

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg**

**vorgelegt von
Diplombiologin Marion Steinbüchel
aus Mannheim**

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Molekulare Mechanismen der *Plasmodium-* *Anopheles* Interaktionen

Gutachter: PD Dr. Hans-Michael Müller
Prof. Dr. Werner Buselmaier

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fotis C. Kafatos am Europäischen Laboratorium für Molekularbiologie (EMBL) und der Abteilung für Parasitologie des Hygiene-Instituts der Universität Heidelberg im Zeitraum von September 2003 bis Juli 2006 unter Anleitung von PD Dr. Hans-Michael Müller und Dr. Kai Matuschewski durchgeführt.

Teile dieser Arbeit sind als Manuskript zur Publikation in Vorbereitung:

Steinbüchel, M. und Matuschewski, K.

„A role for an unconventional *Plasmodium* TRAP-family protein in sporozoite motility and host cell invasion.“

Steinbüchel, M. und Müller, H.-M.

The role of prophenoloxidasen (PPOs) in innate immunity of the malaria vector *Anopheles gambiae*.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Hans-Michael Müller und Kai Matuschewski für die Möglichkeit bedanken, diese speziell zweiseitig-ausgerichtete Dissertation unter ihrer Betreuung durchzuführen. Sowohl fachlich als auch logistisch war diese Arbeit eine große, spannende Herausforderung, durch die ich sehr viel gelernt habe. Vielen Dank für das große Vertrauen, die fachliche und persönliche Unterstützung, sowie mir die Möglichkeit gegeben zu haben, mit großer Eigenverantwortung an die Gestaltung und Durchführung meiner Projekte heranzugehen.

Ein ganz großer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kafatos, allem voran Stéphanie, Jennifer, Dolores, Claudia, Sofia, Tassos, Stephan und Gareth, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und zu sehr guten Freunden wurden. Es hat sehr viel Spaß gemacht, mit euch zusammenzuarbeiten!

Ein weiteres riesiges Dankeschön gebührt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Matuschewski, die mich mit offenen Armen aufgenommen haben und mir sowohl den fachlichen als auch zwischenmenschlichen Wechsel durch ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit sehr erleichtert haben. Vielen Dank für die schöne Zeit!

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Frischknecht, Kappes und Lanzer möchte ich für die gute Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft danken und folgenden Leuten im Besonderen: Freddy für seine anregenden Diskussionen und Ideen, Sylvia und Petra für ihre geduldigen Einweisungen ins konfokale Mikroskop, Diana, Stephan und vor allem Philipp für ihre Hilfe bei Computer-technischen Problemen und Martin, für seine unermüdliche Unterstützung im Labor und Privatem.

Eine großes Dankeschön auch an Peter Vogel und Margret Baumann für ihren seelischen Beistand in all der Zeit sowie die zur Verfügungstellung von Geräten, wenn z. B. das Fluoreszenzmikroskop oder die Entwicklermaschine mal wieder nicht wollten.

Ein ganz besonderer Dank geht an Crista Dorner-Storch, die mir immer wieder neue Möglichkeiten aufgezeigt hat, wenn ich nicht mehr weiter wusste.

Der größte Dank gehört meiner Familie und meinem Freund Christian. Er hat bei allen Höhen und Tiefen stets zu mir gehalten und mir geholfen, zu erkennen, was wirklich wichtig ist. Danke für deinen bedingungslosen Rückhalt und deine offene und ehrliche Kritik, auch wenn es nicht immer das war, was ich hören wollte.

Der Anteil, den meine Eltern an dieser Arbeit haben, ist in Kürze nicht darzustellen. Für die beruflichen und privaten Möglichkeiten, die ich durch ihre Unterstützung hatte und habe, möchte ich mich an dieser Stelle ganz besonders bedanken. Danke, dass ihr immer hinter mir gestanden und stets an mich geglaubt habt, egal welchen Weg ich eingeschlagen habe.

Meinen Eltern

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
<i>An. gambiae</i>	<i>Anopheles gambiae</i>
<i>An. stephensi</i>	<i>Anopheles stephensi</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
cl	<i>clon</i> , Klon
CSP	<i>circumsporozoite protein</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Δ	Delta
Da	Dalton
ddH ₂ O	zweimal destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FD	Farad
for	<i>forward</i> , in <i>sense</i> Richtung des Gens
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Huh7	Humane Hepatoma Zelllinie 7
IFA	Indirekter Immunfluoreszenz-Assay
Kb	Kilobasenpaare
KD	Knockdown
KDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
μ	Mikro-, 10 ⁻⁶

m	Meter, Milli- (10^{-3})
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NMRI	Naval Medical Research Institute
N-Terminus	Amino-Terminus
UOS	<i>upregulated in oocyst sporozoites</i>
<i>P. berghei, Pb</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , pH-Wert
PPO	Prophenoloxidase
PTU	Phenylthiourea
RE	<i>Replacement</i>
rev	<i>reverse</i> , in <i>antisense</i> Richtung des Gens
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
SD	Sprague-Dawley Ratten
sek	Sekunde
SGS-Gene	<i>salivary gland surface</i> Gene
ssRNA	<i>single-strand</i> RNA
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
U	Unit, biochemische Einheit für Enzymaktivität
V	Volt
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	I
Inhaltsverzeichnis	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Malaria	1
1.2 Klinische Symptomatik.....	3
1.3 Lebenszyklus des Malaria-Modell-Erregers <i>Plasmodium berghei</i>.....	4
1.4 Biologie und Fortbewegung der <i>Plasmodium</i>-Sporozoiten.....	6
1.5 Lebenszyklus des Malaria-Vektors <i>Anopheles gambiae</i>	10
1.6 <i>Anopheles gambiae</i> als Modellorganismus zur Erforschung der angeborenen Immunabwehr	11
1.7 Erkennung von „Selbst“	13
1.8 Das angeborene Immunsystem der Insekten und die Prophenoloxidase (PPO)-Kaskade	14
1.9 Die neun Prophenoloxidasen von <i>Anopheles gambiae</i>	16
1.10 Zielsetzung der Arbeit	18
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Geräte	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3 Chemikalien	22
2.1.4 Puffer, Medien, Lösungen.....	22
2.1.5 Verwendete Kits	23
2.1.6 Enzyme.....	24
2.1.7 Größenmarker und Ladepuffer.....	24
2.1.8 Antikörper	24
2.1.9 Oligonukleotide.....	25
2.1.10 Vektoren.....	26
2.1.11 Zelllinien und Bakterienstämme	27
2.1.12 Tierstämme.....	27

2.2	Methoden	27
2.2.1	DNA-Methoden.....	27
2.2.1.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.1.2	Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	28
2.2.1.3	Ligation	28
2.2.1.4	DNA-Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.1.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	29
2.2.2	RNA-Methoden.....	30
2.2.2.1	Isolierung der Gesamt-RNA.....	30
2.2.2.2	Verdau genomischer DNA mit DNase I	30
2.2.2.3	Phenol-Chloroform-Extraktion von RNA	31
2.2.2.4	Semiquantitative Reverse Transkriptions (RT)-PCR.....	31
2.2.2.5	RNA-Interferenz: ssRNA-Synthese und dsRNA-Hybridisierung.....	32
2.2.2.6	Subtraktive cDNA-Hybridisierung	33
2.2.3	Protein-Methoden.....	34
2.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.2.3.2	Western Blot.....	34
2.2.3.3	Immunologischer Nachweis.....	34
2.2.4	Mikrobiologische Methoden	35
2.2.4.1	Flüssigkulturen von <i>Escherichia coli</i> Bakterien	35
2.2.4.2	Plattenkulturen	35
2.2.4.3	Dauerkulturen.....	35
2.2.4.4	Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA.....	35
2.2.5	Zellbiologische Methoden.....	36
2.2.5.1	Kultivierung von Huh7 (Humane Hepatoma) Zellen.....	36
2.2.5.2	Bestimmung der Zellzahl	37
2.2.5.3	Einfrieren und Auftauen von Huh7-Zellen	37
2.2.6	Tierexperimentelle Methoden	37
2.2.6.1	Anästhesie und Blutentnahme von Mäusen und Ratten.....	37
2.2.7	<i>Anopheles</i> -Methoden.....	38
2.2.7.1	Mücken-Aufzucht.....	38
2.2.7.2	Infektion von <i>Anopheles</i> -Mücken mit <i>P. berghei</i>	38
2.2.7.3	dsRNA-Injektion	38

2.2.7.4	Präparation des Mitteldarmes.....	38
2.2.7.5	Gewinnung der Hämolymphe	39
2.2.8	<i>Plasmodium</i> -Methoden	39
2.2.8.1	Transfektion von <i>Plasmodium berghei</i>	39
2.2.8.2	Präparation der Parasiten und <i>in vitro</i> -Kultivierung der Blutstadien.....	40
2.2.8.3	Vorbereitung der Transfektionskonstrukte.....	40
2.2.8.4	Elektroporation der Schizonten.....	41
2.2.8.5	Selektion der Parasiten	41
2.2.8.6	Herstellung von Blutstabilaten	42
2.2.8.7	Präparation genomischer DNA aus Blutstadien.....	42
2.2.8.8	Klonierung von Parasiten	43
2.2.8.9	Giemsa-Färbung und Bestimmung der Parasitämie.....	43
2.2.8.10	Analyse der Exflagellation männlicher Gametozyten.....	44
2.2.8.11	Präparation der Mitteldarmsporoziten.....	44
2.2.8.12	Präparation der Hämözölsporoziten	44
2.2.8.13	Präparation der Speicheldrüsenporoziten	45
2.2.8.14	Bestimmung der Sporozitenzahl	45
2.2.8.15	<i>gliding motility</i> -Test	45
2.2.8.16	Leberstadien-Test.....	46
2.2.8.17	Hepatozyten-Invasions-Test.....	46
3.	Ergebnisse.....	48
3.1	Teil I <i>Anopheles</i>	
	Die Rolle der neun <i>Anopheles gambiae</i> Prophenoxidasen in der Immun-	
	abwehr von <i>Plasmodium berghei</i>.....	48
3.1.1	Beteiligung der PPOs an der melanotischen Einkapselung von <i>P. berghei</i> Parasiten	51
3.1.1.1	PTU verhindert die melanotische Einkapselung von <i>P. berghei</i> Parasiten in L3-5 Mücken.....	51
3.1.1.2	PTU hat keinerlei Auswirkungen auf den Phänotyp von G3 Mücken.....	53
3.1.2	RNA-Interferenz ermöglicht die gezielte Herunterregulierung einzelner <i>PPO</i> -Gene	54
3.1.2.1	Herstellung der <i>PPO</i> -spezifischen dsRNAs.....	54

3.1.2.2	Durch RNAi wird die Expression einzelner <i>PPO</i> -Gene effizient auf Transkriptionsebene herabreguliert.....	55
3.1.2.3	DsPPO9 reguliert spezifisch die Expression des Gens herunter.....	56
3.1.2.4	RNAi reduziert die <i>PPO6</i> Expression auf Transkriptions- und Translations-ebene.....	57
3.1.3	<i>PPO1</i> , 3 - 6 und 9 werden als potentielle Kandidatengene erachtet.....	60
3.1.4	Funktionelle Analyse der Gene <i>PPO1</i> , 3 - 6 und 9.....	62
3.1.4.1	G3/dsCTL-MA2.....	63
3.1.4.1.1	Gleichzeitiger Knockdown von <i>PPO1</i> , 4 und 6 bewirkt eine partielle Reversion des Melanisierungsphänotyps von G3/dsCTL-MA2 Mücken.....	63
3.1.4.1.2	Gleichzeitiger Knockdown von <i>PPO4</i> und 6 führt erst bei hoher Infektivität zum deutlichen Rückgang der Melanisierung in G3/dsCTL-MA2 Mücken....	65
3.1.4.1.3	Nur der Einzelknockdown von <i>PPO1</i> zeigt eine verminderte Einkapselungsfähigkeit.....	66
3.1.4.1.4	Kombinierter Knockdown von <i>PPO3/5/9</i> in G3/dsCTL-MA2 Mücken bewirkt bei hoher Infektivität einen Rückgang in der Melanisierung	68
3.1.4.1.5	Weder der kombinierte KD von <i>PPO3/5</i> noch die Einzelknockdowns von <i>PPO3</i> , 5 und 9 bewirken eine Reduktion der Melanisierung in G3/dsCTL-MA2 Mücken	69
3.1.4.2	L3-5.....	71
3.1.4.2.1	Der gleichzeitige Knockdown von <i>PPO1/4/6</i> und <i>PPO3/5/9</i> in L3-5 Mücken reduziert die Anzahl eingekapselter Parasiten	71
3.2 Teil II <i>Anopheles</i>		
Speicheldrüsen-Rezeptoren von <i>Anopheles gambiae</i> als potentielle Angriffspunkte, die Übertragung von <i>Plasmodium berghei</i> Parasiten zu stoppen.....		
3.2.1	Aufbau der Speicheldrüsen	75
3.2.2	Invasionsverlauf von <i>Plasmodium</i> -Sporozoiten.....	76
3.2.3	<i>Suppression subtractive hybridization screen</i> lateral-spezifischer Speicheldrüsendene von <i>An. gambiae</i>	77
3.2.4	SGS-Familie als potentielle Rezeptoren für <i>Plasmodium</i> -Parasiten.....	78
3.2.5	Die Genexpression von <i>SGS5</i> ist nach dsRNA-Injektion nicht herunterreguliert	79

3.3	Teil III <i>Plasmodium</i>	
	Die Rolle von <i>PbUOS3</i> bei der Invasion von Speicheldrüsen und Hepatozyten.....	81
3.3.1	Das <i>UOS3</i> Gen ist spezifisch in Sporozoiten exprimiert	82
3.3.2	Die <i>UOS3</i> Genexpression beginnt bereits im Ookineten	83
3.3.3	Das <i>UOS3</i> Protein wird am stärksten in Speicheldrüsensporozoiten exprimiert	84
3.3.4	<i>UOS3</i> wird auf der Oberfläche von Sporozoiten exprimiert.....	85
3.3.5	Knockout von <i>UOS3</i> durch <i>Replacement</i> -Strategie	87
3.3.6	Genotypische Analyse der <i>uos3(-)</i> Parentalgeneration	89
3.3.7	Klonierung der <i>uos3(-)</i> Parasiten und anschließende Genotypisierung	90
3.3.8	Das <i>UOS3</i> Gen wurde erfolgreich ausgeknockt.....	91
3.3.9	Funktionelle Charakterisierung von <i>UOS3</i> in der <i>Anopheles</i> -Mücke.....	93
3.3.9.1	Die Übertragung von <i>uos3(-)</i> Speicheldrüsensporozoiten auf den Säugetierwirt ist beeinträchtigt.....	95
3.3.9.2	Die <i>uos3(-)</i> Sporozoiten akkumulieren in der Hämolymphe	96
3.3.9.3	Der Entwicklungsverlauf ist auch bei <i>uos3(-)</i> Klon II-3 identisch	97
3.3.9.4	<i>uos3(-)</i> Sporozoiten sind in ihrer <i>gliding motility</i> eingeschränkt.....	98
3.3.9.5	Analyse der <i>gliding motility</i> im Phasenkontrast-Mikroskop bestätigen die IFA-Ergebnisse.....	99
3.3.10	Invasionsverhalten der <i>uos3(-)</i> Sporozoiten im Säugetierwirt.....	101
3.3.10.1	Eingeschränktes Invasionsverhalten der <i>uos3(-)</i> Hämozölsporozoiten bei Hepatozyten <i>in vitro</i>	101
3.3.10.2	Reduzierte Infektivität von <i>uos3(-)</i> Hämozölsporozoiten bei Hepatozyten <i>in vitro</i>	103
3.3.10.3	Reduzierte Infektivität von <i>uos3(-)</i> Hämozölsporozoiten bei jungen SD-Ratten <i>in vivo</i>	104
4.	Diskussion.....	106
4.1	Teil I <i>Anopheles</i>	106
4.2	Teil II <i>Anopheles</i>	110
4.3	Teil III <i>Plasmodium</i>	112
5.	Zusammenfassung	118
6.	Summary	119
7.	Literaturverzeichnis	120

1. Einleitung

1.1 Malaria

Malaria ist eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit. Rund 300 – 600 Millionen klinische Fälle treten jährlich auf, von denen 1,5 bis 2,7 Millionen tödlich verlaufen (Snow et al., 2005).

Bis Mitte des 20. Jahrhunderts kam die Malaria in gemäßigten Breiten wie Nordeuropa, Nordamerika und Russland vor. Südeuropa galt gar als Gebiet mit hoher Transmission. Heute ist die Malaria auf Länder der Subtropen und Tropen beschränkt (Abb. 1.1); dennoch leben mehr als 40% der Weltbevölkerung in Gebieten, in denen die Krankheit endemisch oder epidemisch auftritt (WHO, 2002). Die verheerendsten Auswirkungen hat die Krankheit in Afrika südlich der Sahara, wo insgesamt 90% aller Fälle auftreten (Greenwood und Mutabingwa, 2002). Am stärksten betroffen sind Kinder unter 5 Jahren und schwangere Mütter (Beeson et al., 2000; Menendez et al., 2000; Saute et al., 2002).

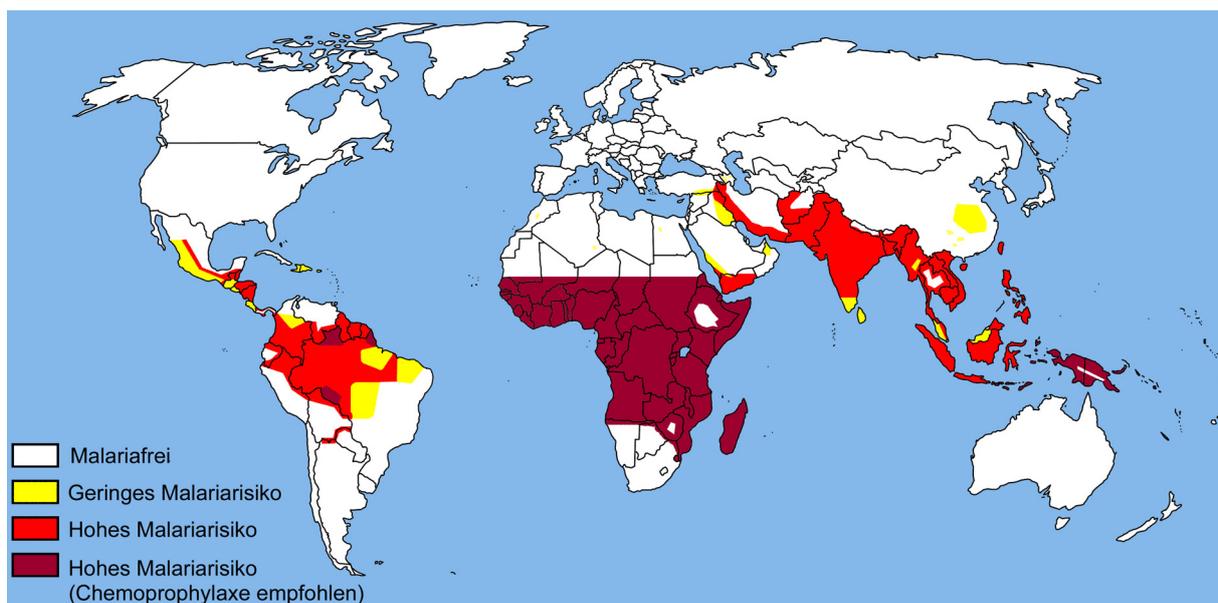


Abb. 1.1 Geographische Verbreitung der Malaria

(Grafik wurde aus der „Malaria-Enzyklopädie“ unter www.arikah.net/enzyklopadie/Malaria entnommen; Stand 2006)

Erreger der Krankheit sind einzellige Protozoen der Gattung *Plasmodium* (Stamm *Alveolata*, Unterstamm *Apicomplexa*, Klasse *Haematozoa*, Ordnung *Haemosporidia*, Familie *Plasmodiidae*; NCBI Taxonomy Browser, 2006). Von den fast 120 bekannten *Plasmodien*-Arten können nur vier Malaria beim Menschen verursachen: *Plasmodium malariae*, Erreger der Malaria quartana (Viertagefieber), *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale*, Erreger der

Malaria tertiana (gutartiges Dreitagefieber), sowie *Plasmodium falciparum*, das die verbreitetste und gefährlichste Form der Malaria auslöst – die Malaria tropica (bösaartiges Dreitagefieber); unbehandelt endet diese in etwa einem Drittel der Fälle tödlich.

Übertragen wird die Malaria durch Mücken der Gattung *Anopheles* (Stamm *Arthropoda*, Klasse *Insecta*, Ordnung *Diptera*, Unterordnung *Nematocera*, Familie *Culicidae*; NCBI Taxonomy Browser 2006), zu deren Lebensräumen warme, feuchte Sumpfbgebiete sowie stehende Gewässer zählen.

Zwei Ansätze zur Eindämmung der Krankheit wurden im wesentlichen verfolgt: Reduktion der Anzahl infizierter Mückenstiche sowie die pharmazeutische Entwicklung von Malariamedikamenten. Beide Maßnahmen wurden jedoch durch die Bildung von Resistenzen sowohl auf Vektor- als auch Parasitenseite erheblich beeinträchtigt.

Änderungen der Landschaftsstruktur – wie die Trockenlegung von Sümpfen, Fortschritte im Hausbau und die gezielte Vektorkontrolle trugen dazu bei, die Krankheit in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts in den Vereinigten Staaten und großen Teilen Europas auszulöschen. Zusätzlich wurde in den 1950er und 1960er Jahren das Insektizid Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) in einem weltweiten Programm zur Ausrottung der Malaria eingesetzt. Die anfänglich großen Erfolge wurden jedoch durch das massive Auftreten von Resistenzen zunichte gemacht (Chow 1958; Luen and Shalbaby 1962; Soerono et al., 1965).

Neben der Dezimierung des Vektor-Wirt-Kontakts basiert die Malariakontrolle auf dem Einsatz neuer Medikamente. Zahlreiche Wirkstoffe, die von Quinolinen, Artemisininen, Antifolaten bis hin zu Antibiotika reichen, greifen das erythrozytäre Stadium des Parasiten im Menschen an. Zunehmende Resistenzbildung gegen die beiden meist genutzten Malariamedikamente – Chloroquin und Pyrimethamin, erfordern die Identifizierung neuer Angriffspunkte (*Targets*) beim Parasiten sowie die Optimierung und Kombination bekannter Malariatherapeutika. Daneben gewinnt auch die Vakzine-Forschung zunehmend an Bedeutung (Müller et al., 2005).

Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms, sowie das von *Plasmodium falciparum* und *Anopheles gambiae* besteht die Möglichkeit, weitreichendere Einblicke auf molekularer und genetischer Ebene der Vektor-Mensch und Wirt-Parasiten Interaktionen zu erlangen. Neue *Targets* für die Malariabekämpfung könnten durch die Erforschung der Physiologie und Immunität der *Anopheles* Mücke geliefert werden. Derzeitige Erkenntnisse liefern den Beweis, dass es Faktoren in der Mücke gibt, die den Parasiten sowohl töten als auch beschützen können. Die Technologien zur Erzeugung transgener Mücken im Feld, die

resistent gegen Malaria sind, bzw. die Entwicklung von Malariamedikamenten für Mücken, welche die protektiven Komponenten eliminieren, sind auf dem Vormarsch.

1.2 Klinische Symptomatik

Malaria tropica wird durch die Infektion mit *Plasmodium falciparum* verursacht. Den benignen Malariaformen – Malaria tertiana und quartana – liegen Infektionen mit *P. vivax* oder *P. ovale* und *P. malariae* zugrunde. In der Regel treten schwere Verläufe mit Beteiligung unterschiedlicher Organsysteme und Todesfälle nur bei der Malaria tropica auf.

Die akute Malaria beginnt nach einer Inkubationszeit von ca. 7 – 14 Tagen zunächst mit uncharakteristischen, grippeähnlichen Beschwerden wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen. Erst im Verlauf der Krankheit entwickelt der Patient die für die Malaria (Wechselfieber) charakteristischen, periodisch wiederkehrenden Fieberschübe, die 8 – 12 Stunden andauern können. Die Schübe sind neben dem ausgeprägten Fieberanstieg durch Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Rückenschmerzen, Übelkeit und Erbrechen gekennzeichnet.

Das klinische Bild der Malaria wird durch die Vorgänge bei der erythrozytären Schizogonie des Parasiten bestimmt. Mit der Hämolyse der infizierten roten Blutkörper durch die Merozoiten werden Toxine des Parasiten freigesetzt, die bei den Makrophagen die Bildung von Cytokinen (wie $\text{TNF}\alpha$) und Interleukin-1 induzieren. Schüttelfrost und hohes Fieber sind die Folge. Dieser Vorgang wiederholt sich entsprechend dem erythrozytären Zyklus des Parasiten alle 48 Stunden bzw. bei *Plasmodium malariae* alle 72 Stunden.

