied in der subzellulären Lokalisierung des MSP-190F Proteins. Die Pf190-Linie zeigt eine Akkumulation des rekombinanten Proteins in den intrazellulären Organellen. Ist die vollständige Sequenz beider Transportsignale vorhanden, kann im Falle der Pf190Pf Transfektanten eine gleichmäßige Verteilung des MSP-190F Proteins beobachtet werden. Eine signifikante Anreicherung des Proteins an der Plasmamembran konnte eindeutig in der Tg190Tg-Linie festgestellt werden.



## Abbildung 5.5: Stabile Expression des MSP-190F in T. gondii

Ausgehend von den verschiedenen MSP-190F spezifischen Konstrukten wurden transgene *T. gondii*-Linien etabliert, die sich bezüglich der subzellulären Lokalisierung des rekombinanten Proteins unterscheiden. Für die Analyse mittels IFA wurden die intrazellulären Parasiten fixiert und mit dem MSP-1 spezifischen mAk 5.2 inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde das anti-Maus IgG FITC-Konjugat verwendet.

**A**. Das synthetische *msp-1f* Gen steht in dem Konstrukt ppT 190 unter der Kontrolle des Tubulin-1 Promotors aus *T. gondii*. Dank einer Deletion wird eine verkürzte Version der GPI-Anker-Signalsequenz synthetisiert, die für 8 Aminosäuren (anstatt für 18 AS) kodiert. Das in der transgenen Pf190 *T. gondii*-Linie exprimierte MSP-

190F akkumuliert in den intrazellulären Organellen des Parasiten. **B**. Im Unterschied zu dem ppT 190 kodiert das Konstrukt ppT 190GPI für die vollständige GPI-Anker-Signalsequenz des *msp-lf* Gens aus *P. falciparum*. Die Anwesenheit beider Transportsignale führt in der transgenen Pf190Pf-Linie zu einer gleichmäßigen Verteilung des rekombinanten Proteins. **C**. In dem Konstrukt pSP 190GPI, das unter der Kontrolle des SAG-1 Promotors von *T. gondii* steht, werden beide Transportsignale von den Sequenzen des SAG-1 Proteins kodiert. Dies führt auf der Ebene der MSP-190F Synthese zu einer signifikanten Anreicherung des Proteins an der Plasmamembran der transgenen Tg190Tg Parasiten.

In Rot dargestellt: synthetische msp-1f Kodierungssequenzen, in Grün: T. gondii spezifische Sequenzen.

Die Synthese des MSP-190F Proteins in seiner Gesamtlänge wurde im Immunoblot mit dem MSP-1 spezifischen mAk 5.2 nachgewiesen (Abbildung 5.6, Spur 1, 2 und 3). Dieser Antikörper, der ein konformationelles Epitop in dem C-terminalen p19 Fragment erkennt, kann für den Nachweis des MSP-190F Proteins (MW: 190kD) sowie aller C-terminalen Fragmente verwendet werden. Eine signifikante Menge des in der Pf190-Linie synthetisierten Proteins bildet Proteinaggregate aus, die als eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht größer als 190kD identifiziert werden können (Spur 3) und die unter reduzierenden Bedingungen nicht mehr nachweisbar sind (Daten nicht gezeigt). Diese Aggregation kann die Konsequenz der falschen subzellulären Lokalisierung des rekombinanten Proteins sein, wie bereits in der IFA festgestellt wurde. Im Vergleich zu den anderen MSP-190F Konstrukten findet fast keine Degradation des Proteins statt, die mit dem mAk 5.2 oder mit dem N-terminalen mAk 13.2 (nicht gezeigt) nachweisbar wäre. Aus diesem Grunde wurde die Pf190-Parasitenlinie für die Aufreinigung des rekombinanten MSP-190F mittels Immunaffinitätschromatographie mit dem mAk 5.2 verwendet (siehe 5.2.3).

Das in der Pf190Pf Linie synthetisierte MSP-190F weist die meisten C-terminalen Abbauprodukte auf (Spur 2). Diese sind teilweise nachweisbar auch in der Spur 1, in der das Lysat der rekombinanten Tg190Tg Parasiten aufgetragen wurde. Die beobachtete Proteindegradation konnte weder durch Zugabe der Proteaseinhibitoren noch durch unterschiedliche Vorbereitung der Proteinproben beeinflusst werden konnte.



#### Abbildung 5.6: Western Blot Analyse des rekombinanten MSP-190F und seiner Fragmente aus T. gondii.

Zelllysate aus rekombinanten (Spur 1-5) und wildtyp (Spur 6) *T. gondii* Parasiten wurden in einem 10%igen PAA-Gel mittels SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine NC-Membran mit dem mAk 5.2 inkubiert. Als Zweitantikörper wurde das anti-Maus IgG POD-Konjugat verwendet. Die transgenen *T. gondii*-Linien, die die unterschiedlichen MSP-190F Konstrukte stabil in ihr Genom integriert haben, synthetisieren das 190kD große MSP-1 Protein (Spur 1: Tg190Tg; Spur 2: Pf190Pf; Spur 3: Pf190). Das in der Pf190-Parasitenlinie produzierte MSP-190F bildet Proteinaggregate aus (Spur 3, MW > 190kD), womöglich als eine Folge der falschen intrazellulären Lokalisierung. Das in Pf190Pf und Tg190Tg Linien synthetisierte MSP-190F weist eine Spaltung in C-terminale Abbauprodukte auf.

In der Spur 4 wurde das Lysat der rekombinanten 19/GFP-Parasiten aufgetrennt, die das MSP-F19 Protein synthetisieren. Obwohl das errechnete MW des Fragments 13,8kD ist, korrespondiert die resultierende Bande zu einem MW von etwa 28kD. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Proteindimer handelt, da eine Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen mit dem mAk5.2 nicht möglich ist. Das MSP-F42 Protein, das in den 42/GFP-Parasiten synthetisiert wird, kann als eine ca. 45kD große Bande mit dem mAk5.2 identifiziert werden (Spur 5). Auffallend ist das etwa 28kD große C-terminale Produkt, das auf der gleichen Höhe mit dem MSP-F19 Protein (Spur 4) migriert und das auch in der Präparation des in den Tg190Tg-Parasiten produzierten MSP-190F enthalten ist (Spur 1). Ob es sich hierbei möglicherweise um eine MSP-1 spezifische Prozessierung handelt sollte in einem anschließenden Experiment (siehe 5.2.4.4) untersucht werden.

Verwendete Proteinstandards: BM: Broad range molecular weight marker (New England Biolabs); LM: low range molecular weight marker (Pharmacia).

# 5.2.2.2 Etablierung von GFP-positiven T. gondii-Linien, die das MSP-190F sowie die Fragmente MSP-F19 und MSP-F42 produzieren

Im Hinblick auf die geplanten Bindungsstudien zur Untersuchung der Affinität zwischen rekombinanten MSP-190F bzw. seinen Fragmenten und den Erythrozyten wurden transgene *T. gondii*-Linien etabliert, welche die C-terminalen Prozessierungsprodukte MSP-F19 und MSP-F42 stabil produzieren. Eine gleichzeitige konstitutive Expression von Green Fluorescence Protein (GFP) sollte die Analyse der transgenen Parasitenlinien mittels Durchflusszytometrie ermöglichen (siehe 5.4.2).

Die für die Transfektion verwendeten Vektoren SP19GPI und SP42GPI wurden mit dem Restriktionsenzym BamHI linearisiert. Als Kotransfektionsvektor für die Etablierung der Parasitenlinie, die das MSP-F19 stabil synthetisieren sollte, wurde der Vektor p5RepPR3/GFP/HX verwendet, welcher das *hxgprt*-Gen und das *gfp*-Gen kodiert. Dieser Vektor (20 µg) wurde ebenfalls mit BamHI linearisiert und zusammen mit 100 µg des Vektors SP19GPI in die *hxgprt T. gondii*-Mutante transfiziert. Nach anschließender MPA/Xanthin Selektion wurde die transgene *T. gondii*-Linie 19/GFP isoliert. Das von dieser Linie synthetisierte, rekombinante MSP-F19 Protein kann in einem Western Blot mit dem mAk 5.2 als eine Bande mit dem Molekulargewicht von ca. 28kD identifiziert werden (Abb.: 5.6, Spur 4).

Für die Transfektion mit dem Vektor SP42GPI wurde die transgene *T. gondii*-Linie Tub8MycGFP gewählt, die das GFP konstitutiv synthetisiert und von Ch. Hettmann (AG Soldati) bereitgestellt wurde. Da diese Parasiten *hxgprt*-positiv sind, wurde als Kotransfektionsvektor das Plasmid pTub5CAT verwendet (15 μg, BamHI linearisiert). Dieses Plasmid kodiert für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) und ermöglicht die Selektion von Chloramphenicol-resistenten Transfektanten. Die aus dieser Transfektion resultierende *T. gondii*-Linie wurde 42/GFP genannt und mittels Western Blot mit dem mAk 5.2 analysiert (Abb.: 5.6, Spur: 5). Das rekombinante MSP-F42 Protein wurde als eine Bande mit dem MW von ca. 45kD identifiziert. Das kleinere, C-terminale Produkt mit dem MW von ca. 28kD migriert an der gleichen Höhe mit dem MSP-F19 Protein (Spur 4). Eine zu beiden Proteinfragmenten korrespondierende Bande (ca. 28kD), wurde in allen transgenen *T.gondii*-Linien nachgewiesen, die das MSP-190F Protein, fusioniert mit den SAG-1 Transportsignalen, produzieren (Bsp.: Tg190Tg, Abb.: 5.6, Spur: 1). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass es sich um eine möglicherweise spezifische Prozessierung handeln könnte und wurde in einem weiteren Teil dieser Arbeit untersucht (5.2.4.4).

Für die Herstellung einer *T. gondii*-Linie, die sowohl das GFP als auch das MSP-190F synthetisiert, wurde die bereits charakterisierte Tg190Tg Mutante verwendet. Die Tg190Tg-Parasiten wurden mit dem GFP-Expressionsplasmid pTub8MycGFP (50  $\mu$ g) und dem Selektionsvektor pTub5CAT (10  $\mu$ g), beide mit BamHI linearisiert, transfiziert, und einer Chloramphenicol-Selektion unterworfen. Die stabilen Transfektanten der so entstandenen *T. gondii*-Linie 190/GFP wurden anhand der GFP-Fluoreszenz identifiziert.

Die transgenen Parasitenlinien, die sowohl das GFP als auch das MSP-190F bzw. die Fragmente MSP-F19 und MSP-F42 synthetisieren, wurden mittels IFA und GFP-vermittelter Fluoreszenz analysiert. Diese Daten sind in der Abbildung 5.7 zusammengefasst.



## Abbildung 5.7.: Analyse der GFP-positiven T. gondii-Linien, die das MSP-190F sowie seine Fragmente MSP-F42 und MSP-F19 stabil exprimieren

Die intrazellulären Parasiten der transgenen *T. gondii*-Linien 190/GFP, 19/GFP und 42/GFP wurden fixiert, permeabilisiert und mit dem mAk 5.2 inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde das anti-Maus IgG Alexa<sub>594</sub>-Konjugat verwendet, das eine indirekte Immunfluoreszenzaufnahme im roten Lichtspektrum ermöglicht (mittlere Reihe). Eine signifikante Anreicherung und gleichmäßige Verteilung der Proteine an der Plasmamembran des Parasiten ist den Linien 19/GFP und 190/GFP gemeinsam. Im Gegensatz dazu zeigen die 42/GFP Parasiten eine unregelmäßige Immunfluoreszenz-Färbung, in der die Signale in einem Punktmuster erscheinen. Aufnahmen im grünen Lichtbereich machten GFP durch direkte Fluoreszenz sichtbar (rechte Reihe). Die Stärke des GFP-Signals ist in den Linien 190/GFP und 19/GFP vergleichbar, da zur Etablierung beider Linien der gleiche GFP-Expressionsvektor verwendet wurde (pTub8MycGFP). In der rechten Reihe sind die Phasenkontrastaufnahmen dargestellt.

Bei der Betrachtung der fixierten Proben durch einen FITC-Filter im Fluoreszenzmikroskop kann die GFP-bedingte Fluoreszenz erfasst werden. Die Stärke des Signals steht im direkten

Zusammenhang mit dem Plasmid, welches für die GFP-Expression benutzt wurde. Zum Nachweis der Proteine MSP-190F, MSP-F42 und MSP-F19 mittels IFA wurde der mAk 5.2 verwendet. Obwohl alle drei Proteine auf der Basis des gleichen Expressionsvektors synthetisiert wurden und bezüglich der Transportsignale identisch sind, ist ein signifikanter Unterschied in der Intensität der indirekten Immunfluoreszenz erkennbar. Während in den Linien 19/GFP und 190/GFP die rekombinanten Proteine an der Plasmamembran des Parasiten angereichert und gleichmäßig verteilt sind, weist die 42/GFP-Linie eine unregelmäßige Färbung auf, in der die Fluoreszenzsignale in einem Punktmuster erscheinen. Dies ist für GPI-verankerte Proteine nicht ungewöhnlich und wurde bereits bei anderen, GPI-verankerten Proteinen beobachtet (D. Soldati, persönliche Mitteilung). Ob die rekombinanten Proteine tatsächlich auf der Oberfläche der Parasiten lokalisiert sind, wurde im Anschluss untersucht. Diese Daten sind in dem Absatz 5.2.4.1 zusammengefasst.

## 5.2.2.3 Etablierung von attenuierten, temperatursensitiven ts-4 Mutanten, die das MSP-190F produzieren

Bei dem temperatursensitiven ts-4 Stamm handelt es sich um eine avirulente, nicht persistierende Mutante des RH-Stammes, die von Pfefferkorn isoliert wurde (Pfefferkorn, 1976). Diese Mutante zeichnet sich durch ihre Fähigkeit aus, bei 34°C zu wachsen, und wurde bereits in Immunisierungsexperimenten mit Mäusen (Sayles and Johnson, 1996) und *Aotus* Affen (Escajadillo, 1991) eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die ts-4 Mutante als ein Träger für das rekombinante MSP-1 verwendet um die Immunogenität vom MSP-1 im Tier zu untersuchen. Da zu unserer Kenntnis keine Region des MSP-1 Proteins im Hinblick auf eine potentielle Schutzwirkung ausgeschlossen werden kann, wurden nur solche transgene ts-4-Linien etabliert, die das gesamte, rekombinante MSP-190F produzieren.

Zur Herstellung der *msp-190f* exprimierenden ts-4-Linien wurden die Vektoren ppT 190 und pSP 190GPI verwendet. Das Protokoll für die Elektroporation der ts-4 Mutanten musste modifiziert werden. So erfolgte die Elektroporation bei 1,8 V und der Elektroporationspuffer wurde mit der doppelten Menge an ATP komplementiert .

Der Vektor ppT 190 (120 µg) sowie der Kotransfektionsvektor pTub8CAT (20 µg) wurden mit BamHI linearisiert. Die Elektroporation erfolgte in Anwesenheit des Restriktionsenzyms NotI. Stabile Transfektanten wurden mittels Chloramphenicol-Selektion etabliert. Die transgene Linie ts4/Pf190 wurde für weitere Studien genutzt. Die Western Blot Analyse ist in der Abbildung 5.8 dargestellt. Die ts4/Pf190-Linie synthetisiert das 190kD große MSP-190F Protein, das in einem Immunoblot mit dem mAk 5.2 nachgewiesen werden kann (Spur 3). Den Erwartungen entsprechend bildet dieses MSP-190F Proteinaggregate aus (MW >190kD), die auch bei der Western Blot Analyse der Pf190-Linie nachgewiesen wurden (siehe Abb.: 6.6, Spur 3). Die Analyse mittels IFA zeigt die gleiche, intrazelluläre Verteilung des Proteins, wie bereits für Pf190-Linie beschrieben (siehe Abb.: 6.5A).

Für die Etablierung einer transgenen ts-4-Mutantenlinie, die das rekombinante MSP-190F an der Plasmamembran akkumuliert, wurden die ts-4 Parasiten mit dem Vektor pSP 190GPI transfiziert (150 µg, BamHI linearisiert). Als Kotransfektionsvektor wurde das Plasmid pß-Gal1/loxTub/CAT (20 µg, SacII linearisiert) verwendet. Die Elektroporation erfolgte in der Gegenwart des Restriktionsenzyms SacII. Nach anschließender Chloramphenicol-Selektion wurde die Linie ts4/Tg190Tg isoliert, die das MSP-190F Protein in seiner Gesamtsequenz synthetisiert. Die Western Blot Analyse dieser Linie ist in der Abbildung 5.8, Spur 2 dargestellt. Das mit dem mAk 5.2 identifizierte Hauptprodukt ist das 190kD große MSP-190F Protein. Die Analyse der ts4/Tg190Tg-Linie mittels IFA zeigt analog zu der IFA Analyse der virulenten Tg190Tg-Linie eine Anreicherung und eine gleichmäßige Verteilung des rekombinanten Proteins an der Oberfläche.



Abbildung 5.8.: Western Blot Analyse der attenuierten T. gondii-Linien, die das MSP-190F stabil exprimieren Zelllysate aus rekombinanten (Spur 2: ts4/Tg190Tg; Spur 3: ts4/Pf190) und wildtyp (Spur 1: ts-4) ts-4 Mutanten des RH Stammes wurden in einem 8%igen PAA-Gel der SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen unterworfen. Zum Nachweis der rekombinanten Proteine wurde der mAk 5.2 verwendet, gefolgt von dem anti-Maus IgG POD-Konjugat. Beide transgenen Linie produzieren das 190kD große MSP-190F Protein. Analog zu der Pf190-Linie bildet auch das in ts4/Pf190-Linie synthetisiertes Protein Aggregate aus, die als eine Proteinbande mit dem MW>190kD identifiziert wurde (Spur 3) und unter reduzierenden Bedingungen nicht mehr nachweisbar ist. Das Molekulargewicht des Proteinstandards (M) ist in kD angegeben (Broad range molecular weight marker, New England Biolabs).

## 5.2.3 Aufreinigung des rekombinanten MSP-190F aus T. gondii mittels Immunaffinitätschromatographie

Die Aufreinigung des rekombinanten MSP-190F Proteins aus *T. gondii* erfolgte nach einem Protokoll, das zur Aufreinigung des nativen MSP-1F aus *P. falciparum* (FCB-1 Stamm) in unserem Labor verwendet wurde (modifiziert aus Siddiqui *et al.*, 1987).

Das Protein sollte über eine Immunaffinitätssäule mit dem mAk 5.2 aus dem Lysatüberstand der transgenen *T. gondii* Parasiten isoliert werden. Der mAk 5.2 vom Isotyp IgG2b erkennt ein konformationelles Epitop am Carboxyterminus von MSP-1 innerhalb des natürlichen Prozessierungsproduktes MSP-19. Durch die Bindung an diesen monoklonalen Antikörper wird das rekombinante MSP-190F spezifisch an der Säule zurückgehalten und kann mit einem Glycinpuffer bei niedrigem pH (pH 2,5) eluiert werden.

Unser Ziel war es, das rekombinante MSP-190F in seiner gesamten Länge und in möglichst reiner Form zu gewinnen. Da der mAk 5.2 alle carboxyterminalen Fragmente des MSP-190F an der Säule zurückhält, wurde für die Aufreinigung die *T. gondii*-Linie Pf190 ausgesucht. Das in dieser Linie synthetisierte MSP-190F besteht fast ausschließlich aus dem 190kD großen Protein und weist die wenigsten mit dem mAk 5.2 nachweisbaren Spaltungsprodukte auf (Abb. 5.6).

Zu diesem Zweck wurden die Parasiten der Linie Pf190 in Vero-Zellen kultiviert, die eine höhere Ausbeute ermöglichen. Für eine Testaufreinigung wurden ca.  $5x10^9$  extrazelluläre Pf190-Parasiten geerntet. Nach der Lyse wurden die unlöslichen Bestandteile sedimentiert und der Überstand auf die frisch vorbereitete Immunaffinitätssäule geladen (detailliertes Protokoll siehe 4.11.1.3). Mit insgesamt 12 Elutionsschritten (E1 – E12) wurde das gebundene Protein von der Affinitätssäule eluiert und aus jeder Fraktion ein Aliquot in einem Immunoblot mit dem mAk 5.2 analysiert. Nur die Fraktionen der Elutionsschritte E5 – E9 erhielten das gereinigte MSP-190F Protein. Diese wurden zusammen geführt und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

Aus den  $5x10^9$  Pf190-Parasiten konnten ca. 5 µg des rekombinanten MSP-190F mittels Immunaffinitätschromatographie gereinigt werden. Gehen wir davon aus, dass für einen Immunisierungsversuch im Affenmodel einige Milligramm des Proteins erforderlich sind, müssten jeweils  $1x10^{12}$  Parasiten zur Aufreinigung von einem Milligramm zur Verfügung stehen.

Nachdem wir zeigen konnten, dass das Protokoll zur Aufreinigung des nativen MSP-1F aus *P. falciparum* auch zur Aufreinigung vom in *T. gondii* synthetisierten MSP-190F geeignet ist, wurde eine entsprechende Menge der Pf190-Parasiten zur Gewinnung des rekombinanten Proteins in präparativem Maßstab kultiviert. Es wurden insgesamt etwa 4 x  $10^{10}$  Parasiten geerntet und zur Aufreinigung von ca. 37,5 µg des MSP-190F verwendet. Das Protein wurde nach Gelelektrophorese und Coomassie Färbung als eine Proteinbande mit dem MW von

190kD identifiziert (Abbildung 5.10). Unter Zugabe von ß-Mercaptoethanol zum Ladungspuffer wird die Bildung von Aggregaten verhindert, die in einer Western Blot Analyse weiterhin nachweisbar sind (Daten nicht gezeigt). Diese Proteinpräparation wurde für die Immunisierungsversuche mit *Aotus* Affen verwendet (siehe 5.3.2.3.2).

ng Proteinstandard					MSF	MSP-190F	
1000	500	250	100	50	1µl	10µl	
~	-						



Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 1  $\mu$ l und 10  $\mu$ l des gereinigten MSP-190F Proteins aufgetragen und in einem 10% igen PAA-Minigel mit den Proben des Proteinstandards verglichen. Die Zugabe von ß-Mercaptoethanol zum Proteinladepuffer verhinderte die Bildung von Proteinaggregaten, und das gereinigte Protein wurde als eine saubere Bande mit dem MW von 190kD identifiziert. Die abgeschätzte MSP-190F-Konzentration: 30 ng/ $\mu$ l.

In einem SDS-PAGE und anschließender Coomassie Färbung (Abbildung 5.10) wurde das aus *T. gondii* Tachyzoiten gereinigte Protein mit weiteren MSP-190F Präparationen verglichen, die aus HeLa Zellen und *E. coli* gereinigt wurden (Pan *et al.*, 1999). Die aus *E. coli* und aus *T. gondii* gewonnenen Proteine korrespondierten in ihrem MW zu der 190kD Bande des Proteinstandards. Im Gegensatz dazu zeigte das aus HeLa Zellen gereinigte MSP-190F eine veränderte Mobilität in SDS-PAGE, was sich in einem MW>190kD äußerte.



## Abbildung 5.10.: Elektrophoretische Analyse der rekombinanten MSP-190F, gereinigt aus verschiedenen heterologen Expressionssystemen

Die verschiedenen MSP-190F Präparationen wurden mittels einer SDS-PAGE im 8%igen PAA-Gel aufgetrennt und durch Coomassie Färbung sichtbar gemacht. Das aus *E. coli* mittels Ni<sup>2+</sup> Chelatchromatographie gereinigte Protein (Spur 3) korrespondiert in seinem MW zu der 190kD Bande des Proteinstandards und zeigt die gleiche elektrophoretische Mobilität, wie das aus *T. gondii* gewonnene MSP-190F (Spur 1). Im Unterschied dazu wurde bei dem, aus HeLa-Zellen mittels Immunaffinitätschromatographie gereinigten MSP-190F (Spur 2) ein langsameres Laufverhalten festgestellt (MW>190kD). Das hier sichtbar werdende, höhere Molekulargewicht ist auf Glykosylierung dieses Proteins zurückzuführen (Burghaus et al., 1999). Das Molekulargewicht des Proteinstandards (M) ist in kD angegeben (Broad range molecular weight marker, New England Biolabs).

Die Daten, die eine Auskunft über die Konservierung der natürlichen Antigenicität liefern, sind in der Tabelle 3 zusammengefasst. Die aus den drei verschiedenen heterologen Expressionssystemen gereinigte MSP-190F Proteine wurden einer Western Blot Analyse mit 11 ausgewählten mAk unterworfen, die das authentische MSP-1F des FCB-1 Isolats vom *P. falciparum* erkennen. Während alle 11 mAk mit den Proteinen aus *E. coli* und *T. gondii* reagieren, wurde das aus CHO Zellen gereinigte MSP-190F von drei mAk nicht erkannt.

MSP-190F spezifische mAk			Western Blot mit MSP-190F gereinigt aus			
mAk	Epitop	Spezifität	T. gondii	E. coli	СНО	
5.2	konf.	FCB-1/3D7	+	+	+	
12.10	konf.	FCB-1/3D7	+	+	+	
7.5	konf.	FCB-1/3D7	+	+	+	
12.8	konf.	FCB-1/3D7	+	+	+	
7.3	konf.	FCB-1	+	+	-	
2.2	konf.	FCB-1/3D7	+	+	+	
7.6	konf.	FCB-1	+	+	+	
9.8	konf.	FCB-1/3D7	+	+	-	
13.2	sequen.	FCB-1/3D7	+	+	+	
13.1	sequen.	FCB-1	+	+	-	
6.1	sequen.	FCB-1	+	+	ND	

#### Tabelle 3: Immunoreaktivität der verschiedenen MSP-190F Präparationen

Die heterolog exprimierten, gereinigten MSP-190F Proteine wurden einer Western Blot Analyse unter nicht reduzierenden Bedingungen mit 11 monoklonalen Antikörpern unterworfen, die spezifisch das MSP-1 von *P. falciparum* erkennen. Diese Antikörper erkennen entweder konservierte (FCB-1 und 3D7 Isolat gleichzeitig) oder dimorphe Epitope (ausschließlich FCB-1 oder 3D7). Während alle Antikörper das aus *E. coli* und aus *T. gondii* gereinigte Protein identifizieren, wurde bei drei mAk keine Kreuzreaktivität mit dem aus CHO Zellen mittels Immunaffinitätschromatographie gewonnenen MSP-190F festgestellt. ND: Experiment nicht durchgeführt, da der mAk 6.1 in limitierter Menge vorhanden war. konf.: konformationelles Epitop; sequen.: sequenz-spezifiches Epitop.

## 5.2.4 Charakterisierung der in T. gondii synthetisierten Proteine

## 5.2.4.1 Analyse der rekombinanten Proteine im Bezug auf ihre subzelluläre Lokalisierung

Die einfachste Methode zum Nachweis einer Lokalisierung des Proteins an der Oberfläche des Parasiten ist die Analyse mittels IFA unter nicht-permeabilisierenden Bedingungen. Während unter Zugabe von Detergenz alle Proteine der Zelle, sowohl intrazelluläre wie auch oberflächenständige, identifiziert werden können, werden in Abwesenheit des permeabilisierenden Stoffes nur die Proteine nachgewiesen, die sich auf der Plasmamembran des intakten Parasiten befinden.

Zur Analyse mittels IFA wurden extrazelluläre Parasiten verwendet (siehe Methoden 4.10.4.1). In Parallelansätzen wurden von jeder *T. gondii*-Linie zwei Proben vorbereitet und unter Zugabe von dem permeabilisierenden Detergenz Triton X 100 (TX100) bzw. in seiner

Abwesenheit behandelt. Als Erstantikörper wurde der mAk 5.2 oder mAk 12.10 verwendet, die beide das Carboxyterminus vom MSP-190F unter nicht reduzierenden Bedingungen erkennen. Der mAk 12.10 bindet an ein konformationelles Epitop, das von Aminosäuren beider EGF-Domänen gebildet wird (Chappel and Holder, 1993).

Die Daten aus der indirekten Immunfluoreszenz Analyse sind in der Tabelle 4 zusammengefasst. Mit Ausnahme des in Pf190-Linie synthetisierten MSP-190F Proteins gelangen alle anderen rekombinanten MSP-1F Proteine an die Oberfläche des Parasiten und können deshalb unter nicht-permeabilisierenden Bedingungen mit beiden monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. Dies bestätigt unsere frühere Beobachtung, dass die verschiedenen Transportsignale zum signifikanten Unterschied in der subzellulären Lokalisierung führen (vergleiche Abb.: 5.5). Das in der Pf190-Linie synthetisierte, von einer verkürzten GPI-Anker-Signalsequenz des MSP-1 Proteins von P. falciparum flankierte MSP-190F, konnte nicht an der Oberfläche nachgewiesen werden und akkumulierte vorwiegend in den intrazellulären Organellen des Parasiten. War die plasmodiale GPI-Anker-Signalsequenz vollständig vorhanden, wurde das rekombinante MSP-190F an der Oberfläche der intakten Parasiten identifiziert (Pf190Pf-Linie). Genauso wiesen die rekombinanten MSP-1F Proteine, die mit Transportsignalen des SAG-1 Proteins fusioniert wurden, alle eine eindeutige Lokalisierung an der Oberfläche auf (Linien Tg190Tg, 42/GFP und 19/GFP). Das in der 42/GFP-Linie synthetisierte MSP-F42 Protein wurde auch an der Plasmamembran mit dem bereits beschriebenen Punktmuster identifiziert (siehe Abb.: 5.7).

Transgene T. gondii-Linie	+ TX100	- TX100
Pf190	++	-
Pf190Pf	++	++
Tg190Tg	+++	+++
42/GFP	++	++
19/GFP	+++	+++

## Tabelle 4: IFA Analyse der extrazellulären T. gondii-Linien unter permeabilisierenden (+ TX100) und nichtpermeabilisierenden (- TX100) Bedingungen

Von jeder *T. gondii*-Linie wurden zwei Proben vorbereitet und unter Zugabe von dem permeabilisierenden Detergenz TX100 bzw. in seiner Abwesenheit behandelt. Der Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte mit den mAk 5.2 und mAk 12.10, die beide gegen den C-Terminus des MSP-F19 Proteins gerichtet sind. Nur das in Pf190-Linie synthetisierte MSP-190F wurde nicht an der Plasmamembran nachgewiesen. Die Anzahl der "+" korreliert mit der relativen Stärke des Immunfluoreszenz-Signals. Um die subzelluläre Lokalisierung der rekombinanten Proteine weiter einzuschränken, wurden Proteinfraktionierungen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Diese Experimente - genauso wie die Analyse mittels IFA - erlauben keine Aussagen über die Art der eventuellen Membranverankerung, geben jedoch eine Auskunft über die Art der Assoziation der Proteine mit der Membran. Zur positiven Kontrolle wurden alle Proteinextrakte in Immunoblots mit dem mAk DG52 analysiert, der ein Epitop des GPI-verankerten SAG-1 Proteins von *T. gondii* erkennt (Burg *et al.*, 1988).

Die Methode der Phasentrennung in TritonX 114 (TX114) ermöglicht die Unterscheidung zwischen integralen und zytosolischen bzw. sekretorischen Proteinen. TX114 ist ein nichtionisches Detergenz, das aus einer hydrophoben, modifizierten Phenolgruppe und einem hydrophilen Schwanz besteht. Wird ein Membransystem in TX114 gelöst, werden amphipatische Proteine vom TX114 selektiv gebunden. Integrale Membranproteine werden dank ihrer hydrophoben Transmembranregion in der detergenten, TX114-haltigen Phase angereichert, wohingegen die sekretierten und die zytosolischen, stark hydrophilen Proteine in der wässrigen Phase zu finden sind (Brusca and Radolf, 1994). GPI-verankerte und membranverankerte Proteine sind in den meisten Fällen in der TX114 Phase enthalten. So wird auch das SAG-1 Protein vorwiegend in der detergenten Phase zurückgehalten, kann jedoch im Extremfall bis zu 40% auch in der löslichen Phase gefunden werden (Kim *et al.*, 1994).

Alternativ zu der Methode der Phasentrennung in TX114 wurden die Membranfraktionen einer Natrium-Karbonat-Extraktion unterworfen, bevor man die Proteinverteilung zwischen der löslichen und unlöslichen Phase mittels Immunoblotanalyse mit dem MSP-1 spezifischen mAk 5.2 untersuchte. Im Allgemeinen werden durch Zugabe von 0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11,5) die elektrostatischen Protein-Protein-Wechselwirkungen zerstört, die hydrophoben Wechselwirkungen bleiben jedoch bestehen. Ein Protein, welches mit der Membran nur über elektrostatische Wechselwirkungen assoziiert ist, wird nach dieser Extraktion losgelöst und nach einer Ultrazentrifugation im Überstand - d. h. in der löslichen Phase - zu finden sein. Dagegen wird ein über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran verbundenes Protein in der unlöslichen Membranfraktion identifiziert.

Die Ergebnisse der Phasentrennung in TX114 und der Natrium-Karbonat-Extraktion sind für die MSP-190F Proteine in der Abbildung 5.11 zusammengefasst. Das in der Tg190Tg-Linie synthetisierte MSP-190F, das mit den SAG-1-Transportsignalen fusioniert wurde, verhielt sich genau so, wie das endogene SAG-1 Protein. Nach einer TX114-Extraktion wurde das rekombinante Protein in der detergenten TX114-Phase identifiziert und konnte durch Zugabe von 0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,5 nicht in Lösung gebracht werden. Diese Ergebnisse deuteten auf ein Protein hin, das mit der Membranfraktion über hydrophobe Wechselwirkungen stark asso-ziiert und sowie integrale Membranproteine bzw. GPI-verankerte Proteine in der detergenten TX114-Phase gehalten wurde. Die gleiche Verteilung wurde auch für das rekombinante MSP-

190F der Pf190Pf-Linie festgestellt, das von vollständigen plasmodialen Transportsignalen flankiert wird (Daten nicht gezeigt).

Das in der Pf190-Linie produzierte MSP-190F konnte zwar nicht durch Natrium-Karbonat-Extraktion aus der Membranfraktion gelöst werden, wurde jedoch nach der Phasentrennung in TX114 fast ausschließlich in der wässrigen Phase identifiziert. Somit verhielt sich das rekombinante Protein als ein mit der Membranfraktion über hydrophobe Wechselwirkungen assoziiertes, stark hydrophiles Protein.



## Abbildung 5.11.: Verteilung der rekombinanten MSP-190F Proteine zwischen verschiedenen zellulären Fraktionen

Die durch Phasentrennung in TX114 und durch Natrium-Karbonat-Extraktion gewonnenen Proteinfraktionen der transgenen *T. gondii*-Linien wurden in 12% igem PAA-Gel aufgetrennt und in einem Western Blot mit dem mAk 5.2 analysiert. Aus jeder Fraktion wurde zur Kontrolle 1/4 der Probe auf die Verteilung des endogenen SAG-1 Proteins hin untersucht. Diese Aliquots wurden in einem Immunoblot (8%-iger PAA-Gel) mit dem SAG-1 spezifischen mAk DG52 unter reduzierenden Bedingungen analysiert (3% β-Mercaptoethanol im Ladepuffer), als Zweitantikörper wurde das anti-Maus POD-Konjugat verwendet. Das mit den *T. gondii* Transportsignalen fusionierte MSP-190F (Tg190Tg, links im Bild) sowie das SAG-1 Protein sind nach einer Phasentrennung in TX114 in der detergenten Fraktion (D) zu finden und konnten durch Zugabe von 0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,5 nicht aus der Membranfraktion (P) losgelöst werden. Im Gegensatz dazu befindet sich das MSP-190F Protein, das von unvollständigen plasmodialen Transportsignalsequenzen flankiert wird (Pf190, rechts im Bild), nach einer Phasentrennung mit TX114 in der wässrigen (A) Phase, kann jedoch ebenfalls nicht durch Natrium-Karbonat-Extraktion in Lösung (lösliche Überstandsfraktion Ü) gebracht werden. Die Mehrheit des Proteins bildet die bereits beschriebenen Proteinaggregate aus (MW > 190kD). Das Molekulargewicht des Proteinstandards ist in kD angegeben (Broad range molecular weight marker, New England Biolabs).

Auch die Proteine MSP-F42 und MSP-F19 wurden bezüglich ihrer Assoziation mit den Membranfraktionen der rekombinanten *T. gondii*-Linien 42/GFP und 19/GFP analysiert (Abb.: 5.12). Beide rekombinanten Proteine, die von den gleichen Transportsignalen flankiert werden wie das in der Tg190Tg-Linie synthetisierte MSP-190F Protein, wurden nach der Phasentrennung in TX114 vorwiegend in der detergenten Phase identifiziert und konnten nicht durch Zugabe von 0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,5 aus der Membranfraktion freigesetzt werden. Das gleiche Verhalten wurde auch für das endogene SAG-1 Protein festgestellt.



## Abbildung 5.12.: Verteilung der MSP-F42 und MSP-F19 Proteine zwischen verschiedenen zellulären Membranfraktionen

Die Verteilung der Proteine nach der Phasentrennung in TX114 und nach der Natrium-Karbonat-Extraktion wurde mittels Western Blot mit dem mAk 5.2 analysiert (8%iger PAA-Gel). Beide Proteine, fusioniert mit den authentischen Transportsignalen von *T. gondii*, wurden vorwiegend in der detergenten TX114-Phase (D) identifiziert. Das MSP-F19 Protein konnte durch Natrium-Karbonat-Behandlung nicht aus der Membranfraktion extrahiert werden. Im Falle des MSP-F42 Proteins wurde in der TX114-Phase (D) und in der Membranfraktion (P) jeweils das C-terminale, 28kD große Spaltungs-/Abbauprodukt identifiziert. Nur eine geringe Menge des ca. 45kD großen MSP-F42 wurde durch Natrium-Karbonat-Extraktion aus der Membranfraktion losgelöst und konnte in der löslichen Phase (Ü) nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurden Aliquots auf die Verteilung des endogenen SAG-1 Proteins in einem Western Blot mit dem mAk DG52 hin untersucht. Als sekundärer Antikörper wurde in allen Experimenten das anti-Maus IgG POD-Konjugat verwendet. Das Molekulargewicht des Proteinstandards ist in kD angegeben.

## 5.2.4.2 Analyse der Epitopkonservierung bei den verschiedenen MSP-190F Proteinen

Eines der wichtigsten Werkzeuge bei der Charakterisierung der Konformation eines heterolog produzierten Proteins sind spezifische Antikörper, die gegen die Epitope des nativen Proteins gerichtet sind. Die Antikörper-vermittelte Analyse des rekombinanten Proteins ermöglicht uns, einen Eindruck über die Konservierung seiner antigenen Epitope zu gewinnen. Handelt es sich dabei um konformationelle Epitope, ist die korrekte Faltung gegebenenfalls Modifizierung des Proteins, für die Erkennung des Epitops notwendig.

Ich habe in dieser Arbeit 10 monoklonale Antikörper (mAk) ausgewählt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jana McBride), die das authentische MSP-1 des FCB-1 Isolats von *P. falciparum* erkennen. Mit Ausnahme von mAk 17.1 und 13.2 handelt es sich um Antikörper, die konformationelle Epitope unter nicht reduzierenden Bedingungen erkennen. Alle drei transgene *T. gondii*-Linien, die das MSP-190F in seiner Gesamtlänge synthetisieren, wurden einer Analyse mittels IFA unter permeabilisierenden Bedingungen unterworfen. Die Reaktivität der rekombinanten Proteine mit den MSP-1 spezifischen Antikörpern wurde untersucht und mit der zu erwartenden Kreuzreaktivität des nativen MSP-1 Proteins verglichen. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die relative Stärke des Immunfluoreszenz-Signals durch die Menge des synthetisierten Proteins beeinflusst wird, die sich in den drei analysierten *T. gon-dii*-Linien unterscheiden kann.

Die Daten aus drei unabhängigen Experimenten sind in der Tabelle 4 zusammengefasst. Das mit den Transportsignalen des SAG-1 Proteins fusionierte MSP-190F (Tg190Tg-Linie) zeigt die beste Konservierung der immunogenen Epitope und wurde von allen 10 mAk erkannt. Mit Ausnahme des mAk 7.1, mit dem nur ein schwaches Signal beobachtet werden konnte, reagierten die übrigen Antikörper mit dem zu erwartenden Muster an Signalstärke. Die mAk 15.2 und 17.2, die in einer IFA mit dem nativen MSP-1 eine reduzierte Kreuzreaktivität zeigen (ausgedruckt durch "++"), reagierten auch schwächer mit dem Tg190Tg Protein (Reduktion der Signalstärke). Das mit den plasmodialen Transportsignalen fusionierte Pf190Pf Protein zeigt in Vergleich zu dem gleichzeitig analysierten Tg190Tg kleinere Unterschiede. Mit dem mAk 7.1 konnte keine und mit dem mAk 17.2 nur eine geringe Kreuzreaktivität festgestellt werden. Die mAk 15.2 und mAk 9.8 reagierten schwächer bei gleicher Verdünnung. Das in der Pf190-Linie synthetisierte Protein wurde von vier mAk nicht erkannt (mAk 17.1,

7.1, 15.2, 17.2), mit dem mAk 9.8 konnte nur ein sehr schwaches Signal beobachtet werden. Verglichen mit den Tg190Tg und Pf190Pf Proteinen reagierten mit Ausnahme des mAk 5.2 alle anderen Antikörper schwächer. Es ist anzunehmen, dass das Pf190 Protein, das mit einem nicht funktionellen GPI-Ankersignal fusioniert ist und nicht auf der Plasmamembran des Parasiten nachweisbar ist, nicht korrekt gefaltet und unvollständig modifiziert wurde.

MSP	-1 spezifische	Zu erwartende Rekombinantes MSP-1 aus <i>T. gondii</i>				
mAk	Region/Epitop	mit <i>P.f.</i> FCB-1	Tg190Tg	Pf190Pf	Pf190	
17.1	P42, lin.	+++	+++	+++	-	
13.2	P83, lin.	+++	+++	+++	++	
6.1	P42, konf.	+++	+++	+++	+	
12.10	P19, konf.	+++	+++	+++	++	
7.1	NB, konf.	+++	+	-	-	
15.2	NB, konf.	++	++	+	-	
9.8	NB, konf.	+++	+++	++	+/-	
12.4	NB, konf.	+++	+++	+++	+	
17.2	NB, konf.	++	+	+/-	-	
5.2	P19, konf.	+++	+++	+++	+++	

#### Tabelle 4: Immunoreaktivität von verschiedenen MSP-190F Proteine mit monoklonalen Antikörpern

Intrazelluläre Tachyzoiten der Linien Tg190Tg, Pf190Pf und Pf190 wurden mittels IFA unter permeabilisierenden Bedingungen mit 10 MSP-1 spezifischen mAk auf die Immunoreaktivität der rekombinanten MSP-190F Proteine hin untersucht. Als Zweitantikörper wurde das anti-Maus IgG Alexa <sub>594</sub>-Konjugat verwendet. Die zu erwartende Reaktivität mit dem *P. falciparum* (FCB-1 Isolat) wurde aus den Daten von Prof. Jana McBride übernommen, da keine *P.f.* Parasiten zur Verfügung standen. Die Anzahl der "+" gibt die relative Stärke des Immunfluoreszenzsignals wieder, wobei der stärkste Signal mit "+++" beschrieben wurde. Die mAk 17.1 und 13.2 erkennen ein lineares Epitop (lin.), die restlichen ein konformationelles (konf.) Epitop. Einige der Epitope sind nicht bekannt (NB). Die mAk wurden in den empfohlen Verdünnungen verwendet:

## 5.2.4.3 Nachweis der GPI-Verankerung mittels PI-PLC Behandlung in vivo

Um zu entscheiden, ob die mit dem MSP-190F Protein fusionierte GPI-Anker-Signalsequenzen als solche erkannt wurden, wurden lebende, extrazelluläre, radioaktiv markierte Parasiten mit der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) bakteriellen Ursprungs (*Bacillus cereus*) inkubiert. Die <sup>3</sup>H markierten Proteine wurden aus dem Überstand bzw. aus dem Zelllysat immunopräzipitiert und autoradiographisch nachgewiesen. Nur die Proteine, die über ein GPI-Anker in der Plasmamembran verankert sind, werden durch die PI-PLC in den Überstand freigesetzt.

Diese Experimente wurden wiederholt mit beiden MSP-190F Proteinen durchgeführt, die eine vollständige GPI-Ankersignalsequenz enthielten und auf der Oberfläche der Tg190Tg bzw. Pf190Pf-Linien lokalisiert waren. Keine der beiden Proteine könnte durch die PI-PLC Be-

handlung von der Oberfläche freigesetzt werden. Obwohl das SAG-1 Protein effizient (bis zu etwa 50%) von der Oberfläche entfernt und im Überstand nachgewiesen werden konnte, wurden beide MSP-190F Proteine nach der Immunopräzipitation mit dem mAk 5.2 in der Pelletfraktion identifiziert (Abbildung 5.13).



#### Abbildung 5.13.: Immunopräzipitation von metabolisch markierten Proteinen nach PI-PLC Behandlung

Für die metabolische Markierung mit <sup>3</sup>H Leucin wurden etwa 2x10<sup>8</sup> extrazelluläre ts4/Tg190Tg-Parasiten verwendet. Die radioaktiv markierten Parasiten wurden geerntet, gewaschen und in zwei Aliquots geteilt. Zur Freisetzung der GPI-verankerten Proteine wurden zu einer der Proben 2U PI-PLC (Boehringer Mannheim) gegeben (+PI-PLC), der Kontrollansatz wurde mit dem gleichen Volumen an PI-PLC-Reaktionsspuffer versetzt (-PI-PLC). Nach einer zweistündigen Inkubation beider Proben bei 37°C wurden die Parasiten abzentrifugiert. Die pelletierte Fraktion wurde lysiert und sowohl dieser Lysatüberstand (P) als auch der ursprüngliche Reaktionsüberstand (Ü) mit dem mAk 5.2 bzw. DG52 versetzt. Die Immunopräzipitate wurden in einem 10% igen PAA-Gel aufgetrennt. Das Autoradiogramm entstand nach einer Expositionszeit von 48 h.

Das gleiche Protokoll wurde auch für das MSP-F19 Protein angewandt, jedoch ohne Erfolg, da es nicht gelang das rekombinante MSP-F19 mit <sup>3</sup>H Leu metabolisch zu markieren. Das in dem selben Experiment markierte SAG-1 Protein konnte im Autoradiogramm nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Aus diesem Grunde wurden nicht markierte, extrazelluläre 19/GFP Parasiten mit oder ohne PI-PLC inkubiert. Die Proteine SAG-1 und MSP-F19 wurden dann sowohl aus dem Parasitensediment als auch aus dem Überstand in einem Western Blot mit mAk 5.2 bzw. mAk DG52 analysiert. Wie in der Abbildung 5.14 dargestellt wurde ein Teil des etwa 28kD großen

MSP-F19 Proteins durch die PI-PLC abgespalten und konnte in dem Überstand der mit PI-PLC behandelten Probe nachgewiesen werden. Obwohl die gleiche Anzahl von 19/GFP-Parasiten (etwa 10<sup>8</sup>) in beiden Ansätzen verwendet wurde, konnte in der mit PI-PLC behandelten Probe nur eine kleine Menge des MSP-F19 Proteins nachgewiesen werden. Dies ist wahrscheinlich auf eine proteolytische Restaktivität des PI-PLC Enzyms zurückzuführen, die in allen Experimenten ebenfalls beobachtet wurde.





Extrazelluläre Parasiten der 19/GFP-Linie wurden geerntet, in zwei Aliqouts (je 1x10<sup>8</sup> Parasiten) geteilt und unter Zugabe von 2U PI-PLC (Molecular Probes) oder equivalentem Volumen von PI-PLC-Reaktionspuffer 1 h bei 4°C und ständigen schaukeln inkubiert. Die Proteine des Überstands (Ü) wurde TCA-präzipitiert und zusammen mit den Proteinen des Sedimentslysat (P) in einem 12% igen PAA-Gel aufgetrennt. Die Western Blot Analyse erfolgte mit den mAk 5.2 und anti-Maus IgG POD-Konjugat als Zweitantikörper. Nur in dem Überstand der PI-PLC behandelten Probe konnte das freigesetzte MSP-F19 Protein nachgewiesen werden.

## 5.2.4.4 Untersuchungen zur potentiellen Prozessierung des MSP-F42 Proteins

Das natürliche MSP-1 Prozessierungsprodukt p42 wird während der *P. falciparum* Invasion von Erythrozyten in einem sekundären Prozessierungsschritt zu den Fragmenten p29 und p19 gespalten (Blackman *et al.*, 1991). Diese Spaltung wird durch eine membrangebundene, Kalzium-sensitive Serin-Protease katalysiert (Blackman and Holder, 1992; Cooper and Bujard, 1992a), die noch nicht identifiziert werden konnte.

In Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass alle rekombinanten MSP-1F Proteine, die mit den Transportsignalen des SAG-1 Proteins fusioniert wurden, eine etwa 28kD große Proteinbande aufweisen, die in der Western Blot Analyse mit dem mAk 5.2 bei allen Präparationen nachgewiesen wurde (vergleiche Abbildung 5.6 und 5.12). Dieses C-terminale Spaltungsprodukt besitzt in SDS-PAGE die gleiche elektrophoretische Mobilität wie das in T. gondii hergestellte MSP-F19.
Weder durch Zugabe von Proteaseinhibitoren zum Extraktionspuffer, noch durch unterschiedliche Vorbereitung des Zelllysates, noch durch direktes Auftragen von nicht lysierten sowohl extra- wie auch intrazellulären Parasiten konnte dieses Verhalten nicht beeinflusst werden. Aus diesem Grunde haben wir die Aminosäuresequenz der sekundären Prozessierungsstelle vom MSP-1F, nämlich Gln-Gly-Met-**Leu-Asn**-Ile-Ser, modifiziert. Die Spaltung findet zwischen Leucin an der Position 1630 (Leu<sub>1630</sub>) und Asparagin an der Position 1631 (Asn<sub>1631</sub>) (fett gedruckt) statt. Da die Erkennungssequenz für die postulierte Serin-Protease nicht bekannt ist, entschieden wir uns für den Austausch des Leucins, das nach der Spaltung den N-Terminus von p29 bildet, gegen Glutaminsäure bzw. Prolin.

Der Nukleotidaustausch wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese durchgeführt (siehe 4.5.6). Als Matrize-DNA diente der Vektor pSP 42GPI. Für jede Reaktion wurden zwei mutagenisierende, 28Bp lange Oligonukleotide entworfen, die folgenden Aminosäureaustausch vermittelten: Primer  $E_s$  (sense Orientierung) und  $E_a$  (antisense Orientierung) für die Substitution des Leucin durch Glutaminsäure (E), bzw. Primer  $P_s$  und.  $P_a$  für den Austausch Leucin gegen Prolin (P). Die PCR wurde mit 18 Amplifikationszyklen und einer Elongationszeit von 10 min durchgeführt.

Der Aminosäureaustausch wurde auf der DNA-Ebene durch Sequenzanalyse bestätigt. Die resultierenden Vektoren weisen folgende Modifikationen der Spaltungsstelle auf:

Vektor pSP42GPI/E, mit dem Austausch Glu gegen Leu: Gln-Gly-Met-**Glu**-Asn-Ile-Ser, und Vektor pSP42GPI/P, mit dem Austausch Pro gegen Leu: Gln-Gly-Met-**Pro**-Asn-Ile-Ser.

Beide Vektoren wurden für die Etablierung von stabilen *T. gondii*-Linien verwendet. Von jedem Plasmid wurden 150 µg mit BamHI verdaut und mit je 20 µg des Vektors p5RepPR3/GFP/HX (ebenfalls BamHI linearisiert) für die Transfektion der *hxgprt T. gondii*-Mutante angesetzt. Nach anschließender MPA/Xanthin Selektion wurden die transgenen *T. gondii*-Linien 42/E und 42/P isoliert und auf die Expression des MSP-F42E bzw. MSP-F42P Proteins in IFA und Western Blots untersucht.

Die Analyse mittels IFA bestätigte die Synthese beider modifizierten Proteine MSP-F42E und MSP-F42P, die von dem mAk 5.2 erkannt und unter nicht-permeabilisierenden Bedingungen auf der Oberfläche der Parasiten festgestellt wurden. Es wurde das gleiche Punktmuster wie bei der 42/GPI-Linie beobachtet (Vergleiche Abb.: 5.7).

Die Western Blot Analyse der Linien 42/E und 42/P mit dem mAk 5.2 ist in der Abbildung 5.15 dargestellt. Trotzt dem Austausch des Leu<sub>1630</sub> durch Glu oder Pro konnte das C-terminale 28kD große Fragment weiterhin in beiden Linien identifiziert werden. Verglichen mit dem MSP-F42 und MSP-F19 wurde ein Unterschied in der Größe des C-terminalen Fragments festgestellt. Es zeigt eine erhöhte elektrophoretische Mobilität in einem 10% igen PAA-Gel und wurde als ein Protein von ca. 27kD identifiziert.



#### Abbildung 5.15.: Western Blot Analyse der transgenen Linien 42/E und 42/P

Die Zelllysate der *T. gondii*-Linien 42/GFP (42), 42/E, 19/GFP (19) und 42/P wurden in Anwesenheit von Protease-Inhibitor-Koktail (Boehringer) vorbereitet und in einem 10%-igem PAA-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf die NC-Membran wurden die Proteine mit dem mAk 5.2 gefärbt und durch die anti-Maus IgG POD-Konjugat vermittelte Reaktion sichtbar gemacht. In allen Linien, die MSP-F42 oder seine modifizierte Form synthetisieren, wurde das C-terminale Fragment identifiziert. Es zeigt jedoch in den 42/E und 42/P Linien eine leicht erhöhte elektrophoretische Mobilität (MW<28kD).

#### 5.3 Immunisierungsstudien mit MSP-1 in Tiermodellen

Als einer der besten Tiermodelle zur Untersuchung der humanen anti-Malaria Immunantwort gelten die *Aotus* Affen. Diese Affenart sowie nicht immune Menschen sind hoch empfänglich für eine *P. falciparum* Infektion. Sie entwickeln eine lebensbedrohliche Parasitemie und/oder Anämie, und sind sensitiv gegenüber wiederholten Infektionen. Trotzdem konnte nach einer Immunisierung mit MSP-1 Protein, gereinigt aus *P. falciparum*, ein kompletter Schutz vor der sonst letalen Malaria erzielt werden (Siddiqui *et al.*, 1987). Auf der Basis dieses Experiments wurden in unserem Labor in Zusammenarbeit mit Prof. S. Herrera in Kolumbien Immunisierung sversuche mit *Aotus* Affen durchgeführt, die die protektive Wirkung des aus *P. falciparum* gereinigten MSP-1 bestätigten (Tolle *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Um zu gewährleisten, dass eine anti-MSP-1 induzierte Immunantwort auf ein reines, definiertes Antigen zurückzuführen ist, solle in dieser Arbeit die attenuierte, avirulente *T. gondii*-Mutante ts-4 als ein Träger des rekombinanten MSP-190F in Immunisierungsversuchen etabliert werden.

Die Immunogenität des rekombinanten MSP-190F sowie die Avirulenz der ts-4 Mutante sollen zuerst in der Maus getestet werden. Im anschließenden Experiment sollen *Aotus* Affen mit dem heterolog produzierten MSP-190F immunisiert und mit einem im Bezug auf MSP-190F homologen *P. falciparum* Stamm infiziert werden. Die potentielle schützende Wirkung des in *T. gondii* hergestellten MSP-190F Proteins sowie die Entwicklung der humoralen Immunantwort sollen analysiert werden.

#### 5.3.1 Immunogene Wirkung des in T. gondii hergestellten MSP-190F Proteins in der Maus

Zunächst wurde das Potential des avirulenten ts-4 Stammes von *T. gondii* als ein lebender Träger des MSP-190F Proteins in der Maus getestet. Immunisierung von Mäusen mit dieser temperatursensitiven Mutante schützt vor einer Infektion mit virulenten *T. gondii*, die sonst letal verlaufen würde (Waldeland *et al.*, 1983a).

Um die Verträglichkeit und Avirulenz des ts-4 Mutanten zu überprüfen, wurden in einem Vorversuch drei BALB/c Mäuse mit verschiedenen Mengen an lebenden ts-4 Tachyzoiten intraperitoneal (i.p.) injiziert. Alle drei verwendeten Dosen ( $10^4$ ,  $5x10^4$  und  $10^5$ ) wurden sehr gut von den Mäusen vertragen. Eine erneute Infektion der Mäuse nach weiteren drei Wochen mit  $10^6$  ts-4 Mutanten bedeutete ebenfalls keine gesundheitliche Beeinträchtigung.

Für die Immunisierung mit rekombinanten ts4/Pf190 zur Analyse der humoralen anti-MSP-1 Immunantwort wurden transgene A2K<sup>b</sup> Mäuse verwendet (ursprünglicher C57BL/6 Stamm), die das humane HLA-A2.1 Allel exprimieren (siehe 4.12.1.1). Der Verlauf des Versuches ist in der Tabelle 5 dokumentiert.

Analyse	Wochen p. i.	Maus #					
		1	2	3	4	5	6
Serokonversion							
vs. <i>T.g</i> .	4	-	+	+	+	+	+
(IFA)							
Serokonversion							
vs. <i>P.f.</i> .	6	-	-	-	-	+	+++
(Western B.)							
Serokonversion							
vs. <i>P.f.</i> (IFA)	7	-	-	-	+	++	+++
nach 1. Boost							
Serokonversion							
vs. P.f. (Western B.)	10	-	-	-	++	++	+++
nach 2. Boost							

#### Tabelle 5: Analyse der humoralen Immunantwort von Mäusen immunisiert mit ts-4/Pf190

Die transgene A2K<sup>b</sup> Mäuse wurden mit  $5x10^4$  ts-4 (Maus # 2 und 3) bzw. ts4/Pf190 (Maus #4 – 6) i.p. injiziert. Die Infektion wurde zweimal wiederholt (Boost), in der 7. Woche post Immunisierung (p.i.) mit je  $10^5$  und in der 8. Woche mit je  $10^6$  Parasiten. Die Maus #1 wurde zur Kontrolle jedesmal mit PBS injiziert. Die Serokonversion wurde mittels IFA (mit intrazellulären *T. gondii* Parasiten oder mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten) und Western Blots (mit Lysat aus *P. falciparum* infizierten Erythrozyten) analysiert, wobei die Mausseren anstelle des ersten Antikörpers verwendet wurden. Die Anzahl der "+" gibt die relative Stärke des erhaltenen Signals an.

Vier Wochen nach der ersten Immunisierung wurden die Seren mittels IFA mit intrazellulären ts-4 auf die Anwesenheit von *T. gondii* spezifischen Antikörpern analysiert. Mit Ausnahme der mit PBS injizierten Maus konnte eine Serokonversion bei allen Tieren festgestellt werden. Die Western Blot Analyse mit *P. falciparum* Lysat 6 Wochen nach der Immunisierung hatte gezeigt, dass zwei Mäuse in der immunisierten Gruppe (#5 und 6) MSP-1 spezifische Anti-körper produzierten.

Eine Woche nach dem ersten Boost wurden die Seren mittels IFA mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten analysiert. Während die Seren der Kontrollmäuse keine Kreuzreaktivität mit den nativen MSP-1 zeigten, konnten in allen Seren der immunisierten Tiere MSP-1 spezifische Antikörper identifiziert werden (Abb.: 5.16).

Schließlich wurden zwei Wochen nach dem zweiten Boost alle Seren erneut in einem Western Blot auf ihre Kreuzreaktion mit dem Lysat aus *P. falciparum* infizierten Erythrozyten getestet. Diese Analyse ist in der Abbildung 5.17 dargestellt. Alle Mäuse, die mit ts4/Pf190 immunisiert wurden, zeigten eine eindeutige Serokonversion gegen das native MSP-1 Protein des FCB-1 Isolats von *P. falciparum*. Dieses konnte als eine Bande mit dem MW von 190kD identifiziert werden, da das verwendete *P. falciparum* Lysat aus einer synchronisierten Kultur im Schizonten Stadium vorbereitet wurde (freundlicherweise von K. Lingelbach zur Verfügung gestellt).



## Abbildung 5.16: Analyse der MSP-1 spezifischen Antikörper in Serum der mit ts4/Pf190 immunisierten Mäuse

Die Induktion der MSP-1 spezifischen humoralen Immunantwort wurde mittels IFA mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten analysiert. Als Erstantikörper wurden die Seren aller Mäuse nach dem ersten Boost verwendet, gefolgt vom anti-Maus IgG FITC-Konjugat als Zweitantikörper. Der Kontrollansatz wurde mit dem mAk 5.2 inkubiert. Es wurde keine Kreuzreaktion mit *P. falciparum* Antigenen in den Kontrollmäusen (Maus # 1-3) beobachtet, während alle drei mit ts4/Pf190 immunisierten Mäuse (Maus # 4-6) eine Färbung der Oberfläche aufweisen, sowie sie auch bei dem Kontrollansatz mit mAb 5.2 festgestellt wurde. Die *P. falciparum* im Segmenter Stadium wurden mit DAPI Färbung sichtbar gemacht.

Dieses Experiment wurde nach dem gleichen Immunisierungsprokoll mit der ts4/Tg190Tg Linie zweimal wiederholt. In dem ersten Versuch zeigten nur zwei der drei A2K<sup>b</sup> Mäuse in der mit ts4/Tg190Tg immunisierten Gruppe eine starke Antikörperproduktion gegen das native MSP-1 aus *P. falciparum* Lysat.

Deshalb wurden in dem zweiten Immunisierungsversuch mit der ts4/Tg190Tg Mutante größere Gruppen von A2K<sup>b</sup> Mäusen verwendet (je 6 Mäuse wurden mit ts-4 bzw. mit ts4/Tg190Tg infiziert, drei Mäuse erhielten nur PBS). Alle 6 immunisierten Mäuse zeigten nach drei Immunisierungen eine eindeutige Serokonversion, die mittels Western Blot mit rekombinanten p83 und p42, aufgereinigt aus *E. coli*, analysiert wurde (Daten nicht gezeigt). Obwohl drei dieser Tiere subcutan und drei intraperitoneal injiziert wurden, konnte kein Unterschied in der MSP-1 spezifischen Antikörperproduktion festgestellt werden. Bei den Kontrollmäusen wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet.



#### Abbildung 5.17: Western Blot Analyse der Mausseren 10 Wochen nach der ersten Immunisierung

Zelllysat aus synchronisierter *P. falciparum* Kultur ( im Schizonten Stadium) wurde in einem 8%-igem PAA-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und die Proteine auf eine NC-Membran transferiert. Diese Membran wurde nach der Absättigung in Streifen geschnitten, die einzeln mit den bzw. mit dem mAk 5.2 inkubiert wurden. Als Zweitantikörper wurde das anti-Maus IgG AP-Konjugat verwendet. Während die Seren der Mäuse, die mit PBS (Linie 1) oder mit ts-4 (Linie 2-3) injiziert worden sind, keine Kreuzreaktivität mit dem nativen MSP-1 zeigen, bildeten alle mit ts4/Pf190 immunisierten Mäuse (Linie 4-6) eine humorale Immunantwort gegen das MSP-1 Protein des FCB-1 Isolats von *P. falciparum*. Linie 7: Identifizierung des MSP-1 mit mAk 5.2.

Es ist uns nicht gelungen, Produktion von MSP-1 spezifischen Antikörpern durch Immunisierung mit gereinigtem MSP-190F Protein zu induzieren. Die Methode ist in 4.12.1.2 detailliert beschrieben. Die 5 µg des aus *T. gondii* aufgereinigten Proteins wurden in drei Aliquots verteilt und zur Immunisierung von einer BALB/c Maus verwendet. Im gleichen Experiment wurden zur Kontrolle weitere drei BALB/c Mäuse mit dem bereits getesteten ts4/Pf190 Stamm injiziert. Keine der insgesamt vier immunisierten Tiere zeigte nach drei Immunisierungen eine positive Serokonversion gegen das native MSP-1 (getestet in Western Blot, Daten nicht gezeigt). Bei Mäusen, die mit rekombinanten ts4/Pf190 infiziert wurden, konnte jedoch eine starke Kreuzreaktion mit *T. gondii* Antigenen mittels Western Blot nachgewiesen werden.

### 5.3.2 Analyse der MSP-1-vermittelten Immunantwort im Aotus Primatenmodell

Die Immunisierungsstudien mit *Aotus* Affen wurden in Zusammenarbeit mit dem Biomedical Primate Research Centre (BPRC) in Rijswijk, Holland, unter Führung von Clemens Kocken und Alan Thomas durchgeführt.

### 5.3.2.1 Voruntersuchungen in Aotus Affen

In einem Vorexperiment mit drei *Aotus azarae boliviensis* soll der für die Studie vorgesehene ts4/Tg190Tg Stamm getestet und der MSP-1-spezifischer Antikörpertiter der Seren nach drei Immunisierungen ermittelt werden.

Die Affen wurden wie unter 4.12.2 beschrieben dreimal (Tag 0, 7 und 14) mit lebenden transgenen ts4/Tg190Tg Parasiten immunisiert. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung (Tag 28) wurde den Affen Blut abgenommen. Die daraus gewonnen post-immun Seren ( $s_{28}$ ) wurden auf die Kreuzreaktivität mit rekombinanten MSP-1 Fragmenten mittels ELISA untersucht. Die in ELISA Tests verwendete MSP-1 Fragmente p83, p30, p31, p42 und p19 wurden zu diesen Zwecken als Hexahis-Proteine in *E. coli* hergestellt und über Ni<sup>2+</sup>-Chelatchromatographie gereinigt (siehe 4.7.6) (Pan *et al.*, 1999).

Die Entwicklung der MSP-1 induzierten Immunantwort ist in der Abbildung 5.18 dokumentiert. Alle drei Affen haben an früheren Immunisierungsstudien mit *Plasmodium ssp.* teil genommen und weisen deshalb einen unterschiedlichen anti-MSP-1 Titer zum Beginn der Studie auf (Serum s<sub>0</sub>). Der Affe A543 mit dem niedrigsten s<sub>0</sub>-Antikörpertiter gegen p83 und p42 wurde mit *P. falciparum* infiziert (im Jahre 1994), die Affen A502 und A361 hatten multiple Infektionen mit *P. falciparum* und *P. vivax* durchgemacht (zwischen 1994 und 1997). Bei allen Affen wurde eine Induktion der MSP-1 spezifischen Antikörper in Folge einer wiederholten Immunisierung mit ts4/Tg190Tg Parasiten nachgewiesen. Keines der Tiere zeigte während der ganzen Versuchsdauer gesundheitliche Beeinträchtigungen (wie z. B. Fieber, Appetitlosigkeit oder starken Gewichtsverlust). Zur Ende der Studie (Tag 42) wurden die Affen ausgeblutet und die Organe untersucht. Dabei wurden keine ungewöhnliche Veränderungen festgestellt.



Abbildung 5.18: Analyse der MSP-1 induzierten Immunantwort mittels ELISA mit rekombinanten Fragmenten p83 und p42

Die ELISA Platten wurden mit den aus *E. coli* gereinigten Fragmenten p83 bzw. p42 beschichtet (Endkonzentration 1 µg/ml im Karbonatpuffer). Nach einer anschließenden Blockierung und dem Auswaschen von nicht gebundenen Antigenen wurden die Seren s<sub>0</sub> (entspricht dem pre-immun Seren) und s<sub>28</sub> (post-immun Seren nach drei Immunisierungen) entsprechend verdünnt (1/500 bis 1/64000) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Platten mit dem anti-Mensch IgG AP-Konjugat als Zweitantikörper (1/3500 verdünnt) beschichtet und für 1 h bei RT inkubiert. Die Zugabe von Substrat (1 mg/ml) ermöglichte die Farbreaktion, und die Stärke des Signals wurde bei 405 nm im ELISA-Gerät photometrisch erfasst (OD<sub>405</sub>). Diese OD-Werte entsprechen einem spezifischen anti-p83 und anti-p42 Antikörpertiter der Seren bei gegebener Verdünnung. Alle drei Affen zeigten nach drei Immunisierungen mit transgenen ts4/Tg190Tg Parasiten eine Steigerung des MSP-1 spezifischen Antikörpertiters.

Um die potentielle schützende Wirkung des heterolog produzierten MSP-190F Proteins untersuchen zu können, sollten naive *Aotus lemurinus griseimembra* mit steigenden Mengen an ts4/Tg190Tg-Parasiten dreimal immunisiert werden. Die Entwicklung der humoralen Immunantwort sollte mittels ELISA beobachtet werden, und nur bei ausreichendem anti-MSP-1 Titer sollten die Affen mit *P. falciparum* des homologen FVO Stammes infiziert werden. Die Entscheidung, bei welchem minimalen anti-MSP-1 Antikörpertiter die Infektion erfolgen soll, richtete sich nach dem Antikörpertiter der post-immun Seren aus erfolgreichen Immunisierungsstudien von *Aotus* Affen mit nativem MSP-1 Protein, gereinigt aus *P. falciparum* (Tolle *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Da diese Seren im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert und die ermittelten Werte zur Diskussion des eigenen Immunisierungsversuches herangezogen werden sollten, werden diese Studien hier kurz vorgestellt.