Eine unkomplizierte Malaria kann sich bei Sequestrierung parasitär befallener Erythrozyten im Kapillarnet innerer Organe rasch zum Vollbild einer schweren und komplizierten Malaria entwickeln. Diese geht mit lebensbedrohlichen Komplikationen einher. Im Vordergrund steht die zerebrale Malaria. Aber auch andere Organsysteme sind betroffen. Nieren-, Lungen und Herzkreislaufversagen sowie hämolytische Anämie und Azidose enden ebenfalls tödlich (Sherman 1995).

Die Intensität der Manifestation einer *Plasmodium*-Infektion hängt vom Grad der Immunität des Infizierten ab. Kinder unter 5 Jahren und schwangere Mütter sind am stärksten betroffen. Bei älteren Kindern und Erwachsenen kommt es trotz weiterhin hoher Infektionsrate häufiger zu asymptomatischen Infektionen und nur selten zu letal endenden Krankheitsverläufen (Bottius et al., 1996; May et al., 1999). Ursache hierfür ist die Entwicklung einer klinischen Immunität, die vor der Erkrankung, nicht aber vor der Infektion *per se* schützt. Diese Semi-

Immunität entsteht durch wiederholte Infektionen mit *P. falciparum* und ständige Neuinfektionen sind notwendig, um sie aufrecht zu erhalten (Wenk und Renz, 2003).

Bei *P. vivax* und *ovale* können Rückfälle (Rezidive) von bis zu 2 bzw. 5 Jahren durch Dauerformen des Parasiten, sog. Hypnozoite, verursacht werden, die längere Zeit in der Leber verweilen können, bevor sie sich vermehren. Ein erneutes Auftreten von Symptomen bei *P. falciparum* ist auf eine persistierende Infektion im Blut zurückzuführen.

1.3 Lebenszyklus des Malaria-Modell-Erregers *Plasmodium berghei*

Plasmodium berghei ist einer von vier Malaria-Erregern, der in afrikanischen Nagetieren beschrieben wurde. Nach seiner Entdeckung durch Vincke und Lips im Jahre 1948 wurde er bald in der Forschung eingesetzt, um die Pathologie und Biologie von *Plasmodien in vivo* besser analysieren zu können. Die Malariaparasiten der Nagetiere gelten als wertvolle Modellorganismen für die Untersuchung menschlicher Malaria, da sie in den meisten essentiellen Aspekten wie Morphologie, Physiologie und Lebenszyklus einander ähnlich sind und die Manipulation des vollständigen Lebenszyklus dieser Parasiten, inklusive der Infektion der Mücken, einfach und sicher ist.

Bei dem natürlichen Wirt von *P. berghei* handelt es sich um die Galeriewaldratte *Grammomys surdaster*, sowie *Praomys surdaster* und *Leggada bella*, die vor allem im östlichen Zaire beheimatet sind (Lucius und Loos-Frank, 1997). Der natürliche Überträger von *P. berghei* ist *An. durenii millescampsii*, wobei für medizinisch-biologische Studien die unter Laborkonditionen verhältnismäßig einfach zu haltende Art *Anopheles stephensi* als Vektor verwendet wird.

Plasmodien sind obligate intrazelluläre Parasiten. Ihr Lebenszyklus umfasst einen komplexen Generationswechsel in zwei Wirten. Durch den Stich einer infizierten weiblichen *Anopheles* Mücke gelangen haploide infektiöse Parasitenformen, die Speicheldrüsensporoziten, in den Blutkreislauf des Säugetiers (Abb. 1.2). Nach einer kurzen Zeitspanne von nur 30 Minuten dringen die Sporoziten über das Endothel in die Hepatozyten ein und durchlaufen dort innerhalb von 47 bis 52 Stunden die erste ungeschlechtliche Vermehrung, die auch als exoerythrozytäre Schizogonie bezeichnet wird. Sie endet nach 2 – 3 Tagen mit dem Aufplatzen der vollständig mit Merozoiten ausgefüllten Leberzellen. Pro Hepatozyt werden mehrere tausend haploide Merozoiten in den Blutkreislauf freigesetzt, die im Gegensatz zu *P. falciparum* bevorzugt junge Retikulozyten anstelle ausgereifter Erythrozyten befallen. Bei ansteigender Parasitämie dringen sie jedoch auch in letztere ein (Deharo et al., 1996). In den

Retikulozyten bzw. Erythrozyten durchlaufen die Parasiten eine zweite ungeschlechtliche Vermehrung (intra-erythrozytäre Schizogonie), bei der sich die Merozoiten über Ring- und Trophozystenstadium zum reifen Schizonten entwickeln, der wiederum in mehrere Merozoiten zerfällt. Letztere werden durch Ruptur der umgebenden Zelle entlassen und infizieren sofort neue Retikulozyten bzw. Erythrozyten. Die erythrozytäre Entwicklung bei *P. berghei* dauert im Gegensatz zu *P. falciparum* (48 Stunden) nur 22 bis 24 Stunden.

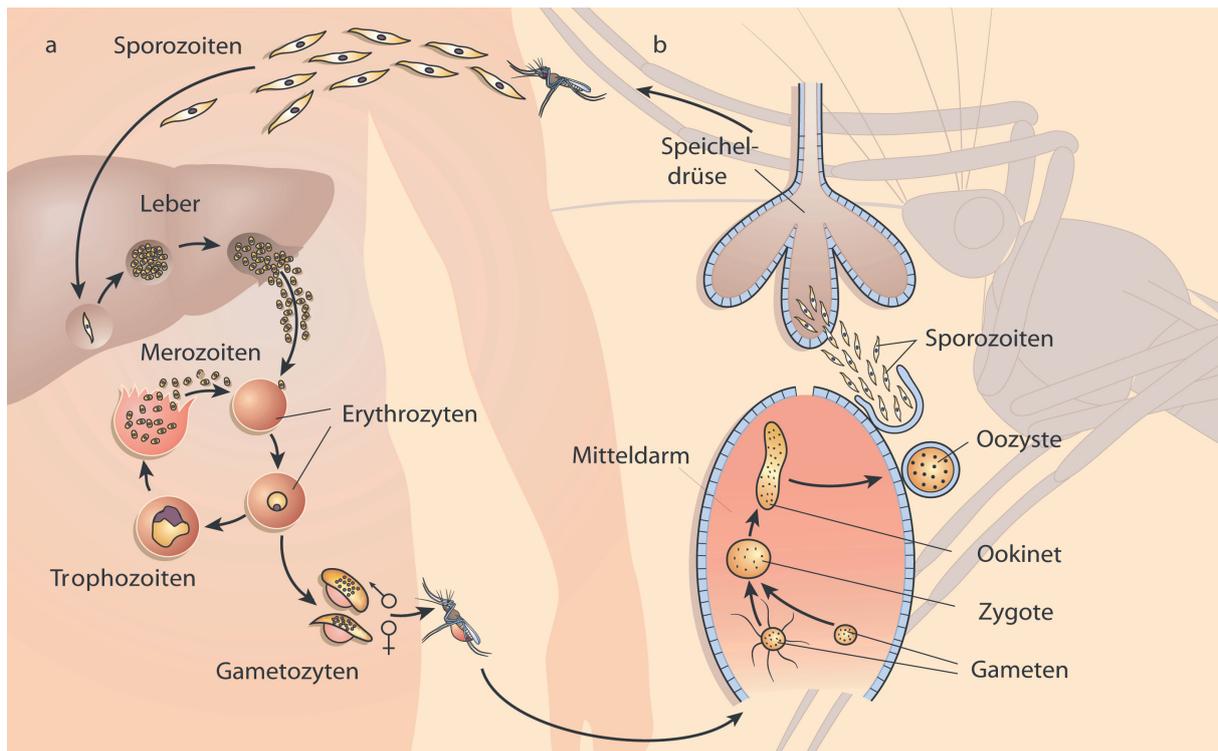


Abb. 1.2 Lebenszyklus der humanpathogenen *Plasmodium*-Erreger

Der *Plasmodium*-Parasit wird durch den Stich einer *Plasmodium*-infizierten *Anopheles* Mücke auf den Vertebratenwirt übertragen. Entscheidende Differenzierungsschritte finden im Wirt (a) und Vektor (b) statt, um den asexuellen und sexuellen Lebenszyklus des Erregers abzuschließen. (Grafik modifiziert von Wirth, 2002)

Während jeder ungeschlechtlichen Vermehrung reift ein kleiner Teil der Merozoiten zu den Vorläufern der Geschlechtsformen heran, den weiblichen Makro- bzw. den männlichen Mikrogametozyten. Werden diese von einer *Anopheles*-Mücke während des Blutsaugens aufgenommen, lösen die physiologischen Bedingungen im Darm der Mücke (Temperaturabfall von 5°C, pH-Wert zwischen 7,4 und 8,3) sowie der Gametozyten-Aktivierungsfaktor Xanthurensäure (Billker et al., 1998; Garcia et al., 1998) die Differenzierung zu weiblichen und männlichen Gameten aus. Die männlichen Mikrogametozyten entwickeln sich hierbei durch Exflagellation zu jeweils vier bis acht begeißelten Mikrogameten.

Die beiden haploiden Gameten fusionieren zur Zygote, die sich weiter zum beweglichen Ookineten differenziert. Dieser durchdringt die Darmwand und reift zwischen Epithel und Basallamina zur Oozyste heran. Im Innern der Oozyste bilden sich durch mitotische Teilung (Sporogonie) Tausende von Tochterzellen, die sogenannten Mitteldarmsporozoiten. Durch Aufplatzen der Oozyste werden sie in das Hämözöl der Mücke freigesetzt und invadieren die Speicheldrüsen. Bei der nächsten Blutmahlzeit werden sie mit dem Speichel wieder auf einen Säuger übertragen und schließen damit den Lebenszyklus.

Obwohl sich das menschliche Immunsystem von dem der Nagetiere unterscheidet und sich die Pharmakokinetik von Medikamenten im Menschen anders auswirkt als in Mäusen oder Ratten, haben alle Malaria-Erreger der Säuger einen vergleichbaren Lebenszyklus, erzeugen ähnliche Krankheitsbilder und sind gegenüber den gleichen Medikamenten sensitiv (Sherman 1998).

1.4 Biologie und Fortbewegung der *Plasmodium*-Sporozoiten

Sporozoiten gehören zu den invasiven Stadien des Malaria-Erregers. Es handelt sich um längliche Zellen mit einer klaren Polarisation. Ihre Form wird durch Mikrotubuli aufrechterhalten, die an einem anterioren polaren Ring befestigt sind und der Länge nach unterhalb der Pellikula verlaufen. Die Pellikula selbst setzt sich aus einer äußeren Plasmamembran und zwei eng nebeneinander liegenden inneren Membranen zusammen, die auch als *inner membrane complex* (ICM) bezeichnet werden (Morrissette und Sibley, 2002). Dazwischen liegt der sog. kortikale Raum. Der anteriore Zellpol – auch Apikalkomplex genannt – ist taxonomisches Kriterium für die Zuordnung zum Unterstamm der Apikomplexa und beinhaltet sekretorische Vesikel (Rhoptrien) und Mikronemen. Diese beiden Strukturen sind nur in den invasiven Stadien vorhanden und an der Bindung und Invasion der Wirtszellen beteiligt.

Die *Plasmodium*-Sporozoiten sind die Stadien, die den Wirtswechsel im Lebenszyklus des Parasiten vollziehen. Sie besitzen die einzigartige Fähigkeit, zwei vollkommen verschiedene Wirtsorgane zu invadieren – die Speicheldrüse der Mücke und die Leber der Säugetiere.

In der Mücke müssen die Sporozoiten beim Erreichen der Speicheldrüse zunächst die Basallamina überqueren und über die darunterliegenden sekretorischen Zellen in den Speichelkanal gelangen (Pimenta et al., 1994), um beim Saugakt der Mücke auf den neuen Wirt übertragen werden zu können. Durch die Blutmahlzeit der Mücke werden die Sporozoiten unter die Haut des Säugetiers injiziert und durchdringen das Endothel der

Blutgefäße (Sidjanski und Vanderberg, 1997). In der Leber gleiten die Sporozoiten entlang der Blutsinusoide – sowohl mit als auch gegen den Blutstrom – bis zu den Kupfer-Zellen und invadieren das Leberparenchym. Hier durchqueren sie zunächst mehrere Hepatozyten und hinterlassen dabei eine Spur toter Zellen, bis sie schließlich in einer Zelle bleiben und sich dort durch exo-erythrozytäre Schizogonie zur exo-erythrozytären Form (EEF) weiterentwickeln (Frevert et al., 2005).

Bei den *Plasmodium*-Sporozoiten sind zwei Proteine zu nennen – CSP und TRAP, die als multifunktionale Moleküle essentielle Aufgaben während des gesamten Sporozoiten-Stadiums übernehmen.

Das *circumsporozoite protein* (CSP) ist das Hauptoberflächenprotein von Speicheldrüsen-sporozoiten (Yoshida et al., 1980). Es wird überwiegend in den Mikronemen gespeichert, von dort kontinuierlich an die Zelloberfläche transportiert und am posterioren Ende des Sporozoiten abgespalten (Stewart et al., 1991). Das Protein ist über einen GPI-Anker (Glycosyl-Phosphatidylinositol) mit der Zellmembran verbunden (Sinnis und Nardin, 2002) und besitzt eine hochkonservierte Region – die sog. Region II-plus. Es wird postuliert, dass die Bindung zwischen Sporozoiten und Hepatozyten während der Leberzellinvasion durch die spezifische Interaktion der Region II-plus mit HPGs (*heparan sulfate proteoglycans*) vermittelt wird (Frevert et al., 1993). Darüberhinaus vermittelt CSP auch die Adhäsion der Sporozoiten an die Speicheldrüsenzellen der Mücke (Sidjanski et al., 1997; Ménard, 2001) und ist an der Morphogenese von Sporozoiten innerhalb der Oozyste beteiligt (Ménard et al., 1997)

Eine ähnliche duale Funktion besitzt das *thrombospondin-related anonymous protein* (TRAP). Das Protein ist in den Mikronemen lokalisiert (Rogers et al., 1992) und akkumuliert beim Kontakt mit der Wirtszelle am anterioren Pol der Sporozoiten (Gantt et al., 2000). Im Gegensatz zu CSP ist TRAP ungleichmäßig auf der Oberfläche des Sporozoiten verteilt (Rogers et al., 1992). Es handelt sich um ein Typ I – Transmembranprotein, dessen extrazelluläre Domäne aus zwei adhäsiven Domänen besteht, der A-Domäne des von Willebrand Faktors und des *thrombospondin type I repeats* (TSR) (Ménard, 2001). Knockoutstudien in *P. berghei* haben gezeigt, dass TRAP für die Fortbewegung der Sporozoiten sowie für die Invasion der Speicheldrüsen im Vektor und die Infektivität im Säugetierwirt essentiell ist (Sultan et al., 1997; Wengelnik et al., 1999)

Auf ihrem Weg vom Mitteldarm des Vektors bis hin zur Leber des Säugetiers müssen die Sporozoiten stets beweglich sein. Obwohl sie keine Geißeln oder Flagellen besitzen, können sie sich auf festem Substrat gleitend fortbewegen. Diese, als *gliding motility* bezeichnete

Bewegung ist gekennzeichnet durch das Fehlen jeglicher Veränderungen in der Zellform und ist ausschließlich in Apikomplexa zu finden.

Sowohl *gliding motility* als auch die Invasion von Wirtszellen werden vom gleichen zytoplasmatischen Motor gesteuert. (Ménard 2001; Sibley, 2004). Aufgrund der Beobachtung, dass invasive Parasitenstadien in der Lage sind, Moleküle zu verschieben, die an ihre Oberfläche gebunden sind (Dubremetz und Ferreira, 1978), geht man von einem *capping*-Modell aus (Russell, 1983; King, 1988). Demnach werden Oberflächenliganden des Parasiten, die transmembran mit dem Motor verbunden sind, am anterioren Zellpol exprimiert und zum posterioren Zellpol transportiert. Die Bindung an ein festes Substrat würde in einer Vorwärtsbewegung resultieren, die Bindung an Oberflächenrezeptoren von Wirtszellen zum Eindringen in die Zelle.

Ein aktuelles Modell der molekularen Motormaschinerie wird nachfolgend eingehender beschrieben (Abb. 1.3). Es handelt sich hierbei um einen Aktin-Myosin Motor, dessen Myosin – das sog. MyoA - eine eigene Klasse (XIV) bildet und ausschließlich in Apikomplexa zu finden ist (Heintzelmann und Schwarzmann, 1997; Meissner et al., 2002). Myo A ist über zwei Proteine (*MyoA tail interacting protein* = MTIP und *MyoA docking protein* = MDP) an der äußeren Membran des IMC (*inner membrane complex*) gebunden und ragt in den kortikalen Raum. Dort interagiert es mit filamentösen Aktin (F-Aktin). Die Proteine, die den intrazellulären Aktin-Myosin Motor mit dem extrazellulären Substrat verbinden, gehören zur TRAP-Familie (Sultan et al., 1997; Kappe et al., 1999). TRAP ist über seine zytoplasmatische Domäne mit Aldolase verbunden, die wiederum über Aktin die Verknüpfung zur Motormaschinerie herstellt (Buscaglia et al., 2003; Jewett und Sibley, 2003). Charakteristisch für die zytoplasmatische Domäne der TRAP-Familie ist der subterminale Tryptophanrest gemeinsam mit zwei nicht-zusammenhängenden Bereichen negativ geladener Aminosäuren.

Für die Fortbewegung wird TRAP vom Aktin-Myosin Motor zum posterioren Pol des Sporozoiten gezogen. Da der extrazelluläre Teil von TRAP am Substrat gebunden ist, führt dies zu einer Vorwärtsbewegung des Sporozoiten (Kappe et al., 2004). TRAP wird während der Lokomotion proteolytisch gespalten und als verkürzte Form, ohne das zytoplasmatische Ende, auf dem Substrat hinterlassen (Kappe et al., 1999).

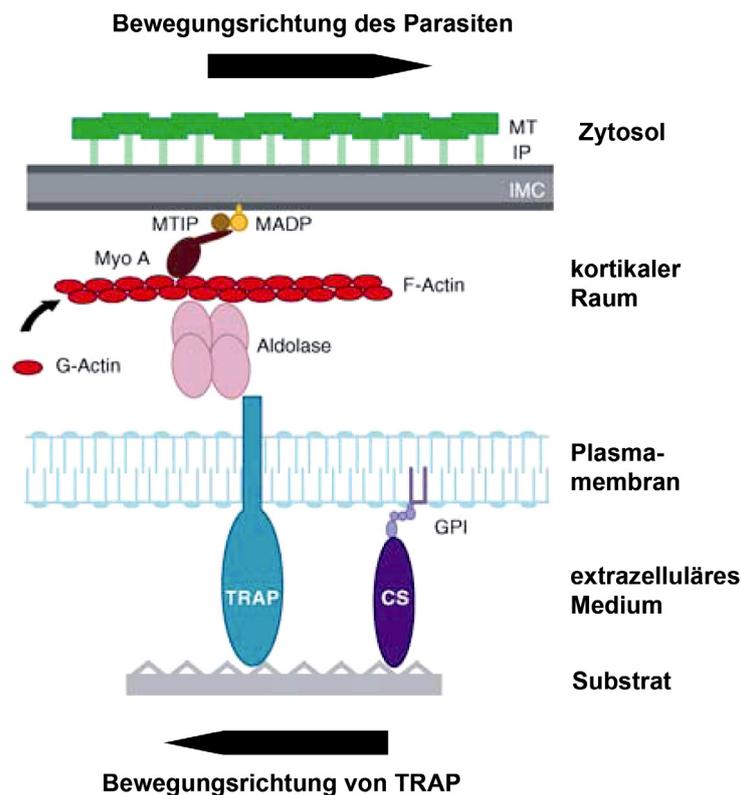


Abb. 1.3 Aktuelles Modell der molekularen *gliding motility* Maschinerie

Die schematische Darstellung zeigt eine Vergrößerung der peripheren Bereiche des Sporozoiten und die mögliche Anordnung von Komponenten der Motormaschinerie. MTIP ist über die Interaktion mit MADP an die äußere Membran des IMC gebunden. MTIP bindet an die Schwanzdomäne von MyoA, welches mit Aktinfilamenten interagiert. An diesen Mikrofilamenten ist der zyttoplasmatische Teil von TRAP über Aldolase gebunden. Der extrazelluläre Teil von TRAP und das in der Plasmamembran verankerte CSP interagieren mit dem Substrat. Die Bewegungsrichtung des Parasiten bzw. von TRAP sind mit Pfeilen angegeben. (Abb. modifiziert von Kappe et al., 2004)

Ein problematischer Punkt im derzeitigen Motor-Modell ist jedoch, dass F-Aktin kaum in invasiven Stadien der Apikomplexa nachzuweisen ist. In *Toxoplasma* Tachyzoiten ist F-Aktin nur durch elektronenmikroskopische Studien (Schatten et al., 2003) oder durch die Verwendung von Aktin-polymerisierenden Substanzen – wie z.B. Jasplakinolid (Shaw und Tilney, 1999; Wetzel et al., 2003) nachzuweisen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Polymerisation von Aktin der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der *gliding motility* ist (Kappe et al., 2004).

1.5 Lebenszyklus des Malaria-Vektors *Anopheles gambiae*

Die Unterfamilie der *Anophelinae* gehört neben den *Culicinen* zur Familie der *Culicidae* (Ordnung *Diptera*; Harbach und Kitching, 1998). Sie umfasst die beiden Gattungen *Anopheles* und *Chagasia* (Sallum et al., 2000).

Die weltweit effizientesten Vektoren der menschlichen Malaria werden vom *Anopheles gambiae sensu lato* (s.l.) Komplex gestellt. Er besteht aus sechs morphologisch nicht unterscheidbaren Arten (Powell et al., 1999), die für rund 80% der Krankheitsfälle in Afrika südlich der Sahara verantwortlich sind.

Die beiden wichtigsten Überträger des Komplexes, *An. gambiae sensu stricto* (s. s.) und *An. arabiensis*, sind weitestgehend sympatrisch, wobei letztere eher in trockenen Regionen verbreitet ist. *An. gambiae s. s.* untergliedert sich in zwei molekulare Formen – M und S, die vermutlich reproduktiv voneinander isoliert sind (della Torre et al., 2001; Favia et al., 2001). Die M-Form zeichnet sich durch eine höhere Vektorkapazität aus, bedingt durch ihre bevorzugte Lebensweise in der Nähe menschlicher Populationen.

Sowohl männliche als auch weibliche *An. gambiae* verwenden den Zucker aus Pflanzensäften als Energiequelle. Die weiblichen Mücken benötigen darüber hinaus das Blut von Vertebraten als Proteinquelle, um die für die Eier notwendigen Eiweiße zu synthetisieren. *An. gambiae sensu stricto* zeichnet sich durch eine extreme Vorliebe für menschliches Blut aus und hält sich daher bevorzugt in der Nähe menschlicher Behausungen auf. Die weiblichen Mücken können ihre erste Blutmahlzeit frühestens ein bis zwei Tage nach dem Schlüpfen zu sich nehmen; solange benötigt der Darm für die Ausreifung. Während dieser ersten beiden Tage nach dem Schlüpfen findet die Paarung statt. Die Weibchen paaren sich nur ein Mal. Die Spermien werden in sog. Spermatheken gespeichert, um später ganze Ladungen von Eiern zu befruchten. Zwei bis drei Tage nach der Blutmahlzeit legen die weiblichen *Anopheles* Mücken 50 – 200 Eier an der Wasseroberfläche stehender Gewässer oder feuchter Erdreie ab. Die Larven schlüpfen ein bis zwei Tage nach der Eiablage. Es gibt insgesamt vier Larvenstadien, die sich im Wasser von Mikroorganismen und Detritus ernähren. Die Entwicklung zum Puppenstadium, das ebenfalls aquatisch ist, ist innerhalb von 8 – 10 Tagen abgeschlossen. Die Puppe benötigt etwa 1 – 4 Tage für die vollständige Metamorphose zur adulten Mücke. Sowohl männliche als auch weibliche Mücken benötigen mindestens 24 Std., um ihre sexuelle Reife zu erlangen. Weibliche Mücken suchen nach der Paarung unmittelbar nach Blut. Adulte Mücken haben eine Lebensspanne von zwei bis drei Wochen. Diese Langlebigkeit ist essentiell für die Vollendung des sexuellen Lebenszyklus des *Plasmodium*-Erregers in der Mücke.