# 5.3.2.2 Immunisierungsstudien von Aotus Affen mit nativen MSP-1: Cali 1993 und Cali 1995

Die Immunisierungsexperimente Cali 1993 und Cali 1995 wurden in Zusammenarbeit mit dem Instituto de Immunologia, Universidad del Valle, Cali, Kolumbien unter Führung von S. Herrera und R. Tolle durchgeführt.

In diesen voneinander unabhängigen Versuchen wurden 10 bzw. 12 *Aotus lemurinus griseimembra* Affen verwendet. Die Immunisierung erfolgte mit dem MSP-1 Protein gereinigt aus *P. falciparum* (FCB-1 Isolat) mittels Immunaffinitätschromatographie mit mAk 5.2 (Tolle, 1994). Für die Cali 1993 Studie wurde aus ca.  $1,3x10^{11}$  Parasiten 1 mg des nativen MSP-1 gewonnen, während für das nachfolgende Experiment Cali 1995 aus  $9x10^{10}$  Parasiten etwa 600 µg des Proteins gereinigt werden konnten.

Als Grundlage für das Immunisierungsprotokoll diente die Arbeit von Siddiqui et al., 1987. Die Experimente Cali 1993 und 1995 unterscheiden sich in der Anzahl der Versuchstiere (je 6 Affen in der Kontroll- und in der MSP-1-Gruppe in Cali 1993, bzw. je 5 Affen in Cali 1995) und in der Menge des MSP-1 Proteins, das für die Immunisierung verwendet wurde. So erhielten die Affen der MSP-1-Gruppe in Cali 1993 dreimal 50 µg des Proteins, in Cali 1995 nur dreimal 40 µg. Für die erste Immunisierung wurde die jeweilige Menge des gereinigten MSP-1 mit 50% igem (v/v) Freund'schen kompletten Adjuvans (FCA) gemischt und subcutan injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt 50% igen FCA gelöst in PBS. Für die zweite Immunisierung wurde eine 25% ige und für die dritte eine 10% ige FCA Mischung verwendet. Zwischen den einzelnen Immunisierungen lagen jeweils vier Wochen. 15 Tage (Cali 1993) bzw. 27 Tage (Cali 1995) nach dem zweiten Boost wurden alle Affen mit 1x10<sup>5</sup> P. falciparum Parasiten (FVO Isolat) infiziert. Vor jeder Immunisierung sowie drei Wochen nach der Infektion wurden Blutproben zur Gewinnung der Seren genommen. Die Entwicklung der Parasitemie mittels mikroskopischer Analyse der Giemsa gefärbten Blutausstriche wurde täglich verfolgt. Alle Affen wurden nach dem Beenden des Versuches bzw. unmittelbar nachdem sie eine 10% ige Parasitemie erreicht hatten, mit Pyrimethamin/Sulfadoxin behandelt.

Das Ergebnis der Immunisierungsstudien Cali 1993 und Cali 1995 ist im Anhang II zusammengefasst. In der immunisierten Gruppe Cali 1993 wurde bei zwei Affen (M191 und V21) ein kompletter Schutz erreicht, denn zu keinem Zeitpunkt konnten in den Blutausstrichen Parasiten identifiziert werden. Bei dem ebenfalls geschützten Affen M189 wurde ein Parasit in einem Blutausstrich am 11. Tag nach der Infektion festgestellt. Zwei Affen (M188 und M187) entwickelten eine hohe Parasitemie und wurden medikamentös behandelt. In der Kontrollgruppe erreichten alle Affen eine hohe Parasitemie mit der Ausnahme des Affen V13, der für kurze Zeit eine niedrige Parasitemie entwickelte, jedoch in der Lage war, die Parasiten zu eliminieren. Zwei Tiere sind während des Versuches an eine bakterielle Infektion der inneren Organe gestorben: M179 in der Kontrollgruppe 12 Tage nach der Infektion mit *P falciparum* und ein weiteres Tier in der MSP-1 Gruppe vor der Infektion (nicht in der Auswertung eingeschlossen).

Die Ergebnisse dieser Studie wurden durch das Experiment Cali 1995 bestätigt. In der immunisierten Gruppe erreicht ein Affe (V37) einen kompletten Schutz, ein anderer entwickelte für 4 Tage eine sehr niedrige Parasitemie (< 0,3%), die er selber unter Kontrolle bringen konnte (A29). Der Affe V16 war in der Lage, die Parasitemie bis zur Behandlung (Tag 22) zu kontrollieren. Die zwei verbleibenden Affen entwickelten eine hohe Parasitemie, jedoch mit einer signifikanten Verspätung im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

Die Analyse der Seren erfolgte mittels ELISA mit rekombinanten MSP-1 Fragmenten, wie unter 4.13.2 und in Abb.: 5.18 beschrieben. Um die ermittelten Werte miteinander vergleichen zu können, wurden für jedes Fragment alle Seren gleichzeitig getestet. Die Daten, die für die Diskussion dieser Arbeit von besonderem Interesse sind, sind im Anhang III-V dargestellt.

Affe	Erreichen der 2%-igen Parasitemie	Antikörpertiter gegen MSP-1 Fragmente bei $OD_{405} = 0.1 (x1000)$				
	(in Tagen)	p83	p30	p38	p42	p19
V21	geschützt	> 1000	200	350	800	230
M191	geschützt	> 1000	200	400	> 1000	480
M189	geschützt	700	120	250	700	200
M188	16,5*	950	16	120	700	200
M187	14	400	250	100	300	120
Ktrl. (n=5)	12,4 +/- 1,5					
V37	geschützt	500	6	6	900	450
V29	geschützt	700	< 0,5	0,5	470	250
V16	kontrollierend	230	1,3	1,5	100	50
V48	18*	150	< 0,5	< 0,5	250	200
V35	15,5*	180	< 0,5	< 0,5	270	90
Ktrl. (n=5)	11,4 +/- 1,4					

*Tabelle 6: Beziehung zwischen der Parasitemieentwicklung und dem Antikörpertiter der pre-challenge Seren* Der Antikörpertiter der Seren am Tag der *P. falciparum* Infektion (pre-challenge Seren) wurde mittels ELISA mit den rekombinanten MSP-1 Fragmenten bestimmt und die Werte für  $OD_{405} = 0,1$  berechnet (aus dem linearen Bereich der Titrationskurve). Die jeweils 5 Affen in der Kontrollgruppe (Ktrl.) erreichten die 2% ige Parasitemie 12,4 (Cali 1993) bzw. 11,4 (Cali 1995) Tage nach der Infektion (angegeben ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung). Die Tiere in der immunisierten Gruppe, die eine signifikante Verspätung des Parasitemieausbruches aufweisen, sind mit einem \* gekennzeichnet (M188 in Cali 1993 und V48 und V35 in Cali 1995).

Der Vergleich zwischen dem ermittelten Antikörpertiter und der Entwicklung der Parasitemie ist in der Tabelle 6 dokumentiert. In beiden Experimenten wurden die höchsten Antikörpertiter gegen das rekombinante p83 und p42 ermittelt. Obwohl im Durchschnitt in dem Cali 1993 Experiment höhere anti-MSP-1 Titer gemessen wurden, wurde in beidem Experimenten ein vergleichbarer Schutz gegen die sonst letale *P. falciparum* Infektion erreicht. Der deutlichste Unterschied wurde bei dem anti-p30 und anti-p38 Titer festgestellt. Während die Affen in Cali 1993 eine starke humorale Immunantwort gegen die Epitope beider Fragmente bildeten, reagierten diese in gleichem ELISA Test analysierte p30 und p38 bedeutend schwächer mit den Immunseren der Cali 1995 Affen. Dies könnte durch unterschiedliche Zusammensetzung der jeweiligen MSP-1 Präparationen erklärt werden, obwohl beide einen effektiven Schutz vermittelten.

### 5.3.2.3 Immunisierung von Aotus Affen mit rekombinanten MSP-190F aus T. gondii

Für diese Studie wurden acht naive *Aotus lemurinus griseimembra* Affen ausgesucht, deren Seren keine Kreuzreaktivität mit nativen MSP-1 Protein (getestet mittels IFA mit *P falcipa-rum* des FCB-1 Stammes, durchgeführt von C. Kocken, BPRC) bzw. mit den rekombinanten Fragmenten p42 und p83 oder *T. gondii*-Lysat gezeigt haben (getestet im Western Blot, Daten nicht gezeigt).

# 5.3.2.3.1 Immunisierung mit rekombinanten T. gondii Parasiten des avirulenten Stammes ts-4

Im ersten Teil des Versuches wurden die Affen dreimal mit lebenden *T. gondii* Tachyzoiten des avirulenten ts-4 Stammes immunisiert (siehe Protokoll 4.12.2). Vier Affen in der immunisierten Gruppe erhielten am Tag 0  $5 \times 10^5$ , am Tag 21 und Tag 35 jeweils  $5 \times 10^6$  rekombinante ts4/Tg190Tg Parasiten. Die drei Kontrollaffen wurden analog mit den ts-4 Parasiten injiziert. Alle Dosen wurden von den Affen gut toleriert. Nach der ersten Immunisierung zeigten alle sieben Affen eine starke Serokonversion gegen die *T. gondii* Antigene (getestet in Western Blot mit Lysat aus wt *T.gondii*, Daten nicht gezeigt).

Eines der Tiere in der Kontrollgruppe (A49) entwickelte am Tag 29, d.h. 11 Tage nach der zweiten Immunisierung eine motorische Schwäche und litt unter Apathie und Appetitlosigkeit. Eine erhöhte Körpertemperatur, die ein typisches Merkmal für eine Toxoplasmose ist, wurde nicht festgestellt. Die neurologische Erkrankung hatte sich bis zum nächsten Tag verschlechtert, so dass der Affe am Tag 30 eingeschläfert wurde. Bei anschließender mikroskopischen Untersuchung der Gehirnschnitte konnten keine Bradyzoitenzysten festgestellt werden, die auf eine Revertante des sonst nicht persistierenden ts-4 Stammes deuten würden. Der Affe A49 ist nicht in der Auswertung aufgeführt.

Die Entwicklung der MSP-1 induzierten humoralen Immunantwort wurde mittels ELISA mit den rekombinanten MSP-1 Fragmenten analysiert und ist am Beispiel der Serokonversion gegen das p83 Fragment in der Abbildung 5.19A dargestellt. Bereits nach der ersten Immunisierung (Tag 21, Serum s<sub>1</sub>) wurde ein MSP-1 spezifischer Antikörpertiter bei allen immunisierten Affen festgestellt, der durch die zweite Immunisierung gesteigert werden konnte (Serum s<sub>2</sub>, Tag 35). Die dritte Immunisierung führte jedoch nicht zur Induktion der MSP-1 spezifischen Antikörperproduktion. Der Antikörpertiter der s<sub>3</sub> Seren (vom Tag 42) wurde deutlich reduziert, obwohl die Serokonversion gegen die *T. gondii* Antigene weiter gesteigert wurde (Abbildung 5.19B). Dies steht auch im Gegensatz zu der Entwicklung der MSP-1 induzierten Immunantwort nach einer Immunisierung mit MSP-1 Protein gereinigt aus *P. falciparum*. In beiden Versuchen Cali 1993 und Cali 1995 wurde nach jeder Immunisierung mit dem nativen MSP-1 ein spezifischer Anstieg des Antikörpertiters beobachtet (zum Vergleich siehe Anhang V).



Abbildung 5.19: Entwicklung der humoralen Immunantwort nach drei Immunisierungen mit ts-4 und ts-4/Tg190Tg Parasiten

In **A** ist die Analyse des MSP-1 spezifischen Antikörpertiters mittels ELISA mit dem rekombinanten p83 Fragment dargestellt. Die Kurven zeigen den p83 spezifischen Antikörpertiter bei einer  $OD_{405} = 0,1$  (angegeben in Tausend). Während beide Kontrollaffen A38 und A50 keine Serokonversion zeigten, wurde bei allen mit ts4/Tg190Tg Parasiten immunisierten Affen eine Induktion der MSP-1 Antikörper festgestellt. **B** zeigt die Entwicklung der humoralen Immunantwort gegen die T. gondii Antigene. Dazu wurden die ELISA Platten mit T. gondii Lysat (1/1000 in Karbonatpuffer verdünnt) beschichtet. Alle Affen in beiden Gruppen entwickelten einen T. gondii spezifischen Antikörpertiter, der nach jeder Immunisierung induziert wurde. Angegeben sind die Antikörpertiter (in Tausend), die bei einer  $OD_{405} = 1$  gemessen wurden. Die Pfeile bedeuten den Zeitpunkt der Immunisierung (am Tag 0, 21 und 35). An diesen Tagen wurden ebenfalls die Seren gewonnen (s<sub>0</sub>=pre-immun Serum, Tag 0; s<sub>1</sub>=Serum nach der ersten Immunisierung, Tag 21; s<sub>2</sub>=Serum nach der zweiten Immunisierung, Tag 35; s<sub>3</sub>=Serum nach der dritten Immunisierung, Tag 42).

Die Reduktion des anti-MSP-1 Antikörpertiters nach der dritten Immunisierung mit ts-4/Tg190Tg Parasiten wurde in ELISA Analysen mit allen getesteten Fragmenten beobachtet (d.h. auch mit p42, p30, p38 und p19, siehe Abb. 5.21,  $s_0$  bis  $s_3$ ).

# 5.3.2.3.2 Induktion der humoralen anti-MSP-1 Antwort nach einer Immunisierung mit heterolog hergestelltem MSP-190F, gereinigt aus T. gondii

Die Versuche Cali 1993 und Cali 1995 hatten gezeigt, dass ein aus *P. falciparum* gereinigtes MSP-1 Protein eine starke humorale Immunantwort induzieren kann (siehe Tabelle 6 und Anhang III-V).

Um eine Steigerung des anti-MSP-1 Antikörpertiters im unseren Experiment zu erreichen, wurden die *Aotus* Affen mit dem aus *T. gondii* gereinigten MSP-190F Protein immunisiert. Die Aufreinigung des Proteins ist im Absatz 5.3.2 dokumentiert. Dazu wurde das gereinigte MSP-190F Protein mit dem SBAS2 Adjuvans gemischt (siehe 4.12.2). 73 Tage nach der Erstimmunisierung wurden den Tieren der immunisierten Gruppe jeweils etwa 8 µg des Proteins intramuskulär injiziert, während die Kontrollaffen die gleiche Menge der Adjuvans/PBS Mischung erhielten.

Sieben Tage nach dieser Immunisierung (Tag 80) wurden die Seren bezüglich der MSP-1 spezifischen Antikörperproduktion analysiert. Bei allen immunisierten Affen war eine starke Erhöhung des Antikörpertiters zu beobachten, die in der Abbildung 5.20 und 5.21 dokumentiert ist.

Die Entwicklung der MSP-1 induzierten humoralen Immunantwort während der gesamten Immunisierungsperiode ist zusammenfassend in der Abbildung 5.21 dargestellt. Sie zeigt die Ergebnisse von ELISA Tests, in denen die Reaktivität aller gewonnen Seren gegen die rekombinanten Fragmente p83 und p42 (Abb.: 5.21A) bzw. p30, p38 und p19 (Abb.: 5.21B) bestimmt und als Antikörpertiter bei einer  $OD_{405}$ = 0,1 dargestellt wurde.

Die erste Immunisierung mit ts4/Tg190Tg führte zu einer signifikanten Antikörperproduktion, die durch die zweite Immunisierung mit rekombinanten ts-4 Parasiten gesteigert wurde. Nach der dritten Immunisierung fiel bei allen Affen der Titer ab. Eine Steigerung des Antikörpertiters konnte jedoch durch die Immunisierung mit MSP-190F, gereinigt aus *T. gondii*, erreicht werden. Der bis dahin geringe Antikörpertiter gegen die Fragmente p30, p38 und p19 wurde ebenfalls um ein Vielfaches erhöht. So wurde bei den meisten Affen ein maximaler Antikörpertiter eine Woche nach der Immunisierung mit dem Protein gemessen (Werte für s<sub>5</sub> am Tag 80), der jedoch in der Regel bis zur der Infektion mit *P. falciparum* wieder abfiel (s<sub>6</sub>, Tag 94). Der Affe A36 ist dabei die Ausnahme und zeigt eine weitere Erhöhung der Antikörperproduktion gegen alle getestete Fragmente.

Die aktuellen Antikörpertiter aller Affenseren am Tag der *P. falciparum* Infektion ( $s_6$ , Tag 94) sind in der Abbildung 5.22 zusammengefasst. Eine eindeutige Serokonversion gegen die getesteten Fragmente p83, p30, p38, p42 und p19 wurde bei allen immunisierten Affen erzielt.



Abbildung 5.20: Induktion des MSP-1 spezifischen Antikörpertiters nach einer Immunisierung mit MSP-190F Protein, gereinigt aus T. gondii

Die Seren vor der Immunisierung der Tiere mit Protein ( $s_4$  vom Tag 73) und eine Woche danach ( $s_5$  vom Tag 80) wurden bezüglich ihrer Reaktivität mit den rekombinanten Fragmenten p83 (**A**) und p42 (**B**) mittels ELISA analysiert. Während die Seren der Kontrollaffen (A 38 und A50) keine Serokonversion zeigten, wurde bei allen immunisierten Affen eine hohe Steigerung des Anikörpertiters festgestellt. Angegeben sind die OD<sub>405</sub>-Werte, die einem MSP-1 spezifischen Antikörpertiter bei gegebener Verdünnung der Seren (1/250 bis 1/32000) entsprechen.



## Abbildung 5.21: Entwicklung der Serokonversion gegen die rekombinante MSP-1 Fragmente während der gesamten Immunisierungsperiode

Die Analyse der Seren mittels ELISA wurde wie in der Abb.: 5.18 beschrieben durchgeführt und die jeweiligen Antikörpertiter berechnet (aus dem linearen Bereich der Titrationskurve). Aufgetragen sind die Werte, die zu einer  $OD_{405}$ = 0,1 korrespondieren (Angabe in Tausend). Ein bedeutend höherer Antikörpertiter wurde für die Fragmente p83 und p42 gemessen, weshalb diese in der Abbildung **A** dargestellt sind (die y-Werte aufgetragen an einer Skala von 1 bis 300000). **B** zeigt die erreichten Antikörpertiter gegen die Fragmente p30, p38 und p19 (y-Werte von 0 bis 15000). Der Zeitpunkt der Immunisierung mit transgenen ts4/Tg190Tg Parasiten ist mit den schwarzen Pfeilen gekennzeichnet, während der weiße Pfeil die Proteinimmunisierung markiert. An diesen Tagen wurden ebenfalls die Seren zur Analyse gewonnen:  $s_0$ = pre-immun Serum, Tag 0;  $s_1$ = Serum nach 1. Immunisierung, Tag 21;  $s_2$ = Serum nach 2. Immunisierung, Tag 35;  $s_3$ = Serum nach 3. Immunisierung, Tag 42;  $s_4$ = Serum am Tag der Proteinimmunisierung, Tag 73;  $s_5$ = Serum nach der Immunisierung mit dem Protein, Tag 80;  $s_6$ = Serum am Tag der Infektion mit *P. falciparum* (gekennzeichnet mit "\*").



Abbildung 5.22: Die Analyse des Antikörpertiters unmittelbar vor der Infektion mit P. falciparum

Die Affenseren am Tag der Infektion mit *P. falciparum* (Seren s<sub>6</sub>, Tag 94) wurden bezüglich ihrer Reaktivität mit den rekombinanten Fragmenten mittels ELISA analysiert (Durchführung siehe Abb.: 5.18). Angegeben sind die gemessenen  $OD_{405}$ -Werte, die einem spezifischen Antikörpertiter bei gegebener Verdünnung der Seren entsprechen. Die Serokonversion gegen die Fragmente p83 und p42 wurde bei einer Verdünnung von 1/250 bis 1/32000 (**A**) bzw. von 1/100 bis 1/12800 gegen die Fragmente p30, p38 und p19 gemessen (**B**). Die Seren der Kontrollaffen A38 und A58 zeigten keine Reaktion mit den getesteten Fragmenten.

# 5.3.2.3.3 Analyse der potentiellen Schutzwirkung des rekombinanten MSP-1 Proteins nach einer Infektion mit P. falciparum des FVO Stammes

Die Versuchstiere wurden am Tag 94 mit  $1 \times 10^5$  *P. falciparum* Parasiten (Ringstadien) des FVO Stammes infiziert. Die Entwicklung der Parasitemie mittels mikroskopischer Analyse der Giemsa gefärbten Blutausstriche wurde ab dem fünften Tag nach der Infektion täglich verfolgt. Diese Daten sind in der Tabelle 7 aufgeführt; der Infektionsverlauf in der Abbildung

Tage	Immunisierte Gruppe				Kontrollgruppe	
p.i.	A46	A58	A42	A36	A38	A50
0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0,1	0,1	0
7	0,33	0,32	0,6	1,35	0,43	0,2
8	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
9	0,9	3,4	2,4	6,7	9,7	5,7
9,5		4	5			5,8
10	0,5	1				
11	1,25	8,7				
12	1					
13	1,6					
14	2,6					

5.23 graphisch dargestellt. Die Tiere wurden unmittelbar mit Mefloquine behandelt (25mg/5ml PBS), wenn sie eine Parasitemie von 5% erreicht hatten.

#### Tabelle 7: Entwicklung der Parasitemie nach der Infektion mit P. falciparum

Ab dem fünften Tag nach der Infektion (p.i.) wurden die Fingerblutproben aller Affen 1-2-mal täglich an die Anwesenheit der *P. falciparum* Parasiten getestet. Dazu wurden die *Plasmodien* mittels Giemsa Färbung sichtbar gemacht und die parasitierten Erythrozyten ausgezählt. Die Parasitemie ist in % angegeben.

Die ersten Parasiten wurden am Tag 6 nach der Infektion in dem Affen A 36 und A38 identifiziert. Beide Kontrollaffen A38 und A50 sowie die Affen A36 und A42 in der immunisierten Gruppe haben am Tag 9 die 5%-ige Parasitemiegrenze überschritten und wurden medikamentös behandelt.

Der Affe A58 konnte den ersten Parasitemieausbruch (4% am Tag 9,5) reduzieren, bis er am Tag 11 behandelt werden musste. Der Affe A46 kontrollierte die Parasitemie während der ganzen Versuchsdauer und wurde erst nach den Beenden des Experimentes behandelt (am Tag 14), noch bevor er die 5%-ige Parasitemiegrenze hätte erreicht haben können.



Abbildung 5.23: Graphische Darstellung der Parasitemieentwicklung nach der Infektion mit P. falciparum Die Parasitemie (angegeben in %) wurde täglich ermittelt und ist in % angegeben. Während in der Kontrollgruppe beide Affen die 2%-ige Parasitemiegrenze am Tag 8 nach der Infektion überschritten hatten, erreichten die Affen A46 und A58 in der immunisierten Gruppe endgültig diese Grenze mit einer signifikanten Verspätung von 6 bzw. 3 Tagen: A46 am Tag 14 und A58 am Tag 11. Nach dem Beenden des Versuches wurde der A46 mit Mefloquine behandelt (B).

Die aus dem Infektionsverlauf und der Analyse des erreichten Antikörpertiters ermittelten Daten sind in der Tabelle 8 zusammengefasst. Obwohl bei keinem der immunisierten Tiere ein kompletter Schutz erzielt werden konnte, wurde bei zwei Affen eine Verspätung des Parasitemieausbruches beobachtet. Der Affe A46 erreichte die 2% ige Parasitemiegrenze am Tag 14, d.h. 6 Tage später als die Kontrollaffen. Dieser Affe weist den höchsten Antikörpertiter gegen die Fragmente p83, p38, p42 und p19 auf. Der Affe A58, der im Vergleich mit den Kontrollaffen drei Tage später endgültig die Parasitemie von 2% überschreitet, erreichte den zweit höchsten Titer gegen p83 und p38, weist jedoch den niedrigsten p42-spezifischen Antikörpertiter auf.

Affe	Erreichen der	Antikörpertiter gegen MSP-1 Fragmente bei				
	2%-ige Parasitemie	$OD_{405} = 0,1 \ (x1000)$				
	(in Tagen)	p83	p30	p38	p42	p19
A46	14*	120	0,4	5,5	112	11
A58	11*	97	2,4	4,5	41	1
A42	8	53	0,7	2,2	61	4
A36	8	25	5,1	0,4	47	1,3
Ktrl. (n=2)	8					

*Tabelle 8: Beziehung zwischen der Parasitemieentwicklung und dem Antikörpertiter der pre-challenge Seren* Der Antikörpertiter der pre-challenge Seren ( $s_6$ ) wurde mittels ELISA mit dem rekombinanten MSP-1 Fragmenten bestimmt (siehe Abb. 5.22). Aus dem linearen Bereich der Titrationskurve wurden anschließend die Titer berechnet, die einem OD<sub>405</sub> = 0,1 entsprechen (angegeben in Tausend). Die Affen in der immunisierten Gruppe, die die Parasitemiegrenze von 2% mit einer signifikanten Verspätung erreichten, sind mit einem "\*" gekennzeichnet (A46 und A58). Die Kontrollaffen (Ktrl.) zeigten keine Kreuzreaktivität mit den getesteten MSP-1 Fragmenten.

Verglichen mit den Experimenten Cali 1993 und Cali 1995 wurde durch die Immunisierung mit dem in *T. gondii* hergestelltem MSP-190F ein insgesamt niedrigerer Antikörpertiter erreicht (siehe Tabelle 6). Lediglich für die Fragmente p30 und p38 sind die ermittelten Werte mit dem Versuch Cali 1995 vergleichbar.

Drei Wochen nach der *P. falciparum* Infektion wurden erneut Blutproben zur Gewinnung der post-challenge Seren (s<sub>7</sub>, Tag 115) entnommen und die Induktion der MSP-1 spezifischer Antikörperproduktion mittels ELISA analysiert. Bei allen Tieren wurde ein Anstieg des Antikörpertiters gegen alle rekombinante Fragmente gemessen, der bei den immunisierten Affen um das Vielfache höher war als bei der naiven Kontrollaffen. In Abbildung 5.24 ist diese durch die *P. falciparum* Infektion bedingte Steigerung der Antikörperproduktion am Beispiel der Fragmente p83 und p42 dargestellt.



Abbildung 5.24: Induktion des MSP-1 spezifischen Antikörpertiters drei Wochen nach der Infektion mit P. falciparum

Die pre-challenge ( $s_6$ , Tag 94) und post-challenge Seren ( $s_7$ , Tag 115) wurden bezüglich ihrer Reaktivität mit den rekombinanten Fragmenten p83 (**A**) und p42 (**B**) mittels ELISA analysiert. Angegeben sind die OD<sub>405</sub>-Werte, die einem MSP-1 spezifischen Antikörpertiter bei gegebener Verdünnung der Seren (1/4000 bis 1/512000) entsprechen. Die Seren der naiven Affen in der Kontrollgruppe (A38 und A50) zeigten eine signifikante Reaktion.

# 5.4 Untersuchung der Bindungsaffinität zwischen transgenen *T. gondü* und Erythrozyten

Obwohl der Invasionsprozess zytologisch gut beschrieben ist (Bannister and Dluzewski, 1990), sind sowohl die molekularen wie auch die biochemischen Ereignisse, die die Invasion begleiten, nicht ausreichend belegt und im Detail verstanden.

Bis zum heutigen Tage wurden zwei parasiteneigene Proteine charakterisiert, die an der Invasion der menschlichen Erythrozyten durch die Merozoiten aktiv beteiligt sind: das 175kD große Erythrozyten bindendes Antigen aus *P. falciparum* (Pf-EBA-175) und das Duffy-Antigen bindende Protein aus *P. vivax* (PvDBP) (Chitnis and Miller, 1994; Sim *et al.*, 1994). Beide Proteine sind in den intrazellulären Mikronemen lokalisiert und können deshalb nur begrenzt, wenn überhaupt an dem primären Kontakt zwischen den Parasiten und den Erythrozyten beteiligt sein. Das Apikale Membran Antigen 1 (AMA-1), dessen biologische Funktion noch nicht geklärt wurde, wird dank seiner subzellulären Lokalisation und Stadiumspezifischer Expression ebenfalls als ein in dem Invasionsprozess involviertes Protein angesehen (Narum and Thomas, 1994). Obwohl ein oberflächenständiges Protein des Merozoiten, das an einen bestimmten Rezeptor auf der Plasmamembran des Erythrozyten binden und somit den ersten Schritt der Invasion vermitteln könnte, noch nicht identifiziert wurde, gibt es Hinweise dafür, dass das MSP-1 eine Rolle in diesem Prozess spielen könnte.

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob eine Wechselwirkung zwischen transgenen *T. gondii* Parasiten, welche – wie wir annehmen – das natürlich gefaltete MSP-1F bzw. Teile desselben, an der Oberfläche tragen, und Erythrozyten festgestellt werden kann. Der obligatorisch intrazellulärer Parasit *T. gondii* infiziert in der Regel nur kernhaltige eukaryotische Zellen (Mineo and Kasper, 1994a). Über das Vorkommen von *T. gondii* in Säugererythrozyten gibt es lediglich eine Einzelbeobachtung (Jadin and Creemers, 1968).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten also experimentelle Bedingungen etabliert werden, die es erlauben würden, sowohl qualitativ als auch quantitativ eine Assoziation zwischen rekombinanten *T. gondii* und menschlichen Erythrozyten zu erkennen.

#### 5.4.1 Mikroskopische Untersuchungen

Für diese Experimente wurden die Parasiten der Tg190Tg-Linie ausgewählt (siehe 5.2.2.1). Das in dieser Linie synthetisierte MSP-190F Protein ist an der Oberfläche der Parasiten lokalisiert. Zusätzlich exprimiert diese Linie zytosolisch das *lacZ* Gen, so dass die Parasiten mittels  $\beta$ -Galaktosidase Färbung sichtbar gemacht werden können. Als MSP-1-negative Kontrolle wurde die ebenfalls das *lacZ* Gen zytosolisch exprimierende *T. gondii*-Linie TCAT/lox/lacZ/lox verwendet (Brecht *et al.*, 1999). Diese Linie weist keine Modifikation der Parasitenoberfläche auf.

Um eine Assoziation zwischen Erythrozyten und Parasiten mikroskopisch zu erkennen, wurden frisch vorbereitete Parasiten mit immobilisierten Erythrozyten der Blutgruppe A<sup>+</sup> zusammengebracht (siehe 4.14.1) und anschließend einer in situ ß-Galaktosidase Färbung unterworfen. Als Kontrolle diente eine transgene ß-Galaktodsidase positive T. gondii-Linie (Abb.: 5.25). Bei den MSP-1 negativen Parasiten wurde keine Interaktion mit den Erythrozyten beobachtet. Es konnten nach dem Waschen einzelne Parasiten identifiziert werden, die jedoch keinen Kontakt zu den Erythrozyten hatten. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation mit den Tg190Tg Parasiten zu einer Assoziation mit den immobilisierten Erythrozyten. Mehrere Arten von Interaktion konnten in wiederholten Experimenten beobachtet werden. Die meisten Parasiten wurden in einer gerichteten Stellung, d.h. mit einem Ende zu der Erythrozytenoberfläche orientiert, gefunden. In Einzelfällen wurden mehrere Erythrozyten mit einen MSP-1 positiven Parasit assoziiert identifiziert (Abb.: 5.25, rechts im Bild). Bei vielen der Erythrozyt/Parasit Paare wurde eine eindeutige ß-Galaktosidase Färbung im Inneren des Erythrozyten festgestellt. Bei der anschließenden Immunfluoreszenzanalyse mit dem anti-ß-Gal Antikörper konnte jedoch nur das zytosolische Protein des Parasiten identifiziert werden (Daten nicht gezeigt), eine Färbung der Erythrozyten wurde nicht beobachtet.



#### Abbildung 5.25: Assoziation der transgenen T. gondii Parasiten mit menschlichen Erythrozyten

Etwa 10<sup>9</sup> frisch vorbereitete Erythrozyten der Blutgruppe A<sup>+</sup> wurden in 0,25% BSA/PBS resuspendiert und auf dem Boden der Kulturschale immobiliziert. Nicht gebundene Erythrozyten wurden nach einstündiger Inkubation bei RT abgewaschen. Die extrazellulären Parasiten der Linien TCAT/lox/lacZ/lox (links) bzw. Tg190Tg (Mitte und rechts) wurden ebenfalls in 0,25% BSA/PBS resuspendiert und zu den gebundenen Erythrozyten gegeben (jeweils 10<sup>8</sup> in 2 ml der Inkubationslösung). Während der nachfolgenden Inkubation für mind. 2 h bei 37°C in Brutschrank wurde das Setzen der Parasiten sowie die Möglichkeit, mit den Erythrozyten zu interagieren, gewährleistet. Überschüssige Parasiten wurden durch erneutes Waschen entfernt. Die zurückgebliebenen Parasiten ließen sich mit X-Gal anfärben. Nach einer Stunde wurden die Ansätze direkt mirkoskopisch bei 40facher Vergrößerung analysiert. Die schwarze Pfeile deuten auf die Tg190Tg Parasiten hin, die mit den ebenfalls blau gefärbten Erythrozyten assoziiert sind. Die roten Pfeile markieren die Tg190Tg Parasiten, die gerichtet mit der Erythrozytenoberfläche interagieren.

### 5.4.2 Quantitative Untersuchungen der Bindungsaffinität mit Hilfe von Durchflusszytometrie

Um eine Aussage über die Effektivität und im gewissen Sinne auch über die Stärke der Bindung zwischen Parasit und Erythrozyt machen zu können, haben wir uns für die Analyse der Bindungsexperimente mittels Durchflusszytometrie entschieden. Bei diesen Experimenten wurden die extrazellulären, GFP-positiven *T. gondii* mit Erythrozyten inkubiert, die zuvor mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff markiert worden sind. Analysiert man nun diese Mischpopulation in einem Durchflusszytometer, kann die Anzahl der doppel-positiven Ereignisse, d.h. solcher Ereignisse, die sowohl im roten als auch im grünen Bereich als positiv identifiziert worden sind, erfasst werden.

In diesen Bindungsexperimenten wurden die GFP-positiven *T. gondii*-Linien angesetzt, die das MSP-190F in seiner Gesamtlänge sowie seine carboxyterminalen Fragmente MSP-F42 und MSP-F19 synthetisieren und auf der Oberfläche tragen: 190/GFP, 42/GFP und 19/GFP. Als negative Kontrolle wurde die ebenfalls GFP-positive *T. gondii*-Linie GFPTgM-Atail verwendet (Hettmann, 2000). Diese Parasiten exprimieren konstitutiv das GFP und weisen keine zusätzliche Modifikation der Oberfläche auf.