1.6 *Anopheles gambiae* als Modellorganismus zur Erforschung der angeborenen Immunabwehr

Insekten stellen mit über einer Millionen Arten die erfolgreichste Gruppe in der Evolution dar. Die Tatsache, dass viele Insektenarten an Orten leben, die besonders reich an Mikroorganismen sind, und selbst die kleinste Verwundung ein hohes Infektionsrisiko in solch einer Umgebung darstellt, deutet auf das Vorhandensein effektiver Abwehrmechanismen hin.

In der Tat besitzen Insekten ein komplexes Immunsystem, das mit der angeborenen Immunität der Vertebraten vergleichbar ist. Es umfasst humorale und zelluläre Reaktionen und bietet eine rasche und unspezifische Abwehr gegen eindringende Pathogene. Sie verfügen jedoch nicht über eine adaptive Immunantwort, die hochgradig spezifisch ist und gleichzeitig einen erhöhten Schutz gegen eine erneute, spätere Infektion mit demselben Erreger bietet (immunologisches Gedächtnis).

Pathogene können über die Epidermis, die Tracheen, durch Wunden, spezialisierte Invasionsmechanismen oder mit der Nahrungsaufnahme in das Insekt eindringen. So oder so wird der Erreger umgehend mit einer Vielzahl verschiedener Abwehrmechanismen konfrontiert, die durch die Erkennung von „Selbst“ und „Fremd“ ausgelöst werden und oft aufeinander abgestimmt sind.

Die Entschlüsselung des *An. gambiae* Genoms, sowie Fortschritte bei „reverse-genetics“-Ansätzen und der raschen Durchmusterung genomischer Datensätze haben die Mücke zu einem neuen attraktiven Modell für die Erforschung der angeborenen Immunabwehr in Insekten werden lassen. *Anopheles*-Mücken sind in der Lage, wirkungsvolle Immunantworten gegen pathogene Organismen hervorzurufen und zeigen bei *Plasmodium*-Infektionen eine dramatische Reduktion der Parasiten-Zahl, vor allem bei deren Mitteldarmpassage (*reviewed* von Blandin und Levashina, 2004; Abb. 1.4). Weitere Erkenntnisse über die molekularen Interaktionen zwischen Mücke und Malaria-Erreger können neue Möglichkeiten eröffnen, die Krankheit zu bekämpfen.

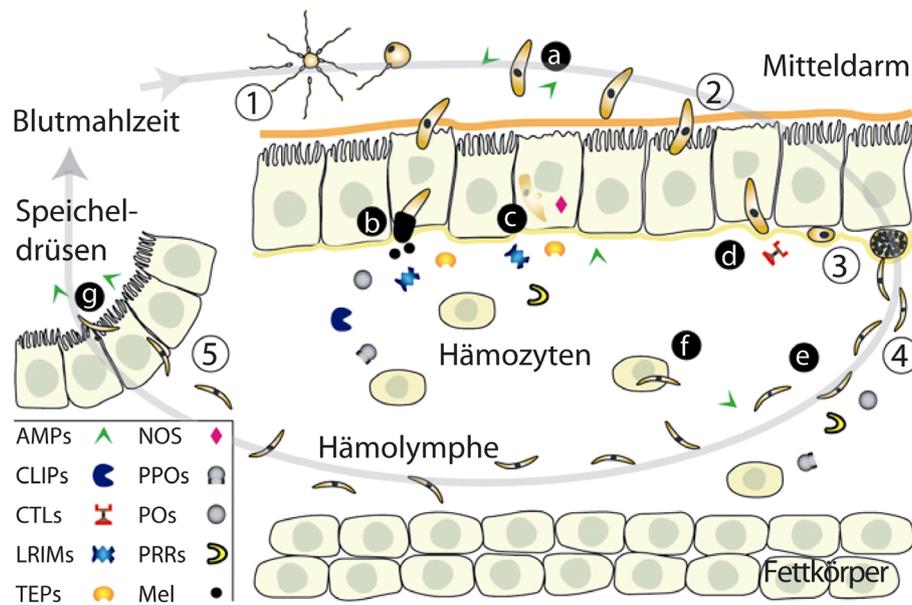


Abb. 1.4 Übersicht des sexuellen Lebenszyklus von *Plasmodium* und damit verbundene Immunreaktionen in der Mücke

1) Gametozyten-Aktivierung und Befruchtung der Gameten. 2) Ookineten-Invasion des Mitteldarmepitheliums ca. einen Tag nach der Infektion. 3) Bildung der Oozyste. Innerhalb der Oozyste entstehen durch wiederholte mitotische Teilungen Tausende von Sporozoiten. 4) Ruptur der Oozyste und Freisetzung der Sporozoiten in die Hämolymphe. 5) Speicheldrüseninvasion der Sporozoiten. Mit der nächsten Blutmahlzeit werden die Parasiten auf einen neuen Wirt übertragen. a) Große Verluste auf Parasitenseite finden während den ersten 24 Stunden nach der Infektion statt. Diese Verluste sind vermutlich teilweise auf Immunreaktionen der Mücke zurückzuführen – wie z.B. die Sezernierung antimikrobieller Peptide (AMPs). b) Melanisierung von Ookineten in einem melanisierenden, resistenten Mücken-Stamm. Immunkomponenten wie TEPs und LRIMs spielen eine Rolle bei der Tötung von Parasiten und deren nachfolgender Melanisierung, die auf proteolytisch aktivierte Prophenoloxidasen (PPO, PO) zurückzuführen ist und durch erhöhte Mengen an reaktiven Sauerstoffintermediaten begünstigt sein könnte. c) Ein Großteil der Ookineten wird im Zytoplasma der Mitteldarmzellen lysiert. Die vermehrte Produktion von Stickoxid, hergestellt von der Stickoxid-Synthase (NOS), und andere reaktive Komponenten könnten zur Abtötung der Ookineten führen. d) Einige Ookineten entkommen auf die Basalseite des Mitteldarmepitheliums und entgehen Immunreaktionen durch Interaktionen mit C-Typ Lektinen (CTLs). e) Die Ruptur der Oozysten und Freisetzung der Sporozoiten fällt mit einer weiteren Immunabwehr zusammen, die vermutlich durch den Fettkörper hervorgerufen wird. f) Phagozytose und/oder die zelluläre melanotische Einkapselung von *Plasmodium gallinaceum* Sporozoiten durch Hämocyten in der Hämolymphe wurden in *Aedes aegypti* beobachtet. g) Die Induktion von Immunsystemkomponenten ist auch während der Sporozoiteninvasion in die Speicheldrüsen der Mücke beobachtet worden. (Abbildung modifiziert von Christophides et al., 2004)

1.7 Erkennung von „Selbst“

Die Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ wird bei der angeborenen Immunabwehr durch sog. Fremderkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*; PRRs) vermittelt (Janeway, 1989). Im Gegensatz zu den Antikörpern der erworbenen Immunität erkennen sie keine bestimmte Peptidsequenz sondern charakteristische Strukturen von Molekülen, die auf der Oberfläche von Mikroorganismen vorhanden sind (*pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs) – wie z.B. bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykan (PGLC) oder β -1,3-Glukan von Pilzen. Mitglieder folgender Genfamilien können als PRRs fungieren: Peptidoglykan-Erkennungsproteine (PGRPs), Gram-negative Bindungsproteine (GNBPs), C-Typ Lektine (CTLs), Thioester-enthaltende Proteine (TEPs), *Scavenger*-Rezeptoren (SCRs), Galektine (GALEs) oder Fibrinogen-Domänen ähnliche Immunolektine (FBNs). Sie leiten die Induktion verschiedener Signaltransduktionswege ein, die sowohl zu einer humoralen als auch zellulären Immunantwort führen können. Einige Mitglieder dieser Genfamilien wurden in *An. gambiae* bereits erfolgreich charakterisiert; auf zwei von ihnen wird im nachfolgenden näher eingegangen.

C-Typ Lektine (CTLs) binden über eine konservierte Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne an eine Reihe von Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen. Sie vermitteln die Einleitung zellulärer und humoraler Immunantworten in einer Reihe von Insektenarten (Fujita et al., 1998; Weis et al., 1998; Natori, 2001). In *Manduca sexta* leitet z.B. die CTL-Aktivierung, ausgelöst durch Lipopolysaccharide, die Melanisierung ein (Yu et al., 1999). CTLs können entweder sezerniert werden oder membrangebunden sein. In *Anopheles gambiae* wurden zwei CTLs identifiziert – CTL-4 und CTL-MA2 – die sich der *Plasmodium*-Erreger zu nutze macht, um sich vor einer Immunantwort der Mücke während der Durchquerung des Mitteldarmepithels zu schützen (Osta et al., 2004).

Thioester-enthaltende Proteine (TEPs) sind durch ihre Struktur charakterisiert. Der wichtigste Aspekt hierbei besteht in der Ausbildung einer intramolekularen, hochreaktiven Thioester-Bindung. Die Komplementfaktoren C3 – C5 der Vertebraten sowie das komplement-fremde Protein α_2 -Makroglobulin zählen zu dieser Gruppe. In *An. gambiae* konnte die transkriptionelle Hochregulierung bei drei von 15 TEPs nach Infektion mit *Plasmodien* oder Bakterien gezeigt werden (Oduol et al., 2000; Christophides et al., 2002). TEP1 vermittelt die Phagozytose gram-negativer Bakterien in einer Hämozyten-ähnlichen Zelllinie von *Anopheles* (Levashina et al., 2001) und dezimiert dramatisch die Anzahl der *Plasmodien*-Erreger während der Mitteldarmpassage (Blandin et al., 2004).

1.8 Das angeborene Immunsystem der Insekten und die Prophenoloxidase (PPO)-Kaskade

Die Immunantwort der Insekten, hervorgerufen durch invadierende Pathogene, beinhaltet humorale und zelluläre Komponenten. Zur humoralen Immunabwehr gehören die Prophenoloxidase-Kaskade (PPO-Kaskade) (Zhao et al., 1995), induzierbare antimikrobielle Peptide (Lowenberger, 2001) sowie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffintermediate (Luckhart et al. 1998; Kumar et al., 2003). Die zelluläre Abwehr wird durch Hämozyten vermittelt und umfasst Phagozytose (Hernández-Martínez et al., 2002) und die Einkapselung größerer Fremdkörper wie Parasitoide oder Nematoden, bei der sich mehrere Schichten aus Hämozyten an den Eindringling anlagern (Lavine und Strand, 2002).

Eine Besonderheit der Dipteren ist die zellfreie, humorale Kapselbildung, bei der Pathogene durch Melanin „verklebt“ und unschädlich gemacht werden (Paskewitz und Gorman, 1999). Dieser Abwehrmechanismus verleiht einigen Mückenarten und -stämmen Resistenz gegenüber Mikrofilarien- und *Plasmodium*-Infektionen (Collins et al., 1986; Beerntsen et al., 1989).

Vor allem die Synthese und Funktion antimikrobieller Peptide sowie die auf der Phenoloxidase-basierten Melanisierungsreaktion stehen im Mittelpunkt immunologischer Forschungen bei Insekten.

Die Aktivierung der PPO-Kaskade wird durch mikrobielle Zellwandkomponenten wie Lipopolysaccharide, Peptidoglykane und β -1,3-Glukane ausgelöst (Ochiai et al., 1999; Lee et al., 2000; Ma und Kanost, 2000) (Abb. 1.5). Erkennung und Bindung dieser PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) durch entsprechende Rezeptoren aktiviert eine oder mehrere Clip-Domänen-Serinproteasen, die wiederum aktive Phenoloxidase(n) durch den Schnitt an einer spezifischen Peptidbindung in der Nähe des N-Terminus erzeugt. Charakteristisch für die Serin-Proteasen sind mindestens ein N-terminales Cystein-Motiv (Clip-Domäne) sowie ihre Induktion nach bakterieller Infektion (Jiang et al., 1998; Lee et al., 1998; Jiang et al., 2003). Jüngste Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass die beiden Clip-Domänen-Serinproteasen – ClipB14 und ClipB15 – von *An. gambiae* bei der Tötung von *Plasmodium*-Ookineten während der Überquerung des Mitteldarmepithels eine Rolle spielen (Volz et al., 2005).

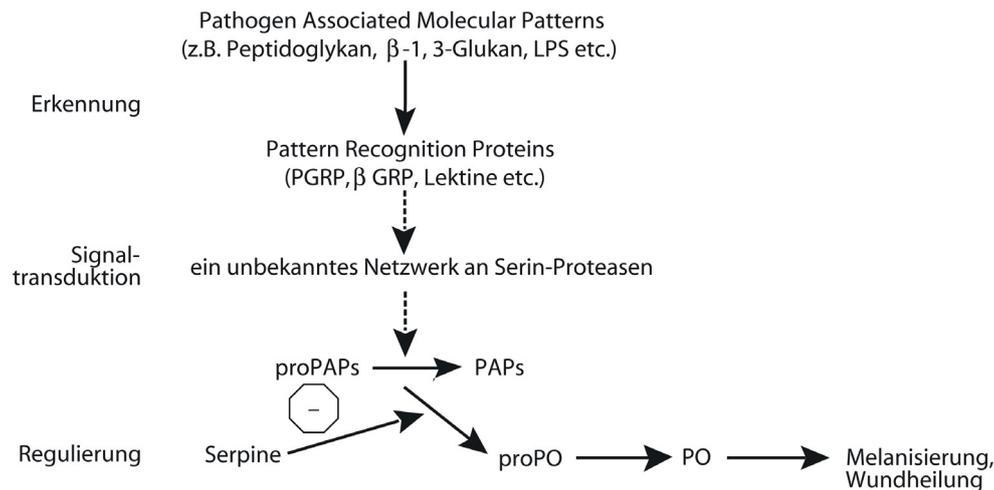


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der PPO-Aktivierung

Die Erkennung von *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) durch *pattern recognition receptors* (PRRs) führt zur Aktivierung von Serin-Proteasen, die wiederum aktive Phenoloxidase erzeugen (PO). Die Regulierung der Kaskade erfolgt durch Serin-Proteinase-Inhibitoren (Serpine). Weitere Erklärungen siehe Text. (modifiziert von Kanost et al., 2004)

Aktive Phenoloxidase katalysiert die Hydroxylierung von Tyrosin zu Dopa und die Oxidierung des resultierenden Dopa zu Dopaquinon. Dopaquinon vollzieht eine rasche nicht-enzymatische Konversion zu Dopachrom, das sich langsam in Eumelanin umwandelt und den pathogenen Organismus einkapselt (Sugumaran et al., 2000). Neben diesem ersten sog. Dopa-Oxidationsweg gibt es noch einen weiteren, der über das Zwischenprodukt Dopamin läuft (Zhao et al., 1995) (Abb. 1.6).

Die Aktivierung der Phenoloxidasen *in vivo* ist eine lokal begrenzte Reaktion von kurzer Dauer. Die Regulierung dieser Proteinase-Kaskade erfolgt durch Serin-Proteinase-Inhibitoren (Serpine) in der Hämolymphe (Kanost und Jiang, 1997). Eine Beteiligung von Serpinen an der PPO-Kaskade konnte bereits in verschiedenen Insekten wie *Manduca sexta*, *Drosophila melanogaster* und *Anopheles gambiae* erfolgreich nachgewiesen werden (Ligoxygakis et al., 2002; Zhu et al., 2003; Abraham et al., 2005).

Es gibt zwei Arten von Phenoloxidasen, welche die Melanisierungsreaktion ausführen können: Tyrosinase-Phenoloxidasen und Laccasen. Während die Tyrosinase-vermittelte Melanisierung bei der Einkapselung von Parasiten und Wundheilung eine Rolle spielt, liegt die Aufgabe der Laccasen in der Sklerotisierung der Kutikula (Arakane et al., 2005; Suderman et al., 2006).

Die Tyrosinase-Phenoloxidasen, oder einfach nur Phenoloxidasen, werden ausschließlich in den Hämocyten synthetisiert (Müller et al., 1999) und als Vorstufen in die Hämolymphe sezerniert. Da die PPOs kein Signalpeptid aufweisen, wird vermutet, dass die Proenzyme

durch Ruptur der Hämazyten (Christophides et al., 2002) oder über einen spezialisierten Transportmechanismus freigesetzt werden, der unabhängig von Signalpeptiden ist (Theopold et al., 2002). In *An. gambiae* gibt es neun Prophenoloxidasen, die nachfolgend eingehender besprochen werden.

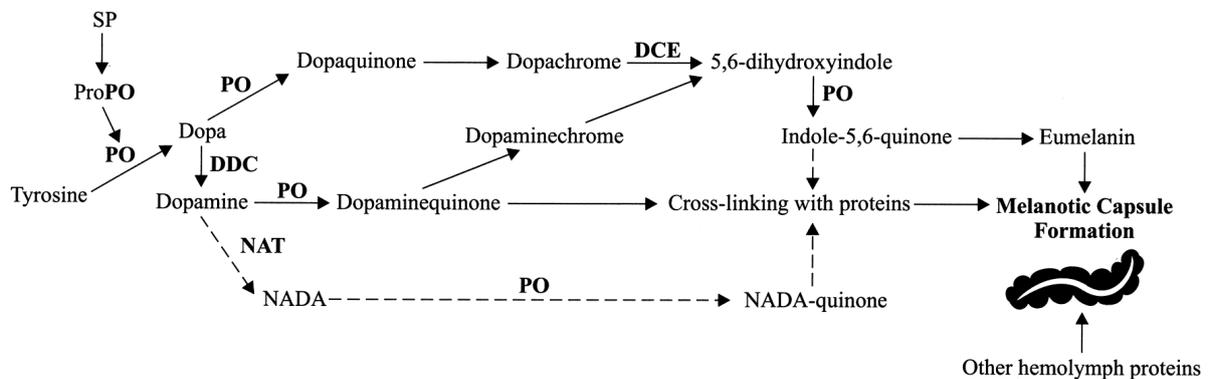


Abb. 1.6 Schematische Darstellung der Melanisierungsreaktion

Die Kaskade, die zur melanotischen Einkapselung des Erregers führt, beginnt mit einer Serin-Protease (SP), die durch einen proteolytischen Schnitt inaktive Prophenoloxidase (ProPO) in ihre aktive Form (PO) umwandelt. Aktive PO katalysiert die Hydroxilierung von Tyrosin zu Dopa und in einem weiteren Schritt die Oxidierung von Dopa zu Dopaquinon, welches dann ein Dopachrom-Intermediat bildet. Das Dopachrom-Konversions-Enzym (DCE) katalysiert die Umwandlung des Intermediats in 5,6-Dihydroxyindol, welches gleich im Anschluß durch PO zu Indol-5,6-Quinon oxidiert wird. Letzteres bildet entweder Eumelanin oder verbindet sich mit Proteinen, um eventuell eine melanisierte Kapsel zu bilden.

Alternativ kann Dopa auch durch eine Dopa-Decarboxylase (DDC) zu Dopamin decarboxyliert werden. Über eine PO-abhängige Oxidation wird Dopamin in Dopaminquinon umgewandelt. Dopaminquinon verbindet sich dann entweder mit Proteinen oder bildet Melanin über den Indol-Weg.

Dopamin könnte eventuell auch über eine N-Acetyltransferase (NAT) in N-Acetyldopamin (NADA) umgewandelt werden. Eine Oxidierung von NADA durch PO produziert NADA-Quinone, die sich mit anderen Proteinen vernetzen, um eine melanotische Kapsel zu bilden, wobei letzterer Weg wohl eher für die Melanisierungsreaktion in der Kutikula entscheidend ist (übernommen von Beerntsen et al., 2000).

1.9 Die neun Prophenoloxidasen von *Anopheles gambiae*

Die Phenoloxidasen der Arthropoden liegen unter physiologischen Bedingungen als Proenzyme vor, die durch eine spezifische Protease aktiviert werden (Lee et al., 1998). Die inaktive Form hat ein Molekulargewicht von 70 – 80 kDa, die aktive ein Molekulargewicht von 60 – 70 kDa (Ashida, 1971; Aspan und Söderhäll, 1991).

Die Prophenoloxidasen der Insekten besitzen zwei charakteristische Kupferbindungsstellen sowie einen kurzen Aminosäurebereich, der Sequenzähnlichkeit zur Thiolester-Region der α_2 -Makroglobuline und Komplementfaktoren C3 und C4 aufweist (Hillyer und Christensen,

2005). Es ist nicht bekannt, ob diese Sequenz an einer Thioester-Ausbildung beteiligt sein kann. Wäre dies der Fall, besteht die Möglichkeit, dass die Proteine auf ähnliche Weise wie die Komplementproteine der Vertebraten an fremde Oberflächen binden können (Söderhäll et al., 1996).

Im Gegensatz zu nur drei *PPO*-Genen in *Drosophila melanogaster*, konnten im Genom von *Anopheles gambiae* neun *PPO*-Gene identifiziert werden. Alle *PPO*-Gene, mit Ausnahme von *PPO1* und *PPO2*, liegen in der chromosomalen Teilregion 21 B auf dem linken Arm des Chromosoms 2. *PPO2* liegt außerhalb dieses Clusters in der Region 24 B desselben Chromosomenarms. *PPO1* dagegen, das eine enge Verwandtschaft zu den *PPO*s höherer Dipteren (Bsp. *Drosophila*) und Lepidopteren aufweist, befindet sich als einziges *PPO*-Gen auf dem rechten Arm von Chromosom 2 in der chromosomalen Teilregion 13 B (Müller et al., 1999; Christophides et al., 2002).

Sequenzhomologien der einzelnen *PPO*s untereinander deuten auf eine enge Verwandtschaft zwischen *PPO4* und 5, *PPO7* und 8 sowie *PPO3* und 6, zusammen mit *PPO2* im weiteren Sinn (Abb. 1.7), hin. *PPO9* zeigt die geringste Ähnlichkeit zu den *PPO*-Genen des linken Arms von Chromosom 2. *PPO1* nimmt eine Sonderstellung innerhalb der *PPO*-Familie ein, da es eine größere Sequenzhomologie zu den *PPO*-Genen von *D. melanogaster* als zu denen von *An. gambiae* aufweist und daher als ursprünglich betrachtet wird (Christophides et al., 2002).

Die neun *PPO*-Gene von *An. gambiae* werden in unterschiedlichen Entwicklungsstadien exprimiert und zeigen teilweise überlappende Expressionsprofile. *PPO1*, 2 und 3 werden am stärksten im Embryo und in Larven exprimiert. Ihre Expression hält zwar in jungen Puppen an – sowie bei *PPO2* auch in alten Puppen und adulten Mücken, jedoch nur auf sehr niedrigem Niveau. *PPO4* wird am stärksten in späten Larvenstadien, sowie in jungen Puppen und in abgeschwächter Form auch in der Mücke exprimiert. *PPO5* und 6 bilden zusammen mit *PPO9* die adultspezifischsten *PPO*-Gene. Die Expression von *PPO6* beginnt in frühen Puppen bzw. die von *PPO5* in späten Puppenstadien und setzen sich in der Mücke fort (Müller et al., 1999). Die Expression von *PPO9* ist in der Mücke schwach ausgeprägt, wird aber nach der Blutmahlzeit stark induziert (Christophides et al., 2002). *PPO7* und 8 werden ausschließlich larval exprimiert.

Mit der Blutmahlzeit des Weibchens wird die Transkription einiger *PPO*-Gene – *PPO1*, 2, 3 und 4 – wieder induziert (Müller et al., 1999). Gründe für die gleichzeitige Expression von sieben *PPO*-Genen (*PPO1* – 6 und 9) während dem Verdau der Blutmahlzeit könnten sowohl im Beginn der Eiproduktion liegen als auch im Prozess der melanotischen Einkapselung von

Pathogenen, die mit der Nahrungsaufnahme in die Mücke gelangt sind (Dimopoulos et al., 2001). Noch ist nicht bekannt, ob und welche der neun PPOs für die melanotische Einkapselung benötigt werden.