Um diese Methode testen und die Effizienz der möglicherweise MSP-1 vermittelten Bindung der Parasiten an die Erythrozyten erfassen zu können, war es zuerst notwendig, eine Reporter-Linie herzustellen.

### 5.4.2.1 Konstruktion des Reporter-Plasmids und Etablierung der transgenen T. gondii-Linie

Als Reporter-Linie zur Untersuchung der Bindungsaffinität an die Erythrozyten sollen transgene *T. gondii* hergestellt werden, die an ihrer Oberfläche die Region II des Duffy binding Protein aus *P. vivax* exponieren. Es wurde gezeigt, dass dieses Fragment an der Oberfläche von COS7 Zellen verankert, die Bindung von Erythrozyten an diese Zellen vermittelt (Chitnis *et al.*, 1994).

Die Konstruktion des Vektors zur Expression der Region II von PvDPB erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Carmen Fernandez, ZMBH. Die Kodierungssequenz der Region II wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion aus dem Plasmid pHVDR22 amplifiziert (zur Verfügung gestellt von Dr. Ch. Chitnis). Dazu wurden spezifische PCR-Oligonukleotide entworfen, PvDBPs und PvDBPas, die zusätzlich die Schnittstelle des Restriktionsenzyms NsiI enthalten. Das amplifizierte Fragment wurde mit NsiI verdaut und in das mit NsiI/PstI geschnittene Plasmid pSP 130-2 (I. Jecmik, 1996) ligiert. Das daraus resultierende Plasmid wurde pSP PvDBPII benannt und durch Sequenzanalyse verifiziert. Es kodiert für das PvDBP Region II Protein (324 AS), das mit der Signalpeptidsequenz und GPI-Ankersignalsequenz des SAG1 Proteins aus *T. gondii* fusioniert wurde (siehe Abb.: 5.4).

In einem zweiten Klonierungsschritt wurde von Carmen Fernandez die Ty-1 Epitopsequenz eingeführt, welche den Nachweis des rekombinanten Protein ermöglicht (Bastin *et al.*, 1996). Diese Sequenz wurde aus dem Vektor pSP/Ty-1Pv19GPI gewonnen (Carmen Fernandez), der sich von dem pSP PvDBPII nur bezüglich des Inserts zwischen den Signalpeptid- und GPI-Ankersignalsequenzen unterscheidet. Der Vektor pSP/Ty-1Pv19GPI wurde mit den Restriktionsemzymen XhoI und PstI verdaut und das Fragment, das für den SAG1 Promotor sowie für das SAG1 Signalpeptid und Ty-1 Epitop kodiert, isoliert. Dieses Fragment wurde in den mit XhoI und NsiI verdaute Vektor pSP PvDBPII ligiert.

Das so entstandene Plasmid pSP/Ty-1PvDBPII wurde durch Sequenzanalyse überprüft und in die *hxgprt* Mutante von *T. gondii* transfiziert. Als Kotransfektionsvektor wurde der p5RepPR3/GFP/HX verwendet, der die MPA/Xanthin-Selektion ermöglicht und gleichzeitig das GFP zytosolisch exprimiert. Die aus dieser Transfektion hervorgegangene Reporter-Linie wurde PvDBPII/GFP benannt. Das rekombinante PvDBPII Protein wurde in einem Western Blot (10% iges PAA-Gel) mit dem anti-Ty-1 mAk BB2 als eine saubere Bande mit dem Mo-lekulargewicht von etwa 50kD identifiziert (errechneter MW = 46,5kD) (Daten nicht gezeigt). Die PvDBPII/GFP Linie wurde mittels IFA und GFP-vermittelter Fluoreszenz weiter analysiert (Abbildung 5.26). Während das PvDBPII Protein an der Plasmamembran des Parasiten akkumuliert, deutet das GFP-vermittelte Signal auf eine zytosolische Anreicherung des GFP Proteins hin. Die gewünschte Lokalisation des PvDBPII Proteins auf der Oberfläche des Parasiten wurde mittels IFA unter nicht-permeabilisierenden Bedingungen bestätigt.



#### Abbildung 5.26: Analyse der GFP-positiven PvDBPII/GFP-Linie mittels IFA

Die intrazellulären, rekombinanten Parasiten wurden fixiert, permeabilisiert und mit dem mAk BB2 (anti-Ty-1) in einer 1:1000 Verdünnung inkubiert. Als Zweitantikörper wurde das anti-Maus Alexa<sub>594</sub>-Konjugat verwendet (1:5000 verdünnt), das eine indirekte Immunfluoreszenzaufnahme im roten Lichtspektrum ermöglicht (mittlere Reihe). Das rekombinante PvDBPII Protein ist gleichmäßig an der Plasmamembran der Parasiten verteilt. Das GFP Protein zeigt in der direkten Fluoreszenz im grünen Lichtspektrum eine zytosolische Lokalisierung (rechts). Links ist die Phasenkontrastaufnahme abgebildet.

#### 5.4.2.2 Durchflusszytometrieanalyse der Bindungsexperimente

Um die Methode der Durchflusszytometrie in unseren Bindungsexperimenten erfolgreich anwenden zu können, sollte ein rot fluoreszierender Farbstoff für die Markierung der Erythrozyten benutzt werden, so dass diese eindeutig von den GFP-positiven *T.gondii* Parasiten zu unterscheiden sind. Diese Substanz sollte passiv und irreversibel in die Lipiddoppelschicht der Erythrozytenmembran eingebaut werden. Wir haben zu diesem Zwecke ein langkettiges Dialkylcarbocyanin gewählt, DiIC<sub>16</sub>. Die Alkylkette des fluoreszierenden Farbstoffes dient als lipophiler Träger, der in die Plasmamembran eingebaut und mittels lateraler Diffusion verbreitet wird. Das Protokoll für die Markierung wurde modifiziert aus Sowers et al., 1985, übernommen. (siehe 4.14.2.1). Unter diesen Bedingungen wurden bis zu 85% der Erythrozyten markiert wie die Abbildung 5.27 dokumentiert.



Abbildung 5.27: Analyse der mit DiIC<sub>16</sub> markierten Erythrozyten mittels Durchflusszytometrie

Die nicht markierten (**A**) sowie markierten Erythrozyten (**B**) wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 2% igem Formaldehyd/PBS fixiert. Die Suspension wurde vor jeder Messung kräftig gemischt (Vortex). Die Messung wurde mit dem FACScan Gerät der Firma Becton Dickinson mit den Einstellungen wie unter 4.14.2.3 angegeben, durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Quadrant-Diagramm Analyse, in der die Fluoreszenz im grünen Bereich auf der x-Achse und die im roten Bereich auf der y-Achse aufgetragen ist. Dementsprechend erscheinen die nicht markierten Zellen in dem unteren rechten Quadrant, wohingegen die mit dem rotfluoreszierenden DiIC<sub>16</sub> markierte Erythrozyten zu 85% in dem oberen linken Quadrant zu finden sind.

In den Bindungsexperimenten wurden jeweils  $10^7$  markierte Erythrozyten (Blutgruppe A<sup>+</sup>, Duffy-Antigen positiv mit dem Phenotyp Fy (a<sup>+</sup> b<sup>+</sup>)) mit einfachen Überschuss von transgenen *T. gondii* Parasiten im DMEM gemischt und für 4 h im Zellkulturschrank bei 37°C inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellpopulationen mit 2% Formaldehyd/PBS fixiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 5.28



dargestellt und die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten wurden in Tabelle 9 zusammengefasst.

## Abbildung 5.28: Durchflusszytometrieanalyse der Bindungsaffinität zwischen rekombinanten T. gondii und menschlichen Erythrozyten

In jedem Ansatz wurden  $10^7$  mit dem DiIC<sub>16</sub> Farbstoff markierte Erythrozyten der Blutgruppe A<sup>+</sup> mit 2x10<sup>7</sup> extrazellulären rekombinanten *T. gondii* Tachyzoiten gemischt und für 4 h in Zellkulturschrank inkubiert. Nach Waschen und Fixieren der Proben wurden die Ansätze mittels Durchflusszytometrie unter Bedingungen analysiert, die in 4.14.2.3 angegeben sind. Die hier präsentierte Auswertung mittels Quadrant-Diagramm Analyse (Angaben in %) ermöglicht die Quantifizierung der einzelnen Subpopulationen in jedem Ansatz. Alle Parasitenlinien wurden zuerst einzeln analysiert (- Erythrozyten), um die Qualität der Population zu erfassen und die Position des Fadenkreuzes festzulegen. Diese wird durch die Stärke des GFP Signals bestimmt und ist in den einzelnen Linien unterschiedlich, abhängig von dem für die Transfektion verwendeten GFP-Expressionsvektor. Im unteren linken Quadrant (UL) befinden sich nicht fluoreszierende Zellen (d.h. tote Parasiten) und vorwiegend Zelltrümmer. Die GFP-positiven Parasiten sind in dem unteren rechten Quadranten (UR) zu finden. Bei der Analyse der mit Erythrozyten gemischten Ansätze (+ Erythrozyten) sind in dem oberen linken Quadranten (OL) die markierten roten Blutkörperchen zu finden. Im oberen rechten Quadranten (OR) sind die Ereignisse erfasst, die Doppelfluoreszenzmerkmale tragen, d.h. sowohl grün als auch rot fluoreszierend erscheinen. Diese Werte wurden für die Quantifizierung des Bindungspotenzials verwendet. FL1-H = Fluoreszenz 1 im grünen Bereich (GFP); FL2-H = Fluoreszenz 2 im roten Bereich (DiIC16); Quad = Position des Quadranten; Events = absolute Anzahl der gemessen Ereignisse; %Gated = Anzahl der Ereignisse angegeben in %.

Diese Daten zeigen zunächst, dass bei der als negative Kontrolle verwendeten Linie GFPTgM-Atail erwartungsgemäß die niedrigste Anzahl der Doppelfluoreszenz-Ereignisse gemessen wurde. Wird dieser Wert gleich 1 gesetzt, kann ein direkter Vergleich der Bindungsaffinität der analysierten *T. gondii* Linien untereinander gezogen werden. Demnach binden die als positive Kontrolle verwendete Parasiten PvDBPII/GFP mit einer um den Faktor 2-3 höheren Affinität an die menschlichen Erythrozyten. Die gleiche Bindungsaffinität wurde auch bei den Linien 190/GFP und 42/GFP beobachtet. Die transgene 19/GFP Linie zeigte in allen Bindungsexperimenten die höchste Affinität, um den Faktor 2,7–3,4 höher als die negative Kontrolle.

Experiment	T. gondii-Linie	OR	OR + Ery	Diff.	Faktor
1	GFPTgM-Atail	2,48	8,40	5,92	1 <sup>(1)</sup>
	PvDBPII/GFP	0,57	12,08	11,51	2
	19/GFP	1,17	17,39	16,22	2,7
	42/GFP	0,33	11,98	11,65	2
	190/GFP	0,62	15,35	14,73	2,5
2	GFPTgM-Atail	3,15	5,04	1,89	$1^{(1)}$
	PvDBPII/GFP	2,01	7,64	5,63	3
	19/GFP	3,43	9,94	6,51	3,4
	42/GFP	2,03	7,45	5,42	3
	190/GFP	2,26	7,91	5,65	3

## Tabelle 9: Vergleich der Bindungsaffinität der verschiedenen transgenen T. gondii-Linien zu menschlichen Erythrozyten

In der Tabelle sind zwei unabhängige Experimente zusammengefasst, in denen die Bindung der rekombinanten *T. gondii* Parasiten an die Erythrozyten mittels Durchflusszytometrie quantifiziert wurde. Angegeben ist die prozentuelle Anzahl der gemessenen Doppelfluoreszenz-Ereignisse aus dem oberen rechten Quadranten (Angaben in %). Der Wert, der für den Vergleich der Bindungsaffinität der verschiedenen *T. gondii*-Linien verwendet wurde (Diff.), ist die Differenz zwischen dem Wert des mit Erythrozyten inkubierten Ansatzes (OR + Ery) und dem Wert, der für die jeweilige Parasitenlinie alleine gemessen wurde (OR).

<sup>(1)</sup> Zum direkten Vergleich wurde in jedem Experiment der Wert, der für die Bindung der als negative Kontrolle verwendete Linie GFPTgM-Atail gemessen wurde, gleich 1 gesetzt.

In einem abschließenden Experiment sollten die bei der Analyse der Bindungsaffinität erkennbaren Populationen weiter untersucht werden. Dazu wurden mit Hilfe von Fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (siehe 4.14.2.4) die Populationen aus den 4 verschiedenen Quadranten getrennt isoliert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Diese Analyse bestätigte unsere Annahme, dass es sich bei der Populationen mit der Doppelimmunfluoreszenz, d.h. isoliert aus dem oberen rechten Quadranten, vorwiegend um Parasit/Erythrozyt-Paare handelt, vergleichbar mit denen in der Abbildung 5.25. Mit einer geringeren Häufigkeit wurden auch nicht gebundene Parasiten oder markierte Erythrozyten gesichtet, die möglicherweise während des Isolierungsvorganges aus der ursprünglichen Bindung losgelöst worden sind.

Bei einigen der Paare wurde eine Verbreitung des  $\text{DiIC}_{16}$  Farbstoffes von dem markierten Erythrozyten auf die mit den Erythrozyten assoziierte *T. gondii* beobachtet, wie an einem Beispiel in der Abbildung 5.29 präsentiert wird. Dabei handelt es sich um die Analyse der Doppelfluoreszenz-Population, die nach der Inkubation von 19/GFP Parasiten mit den Erythrozyten erstellt wurde. Diese Aufnahme zeigt einen mit dem Erythrozyten assoziierten Parasiten, der zusätzlich zu der GFP-vermittelten Fluoreszenz auch eine eindeutige rote Fluoreszenzmarkierung aufweist, verursacht durch den Einbau des DiIC<sub>16</sub> Farbstoffes. Dabei handelt es sich nicht um eine einfache Diffusion des Farbstoffes, denn andere, nicht gebundene Parasiten in der gleichen Population wiesen keine rote Fluoreszenz auf (rechts im Bild).

Die Bindung zwischen Erythrozyt und *T. gondii* wurde bei allen analysierten Ansätzen beobachtet, d.h. auch bei den als negative Kontrolle verwendeten GFPTgM-Atail Parasiten. Bei dieser Linie wurde nur in zwei Fällen eine Verbreitung des  $DiIC_{16}$  auf die Parasiten gesichtet. Der Unterschied bestand also in der Quantität der gezählten Ereignisse (siehe Tabelle 9).



## Abbildung 5.29: Mikroskopische Analyse der Doppelfluoreszenz-Population, isoliert aus dem Bindungsexperiment mit 19/GFP Parasiten

In diesem Bindungsexperiment wurden die Parasiten der 19/GFP Linie mit den markierten Erythrozyten inkubiert. Die Population mit den Doppelfluoreszenzmerkmalen (obere rechte Quadrant) wurde anschließend mit Hilfe von fluoreszenzaktivierter Sortierung isoliert und mit Hilfe vom Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Abbildung zeigt die Phasenkontrastaufnahme (links) von GFP-positiven Parasiten der 19/GFP Linie. Während der mit dem Erythrozyten assoziierte Parasit eine eindeutige rot fluoreszierende Markierung aufweist (Fluoreszenzaufnahme im roten Bereich, 2.v.l.), wurde bei dem frei liegenden Parasiten keine DiIC<sub>16</sub> vermittelte Färbung beobachtet. Die Überlagerung der Aufnahmen im roten und im grünen (2.v.r.) Bereich ist rechts im Bild dargestellt. Erwartungsgemäß wurden in dem oberen linken Quadranten fast ausschließlich die markierten Erythrozyten, in den unteren rechten Quadranten die GFP-positiven *T. gondii* Tachyzoiten identifiziert. Aus der Population des unteren linken Quadranten wurden vorwiegend Zelltrümmer, nicht markierte Erythrozyten sowie tote Parasiten isoliert (Daten nicht gezeigt).

### 6. DISKUSSION

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt zu einem in dem Ansatz, die potentielle Schutzwirkung des heterolog hergestellten MSP-1 Proteins zu untersuchen und zum anderen in der Frage nach der Funktion von MSP-1 in vivo. Der erste Teil dieser Arbeit konzentrierte sich auf den Entwurf und die Synthese der msp-1d Kodierungssequenz, welche die Expression des msp-1 (vom Prototyp MAD-20) in seiner Gesamtlänge erlauben würde. Der zweite Teil befasste sich mit der Aufreinigung des heterolog hergestellten MSP-190F Proteins und seiner Charakterisierung bezüglich der posttranslationellen Modifizierung, intrazellulären Lokalisierung und Konservierung der immunogenen Epitope. Die Expression des synthetischen msp-lf Gens sowie seiner Fragmente erfolgte in dem den Plasmodium ssp. nah verwandten Organismus Toxoplasma gondii, das in seiner attenuierten Form als ein lebender Impfstoffträger in Immunisierungsstudien eingesetzt wurde. Diese Immunisierungsversuche im Maus- und Aotus Primatenmodell sowie die anschließende Analyse der induzierten, humoralen Immunantwort sind der wesentliche Bestandteil des dritten Teils dieser Arbeit. Im letzten Teil befasste ich mich mit der Frage nach der vermuteten, bislang jedoch nicht bewiesenen Rolle des MSP-1 Proteins in dem initialen Schritt des Invasionsprozesses. Ich konnte zeigen, dass transgene T. gondii Linien, die das MSP-1 oder seine Fragmente auf der Oberfläche verankert präsentieren, eine erhöhte Bindungsaffinität zur menschlichen Erythrozyten aufweisen.

#### 6.1 Entwurf und Konstruktion des synthetischen msp-1d Gens

Die Sequenzanalyse der *msp-1* Gene verschiedener *P. falciparum* Isolate offenbarte den Dimorphismus der meisten Regionen (Tanabe *et al.*, 1987). Demnach kann jedes MSP-1 Protein zu dem Prototyp K1 oder MAD20 zugeordnet werden. W. Pan in unserem Labor ist es gelungen, durch die Reduktion des hohen A+T Gehaltes der Kodierungssequenz von MSP-1 des FCB-1 Stammes (bezeichnet als MSP-1F, ein Vertreter des K1 Prototypes) die Expression des *msp-1f* Gens sowie die Synthese des MSP-1F Proteins zu etablieren (Pan *et al.*, 1999).

Die hier beschriebene chemische Synthese vom MSP-1 des 3D7 Stammes, bezeichnet als MSP-1D, basiert auf der gleichen Methode. Das MSP-1D gehört zu dem MAD-20 Prototyp und unterscheidet sich in seiner Aminosäuresequenz am meisten von dem bereits synthetisierten MSP-1F Protein. Die gleichzeitige Verfügbarkeit der Vertreter beider Prototypen wird es in der Zukunft erlauben, sowohl homologe wie auch heterologe Immunisierungs- und Infektionsversuche durchzuführen.

Die 1720 AS lange authentische Sequenz des MSP-1D vom *P. falciparum* des 3D7 Stammes wurde unter Verwendung der humanen Kodonhäufigkeiten und mit Hilfe des Zufall-Prinzip-

Generators zurück in die DNA Sequenz übersetzt. Dadurch wurde gleichzeitig die Reduktion des A+T Gehaltes von ursprüngliche 73% auf 54,6% erreicht.

Um eine möglichst fehlerfreie und effiziente Transkription und Translation zu ermöglichen, wurde im nächsten Schritt die entworfene Sequenz modifiziert. Durch einen Nukleotidaustausch, bei dem die Aminosäuresequenz unverändert bleibt, haben wir die Sequenzen eliminiert, die einen vorzeitigen Transkription- oder Translationsstopp verursachen können, als Spleiß-Donor oder –Akzeptor-Signale, interne prokaryontische Promotoren und Polyadenylierungssignale erkannt werden sowie die GC-reichen Regionen, Shine-Dalgano und Methylierungssequenzen. Die in der natürlichen MSP-1D Sequenz vorhandenen Glykosylierungssignale wurden nicht entfernt, um keinen der putativen Epitope des Proteins zu zerstören.

Weitere Modifikationen wurden vorgenommen, um eine möglichst einfache und schnelle Klonierungsstrategie zu entwickeln, die gleichzeitig die Produktion der einzelnen Prozessierungsfragmente sowie deren Kombinationen ermöglicht. Durch den Austausch mit alternativen Kodons wurden die meisten Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen zerstört, die nur einmal in dem gesamten Gen schneiden. Mehrmals vorkommende Schnittstellen, die zur Subklonierung der einzelnen Fragmente verwendet werden sollten, wurden entsprechend reduziert.

Ausgehend von der Nomenklatur von Stafford et al., 1994, wurde die Gesamtsequenz des *msp-1d* in fünf Fragmente unterteilt, die den natürlichen proteolytischen Prozessierungsprodukten des Proteins, nämlich p83, p30, p38, p29, und p19 entsprechen. Durch die Einführung von Schnittstellen für einmal schneidende Restriktionsendonukleasen an den Prozessierungsstellen, an denen die Spaltung des MSP-1D Vorläufers stattfindet, ist es uns gelungen, synthetische msp-1d Fragmente zu entwerfen, die auf Proteinebene identisch mit den natürlichen Spaltprodukten sind oder sich um eine, bzw. um zwei Aminosäuren von diesen unterscheiden. Die fünf für die Zusammensetzung des msp-1d Gens verwendeten Fragmente wurde einzeln synthetisiert. Längere Fragmente wie p83 und p38 mussten dafür aus drei bzw. zwei getrennt synthetisierten Subfragmenten zusammengesetzt werden. Die Synthese beruht auf einer asymmetrischen Polymerase-Kettenreaktion, die mit einzelsträngigen, sich überlappenden Oligonukleotiden durchgeführt wird (Pan et al., 1999). Mit Ausnahme vom p29, das ausgehend von 12 Oligonukleotiden und p19, das ausgehend von 4 Oligonukleotiden amplifiziert wurde, wurden für alle anderen Fragmente jeweils 8 Oligonukleotide in einem PCR-Ansatz verwendet. Dessen Qualität, die im Wesentlichen durch die Länge des zu synthetisierenden Fragments bestimmt wird, ist der limitierende Schritt der Methode. So konnten in dieser Arbeit die kürzeren Fragmente auf Anhieb fehlerfrei synthetisiert werden, da die meisten der verwendeten Oligonukleotide kleiner als 110 Basen waren, nämlich msp1-d83II (618Bp), msp1-d30 (568Bp), msp1-d38I (547Bp) und msp-1d19 (341Bp). Die restlichen Fragmente wurden aus mehreren fehlerfreien Blöcken zusammengesetzt.

Das von uns entworfene synthetische *msp-1d* Polynukleotid kodiert das 1720 Aminosäuren lange MSP-1D Protein des 3D7 Isolats von *P. falciparum*, inklusive Signalpeptid und GPI-

Verankerungssignal. In Folge der Erweiterung außerhalb des offenen Leserahmens besteht die im Anhang I aufgeführte, synthetisierte Sequenz aus 5186Bp.

#### 6.1.1 Perspektiven, welche die Expression des synthetischen msp-1d Gens eröffnet

Das von uns synthetisierte *msp-1d* Gen sowie seine Fragmente wurden erfolgreich sowohl in prokaryontischen als auch in eukaryontischen Expressionssystemen exprimiert.

Die prokaryontische Expression wird in unserem Labor von Rolf Lutz, Christian Epp und Irina Idler mit dem Ziel optimiert, unbegrenzte Mengen des rekombinanten MSP-1D sowie seiner Fragmente herzustellen und Methoden für die Proteinaufreinigung, Faltung und Charakterisierung ausarbeiten, die für ein GMP-Verfahren vorausgesetzt werden. Das prokaryontische Expressionssystem basiert auf dem IPTG-induzierbaren System von Lutz et al., 1998, das zu diesem Zweck weiter modifiziert wurde. Das rekombinante Material wird zu einem für Strukturstudien verwendet; die Kristallisierung des MSP-1D Proteins in seiner Gesamtlänge sowie der einzelnen Fragmente ist in Zusammenarbeit mit Prof. K Holmes und Dr. W. Kabsch (Heidelberg) vorgesehen. Bis zum heutigen Tage konnte nur das carboxyterminale p19 aus dem *P. cynomolgi*, das in baculoviralen System exprimiert wurde, erfolgreich kristallisiert werden (Chitarra *et al.*, 1999). Die gleichen Fragmente können zum anderen in einer funktionellen Studie angesetzt werden, in der die Reassoziation des MSP-1 Komplexes, sowie die möglichen Wechselwirkungen mit der Erythrozytenoberfläche untersucht werden.

Schließlich sind mit dem nach dem GMP-Verfahren hergestellten rekombinanten Material Immunisierungsstudien im Menschen geplant. Der 3D7 Stamm weist keinerlei Resistenzen gegen am Menschen einsetzbare Antimalaria-Mittel auf und wurde bereits für Infektions- und Immunisierungsversuche an Freiwilligen verwendet. Der kompetente Partner für einen Malaria-Impfversuch am Menschen ist die Malariaabteilung des Walter Reed Army Institut of Research (WRAIR), Bethesda, USA. Die gleichzeitige Verfügbarkeit des identisch hergestellten MSP-1F Protein von Typ K1 erlaubt darüber hinaus auch heterologe (d.h. MSP-1F Immunisierung und 3D7 Infektion) Impf-/Infektionsversuche.

Mit dem gleichen Ziel, Immunisierungsstudien im Menschen durchzuführen, sollen in unserem Labor von Nicole Westerfeld in Zusammenarbeit mit Dr. Gerd Sutter, München rekombinante Vaccinia Viren des Stammes MVA und in Zusammenarbeit mit Prof. Martin Billeter, Zürich rekombinante Masern Viren etabliert werden, die das MSP-1D sowie seine Fragmente stabil exprimieren.

# 6.2 *Toxoplasma gondii* als ein Modellorganismus zur Expression von rekombinanten MSP-190F und seinen Fragmenten

Das MSP-190F Protein vom K1 Prototyp (aus *P. falciparum* Stamm FCB-1), das von dem synthetischen *msp-lf* Gen kodiert wird, konnte erfolgreich in prokaryontischen wie auch eukaryontischen Expressionssystemen hergestellt werden (Pan *et al.*, 1999; Burghaus *et al.*, 1999). Ein prokaryontisches Expressionssystem ermöglicht zwar eine fast unbegrenzte Produktion des Proteins, es ist jedoch nicht sicher, ob eine, der natürlichen entsprechende Faltung des Proteins erreicht werden kann. Anderseits wird das Protein in *E. coli*, ebenso wie *in P. falciparum* nicht glykosyliert. In Säuger-, Insekten- und Hefezellen dagegen werden potentielle Glykosylierungsstellen modifiziert, wodurch die immunogenen Eigenschaften des Proteins verändert werden könnten.

In dieser Arbeit habe ich mich deshalb darauf konzentriert, das früher etablierte *Toxoplasma gondii* Expressionssystem (Jecmik, 1996) weiter auszubauen. Vor allem Hinblick auf die geplante Immunisierungsstudien waren folgende Gründe bei dieser Entscheidung ausschlaggebend.

Beide zu dem Stamm der Apikomplexa gehörende Organismen *P. falciparum* und *T. gondii* sind sehr nah miteinander verwandt und viele der metabolischen und funktionellen Prozesse verlaufen in beiden Pathogenen analog. Dazu gehören z. B. die Bindung und anschließende Invasion menschlicher Zellen (Kappe *et al.*, 1999), die Art der Bewegung, die als gleitende Bewegung ("gliding motility") beschrieben wird (Sibley *et al.*, 1998) und die Art posttranslationeller Modifizierungen. So ist die bevorzugte Proteinverankerung in der Plasmamembran die Verankerung über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker), der nach der Abspaltung der hydrophoben carboxyterminalen GPI-Verankerugssequenz mit dem Protein kovalent verbunden wird (für Übersicht siehe: Udenfriend and Kodukula, 1995). Die für die immunogenen Eigenschaften eines Antigens wichtige Glykosylierung ist in beiden Organismen relativ selten (Dieckmann-Schuppert *et al.*, 1994; Gowda and Davidson, 1999).

*T. gondii* wird zudem zunehmend als ein Modellorganismus für genetische Analysen verwendet (Boothroyd *et al.*, 1995). Neben seiner einfachen Kultivierbarkeit (Roos *et al.*, 1994) werden auch die vielfältigen Methoden zur genetischen Manipulation geschätzt. Dazu gehören die Möglichkeiten der reversen Genetik (Donald and Roos, 1993, Soldati and Boothroyd, 1993) und die Verfügbarkeit von Markern zur positiven und negativen Selektion auf stabile Transformanten, wie z. B. das Dihydrofolatreduktase-Thymidilatsynthase Gen (*dhfr-ts* Gen) (Donald and Roos, 1993), das Uracil-Phosphoribosyltransferase Gen (*uprt* Gen) (Donald and Roos, 1995), das Hypoxanthin-Xantin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase Gen (*kim et al.*, 1993). Schließlich war es die Verfügbarkeit der attenuierten, temperatursensiviten *T. gondii* Mutante ts-4 (Pfefferkorn and Pfefferkorn, 1976), die eine experimentelle Infektion in einem Tiermodell erlaubt, welche unsere Entscheidung beeinflusst hatte.

### 6.2.1 Die plasmodialen Transportsignale sind funktionsfähig in T. gondii

Das MSP-1 wird im P. falciparum als ein Vorläuferprotein mit dem MW von 190kD synthetisiert und schließlich über einen GPI-Anker in der Plasmamembran des Parasiten verankert (Cooper, 1993). Die Kodierungssequenz des Proteins enthält die typischen Signale, die für den Transport eines sekretorischen Proteins an die Oberfläche und die anschließende Verankerung über ein GPI-Anker notwendig sind (für Übersicht siehe: Udenfriend und Kodukula, 1995). Es ist zum einen die N-terminale, im Falle des MSP-1 Proteins 19 Aminosäuren lange hydrophobe Signalpeptidsequenz, die im Allgemeinen den sekretorischen Transportweg eines Proteins bestimmt und die Translokation der naszierenden Proteinkette in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) vermittelt. Dort findet die Abspaltung des Signalpeptides durch eine Signalpeptidase statt, die in Plasmodium ssp. noch nicht identifiziert wurde. Ein zweites Signal, das nun für die Modifikation des Proteins durch einen GPI-Anker notwendig ist, ist die carboxyterminale ebenfalls hydrophobe GPI-Verankerungssequenz, die im Falle des MSP-1 von 18 Aminosäuren gebildet wird. Diese wird in dem Lumen des ERs abgespalten, und das Protein mit dem vorsynthetisierten GPI-Anker kovalent verbunden. Diese Reaktionen werden sehr wahrscheinlich von einer Transamidase katalysiert. Das mit dem GPI-Anker modifizierte Protein wird schließlich durch den Golgi Apparat zu der Oberfläche transportiert und dort verankert. Dies gilt im Allgemeinen für den sekretorischen Transportweg in Eukaryoten und wurde auch für die GPI-verankerte Proteine des T. gondii beschrieben (für Übersicht siehe: Ngo et al., 2000). Die Existenz eines typischen Golgi Aparates in P. falciparum ist umstritten und auch der klassische sekretorische Weg ist noch nicht vollständig verstanden (Lingelbach und Joiner, 1998). Die Struktur des GPI-Ankers vom MSP-1 wurde zwar im Detail aufgeklärt (Gerold et al., 1996), die an dem Transport beteiligten Enzyme wurden jedoch noch nicht identifiziert.

Nur wenig Aufmerksamkeit wurde bis jetzt der Frage gewidmet, ob plasmodiale Transporsignale in heterologen Organismen erkannt werden und den korrekten Transport zu der Oberfläche bewirken können. Petra Burghaus in unserem Labor ist es nicht gelungen, das rekombinante MSP-190F, das von der authentischen Signalpeptid- und GPI-Verankerungssequenz flankiert wurde, auf der Oberfläche von transfizierten HeLa Zellen nachzuweisen (P. Burghaus, persönliche Mitteilung). Dagegen führte der Austausch dieser Sequenzen gegen die entsprechenden Transportsignale des humanen Decay Accelerating Factor (DAF) zur Lokalisation des Proteins und seiner Fragmente auf der Plasmamembran von HeLa Zellen (Burghaus *et al.*, 1999). Dies bestätigte die Beobachtung von Moran und Caras (Moran and Caras, 1994), dass die Bedingungen für die Modifikation des Proteins durch einen GPI-Anker zwar ähnlich, jedoch zwischen Säugertierzellen und parasitären Protozoen nicht vollkommen identisch sind. Wir haben in dieser Arbeit zeigen können, dass die plasmodialen Transportsignale in dem nah verwandten T. gondii als solche prinzipiell erkannt werden und den Transport des rekombinanten MSP-190F zu der Plasmamembran der transgenen Tachyzoiten vermitteln können. Die Voraussetzung für den korrekten Transport ist die vollständige Kodierungssequenz beider Transportsignale. Wird eine verkürzte Form der GPI-Verankerungssequenz synthetisiert, kann das rekombinante MSP-190F nicht an der Oberfläche der Pf190 Linie nachgewiesen werden. Dieses Protein akkumuliert vorwiegend in den intrazellulären Organellen von T. gondii. Ein Beweis dafür, um welche Organellen sich hierbei handelte, war zum gegeben Zeitpunkt nicht möglich, da keine organellspezifischen Marker zur Verfügung standen. Moran and Caras konnten jedoch am Beispiel eines Fusionsproteins zwischen humanem Wachstumshormon und DAF-GPI-Signalsequenz zeigen, dass Mutationen in der GPI-Verankerungssequenz, die die korrekte Prozessierung des Proteins verhindern, zu einer Akkumulation des Polypeptides innerhalb der Zelle führen, und beschrieben die Kolokalisation des zurückgehalten Fusionsproteins mit den Markern für den intermediären Golgi Apparat (Moran and Caras, 1992). Genauso führt eine Überexpression eines voll funktionsfähigen Konstrukts in COS Zellen zu einer signifikanten Akkumulation von nicht prozessierten Protein innerhalb der Zelle (Moran and Caras, 1991). Ist dagegen die GPI-Verankerungssequenz eines Proteins vollständig deletiert, wird eine lösliche Form des Proteins produziert, die mit einer reduzierten Transportkinetik aus der Zelle ausgeschleusßt wird (Bangs et al., 1997).

Diese Daten lassen unter anderem darauf schließen, dass der GPI-Anker eine wichtige Rolle bei dem intrazellulären Transport spielt. Wir gehen davon aus, dass die in der Pf190 Linie synthetisierte, verkürzte, plasmodiale GPI-Verankerungssequenz nicht korrekt prozessiert wird. In Folge dessen wird das rekombinante MSP-190F nicht weiter zur Oberfläche transportiert und akkumuliert möglicherweise in dem post-ER Kompartiment des *T. gondii*. Für die falsche Lokalisierung spricht auch die Bildung von Proteinaggregaten, die in dem Western Blot mit der Pf190 Linie beobachtet wurde.

Sind dagegen beide Transportsignalsequenzen vollständig vorhanden, die entweder der MSP-1 oder der toxoidalen SAG-1 Kodierungssequenz entstammen, wird das MSP-190F Protein in beiden transgenen *T. gondii* Linien korrekt zu der Oberfläche transportiert. Diese Linien (Pf190Pf und Tg190Tg) unterscheiden sich lediglich in der Stärke des Immunfluoreszenzsignals, das in einer IFA beobachtet wird. Die Verteilung des rekombinanten Proteins in der Pf190Pf Linie erscheint gleichmäßig; bei der Tg190Tg Linie wurde zudem eine signifikante Anreicherung des Proteins an der Plasmamembran festgestellt. Nun ist zum einen die Expression sehr stark sowohl von der integrierten Kopienzahl als auch von dem Integrationsort abhängig. Zum anderen sind in beiden Expressionsvektoren unterschiedliche Promotoren verwendet worden, die in ihrer Stärke nicht vollkommen identisch sind: der Tubulin-Promotor ist etwas stärker als der SAG-1-Promotor (Seeber *et al.*, 1998; Soldati and Boothroyd, 1993). Da jedoch das gleiche Immunfluoreszenzmuster bei mehreren, unabhängigen Transfektantlinien beobachtet wurde erscheinen uns diese Einflüsse nicht als ausschlaggebend. Es ist eher vorstellbar, dass die plasmodialen Transportsignale in einem direkten Vergleich mit den endogenen Transportsignalen mit einer niedrigeren Effizienz erkannt und/oder prozessiert werden. In Folge dessen liegt möglicherweise ein Teil des rekombinanten Proteins in seiner unprozessierten Form vor und akkumuliert übereinstimmend mit der Beobachtung von Moran und Caras (Moran and Caras, 1992) innerhalb der Zelle. Die plasmodialen Transportsignalsequenzen sind jedoch ausreichend dafür, eine signifikante Menge des rekombinanten MSP-190F Proteins an die Oberfläche der Pf190Pf Parasiten zu transportieren, wie die IFA mit nicht permeabilisierten Tachyzoiten beweist.

Für die Konstruktion von allen anderen Expressionsvektoren wurden daher die Proteine mit den Transportsignalsequenzen des SAG-1 Proteins aus *T. gondii* fusioniert, um einem effizienteren Transport an die Oberfläche zu gewährleisten.

# 6.2.3 Das rekombinante MSP-190F kann in seiner Gesamtlänge aus T. gondii gereinigt werden

In unserem Labor konnte wiederholt das native MSP-1F Protein aus *P. falciparum*-Kultur gereinigt werden (Tolle, 1994). Diese MSP-1F Präparationen zeigten reproduzierbar eine effiziente, protektive Wirkung in Immunizierungsversuchen mit *Aotus* Affen (Tolle *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Unter Anwendung des gleichen Aufreinigungsprotokolls ist es mir in dieser Arbeit gelungen, das heterolog produzierte MSP-190F in seiner Gesamtlänge und in reiner Form aus *T. gondii* zu reinigen. Natürlich kann eine Verunreinigung solcher Präparation durch *T. gondii* eigene Antigene, die entweder an die Immunaffinitätssäule unspezifisch binden oder in einem Komplex mit dem MSP-190F eluieren nicht absolut ausgeschlossen werden. Sollte sich jedoch solches rekombinantes Material protektiv in einer Immunisierungsstudie erweisen, kann eine Kontamination durch ein nicht definiertes, *P. falciparum* eigenes Protein ausgeschlossen werden.

Die immunogenen Eigenschaften eines Proteins werden unter anderem durch seine Glykosylierung beeinflusst. Das native MSP-1F enthält 14 potentiellen N-Glykosylierung-Erkennungsstellen, die auch bei der synthetischen Sequenz beibehalten wurden. Diese Sequenzen werden jedoch bei dem endogenen MSP-1F nicht durch Zucker modifiziert, die einzige Glykosylierung des nativen MSP-1 beschränkt sich auf die Modifikation durch den GPI-Anker (Gerold, persönliche Mitteilung). Im Allgemeinen ist die N-Glykosylierung in *P. falciparum* sehr selten und die O-Glykosylierung möglicherweise überhaupt nicht oder in einem sehr geringen Ausmaß vorhanden (Gowda and Davidson, 1999). Auch bei *T. gondii* besteht die Modifikation der Proteine durch Glykosylierung hauptsächlich in der Synthese des GPI-Ankers, eine N- und O-Glykosylierung konnte nur bei einigen wenigen Proteinen nachgewie-
sen werden und scheint ebenfalls selten zu sein (Dieckmann-Schuppert et al., 1994; Schwarz and Tomavo, 1993).

Wir haben in dieser Arbeit kein Hinweis auf eine Glykosylierung des in *T. gondii* synthetisierten MSP-190F gefunden. Das aus *T. gondii* gereinigte MSP-190F zeigt die gleiche elektrophoretische Mobilität in einer SDS-PAGE wie das aus *E. coli* gewonnene, nicht modifizierte MSP-190F. Im Vergleich dazu wurde das aus HeLa Zellen gereinigte MSP-190F in seinem Laufverhalten stark verändert (MW deutlich größer als 190kD). Unsere Annahme, dass diese verminderte Mobilität eine Folge der Glykosylierung des im eukaryontischen System produzierten Proteins ist, wurde experimentell bestätigt. P. Burghaus konnte zeigen, dass eine Behandlung des in Säugerzellen synthetisierten MSP-190F mit N-Glykosidase und Endoglykosidase H zu einer erhöhten elektrophoretischen Mobilität des Proteins führt (Burghaus *et al.*, 1999).

Wir nehmen auch an, dass die Glykosylierung die Interaktion des im eukaryontischen System synthetisierten MSP-190F mit monoklonalen Antikörpern beeinträchtigt. Dies kann die Erklärung für die nicht vorhandene Kreuzreaktivität des aus CHO Zellen gereinigten MSP-190F mit monoklonalen Antikörpern sein. Diese Antikörper sind entweder gegen konformationelle oder sequenzspezifische Epitope des nativen MSP-1 Proteins gerichtet und erkennen sowohl das aus *E. coli* wie auch aus *T. gondii* gereinigte MSP-190F Protein.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das heterolog produzierte MSP-190F in seiner Gesamtlänge und in einer guten Qualität aus *T. gondii* gereinigt werden kann. Dieses Expressionssystem ist jedoch nicht für die Produktion des rekombinanten Proteins in präparativen Maßstab geeignet. Es werden ca.  $10^{12}$  transgene *T. gondii* Parasiten benötigt, um 1 mg des rekombinanten MSP-190F zu reinigen. Dies entspricht etwa der achtfachen Menge der *P. falciparum* Parasiten, die zur Gewinnung von 1 mg des authentischen MSP-1F notwendig sind (1 mg gereinigt aus 1,3 x  $10^{11}$  Parasiten, Tolle, 1994).

### 6.2.4 Charakterisierung des rekombinanten MSP-190F und seiner Fragmente aus T. gondii

Biochemische Methoden wie die Phasentrennung eines Membransystems in TX114 und die Natrium-Karbonat-Extraktion haben uns zuerst eine Auskunft über die Art der Assoziation der rekombinanten Proteine mit der Membran des *T. gondii* ermöglicht.

Die Ergebnisse dieser Experimente deuten darauf hin, dass die Proteine, denen Kodierungssequenz mit der vollständigen Transportsignalsequenz des *sag-1* oder *msp-1* Gens fusioniert wurde, in einer starken hydrophoben Assoziation mit der Membranfraktion vorliegen, die nicht durch Natrium-Karbonat-Extraktion zerstört werden konnte. Sie werden nach der Phasentrennung in TX114 vorwiegend in der löslichen Detergenz-Phase identifiziert. Das gleiche Fraktionierungsverhalten, typisch für integrale Membranproteine bzw. GPI-verankerte Proteine, wurde auch bei dem endogenen SAG-1 Protein von *T. gondii* beobachtet.

Im Gegensatz dazu verhielt sich das mit der unvollständigen, plasmodialen GPI-Anker-Signalsequenz fusionierte MSP-190F aus der Pf190-Linie wie ein zytosolisches oder sekretorisches Protein. Es wurde nach der Phasentrennung in TX114 ausschließlich in der wässrigen Phase identifiziert. Wir nehmen an, dass die nicht korrekt prozessierte, verkürzte Form des GPI-Anker-Signals nicht in der Lage ist, das an sich stark hydrophile MSP-190F in der detergenten TX114 Phase zu halten. Die Tatsache, dass es trotzdem nicht durch die Natrium-Karbonat-Extraktion aus der unlöslichen Membranfraktion gelöst werden konnte, erklären wir durch seine starke Neigung, Aggregate zu bilden.

Zu einem spezifischen Nachweis der GPI-Verankerung des rekombinanten MSP-190F oder seiner Fragmente in der Plasmamembran des *T. gondii* sind diese Methoden nicht geeignet. Wir haben deshalb die transgenen *T. gondii*-Linien einer Behandlung mit Phosphatidylinosi-tol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) unterworfen, die als Standardmethode zum Nachweis einer GPI-Verankerung angesehen wird (Ferguson and Williams, 1988).

Diese enzymvermittelte Freisetzung der GPI-verankerten Proteine aus der Membran beruht auf der Spaltung der Bindung zwischen Diacylglycerol und dem Phosphoglykolipid mit dem kovalent gebundenen Protein (Futerman *et al.*, 1985). Der authentische GPI-Anker des MSP-1 von *P. falciparum* weist eine zusätzliche Modifikation des Inositolringes durch Myristinsäure auf (Gerold *et al.*, 1996) und kann deshalb nicht durch die PI-PLC Behandlung aus der Merozoitenoberfläche freigesetzt werden (Schofield and Hackett, 1993). Das in *T. gondii* synthetisierte MSP-190F wird jedoch durch einen *T. gondii*-eigenen GPI-Anker modifiziert. Es ist zwar nicht bekannt, wie viele GPI-Anker-Variationen in diesem Organismus synthetisiert werden, die beiden häufigsten GPI-verankerten Proteine SAG-1 und p23 können jedoch durch die PI-PLC Behandlung aus der Oberfläche der Tachyzoiten freigesetzt werden (Schwarz and Tomavo, 1993; Tomavo *et al.*, 1993).

Beide transgenen *T. gondii*-Linien, die das MSP-190F in seiner Gesamtlänge auf der Plasmamembran exponieren, nämlich Tg190Tg und Pf190Pf, wurden mit der PI-PLC aus *Bacillus cereus* behandelt, ohne die Freisetzung der radioaktiv markierten, rekombinanten Proteine aus der Membranfraktion zu erzielen. Es ist vorstellbar, dass die Erkennungsstelle, an der die PI-PLC die Bindung zwischen Diacylglycerol und dem Phosphoglykolipid spaltet, in diesem Kontext nicht für das Enzym zugänglich ist. Die zu spaltende Stelle befindet sich zwischen der Plasmamembran und dem 190kD großen MSP-190F Protein und wird möglicherweise von diesem maskiert. Das nur 30kD große endogene SAG-1 Protein, das von den gleichen Transportsignalen wie das MSP-190F der Tg190Tg-Linie zu der Oberfläche transportiert und dort über einen GPI-Anker verankert wird, konnte in den gleichen Experimenten erfolgreich abgespalten werden. Diese Vermutung wurde durch die PI-PLC Experimente mit der 19/GFP-Linie verstärkt. In diesem Fall konnten wir zeigen, dass das MSP-F19 Protein effizient aus der Oberfläche in den Überstand der mit PI-PLC behandelten, transgenen *T. gondii* Parasiten freigesetzt wurde. Wie bei der Linien Tg190Tg und 42/GFP gehen wir davon aus, dass das von dem SAG-1 Protein stammende, N-terminale Transportsignal erkannt und richtig prozessiert wurde. Eine 100% ige Entfernung der Proteine aus der Plasmamembran wurde weder bei SAG-1 noch bei MSP-F19 erreicht. Dies ist entweder auf suboptimalen Reaktionsbedingungen für die PI-PLC zurückzuführen oder auf die Tatsache, dass nur ein Teil des synthetisierten Proteins durch ein GPI-Anker modifiziert wurde.

Es ist uns nicht gelungen, das rekombinante MSP-19F *in vivo* mit <sup>3</sup>H markierten Leu nachzuweisen. Dies führen wir auf die Tatsache zurück, dass nur vier Leucine in der Aminosäuresequenz dieses Fragments vorhanden sind. So ist z. B. auch die metabolische Markierung des MSP-19 mit <sup>35</sup>S Met nicht gelungen, obwohl das längere MSP-42 unter gleichen Bedingungen nachgewiesen werden konnte (Blackman *et al.*, 1993).

Einen interessanten Zusammenhang haben wir zwischen der intrazellulären Lokalisierung der rekombinanten Proteine und der Konservierung derer antigenen Epitope festgestellt. Die beste Erkennung des MSP-190F Proteins durch monoklonale Antikörper wurde bei der Tg190Tg-Linie erzielt. Dieses Protein ist auf der Oberfläche, wie wir annehmen, durch einen GPI-Anker verankert, der eine wichtige Rolle für den korrekten und effizienten Transport zu der Oberfläche hin spielen kann. Das in der Pf190-Linie synthetisierte MSP-190F Protein besitzt dagegen keine funktionsfähige GPI-Ankersignalsequenz, akkumuliert in den intrazellulären Organellen (siehe oben) und tritt deshalb auch nicht in Kontakt mit den modifizierenden Enzymen, die erst in dem nachfolgenden Golgi Apparat aktiv sind. Dieses Protein wurde in unserem Vergleich von den monoklonalen Antikörpern mit der niedrigsten Effizienz erkannt.

Zusätzlich weist das falsch lokalisierte Protein der Pf-190-Linie in einem Western Blot keine Abbauprodukte auf, die mit den Antikörpern gegen den C- und den N-Terminus nachweisbar wären. Solche Spaltungsprodukte wurden jedoch in jeder Western Blot Analyse der Tg190Tg und Pf190Pf Linien nachgewiesen. Deshalb gehen wir davon aus, dass diese Proteinspaltung zu einem späteren Zeitpunkt des Transportes, möglicherweise erst nach der Assoziation mit der Oberfläche passiert. Ob es sich dabei um eine unspezifische Spaltung (Hydrolyse) oder um eine sequenzspezifische Prozessierung handelt, so wie sie in *P. falciparum* stattfindet, wurde mit der Ausnahme des auffälligen C-terminalen Spaltungsproduktes experimentell nicht weiter analysiert. Eine Zuordnung der Fragmente ist daher nicht eindeutig möglich. Die Frage der sekundären Prozessierung des nativen MSP-1 wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

# 6.2.5 Findet die P. falciparum-spezifische sekundäre Prozessierung des MSP-F42 auch im T. gondii statt?

Das MSP-1 Protein von *P. falciparum* wird nach seiner GPI-Verankerung in der Plasmamembran in zwei Schritten prozessiert. Zuerst erfolgt in dem Stadium des späten Schizonten die Spaltung in die vier Hauptfragmente, die in einem nicht kovalent gebundenen Komplex assoziiert bleiben (McBride and Heidrich, 1987). Die Funktion dieser Prozessierung ist unklar (Holder and Blackman, 1994a). Der Komplex bleibt über das carboxyterminale p42 Fragment in der Oberfläche des nun freien Merozoiten verankert. In einem zweiten Schritt wird das p42 in zwei Fragmente gespalten: Das p29 wird zusammen mit dem gesamten Komplex während der Invasion der Erythrozyten aus der Oberfläche abgestreift (Blackman *et al.*, 1991). Das Cterminale p19 bleibt in der Plasmamembran verankert und kann als einziges nach einer erfolgreichen Invasion auch in dem Ringstadium nachgewiesen werden (Blackman *et al.*, 1990). Auch die Rolle der sekundären Prozessierung ist nicht klar; sie ist jedoch essentiell für die Invasion. Wird diese Spaltung blockiert, sei es durch Serin-Protease-Inhibitoren (Blackman *et al.*, 1994), wird der Invasionsprozess unterbrochen.

Die Aminosäuresequenz der Prozessierungsstelle ist bekannt (Blackman *et al.*, 1991; Blackman *et al.*, 1993). Die Spaltung findet zwischen dem Leucin an der Position 1630 (bildet den C-Terminus vom p29) und dem Asparagin an der Position 1631 (der N-Terminus von p19) statt.

Die sekundäre Prozessierung wird durch eine Membran-gebundene, Kalzium-sensitive Serin-Protease katalysiert (Blackman *et al*., 1993, Blackman and Holder, 1992). Kürzlich konnten in *P. falciparum* unabhängig zwei Enzyme identifiziert werden, denen eine Rolle bei der Invasion, möglicherweise direkt bei der Reifung des MSP-42 zugesprochen wird: PfSUB1 (Blackman *et al.*, 1998) und PfSUB2 (Barale *et al.*, 1999). Beide gehören der Superfamilie der Subtilisin-ähnlichen Proteasen an (Siezen and Leunissen, 1997), zeigen eine 48% ige Sequenzhomologie in der Aktivierungsdomäne und sind in den sekretorischen apikalen Organellen lokalisiert, deren Inhalt während der Invasion freigesetzt wird. Die PfSUB1 zeigte jedoch keine typische Substratspezifität, die für die sekundäre Prozessierung vom MSP-42 notwendig wäre (Sajid *et al.*, 2000). Dagegen autokatalysiert die PfSUB2 die Spaltung zwischen Leu und Asn (Barale *et al.*, 1999), die auch bei der Prozessierung vom MSP-42 stattfindet.

In dieser Arbeit wurden sowohl das MSP-F42 Fragment als auch das MSP-F19 in *T. gondii* synthetisiert. Beide Proteine sind an der Oberfläche des Parasiten lokalisiert, und wir gehen davon aus, dass zumindest ein Teil über ein GPI-Anker in der Plasmamembran verankert ist (siehe oben).

Das MSP-F19 wurde im Western Blot als eine Proteinbande mit dem Molekulargewicht von etwa 28kD identifiziert. Wir nehmen an, dass es sich hierbei um einen Dimer des Proteins,

dessen errechneter MW 13,8kD beträgt, handelt. Ein ähnliches Laufverhalten zeigt nämlich auch das ebenfalls in *T. gondii* synthetisierte, C-terminale PvMSP-19 Fragment von *P. vivax* (C. Fernandez, persönliche Mitteilung). Der Vektor zur Expression der *pvmsp-19* Sequenz ist identisch mit den Konstrukten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, und das Protein wird ebenfalls an die Oberfläche transportiert. Im Western Blot wird dieses Fragment als eine Bande mit dem MW von etwa 28,5kD identifiziert, obwohl auch in diesem Falle ein MW von nur 14,2kD zu erwarten wäre.

Die Western Blot Analyse der Linien Tg190Tg und 42/GFP zeigte die konstante Anwesenheit von einem MSP-1 spezifischen, C-terminalen Spaltungsprodukt von etwa 28kD, das die gleiche elektrophoretische Mobilität wie das MSP-F19 Protein aufweist. Wir konnten nicht ausschließen, dass es sich hierbei um eine spezifische Prozessierung der plasmodialen Proteinsequenz in dem homologen Organismus *T. gondii* handelt und entschlossen uns, die Aminosäuresequenz an der Spaltungsstelle zu verändern.

Wie bereits erwähnt, wird das MSP-42 in *P. falciparum* an der Bindung zwischen Leu<sub>1630</sub> und  $Asn_{1631}$  gespalten (Blackman *et al.*, 1991). Die Prozessierungsstelle befindet sich am Anfang des hoch konservierten Blocks 17; diese Region besteht aus 114 Aminosäuren, die sich nur an vier Positionen in den K1 und MAD20 Prototypen voneinander unterscheiden (Miller *et al.*, 1993). Bei dem Vergleich der Aminosäuresequenz beider Prototypen direkt vor der Spaltungsstelle fällt auf, dass sich in der P3 Position entweder ein Asp im Falle von MAD20 oder ein Gly im Falle von K1 befindet. Das würde bedeuten, dass die putative Protease vom *P. falciparum* bezüglich dieser Stelle eine Toleranz aufweist.

Die sekundäre Prozessierungsstelle ist nicht zwischen den MSP-1 Proteinen von unterschiedlichen *Plasmodium ssp.* konserviert. Sie wird im MSP-1 von *P. vivax* von Thr-Met (M. Blackman, persönliche Mitteilung), in *P. chabaudi*, *P. yoelii* und *P. berghei* von Leu-Gly gebildet (Jennings *et al.*, 1998).

Aus diesen Gründen konnten wir keine genaue Voraussage über die Rolle der einzelnen Aminosäuren bei der Bildung der Spaltungsstelle treffen. Wir entschlossen uns für den Austausch des neutralen Leucins an der Position P1, das mit Ausnahme von PvMSP-1 konserviert zu sein scheint, gegen Glutamin, bzw. Prolin. Diese Mutationen hatten jedoch keine Auswirkung auf die Spaltung/Degradation des in *T. gondii* produzierten MSP-F42 Proteins. In Western Blots mit beiden transgenen *T. gondii* Linien 42/E und 42/P konnte das auffällige, 28kD große Spaltungsprodukt weiterhin identifiziert werden.

Fassen wir zusammen, dass das 28kD Produkt nur bei den *T. gondii*-Linien identifiziert wurde, in denen das rekombinante Protein an die Oberfläche gelangt, gibt es zwei Hypothesen, die sein Auftreten erklären können. (i) Es handelt sich um eine unspezifische Proteindegradation, die durch feine Veränderungen zu einem späteren Zeitpunkt des sekretorischen Prozesses, wie z. B. Ionenzusammensetzung oder unterschiedlicher pH Wert hervorgerufen wird. (ii) Es ist in der Tat eine spezifische, Protease-vermittelte Prozessierung, und das putative Enzym wird entweder in dem post ER Kompartiment oder erst nach der Insertion des Proteins in die Plasmamembran aktiv. Seine Spezifität wird dabei nicht durch die Primärstruktur der Spaltungsstelle beeinflusst. Ähnliche Beobachtungen, in denen die sekundäre (alfahelikale) Struktur des Proteins bzw. der Abstand der Erkennungsstelle zu der tatsächlichen Spaltungsstelle eine Rolle spielen, wurde für andere, membrangebundene Proteine beschrieben (Egnell and Flock, 1992; Sisodia, 1992).

#### 6.3 Das Immunisierungspotential des in T. gondii produzierten MSP-190F Proteins

Obwohl die Entwicklung der Immunität gegen Malaria ein sehr komplexes und noch kaum verstandenes Prozess ist, sind die grundlegenden Immunmechanismen aufgeklärt. Es ist zum einen die gegen die prä-erythrozytäre Stadien gerichtete Immunantwort, die vor allem durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt wird und zur Produktion von Interferon- (IFN- ), Interleukin 12 (IL-12), Nitritoxid und natürlichen Killerzellen führt, und zum anderen die humorale, also antikörpervermittelte Immunantwort gegen die erythrozytäre Stadien, die mit der Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und T-Zellen verbunden ist (für Übersicht siehe: Good and Doolan, 1999, Taylor-Robinson, 2000).

Diese CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (Th) werden anhand der Zytokine die sie produzieren und die ihre Funktion bestimmen in zwei Populationen unterteilt (Mosmann and Coffman, 1989): Th1 produzieren vor allem IL-2, IFN- und Tumornekrosisfaktor-ß (TNF-ß). Diese Zytokine bewirken die Aktivierung von Makrophagen und verursachen den sog. verspäteten Typ der hypersensitiven Immunantwort. Die andere Population – Th2 – sezernieren IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 und bewirken das Reifen von B-Zellen, was zur vermehrten Antikörperproduktion führt.

Die Immunität gegen Malaria kann nicht ausschließlich mit einer Th1 oder Th2 Immunantwort assoziert werden; die Zytokine beider Populationen werden während der *Plasmodium* Infektion aktiviert, unabhängig von dem Krankheitsverlauf (Taylor-Robinson and Smith, 1999). Mit anderen Worten: sowohl die Antikörper-vermittelte als auch die T-Zell-spezifische (also Antikörper-unabhängige) Immunantwort spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Immunität (für Übersicht siehe: Berzins, 1996).

In den letzten Jahren wurden einige *P. falciparum* Antigene identifiziert, die als Ziele für beide Effektormechanismen dienen und deshalb als mögliche Impfstoff-Kandidaten für die Entwicklung einer anti-Malaria Vakzine in Frage kommen. Das MSP-1 aus *P. falciparum* ist dabei einer der etwa zehn Antigene, die bezüglich ihres Potentials eine anti-erythozytäre Immunantwort einzuleiten zur Zeit analysiert werden. Nachdem man zeigen konnte, dass Immunisierung von Mäusen und Affen mit verschieden MSP-1-Präparationen vor einen *Plasmodium* Infektion schützt, gilt das MSP-1 als der führende Impfstoff-Kandidat (Übersicht siehe: Good *et al.*, 1998; Holder, 1996). Diese Experimente wurden größten Teils mit MSP-1 Fragmenten durchgeführt, die zu dem C-terminus des Proteins korrespondieren: MSP-42 und MSP-19. Der Grund hierfür liegt unter anderem darin, dass es bis vor Kurzem technisch nicht möglich war, längere MSP-1 Fragmente heterolog herzustellen. Obwohl mit beiden Fragmenten eine protektive Immunantwort in Affen und Mäusen induziert werden konnte (Kumar *et al.*, 1995; Tian *et al.*, 1997), sind wir der Meinung, dass keine Region des Proteins bei einer Immunisierungsstudie ausgeschlossen werden sollte. Aus diesem Grund haben wir in unseren Experimenten das MSP-190F in seiner Gesamtlänge für die Immunisierung von Mäusen und *Aotus* Affen verwendet und die induzierte, humorale Immunantwort gegen das Gesamtprotein wie auch gegen die einzelnen MSP-1 Prozessierungsprodukte analysiert.

Die antigenen Eigenschaften eines rekombinanten Proteins werden in erster Linie durch die Konservierung seiner natürlichen, immunogenen Epitope bestimmt. Die Wahl eines geeigneten, heterologen Expressionssystems spielt dabei die entscheidende Rolle. Jedoch wird die Entwicklung der mit diesem Antigen induzierten Immunantwort sehr stark durch weitere Faktoren beeinflusst. Dazu gehören u.a. die Natur des Antigens (gereinigtes Protein, synthetische Peptide), die Art der Verabreichung (DNA-Immunisierung, virale oder bakterielle Träger) und die Wahl des Adjuvans (Taylor-Robinson, 2000).

Das in *T. gondii* synthetisierte MSP-190F Protein zeigt - verglichen mit den MSP-190F Proteinen aus *E. coli* und Säugertierzellen - die beste Konservierung seiner immunogenen Epitope (siehe oben). Deswegen haben wir avirulente transgene *T. gondii* Linien etabliert, die das MSP-190F in seiner Gesamtlänge produzieren und sie als eine Art lebender Träger – "lebend Vakzine" – sowohl im Maus- als auch im *Aotus*-Immunisierungsmodell getestet. Das an sich immunogene *T. gondii* übernimmt dabei die Rolle des Adjuvans (Sayles and Johnson, 1996) und präsentiert das Antigen dem Immunsystem des Wirtes.

# 6.3.1 Das MSP-190F aus T. gondii induziert eine spezifische, humorale Immunantwort in C57BL/6 Mäusen

Der von uns ausgewählte, temperatur-sensitive ts-4 Stamm ist eine nicht-persistierende Mutante des RH Stammes, die eine starke, schützende Immunantwort gegen die sonst letale Infektion mit dem RH Stamm in Mäusen induziert (McLeod *et al.*, 1988; Waldeland and Frenkel, 1983). Erst kürzlich konnte demonstriert werden, dass neben der T-Lymphozyten und IFN- vermittelten Immunantwort auch die B-Lymphozyten eine wichtige Rolle spielen (Sayles *et al.*, 2000). Die B-Zellen produzieren Antikörper, die wahrscheinlich die Infektion der Wirtszellen blockieren.

Unsere Experimente haben die Avirulenz des ts-4 Stammes in Mäusen bestätigt. Zwei verschiedene Mäusestämme, der gegenüber einer virulenten *T. gondii* Infektion hoch sensitive C57BL/6 (A2K<sup>b</sup> Mutante) sowie der weniger sensitive BALB/c konnten mit einer hohen Dosis (bis zu 10<sup>6</sup>) von lebendigen ts-4 Tachyzoiten infiziert werden, ohne gesundheitliche Beeinträchtigungen für die Tiere festzustellen.

In anschließenden Immunisierungsexperimenten konnte wir zeigen, dass die transgenen ts-4 Tachyzoiten in der Lage sind, eine starke, humorale Immunantwort gegen das rekombinante MSP-190F in den Mäusen des C57BL/6 Stammes einzuleiten. Es wurden insgesamt 12 A2K<sup>b</sup> Mäuse in drei verschiedenen Experimenten mit den rekombinanten ts-4 Parasiten immunisiert. Davon waren 11 in der Lage MSP-1 spezifische Antikörper zu produzieren, die sowohl mit dem nativen MSP-1 aus *P. falciparum* als auch mit den rekombinanten MSP-1 Fragmenten aus *E. coli* reagierten. Bei einigen dieser Mäuse waren allerdings drei Immunisierungen notwendig, um die MSP-1 spezifische Antikörper nachzuweisen.

Die Induktion der humoralen anti-MSP-1 Immunantwort wurde weder durch die für die Immunisierung verwendete T. gondii Linie (ts4/Pf190 oder ts4/Tg190Tg) noch durch die unterschiedliche Applikation des Antigens (eine i.p. oder eine s.c. Injektion) beeinflusst. Wir nehmen aber an, dass es eine genetische Komponente gibt die in dem hier diskutierten Mausmodell limitierend wirkt. So ist es uns nicht gelungen, eine MSP-1 induzierte Antikörperproduktion in den Mäusen des BALB/c Stammes durch die Immunisierung mit den ts4/Pf190 Parasiten einzuleiten. Eine Analyse der eventuellen Ursache war in Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Wir stellen aber fest, dass eine identische Infektion der Mäuse eine unterschiedliche immunologische Reaktion hervorrufen kann, die Stamm-spezifisch ist. So reagieren die C57BL/6 Mäuse nach einer Leishmania major Infektion durch die Induktion einer Th1 spezifischen Immunantwort, während die BALB/c Mäuse eine Th2 vermittelte Immunantwort einleiten (Hsieh et al., 1995; Reiner and Locksley, 1995). Im Gegensatz dazu induziert die Infektion mit T. gondii in beiden Stämmen eine Th1 vermittelte Immunantwort, unabhängig von dem genetischen Hintergrund (Denkers and Gazzinelli, 1998). Unsere Daten erlauben uns keine Aussage darüber, inwieweit die MSP-1 spezifische Immunantwort von dem unterschiedlichen genetischen Hintergrund beeinflusst wird; sie sollten jedoch bei zukünftigen Immunisierungsexperimenten in Mäusen nicht außer Acht gelassen werden.

Aus gleichem Grund können wir auch keine Aussage über die Immunisierung mit dem aus *T. gondii* gereinigten MSP-190F Protein treffen, da auch in diesem Falle der BALB/c Stamm verwendet wurde. Die limitierte Menge des gereinigten Proteins verhinderte eine Wiederholung der Proteinimmunisierung in Mäusen, die jedoch detailliert in dem *Aotus* Primatenmodell untersucht wurde.

#### 6.3.2 Die Wirkung des MSP-190F aus T. gondii im Aotus Immunisierungsmodell

Unser Vorexperiment mit *drei Aotus azarae boliviensis* hatte die von Escajadillo und Frenkel beschriebene Avirulenz der ts-4 Mutante in diesen Neu-Welt-Affen bestätigt, bei denen eine Infektion mit dem virulenten *T. gondii* letal verläuft (Escajadillo and Frenkel, 1991). Keines der Tiere entwickelte Zeichen für eine Toxoplasmose oder für eine gesundheitliche Schwäche wie Fieber, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust. Bei der Untersuchung der inneren Organe wurden ebenfalls keine Veränderungen festgestellt.

Trotzdem haben wir in der darauf folgenden Immunisierungsstudie einen Affen verloren. Dieses Tier in der Kontrollgruppe musste am Tag 30 eingeschläfert werden. Obwohl bei diesem Affen kein Fieber gemessen wurde, waren die übrigen, für eine akute Toxoplasmose typischen Symptome aufgetreten (motorische Schwäche, Desorientierung und die Anwesenheit von *T. gondii* Tachyzoiten in den inneren Organen *post mortum*). Wir nehmen an, dass die Toxoplasmose durch eine Immunschwäche des Affen (hervorgerufen z. B. durch eine virale Infektion), die sich während des Experiments entwickelte bzw. verstärkte, ermöglicht wurde. Dafür spricht die Tatsache, dass das Tier die erste Infektion mit 5x10<sup>5</sup> lebendigen ts-4 Tachyzoiten ohne Probleme verkraftet hatte. Erst 11 Tage nach der zweiten Infektion wurden die beschriebenen Symptome beobachtet. Diese Zeitspanne ist identisch mit der von Escaj und Frenkel festgestellten Inkubationszeit, in der die Infektion von *Aotus* Affen mit Bradyzoiten zum Tode führt (Escajadillo and Frenkel, 1991). Bei der mikroskopischen Untersuchung von Gehirnschnitten wurden keine Bradyzoitenzysten beobachtet, die auf eine chronische, durch die Bildung von virulenten Revertanten bedingte Toxoplasmose schließen ließe.