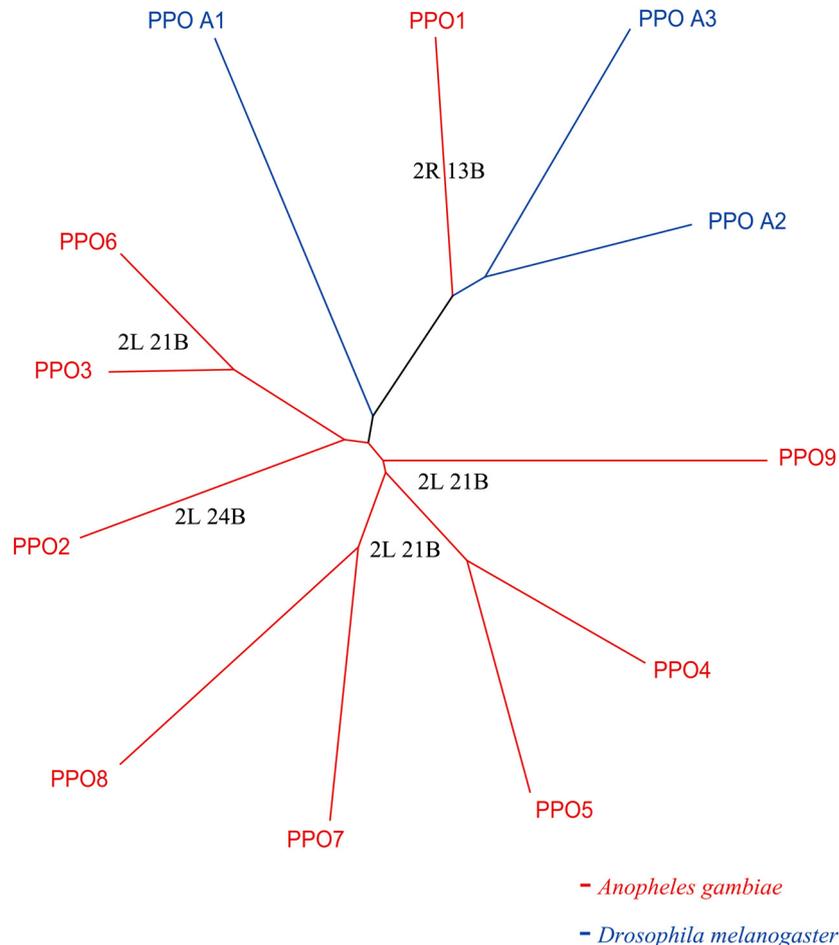


Abb. 1.7 Verwandtschaft der *Anopheles gambiae* PPOs auf Aminosäure-Sequenz-Ebene (Grafik von H.-M. Müller, mit freundlicher Erlaubnis)

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Während seiner Differenzierung in der Mücke muss der *Plasmodium*-Parasit drei große Engpässe überwinden, an denen seine Entwicklung gestoppt werden kann: der Übergang zwischen Gametozyten und Ookineten, Ookineten und reifen Oozysten sowie zwischen Mitteldarm- und Speicheldrüsenporozysten (Blandin und Levashina, 2004). Ziel dieser Arbeit ist es, die molekularen Interaktionen zwischen Parasit und Vektor während der beiden letzteren Entwicklungsübergänge näher zu analysieren, um neue Angriffspunkte zur Eindämmung der Malaria-Transmission zu identifizieren. Im Vordergrund stehen hierbei die

melanotische Einkapselung der Ookineten während der Mitteldarmpassage im ersten Teil der Arbeit und die Speicheldrüseninvasion der Sporozoiten in den beiden letzten Teilen.

Die größten Verluste des Parasiten treten während der Ookineten-Invasion 24 – 48 Stunden nach der Infektion auf. Sie werden häufig mit einer effizienten Immunantwort der Mücke in Verbindung gebracht und verhindern beim genetisch selektionierten L3-5 Stamm von *An. gambiae* die Weiterentwicklung des Parasiten durch melanotische Einkapselung der Ookineten während der Durchquerung des Mitteldarmepitheliums (Collins et al., 1986). Durch RNA-Interferenz (RNAi) soll herausgefunden werden, ob und welche *PPO*-Gene von *An. gambiae* an der Melanisierung von *Plasmodium*-Erregern beteiligt sind.

Für die Übertragung auf den Säugetierwirt müssen die Malaria-Sporozoiten die Speicheldrüse der Mücke invadieren. Vieles deutet dabei auf eine spezifische Rezeptor-Liganden-Interaktion hin (Touray et al., 1992; Barreau et al., 1995; Brennan et al., 2000; Myung et al., 2004). Mittels *transcriptional profiling* sollen im zweiten Teil der Arbeit potentielle Speicheldrüsenrezeptoren für *Plasmodium*-Parasiten identifiziert und durch RNAi-Studien *in vivo* phänotypisch analysiert werden.

Im dritten Teil der Arbeit steht die molekulare und funktionelle Charakterisierung des Sporozoiten-spezifischen *UOS3* Gens von *P. berghei* im Mittelpunkt. Das UOS3 Protein besitzt die zytoplasmatische Domäne der TRAP-Familie und könnte analog zu TRAP entscheidend für die Infektivität der Sporozoiten sein (Sultan et al., 1997). Genetische Deletionsstudien sollen Aufschluß über seine Rolle während der Speicheldrüsen- und Leberinvasion in Vektor und Wirt geben.

pH-Meter	Inolab
Pipetten: Gilson	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Quarzküvetten	Amersham, Freiburg
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, Innova 4300
Spektrophotometer	GeneQuant pro Amersham, Freiburg
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415R, Eppendorf
Stickstofftank	CBS, USA
UV-Tischlampe	Gibco BRL, Karlsruhe
Vortex-Gerät	Vortex-Genie, Scientific Industries, Roth Karlsruhe
Waagen	Sartorius GmbH, Göttingen
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zählkammer	Neubauer Labotec, Göttingen
Zellkulturzentrifuge	Megafuge 2.0R, Heraeus, Hanau
Zentrifuge J2-MC (Rotor: JA-20)	Beckman, Krefeld

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

15/ 50 ml Plastik-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
8-well-Objektträger	Medco
<i>Chamberslides</i>	Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen	Knittel
Elektroporationsküvetten	Biorad, München
Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Einbeck
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Kanülen	BD Microlance, Becton Dickinson
Kryogefäße	Nalgene®
Objektträger	Menzel
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten	WU Mainz
PCR-Gefäße	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Petrischalen	Greiner Bio-one, Frickenhausen

Pipettenspitzen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Sterilfilter	Nalgene®
Spritzen	Diskardit, Becton Dickinson
Zellkulturflaschen	Renner, Dannstadt-Schauernheim

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Axis Shield, Oslo, Norwegen; Bayer, Leverkusen; BDH Laboratory Supplies; Braun, Melsungen; Difco Laboratories, Augsburg; GibcoBRL, Karlsruhe; Gibco Invitrogen, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; Riedel-de Haen; Roche, Karlsruhe; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Taufkirchen; Whatman, Großbritannien, VFW.

2.1.4 Puffer, Medien, Lösungen

Ampicillin-Stock	100 mg/ml Ampicillin in ddH ₂ O
Bakterien-Lysispuffer	20 mM Tris, 100 mM KCl (pH 7,3), 1 mM DTT; vor Gebrauch 1x Proteinase- Inhibitor dazu
Chloramphenicol-Stock	30 mg/ml Chloramphenicol in ddH ₂ O
<i>freezing solution</i>	Glyzerin, Alsever's Solution (1:9)
Kulturmedium für Huh7-Zellen	450 ml DMEM (high Glucose), 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin; steril- filtrieren
LB (Luria Broth)-Agar	LB-Medium, 15 g/l Agar
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,5; autoklavieren
Lysozym (Protein-Aufreinigung)	10 mg/ml in ddH ₂ O
3 M NaAc-Lösung	24,06 g ad 100 ml ddH ₂ O; pH 4,8
PBS	1,370 M NaCl, 27 mM KCl, 15 mM KH ₂ PO ₄ , 81 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
100x <i>round up</i>	60 mg Penicillin, 100 mg Kanamycin, 50 mg Fluocytosin, 10 mg Chloramphenicol; sterilfiltriert

2x SDS-Probenpuffer (SDS-Page)	250 mM Tris pH 6,8; 6,6% SDS, 24% Glyzerin, 10 mM EDTA, 6% β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau
SDS-Gel-Laufpuffer 1x	250 ml Glycin, 25 mM Tris/HCl, pH6,8; 0,1% SDS
TAE-Puffer 1x	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA; pH 8,0
TBST	20 mM Tris pH 7,6 ; 137 mM NaCl, 0,1% Tween
TE	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1mM EDTA
Transferpuffer 10x	20 mM Tris, 144 mM Glyzin, 0,01% SDS
Transferpuffer 1x	100 ml 10x Transferpuffer, 200 ml Methanol, ad 1l
Tris/HCL, pH 6,8	0,5 M Tris/HCl; pH 6,8
Tris/HCl, pH 8,8	1,5 M Tris/HCl; pH 8,8
Transfektions-Kulturmedium	40 ml RPMI-Medium 1640, 25 mM HEPES, L-Glutamin (Gibco), 35 ml FCS, 50 μ l Gentamycin

2.1.5 Verwendete Kits

HiSpeed Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
Megaskript T7	Ambion, Huntingdon, England
Micro-FastTrack 2.0 Kit	Invitrogen
QIAamp DNA-Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAgen PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
RETROscript	Ambion, Huntingdon, England
SMART cDNA Synthesis Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Clontech PCR-Select™ cDNA Substraction Kit	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.6 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen Ambion (Huntingdon, England), New England Biolabs GmbH (Frankfurt), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und Roche (Mannheim) bezogen.

2.1.7 Größenmarker und Ladepuffer

1 kb DNA-Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Rainbow Protein Marker RPN800V	Amersham Life Science, Freiburg
6x Ladepuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.8 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle
Kaninchen Anti-UOS3	1:1000 (Western Blot) 1:100 (IFA)	Eigenherstellung
Anti-Kaninchen IgG-HRP	1:5000	Amersham, Freiburg
Maus Anti-CSP	1:5000 (Western Blot) 1:500 bzw. 1:1000 (IFA)	Nussenzweig RS, New York
Anti-Maus IgG-HRP	1:5000	Amersham, Freiburg
Maus Anti- <i>PbHSP70</i>	1:1	Tsuji M, New York
Ziege Anti-Maus Alexa-Fluor 488	1:300	Molecular Probes, Niederlande
Ziege Anti-Maus Alexa-Fluor 546	1:300	Molecular Probes, Niederlande
Ziege Anti-Kaninchen Alexa-Fluor 546	1:300	Molecular Probes, Niederlande
Ratte Anti-PPO6	1:1000	H.-M. Müller, HD
Kaninchen Anti-PPO6	1:1000	H.-M. Müller, HD
Anti-Ratten Antikörper AP	1:2500	Promega
Anti-Kaninchen Antikörper AP	1:3000	Promega

2.1.9 Oligonukleotide

RNAi-Klonierung

SGS2/3_F	5'-AGAGGATCCGCATCAGGATTGCGAAATTTATTC-3'
SGS2/3_R	5'-GGGAATTCCATACTCTGTATTCATTAATTGTAG-3'
SGS4_F	5'-TATAGGATCCCGCGTCCAAAACGCGACCAAC-3'
SGS4_R	5'-ATTTGAATTCGTGATGTGAATTATGACATGTTTCTAC-3'
SGS5_F	5'-CTTTGGATCCGGTAGCAGTTCATCCCGTACTAC-3'
SGS5_R	5'-CCGAATTCGGTACGTATTCACTTTTATTAGC-3'
SGSM_F	5'-GTGATCTAGACGTAATCCAGGCAGAACAACAAGG-3'
SGSM_R	5'-TCTGAATTCGGATCGATCAACGAAACGGGCG-3'

PbUOS3 AK-Herstellung

S3S6-1 AK_F	5'-GCGCCATGGGTCCCGGATATGAAGAAGAAACAAAAGG-3'
S3S6-1 AK_R	5'-GCGGTACCTCAGAGCGCACCTTTCATTTTCATATGTG-3'

gene-targeting, Replacement

<i>PbS3</i> _SacIIfor	5'-TCCCCGCGGGCACTTAATATATGCGATTATGGG-3'
<i>PbS3</i> _BamH1rev	5'-CGGGATCCTTTACTCGGTTGTCTATGAATGC-3'
<i>PbS3</i> _HindIII_F2	5'-CCCCAAGCTTTATAGACATGGAACACAAAGAGGATAGC-3'
<i>PbS3</i> _KpnI_R	5'-GGGGTACCTTCTACGAAATCATCTAGTATGCC-3'

Semiquantitative RT-PCR

S3_testREcl2_for	5'-GTGTTATCAACCTTCATATTATTATC-3'
S3_testRE3_rev	5'-CATTTAACATATGGATCACTTTGCAC-3'
Tgfor	5'-CCCGCACGGACGAATCCAGATGG-3'
S3_testRE4_rev	5'-CTCCACTTTCGAAAAAATATACAG-3'
test 1	Tgfor und S3_testRE4_rev
test 2	<i>PbS3</i> _BamH1rev und S3_testRE4_rev
test 3	Tgfor und <i>PbS3</i> _SacIIfor
test 4	S3_testREcl2_for und S3_testRE3_rev
<i>PbUOS3</i> -Expression	S3_testREcl2_for und S3_testRE4_rev
CScDNA_5_for	5'-GACGATTCTTATATCCCAAGCGC-3'
CScDNA_4_rev	5'-CCTAATGAATTGCTTACAATATTAATATACTTG-3'

SGS2/3-F.sp	5'-GTTGAACGTGTCCTTTGGTGATGAATTC-3'
SGS2/3-R.sp	5'-GTTGCCAATCCGAGCCACGTTGAATTG-3'
SGS4-F.sp	5'-GTCAACAACAAGACTCAACTACTGGAAGAC-3'
SGS4-R.sp	5'-CATAGCCATACTCGTCGTGGTACTTTGC-3'
SGS5-F.sp	5'-CAGTGCTTGTGGTATGTGCTTTATAACCAC-3'
SGS5-R.sp	5'-GATCATGATACTTGGATAACCGTGTACTGG-3'
PPO1-A	5'-TTCGATGCCTCTAACCGGGCGA-3'
PPO1-B	5'-ACTTAGGCCATTGGCGTAGGGCG-3'
PPO2-A	5'-CGGTTCTGCGCCAAGCTGAA-3'
PPO2-B	5'-GGCTTGCGAGTCGACATACCGTC-3'
PPO3-C	5'-GGGTCCCGACCGTGTTCGTCAAC-3'
PPO3-D	5'-GCACCCGGGGCCACCATTAGCA-3'
PPO4-C	5'-CGCGGGCCGAATCGTATCGTGC-3'
PPO4-E	5'-AACTCACTAGAATTTGCTCAACTC-3'
PPO5-C	5'-ACTGGTCCGGATCGGGTTGTGC-3'
PPO5-D	5'-CGCTGCTTACCGCTAGCACAAG-3'
PPO6-A	5'-GGAGAGGGTCCGAATAACGTA-3'
PPO6-B	5'-ACAACGGGGGCCTCCTTTAGCCT-3'
PPO7-C	5'-ACAGCCAAGGTTTGGGGCGTGTGAC-3'
PPO7-D	5'-ACTTTCGAGCTCGTATAGGCACTTGGCG-3'
PPO8-A	5'-ATATCGAATCGTGGCTTCCCCGCGTA-3'
PPO8-B	5'-TGCGACCTTCGCGAACTTTGCGTCGA-3'
PPO9-A	5'-GCACTGAATCGCACGTACCCTGGCA-3'
PPO9-B	5'-AGCCTGCGTTGCCACGTCTAATGCT-3'

2.1.10 Vektoren

Transfektionsvektor	b3D.DT ^H .D Vektor (A.P. Waters, Universität Leiden, Niederlande)
Proteinexpressionsvektor	pETM-50 (A. de Marco, EMBL HD)
RNAi-Vektor	pLL10 (Blandin und Levashina, EMBL, Heidelberg)

2.1.11 Zelllinien und Bakterienstämme

Für die Untersuchung der Leberstadienentwicklung von *P. berghei* wurde die Hepatozyten-Zelllinie Huh7 (Humane Hepatoma Zelllinie) verwendet.

Für die Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm XL-1 blue von Stratagene eingesetzt.

2.1.12 Tierstämme

Mäuse	Naval Medical Research Institute (NMRI)
Ratten	Sprague Dawley (SD), WIST (Wistar)
Mücken	<i>Anopheles gambiae</i> (L3-5 und G3), <i>Anopheles stephensi</i>
<i>Plasmodium</i>	<i>P. berghei</i> , ANKA cl 507 (Andy Waters)

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Methoden

2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird für die schnelle *in vitro* Amplifizierung von DNA eingesetzt. Hierbei wird eine spezifische DNA-Sequenz zwischen den Bindungsstellen eines 5'-terminalen und eines 3'-terminalen Desoxynukleotid-Primers durch eine DNA-Polymerase bei jedem Zyklus annähernd verdoppelt. Durch entsprechendes Auswählen der Primer ist es auch möglich Schnittstellen für Restriktionsenzyme in eine DNA einzuführen.

Für eine PCR-Reaktion wurden typischerweise 1 µl DNA (100 ng) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl eingesetzt. Zur DNA wurden 5 µl 10x PCR-Puffer (Roche), 1 µl eines 10 mM dNTP-Mixes (enthält je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 2,5 µl des 5'- und 3'-Primers (beide in einer Endkonzentration von 50 pmol/µl) und 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl; Roche) hinzupipettiert. Die Reaktion wurde mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt, kurz vermischt, zentrifugiert und anschließend in einem Thermozykler inkubiert.

Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet: Die DNA-Doppelstränge wurden zunächst für 5 min (cDNA für 1 min) bei 94°C in Einzelstränge denaturiert. Es folgten 30 Zyklen aus Denaturierung für 30 sek bei 94°C, Anlagerung (*Annealing*) der Oligonukleotide für 30 sek

bei 55°C (60°C bei *Anopheles*) und Neusynthese der DNA-Stränge für 1-2 min je nach Fragmentlänge bei 60°C (72°C *Anopheles*). Die Reaktion wurde bei 60°C (72°C *Anopheles*) für 10 min abgeschlossen und auf 4°C heruntergekühlt.

Das PCR-Ergebnis wurde durch analytische Gelelektrophorese untersucht und die PCR-Produkte mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt, um überschüssige Oligonukleotide, Nukleotide und Proteine zu entfernen.

2.2.1.2 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Sequenzen, meist sechs palindromische Basenpaare, von doppelsträngiger DNA und spalten hydrolytisch Phosphordiesterbindungen. Dabei können je nach Enzym *blunt ends* (gerade Enden) oder *sticky ends* (überhängende Enden) entstehen. Die Restriktionsendonukleasen werden eingesetzt, um zirkuläre DNA-Moleküle zu linearisieren oder definierte Bereiche aus DNA-Molekülen auszuschneiden. Die Enzymeinheit wird in *Units* (U) angegeben; eine *Unit* entspricht dabei der Enzymmenge, die benötigt wird, um 1 µg λ-Phagen-DNA unter optimalen Bedingungen in einer Stunde zu schneiden.

Pro µg DNA wurden eine Enzymeinheit eingesetzt. Verdaut wurde bei 37°C über einen Zeitraum von 2-4 Std. oder über Nacht. Die DNA konnte mit zwei Restriktionsenzymen gleichzeitig geschnitten werden, wenn beide Enzyme unter gleichen Bedingungen ihre optimale Aktivität zeigten. Dabei durfte der Volumenanteil der Enzymstammlösung nie mehr als 1/10 des Gesamtvolumens betragen, da ansonsten das darin enthaltene Glycerin die Spezifität der Enzyme beeinträchtigen könnte und es zu unspezifischen Spaltungen oder, im Falle von Star-Aktivität der Enzyme, zu unspezifischen Restriktionsschnitten kommen könnte. Die jeweils gewählten Reaktionsbedingungen richteten sich nach den Angaben des Enzymherstellers. Nach einem Restriktionsverdau wurde 1/10 der Reaktion gelelektrophoretisch analysiert und die Gesamtreaktion zur Weiterprozessierung mit dem „QIAGEN PCR Purification Kit“ (Qiagen) aufgereinigt.

2.2.1.3 Ligation

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert in Anwesenheit von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl und 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA. Eine Einheit des Enzyms (1 *Unit*) ist definiert als die Ligasemenge, die notwendig ist, um die Konversion von 1 nmol ³²P_i in ATP bei 37°C in 20 Minuten zu katalysieren.

Die Ligationen wurden stets in einem Gesamtvolumen von 10 bis maximal 20 μl durchgeführt. 100-200 ng Vektor-DNA und die 4-5fache Molarität an Insert-DNA, zusammen mit einer Einheit T4-Ligase (Fermentas) und 1/10 Volumen des entsprechenden 10x Ligasepuffers (Fermentas) wurden eingesetzt. Das Endvolumen wurde mit ddH₂O auf 10 bzw. 20 μl eingestellt. Die Reaktionen wurden für mindestens 2 Std. bei RT oder alternativ über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.2.1.4 DNA-Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese

Ungeschnittene oder mit Restriktionsenzymen verdaute DNA kann mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht werden. Die DNA wandert hierbei mit einer zu ihrer Größe umgekehrt proportionalen Geschwindigkeit durch die Gelporen zum positiven Pol des elektrisch erzeugten Feldes.

Zur Auftrennung wurden in Abhängigkeit von der Fragmentgröße 1,2% (0,4-7 Kb) oder 2%-ige (0,1-1 Kb) TAE-Agarosegele verwendet. Die in der Mikrowelle aufgekochte und auf ca. 60°C abgekühlte Agarose (Invitrogen) wurde mit Ethidiumbromid (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma) versetzt, in einen abgedichteten Gelschlitten gegossen und nach Einsetzen eines Probenkammes bis zum Erhärten stehengelassen. Das Gel wurde mit 1x TAE überschichtet, die mit 6x Probenpuffer (Fermentas) versetzten Proben aufgetragen und bei 110 V für 0,5 - 1 Std. aufgetrennt. Die Verwendung des Bromphenolblau-Farbstoffes im Probenpuffer erlaubte eine ungefähre Abschätzung der Laufstrecke und Position der interessanten DNA-Moleküle. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel unter kurzwelligem UV-Licht analysiert.

2.2.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Konzentrationen von Nukleinsäuren können spektrophotometrisch bestimmt werden, unter Ausnutzung der Tatsache, dass die Absorption der ultravioletten Strahlung direkt proportional zum Gehalt der Nukleinsäuren ist. Die DNA-Proben wurden 1:50 in einem Endvolumen von 1 ml verdünnt, die RNA-Proben entsprechend 1:500. Ihre Extinktionen wurden gegen ddH₂O als Nullwert gemessen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm ist die Absorption von DNA und RNA maximal, die von Proteinen bei 280 nm. Werden Quarküvetten mit einer Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$ verwendet, so ist bei einer Konzentration von 50 μg doppelsträngiger DNA bzw. 40 μg RNA / ml die Optische Dichte (OD) gleich 1. Daraus folgt für die Konzentration einer Probe: $c_{\text{DNA/RNA}} = \Delta\text{OD}_{260\text{nm}} \times 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (bzw. 0,04) \times Verdünnungsfaktor = Gehalt [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$].

Aus dem Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ergibt sich die Reinheit einer DNA-Präparation. Das Verhältnis sollte $OD_{260nm}/OD_{280nm} = 1,8 - 2,0$ betragen.

Für die Arbeit mit Bakterienkulturen wurde die OD bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt.

2.2.2 RNA-Methoden

2.2.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die bei -80°C eingefrorenen Gewebe (Mücken / Sporozoitenniederschlag) wurden noch im gefrorenen Zustand mit Trizol (Invitrogen) versetzt (300 μl Trizol bei 5 Mücken bzw. 500 μl Trizol bei Sporozoitenniederschlag). Das Gewebe wurde mit sterilen Plastikstößeln (Mücken) bzw. 21 Gauge-Injektionsnadeln (Sporozoitenniederschlag) zerkleinert und homogenisiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurden die Proben mit Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 49:1 versetzt (100 μl CHCl_3 pro 0,5 ml Trizol), 15 sek kräftig mit der Hand geschüttelt und für weitere 5 min bei RT inkubiert. Die Trennung der organischen und wässrigen Phase erfolgte während eines 15-minütigen Zentrifugationsschrittes bei 14.000 rpm und 4°C . Die obere, wäßrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol (Merck; 0,5 ml pro 1 ml Trizol) für 15 min bei RT, dann für 15 min bei 14.000 rpm und 4°C präzipitiert. Das RNA-Sediment wurde mit 75% Ethanol gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 7.500 rpm und 4°C), kurz an der Luft getrocknet und anschließend in 20-30 μl RNase-freiem ddH_2O resuspendiert. Um die Qualität der Gesamt-RNA (von Mücken) zu überprüfen, wurden je 2 μl Probe als Kontrolle gelelektrophoretisch analysiert und die Konzentration der Gesamt-RNA photometrisch bei 260 nm bestimmt.

(Für die ausschließliche Extraktion von mRNA wurde der „Micro-FastTrack 2.0 Kit“ von Invitrogen verwendet).

2.2.2.2 Verdau genomischer DNA mit DNase I

Die RNA-Probe wurde mit 1/10 Volumen des 10x DNase Puffers (Ambion) und 1 μl TurboDNaseTM (Ambion) versetzt und 15 min bei 37°C verdaut. Die Reaktion wurde mit 15 μl 5 M Ammonium-Acetat (Ambion) gestoppt, das Gesamtvolumen mit RNase-freiem ddH_2O auf 150 μl aufgefüllt und anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt.

2.2.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion von RNA

RNA-Proben, die nach enzymatischen Reaktionen oder nach der Isolierung aus Zell- und Gewebelysaten mit Proteinen verunreinigt sind, können durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt werden.

Hierfür wurden die Proben mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1; Amresco) versetzt, gevortext und anschließend für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und zentrifugiert. Anschließend wurden die RNA-Proben mit 0,6 Volumen Isopropanol (Merck) und Ammoniumacetat (Endkonzentration 0,2 M) – falls nicht schon durch DNase I Verdau enthalten – für 15 min bei RT und weiteren 15-30 min bei 14.000 rpm und 4°C präzipitiert. Der Niederschlag wurde kurz an der Luft getrocknet und in 20-30µl RNase-freiem ddH₂O resuspendiert

2.2.2.4 Semiquantitative Reverse Transkriptions (RT)-PCR

Ausgehend von einer RNA-Matrize wird bei der RT-PCR die dazu komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Die Synthese der komplementären cDNA erfolgt, wie bei allen Nukleinsäure-Polymerasen, in 5'-3' Richtung und benötigt einen Primer für die Initiation.

Für alle durchgeführten RT-PCRs wurden stets Oligo-(dT) Primer verwendet.

Um die RNA-Proben auf DNA-Kontamination überprüfen zu können, wurde bei jeder Reaktion eine Minus-RT-Kontrolle durchgeführt. Sie enthält alle Reagenzien der RT-PCR mit Ausnahme der Reversen Transkriptase. Auf diese Weise kann gezeigt werden, dass es sich bei der Matrize für das PCR-Produkt um cDNA und nicht um genomische DNA gehandelt hat.

Für die Reverse Transkription wurden bis zu 3 µg Gesamt-RNA mit 2 µl Oligo(dT)-Dekameren (500 µg/ml; Ambion) und 0,5 µl RNase-Inhibitor (Ambion) versetzt, mit RNase-freiem ddH₂O auf 12 µl aufgefüllt und für 10 min bei 70°C denaturiert. Die Proben wurden kurz auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert, 4 µl 5x First Strand Buffer (Ambion), 2 µl 0,1 M DTT (Ambion) und 1 µl 10 mM dNTP-Mix hinzugegeben und für weitere 2 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden je 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/µl; Ambion) zu den Proben pipettiert bzw. 1 µl RNase-freies ddH₂O zu den Negativkontrollen. Die Reverse Transkription erfolgte bei 42°C für 50 min. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Enzym durch eine 15-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Die synthetisierte cDNA wurde nachfolgend mittels PCR analysiert.

2.2.2.5 RNA-Interferenz: ssRNA-Synthese und dsRNA-Hybridisierung

Je 20 µg der jeweiligen rekombinanten Zielvektoren (PPO1-9pl. bzw. SGS2/3pl., SGS4-5pl. und SGSMpl.) wurden entsprechend ihrer zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen mit zwei unterschiedlichen Enzymen in separaten Reaktionsgefäßen einzelverdaut. Im nächsten Schritt wurden die linearisierten Plasmide durch Zugabe von 0,5 µl Proteinase K (20 mg/ml Stocklösung) und 2,5 µl 10% SDS für 30 min bei 50°C verdaut, um Proteine abzubauen. Das Volumen wurde mit ddH₂O auf 80 µl aufgefüllt, die Probe mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1; Amresco) versetzt, gevortext und für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gevortext und erneut für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die DNA-Proben mit Isopropanol (Merck) gefällt und in je 20 µl RNase-freiem ddH₂O resuspendiert. Um die einzusetzende DNA-Konzentration für die nachfolgende ssRNA-Synthese abschätzen zu können, wurde je 1 µl Probe mittels Gelelektrophorese und entsprechendem Mengenstandard analysiert.

Die aufgereinigten, linearisierten Plasmide dienten als Matrize für die nachfolgende Einzelstrang-RNA (ssRNA)-Synthese mit dem „MEGAscript T7 Kit“ (Ambion). Unter Verwendung der Herstellerangaben wurden von jeweils 1 µg linearisierter Plasmid-DNA ssRNA Moleküle in einem 20 µl Reaktionsvolumen über Nacht bei 37°C synthetisiert.

Nach erfolgreicher Synthese wurde die DNA-Matrize durch Zugabe von 1 µl DNase (2 U/µl; Ambion) für 15 min bei 37°C verdaut. Die Reaktion wurde durch 15 µl 5 M Ammonium-Acetat (Ambion) gestoppt und das Volumen mit RNase-freiem ddH₂O auf 150 µl aufgefüllt. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion wie unter 2.2.2.3 beschrieben mit anschließender RNA-Präzipitation. Der RNA-Niederschlag wurde in 20 µl RNase-freiem ddH₂O resuspendiert und die Konzentration der aufgereinigten ssRNA-Proben photometrisch bei 260 nm bestimmt.

Für die Hybridisierung von *sense*- und *antisense* ssRNAs zu doppelsträngigen RNA (dsRNA)-Molekülen wurden jeweils gleiche Mengen an komplementären ssRNAs vermischt, für 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend langsam in einem, mit 95°C heißen Wasser gefüllten, 1 l Becherglas auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Die Konzentration der dsRNA-Proben wurde auf 3 µg/µl entsprechend eingestellt.

2.2.2.6 Subtraktive cDNA-Hybridisierung

Theorie

Die subtraktive Hybridisierung ermöglicht den Vergleich der RNA-Expression von zwei unterschiedlichen Populationen. Hierbei wird die eine Population (bezeichnet als *Driver*) von einer zweiten Referenzpopulation (bezeichnet als *Tester*) abgezogen, und man erhält eine cDNA Bank mit den in der *Tester*-Population höher exprimierten Genen (Diatchenko, 1996). Für die subtraktive Hybridisierung werden die beiden RNA-Populationen in cDNA umgeschrieben und fragmentiert. Dieser Schritt ist notwendig, um Sekundärstrukturen zu vermeiden, welche die Hybridisierungsreaktion behindern würden. Die *Tester*-Population wird in zwei Gefäße aufgeteilt und die Subpopulationen an den Adaptor 1 bzw. Adaptor 2R ligiert. Da den beiden Adaptoren eine Phosphatgruppe fehlt, bindet nur ein Strang der Oligonukleotide an die 5'-Enden der cDNA-Fragmente. Während der ersten Hybridisierung wird nun jede der beiden *Tester*-Populationen, die entweder Adaptor 1 oder Adaptor 2R trägt, mit einem Überschuß an *Driver* hybridisiert. In dieser Phase sollten alle *Tester*-Moleküle, die ein Gegenstück in der *Driver*-Population besitzen, als doppelsträngige cDNA vorliegen. In einer darauf folgenden zweiten Hybridisierung werden die beiden Ansätze aus der ersten Hybridisierung vermischt und frischer *Driver* hinzugefügt. cDNAs, die in der *Tester*-Population in höherer Zahl als in der *Driver*-Population vorliegen, sollten jetzt miteinander hybridisieren und als doppelsträngige Fragmente vorliegen, die an ihren beiden Enden unterschiedliche Adaptoren tragen. Die Adaptoren werden aufgefüllt und die cDNAs mit einer PCR amplifiziert. Die im Anschluß an die erste Amplifizierung folgende zweite PCR mit *Nested* Primern bewirkt eine weitere Anreicherung der differentiell exprimierten cDNAs, da während dieser PCR nur diejenigen Fragmente amplifiziert werden, die an den Enden unterschiedliche Adaptoren tragen.

Praxis

Ca. 200 Speicheldrüsen weiblicher, blutgefütterter *An. gambiae* Mücken wurden fein säuberlich herauspräpariert, laterale (*Driver*) und mediale Lappen (*Tester*) voneinander getrennt und die mRNA mit Hilfe des „Micro-FastTrack 2.0 Kit“ (Invitrogen) isoliert.

Die cDNA-Synthese und Amplifikation erfolgte nach dem „SMART cDNA Synthesis Protokoll“ von BD Biosciences. Anschließend wurde die cDNA über Phenol-Chloroform-Extraktion und Säulenchromatographie („QIAGEN PCR Purification Kit“; QIAGEN) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Fragmentierung der cDNA mit dem Restriktionsenzym *RsaI* sowie die einzelnen Schritte der subtraktiven Hybridisierung (Ligation der fragmentierten cDNA, erste und zweite Hybridisierung, PCR-Amplifikation der subtrahierten

cDNA-Proben sowie die Klonierung der subtrahierten cDNA-Proben) wurden gemäß dem „Clontech PCR-Seletct™ cDNA Subtraction Kit Protokoll“ von BD Biosciences durchgeführt.

2.2.3 Protein-Methoden

2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können entsprechend ihres Molekulargewichts mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Dabei bestimmt der Anteil des Polyacrylamids und dessen Vernetzungsgrad die Porengröße und somit auch die Eigenschaften des Gels. Folgende Gelzusammensetzungen wurden verwendet:

Anopheles/PPO - 5% Sammelgel pH 6,8 und 7% Trenngel pH 8,8

Plasmodium/UOS3 - 3.6% Sammelgel pH 6,8 und 6% Trenngel pH 8,8

Die aufzutrennenden Proteinproben wurden vor dem Auftrag für 3 min bei 80°C (*Anopheles* 5 min bei 95°C) in SDS-Probenpuffer denaturiert. Der Gellauf erfolgte bei 40 mA.

2.2.3.2 Western Blot

Nach der SDS-Page wurden die aufgetrennten Proteine zur weiteren Untersuchung auf Nitrocellulose (0,45 µm Porengröße; Amersham) übertragen und anschließend durch Immunfärbung mit Antikörpern sichtbar gemacht.

Der Transfer erfolgte im Naß-Blot-Verfahren. Membran, Gel, Filterpapiere und Blottingschwämme wurden im Transferpuffer equilibriert und luftblasenfrei wie folgt zusammengesetzt: Blottingschwamm, 3 Whatman-Filterpapiere, Nitrocellulosemembran (Anodenseite), Trenngel (Kathodenseite), 3 Whatman-Filterpapiere und Blottingschwamm.

Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 70 Volt für 1 Std. bei 4°C auf die Membran transferiert.

2.2.3.3 Immunologischer Nachweis

Nach dem Elektrotransfer der Proteine und vor der Immunfärbung der Membran erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen für 2 Std. bei RT in 5% Milchpulver/1x TBST, gefolgt von zwei 10-minütigen Waschschritten in 1x TBST. Die Membran wurde anschließend mit dem primären Antikörper (Kaninchen Anti-UOS3; Maus Anti-CSP; Kaninchen Anti-PPO6) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach sechs 10-minütigen Waschschritten in 1x TBST erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen HRP; Anti-Maus HRP; Anti-

Kaninchen AP) für 30 min. Nach drei weiteren 10-minütigen Waschschrritten in 1x TBST wurden die Proteine mittels Chemilumineszenz detektiert (ECL-System bei *Plasmodium* bzw. Alkalische Phosphatase bei *Anopheles*).

2.2.4 Mikrobiologische Methoden

2.2.4.1 Flüssigkulturen von *Escherichia coli* Bakterien

Für *E. coli* Bakterien wurden 5 ml (Vorkultur) bzw. 150 ml LB-Medium mit Bakterienzellen inokuliert und über Nacht bei 250 rpm und 37°C inkubiert. Bei den Bakterien handelte es sich um Zellen einer Vorkultur (ca. 100 µl) oder um direkt auf Agarplatten gewachsene Zellkolonien. Die Nährmedien enthielten ein Antibiotikum zur Selektion.

2.2.4.2 Plattenkulturen

Plattenkulturen dienen der Anzucht einzelner Bakterienkolonien und zur mittelfristigen Lagerung bei 4°C. Hierfür wurden die Bakterien mit Hilfe eines sterilen Drigalski-Glasspatels auf Agarplatten (LB-Platten), die ein entsprechendes Antibiotikum zur Selektion enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch die anschließende Lagerung der Platten bei 4°C bleiben sie bis zu vier Wochen haltbar.

2.2.4.3 Dauerkulturen

Zur längerfristigen Lagerung transformierter Bakterienkulturen wurde eine Übernachtskultur in Glycerol (Glycerol-Endkonzentration 50%) in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren.

2.2.4.4 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

Bei der Transformation wird fremdes, genetisches Material in Form von Plasmiden von kompetenten Bakterienzellen aufgenommen. Unter den anschließend zusätzlich exprimierten Genen befinden sich auch Gene zur Resistenzvermittlung als Marker zur Selektion, wodurch der Erfolg der Transformation unter Verwendung eines Antibiotikums bei der anschließenden Kultivierung kontrolliert werden kann. Zellen, die fremde DNA aufnehmen können, werden als kompetent bezeichnet.

Hitzeschock-Transformation

Für die Transformation von Ligationsprodukten im Rahmen von Klonierungen wurden *E. coli* XL-1 Blue kompetente Zellen (Stratagene) verwendet. Die Zellen wurden unmittelbar vor der Transformation langsam auf Eis aufgetaut, je 40 µl XL-1 Blue Zellen durch Zugabe von 0,68 µl β-Mercaptoethanol (Stratagene) und nachfolgender 10-minütiger Inkubation permeabilisiert und mit maximal 20 µl Ligationsprodukt versetzt. Nach Inkubation der Zellen für 30 min auf Eis schloss sich ein 45-sekündiger Hitzeschock bei 42°C an, gefolgt von einer 2-minütigen Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 900 µl 37°C vorgewärmtes, antibiotikafreies LB-Medium zu dem Transformationsansatz gegeben und die Zellen eine Stunde bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. 200 µl dieses Ansatzes wurden auf einer Agar-Platte mit dem entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Schnelltransformation (nach Pope und Kent, 1996)

Die Schnelltransformation wurde bei Bakterienzellen mit Ampicillin-Resistenz angewendet. XL-1 Blue kompetente Zellen wurden aufgetaut, mit β-Mercaptoethanol permeabilisiert und 1-20 µl des Ligationsprodukts hinzugegeben. Nach Inkubation der Zellen für 5-30 min auf Eis wurde der Transformationsansatz auf vorgewärmte LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert.

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml	50 µg/ml

2.2.5 Zellbiologische Methoden

2.2.5.1 Kultivierung von Huh7 (Humane Hepatoma) Zellen

Zellen, die adhären in Monolayerkulturen in Flaschen wachsen, benötigen zu ihrem Wachstum und zur Vitalitätserhaltung regelmäßigen Wechsel des Mediums. Sie sollten vor Erreichen der vollständigen Konfluenz subkultiviert werden (Lindl, 2000).

Für das Passagieren der Huh7-Zelllinie wurden die Zellen zweimal mit 20 ml Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Gibco Invitrogen) gewaschen, um das im Medium enthaltene FCS zu entfernen, und anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA für 2 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen vom Boden der Kulturflasche und ihren Nachbarzellen zu lösen. Die Suspension wurde zweimal in ca. 13 ml DMEM-Medium gewaschen (Zentrifugation bei

800 rpm für 3 min) und 1-3 ml in eine neue Kulturflasche überführt, in der 10-15 ml 37°C warmes DMEM-Medium vorgelegt waren.

2.2.5.2 Bestimmung der Zellzahl

Eine genaue Bestimmung der Zellzahl ist unerlässlich, um definierte Zellzahlen ausplattieren zu können. Zu dünn ausgesäte Zellen wachsen nur sehr langsam, zu dicht ausgesäte können ihren Phänotyp verändern. Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer konnten Zellsuspensionen in geeigneter Verdünnung ausgezählt werden.

$(\text{Anzahl der Zellen in 4 Quadraten} / 4) \times 10^4 \times \text{Verdünnung} = \text{Anzahl der Zellen} / \text{ml}$

2.2.5.3 Einfrieren und Auftauen von Huh7-Zellen

Die Zellen wurden mittels Trypsinbehandlung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und für 3 min bei 800 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml DMEM-Medium und 2 ml Einfriermedium (*freezing solution*) resuspendiert, jeweils 1 ml in ein Kryoröhrchen überführt und für 10 min in einem Ethanol-Trockeneisbad langsam heruntergekühlt. Anschließend wurden die Zellen für 24 Std. bei -80°C gelagert, bevor sie in flüssigem Stickstoff bei -196°C dauerhaft aufbewahrt werden konnten.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden in ein 15 ml Falcon überführt, in das ca. 15 ml 37°C warmes DMEM-Medium vorgelegt waren, und für 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 37°C warmen DMEM-Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium bei den aufgetauten Zellen gewechselt.

2.2.6 Tierexperimentelle Methoden

2.2.6.1 Anästhesie und Blutentnahme von Mäusen und Ratten

Um die Parasiten aus dem Blut der Nagetiere isolieren zu können, musste eine möglichst große Menge Blut mittels Herzpunktion den Mäusen bzw. Ratten entnommen werden.

Hierfür wurden die Tiere einzeln in einem Glasbehälter mit Diethyläther (Riedel-de Haen) getränkten Tüchern narkotisiert. Nach 1–2 min sind die Tiere betäubt und schmerzfrei, so dass nach dem Freipräparieren des Herzens die Punktion mit einer heparinisierten Spritze (Heparin; Braun) vorgenommen werden konnte.

2.2.7 *Anopheles*-Methoden

2.2.7.1 Mücken-Aufzucht

Der für den Malaria-Erreger susceptible G3 Stamm und der refraktäre L3-5 Stamm von *Anopheles gambiae* sowie *Anopheles stephensi* Mücken wurden bei 27°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75% und einem 12/12 Stunden Hell/Dunkel Zyklus gezüchtet. Die Larven wurden in deionisiertem Wasser, das mit 0,1% Salz versetzt war, großgezogen und mit pulverisiertem Katzenfutter gefüttert. Die adulten Mücken wurden *ad libitum* an einem Wattestück gefüttert, das zuvor mit 15% Zuckerlösung (10% *An. stephensi*) getränkt worden war. Für einen vollständigen Lebenszyklus ließ man weibliche Mücken an anästhesierten NMRI-Mäusen Blut saugen.

2.2.7.2 Infektion von *Anopheles*-Mücken mit *P. berghei*

GFP-exprimierende *P. berghei* Parasiten wurden in NMRI Mäuse injiziert. Die Parasitämie der Tiere wurde mittels Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen (Giemsa; BDH Laboratory Supplies) und Exflagellation überprüft. Bei hohem Prozentsatz an Gametozyten und guter Exflagellation wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazinhydrochlorid (VWF; Bayer) narkotisiert und für ca. 15 min auf einen Käfig mit 3 – 5 Tage alten Mücken gelegt. Zehn Tage nach der infektiösen Blutmahlzeit wurde die Infektivität bei *An. stephensi* Mücken anhand der Oozystenanzahl pro Mitteldarm abgeschätzt.

2.2.7.3 dsRNA-Injektion

Soweit nicht eingehender spezifiziert wurden im Rahmen der RNAi-Studien 1-Tage alte Mücken durch CO₂ oder Eis temporär betäubt und die dsRNA (3 µg/µl) mit einem Nano-Injektor (Drummond) intrathorakal in die Tiere injiziert. Das maximale Injektionsvolumen betrug 69 nl; bis zu viermal hintereinander konnte das Injektionsvolumen in die selbe Wunde gepumpt werden, ohne dass Flüssigkeit aus der Wunde wiederaustrat oder die Mücke Schaden nahm. Drei Tage nach der Injektion wurden die Mücken mit *P. berghei* infiziert. Die Zeit dazwischen diente zur Regeneration der Mücken und zur Aufnahme der dsRNA in die Zellen.

2.2.7.4 Präparation des Mitteldarmes

Zur Quantifizierung und Analyse von Oozysten bzw. eingekapselten Ookineten wurden den infizierten weiblichen Mücken die Mitteldärme entnommen und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierfür wurden die Mücken durch einen Kälteschock von ca. 3 min

auf Eis betäubt. Auf einer Glasplatte mit Medium (PBS oder RPMI/3% BSA) wurde das Abdomen an den letzten beiden Segmenten mit einer feinen Sezierpinzette (Dumont, Nr. 5) fixiert und mit einer weiteren Pinzette das Abdomen vom Thorax getrennt und langsam nach hinten abgestreift. Der am Thorax verbleibende Mitteldarm lag nun frei und konnte, vom vorderen Teil des Darms getrennt, auf einen mit Medium bedeckten Objektträger gelegt und mikroskopiert werden.

2.2.7.5 Gewinnung der Hämolymphe

Für die Gewinnung der Hämolymphe aus adulten Mücken wurden die Tiere zwischen Thorax und Abdomen mit feinen Sezierpinzetten (Dumont, Nr. 5) auseinandergezogen. Der austretende Hämolymphtropfen wurde mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in einen Extraktionspuffer, bestehend aus 20 mM EGTA, 2 mg/ml Pefabloc (Böhringer, Mannheim) in 1x PBS und saturiert mit Phenylthiourea, überführt. Der Korpus der Mücke wurde ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben und das Ganze für 2 min bei 3.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Sediment wurde erneut mit Extraktionspuffer versetzt (5 µl pro Mücke), zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit dem Überstand aus dem ersten Schritt vereint. Während der ganzen Zeit wurde auf Eis gearbeitet. Durch Abschätzen des Gesamtvolumens des Überstandes wurde das Volumen pro Mücke für den Immunoblot berechnet. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren.

2.2.8 *Plasmodium*-Methoden

2.2.8.1 Transfektion von *Plasmodium berghei*

Gene targeting wurde in den letzten Jahren erfolgreich angewendet, um Genfunktionen *in vivo* zu untersuchen. Dabei können Gene durch homologe Rekombination verändert oder ausgeschaltet werden. Die Technik wird sowohl in *P. falciparum* als auch in *P. berghei* eingesetzt. In beiden Fällen werden die Blutstadien der Parasiten durch Elektroporation transformiert und die Transfektionsvektoren ausschließlich durch homologe Rekombination integriert. Da *Plasmodium* während des Großteils seines Lebenszyklus haploid ist, kann die Funktion eines Proteins, das von einem *single-copy gene* kodiert wird, mit nur einem Selektionsmarker untersucht werden.

Der am häufigsten verwendete Selektionsmarker ist das DHFR/TS-Gen (Dihydrofolat-Reduktase-Thymidylat-Synthase), welches von *P. falciparum*, *P. berghei* oder *Toxoplasma*

gondii abgeleitet wurde (Van Dijk et al., 1995, 1996; Wu et al., 1996). Durch eine Punktmutation an Position 110 von Serin zu Asparagin verleiht DHFR-TS Resistenz gegenüber Pyrimethamin. Die Dihydrofolat-Reduktase katalysiert die Reduktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat, einem Koenzym für die *de novo* Nukleotid-Synthese.

Der Vorteil des DHFR/TS-Gens von *T. gondii* ist, dass unerwünschte Rekombinationen mit dem endogenen *P. berghei* DHFR-TS-Gen vermieden werden. Des Weiteren scheinen *P. berghei*-Parasiten, die das *T. gondii* DHFR/TS-Gen enthalten, 10-100mal resistenter gegenüber Pyrimethamin zu sein als Parasiten mit dem *P. berghei* DHFR/TS-Konstrukt (Van der Wel et al., 1997).

Das Selektionsgen wird von zwei Kontrollelementen flankiert. Die 5'-Region enthält den Promotor und die 5'-nicht translatierte Sequenz, die 3'-Region beinhaltet die 3'-nicht translatierte Sequenz und das Stoppsignal (Waters et al., 1997; Thathy und Ménard, 2002).

2.2.8.2 Präparation der Parasiten und *in vitro*-Kultivierung der Blutstadien

GFP-exprimierende Parasiten des Pyrimethamin-sensitiven *P. berghei*-Stammes ANKA (cl 507 von A. Waters) wurden intraperitoneal in 100-150 g schwere Wistar-Ratten injiziert. Drei bis vier Tage nach der Injektion sollte die Parasitämie zwischen 1-3% liegen. Das Blut der Ratte wurde durch Herzpunktion mit einer heparinisierten Spritze entnommen und zu 10 ml Kulturmedium gegeben, welches 0,25 ml Heparinlösung (200 U/ml; Braun) enthält. Die roten Blutkörperchen wurden bei 1.000 rpm für 8 min bei RT abzentrifugiert, wodurch man ca. 3 ml Erythrozyten-Niederschlag erhielt. Dieser wurde in 50 ml Kulturmedium aufgenommen und in einem Erlenmeyerkolben überführt, in dem 100 ml auf 37°C erwärmtes Kulturmedium vorgelegt waren, so dass ein Endvolumen von 150 ml erreicht wurde. Die Kultur wurde in einem Inkubator mit einem Gasgemisch von 10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂ bei 37°C über Nacht für 15 bis 16 h bei 77 rpm vorsichtig geschüttelt. Während dieser Zeit reifen die meisten Parasiten zu Schizonten. Am nächsten Tag sollte die Kultur ein hohes Schizonten/Gametozyten-Verhältnis haben.