Der Verlauf der Entwicklung von anti-MSP-1 spezifischen Antikörperproduktion während der wiederholten Immunisierung mit ts4/Tg190Tg Tachyzoiten war für uns überraschend. Nach der ersten Immunisierung entwickelten alle vier Affen MSP-1 spezifische Antikörper, die gegen alle getesteten Fragmente nachgewiesen wurden. Diesen ersten Kontakt mit dem rekombinanten Antigen verstehen wir als ein "priming" des Immunsystems des Wirtes, bei dem nicht der tatsächlich induzierte Antikörpertiter, sondern die Erkennung des Antigens die entscheidende Rolle spielt. Die erste Immunisierungswiederholung (sog. erster "boost") hatte die erwartete Steigerung der Antikörperproduktion zur Folge. Die zweite Wiederholung (zweiter "boost") zeigte jedoch keine induzierende Wirkung. Obwohl der Antikörpertiter gegen *T. gondii* spezifische Antigene weiter stieg, wurde bei allen vier immunisierten Affen eine signifikante Reduktion des MSP-1 spezifischen Antikörpertiter festgestellt. Dies steht im Gegensatz zu unseren vorherigen *Aotus* Immunisierungsstudien (vergleiche Cali 1995, Anhang V) und zu Beobachtungen von anderen (Egan *et al.*, 2000; Kocken *et al.*, 1998), bei denen auch der zweite "boost" mit gereinigtem, rekombinantem Protein zur weiteren Steigerung der spezifischen Antikörperproduktion führte. Genauso zeigten unsere Experimente mit Mäusen, dass bei einigen Tieren erst nach dem zweiten "boost" eine MSP-1 spezifische, humorale Immunantwort eingeleitet wurde (siehe 6.3.1).

Unserer Meinung nach gibt es zwei denkbare Ursachen für den nicht eingetretenen, induzierenden Effekt des zweiten "boosts", die wahrscheinlich gleichzeitig eine Rolle spielten.

(i) Das Immunsystem des Wirtes entwickelte bereits nach der ersten Immunisierung und dem ersten "boost" eine starke Immunantwort gegen das als Träger verwendete *T. gondii*; als Folge dessen wurde das Pathogen effizient von dem Wirt eliminiert, ohne eine ausreichende antigene Präsentation des rekombinanten MSP-190F zu gewährleisten.

(ii) Das *T. gondii* induzierte eine dominante, Th-1 vermittelte Immunantwort, die die Entwicklung der für die Antikörperproduktion notwendige, Th-2 bedingte Immunantwort unterdrückte. Diese Annahme stimmt mit den experimentellen Daten von Santiago *et al.* (Santiago *et al.*, 1999) überein. Die Autoren konnten zeigen, dass eine Koinfektion von *T. gondii* die Antigen spezifische, Th-2 vermittelte Immunantwort während einer *Leishmania major* Infektion in BALB/c Mäusen inhibierte und die Synthese von IgG1 unterdrückte.

Die gewünschte Induktion von MSP-1 spezifischen Antikörpern haben wir durch die Immunisierung mit dem aus *T. gondii* gereinigten MSP-190F Protein erreicht. Das für die Formulierung des Antigens verwendete Adjuvans SBAS2 erwies sich als gesundheitlich unbedenklich. Obwohl nur eine sehr geringe Menge des Proteins – etwa 8 µg pro Tier – injiziert wurde, reagierten alle Affen mit einem starken Anstieg der Antikörperproduktion, gemessen gegen alle rekombinanten MSP-1 Fragmente. Dies ist für uns der Hinweis darauf, dass ein effizientes und korrektes "priming" des Immunsystems des Wirtes durch die rekombinanten ts4/Tg190Tg Tachyzoiten stattgefunden hatte.

Trotzdem haben wir in diesem Experiment nicht die Antikörpertiter erreicht, die bei den erfolgreichen Immunisierungen von *Aotus* Affen Cali 1993 und Cali 1995 erzielt wurden. Dies kann einer der Gründe sein, warum kein effizienter Schutz gegen die *P. falciparum* Infektion in unserem Experiment eingetreten ist. Bei zwei Affen in der immunisierten Gruppe kam es zu einer signifikanter Verspätung des Parasitemieausbruches; während die Kontrollaffen 8 Tage nach der Infektion die Parasitemiegrenze von 2% überschritten haben, wurde bei dem Affen A46 und A58 diese Grenze erst 6 bzw. 3 Tage später endgültig erreicht. Dies deutet auf eine Aktivierung des Immunsystems vor der Infektion mit *P. falciparum* Merozoiten hin, die jedoch nicht ausreichend für eine protektive Wirkung war. Auch der enorme, mehr als 20fache Anstieg des MSP-1 spezifischen Antikörpertiters in den immunisierten Affen nach der *P. falciparum* Infektion belegt, dass das Immunsystem mit einem dem nativen Antigen sehr ähnlichen Immunogen konfrontiert wurde.

Wir nehmen folgende Gründe als Ursache für die, im Bezug auf eine schützende Wirkung nicht ausreichende Immunantwort an:

(i) Wie bereits erwähnt scheint der aktuelle Antikörpertiter am Tag der *P. falciparum* Infektion nicht ausreichend für eine schützende Immunantwort gewesen zu sein. Es gilt als bewiesen – zumindest für Immunisierung mit MSP-19 in Mäusen – dass die Immunität durch einen hohen Titer der spezifischen, wahrscheinlich neutralisierenden Antikörper zum Zeitpunkt der Infektion vermittelt wird (Good and Doolan, 1999). Kontrovers wird dagegen die Rolle der anti-MSP-19 spezifischen Antikörpertiter bei Menschen betrachtet. So gibt es Berichte sowohl über eine signifikante Korrelation zwischen dem anti-MSP-19 Titer und der klinischen Immunität (Egan *et al.*, 1996) als auch über das Fehlen einer solchen Korrelation (Dodoo *et al.*, 1999). Unsere Experimente Cali 1993 und Cali 1995 zeigten eine eindeutige Tendenz zur einer signifikanten Korrelation zwischen dem höchsten anti-MSP-1 Titer und Protektion. Allerdings wurde in beiden Studien das Freund´sche komplette Adjuvans für die Formulierung des Antigens verwendet, das verglichen mit anderen Adjuvantien zur Induktion des höchsten Antikörpertiters führt (Kumar *et al.*, 2000).

(ii) Unabhängig von der Höhe des anti-MSP-1 Titers gibt es zunehmend Hinweise auf die protektive Wirkung von IgG Antikörpern während der *P. falciparum* Infektion in Affen und im Menschen (Cohen *et al.*, 1961; Fandeur *et al.*, 1984; Groux and Gysin, 1990). In dieser Hinsicht ist der Isotyp der induzierten IgGs für die Resistenz entscheidend. Nach den neuesten Erkenntnissen scheint ein hoher IgG2 und IgG3 und ein niedriger IgG4 Titer mit der Immunität gegen *P. falciparum* Malaria assoziiert zu sein (Aucan *et al.*, 2000). Welcher anti-MSP-1 IgG Isotyp tatsächlich induziert wird, hängt von der Art der Immunisierung (z. B. DNA-Immunisierung vs. Proteinimmunisierung; siehe Kang *et al.*, 1998) und dem verwendeten Adjuvans ab (Hui and Hashimoto, 1998; Kumar *et al.*, 2000). Obwohl es für uns nicht möglich war, die IgG Isotypen der Affenseren zu bestimmen, ist es naheliegend, dass durch die Immunisierung mit transgenen *T. gondii* ein anderes IgG Isotyp-Profil induziert wurde als durch die Proteinimmunisierung in den Experimenten Cali 1993 und Cali 1995. Als Folge wurde keine sterile Immunität gegen die *P. falciparum* Infektion erreicht.

(iii) Wir haben in unserem Experiment insgesamt dreimal mit rekombinanten *T. gondii* and anschließend einmal mit gereinigtem MSP-190F Protein immunisiert. Dadurch haben wir eine definierte Immunodominanz festgelegt. Nun konnte kürzlich demonstriert werden, dass eine Protektion gegen Malaria sehr stark durch die Art des Antigens, das für das "priming" und anschließende "boosting" verwendet wurde, bestimmt wird. Wurde ein Antigen in Form vom DNA-Plasmid sowohl für die erste wie auch für die zweite Immunisierung verwendet, konnte in Mäusen keine Protektion erreicht werden; kombinierte man dagegen das "priming" durch DNA-Immunisierung mit dem "boosting" durch rekombinante Vaccinia Viren, wurde eine 100% ige Protektion gegen die *P. berghei* Malaria erzielt, die jedoch bei einem umgekehrten Immunisierungsablauf – "priming" mit Vaccinia und "boosting" mit DNA-Plasmid – wieder auf 0% reduziert wurde (Schneider *et al.*, 1998). Ein ähnliches Ergebnis wurde im Falle von *P. yoelii* Malaria dokumentiert (Sedegah *et al.*, 1998). Zusammenfassend mit den Daten aus unserem Immunisierungsexperiment gehen wir von folgender Immunodominanz aus:

Das *T. gondii* ist immunogener als das gereinigte Protein. Jedoch überwiegt die humorale Immunantwort gegen die *T. gondii* eigenen, immunodominanten Antigene (wie SAG-1), welche die Mehrheit der Proteine darstellen. Durch den ersten und zweiten "boost" mit den ts4/Tg190Tg Parasiten wird außerdem die Th-1 bedingte Immunantwort etabliert, die die Induktion von Th2 vermittelter Immunantwort verhindert; der zweite "boost" hat also keinen induzierenden Effekt auf die Produktion von MSP-1 spezifischen Antikörpern. Erst durch den anschließenden "Proteinboost" können die Lymphozyten weiter zur Antikörperproduktion angeregt werden, die bereits durch die erste und zweite Immunisierung auf das rekombinante MSP-190F eingestellt wurden.

Die von uns gewonnenen Daten haben gezeigt, dass das Immunisierungspotential des rekombinanten *T. gondii* in seiner Fähigkeit liegt, das Immunsystem des Wirtes auf korrekte Art und Weise zu aktivieren (zu "primen"). Auf der Basis dieser Erkenntnis und der Daten aus Cali 1993 und Cali 1995 schlagen wir folgendes Protokoll für zukünftige Immunisierungsversuche im *Aotus* Primatenmodell vor:

Die erste, für das "priming" des Immunsystems entscheidende Immunisierung findet mit den rekombinanten T. gondii statt, da diese die beste Konservierung der antigenen Epitope des MSP-1 Proteins gewährleisteten. Um einen starken, Antikörperproduktion fördernden Effekt zu erzielen und eine Th2 vermittelte Immunantwort zu induzieren, sollte die zweite und die dritte Immunisierung mit einem gereinigten, heterolog hergestellten MSP-1 Protein erfolgen. Unsere Daten zeigten, dass das aus E. coli gereinigte Protein dabei dem aus Säugertierzellen gewonnenen MSP-1 vorzuziehen ist. Als Adjuvans erscheint das SBAS2 Präparat geeignet. Zur Diskussion steht jedoch die Frage, mit welcher Menge an P. falciparum Merozoiten die Infektion ("challenge") statt finden soll. Egan et al. konnten zeigen, dass bei einer "challenge" mit 10<sup>4</sup> Parasiten drei von vier Aotus Affen geschützt worden sind, während nach der Infektion mit 10<sup>5</sup> Merozoiten nur einer von vier Affen immun wurde (Egan et al., 2000). In den Experimenten Cali 1993 und Cali 1995, in denen sechs von zehn Affen Immunität entwickelten, wurden ebenfalls 10<sup>5</sup> Merozoiten für die Infektion verwendet. Sollte also das geplante Immunisierungsexperiment eine Wiederholung der Cali-Versuche sein, müssten auch diesmal die Affen mit der gleichen Menge von Merozoiten infiziert werden. Wünschenswert wäre jedoch der natürliche Infektionsweg, d.h. die "challenge" durch die Stiche von infizierten Anopheles Mücken, bei dem die Sporozoiten des P. falciparum in einer authentischen Menge injiziert werden.

Im Hinblick auf die geplanten Immunisierungsversuche im Menschen ist der Ansatz der rekombinanten ts-4 Tachyzoiten selbstverständlich nicht denkbar. Als Alternative zieht unser Labor zur Zeit Vaccinia Viren des Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) Stammes als Vektor für das rekombinante MSP-1 Antigen im Betracht (Hochstein-Mintzel *et al.*, 1972). Diese Viren wurden bereits für die Impfung gegen Pocken bei etwa 120 000 Menschen verwendet (Mayr *et al.*, 1978) und zur Zeit werden in unserem Labor rekombinante MVA hergestellt, die das *msp-1d* und seine Fragmente stabil exprimieren (Nicole Westerfeld). Ob diese Viren eine vergleichbar gute Epitopenkonservierung vermitteln können, wird in vorläufigen Immunisierungsexperimenten in Tiermodellen getestet.

### 6.4 MSP-1 und seine Fragmente vermitteln eine erhöhte Bindungsaffinität von rekombinanten *T. gondii* zur menschlichen Erythrozyten

Es gibt mehrere Hinweise dafür, dass das MSP-1 Protein eine Rolle bei dem Erkennungsund/oder Invasionsprozess von Erythrozyten durch die Merozoiten spielt. So wurde gezeigt, dass das MSP-1 in seiner nicht-prozessierten Form an sialinsäurehaltige Rezeptoren der Erythrozyten bindet (Perkins and Rocco, 1988) und dass anti-MSP-1 Antikörper die Invasion der Merozoiten *in vitro* inhibieren (Blackman et al., 1991; Pirson and Perkins, 1985; Su *et al.*, 1993). Erst kürzlich wurde eine neue Region innerhalb des MSP-38 Fragments vorgeschlagen, die spezifisch an menschliche Erythrozyten binden soll und ebenfalls deren Invasion inhibiert (Nikodem and Davidson, 2000).

Die Invasion der Erythrozyten durch *Plasmodium* ssp. ist ein hoch spezifisches Prozess, der im Wesentlichen in folgende Schritte unterteilt werden kann (für Übersicht siehe Bannister *et al.*, 1990, Coppel *et al.*, 1998a). Der Merozoit bindet zuerst reversibel an einer beliebigen Stelle auf der Oberfläche des Erythrozyten. Danach kommt es zu einer raschen Reorientierung, nach der das apikale Ende des Parasiten zu der Plasmamembran der Wirtszelle hin positioniert ist (ein irreversibel Schritt). Zum gleichen Zeitpunkt wird der Inhalt von spezialisierten Organellen – Rhoptrien und Mikronemen – freigesetzt; für einige der freigesetzten Proteine wurde die Rolle als ein Ligand für den Invasionsprozess nachgewiesen (Sim *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1979). Schließlich wird eine Verbindung, sog. "junction" von beiden Oberflächen ausgebildet und der Parasit ist nun in der Lage, in den Erythrozyten einzudringen.

Es ist naheliegend, dass der erste Kontakt mit der Erythrozytenoberfläche durch Antigene vermittelt wird, die mit der Plasmamembran des freien Merozoiten assoziiert sind. Viele dieser Proteine sind identifiziert worden (Übersicht siehe: Coppel *et al.*, 1998a); das MSP-1 ist das prominenteste unter ihnen. Die Tatsache, dass alle Versuche das *msp-1* Gen funktionell zu inaktivieren (z. B. durch einen "Knock-out") soweit fehlgeschlagen haben, deutet auf eine essentielle Funktion des MSP-1 Proteins hin. Wir halten es für denkbar, dass das MSP-1 ein Ligand für einen noch nicht definierten Rezeptor ist, der den primären Kontakt bzw. die Erkennung des Erythrozyten als ein Ziel für die Invasion ermöglicht.

Die Ergebnisse aus unseren Bindungsexperimenten zwischen rekombinanten *T. gondii* und menschlichen Erythrozyten verstärkten unsere Vermutung. Den ersten Hinweis ergab die mikroskopische Analyse von ß-Galaktosidase positiven Tg190Tg Parasiten: eine signifikante Anzahl dieser Tachyzoiten assoziierte zu einem Parasit/Erythrozyt-Komplex auf einer Art und Weise, wie es bei der MSP-1 negativen Kontrolle nicht beobachtet wurde. Die bei solchen Paaren beobachtete ß-Galaktosidase Färbung des Erythrozyten kann nicht durch eine einfache Diffusion des Proteins erklärt werden. Eine identische Analyse von *lacZ* positiven *T. gondii* Parasiten resultiert nicht in einer positiven ß-Gal-Färbung der parasitophoren Vakuole oder der Wirtszelle (D. Soldati, persönliche Mitteilung). Anderseits können wir nicht ausschließen, dass es sich bei unserer Beobachtung um einen Lichteffekt handelte, der durch das unterschiedliche Difraktionsmuster (verursacht z. B. durch räumliche Überlappung des Erythrozyten mit dem Parasit) bei solchen Komplexen entstanden ist. Bei der indirekten Immunfluoreszenzanalyse dieser Bindungsexperimente mit dem anti-ß-Gal Antikörper wurde kein positives Signal innerhalb des Erythrozyten festgestellt, was jedoch auch auf eine zu niedrige Konzentration des Proteins zurückgeführt werden kann.

Die Analyse der entstandenen Parasit/Erythrozyt Paare unter dem Mikroskop erlaubte keine Aussage über die Art der Assoziation. Obwohl verschiedene Arten - von einer seitlichen oder gerichteten Interaktion bis zur der räumlichen Überlappung beider Partner – beobachtet wurden, kann nur eine zukünftige, elektronmikroskopische Analyse solcher Komplexe die Frage nach der tatsächlichen Interaktion beantworten.

Die Daten, die wir durch die Analyse der Bindungsexperimente mittels Durchflusszytometrie gewonnen haben, erlaubten uns einen Eindruck über die Effizienz dieser Parasit/Erythrozyt Assoziation zu gewinnen. Unsere Annahme, dass ein Doppelfluoreszenz-Ereignis einem Parasit/Erythrozyt-Paar entspricht, konnten wir durch die Isolierung und anschließende mikroskopische Analyse dieser Zellpopulation bestätigen (siehe unten).

Die Bildung von Parasit/Erythrozyt Komplexen, die bei dem MSP-1 negativen Kontrollansatz beobachtet wurde, führen wir auf eine unspezifische Interaktion des *T. gondii* mit den Erythrozyten zurück, die nicht durch eine Modifikation der parasitären Plasmamembran zustande kam. Um einen Vergleich der analysierten *T. gondii* Linien bezüglich ihrer Affinität mit den Erythrozyten zu assoziieren zu ermöglichen, haben wir diesen Wert gleich "1" gesetzt. Wir konnten zeigen, dass die transgenen Parasiten, die entweder das PvDBPII oder das MSP-F42 bzw. MSP-190F Protein auf der Oberfläche tragen, mit einer um den Faktor 2-3 höheren Affinität an die menschlichen Erythrozyten binden bzw. mit denen assoziieren. Die stärkste Affinität wurde bei den 19/GFP Parasiten gemessen (Faktor 2,7-3,4).

Wir halten die gemessen Werte für einen weiteren Hinweis für die vermutete Rolle des MSP-1 Proteins und/oder seiner Regionen bei dem Invasionsprozess. Die Tatsache, dass wir keine grundlegenden Unterschiede in der Bildung von Komplexen mit den verschiedenen MSP-1 positiven *T. gondii* Linien festgestellt hatten, kann folgende Ursachen haben.

Zum einen wissen wir aus unseren früheren Experimenten (siehe 6.2), dass die Produktionsrate der rekombinanten Proteine in den hier getesteten Linien unterschiedlich hoch ist (MSP-F19 > MSP-190F > MSP-F42). Es kann also die Dichte des für die Erkennung seines putativen Rezeptors zur Verfügung stehenden Proteins auf der Oberfläche des *T. gondii* sein, die bei der Bildung der Komplexe limitierend wirkt.

Zum anderen können wir nicht ausschließen, dass die Assoziation von MSP-1 positiven *T. gondii* Linien auf das C-terminale Fragment zurückzuführen ist, das in allen drei analysierten Linien durch Prozessierung entsteht. Wie haben jedoch keinen endgültigen Beweis dafür, dass es sich bei den Linien 190/GFP und 42/GFP um das MSP-F19 Prozessierungsprodukt handelt (siehe 6.2.5). Um seine Rolle bei der Assoziation mit den Erythrozyten zu erläutern, müssten rekombinante *T. gondii* Parasiten hergestellt werden, die keine Kodierungssequenz für dieses

Fragment exprimieren. Von besonderem Interesse sind solche Konstrukte, die für das Gesamtlänge Protein ohne das C-terminale MSP-F19 Fragment und für das MSP-F38 kodieren, das kürzlich als das Protein mit der Erythrozyten-bindenden Region vorgeschlagen wurde (Nikodem and Davidson, 2000).

Es ist auch denkbar, dass das MSP-1 erst in seiner prozessierten Form, d. h. erst als ein Protein-Komplex – möglicherweise in Assoziation mit weiteren Proteinen wie das p22 und p36 eine effiziente Bindung an die Erythrozyten vermitteln kann. Da diese Modifikation in *T. gondii* nicht vorliegt, mißt man möglicherweise nur eine stark reduzierte Bindungsfähigleit.

Die mikroskopische Analyse der isolierten, doppel-fluoreszenzpositiven Zellpopulation führte zu einem unerwarteten Befund. Mit einem signifikanten Unterschied zu der Negativ-Kontrolle wurde bei einigen der Parasit/Erythrozyt Komplexe, die nach der Inkubation sowohl mit dem MSP-1 positiven wie auch PvDBPII positiven Tachyzoiten isoliert wurden, eine eindeutige, rot-fluoreszierende Markierung des gebundenen Parasiten beobachtet.

Die einfachste Erklärung hierfür wäre ein unspezifischer Einbau der fluoreszierenden Moleküle in die Plasmamembran des Parasiten. DiIC<sub>16</sub> ist jedoch definiert als ein nicht austauschbarer Lipidanalog, da keine spontane Verbreitung von markierten Liposomen in die nicht markierte Membran stattfindet (Struck and Pagano, 1980). Laut Angaben des Herstellers kann es zu einer begrenzten Diffusion des Farbstoffes nur nach einer Zerstörung der Membran kommen. Obwohl wir solche Zerstörung während des Isolierungsprozesses nicht ausschließen können, erscheint eine freie Diffusion oder ein zufälliger Einbau des Farbstoffes in unserem Falle unwahrscheinlich, denn aus der gleichen Zellpopulation isolierte, nicht gebundene Parasiten lassen keine Markierung durch den roten Fluoreszenzfarbstoff erkennen.

Dagegen könnte eine Fusion beider Plasmamembranen, welche die anschließende Verbreitung des fluoreszierenden Moleküls ermöglichen würde, dieses Phänomen erklären. Für solchen Prozess sprechen auch die Daten von Sowers (Sowers, 1985), die eine Verbreitung des DiIC<sub>16</sub> von markierten zu unmarkierten Erythrozyten nur nach einer Fusion beider Zellen in Folge von elektrischen Impulsen belegen. Darüber hinaus konnte Haldar *et al.* demonstrieren, dass DiIC<sub>16</sub> aus markierten Erythrozyten während der Invasion auf das *P. falciparum* übergeht und schließlich im intra-erythrozytären Ring Stadium des Parasiten nachgewiesen werden kann. Für die Autoren war dies ein Hinweis darauf, dass Lipide aus der Plasmamembran des Erythrozyten während der Invasion von dem Parasiten aufgenommen werden (Haldar and Uyetake, 1992).

Zusammenfassend weisen unsere Daten daraufhin, dass die rekombinanten *T. gondii* mit der Oberfläche des Erythrozyten, wenn auch nicht sehr effizient, fusionieren können. Hierdurch könnte man sich erklären, warum eine positive ß-Galaktosidase Färbung – als Folge der Fusion beider Partner - innerhalb des Erythrozyten beobachtet wird (siehe oben). Da beide Phänomene signifikant häufiger bei den MSP-1 bzw. PvDBPII positiven *T. gondii* Linien zu beobachten waren, wird durch diese Daten die Hypothese, das MSP-1 eine Rolle beim Invasi-

ons-/Erkennungsprozess spielt, verstärkt. Für das PvDBP ist seine Funktion bei der Invasion dokumentiert. Wir haben mit dieser Arbeit weitere Hinweise auf die Bedeutung des MSP-1 aus *P. falciparum* während der Wechselwirkung mit menschlichen Erythrozyten geliefert.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Das Hauptoberflächenprotein 1 (MSP-1) der Merozoiten von *Plasmodium ssp.* wird aus einer Reihe von Gründen als der führende Kandidat für die Entwicklung eines Mehrkomponentenimpfstoffes gegen Malaria angesehen. Das Protein ist hoch immunogen und eine Korrelation zwischen MSP-1 spezifischem Antikörpertiter und schützender Immunantwort konnte sowohl bei einer natürlichen Infektion als auch in Immunisierungsversuchen in Tiermodellen mehrfach nachgewiesen werden. Obwohl seine Funktion *in vivo* noch unklar ist, deuten einige Hinweise auf seine mögliche Rolle bei der Erkennung und/oder Invasion von Erythrozyten durch die Merozoiten hin.

Unserer Arbeitsgruppe ist es erstmals gelungen, eine synthetische Kodierungssequenz des *msp-lf* Gens (vom K1-Prototyp) in *E. coli* stabil zu klonieren und das rekombinante MSP-1 Protein in seiner gesamten Länge sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Expressionssystem herzustellen. Damit wurde die Grundlage für Immunisierungsexperimente mit rekombinantem MSP-1-Material geschaffen, das die vollständige Sequenz des 190kD großen Proteins beinhaltet.

In der vorliegender Arbeit wurden zwei unterschiedliche Projekte bearbeitet, die jedoch das gleiche Ziel verfolgten: (i). die Entstehung der MSP-1 induzierten, humoralen Immunantwort, bzw. die Schutzwirkung eines rekombinanten MSP-1 in einem Tiermodell zu untersuchen und (ii). tiefere Einblicke in die potentielle Funktion des Proteins *in vivo* zu bekommen.

Der erste Teil dieser Arbeit widmete sich zunächst dem Entwurf und der Synthese des *msp-1d* Gens. Die Verfügbarkeit beider Prototypen soll es uns in Zukunft erlauben, sowohl homologe als auch heterologe Immunisierungsversuche in Tiermodellen und an Freiwilligen durchzuführen.

Die folgenden drei Abschnitte beschäftigten sich mit dem zweiten Projekt, nämlich der Etablierung von *Toxoplasma gondii* als ein Modellorganismus zur Herstellung von rekombinantem MSP-1 und seinen C-terminalen Fragmenten. Durch die Verwendung von unterschiedlichen Transportsignalsequenzen konnten die Proteine auf der Oberfläche von *T. gondii* lokalisiert werden. Die Analyse dieser Proteine bezüglich ihrer posttranslationellen Modifikationen und der immunogenen Eigenschaften ihrer Epitope bestätigte unser Vorhaben, das in *T. gondii* hergestellte MSP-1 für Immunisierungsstudien in Tiermodellen einzusetzen. Das rekombinante MSP-1 konnte aus *T. gondii* in seiner gesamten Länge guter Qualität aufgereinigt werden; dieses System eignete sich jedoch nicht für eine präparative Produktion. Deshalb wurde für die Immunisierungsversuche hauptsächlich eine attenuierte, transgene *T. gondii*-Mutante als ein lebender Träger des rekombinanten MSP-1 verwendet. Dabei konnten die Avirulenz dieses *T. gondii* Stammes als auch die Fähigkeit des auf diese Art und Weise präsentierten MSP-1, eine starke humorale Immunantwort im Maus- und Affen-Modell zu induzieren, nachgewiesen werden.

Obwohl in dem anschließenden Immunisierungsexperiment in *Aotus*-Affen kein ausreichender Schutz gegen die Infektion mit *P. falciparum* erreicht werden konnte, erlaubten uns die aus diesem Versuch gewonnen Daten ein besseres Verständnis für die Entwicklung der induzierten, humoralen Immunantwort zu gewinnen. Auf der Basis dieser Ergebnisse konnte ein neues Immunisierungsprotokoll entwickelt werden.

Abschließend wurden die MSP-1 transgenen *T. gondii*-Linien auf ihre Bindungsaffinität zu menschlichen Erythrozyten hin analysiert. In zwei unterschiedlichen Ansätzen konnte ich zeigen, dass die Linien, die das MSP-1 und seine Fragmente auf der Oberfläche präsentieren eine erhöhte Affinität für die Plasmamembran der Erythrozyten besitzen. Dies wurde als ein wichtiger Hinweis auf die mögliche Rolle des MSP-1 bei dem Erkennungs- und/oder Invasionsprozess interpretiert.

#### **8. LITERATUR**

Adams, J. H., Hudson, D. E., Torii, M., Ward, G. E. Wellems, T. E., Aikawa, M., Miller, L. H. (1990). The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell.* **63** (1), 141-53.

Ammassari, A., Murri, R., Cingolani, A., De Luca, A. and Antinori, A. (1996). AIDS-associated cerebral toxoplasmosis: an update on diagnosis and treatment. *Curr Top Microbiol Immunol.* **219**, 209-22.

Anders, R. F., Crewther, P. E., Edwards, S., Margetts, M., Matthew, M. L., Pollock, B. and Pye, D. (1998). Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with Plasmodium chabaudi. *Vaccine*. **16**, 240-7.

Aribot, G., Rogier, C., Sarthou, J. L., Trape, J. F., Balde, A. T., Druilhe, P. and Roussilhon, C. (1996). Pattern of immunoglobulin isotype response to Plasmodium falciparum blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa). *Am J Trop Med Hyg.* **54**, 449-57.

Aucan C., Traore, Y., Tall, F., Nacro, B., Traore-Leroux, T., Fumoux, F. and Rihet, P. (2000). High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun.* **68**, 1252-8.

Ballou, W. R., Hoffman, S. R., Sherwood, J. A., Hollingdale, M. R., Neva, F. H., Hockmeyer, W. T., Gordon, D. M., Wirtz, R. A., Schneider, I., Wasserman, G. F., Young, J. F., Diggs, C. L., Reeve, P. and Chulay, J. D. (1987). Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *Lancet.* **1**, 1277-1281.

Bangs, J. D., Ransom, D. M., McDowell, M. A. and Brouch, E. M. (1997). Expression of bloodstream variant surface glycoproteins in procyclic stage Trypanosoma brucei: role of GPI anchors in secretion. *Embo J.* **16**, 4285-94.

Bannister, L. H. and Dluzewski, A. R. (1990). The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells.* **16**, 257-92; discussion 293-7.

Barale, J. C., Blisnick, T., Fujioka, H., Alzari, P. M., Aikawa, M., Braun-Breton, C. and Langsley, G. (1999). Plasmodium falciparum subtilisin-like protease 2, a merozoite candidate for the merozoite surface protein 1-42 maturase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 6445-50.

Baruch, D. I., Pasloske, B. L., Singh, H. B., Bi, X., Ma, X. C., Feldman, M., Taraschi, T. F. and Howard, R. J. (1995). Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes [see comments]. *Cell.* **82**, 77-87 issn: 0092-8674.

Bastin, P., Bagherzadeh, Z., Matthews, K. R. and Gull, K. (1996). A novel epitope tag system to study protein targeting and organelle biogenesis in Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol.* **77**, 235-9.

Berendt, A. R., Simmons, D. L., Tansey, J., Newbold, C. I. and Marsh, K. (1989). Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for Plasmodium falciparum. *Nature*. **341**, 57-9.

Berzins, K. a. Perlman., P (1996). Malaria Vaccines: Attacking infected Erythrocyte. In *Malaria Vaccine Development* (ed. S. L. Hoffman), vol. pp. 105-144. Washington, D. C.

Berzins, K., Perlmann, H., Wahlin, B., Ekre, H. P., Hogh, B., Petersen, E., Wellde, B., Schoenbechler, M., Williams, J., Chulay, J. and et al. (1991). Passive immunization of Aotus monkeys with human antibodies to the Plasmodium falciparum antigen Pf155/RESA. *Infect Immun.* **59**, 1500-6.

Birnboin, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-23.

Black, M., Seeber, F., Soldati, D., Kim, K. and Boothroyd, J. C. (1995). Restriction enzyme-mediated intergration elevates trabusformation frequencey and enables co-transfection of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **74**, 55-63.

Blackman, M. J. and Holder, A. A. (1992). Secondary processing of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 (MSP1) by a calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP133 as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSP1. *Mol Biochem Parasitol.* **50**, 307-15.

Blackman, M. J., Chappel, J. A., Shai, S. and Holder, A. A. (1993). A conserved parasite serine protease processes the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1. *Mol Biochem Parasitol.* **62**, 103-14.

Blackman, M. J., Fujioka, H., Stafford, W., Sajid, M., Clough, B., Fleck, S. L., Aikawa, M., Grainger, M. and Hackett, F. (1998). A subtilisin-like protein in secretory organelles of plasmodium falciparum merozoites [In Process Citation]. *J Biol Chem.* **273**, 23398-409.

Blackman, M. J., Heidrich, H. G., Donachie, S., McBride, J. S. and Holder, A. A. (1990). A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J. Exp. Med.* **172**, 379-382.

Blackman, M. J., Ling, I. T., Nicholls, S. C. and Holder, A. A. (1991a). Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**, 29-33.

Blackman, M. J., Scott-Finnigan, T. J., Shai, S. and Holder, A. A. (1994). Antibodies inhibit the proteasemediated processing of a malaria merozoite surface protein. *J Exp Med.* **180**, 389-93.

Blackman, M. J., Whittle, H. and Holder, A. A. (1991). Processing of the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein-1: identification of a 33-kilodalton secondary processing product which is shed prior to erythrocyte invasion. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**, 35-44.

Boothroyd, J. C., Kim, K., Pfefferkorn, E. R., Sibley, L. D. and Soldati, D. (1994). Forward and reverse genetics in the study of the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods in Molecular Genetics*. **3**,

Boothroyd, J. C., Kim, K., Sibley, D. and Soldati, D. (1995). Toxoplasma as a paradigm for the use of genetics in the study of protozoan parasites. *Mol. Appr. to Parasitol.* 211-225.

Borre, M. B., Dziegiel, M., Hogh, B., Petersen, E., Rieneck, K., Riley, E., Meis, J. F., Aikawa, M., Nakamura, K., Harada, M. and et al. (1991). Primary structure and localization of a conserved immunogenic Plasmodium falciparum glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Mol Biochem Parasitol.* **49**, 119-31.

Bouharoun-Tayoun, H. and Druilhe, P. (1992). *Plasmodium falciparum* malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. *Infect. Immun.* **60**, 1473-1481.

Bouharoun-Tayoun, H., Attanath, P., Sabchareon, A., Chongsuphajaisiddhi, T. and Druilhe, P. (1990). Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J. Exp. Med.* **172**, 1633-1641.

Boyle, J. S. a. L., A. M. (1995). An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. Trends-Genet. 11,

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**, 248-54.

Brecht, S., Erdhart, H., Soete, M. and Soldati, D. (1999). Genome engineering of Toxoplasma gondii using the site-specific recombinase Cre. *Gene.* 234, 239-47.

Brooks, R. G., Remington, J. S., Luft, B. J. (1987). Drugs used in the treatment of Toxoplasmosis. *Abtimicr. Agents Annu.*, 2, 297-306.