2.2.8.3 Vorbereitung der Transfektionskonstrukte

Für eine *P. berghei* Transfektion wurden 60 µg der durch Maxi-Präparation gewonnenen Plasmid-DNA eingesetzt. Hierfür wurde der Transfektionsvektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen über Nacht linearisiert und das Sediment nach einer Alkoholfällung am folgenden Tag in 300 µl PBS aufgenommen. Die DNA konnte direkt für die Elektroporation eingesetzt werden.

2.2.8.4 Elektroporation der Schizonten

Die Transfektion erfolgt durch Elektroporation einer Erythrozytenkultur von Schizontenstadien mit Plasmid-DNA.

Dazu wurde nach 15-16 Std. die Übernachtskultur gestoppt und die Qualität mit Hilfe eines Ausstrichs bestimmt. Die Mehrheit der Parasiten sollten reife Schizonten sein, die von den nicht-infizierten roten Blutkörperchen mit Hilfe eines Dichtegradienten getrennt werden. Hierfür wurde eine 55% Nycodenz/PBS-Lösung (Axis Shield) angesetzt. Die Kultur wurde zu je 35 ml in vier 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und mit 10 ml Nycodenz/PBS-Gradienten langsam unterschichtet. Der Gradient wurde für 25 min bei 1.000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bildet sich ein Ring aus hauptsächlich mit Schizonten infizierten Erythrozyten zwischen dem Nycodenz/PBS-Gradienten und dem Überstand des Mediums. Der Ring aus Schizonten in der Zwischenphase wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette gesammelt, wobei die Schizonten von je zwei Falcon-Röhrchen vereinigt wurden. Mit Kulturmedium auf ein Volumen von 30 ml aufgefüllt wurden die Parasiten nun für 10 min bei 1.000 rpm und RT sedimentiert. Die zwei resultierenden Schizonten-Niederschläge wurden zu insgesamt 100 µl vereinigt, welches ca. 10^8 Schizonten enthält, die während der Elektroporation ca. 10^9 Merozoiten entlassen. Die ca. 100 µl Schizonten wurden sofort zur linearisierten Plasmid-DNA gegeben und das Gemisch in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette einem elektrischen Impuls von 800 V und 25 µFD ausgesetzt. Die Zeitkonstante sollte dabei zwischen 0,8 und 1,4 ms liegen. Jeweils 200 µl elektroporierte Parasiten wurden in die Schwanzvene von jungen (55-60 g) Sprague-Dawley (SD)-Ratten gespritzt.

2.2.8.5 Selektion der Parasiten

Einen Tag nach der Elektroporation wurde die Parasitämie der Ratten mittels Giemsa-gefärbter (BDH Laboratory Supplies) Blutausstriche untersucht. Während der letzten 24 Std. konnten die Parasiten einen kompletten Zyklus der asexuellen Teilung ohne Selektionsdruck durch Pyrimethamin (Sigma) durchlaufen. 27-30 Std. nach der Elektroporation wurde mit der Pyrimethamin-Behandlung begonnen. Dazu wurde den Ratten 25 mg/kg Pyrimethamin intraperitoneal injiziert und dies im 24 Std. Takt wiederholt, bis die Zahl der Parasiten unter die Detektionsgrenze im Ausstrich fiel. Gewöhnlich wurde 3-5 Tage mit der Selektionsdroge behandelt.

Mit dem Erscheinen einer Pyrimethamin-resistenten Parasiten-Population ist 8-10 Tage nach der Elektroporation zu rechnen. Sie wird als parentale resistente Population bezeichnet. Die

Ratten mit den Parental-Populationen wurden für weitere 2-3 Tage mit Pyrimethamin behandelt. Während dieser Zeit sollte die Parasitämie trotz Behandlung weiter ansteigen.

Sobald die ersten resistenten Parasiten im Ausstrich zu sehen waren, wurden die Erreger in naive NMRI-Mäuse transferiert. Hierfür wurde der parentalen Ratte ca. 50-100 µl Blut an der Schwanzvene entnommen, mit 200 µl PBS verdünnt und intravenös der naiven Maus injiziert. Stieg bei diesen Mäusen ebenfalls die Parasitämie unter Pyrimethamin-Behandlung an, konnte eine weitere resistente Population isoliert werden, wodurch eine zusätzliche Selektion der Parasiten gewährleistet wurde. Um sicher zu gehen, dass hierbei nur Parasiten der parentalen Population und keine resistenten Wildtyp-Parasiten passagiert werden, wurde der Transfer so früh wie möglich durchgeführt.

Für die genotypische Analyse der resistenten Populationen wurde den Tieren ab einer Parasitämie von über 2% das Blut mittels Herzpunktion entnommen. Ein Aliquot wurde als Stabilat eingefroren und vom restlichen Blut die genomische DNA der Parasiten isoliert.

2.2.8.6 Herstellung von Blutstabilaten

Zur längerfristigen Lagerung von infektiösen Blutstadien wurden Stabilate angefertigt. Hierfür wurden nach der Herzpunktion Aliquots von 100 µl bei Mäusen und 300 µl bei Ratten jeweils mit dem zweifachen Volumen an *freezing solution* gut vermischt und unmittelbar in einem 2 ml Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit einem solchen Stabilat konnten zu einem späteren Zeitpunkt Mäuse oder Ratten erneut infiziert werden.

2.2.8.7 Präparation genomischer DNA aus Blutstadien

Um die Erythrozyten von anderen Blutzellen zu trennen, wurde das Blut über eine Säule aufgereinigt. Diese besteht bei Mäusen aus einer 5 ml, bei Ratten aus einer 20 ml Spritze und setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: etwas Watte als untere Abgrenzung, gefolgt von ca. 2/3 Fibrose Cellulose Puder (Whatman) zum Entfernen der Leukozyten und 1/3 Glasperlen (Sigma) zum Entfernen der Thrombozyten.

Die Säule wurde zum Equilibrieren mehrfach mit 1x PBS durchgespült, bevor das Blut auf die Säule gegeben und durch erneutes waschen der Säule mit 1x PBS die Erythrozyten ausgespült werden konnten. Das Blut einer Maus wurde in 14 ml, das einer Ratte in 50 ml 1x PBS aufgenommen. Nach einer Zentrifugation von 8 min bei 1.500 rpm und RT wurde der Niederschlag zum Aufschließen der Erythrozyten in 0,2% Saponinlösung (Sigma) resuspendiert. Die freigesetzten Parasiten wurden anschließend für 8 min bei 2.800 rpm und RT zentrifugiert, das Sediment in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß

überführt. Die Probe wurde ein weiteres Mal für 2 min bei 7.000 rpm und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag in 200 µl PBS aufgenommen.

Für die Isolierung der genomischen DNA aus dem Parasitenniederschlag wurde das „QIAamp DNA Blood Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.8.8 Klonierung von Parasiten

Für die Isolierung eines Klons von rekombinanten Parasiten wird das Blut einer mit der entsprechenden Parasiten-Population infizierten Maus so weit verdünnt, dass ein Parasit pro Maus injiziert werden kann.

Der Maus wurde hierfür Blut entnommen, sobald die Parasitämie zwischen 0,1 und 1% lag. Die Parasitämie wurde sehr genau ausgezählt und die Anzahl der infizierten Erythrozyten nach folgender Formel berechnet: $7 \times 10^6 \text{ (RBC / } \mu\text{l Blut)} \times \text{Parasitämie} \times 10^{-2} \text{ Parasiten / } \mu\text{l}$.

Das Blut wurde mit RPMI-Medium entsprechend verdünnt, so dass sich statistisch gesehen nur ein Parasit in einem Gesamtvolumen von 100 µl befand. Diese Verdünnungen wurden in 15 NMRI-Mäuse intravenös injiziert und deren Parasitämie nach 8-10 Tagen mit Giemsa-gefärbten Blutaustriechen überprüft. Es sollten nicht mehr als 40% der Mäuse Blutstadien-positiv werden, denn nur dann kann davon ausgegangen werden, dass nicht mehr als ein Parasit injiziert wurde. Ab einer Parasitämie von 2% wurden die Tiere geblutet, Stabilate gemacht, die genomische DNA der Parasiten isoliert und der Genotyp der Parasiten mittels PCR analysiert.

2.2.8.9 Giemsa-Färbung und Bestimmung der Parasitämie

Zur Bestimmung der Parasitämie wurden Blutaustrieche gemacht, die anschließend mit Giemsa gefärbt wurden. Dazu wurde einer Maus oder Ratte ein Tropfen Blut durch Schwanzpunktion entnommen, auf einen Objektträger übertragen und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Die luftgetrockneten Ausstriche wurden in Methanol fixiert, für 10 – 30 min in frisch angesetzter Giemsa-Färbelösung (1:10 in VE-Wasser) gefärbt und anschließend mit VE-Wasser abgespült. Die getrockneten Ausstriche wurden bei 100-facher Vergrößerung mit einem Öl-Immersionsobjektiv untersucht.

Die Parasitämie ist der prozentuale Anteil *Plasmodium*-infizierter Erythrozyten. Für ihre Bestimmung wurde ein Bereich des gefärbten Blutaustriechs mit einlagiger Erythrozyten-Schicht ausgewählt und in mindestens zehn nebeneinanderliegenden Sichtfeldern die Anzahl der Erythrozyten und Parasiten ausgezählt. Die Parasitämie berechnet sich wie folgt:

$$(\text{Anzahl Parasiten} / \text{Anzahl Erythrozyten}) \times 100 = \text{Parasitämie} [\%]$$

2.2.8.10 Analyse der Exflagellation männlicher Gametozyten

Bevor *Anopheles* Mücken an *P. berghei*-infizierten Mäusen gefüttert werden konnten, musste sichergestellt werden, dass die männlichen Gametozyten ausreichend exflagellieren. Normalerweise findet die Exflagellation, d.h. die Differenzierung des Mikrogamonten in vier bis acht Mikrogameten im Darm der Mücke statt. Sie wird unter anderem durch einen Temperaturabfall von 2-5°C induziert (Sinden und Croll, 1975). Diese Eigenschaft nutzt man *in vitro* aus, indem man die Parasiten aus dem Blut der Maus von 37°C auf Raumtemperatur bringt.

Durch Schwanzpunktion wurde der Maus ein Tropfen Blut entnommen, auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach etwa 10 min bei RT wurde die Exflagellation der Parasiten bei 40-facher Vergrößerung untersucht. Waren durchschnittlich 3-6 exflagellierende Mikrogamonten pro Gesichtsfeld zu sehen, wurde die Maus für eine infektiöse Blutmahlzeit von *Anopheles* Mücken verwendet.

2.2.8.11 Präparation der Mitteldarmsporozoiten

Für die Isolation der Mitteldarmsporozoiten wurden die Mitteldärme infizierter *An. stephensi* Weibchen 14 Tage nach der Blutmahlzeit herauspräpariert und in RPMI/3% BSA Medium (GibcoBRL) aufgenommen. Zu diesem Zeitpunkt sind die Oozysten nahezu ausgereift und die ersten Sporozoiten werden ins Hämozöl freigesetzt. Die Mitteldärme wurden in einem Eppendorfgemäß gesammelt und mit einem Plastikstößel zerkleinert und homogenisiert. Durch Zentrifugation des Homogenats für 3 min bei 1.000 rpm und 4°C wurden die Gewebereste sedimentiert und die im Überstand enthaltenen Sporozoiten in ein neues Eppendorfgemäß überführt. Das Sediment wurde mit ca. 150 µl Medium versetzt, erneut homogenisiert und zentrifugiert und der Überstand mit dem vorangegangenen vereinigt.

2.2.8.12 Präparation der Hämozölsporozoiten

15-16 Tage nach der infektiösen Blutmahlzeit weiblicher *An. stephensi* Mücken wurde die Hämolymphe mit den darin enthaltenen Sporozoiten isoliert. Hierfür wurden die letzten beiden Segmente des Abdomens entfernt, eine fein ausgezogene Pasteur-Pipette seitlich in den Thorax der Mücke flach eingeführt und das Tier mit dem in der Pasteur-Pipette enthaltenem RPMI-Medium (GibcoBRL) durchgespült. Die ausgetretenen Tropfen wurden mit einer Pipette aufgenommen, gesammelt und auf Eis bis zur weiteren Verwendung der Sporozoiten gelagert.

2.2.8.13 Präparation der Speicheldrüsenporozoiten

Für die Isolation der Speicheldrüsenporozoiten wurden die Speicheldrüsen weiblicher *An. stephensi* Mücken 17 Tage nach der infektiösen Blutmahlzeit isoliert. Hierfür wurde der Thorax mit einer feinen Sezierpinzette fixiert und mit einer weiteren der Kopf langsam nach hinten geschoben und abgetrennt. Die freiliegenden Speicheldrüsen wurden vom Kopf entfernt und in einem Eppendorfgefäß mit RPMI/3% BSA Medium auf Eis gesammelt. Mit einem Plastikstößel wurde das Gewebe zerkleinert, homogenisiert und für 3 min bei 1.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand mit den Sporozoiten wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Sediment mit 150 µl RPMI/3% BSA erneut gewaschen. Beide Überstände wurden am Ende vereinigt.

2.2.8.14 Bestimmung der Sporozoitenzahl

Die Sporozoiten wurden durch geeignete Verdünnung der Ausgangssuspension in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und die Anzahl der Sporozoiten pro infiziertem Weibchen ermittelt. Die Zahl wurde hierbei nach folgender Formel berechnet:

$(\text{Anzahl Sporozoiten in 4 Quadraten} / 4) \times 10 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Anzahl Sporozoiten} / \mu\text{l}$
 $\text{Anzahl Sporozoiten} / \mu\text{l} \times \text{Gesamtvolumen der Suspension} / \text{Anzahl Mücken} = \text{Anzahl Sporozoiten} / \text{Mücke}$

2.2.8.15 *gliding motility*-Test

Beim Gleiten über einen BSA-beschichteten Objektträger hinterlassen Sporozoiten eine Spur von Oberflächenproteinen, die durch Antikörper angefärbt werden können.

Für den Versuch wurde ein 8-*well*-Objektträger mit je 20 µl RPMI/3% BSA pro *well* für 15 min bei 37°C inkubiert, um die Oberfläche mit BSA zu bedecken. Anschließend wurden die Sporozoiten (Minimum 10.000 pro *well*) auf den beschichteten Objektträger gegeben und für 15 min bei 37°C gleiten gelassen. Es folgte die Fixierung mit 4% Formaldehyd (Merck) für 10 min bei RT. Nach dem Fixierungsschritt wurde der Objektträger 2-3 mal mit PBS/1% FCS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch 15-minütige Inkubation in PBS/10% FCS bei 37°C blockiert. Als primärer Antikörper wurde Maus Anti-CSP (1:500 bzw. 1:1000 bei CS-Oberflächenlokalisation) für 45 min bei 37°C auf den Objektträger gegeben. Nach 3-4 Waschschritten mit PBS/1% FCS wurden die Sporozoiten mit dem sekundären Antikörper Ziege Anti-Maus-Alexa Fluor 488 (1:300) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Sporozoiten mit PBS/50% Glycerol bedeckt und unter einem

Deckgläschen mit Nagellack luftdicht eingeschlossen. Die Bewegungsspuren der Sporozoiten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

2.2.8.16 Leberstadien-Test

Bevor die *Plasmodium*-Parasiten die Erythrozyten infizieren, durchlaufen die Sporozoiten in den Hepatozyten ein Stadium der Schizogonie, bei dem sie als exo-erythrozytäre Form (EEF) oder Leberstadium vorliegen. Diese Stadien können *in vitro* in Huh7-Zellen kultiviert und durch Antikörperfärbung detektiert werden (Frevort et al., 1996).

Für die Analyse der EEFs wurden einen Tag vor dem eigentlichen Experiment in *Chamberslides* (Nunc, Wiesbaden) je 3×10^4 Hepatozyten in 400 μ l Medium pro Kammer ausplattiert und bis zur Konfluenz bei 37°C kultiviert.

Für den Test wurden Hämozölsporozoiten in verschiedener Anzahl (1.000, 10.000 und 100.000) in 100 μ l Gesamtvolumen pro Kammer pipettiert und für die Invasion 90 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abnehmen der Suspension wurden die Zellen mit 400 μ l vorgewärmten Kulturmedium bedeckt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Um Kontaminationen mit Bakterien vorzubeugen, wurde das Kulturmedium zusätzlich mit 100x *round up* versetzt. Am Tag 2 wurde das Medium mit *round up* morgens und abends gewechselt. 48 Std. nach der Invasion wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol für 10 min fixiert, gefolgt von dreimaligem Waschen mit PBS/1% FCS. Nach einem 30-minütigen Blockierungsschritt mit PBS/10% FCS bei 37°C wurden die Zellen mit dem primären Antikörper Anti-*PbHSP70* (1:1) für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS/1% FCS wurde der sekundäre Antikörper Anti-Maus-AlexaFluor 488 (1:300) für 45 min bei 37°C dazugegeben. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS/1% FCS wurde das Präparat mit PBS/50% Glycerol (Roth) und einem Deckgläschen eingebettet und luftdicht verschlossen.

2.2.8.17 Hepatozyten-Invasions-Test

Plasmodium-Sporozoiten können mithilfe bestimmter Oberflächenproteine in die Hepatozyten eindringen. Durch eine sogenannte Doppelfärbung kann das Invasionsverhalten der Parasiten analysiert werden.

Hierfür wurden, wie oben bereits beschrieben, Huh7-Zellen in *Chamberslides* kultiviert. Pro Kammer wurden 10.000 Hämozölsporozoiten in 100 μ l Gesamtvolumen auf die Zellen gegeben und für 90 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Suspensions-Überstand abgenommen und die Zellen für 10 min mit 400 μ l 4% Formaldehyd (Merck) fixiert. Nach

dreimaligem Waschen wurden unspezifische Bindungen mit PBS/10% FCS für 30 min bei 37°C blockiert und mit dem primären Antikörper Anti-*PbCSP* für weitere 45 min bei 37°C inkubiert. Es folgten drei Waschschritte und die Inkubation mit dem sekundären Fluoreszenzgekoppelten Antikörper Anti-Maus Alexa-Fluor 546 für 45 min. Dieser färbt die extrazellulären Sporoziten außerhalb der Hepatozyten rot. Zum Anfärben der intrazellulären Sporoziten wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol für 10 min permeabilisiert, erneut mit dem primären Antikörper Anti-*PbCSP* und anschließend mit dem sekundären Antikörper Anti-Maus Alexa-Fluor 488 angefärbt, der die intrazellulären Sporoziten grün erscheinen lässt.

Das Verhältnis der intra- zu den extrazellulären Sporoziten wurde mittels unterschiedlicher Anfärbungen im Fluoreszenzmikroskop (Konfokales Laser-Scan-Mikroskop) sichtbar gemacht.

Ergebnisse – Teil I *Anopheles*

Die Rolle der neun *Anopheles gambiae* Prophenoloxidasen in der Immunabwehr von *Plasmodium berghei*

3.1 Ergebnisse – Teil I

Prophenoloxidasen (PPOs) gelten als Schlüsselenzyme der Melanisierungsreaktion, die im letzten Schritt der Kaskade in aktiver Form die Oxidation von Mono- und Diphenolen zu Orthoquinonen katalysieren, die wiederum nicht-enzymatisch zu Melanin polymerisieren (Abb. 1.6).

Anopheles gambiae besitzt neun *PPO*-Gene, deren Expressionsprofile teilweise überlappen. Obwohl in anderen Insekten wie dem Tabakswärmer *Manduca sexta* (Kanost et al., 2004), dem Maulbeerspinner *Bombyx mori* (Ashida et al., 1983) oder der Stechmücke *Armigeres subalbatus* (Shiao et al., 2001) eine direkte Beteiligung der PPOs in der Melanisierungskaskade erfolgreich nachgewiesen wurde, bleibt die Rolle der *An. gambiae* PPOs noch offen.

Durch RNA-Interferenz wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression einzelner *PPO*-Gene gezielt herunterreguliert und ihre Funktion in der Mücke analysiert. Im Mittelpunkt der phänotypischen Untersuchungen stand die Auswirkung der *PPO*-Knockdowns auf die Fähigkeit von *An. gambiae*, *Plasmodium berghei* Parasiten beim Durchqueren des Mitteldarmepitheliums melanotisch einzukapseln.

Für die funktionelle Analyse wurden zwei Stämme von *An. gambiae* als Modellsysteme eingesetzt: L3-5 und der durch RNA-Interferenz modifizierte Stamm G3/dsCTL-MA2.

L3-5 Mücken

Der genetisch selektionierte L3-5 Stamm von *An. gambiae* ist in der Lage, frühe Ookineten und Oozysten von *Plasmodium*-Parasiten melanotisch einzukapseln (Abb. 3.1), sobald diese das Mitteldarmepithel durchquert und die Basallamina erreicht haben (Collins et al., 1986). Der Lebenszyklus des Malaria-Erregers wird somit unterbrochen und verleiht dem L3-5 Stamm Resistenz. Neuere Erkenntnisse deuten daraufhin, dass nicht nur die melanotische Einkapselung von Ookineten, sondern auch deren Lyse als weitere Immunabwehr zur Refraktorität des L3-5 Stammes beiträgt (Blandin et al., 2004).

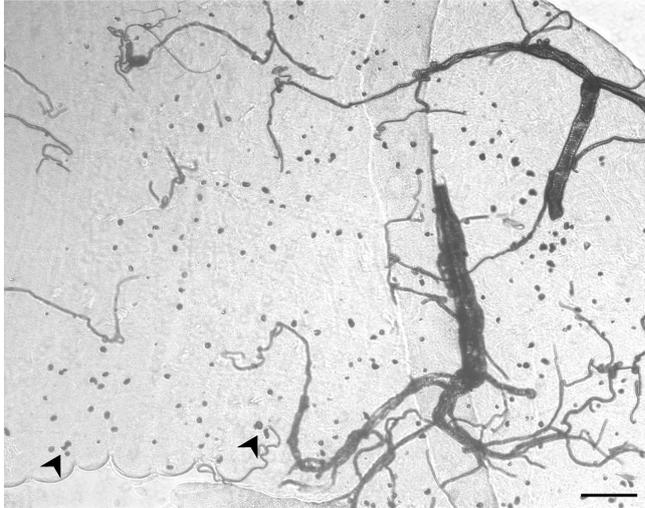


Abb. 3.1 Melanotische Einkapselung von *P. berghei* Parasiten in L3-5

Die Abb. zeigt den herauspräparierten Mitteldarm einer mit *P. berghei* infizierten L3-5 Mücke am Tag 7 nach der Infektion. Einkapselte Parasiten sind exemplarisch durch ▲ markiert, — entspricht 100 µm.

G3 bzw. G3/dsCTL-MA2 Mücken

Der G3 Stamm ist suszeptibel für Malaria-Erreger. Obwohl der Großteil der invadierenden Ookineten durch Lyse abgetötet wird (~ 80%; Blandin et al., 2004), entwickelt sich ein Teil der Parasiten auf der Außenseite des Mitteldarmepitheliums zu Oozysten weiter (Abb. 3.2).

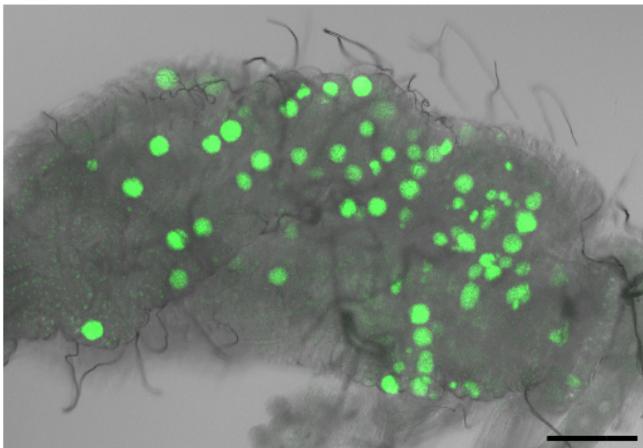


Abb. 3.2 Entwicklung von *P. berghei* Parasiten in infizierten G3-Mücken

Dargestellt ist der herauspräparierte Mitteldarm einer G3-Mücke, die 7 Tage zuvor mit einem GFP-exprimierenden *P. berghei* Erreger infiziert wurde. Die Parasiten haben sich zu grünfluoreszierenden Oozysten entwickelt. — 100 µm.

Jüngste Forschungsergebnisse haben ein Vektorprotein (CTL-MA2) identifiziert, das den Malaria-Parasiten vor Melanisierung im suszeptiblen G3-Stamm schützt (Osta et al., 2004). Durch Knockdown von *CTL-MA2* mittels RNA-Interferenz werden 53% der normalerweise durchkommenden Parasiten melanotisch eingekapselt (Abb. 3.3).

Um die Funktion der *PPO*-Gene von *An. gambiae* bei der Einkapselung von *P. berghei* Parasiten zu untersuchen, wurden beide Systeme – sowohl L3-5 als auch G3/dsCTL-MA2 – verwendet, da ein unterschiedlicher genetischer Hintergrund der beiden Melanisierungsreaktionen nicht ausgeschlossen werden kann.

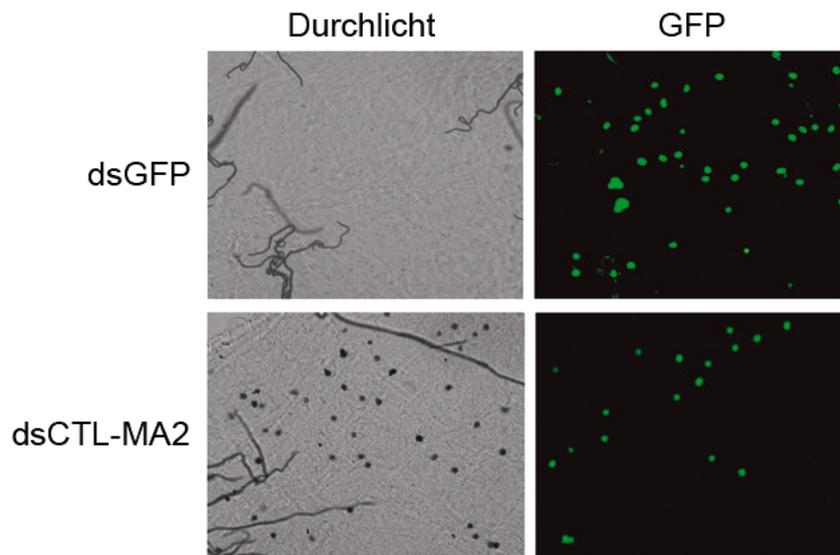


Abb. 3.3 Induktion der Melanisierungskaskade nach *CTL-MA2* KD in G3-Mücken

Die Abbildung zeigt *P. berghei* Oozysten und melanierte Ookineten auf der Mitteldarmaußenseite infizierter G3 Mücken, deren *CTL-MA2* Expression durch Injektion von *CTL-MA2* doppelsträngiger RNA (dsCTL-MA2) herunterreguliert wurde. Als Negativkontrolle wurde dsGFP verwendet. (modifiziert von Osta et al., 2004)

3.1.1 Beteiligung der PPOs an der melanotischen Einkapselung von *P. berghei* Parasiten

Um zunächst den Nachweis einer grundsätzlichen Beteiligung von PPOs an der melanotischen Einkapselung von *Plasmodium*-Erregern zu erbringen, wurden die Enzyme durch den kupferbindenden Tyrosinasehemmer Phenylthiourea (PTU) in *P. berghei* infizierten L3-5 Mücken vollständig inhibiert.

Schon früh in der Insektenbekämpfung wurde PTU erfolgreich eingesetzt, um z.B. den durch Melanisierung initiierten Wundheilungsprozess in der Raupe des Dickkopffalters *Calpododes ethlius* (Lai-Fook, 1966) oder der Schafschmeißfliegenlarve von *Lucilia cuprina* (Binnington und Barrett, 1988) zu unterbinden.

3.1.1.1 PTU verhindert die melanotische Einkapselung von *P. berghei* Parasiten in L3-5 Mücken

Für das Experiment wurden refraktäre L3-5 Mücken zwei Tage vor und nach der infektiösen Blutmahlzeit mit einer PTU/Zuckerlösung gefüttert. Kontroll-Mücken erhielten ausschließlich eine Zuckerlösung. Sieben Tage nach der Infektion mit *P. berghei*-Erregern wurden die Mitteldärme infizierter Mücken herauspräpariert, die Entwicklung der Parasiten durch

Fluoreszenzmikroskopie analysiert und die Anzahl eingekapselter Ookineten bzw. lebender Oozysten quantifiziert.

In drei unabhängigen Experimenten (Tab. 3.1) wiesen die Versuchsmücken nach oraler Verabreichung von PTU grün-fluoreszierende, lebende Oozysten auf (Abb. 3.4), während die Weiterentwicklung der Ookineten nach Überquerung des Mitteldarmepitheliums in der Kontrollgruppe durch melanotische Einkapselung unterbunden war.

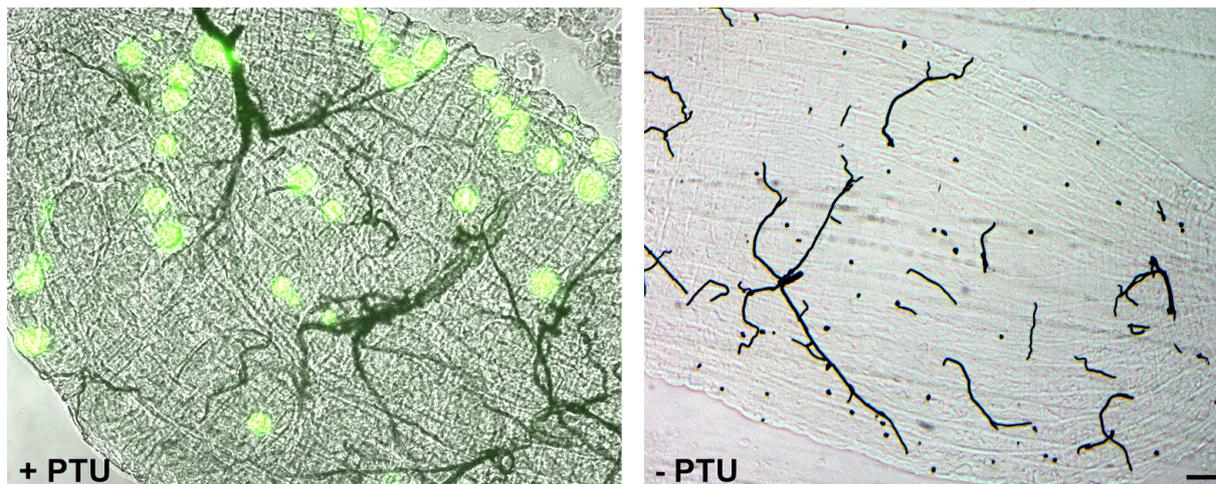


Abb. 3.4 Keine Melanisierung von *P. berghei* Parasiten in L3-5 nach PTU-Behandlung
Dargestellt sind die herauspräparierten Mitteldärme *P. berghei* infizierter L3-5 Mücken, die vor und nach der Blutmahlzeit entweder mit PTU (+ PTU; 0,7 mM) gefüttert wurden oder unbehandelt blieben (- PTU). Während sich die Parasiten bei den PTU-behandelten Mücken 7 Tage nach der Infektion zu lebenden Oozysten weiterentwickelt haben, konnten in der Kontrollgruppe (- PTU) nur eingekapselte Erreger detektiert werden. — 100 µm

Stamm	Exp.	Versuchsgruppe	Anzahl der Mitteldärme	Einkapselung [%]	Oozysten [%]	Gesamtzahl der Parasiten/Mücke
L3-5	A	+ PTU	12	0	100	20 ± 20,5
		- PTU	10	100	0	36,3 ± 23,4
	B	+ PTU	8	1,2	98,8	49,4 ± 53,4
		- PTU	9	99,9	0,1	71,1 ± 42,6
	C	+ PTU	7	0	100	16,2 ± 18,7
		- PTU	6	100	0	29,2 ± 25,5
Gesamt	+ PTU	27	0,6	99,4	27,5 ± 34,3	
	- PTU	25	99,9	0,1	47,1 ± 36	

Tab. 3.1: PTU bewirkt die Reversion des refraktären Phänotyps von L3-5 Mücken

Die Tabelle zeigt die Daten aus drei unabhängigen Experimenten (A-C), bei den L3-5 Mücken zwei Tage vor und nach der infektiösen Blutmahlzeit entweder mit einer PTU/Zuckerlösung oder ausschließlich einer Zuckerlösung gefüttert wurden. Bei der + PTU-Versuchsgruppe ist der refraktäre Phänotyp von L3-5 Mücken zu 99,4% revertiert. Die

Kontrollgruppe (- PTU) zeigt ein für L3-5 Mücken normales Einkapselungsverhalten von 99,9%. Die großen Standardabweichungen bei der Gesamtparasitenzahl pro Mücke sind auf die bei Fütterungsexperimenten üblichen Schwankungen in der Infektivität einzelner Mitteldärme zurückzuführen. Die Zahlen variierten, obwohl nicht-blutgefütterte Mücken aussortiert worden waren, von 0 - 139 Parasiten pro Mitteldarm.

3.1.1.2 PTU hat keinerlei Auswirkungen auf den Phänotyp von G3 Mücken

In der Literatur wird die Rolle der melanotischen Einkapselung von Parasiten in der Immunabwehr kontrovers diskutiert. Während auf der einen Seite Melanisierung zur Isolation und Tötung des Parasiten durch die toxischen Nebenprodukte der Reaktion führen soll (Dimopoulos et al., 1999), schlagen Blandin und Kollegen (2004) ein anderes Modell vor. Demnach werden die *P. berghei* Ookineten nach Durchquerung des Mitteldarmepitheliums von Komponenten aus der Hämolymphe wie dem Komplement-ähnlichen Thioesterprotein TEPI erkannt und durch einen bisher unbekanntem Mechanismus getötet. Erst in einem nächsten Schritt werden die toten Parasiten durch Lyse (G3) oder im Falle von L3-5 - Lyse und Melanisierung - beseitigt.

Durch eine Versuchsreihe in G3 Mücken wurde überprüft, ob PTU ausschließlich inhibierend auf die PPO-Kaskade wirkt und damit lebende Parasiten in L3-5 Mücken zur Folge hat, oder ob der Einsatz von PTU sich auch auf andere Bereiche der Immunabwehr – wie z.B. Lyse – auswirkt. Die Durchführung der Experimente war mit der unter Abschnitt 3.1.1.1 aufgeführten identisch.

Die mit PTU behandelten G3 Mücken zeigen gegenüber den Kontroll-Mücken keinerlei Unterschiede im Infektionsverhalten. Sowohl die Anzahl der Oozysten als auch die Gesamtinfektivität sind in beiden Gruppen nahezu identisch (Tab. 3.2).

Stamm	Exp.	Versuchs- gruppe	Anzahl der Mitteldärme	Anzahl der Oozysten	Gesamtzahl der Parasiten/Mücke
G3	A	+ PTU	25	47,6	47,6 ± 73,9
		- PTU	24	45,8	45,8 ± 50,3
	B	+ PTU	26	71,4	71,4 ± 91,1
		- PTU	19	67,4	67,4 ± 105,2
Gesamt	+ PTU	51	59,7	59,7 ± 83,2	
	- PTU	43	55,3	55,3 ± 79,1	

Tabelle 3.2: PTU hat keinen Effekt auf infizierte G3 Mücken

In zwei unabhängigen Experimenten (A und B) wurde nachgewiesen, dass PTU das Verhalten von *P. berghei* infizierten G3 Mücken nicht beeinflusst. Die Gesamtinfektivität und Anzahl der Oozysten sind zusammenfassend in beiden Mücken-Gruppen nahezu identisch.

3.1.2 RNA-Interferenz ermöglicht die gezielte Herunterregulierung einzelner *PPO*-Gene

Um herauszufinden, welche der neun *PPO*-Gene maßgeblich an der Melanisierung von *P. berghei* Parasiten beteiligt sind, sollte gezielt die Expression einzelner Gene durch RNA-Interferenz (RNAi) herabreguliert und ihre Funktion analysiert werden.

Der erfolgreiche Knockdown eines *An. gambiae* Gens durch intrathorakale Injektion von doppelstrang-RNAs (dsRNAs) in adulte Mücken wurde erstmalig für *Defensin* von Blandin und Kollegen (2002) beschrieben.

3.1.2.1 Herstellung der *PPO*-spezifischen dsRNAs

Für die Herstellung der *PPO* dsRNAs wurde von jedem Gen eine ca. 700 bp spezifische Sequenz in der Nähe des 3'-Terminus ausgewählt, mit Oligonukleotiden unterschiedlicher Restriktionsschnittstellen amplifiziert und in einen Expressionsvektor kloniert, der zu beiden Seiten des Polylinkers T7 Promotoren in entgegengesetzter Orientierung enthielt. Die rekombinanten Plasmide wurden entsprechend ihren Restriktionsschnittstellen in zwei separaten Ansätzen einzelverdaut und dienten als Matrize für die nachfolgende Synthese der Einzelstrang-RNAs (ssRNAs). Die ssRNAs wurden anschließend zu dsRNAs hybridisiert (Abb. 3.5).

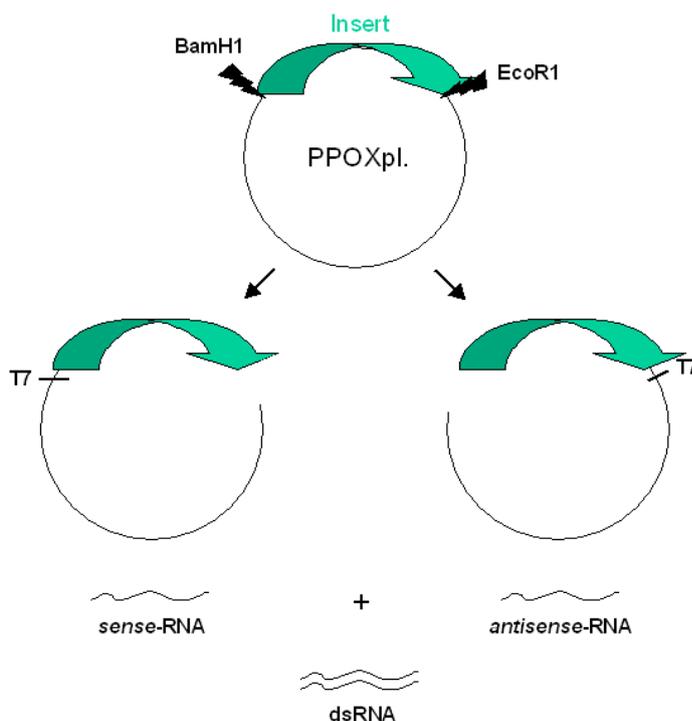


Abb. 3.5 Schematische Darstellung der dsRNA-Synthese

Dargestellt ist die Synthese der *sense* und *antisense* RNA ausgehend vom jeweiligen T7 Promotor mit nachfolgender Hybridisierung zur dsRNA als schematische Übersicht. Als *Template* dient der entsprechende, rekombinante PPO-Vektor (PPOXpl.), der zuvor mit den beiden Restriktionsenzymen BamH1 und EcoR1 separat verdaut wurde.

3.1.2.2 Durch RNAi wird die Expression einzelner *PPO*-Gene effizient auf Transkriptionsebene herabreguliert

Als Nachweis für die erfolgreiche Herunterregulierung (Knockdown) aller neun *PPO*-Gene auf Transkriptionsebene wurde ein Gemisch aller neun *PPO*-spezifischen dsRNAs (dsPPOs) intrathorakal in 1-Tage alte G3 Mücken injiziert. Kontroll-Mücken wurden parallel dazu mit der dsRNA des Grün-fluoreszierenden-Proteins (GFP) behandelt.

Einige *PPO*-Gene, wie die überwiegend in Larven exprimierten *PPO*-Gene 2, 3 und 4 (Müller et al., 1999) werden erst nach einer Blutmahlzeit wieder entscheidend hochreguliert bzw. im Falle des adultspezifischen *PPO*9s erstmalig hochreguliert. Um die Effizienz des Knockdowns zu vergleichen, wurden daher Versuchs- und Kontrollmücken entweder kontinuierlich mit Zucker oder drei Tage nach dsRNA-Injektion mit Blut gefüttert.

Vier Tage nach Beginn des Experiments wurde die Gesamt-RNA aller Versuchs- und Kontrollmücken isoliert und für semiquantitative RT-PCR Analysen eingesetzt. Das ribosomale Haushaltsgen *S7* diente hierbei als interne Ladekontrolle (Abb. 3.6).

Alle mit dsPPO1-9 injizierten G3 Mücken – ob mit Blut oder ausschließlich mit Zucker gefüttert – zeigen eine signifikante Reduktion ihrer *PPO* Transkriptmenge gegenüber den entsprechenden Kontroll-Mücken (Abb. 3.6); vorausgesetzt, das entsprechende *PPO*-Gen ist in dieser spezifischen Phase des Experiments überhaupt exprimiert.

Bei den Versuchs-Mücken, die zusätzlich am 3. Tag eine Blutmahlzeit erhielten, ist die Transkription der *PPO*-Gene im Vergleich zu den Kontroll-Mücken nicht völlig unterbunden. Dies zeigt, dass RNA-Interferenz nicht zu einem vollständigen Knockdown der Genexpression führt.

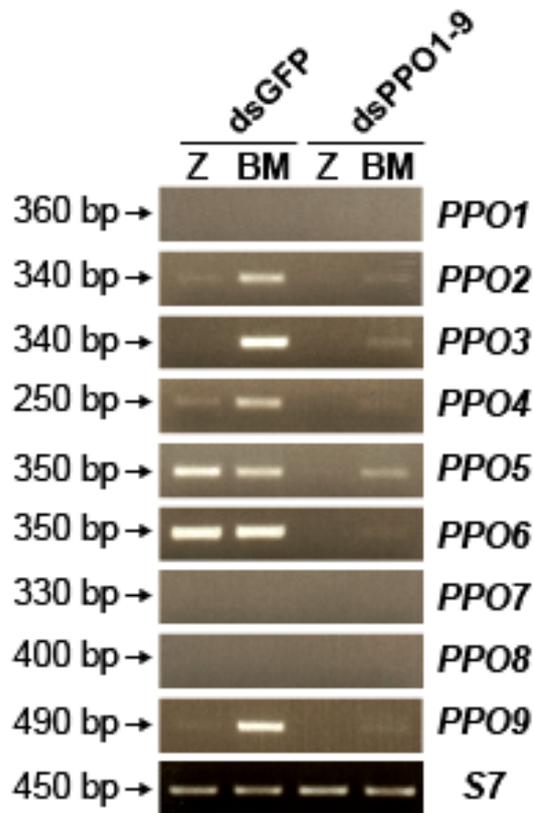


Abb. 3.6 Effiziente Reduktion der *PPO*-Expression durch RNAi

PPO-Expressionsprofile wurden vier Tage nach dsPPO1-9 Injektion in G3 Mücken mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Versuchs- u. Kontrollmücken (dsGFP) wurden während des Experiments ausschließlich mit Zucker gefüttert (Z) oder bekamen drei Tage nach dsRNA-Injektion eine Blutmahlzeit (BM). *S7* Transkripte wurden zur Standardisierung in 21 Zyklen, *PPO* Transkripte in 30 Zyklen amplifiziert.

3.1.2.3 DsPPO9 reguliert spezifisch die Expression des Gens herunter

Um Kreuzreaktionen der doppelstrang-RNAs untereinander auszuschließen, wurden dsPPOs einzeln in G3 Mücken injiziert und die Expressionsprofile aller *PPO*-Gene mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert.

Für die Darstellung der Knockdown-Spezifität wurde *PPO9* exemplarisch ausgewählt, da ein starker Expressionsanstieg von *PPO9* nach der Blutmahlzeit die Knockdown-Effizienz und Spezifität am deutlichsten hervortreten ließ.

Die experimentelle Durchführung war mit der unter Punkt 3.1.2.2 aufgeführten identisch. Anstelle eines Gemischs aller neun dsPPOs wurde diesmal dsPPO9 allein injiziert.

Die Analyse der semiq. RT-PCR Daten zeigt eine signifikante Herunterregulierung der *PPO9* Expression in blutgefütterten, dsPPO9 injizierten G3 Mücken im Vergleich zu den entsprechenden dsGFP behandelten Kontroll-Mücken (Abb. 3.7). Die Expressionsprofile der *PPO*-Gene 1-8 sind dagegen unverändert gegenüber denen der Kontrollgruppen.

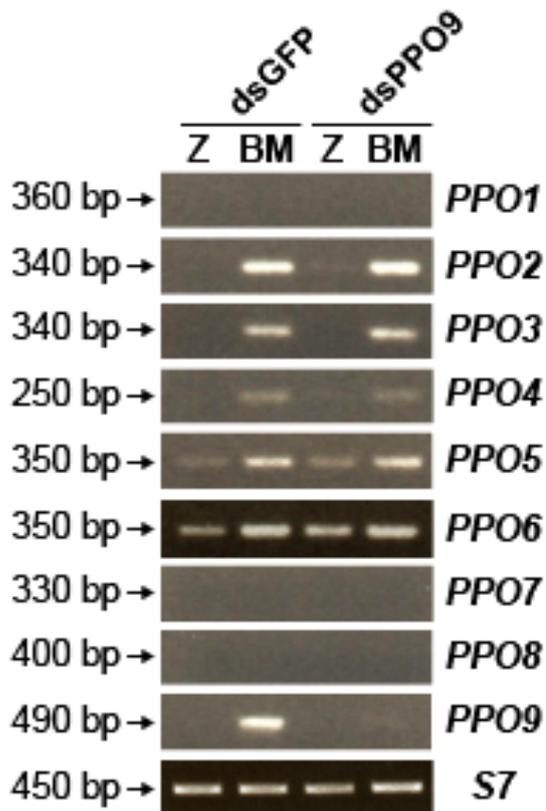


Abb. 3.7 Spezifische Reduktion der *PPO9* Expression mittels RNAi

PPO-Expressionsprofile wurden vier Tage nach ds*PPO9* Injektion in G3 Mücken mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Versuchs- u. Kontrollmücken wurden entweder ausschließlich mit Zucker behandelt oder bekamen am Tag 3 nach der dsRNA-Injektion eine Blutmahlzeit (BM). *S7* wurde zur Anpassung der einzusetzenden cDNA-Mengen verwendet. *S7* Transkripte wurden mit 21 Zyklen, *PPO*-Transkripte mit 30 amplifiziert.

3.1.2.4 RNAi reduziert die *PPO6* Expression auf Transkriptions- und Translations-ebene

Wie in den vorangegangenen Experimenten aus Abschnitt 3.1.2.2. bzw. 3.1.2.3 bereits gezeigt wurde, ist eine effiziente und spezifische Herunterregulierung einzelner *PPO*-Gene durch RNAi auf Transkriptionsebene möglich.

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit an spezifischen Antikörpern gegen PPOs, wurde der Nachweis einer fehlenden Proteinproduktion als Folge des Knockdowns exemplarisch am Beispiel von *PPO6* demonstriert. Immunoblotanalysen von 3-Tage alten G3 Mücken, die zwei Tage zuvor mit ds*PPO6* injiziert wurden, zeigten jedoch keinerlei Veränderung in ihrer *PPO6*-Proteinmenge im Vergleich zu den Kontroll-Mücken (Daten nicht gezeigt, Ergebnis vergleichbar mit Abb. 3.8).

Als möglicher Grund wurde eine hohe Stabilität der *PPO*-Proteine vermutet. *PPO6* ist zwar adultspezifisch, seine Expression startet aber bereits im späten Puppenstadium und setzt sich in der Mücke fort (Müller et al., 1999). Da die dsRNA-Aufnahme in die Zellen und die Entfaltung ihrer Wirkung zwei bis drei Tage benötigen kann (persönliche Mitteilung von S. Blandin), war die Injektion in 1-Tage alte Mücken wahrscheinlich zu spät, um eine Proteinsynthese effizient zu verhindern.

Aus diesem Grund wurden in einer weiteren Versuchsreihe spätes Puppenstadium sowie spätes 3. bzw. frühes 4. Larvenstadium des G3-Stammes mit dsPPO6 injiziert. Als Vergleich dienten unbehandelte bzw. mit H₂O injizierte Stadien. Anstelle von dsGFP wurde diesmal H₂O als Äquivalent verwendet, da auch die dsRNA in Wasser gelöst ist.

Proteinextrakte wurden aus 1-Tage alten Mücken gewonnen und PPO6 Proteinkonzentrationen mittels Immunoblotverfahren analysiert.