Brown, J., Whittle, H. C., Berzins, K., Howard, R. J., Marsh, K. and Sjoberg, K. (1986). Inhibition of *Plasmodi-um falciparum* growth by IgG antibody produced by human lymphocytes transformed with Epstein-Barr virus. *Clin. Exp. Immunol.* **63**, 135-140.

Brusca, J. S. and Radolf, J. D. (1994). Isolation of integral membrane proteins by phase partitioning with Triton X-114. *Methods Enzymol.* **228**, 182-93.

Burg, J. L., Perelman, D., Kasper, L. H., Ware, P. L. and Boothroyd, J. C. (1988). Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of Toxoplasma gondii. *J-Immunol.* **141**, 3584-91 issn: 0022-1767.

Burghaus, P. A., Gerold, P., Pan, W., Schwarz, R. T., Lingelbach, K. and Bujard, H. (1999). Analysis of recombinant merozoite surface protein-1 of Plasmodium falciparum expressed in mammalian cells. *Mol Biochem Parasitol.* **104**, 171-83.

Burghaus, P. A., Wellde, B. T., Hall, T., Richards, R. L., Egan, A. F., Riley, E. M., Ballou, W. R. and Holder, A. A. (1996). Immunization of Aotus nancymai with recombinant C terminus of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 in liposomes and alum adjuvant does not induce protection against a challenge infection. *Infect Immun.* **64**, 3614-9.

Buxton, D., Thomson, K., Maley, S., Wright, S. and Bos, H. J. (1991). Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of Toxoplasma gondii and their immunity to challenge when pregnant. *Vet Rec.* **129**, 89-93.

Carruthers, V. B. and Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* **73**, 114-23.

Carter, R., Mendis, K. N., Miller, L. H., Molineaux, L. and Saul, A. (2000). Malaria transmission-blocking vaccines--how can their development be supported? *Nat Med.* **6**, 241-4.

Certa, U., Rotmann, D., Matile, H. and Reber-Liske, R. (1987). A naturally occurring gene encoding the major surface antigen precursor p190 of *Plasmodium falciparum* lacks tripeptide repeats. *EMBO J.* **6**, 4137-4142.

Chang, S. P., Case, S. E., Gosnell, W. I., Hashimoto, A., Kramer, K. J., Tam, L. Q., Hashiro, C. Q., Nikaido, K. M., Gibson, H. L., Lee-Ng, C. T., Barr, P. J., Yokota, B. T. and Hui, G. S. N. (1996). A recombinant Baculovirus 42-Kilodalton C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 protects *Aotus* monkeys against malaria. *Inf. and Immun.* **64**, 253-261.

Chang, S. P., Kramer, K. J., Yamaga, K. M., Kato, A., Case, S. E. and Siddiqui, W. A. (1988). *Plasmodium falciparum*: gene structure and hydropathy profile of the major merozoite surface antigen (gp190) of the Uganda-Palo Alto isolate. *Exp. Parasitol.* **67**, 1-11.

Chappel, J. A. and Holder, A. A. (1993). Monoclonal antibodies that inhibit Plasmodium falciparum invasion in vitro recognise the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1. *Mol Biochem Parasitol.* **60**, 303-11.

Charoenvit, Y., Collins, W. E., Jones, T. R., Millet, P., Yuan, L., Campbell, G. H., Beaudoin, R. L., Broderson, J. R. and Hoffman, S. L. (1991). Inability of malaria vaccine to induce antibodies to a protective epitope within its sequence. *Science*. **251**, 668-671.

Chitarra, V., Holm, I., Bentley, G. A., Petres, S. and Longacre, S. (1999). The crystal structure of C-terminal merozoite surface protein 1 at 1.8 A resolution, a highly protective malaria vaccine candidate. *Mol Cell.* **3**, 457-64.

Chitnis, C. E. and Miller, L. H. (1994). Identification of the erythrocyte binding domains of Plasmodium vivax and Plasmodium knowlesi proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med.* **180**, 497-506.

Clarke, L. E., Tomley, F. M., Wisher, M. H., Foulds, I. J. and Boursnell, M. E. (1990). Regions of an *Eimeria tenella* antigen contain sequences which are conserved in circumsporozoite proteins from *Plasmodium spp.* and which are related to the thrombospondin gene family. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**, 269-279.

Clyde, D. F., McCarthy, V. C., Miller, R. M. and Woodward, W. E. (1975). Immunization of man against *falciparum* and *vivax* malaria by use of attenuated sporozoites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **24**, 397-401.

Clyde, D. F., Most, H., McCarthy, V. C. and Vanderberg, J. P. (1973). Immunization of man against sporozoiteinduced *falciparum* malaria. *Am. J. Med. Sci.* **266**, 169-177.

Cohen, S., McGregor, I. A. and Carrington, S. C. (1961). Gamma globulin and acquired immunity to malaria. *Nature*. **192**, 733-737.

Collins, W. E., Pye, D., Crewther, P. E., Vandenberg, K. L., Galland, G. G., Sulzer, A. J., Kemp, D. J., Edwards, S. J., Coppel, R. L., Sullivan, J. S. and et al. (1994). Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of Plasmodium fragile. *Am J Trop Med Hyg.* **51**, 711-9.

Cooper, J. A. (1993). Merozoite Surface Antigen-1 of Plasmodium. Parasitol. Today. 9, 50-54.

Cooper, J. A. and Bujard, H. (1992a). Membrane-associated proteases process *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-1 (MSA1) to fragment gp41. *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**, 151-160. Cooper, J. A., Cooper, L. T. and Saul, A. J. (1992b). Mapping of the region predominantly recognized by anti-

bodies to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSA 1. *Mol. Biochem. Parasitol.* **51**, 301-312.

Coppel, R. L., Brown, G. V. and Nussenzweig, V. (1998a). Adhesive proteins of the malaria parasite. *Curr Opin Microbiol.* **1**, 472-81.

Crewther, P. E., Matthew, M. L., Flegg, R. H. and Anders, R. F. (1996). Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of Plasmodium chabaudi involve recognition of strain-specific epitopes. *Infect Immun.* **64**, 3310-7.

Daly, T. M. and Long, C. A. (1993). A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii yoelii* 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice. *Infect. Immun.* **61**, 2462-7.

Dame, J. B., Williams, J. L., McCutchan, T. F., Weber, J. L., Wirtz, R. A., Hockmeyer, W. T., Maloy, W. L., Haynes, J. D., Schneider, I., Roberts, D., Sanders, G. S., Reddy, E. P., Diggs, C. L. and Miller, L. H. (1984). Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. **225**, 593-599.

Deans, J. A. (1984). Protective antigens of bloodstage Plasmodium knowlesi parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **307**, 159-69.

Deans, J. A., Knight, A. M., Jean, W. C., Waters, A. P., Cohen, S. and Mitchell, G. H. (1988). Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, Plasmodium knowlesi 66 kD merozoite antigen. *Parasite Immunol.* **10**, 535-52.

del Portillo, H. A., Longacre, S., Khouri, E. and David, P. H. (1991). Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 4030-4034.

Deleersnijder, W., Hendrix, D., Bendahman, N., Hanegreefs, J., Brijs, L., Hamers, C. C. and Hamers, R. (1990). Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the major merozoite surface antigen of *Plasmodium chabaudi IP-PC1*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **43**, 231-244.

Delplace, P., Fortier, B., Tronchin, G., Dubremetz, J. F. and Vernes, A. (1987). Localization, biosynthesis, processing and isolation of a major 126 kDa antigen of the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **23**, 193-201.

Denkers, E. Y. and Gazzinelli, R. T. (1998). Regulation and function of T-cell-mediated immunity during Toxoplasma gondii infection. *Clin Microbiol Rev.* **11**, 569-88.

Desmonds, G. and J, C. (1974). Congenital Toxoplasmosis. A prospective Study of 378 pregnancies. *N Engl J Med.* **290**, 1110-1116.

Desowitz, R. S. (1991). The malaria capers: more tales of parasites and people, research and reality. (ed. pp. 288. New York: W. W. Norton & Company.

Dessens, J. T., Beetsma, A. L., Dimopoulos, G., Wengelnik, K., Crisanti, A., Kafatos, F. C. and Sinden, R. E. (1999). CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *Embo J.* **18**, 6221-7.

Devereux, J., Haeberli, P. and Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-95.

Dieckmann-Schuppert, A., Bause, E. and Schwarz, R. T. (1994). Glycosylation reactions in Plasmodium falciparum, Toxoplasma gondii, and Trypanosoma brucei brucei probed by the use of synthetic peptides. *Biochim Biophys Acta*. **1199**, 37-44.

Dobrowolski, J. and Sibley, L. D. (1997). The role of the cytoskeleton in host cell invasion by Toxoplasma gondii. *Behring Inst Mitt.* **99**, 90-6.

Dodoo, D., Theander, T. G., Kurtzhals, J. A., Koram, K., Riley, E., Akanmori, B. D., Nkrumah, F. K. and Hviid, L. (1999). Levels of antibody to conserved parts of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 in Ghanaian children are not associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun.* **67**, 2131-7.

Donald, R. G. and Roos, D. S. (1995). Insertional mutagenesis and marker rescue in a protozoan parasite: cloning of the uracil phosphoribosyltransferase locus from Toxoplasma gondii. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**, 5749-53.

Donald, R. G. K. and Roos, D. S. (1993). Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable markerDHFR-TS marker based on drug resistance mutations in malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 11703-11707.

Donald, R., Carter, D., Ullman, B. and Roos, D. S. (1996). Insertional tagging, cloning, and expression of the Toxoplasma gondii hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. *J Biol Chem.* **271**, 14010-9.

Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W. and Liu, M. A. (1997). DNA vaccines. Annu Rev Immunol. 15, 617-48.

Doolan, D. L., Sedegah, M., Hedstrom, R. C., Hobart, P., Charoenvit, Y. and Hoffman, S. L. (1996a). Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD8+ cell-, interferon gamma-, and nitric oxide-dependent immunity. *J Exp Med.* **183**, 1739-46.

Dower, W. J., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic-Acids-Res.* **16**, 6127-45 issn: 0305-1048.

Dubey, J. P. (1977). Toxoplasma, Hammondia, Besnoita, Sarcocystis, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In *Parasitic Protozoa* (ed. J. P. Kreier), pp. 101-237. New York: Academic Press.

Dubey, J. P., Miller, N. L. and Frenkel, J. K. (1970). Toxoplasma gondii life cycle in cats. *J Am Vet Med Assoc*. **157**, 1767-70.

Egan, A. F., Blackman, M. J. and Kaslow, D. C. (2000). Vaccine efficacy of recombinant Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 in malaria-naive, -exposed, and/or -rechallenged Aotus vociferans monkeys. *Infect Immun.* **68**, 1418-27.

Egan, A. F., Chappel, J. A., Burghaus, P. A., Morris, J. S., McBride, J. S., Holder, A. A., Kaslow, D. C. and Riley, E. M. (1995). Serum antibodies from malaria-exposed people recognize conserved epitopes formed by the two epidermal growth factor motifs of MSP1(19), the carboxy-terminal fragment of the major merozoite surface protein of Plasmodium falciparum. *Infect Immun.* **63**, 456-66.

Egan, A. F., Morris, J., Barnish, G., Allen, S., Greenwood, B. M., Kaslow, D. C., Holder, A. A. and Riley, E. M. (1996). Clinical immunity to Plasmodium falciparum malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. *J Infect Dis.* **173**, 765-9.

Egan, J. E., Weber, J. L., Ballou, W. R., Hollingdale, M. R., Majarian, W. R., Gordo, D. M., Maloy, W. L., Hoffman, S. L., Wirtz, D. A., Schneider, I., Woolett, G. R., Young, J. F. and Hockmeyer, W. T. (1987). Efficacy of murine malaria sporozoite vaccines: implications for human vaccine development. *Science*. **236**, 453-456.

Egnell, P. and Flock, J. I. (1992). The autocatalytic processing of the subtilisin Carlsberg pro-region is independent of the primary structure of the cleavage site. *Mol Microbiol.* **6**, 1115-9.

Engers, H. D., Godal, T. (1998). Malaria Vaccine Development: current status. Parasitology today. 14, 54-56.

Escajadillo, A. a. F., J.K. (1991). Experimental toxoplasmosis and vaccine tests in Aotus monkeys. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**, 182-189.

Etlinger, H. M., Caspers, P., Matile, H., Schoenfeld, H.-J., Stüber, D. and Takacs, B. (1991). Ability of recombinant or native proteins to protect monkeys against heterologous challenge with *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* **59**, 3498-3503.

Fandeur, T., Dubois, P., Gysin, J., Dedet, J. P. and da Silva, L. P. (1984). In vitro and in vivo studies on protective and inhibitory antibodies against Plasmodium falciparum in the Saimiri monkey. *J Immunol.* **132**, 432-7.

Fell, A. H., Currier, J. and Good, M. F. (1994). Inhibition of Plasmodium falciparum growth in vitro by CD4+ and CD8+ T cells from non-exposed donors. *Parasite Immunol.* **16**, 579-86.

Ferguson, M. A. and Williams, A. F. (1988). Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu Rev Biochem.* 57, 285-320.

Foley, M., Tilley, L., Sawyer, W. H. and Anders, R. F. (1991). The ring-infected erythrocyte surface antigen of Plasmodium falciparum associates with spectrin in the erythrocyte membrane. *Mol Biochem Parasitol.* **46**, 137-47.

Frenkel, J. K. (1980). Pathophysiology of toxoplasmosis. Parasitology today. 4, 273-278-

Frenkel, J. K. (1970). Pursuing toxoplasma. J Infect Dis. 122, 553-9.

Früh, K., Doumbo, O., Müller, H.-M., Koita, O., McBride, J., Crisanti, A., Touré, Y. and Bujard, H. (1991). Human antibody response to the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* is strain specific and short-lived. *Infect. Immun.* **59**, 1319-1324.

Fuerst, T. R., de la Cruz, V. F., Bansal, G. P. and Stover, C. K. (1992). Development and analysis of recombinant BCG vector systems. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **8**, 1451-5.

Futerman, A. H., Fiorini, R. M., Roth, E., Low, M. G. and Silman, I. (1985). Physicochemical behaviour and structural characteristics of membrane-bound acetylcholinesterase from Torpedo electric organ. Effect of phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem-J.* **226**, 369-77 issn: 0264-6021.

Gerold, P., Schofield, L., Blackman, M. J., Holder, A. A. and Schwarz, R. T. (1996). Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol.* **75**, 131-43.

Gibson, H. L., Tucker, J. E., Kaslow, D. C., Krettli, A. U., Collins, W. E., Kiefer, M. C., Bathurst, I. C. and Barr, P. J. (1992). Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **50**, 325-333.

Good, M. F. and Doolan, D. L. (1999). Immune effector mechanisms in malaria. Curr Opin Immunol. 11, 412-9.

Good, M. F., Kaslow, D. C. and Miller, L. H. (1998). Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. *Annu Rev Immunol.* **16**, 57-87.

Goonewardene, R., Daily, J., Kaslow, D., Sullivan, T. J., Duffy, P., Carter, R., Mendis, K. and Wirth, D. (1993). Transfection of the malaria parasite and expression of firefly luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**, 5234-6.

Gowda, D. C. and Davidson, E. A. (1999). Protein glycosylation in the malaria parasite. *Parasitol Today*. 15, 147-52.

Grau, G. E., Piguet, P. F., Vassalli, P. and Lambert, P. H. (1989). Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. *Immunol Rev.* **112**, 49-70.

Gribskov, M. Devereux, J. and Burgess, R. R. (1984). The codon preference plot: graphic analysis of protein coding sequences and prediction of gene expression. *Nucleic Acids Res.* **12**, 539-49.

Groux, H. and Gysin, J. (1990). Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses. *Res. Immunol.* **141**, 529-542.

Haldar, K. and Uyetake, L. (1992). The movement of fluorescent endocytic tracers in Plasmodium falciparum infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol.* **50**, 161-77.

Haldar, K., Ferguson, M. and Cross, G. (1985). Acylation of a *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen via *sn*-1,2-diacyl glycerol. *J. Biol. Chem.* **260**, 4969-4974.

Heidrich, H. G., Miettinen, B. A., Eckerskorn, C. and Lottspeich, F. (1989). The N-terminal amino acid sequences of the *Plasmodium falciparum* (FCB1) merozoite surface antigens of 42 and 36 kilodalton, both derived from the 185-195-kilodalton precursor. *Mol Biochem Parasitol.* **34**, 147-54.

Helmby, H., Cavelier, L., Pettersson, U. and Wahlgren, M. (1993). Rosetting *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes express unique strain-specific antigens on their surface. *Infect. Immun.* **61**, 284-288.

Herrera, S., Herrera, M. A., Corredor, A., Rosero, F., Clavijo, C. and Guerrero, R. (1992). Failure of a synthetic vaccine to protect *Aotus lemurinus* against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **47**, 682-690.

Herrera, S., Herrera, M. A., Perlaza, B. L., Burki, Y., Caspers, P., Dobeli, H., Rotmann, D. and Certa, U. (1990). Immunization of *Aotus* monkeys with *Plasmodium falciparum* blood-stage recombinant proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4017-4021.

Herrera, S., Rudin, W., Herrera, M., Clavijo, P., Mancilla, L., de, P. C., Matile, H. and Certa, U. (1993). A conserved region of the MSP-1 surface protein of *Plasmodium falciparum* contains a recognition sequence for erythrocyte spectrin. *EMBO J.* **12**, 1607-1614.

Herrington, D. A., Clyde, D. F., Losonsky, G., Cortesia, M., Murphy, J. R., Davis, J., Baqar, S., Felix, A. M., Heimer, E. P., Gillessen, D., Nardin, E., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., Hollingdale, M. R. and Levine, M. M. (1987). Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature*. **328**, 257-259.

Hettmann, C., Herm H., Geiter A., Frank B., Schwarz E., Soldati T. and Soldati D. (2000). A dibasic motif in the tail of a class XIV apicomplexan myosine is an essential determinant of plasmamebrane localisation. *Mol. Biol. Cell*, **11**, (4), 1385-1400.

Hirunpetcharat, C., Tian, J. H., Kaslow, D. C., van Rooijen, N., Kumar, S., Berzofsky, J. A., Miller, L. H. and Good, M. F. (1997). Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1[19]) of Plasmodium yoelii expressed in Saccharomyces cerevisiae: correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effector CD4+ T cells. *J Immunol.* **159**, 3400-11.

Hochstein-Mintzel, V., Huber, H. C. and Stickl, H. (1972). [Virulence and immunogenicity of a modified vaccinia virus (strain MVA) (author's transl)]. Z Immunitatsforsch Exp Klin Immunol. **144**, 104-56. Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. and Stüber, D. (1988). Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Biotechnology*. **6**, 1321-1325.

Hoffman, S. L. a. Miller., L. H. (1996b). Perspectives on Malaria Vaccine Development. In *Malaria Vaccine Development* (ed. S. Hoffman), vol. pp. 1-14. Washington, D.C.:

Hoffman, S. L., Doolan, D. L., Sedegah, M., Wang, R., Scheller, L. F., Kumar, A., Weiss, W. R., Le, T. P., Klinman, D. M., Hobart, P., Norman, J. A. and Hedstrom, R. C. (1997). Toward clinical trials of DNA vaccines against malaria. *Immunol Cell Biol.* **75**, 376-81.

Hoffman, S. L., Franke, E. D., Hollingdale, M. R., Druilhe, P. (1996a). Attacking the infected Hepatocyte. In *Malaria Vaccine Development* (ed. S. L. Hoffman), vol. pp. Washington, D.C:

Hoffman, S. L., Oster, C. N., Plowe, C. V., Woollett, G. R., Beier, J. C., Chulay, J. D., Wirtz, R. A., Hollingdale, M. R. and Mugambi, M. (1987). Naturally acquired antibodies to sporozoites do not prevent malaria: vaccine development implications. *Science*. **237**, 639-642.

Hohmann, E. L., Oletta, C. A., Killeen, K. P. and Miller, S. I. (1996). phoP/phoQ-deleted Salmonella typhi (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. *J Infect Dis.* **173**, 1408-14.

Holder, A. A. (1988a). The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. *Prog. Allergy.* **41**, 72-97.

Holder, A. A. (1996). Preventing Merozoite Invasion of Erythrocyte. In *Malaria Vaccine Development* (ed. S. L. Hoffman), vol. pp. 77-104. Washington, D. C.:

Holder, A. A. and Blackmann, M. J. (1994a). What is the function of MSP-1 on the Malaria Merozoite? *Parasitology Today*. **10**, 182 - 184.

Holder, A. A. and Freeman, R. R. (1981). Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens. *Nature*. **294**, 361-364.

Holder, A. A. and Freeman, R. R. (1982). Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* **156**, 1528-1538.

Holder, A. A., Freeman, R. R. and Nicholls, S. C. (1988). Immunization against *Plasmodium falciparum* with recombinant polypeptides produced in *Escherichia coli*. *Parasite Immunol*. **10**, 607-617.

Holder, A. A., Lockyer, M. J., Odink, K. G., Sandhu, J. S., Riveros-Moreno, V., Nicholls, S. C., Hillman, Y., Davey, L. S., Tizard, M. L. V., Schwarz, R. T. and Freeman, R. R. (1985). Primary structure of the precursor to three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Nature.* **317**, 270-273.

Hollingdale, M. R., Ballou, W. R., Aley, S. B., Young, J. F., Pancake, S., Miller, L. H. and Hockmeyer, W. T. (1987). Plasmodium falciparum: elicitation by peptides and recombinant circumsporozoite proteins of circulating mouse antibodies inhibiting sporozoite invasion of hepatoma cells. *Exp Parasitol.* **63**, 345-51.

Howard, R. J. (1988). Malarial proteins at the membrane of *P. falciparum*-infected erythrocytes and their involvement in cytoadherence to endothelial cells. *Prog. Allergy*. **41**, 98-147.

Howard, R. J. and Gilladoga, A. D. (1989). Molecular studies related to the pathogenesis of cerebral malaria. *Blood.* **74**, 2603-18.

Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., O'Garra, A. and Murphy, K. M. (1995). T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *J Exp Med.* **181**, 713-21.

Hui, G. S. and Hashimoto, C. N. (1998). Pathways for potentiation of immunogenicity during adjuvant-assisted immunizations with Plasmodium falciparum major merozoite surface protein 1. *Infect Immun.* **66**, 5329-36. Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene.* **96**, 23-8.

Institute of Medecine (1991). Malaria - obstacles and opportunities. (ed. S. C. Oaks Jr., V. S. Mitchell, G. W. Pearson and C. C. J. Carpenter), pp. 309. Washington, D.C., USA: National Academy Press.

Israelski, D. M. and Remington, J. S. (1993). Toxoplasmosis in patients with cancer. *Clin Infect Dis.* **17 Suppl 2**, S423-35.

Jadin, J. M. and Creemers, J. (1968). [Ultrastructure and biology of Toxoplasma. 3. Observations on intrae-rythrocytic Toxoplasma in a mammal]. *Acta Trop.* **25**, 267-70.

Jakobsen, P. H., Bate, C. A., Taverne, J. and Playfair, J. H. (1995). Malaria: toxins, cytokines and disease. *Parasite Immunol.* **17**, 223-31.

Jecmik, I. (1996). Expression des Hauptoberflächenantigens gp190 von *Plasmodium falciparum* in *Toxoplasma gondii*. ZMBH.

Jennings, G. J., Toebe, C. S., van Belkum, A. and Wiser, M. F. (1998). The complete sequence of Plasmodium berghei merozoite surface protein-1 and its inter- and intra-species variability. *Mol Biochem Parasitol.* **93**, 43-55.

Kang, Y., Calvo, P. A., Daly, T. M. and Long, C. A. (1998). Comparison of humoral immune responses elicited by DNA and protein vaccines based on merozoite surface protein-1 from Plasmodium yoelii, a rodent malaria parasite. *J Immunol.* **161**, 4211-9.

Kappe, S. H. I., Noe, A. R., Fraser, T. S., Blair, P. L. and Adams, J. H. (1998). A family of chimeric erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 1230-5.

Kappe, S., Bruderer, T., Gantt, S., Fujioka, H., Nussenzweig, V. and Menard, R. (1999). Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J Cell Biol.* **147**, 937-44.

Kaslow, D. C. (1996). Transmission-blocking Vaccines. In *Malaria Vaccine Development* (ed. S. L. Hoffman), vol. pp. 181.

Kasper, L. H. (1987). Isolation and characterization of a monoclonal anti-P30 antibody resistant mutant of Toxoplasma gondii. *Parasite Immunol.* **9**, 433-45.

Kasper, L. H. and Boothroyd, J. C. (1992). *Toxoplasma gondii*: Immunology and molecular biology. In *Immunology and molacular biology of parasites* (ed. K. Warren), pp. 269-301. Oxford: Blackwell.

Keitel, W. A., Kester, K. E., Atmar, R. L., White, A. C., Bond, N. H., Holland, C. A., Krzych, U., Palmer, D. R., Egan, A., Diggs, C., Ballou, W. R., Hall, B. F. and Kaslow, D. (1999). Phase I trial of two recombinant vaccines containing the 19kd carboxy terminal fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 (msp-1(19)) and T helper epitopes of tetanus toxoid. *Vaccine.* **18**, 531-9.

Kim, K., Bulow, R., Kampmeier, J. and Boothroyd, J. C. (1994). Conformationally appropriate expression of the Toxoplasma antigen SAG1 (p30) in CHO cells. *Infect Immun.* **62**, 203-9.

Kim, K., Soldati, D. and Boothroyd, J. C. (1993). Gene replacement in Toxoplasma gondii with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science*. **262**, 911-914.

Knapp, B., Hundt, E. and Kupper, H. A. (1989). A new blood stage antigen of Plasmodium falciparum transported to the erythrocyte surface. *Mol Biochem Parasitol.* **37**, 47-56.

Kocken, C. H., Hundt, E., Knapp, B., Brazel, D., Enders, B., Narum, D. L., Wubben, J. A. and Thomas, A. W. (1998). Immunization of Aotus monkeys with recombinant Plasmodium falciparum hybrid proteins does not reproducibly result in protection from malaria infection. *Infect Immun.* **66**, 373-5.

Kumar, S., Collins, W., Egan, A., Yadava, A., Garraud, O., Blackman, M. J., Guevara Patino, J. A., Diggs, C. and Kaslow, D. C. (2000). Immunogenicity and efficacy in aotus monkeys of four recombinant Plasmodium

falciparum vaccines in multiple adjuvant formulations based on the 19-kilodalton C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect Immun.* **68**, 2215-23.

Kumar, S., Yadava, A., Keister, D. B., Tian, J. H., Ohl, M., Perdue-Greenfield, K. A., Miller, L. H. and Kaslow, D. C. (1995). Immunogenicity and in vivo efficacy of recombinant Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 in Aotus monkeys. *Mol Med.* **1**, 325-32.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-5.

Laurence, D. J. R. and Gusterson, B. A. (1990). The epidermal growth factor. Tumor Biol. 11, 229-261.

Laveran, A. (1880). Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs malades attiends de fièvre palustre. *Bull. Med. Soc. Med. Hosp. Paris.* **17**, 158-164.

Lew, A. M., Langford, C. J., Anders, R. F., Kemp, D. J., Saul, A., Fardoulys, C., Geysen, M. and Sheppard, M. (1989). A protective monoclonal antibody recognizes a linear epitope in the precursor to the major merozoite antigens of *Plasmodium chabaudi adami*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**, 3768-3772.

Lewis, A. P. (1989). Cloning and analysis of the gene encoding the 230-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium yoelii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **36**, 271-282.

Ling, I. T., Ogun, S. A. and Holder, A. A. (1994). Immunization against malaria with a recombinant protein. *Parasite Immunol.* **16**, 63-7.

Ling, I. T., Ogun, S. A., Momin, P., Richards, R. L., Garcon, N., Cohen, J., Ballou, W. R. and Holder, A. A. (1997). Immunization against the murine malaria parasite Plasmodium yoelii using a recombinant protein with adjuvants developed for clinical use. *Vaccine*. **15**, 1562-7.

Lingelbach, K. and Joiner, K. A. (1998). The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci.* **111**, 1467-75.

Luft, B. J. and Remington, J. S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin-Infect-Dis.* 15, 211-22 issn: 1058-4838.

Lutz, R. and Bujard, H. (1997). Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the lacR/o, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucl. Acids Res.* **25**, 1203-1210.

Mackay, M., Goman, M., Bone, N., Hyde, J. E., Scaife, J., Certa, U., Stunnenberg, H. and Bujard, H. (1985). Polymorphism of the precursor for the major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites: studies at the genetic level. *EMBO J.* **4**, 3823-3829.

Majarian, W. R., Daly, T. M., Weidanz, W. P. and Long, C. A. (1984). Passive immunization against murine malaria with an IgG3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* **132**, 3131-3137.

Marsh, K. (1993). Immunology of human Malaria. In: *Bruce-Chwatt's essential malariology* (ed. H. Gilles, Warrell, D. A., Edward Arnold), vol. pp. 60-77. London, UK:

Mattei, D., Hinterberg, K. and Scherf, A. (1992). Pf11-1 and Pf332: two giant proteins synthesized in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today.* **8**, 426-428.

Mayr, A., Stickl, H., Muller, H. K., Danner, K. and Singer, H. (1978). [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol [B]*. **167**, 375-90.

McBride, J. S. and Heidrich, H. G. (1987). Fragments of the polymorphic Mr 185,000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex. *Mol. Biochem. Parasitol.* 23, 71-84.

McBride, J. S., Walliker, D. and Morgan, G. (1982). Antigenic diversity in the human parasite *Plasmodium* falciparum. Science. 217, 254-257.

McKean, P. G., O'Dea, K. and Brown, K. N. (1993). Nucleotide sequence analysis and epitope mapping of the merozoite surface protein 1 from *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Mol. Biochem. Parasitol.* **62**, 199-209.

McLeod, R., Frenkel, J. K., Estes, R. G., Mack, D. G., Eisenhauer, P. B. and Gibori, G. (1988). Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of Toxoplasma gondii and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. *J Immunol.* **140**, 1632-7.

Miller, L. H. and Hoffman, S. L. (1998). Research toward vaccines against malaria. Nat Med. 4, 520-4.

Miller, L. H., Aikawa, M., Johnson, J. G. and Shiroishi, T. (1979). Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. *J Exp Med.* **149**, 172-84.

Miller, L. H., Roberts, T., Shahabuddin, M. and McCutchan, T. F. (1993). Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**, 1-14.

Mineo, J. R. and Kasper, L. H. (1994a). Attachment of Toxoplasma gondii to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp Parasitol.* **79**, 11-20.

Mitchell, G. H., Butcher, G. A. and Cohen, S. (1975). Merozoite vaccination against Plasmodium knowlesi malaria. *Immunology*. **29**, 397-407.

Moran, P. and Caras, I. W. (1991). A nonfunctional sequence converted to a signal for glycophosphatidylinositol membrane anchor attachment. *J Cell Biol.* **115**, 329-36.

Moran, P. and Caras, I. W. (1992). Proteins containing an uncleaved signal for glycophosphatidylinositol membrane anchor attachment are retained in a post-ER compartment. *J Cell Biol.* **119**, 763-72.

Moran, P. and Caras, I. W. (1994). Requirements for glycosylphosphatidylinositol attachment are similar but not identical in mammalian cells and parasitic protozoa. *J Cell Biol.* **125**, 333-43.

Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* **7**, 145-73.

Müller, H.-M. (1989). Identifizierung immunogener Strukturen auf dem 190 kD Glykoprotein von *Plasmodium falciparum*.

Müller, H.-M., Früh, K., von Brunn, A., Esposito, F., Lombardi, S., Crisanti, A. and Bujard, H. (1989). Development of the human immune response against the major surface protein (gp190) of *Plasmodium falciparum*. *Inf. Immun.* **57**, 3765-3769.

Myler, P. J. (1989). Nucleotide and deduced amino acid sequence of the gp195 (MSA-1) gene from *Plasmodium falciparum* Palo Alto PLF-3/B11. *Nucleic Acids Res.* **17**, 5401.

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

Ngo, H. M., Hoppe, H. C. and Joiner, K. A. (2000). Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion. *Trends Cell Biol.* **10**, 67-72.

Nicolle C., M. L. (1908). Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *CR Acad Sci* (*III*). **146**, 2207-209.

Nikodem, D. and Davidson, E. (2000). Identification of a novel antigenic domain of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 that specifically binds to human erythrocytes and inhibits parasite invasion, in vitro. *Mol Biochem Parasitol.* **108**, 79-91.

Nussenzweig, R., Vanderberg, J., Most, H. and Orton, C. (1969). Specifity of protective immunity produced by X-irradiated Plasmodium berghei sporozoites. *Nature*. **222**, 488-489.

Nussenzweig, V. and Nussenzweig, R. S. (1989). Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine. *Adv. Immunol.* **45**, 283-334.

Ockenhouse, C. F., Sun, P. F., Lanar, D. E., Wellde, B. T., Hall, B. T., Kester, K., Stoute, J. A., Magill, A., Krzych, U., Farley, L., Wirtz, R. A., Sadoff, J. C., Kaslow, D. C., Kumar, S., Church, L. W., Crutcher, J. M., Wizel, B., Hoffman, S., Lalvani, A., Hill, A. V., Tine, J. A., Guito, K. P., de Taisne, C., Anders, R., Ballou, W. R. and et al. (1998). Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for Plasmodium falciparum malaria. *J Infect Dis.* **177**, 1664-73.

Ockenhouse, C. F., Tegoshi, T., Maeno, Y., Benjamin, C., Ho, M., Kan, K. E., Thway, Y., Win, K., Aikawa, M. and Lobb, R. R. (1992). Human vascular endothelial cell adhesion receptors for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med.* **176**, 1183-9.

Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J. and Seed, B. (1989). CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. *Cell.* **58**, 95-101.

Pan, W., Ravot, E., Tolle, R., Frank, R., Mosbach, R., Turbachova, I. and Bujard, H. (1999). Vaccine candidate MSP-1 from Plasmodium falciparum: a redesigned 4917 bp polynucleotide enables synthesis and isolation of full-length protein from Escherichia coli and mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1094-103.

Pan, W., Tolle, R. and Bujard, H. (1995). A direct and rapid sequencing strategy for the Plasmodium falciparum antigen gene gp190/MSA1. *Mol Biochem Parasitol.* **73**, 241-4.

Perkins, M. E. and Rocco, L. J. (1988). Sialic acid-dependent binding of *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen, Pf200, to human erythrocytes. *J. Immunol.* **141**, 3190-3196.

Perrin, L. H., Merkli, B., Loche, M., Chizzolini, C., Smart, J. and Richle, R. (1984). Antimalarial immunity in *Saimiri* monkeys. Immunization with surface components of asexual blood stages. *J. Exp. Med.* **160**, 441-451.

Peterson, G. M., Coppel, R. L., Moloney, M. B. and Kemp, D. J. (1988). Third form of the precursor to the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2664-2667.

Peterson, M. G., Coppel, R. L., McIntyre, P., Langford, C. J., Woodrow, G., Brown, G. V., Anders, R. F. and Kemp, D. J. (1988a). Variation in the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falcipa-rum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **27**, 291-301.

Peterson, M. G., Marshall, V. M., Smythe, J. A., Crewther, P. E., Lew, A., Silva, A., Anders, R. F. and Kemp, D. J. (1989). Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 3151-3154.

Pfefferkorn, E. R. and Borotz, S. E. (1994). Toxoplasma gondii: characterization of a mutant resistant to 6-thioxanthine. *Exp Parasitol.* **79**, 374-82.

Pfefferkorn, E. R. and Pfefferkorn, L. C. (1976). Toxoplasma gondii: isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. *Exp Parasitol.* **39**, 365-76.

Pirson, P. J. and Perkins, M. E. (1985). Characterization with monoclonal antibodies of a surface antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *J. Immunol.* **134**, 1946-1951.

Pope, B. and Kent, H. M. (1996). High efficiency 5 min transformation of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res.* 24, 536-7.

Ramasamy, R. (1998). Molecular basis for evasion of host immunity and pathogenesis in malaria. *Biochim Bio-phys Acta*. **1406**, 10-27.

Reiner, S. L. and Locksley, R. M. (1995). The regulation of immunity to Leishmania major. *Annu Rev Immunol*. **13**, 151-77.

Remane, A., Storch, V. and Welsch, U. (1985). Kurzes Lehrbuch der Zoologie. (ed. pp. S. 369. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Rieckmann, K. H., Beaudoin, R. L., Cassells, J. S. and Sell, K. W. (1979). Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against *falciparum* malaria. *Bull. WHO.* **57** (**S1**), 261-265

Riley, E. M., Allen, S. J., Wheeler, J. G., Blackman, M. J., Bennett, S., Takacs, B., Schonfeld, H. J., Holder, A. A. and Greenwood, B. M. (1992). Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol.* **14**, 321-337.

Riley, E. M., Morris-Jones, S., Blackman, M. J., Greenwood, B. M. and Holder, A. A. (1993). A longitudinal study of naturally acquired cellular and humoral immune responses to a merozoite surface protein (MSP1) of *Plasmodium falciparum* in an area of seasonal malaria transmission. *Parasite Immunol.* **15**, 513-524.

Rogers, W. O., Rogers, M. D., Hedstrom, R. C. and Hoffman, S. L. (1992). Characterization of the gene encoding sporozoite surface protein 2, a protective *Plasmodium yoelii* sporozoite antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* **53**, 45-51.

Rogerson, S. J., Chaiyaroj, S. C., Ng, K., Reeder, J. C. and Brown, G. V. (1995). Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Exp Med.* **182**, 15-20.

Romero, P., Maryanski, J. L., Corradin, G., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V. and Zavala, F. (1989). Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature*. **341**, 323-326.

Roos, D. S., Donald, R. G., Morrissette, N. S. and Moulton, A. L. (1994). Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite Toxoplasma gondii. *Methods Cell Biol.* **45**, 27-63.

Ross, R. (1897). On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malarial blood. *Br. Med. J.* 2, 1786-1788.

Ruangjirachuporn, W., Afzelius, B. A., Helmby, H., Hill, A. V., Greenwood, B. M., Carlson, J., Berzins, K., Perlmann, P. and Wahlgren, M. (1992). Ultrastructural analysis of fresh Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and their cytoadherence to human leukocytes. *Am J Trop Med Hyg.* **46**, 511-9.

Russell, D. G. (1983). Host cell invasion by Apicomplexa: an expression of the parasite's contractile system? *Parasitology*. **87**, 199-209.

Sabchareon, A., Burnouf, T., Ouattara, D., Attanath, P., Bouharoun-Tayoun, H., Chantavanich, P., Foucault, C., Chongsuphajaisiddhi, T. and Druilhe, P. (1991). Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* **45**, 297-308.

Sabin, A. B. (1941). Toxoplasmic encephalitis in childern. J. Am. Med. Assoc. 116, 801-807.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. **239**, 487-491.

Sajid, M., Withers-Martinez, C. and Blackman, M. J. (2000). Maturation and specificity of Plasmodium falciparum subtilisin-like protease-1, a malaria merozoite subtilisin-like serine protease. *J Biol Chem.* **275**, 631-41.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. (ed. pp. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandhu, J. S. and Kennedy, J. F. (1994). Expression of the merozoite surface protein gp195 in vaccinia virus. *Vaccine*. **12**, 56-64.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulsen, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **74**, 5463-5467.

Santiago, H. C., Oliviera, M. A. P., Bambirra, E. A., Faria, A. M. C., Afonso, L. C. C., Vieira, L. Q. and Gazzinelli, R. T. (1999). Coinfection witd Toxoplasma gondii inhibits Antigen-specific Th2 Immune responses, Tissue inflammation and parasitism in BALB/c mice infected with Leishmanie major. *Infection and Immunity*. **67**, 4939-4944.

Sayles, P. C. and Johnson, L. L. (1996). Intact immune defenses are required for mice to resist the ts-4 vaccine strain of Toxoplasma gondii. *Infect Immun.* **64**, 3088-92.

Sayles, P. C., Gibson, G. W. and Johnson, L. L. (2000). B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent Toxoplasma gondii. *Infect Immun.* **68**, 1026-33.

Schneider, J., Gilbert, S. C., Blanchard, T. J., Hanke, T., Robson, K. J., Hannan, C. M., Becker, M., Sinden, R., Smith, G. L. and Hill, A. V. (1998). Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med.* **4**, 397-402.

Schofield, L. and Hackett, F. (1993). Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J-Exp-Med.* **177**, 145-53 issn: 0022-1007.

Schwarz, R. T. and Tomavo, S. (1993). The current status of the glycobiology of Toxoplasma gondii: glycosylphosphatidylinositols, N- and O-linked glycans. *Res-Immunol.* **144**, 24-31 issn: 0923-2494. Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P. and Hoffman, S. L. (1994). Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 9866-70.

Sedegah, M., Jones, T. R., Kaur, M., Hedstrom, R., Hobart, P., Tine, J. A. and Hoffman, S. L. (1998). Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 7648-53.

Seeber, F. and Boothroyd, J. C. (1996). Escherichia coli beta-galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite Toxoplasma gondii. *Gene.* **169**, 39-45.

Seeber, F., Dubremetz, J. F. and Boothroyd, J. C. (1998). Analysis of Toxoplasma gondii stably transfected with a transmembrane variant of its major surface protein, SAG1. *J Cell Sci.* **111**, 23-9.

Sercarz, E. E., Lehmann, P. V., Ametani, A., Benichou, G., Miller, A. and Moudgil, K. (1993). Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu Rev Immunol.* **11**, 729-66.

Shear, H. L. (1993). Transgenic and mutant animal models to study mechanisms of protection of red cell genetic defects against malaria. *Experientia*. **49**, 37-42.

Sibley, L. D., S., H. and Carruthers, V. B. (1998). Gliding motility: An efficient mechanism for cell penetration. *Current Biology*. **8**, 12-14.

Siddiqui, W. A., Tam, L. Q., Kramer, K. J., Hui, G. S., Case, S. E., Yamaga, K. M., Chang, S. P., Chan, E. B. and Kan, S. C. (1987). Merozoite surface coat precursor protein completely protects *Aotus* monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 3014-3018.

Siddiqui, W. A., Taylor, D. W., Kan, S.-C., Kramer, K., Richmond-Crum, S. M., Kotani, S., Shiba, T. and Kusumoto, S. (1978a). Vaccination of experimental monkeys against *Plasmodium falciparum*: a possible safe adjuvant. *Science*. **201**, 1237-1238.

Siezen, R. J. and Leunissen, J. A. (1997). Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.* **6**, 501-23.

Sim, B. K., Chitnis, C. E., Wasniowska, K., Hadley, T. J. and Miller, L. H. (1994). Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by Plasmodium falciparum. *Science*. **264**, 1941-4.

Sinnis, P. and and Nussenzweig, V. (1996). Preventing Sporozoite Invasion of Hepatocytes. In *Malaria Vaccine Development* (ed. S. L. Hoffman), vol. pp. 15-34. Washington, D.C:

Sinnis, P. and Sim, B. K. (1997). Cell invasion by the vertebrate stages of Plasmodium. *Trends Microbiol.* 5, 52-8.

Sisodia, S. S. (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**, 6075-9.

Smythe, J. A., Coppel, R. L., Day, K. P., Martin, R. K., Oduola, A. M., Kemp, D. J. and Anders, R. F. (1991). Structural diversity in the Plasmodium falciparum merozoite surface antigen 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**, 1751-5.

Soldati, D. and Boothroyd, J. C. (1993). Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite Toxoplasma gondii. *Science*. **260**, 349-52 issn: 0036-8075.

Sowers, A. E. (1985). Movement of a fluorescent lipid label from a labeled erythrocyte membrane to an unlabeled erythrocyte membrane following electric-field-induced fusion. *Biophys J.* **47**, 519-25.

Stafford, W. H., Blackman, M. J., Harris, A., Shai, S., Grainger, M. and Holder, A. A. (1994). N-terminal amino acid sequence of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 polypeptides. *Mol-Biochem-Parasitol.* **66**, 157-60 issn: 0166-6851.

Stafford, W. H., Gunder, B., Harris, A., Heidrich, H. G., Holder, A. A. and Blackman, M. J. (1996). A 22 kDa protein associated with the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 complex. *Mol Biochem Parasitol.* **80**, 159-69.

Stoute, J. A., Kester, K. E., Krzych, U., Wellde, B. T., Hall, T., White, K., Glenn, G., Ockenhouse, C. F., Garcon, N., Schwenk, R., Lanar, D. E., Sun, P., Momin, P., Wirtz, R. A., Golenda, C., Slaoui, M., Wortmann, G., Holland, C., Dowler, M., Cohen, J. and Ballou, W. R. (1998). Long-term efficacy and immune responses following immunization with the RTS, Smalaria vaccine. *J Infect Dis.* **178**, 1139-44.

Struck, D. K. and Pagano, R. E. (1980). Insertion of fluorescent phospholipids into the plasma membrane of a mammalian cell. *J Biol Chem.* **255**, 5404-10.

Su, S., Sanadi, A. R., Ifon, E. and Davidson, E. A. (1993). A monoclonal antibody capable of blocking the binding of Pf200 (MSA-1) to human erythrocytes and inhibiting the invasion of *Plasmodium falciparum* merozoites into human erythrocytes. *J. Immunol.* **151**, 2309-2317.

Su, X. Z., Heatwole, V. M., Wertheimer, S. P., Guinet, F., Herrfeldt, J. A., Peterson, D. S., Ravetch, J. A. and Wellems, T. E. (1995). The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes [see comments]. *Cell.* **82**, 89-100 issn: 0092-8674.

Sultan, A. A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K. J., Crisanti, A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R. S. and Menard, R. (1997). TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. *Cell.* **90**, 511-22.

Tanabe, K., Mackay, M., Goman, M. and Scaife, J. G. (1987). Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* **195**, 273-287.

Taylor-Robinson, A. W. (2000). Vaccination against malaria: targets, strategies and potentiation of immunity to blood stage parasites. *Front Biosci.* **5**, E16-29.

Taylor-Robinson, A. W. and Smith, E. C. (1999). A role for cytokines in potentiation of malaria vaccines through immunological modulation of blood stage infection. *Immunol Rev.* **171**, 105-23.

Thomas, A. W., Deans, J. A., Mitchell, G. H., Alderson, T. and Cohen, S. (1984). The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit Plasmodium knowlesi invasion of erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol.* **13**, 187-99.

Tian, J. H., Kumar, S., Kaslow, D. C. and Miller, L. H. (1997). Comparison of protection induced by immunization with recombinant proteins from different regions of merozoite surface protein 1 of Plasmodium yoelii. *Infect Immun.* **65**, 3032-6.

Tian, J. H., Miller, L. H., Kaslow, D. C., Ahlers, J., Good, M. F., Alling, D. W., Berzofsky, J. A. and Kumar, S. (1996). Genetic regulation of protective immune response in congenic strains of mice vaccinated with a subunit malaria vaccine. *J Immunol.* **157**, 1176-83.

Tobwin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophorectic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**, 4350-4354.

Tolle, R. (1994). Untersuchungen zur Seroepidemilogie und Protektivität zweier Antigene des Malariaerregers Plasmodium falciparum.

Tomavo, S., Dubremetz, J. F. and Schwarz, R. T. (1993). Structural analysis of glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the Toxoplasma gondii tachyzoite surface glycoprotein gp23. *Biol Cell.* **78**, 155-62.

Trager, W. and Jensen, J. B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. Science. 193, 673-675.

Udenfriend, S. and Kodukula, K. (1995). How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem.* **64**, 563-91.

Ulaeto, D. and Hruby, D. E. (1994). Uses of vaccinia virus in vaccine delivery. Curr Opin Biotechnol. 5, 501-4.

van den Hoff, M. J., Moorman, A. F. and Lamers, W. H. (1992). Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival. *Nucleic-Acids-Res.* **20**, 2902 issn: 0305-1048.

van Dijk, M. R., Waters, A. P. and Janse, C. J. (1995). Stable transfection of malaria parasite blood stages. *Science*. **268**, 1358-62.

Waldeland, H. and Frenkel, J. K. (1983). Live and killed vaccines against toxoplasmosis in mice. *J Parasitol.* **69**, 60-5.

Wahlgren, M., Fernandez, V., Scholander, C., Carlson, J. (1994). Rosetting. Parasitology today. 10, 73-79.

Waldeland, H., Pfefferkorn, E. R. and Frenkel, J. K. (1983a). Temperature-sensitive mutants of Toxoplasma gondii: pathogenicity and persistence in mice. *J Parasitol.* **69**, 171-5

Walliker, D., Quakyi, I. A., Wellems, T. E., McCutchan, T. F., Szarfman, A., London, W. T., Corcoran, L. M., Burkot, T. R. and Carter, R. (1987). Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. **236**, 1661-1666.

Wang, R., Doolan, D. L., Le, T. P., Hedstrom, R. C., Coonan, K. M., Charoenvit, Y., Jones, T. R., Hobart, P., Margalith, M., Ng, J., Weiss, W. R., Sedegah, M., de Taisne, C., Norman, J. A. and Hoffman, S. L. (1998). Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science*. **282**, 476-80.

Warrell, D. A. (1997). Cerebral malaria: clinical features, pathophysiology and treatment. *Ann Trop Med Parasitol.* **91**, 875-84.

Weber, J. L., Leininger, W. M. and Lyon, J. A. (1986). Variation in the gene encoding a major merozoite surface antigen of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res.* **14**, 3311-3323.

Weber, J. L., Sim, B. K. L., Lyon, J. A. and Wolff, R. (1988). Merozoite surface protein sequence from the Camp strain of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1206.

Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L. and Mosmann, T. R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? [see comments]. *Immunol Today.* **14**, 353-6.

WHO (1988). Role of non-human primates in malaria vaccine development: memorandum from a WHO meeting. *Bull. WHO.* **66**, 719-728.

WHO (1994). World malaria situation in 1991. WHO Bulletin. 72, 160-164.

Yuda, M., Sakaida, H. and Chinzei, Y. (1999). Targeted disruption of the plasmodium berghei CTRP gene reveals its essential role in malaria infection of the vector mosquito. *J Exp Med.* **190**, 1711-6.

Zevering, Y., Amante, F., Smillie, A., Currier, J., Smith, G., Houghten, R. A. and Good, M. F. (1992). High frequency of malaria-specific T cells in non-exposed humans. *Eur. J. Immunol.* **22**, 689-696.

# Anhang I

#### DNA Sequenz des nativen (msp-1<sup>n</sup>) und des synthetischen (msp-1d<sup>s</sup>) Gens für MSP-1 aus P. falciparum Stamm 3D7

AS	M K I I F F L C S F L F F I I N T Q C V T H E S Y Q E	27
n msp-1d <sub>s</sub>	A C T A A T T T A T A A T A A T A A A A	90
AS	<sup>Mlu I</sup> L V K K L E A L E D A V L T G Y S L F Q K E K M V L N E E E	57
n msp-1d <sub>s</sub>	T A A A A T A TAGTT T A G A A T CTCGTCAAGAAGCTCGAAGCTTTAGAGGACGCCCGTATTGACAGGTTACTCCCCTATTCCAGAAAGAA	180
AS	I T T K G A S A Q S G A S A Q S G A S A Q S G A	87
n msp-1d <sub>s</sub>	T A T AGT T AAG T AG A T T AG A T T T T	270
AS	S A Q S G A S A Q S G T S G P S G P S G T S P S S R S N T L	117
n msp-1d <sub>s</sub>	AG T AAGT T AAGT AG T AAG T A A T AAG TCATCT T A C TT A	360
25		147
n msp-1d	T A T T ATC T AAG T A T T AG T T ATC C T TTA A A A A	11/
S S	CCACGTTCCAACACCTCCAGTGGAGCCTCCCCACCCGCCGACGCATCCGACTCAGACGCTAAGAGTTATGCAGACCTGAAGCACCGCGTG	450
AS n	RNYLFTIKELKYPELFDLTNHMLTLCDNIH CATTG T ACCATC CCT A T TATTG TTT	177
msp-ld <sub>s</sub>	AGGAACTACCATATCACAAAGAGTTGAAGTACCCTGAATTGTTCGATTTGACCAACCA	540
AS n	GFKYLIDGYEEINELLYKLNFYFDLLRAKL ATAT A TATATA TA TTATAAAAATA	207
$msp-1d_s$	GGTTTCAAGTATCTGATAGATGGGTATGAAGAAATTAACGAGCTGCTCTATAAACTCAACTTTTACTTCGACCTGCGTGCG	630
AS	N D V C A N D Y C Q I P F N L K I R A N E L D V L K K L V F	237
msp-1d <sub>s</sub>	ACGATGTCTGTGCAAACGATTACTCCATCCACCTAAAGATACGTGCGAACGAGCTGGATGTTCTGAAGAAACTCGTGTTC	720
AS	G Y R K P L D N I K D N V G K M E D Y I K K N K T T I A N I	267
msp-1d <sub>s</sub>	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	810
AS	N E L I E G S K K T I D Q N K N A D N E E G K K K L Y Q A Q	297
n msp-1d <sub>s</sub>	AT A T A A T G A A T T A T A A T A G A T T A A A A	900
AS	YDLSIYNKQLEEAHNLISVLEKRIDTLKKN	327
msp-1d <sub>s</sub>	TATGATTTGAGCATCTACAATAAGCAACTAGAGGAAGGCTCACCAACCTCATCAGCGTACTGGAAAAGAGAATTGACACCCTGAAAAAGAAT	990
AS	E N I K K L L D K I N E I K N P P P A N S G N T P N T L L D	357
n msp-1d <sub>s</sub>	A TATT AT TCAGCTCT AATCT GAAAACATTAAGAAACTCCTGGACAAGATTAACGAAATTAAAAACCCACCTCCAGCGAATAGCGGAAATACCCCGAATACCCTGCTGGAT	1080
AS	K N K K I E E H E E K I K E I A K T I K F N I D S L F T D P	387
n msp-1d <sub>s</sub>	A C G A A A A T A A T C T AG T A T T T A	1170
AS	L E L E Y Y L R E K N K K V D V T P K S Q D P T K S V Q I P	417
n msp-1d <sub>s</sub>	T AT A T TT AA A A A A A T T A A T ATCA T T G A T T A A A CTGGAGCTGGAATACTACCTGCGCGAGAAGAATAAGAAGGTCGACGTGGACCCCAAAGAGCCCAAGAACCAAAGTCCGTGCAGATCCCC	1260
AS	K V P Y P N G I V Y P L P L T D I H N S L A A D N D K N S Y	447
n msp-1d <sub>s</sub>	T T T T T T A TT A C T T T T T AT A T A	1350
AS	G D L M N P H T K E K I N E K I I T D N K E R K I F I N N I	477
n msp-1d <sub>s</sub>	T TT A T T T A A T T A A T A AAAAAC T T T GGAGACCTGATGAACCCCCCCCCACCTAAGGAAAAGATAAACGAGAAGATCATTACCGATAATAAGGAGCGGAAGATTTTTATCAACAACATC	1440

AS	KKKIDLEEKNINHTKEQNKKLLEDYEKSKK	507
msp-1d <sub>s</sub>	A A I A I A I A I A I A I A I A I A I A	1530
AS n	DYEELLEKFYEMKFNNNFDKDVVDKIFSAR A TACTAA T TTT TCA CA A TAAA	537
$msp-1d_s$	GATTATGAGGAACTGTTAGAGAAGTTCTATGAAATGAAA	1620
AS n	YTYNVE KQRYNNKFSSSNNSVYNVQKLKKA TATTTAAAAATT ATTCATC T TTAT TAATAAG	567
msp-ld <sub>s</sub> AS	TACACCTACAACGTGGAGAAGCAGCGGTACAACAATAAGTTCAGCAGCTCCAATAACTCGGTCTACAATGTGCAGAAGCTGAAGAAAGCT L S Y L E D Y S L R K G I S E K D F N H Y Y T L K T G L E A	1710 597
msp-1d <sub>s</sub>	CTGAGCTATCTGGAAGACTACTGGCTGGGGAAAGGGATTTCTGGAGAAGGATTTCAACCACTACTACACCCCTCAAAACCGGCCTGGAAGCT	1800
AS n msp-ld_	DIKKLTEEIKSSENKILEKNFKGLTHSANG TAATAA AAGAGACATAAATTA ATA TT DADMADADADADADADADADADADADADADADADADADA	627
	GACATCAAGAAACTCACTGAAGAGATCAAAAGTTCTGAGAATAAGATACTGGAGAAGAACTTCAAGGGACTAACGCACTCTGCAAACGGC	1890
AS n msp-1d <sub>s</sub>	S L E V S D I V K L Q V Q K V L L I K K I E D L R K I E L F T A A T T A T A A A TT AT A T A A CT AA A AT A TCCCTGGAAGTCTCTGACATCGTGAAACTGCAAGTCGCAGGTCGCTGCTCATCAAAAAAAA	657 1980
AS	I, K N A O I, K D S T H V P N T Y K P O N K P F P Y Y I, T V I,	687
n msp-ld <sub>s</sub>	T A A T A A TAGT T T A A T T A A T T T A T A	2070
AS n	KKEVDKLKEFIPKVKDMLKKEQAVLSSITQ AAAA ATAA TA A C A T CT ATCATT AA	717
$msp-1d_s$	AAGAAGGAGGTGGATAAGCTGAAGGAATTCATCCCAAAAGTGAAAGATATGTTAAAGAAAG	2160
AS n	PLVAASETTEDGGHSTHTLSQSGETEVTEE TATA A T GTTCA ATACAAA AA A	747
$msp-1d_s$	CCTCTGGTGGCCGCAAGCGAGACAACCGAAGATGGCGGGCACAGCACCCCACACCCTGTCTCAGTCTGGCGAAACAGAGGTGACAGAAGAG	2250
AS n	T E E T E E T V G H T T T V T I T L P P T Q P S P P K E V K A A A A A G A A A A A A A A A A A A A A	777
$msp-1d_s$	ACAGAAGAGACCGAAGAAACAGTGGGGCACACCACTACTGTGACCATCACTTTGCCCCCTACGCAGCCATCTCCCCCAAAAGAGGTCAAA	2340
AS n	VVENSIEHKSNDNSQALTKTVYLKKLDEFL TT TAA TAGTT T ACT AAAT A TATATTA	807
msp-ld <sub>s</sub>	GTCGTGGAAAACTCCATTGAACACAAGTCCAACGACAACTCACAGGCTCTGACGAAGACCGTCTATCTGAAGAAACTGGACGAGTTCCTG	2430
AS n msp-1d	TKSYICHKYILVSNSSMDQKLLEVYNLTPE TTCATAT TTTAAATCTT CAATAA ATTTTA	837
s s	ACCAAAAGCTACATCTGCCATAAATACATCCTCGTGTCTAACAGCAGCAGCATGGATCAGAAGCTGTTGGAGGTGTACAACCTAACGCCCGAA	2520
AS n msp-1d <sub>s</sub>	E E N E L K S C D P L D L L F N I Q N N I P A M Y S L Y D S A T A A A TT T A T A T A T TTCA AGT GAAGAGAACGAGTTAAAAATCCTGTGTGTGGACCCTCTTGGACCATCTGGAGCATCCAGGCTTATGGATCC	867 2610
AS	MNNDI, OHI, FFEI, YOKEMTYYI, HKI, KEENHT	897
n msp-1d <sub>s</sub>	C T TT À A T C T T AT A T À G A T T T A A A A A ATGATAACGACCTCCAGCACCTGTTCTTCGAGCTGTACCAGAAAGAGAGTGATCTACTATCTGCATAAGCTGAAAGAGGAGAATCACATC	2700
AS	K K L L E E Q K Q I T G T S S T S S P G N T T V N T A Q S A	927
n msp-1d <sub>s</sub>	A AT A G A A A ATCT CAGT A T A C T T A C A	2790
AS n	TH SN SQN QQ SN A SSTN TQN GV A V SSG PAVV TAGTT A A ATCATA CTCT TA T TATCATCTT AT	957
$msp-1d_s$	ACACACTCCAACTCCCAGAACCAGCAGGGCAACGCTTCTAGCACCAACACCCAGAATGGGGTAGCAGTTAGTAGCGGCCCTGCTGTGGTG	2880
AS n	EESHDPLTVLSISNDLKGIVSLLNLGNKTK AAGT TTAA G AGT TTG T TAGT TACTA ATA	987
$msp-1d_s$	GAGGAATCGCATGACCCCCTCACTGTATTATCTATTTCAAACGACCTAAAAGGGATTGTGTCCCTCCTCAATTTAGGTAATAAGACCAAG	2970
AS	VPNPLTISTTEMEKFYENILKNNDTYFNDD A TAACTTTAAG AA GTTTAATTT TT	1017
msp-ld <sub>s</sub>	GTCCCTAACCCCTTGACTATCAGCACTACGGAAATGGAGAAAGTTTTATGAAAACATCCTGAAGAACAACGACACCTATTTTAACGACGAC	3060
AS n msp-ld <sub>s</sub>	I K Q F V K S N S K V I T G L T E T Q K N A L N D E I K K L C A A A ATC TTCA A A TT C A A A A T A T	1047 3150
--------------------------------	--	--------------
AS	K D T L Q L S F D L Y N K Y K L K L D R L F N K K K E L G Q	1077
n msp-1d <sub>s</sub>	T TT A T A A T T A T T A T T AT A T T AT A	3240
AS n	DKMQIKKLTLLKEQLESKLNSLNNPHNVLQ CA A AAT TAAAATAATCAATGTAT C ATAA	1107
$msp-1d_s$	GATAAGATGCAGATTAAGAAGCTAACTTTACTGAAGGAGCAGCTCGAGAGCAAGCTCAACTCCCTGAATAATCCACATAATGTGCTCCAG	3330
AS n	NFSVFFNKKKEAEIAETENTLENTKILLKH TT TCAA TAAAT CATA AA T T	1137
msp-1ds	AACTTTTCCGTATTCTTCAATAAGAAGAAGAAGAAGCAGAGAGTTGCCGAGACGGAAAATACCCTCGAAAACACTTAAGATATTACTGAAACAC	3420
AS n msp-1d <sub>s</sub>	Y K G L V K Y Y N G E S S P L K T L S E V S I Q T E D N Y A A T T A T T T A ATCT A A T AAGT A A A T T C TATAAAGGGCTGGTGAAGTATTACAACGGAGAGTCTAGCCCATTGAAGACTCTTTCAGAAGTGTCAATTCAAACCGGAGATAACTACGCA	3510
AS	N L E K F R V L S K I D G K L N D N L H L G K K K L S F L S	1197
n msp-1d <sub>s</sub>	TT A T AT A T A T A T A TT TT A G AT ATCT T A A AACCTAGAAAAAGGTCAGAGGCGAAAATCGACGGCAAACTCAATGATAACCTACACCTCGGAAAAAAAA	3600
AS n	SGLHHLITELKEVIKNKNYTGNSPSENNKK TA TA AAT TTATTTCT AG GA	1227
$msp-1d_s$	AGTGGACTTCATCATTTAATTACCGAATTGAAAGAAGTTATCAAAAACAAAAACTACACTGGGAACAGCCCATCTGAAAATAATAAAAAG	3690
AS n	VNEALKSYENFLPEAKVTTVVTPPQPDVTP T ATTAA C TC T ATATATA ATA	1257
msp-1d <sub>s</sub>	GTCAACGAGGCCCTCAAGTCTTATGAAAATTTCCTTCCAGAAGCAAAAGTGACAACCGTCGTGACCCCCCCAGCCCGATGTCACCCCC	3780
AS n msp-1d	SPLSVRVSGSSGSTKEETQIPTSGSLLTEL TCTATTCTAGAAG TAGTTCAA AAAT CTTAAAA	1287
NSP IUS	AGCCCTCTAAGCGTGAGAGTGTCTTGGATCAAGTGGCTCCACAAAAGAAGAAACCCAGATCCCCACATCAGGATCTCTACTGACCGAGTTG	3870
n msp-1d <sub>s</sub>	A A A A T A A A T A A A T TTC T A T A A C T T A C T T A CAGCAGGTCGTCCAACTCCAGGAATTATGACGAGGAAGACGACGACGACGTCTTGCCAATCTTCGGCGAATCAGAAGACAACGACGAG	3960
AS	Y L D Q V V T G E A I S V T M D N I L S G F E N E Y D V I Y	1347
n msp-1d <sub>s</sub>	TT T A A T A A ATC A T TCA A T A T A T A	4050
AS n	LKPLAGVYRSLKKQIEKNIFTFNLNLNDIL TA TT T AT CTAAAAT A TTA TTTG T A	1377
$msp-1d_s$	CTCAAACCACTAGCCGGAGTTTACAGAAGTCTCAAGAAGCAGATCGAAAAGAACATCTTCACCTTTAATCTAAACCTAAACGACATCTTG	4140
AS n	N S R L K K R K Y F L D V L E S D L M Q F K H I S S N E Y I A T T G A A T T T T T A A T A A T A TCA T	1407
msp-10 <sub>s</sub>	AATTCCCGGCTGAAAAAGCGGAAATACTTCCTCGACGTACTGGAGTCGGATTTGATGCAGTTTAAGCACATCTCCCAGCAACGAATACATT	4230
n msp-1d	TATAT TAG TAAAA A TTA AAGT A A A T	4320
AS	I K F A Q E G I S Y Y E K V L A K Y K D D L E S I K K V I K	1467
n msp-1d <sub>s</sub>	T A G T T T T T TT A G T T T A A A T A T	4410
AS	E E K E K F P S S P P T T P P S P A K T D E Q K K E S K F L	1497
msp-1d <sub>s</sub>	GAAGAAAAGAAAATTTCCCAGTTCTCCCCCTACAACGCCGCCCTCTCCAGCCAAGACTGATGAACAGAAAAAAGAGTCTAAGTTCCTC	4500
AS n	PFLTNIETLYNNLVNKIDDYLINLKAKIND ATTAACT CTA TTTA TTATTAGA T	1527
$msp-ld_s$	CCTTTCCTCACTAATATCGAGACTCTCTACAATAACCTAGTGAACAAGATTGACGACTACCTGATCAACCTTAAAGCCAAGATAAACGAC	4590
AS n	CNVEKDEAHVKITKLSDLKAIDDKIDLFKN T TAA AA AAT TAGT TA ATT AATCT	1557
msp-ld <sub>s</sub>	TGCAATGTCGAGAAGGATGAGGCTCATGTTAAGATCACCAAACTGTCCGATCTGAAAGCCATCGACGACAAGATCGACTTATTTAAAAAC	4680

AS n	PYDFEAIKKLINDDTKKDMLGKLLSTGLVQ T C AAT AT A TGA T ATATTAATATA	1587
$msp-1d_s$	CCATACGATTTCGAGGCTATCAAAAAGCTGATCAATGATGACACCAAGAAAGA	4770
AS n	NFPNTIISKLIEGKFQDMLNISQHQCVKKQ TT TAA ATATAAA TTAC ACA AAAA	1617
$msp-1d_s$	AACTTCCCTAACACCATCATATCAAAGCTCATAGAGGGCAAGTTCCAAGACATGCTGAATATTTCACAGCATCAGTGCGTCAAGAAGCAG	4860
AS n	CPENSGCFRHLDEREECKCLLNYKQEGDKC TA TAATTA AA ATATTATATC AATT	1647
$msp-1d_s$	TGCCCCGAAAATTCTGGATGCTTCCGGCACCTGGATGAGCGAGAAGAGTGCAAGTGCCTGCTTAACTATAAACAGGAGGGCGACAAATGT	4950
AS n	VENPNPTCNENNGGCDADATCTEEDSGSSR TAT TTT ATT AT ATCA CA TATCAGCAA	1677
$msp-1d_s$	GTGGAGAACCCAAATCCGACGTGCAACGAGAACAACGGTGGCTGCGATGCCGACGCGACTTGTACAGAGGAAGACTCGGGGAGTTCTCGG	5040
AS n	KKITCECTKPDSYPLFDGIFCSSSNFLGIS G ATATT TTTC AT TT AGT TCTCTAAAA	1707
$msp-1d_s$	AAAAAAATCACGTGCGAGTGCACCAAACCCGACAGTTATCCTCTGTTCGATGGGATATTCTGCTCCTCCAGCAATTTCCTCGGGATTTCT	5130
AS n	FLLILMLILYSFI** 1720 CTTAACT ATA AGTCT	

msp-ld<sub>s</sub> TTTCTACTGATCCTTATGCTAATTCTGTACTCATTTATC<u>TAATAG</u>CGC<u>ATCGAT</u>GG 5186 Stop Cla I

# Anhang II

Immunisierungsversuche mit nativen MSP-1 aus P. falciparum in Aotus Affen



## Cali 1993

Cali 1995



B: Behandlung mit Pyrimethamin/Sulfadoxin; T: Tot

## **Anhang III**

Cali 1993: Analyse der pre-challenge Sera der MSP-1 Gruppe mittels ELISA mit rekombinanten MSP-1 Fragmenten



191 M M189

V 21

M188

M187

## **Anhang IV**

Cali 1995: Analyse der pre-challenge Sera der MSP-1 Gruppe mittels ELISA mit rekombinanten MSP-1 Fragmenten



# Anhang V

Cali 1995: Analyse der MSP-1 induzierten Immunantwort mittels Kreuzreaktiviät der Sera mit rekombinanten p83 Fragment