Die G3-Mücken, die als reife Puppen mit dsPPO6 injiziert wurden, weisen keinerlei Reduktion ihrer PPO6-Proteinmenge gegenüber den Kontroll-Gruppen auf (Abb. 3.8), obwohl auf Transkriptionsebene bei paralleler Versuchsdurchführung die *PPO6* Expression eindeutig reduziert ist (Abb. 3.9). Erst die Injektion von späten 3. bzw. frühen 4. Larvenstadien erzielt die gewünschte Reduktion von PPO6 auch auf Translationsebene. Die Versuchsgruppe zeigt eine signifikante Abnahme der PPO6 Proteinmenge gegenüber den beiden Kontrollgruppen auf (Abb. 3.10).

Die Versuche verdeutlichen, dass dsPPOs ein bis zwei Tage vor dem Expressionsbeginn ihres jeweiligen Gens injiziert werden müssen, um eine umfassende Reduktion sowohl auf Transkriptions- als auch Translationsebene zu erzielen.

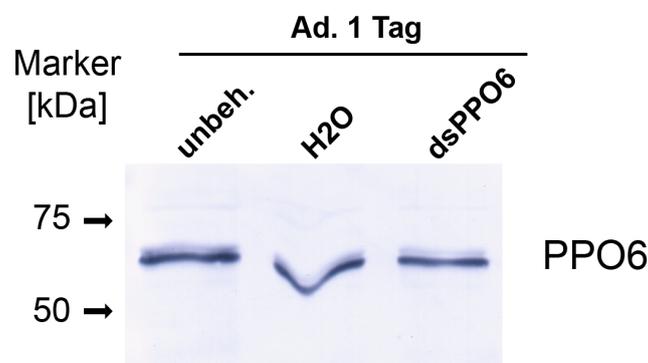


Abb. 3.8 Keine Reduktion der PPO6 Proteinmenge durch dsPPO6-Injektion in reife G3 Puppen

Gezeigt ist der Immunoblot von 1-Tage alten, adulten G3 Mücken (Ad. 1 Tag), die als reife Puppen mit dsPPO6 bzw. H₂O injiziert wurden oder unbehandelt (unbeh.) blieben. Jeweils das Proteinäquivalent einer Mücke (durch Bradford-Messungen angeglichen) wurde aufgetragen. Polyklonaler Maus-Antikörper gegen PPO6 detektierte eine starke, ca. 70 kDa Bande für PPO6 und oberhalb davon eine schwache, durch Kreuzreaktion mit PPO4 verursachte Bande. PPO6 in der dsPPO6-Versuchsgruppe zeigt keinerlei Veränderungen in der Expressionsstärke gegenüber den beiden Kontrollgruppen.

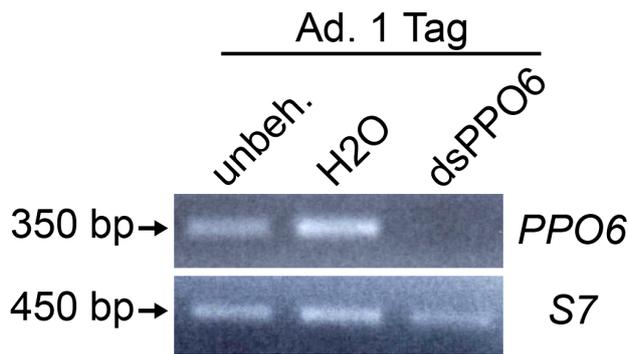


Abb. 3.9 Signifikante Reduktion der *PPO6* Transkript-Menge nach dsPPO6-Injektion in reife G3 Puppen

Semiquantitative RT-PCR von 1-Tage alten G3 Mücken (Ad. 1 Tag), die als reife Puppen mit dsPPO6 bzw. H₂O injiziert wurden oder unbehandelt (unbeh.) blieben. *S7* diente als interne Ladekontrolle. *PPO6* wurde mit 30 Zyklen, *S7* mit 21 Zyklen amplifiziert. Die dsPPO6 Mücken zeigen eine deutliche Reduktion in der *PPO6*-Expression gegenüber ihren beiden Kontrollgruppen.

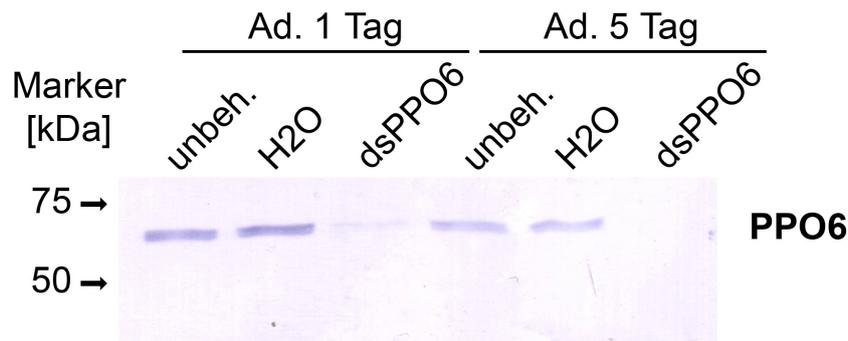


Abb. 3.10 Reduktion der *PPO6* Proteinmenge nach dsPPO6-Injektion in spätes 3. bzw. frühes 4. Larvenstadium

Gezeigt ist der Immunoblot von 1- und 5-Tage alten G3 Mücken (Ad.), die im spätes 3. bzw. frühes 4. Larvenstadium mit dsPPO6 bzw. H₂O injiziert wurden oder unbehandelt (unbeh.) blieben. Das Proteinäquivalent von jeweils einer Mücke wurde durch Bradford-Messungen einander angeglichen und aufgetragen. Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen *PPO6* detektierte eine einzelne Bande bei ca. 70 kDa. In den 1-Tage alten dsPPO6 Mücken konnte nur eine sehr geringe Proteinmenge von *PPO6* nachgewiesen werden bzw. in den 5-Tage alten überhaupt keine, im Gegensatz zu den entsprechenden Kontrollgruppen.

3.1.3 *PPO1, 3 - 6 und 9 werden als potentielle Kandidatengene erachtet*

Für die Knockdownstudien wurden *PPO5*, *6* und *9* von Anfang an in Betracht gezogen, da es die drei adultspezifischsten Gene sind; allen voran *PPO9*, dessen Expression ausschließlich in der adulten Mücke und speziell nach der Blutmahlzeit hochreguliert ist (Abb. 3.6; Daten nicht gezeigt).

Für die Auswahl weiterer Kandidatengene wurde das Expressionsverhalten der übrigen *PPOs* (*1 - 4, 7* u. *8*) nach *P. berghei* Infektion in L3-5 Mücken analysiert. L3-5 Mücken bekamen entweder eine normale Blutmahlzeit (nicht-infiziert), wurden an *P. berghei* infizierten Mäusen füttern gelassen (infiziert) oder über die gesamte Dauer des Experimentes ausschließlich mit Zucker versorgt (Kontrolle). Über einen Zeitverlauf von 24 Std., 48 Std., 4 und 6 Tagen wurden die Mitteldärme der nicht-infizierten (n.i.), infizierten (inf.) und Kontroll-Mücken (k) herauspräpariert, die Gesamt-RNA isoliert und für semiquantitative RT-PCR eingesetzt (Abb. 3.11).

Mit der Auswahl der Zeitpunkte sollten diejenigen *PPO*-Gene identifiziert werden, die während der melanotischen Einkapselung der *P. berghei* Parasiten (zwischen 24 bis 48 Std.) stark exprimiert oder sogar reprimiert sind; sowie Gene, deren Expression vier bis sechs Tage nach Infektion stark ansteigt, um nach eventueller Melanisierungsbeteiligung den *PPO*-Grundbedarf wieder abzudecken.

PPO1 ist 24 Std. nach der Blutmahlzeit in nicht-infizierten, nicht aber in infizierten Mücken stark exprimiert. Erst 48 Std. nach der Infektion nimmt die Transkript-Menge in infizierten Mücken gegenüber nicht-infizierten entscheidend zu.

PPO2 ist über die gesamte Versuchsdauer gleichbleibend exprimiert und zeigt keine größeren Veränderungen in der Transkript-Menge.

PPO3 wird 24 Std. und 48 Std. nach der Blutmahlzeit in nicht-infizierten Mücken stark exprimiert, wobei nach 24 Std. die Expression in nicht-infizierten Mücken überwiegt und dieser Effekt sich nach 48 Std. umkehrt.

PPO4-Transkript ist bereits in drei Tage alten Mücken vorhanden ($t = 0$) und die Expression bleibt während den ersten 24 Stunden des Experimentes in allen drei Gruppen unvermindert stark. Nach 48 Stunden und 4 Tagen dagegen ist in den infizierten Mücken keine *PPO4*-Expression detektierbar. Diese steigt erst wieder nach 6 Tagen an.

Die Expression von *PPO7* und *8* ist gegenüber den anderen *PPO*-Genen nur sehr schwach ausgeprägt. Während bei den anderen *PPO*-Genen 30 PCR-Zyklen für die Amplifikation einer ausreichenden Transkript-Menge genügte, konnten bei *PPO7* und *8* erst mit 34 Zyklen überhaupt Transkriptionsprodukte detektiert werden. Ihre Expression in der adulten Mücke

wird erst nach der Blutmahlzeit induziert, wobei die Transkript-Menge der beiden Gene 24 Stunden nach der Infektion in nicht-infizierten Mücken zunächst überwiegt und sich dann, wie bei *PPO3*, im Verhältnis von infizierten und nicht-infizierten Mücken umkehrt.

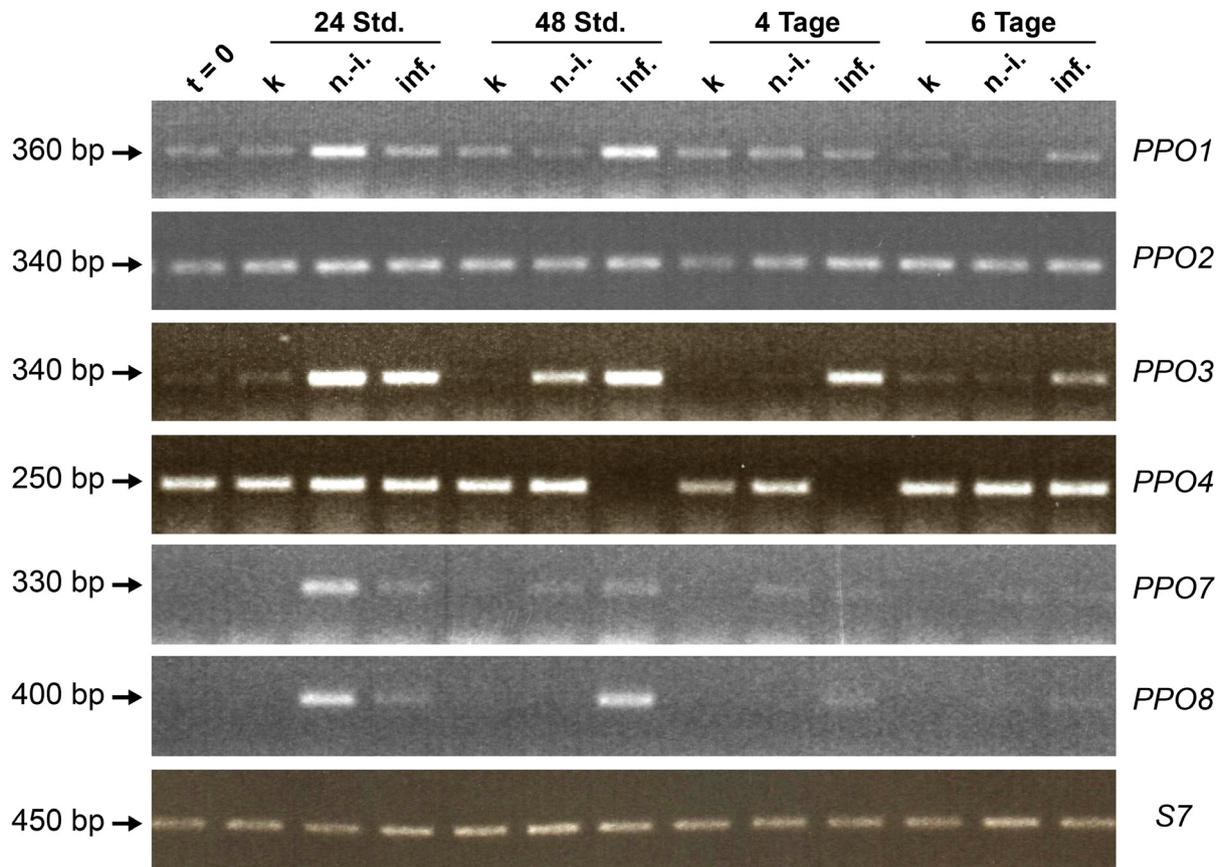


Abb. 3.11 *PPO*-Expression in L3-5 Mücken nach *P. berghei* Infektion

Semiquantitative RT-PCR von L3-5 Mücken unmittelbar vor der Blutmahlzeit (BM, t = 0), 24 Std., 48 Std., 4 Tage (4T) und 6 Tage (6T) nach *P. berghei* Infektion. L3-5 Mücken wurden entweder ausschließlich mit Zucker als Kontrolle (k), mit nicht-infiziertem (n.i.) oder *P. berghei* infizierten (inf.) Blut gefüttert. *S7* wurde zur Standardisierung eingesetzt. *S7* Transkript wurde in 21 Zyklen, *PPO1* - 4 in 30 Zyklen und *PPO7* u. 8 in 34 Zyklen amplifiziert.

Zusammenfassend wurden, zusätzlich zu den bereits bestehenden Kandidatengen *PPO5*, 6 und 9, folgende weitere *PPO*-Gene nach ihrem charakteristischen Expressionsverlauf für die Knockdownstudien ausgewählt: *PPO1* aufgrund der signifikanten Hochregulierung 48 Std. nach Infektion; *PPO3* und *PPO4* wegen ihrer allgemein starken Expression nach der Blutmahlzeit sowie im Falle von *PPO3* der erhöhten Transkript-Menge in infizierten Mücken 48 Std. nach Infektion bzw. bei *PPO4* dem völligen Ausbleiben der Transkription.

PPO7 und 8 wurden zunächst aus den Knockdownstudien ausgeschlossen, da sie nur relativ schwach in der adulten Mücke exprimiert werden. Ebenso auch *PPO2*. Obwohl das Gen in der adulten Mücke exprimiert ist, zeigt es keinerlei charakteristische Veränderungen im Transkriptionsprofil nach *P. berghei* Infektion.

3.1.4 Funktionelle Analyse der Gene *PPO1*, 3 - 6 und 9

Aufgrund der Vielzahl möglicher Kandidatengene wurden zunächst jeweils drei *PPO*-Gene gemeinsam durch RNA-Interferenz herunterreguliert, um bei erfolgreicher Beeinflussung des Melanisierungsphänotyps von G3/dsCTL-MA2 und L3-5 Mücken die Gene anschließend in Einzelknockdowns genauer zu charakterisieren.

Die Kombination von drei dsRNAs ist die Höchstzahl an gleichzeitig durchführbaren *PPO*-Knockdowns, wenn man berücksichtigt, dass bei G3 Mücken zusätzlich die dsRNA von CTL-MA2 hinzugefügt werden muß. Experimentelle Erfahrungen haben gezeigt, dass die Ausgangskonzentration der dsRNAs für eine nahezu vollständige Herunterregulierung der Genexpression beibehalten werden muss. Gleichzeitige Knockdown-Versuche aller neun *PPOs* - wie unter 3.1.2.2 beschrieben – zeigten zwar eine effiziente Reduzierung der Genexpression auf Transkriptionsebene (Abb. 3.6), hatten jedoch keine Auswirkungen auf den Phänotyp infizierter L3-5 Mücken (Daten nicht gezeigt). Als Erklärung wurde die geringere Konzentration jeder dsRNA, bedingt durch die 1:9 Verdünnung im Gesamtgemisch in Betracht gezogen. Da die Ausgangskonzentration jeder dsRNA auch gleichzeitig der Maximalkonzentration entspricht, die mit dem Injektionsgerät aufgenommen werden kann, muss beim Injizieren mehrerer dsRNAs entsprechend die Anzahl der hintereinanderfolgenden Injektionen erhöht werden (bei einem Gemisch aus drei dsRNAs muss entsprechend drei mal nacheinander injiziert werden). Das Maximalvolumen, das in die Mücke problemlos injiziert werden kann, ohne dass Flüssigkeit wieder austritt oder die Mücke zu Schaden kommt, entspricht einer viermaligen Injektion (276 nl).

Obwohl die Expression von *PPO5* und 6 bereits im Puppenstadium einsetzt und die Ergebnisse von 3.1.2.4, Abb. 3.10 eine rechtzeitige Injektion der dsRNA ein bis zwei Tage vor Transkriptionsbeginn des eigentlichen Gens vorsehen, wurde auf eine zeitversetzte dsRNA-Injektion verzichtet. Versuche, in denen dsPPO5 und 6, bzw. H₂O als Kontrolle, in spätes 3./frühes 4. Larvenstadium injiziert wurden, gefolgt von einer weiteren dsPPO- bzw. H₂O-Injektion in die adulten Mücken, bewirkte sowohl in der Versuchs- als auch Kontrollgruppe eine starke Schwächung der Mücken, die kurze Zeit danach zum Tode führte (Daten nicht gezeigt). DsPPO5 und 6 wurden stattdessen gemeinsam mit den anderen dsRNAs in 1-Tage alte Mücken injiziert, unter der Annahme, dass die bis dahin synthetisierte Proteinmenge an PPO5 und 6 zwar für die Melanisierung eingesetzt wird, aber nicht ausreichend ist.

3.1.4.1 G3/dsCTL-MA2

3.1.4.1.1 Gleichzeitiger Knockdown von *PPO1*, *4* und *6* bewirkt eine partielle Reversion des Melanisierungsphänotyps von G3/dsCTL-MA2 Mücken

G3 Mücken wurden mit einem Gemisch aus dsCTL-MA2 und dsPPO1/4/6 viermal hintereinander injiziert; Kontrollmücken mit dsCTL-MA2 und 3x dsGFP. Sieben Tage nach Infektion mit *P. berghei* wurden die Mitteldärme herauspräpariert und die Anzahl lebender Oozysten bzw. eingekapselter Ookineten durch Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie quantifiziert.

Die gesammelten Daten aus fünf unabhängigen Experimenten zeigen einen deutlichen Rückgang der eingekapselten Parasiten in Relation zur Gesamtparasitenanzahl (Abb. 3.12a und b). Im Vergleich zu den Kontrollmücken (dsCTL-MA2/dsGFP) werden bei nahezu identischen Infektionszahlen prozentual gesehen weniger Erreger eingekapselt und entsprechend mehr Parasiten entwickeln sich zu Oozysten weiter. Das Einkapselungsverhältnis der Kontrollgruppe entspricht dagegen mit durchschnittlich 60% den Ergebnissen von Osta et al., 2004 (53% eingekapselte Parasiten beim CTL-MA2 KD).

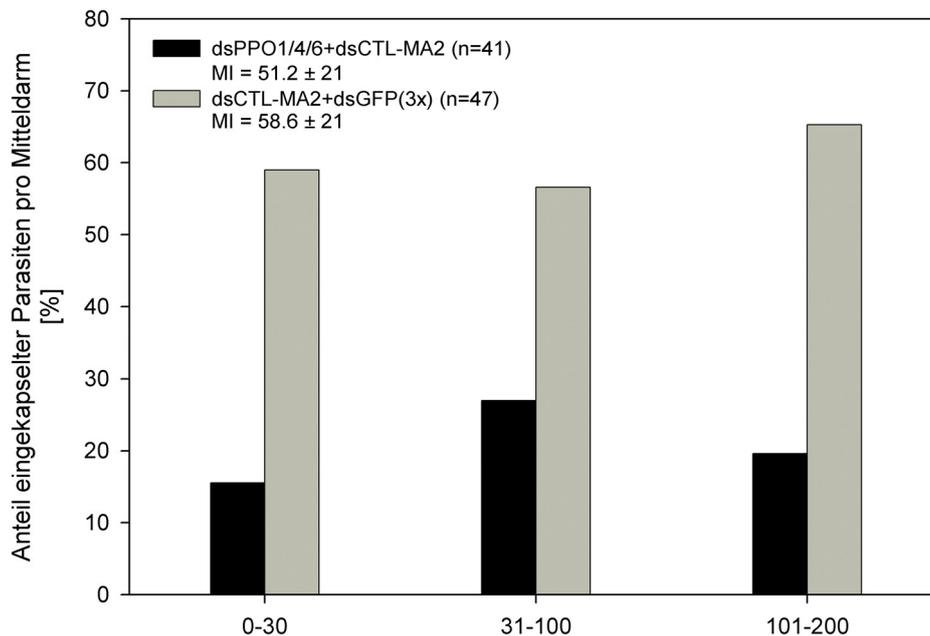


Abb. 3.12a Parasitenverteilung pro Mitteldarm von dsPPO1/4/6 und 3x dsGFP injizierten G3/dsCTL-MA2 Mücken

Die Daten aus fünf unabhängigen Experimenten, die alle eine ähnliche Verteilung aufwiesen, wurden zusammengefasst. Mitteldärme sind entsprechend ihrer Gesamtzahl an Parasiten in drei Infektionsklassen (0-30, 31-100, 101-200) unterteilt. Pro Infektionsstufe waren mindestens 10 Mitteldärme vorhanden. Das Verhältnis an eingekapselten Parasiten zur Gesamtanzahl der Parasiten in der jeweiligen Gruppe ist in Prozent ausgedrückt. Die mittlere Infektivität (MI) ist gemeinsam mit der Gesamtzahl der Mitteldärme (n) in der Legende wiedergegeben.

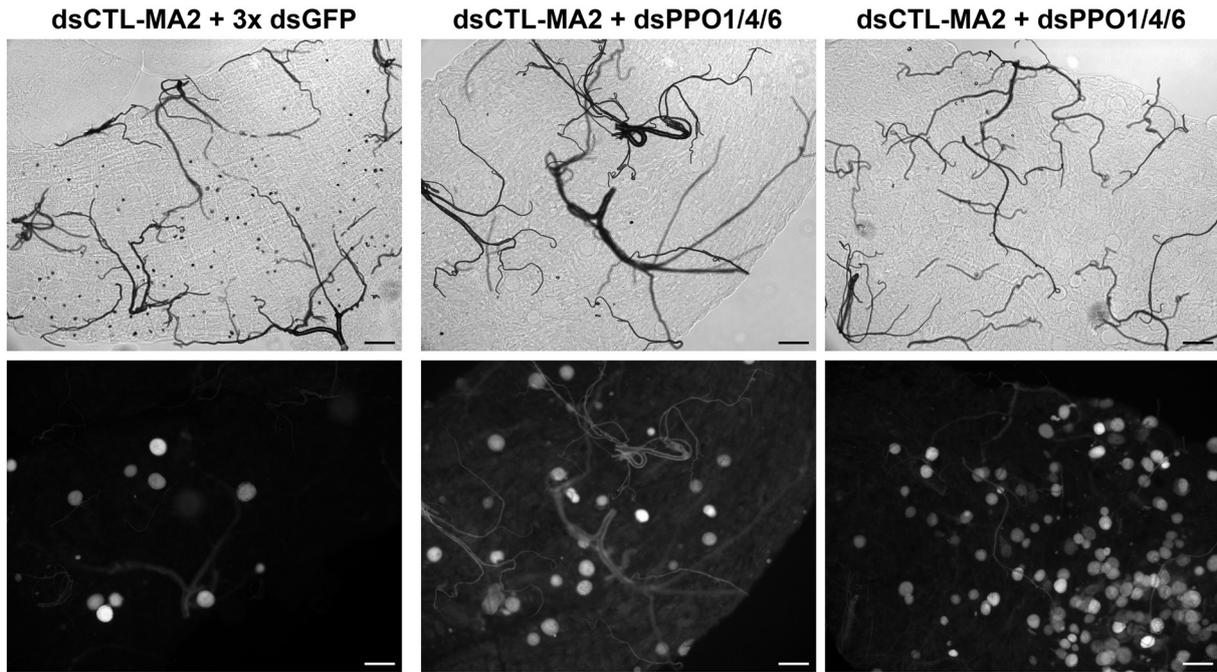


Abb. 3.12b Mitteldärme von dsPPO1/4/6 injizierten G3/dsCTL-MA2 Mücken weisen weniger eingekapselte und mehr lebende Parasiten auf

Die Abbildung zeigt einen herauspräparierten Mitteldarm der Kontrollgruppe (dsCTL-MA2 + 3x dsGFP) sowie einen wenig und stark infizierten Mitteldarm der Versuchsgruppe (dsCTL-MA2 + dsPPO1/4/6). In der Versuchsgruppe ist das Verhältnis von eingekapselten Parasiten zu Oozysten zugunsten der Oozysten verschoben. — 100 μm

3.1.4.1.2 Gleichzeitiger Knockdown von *PPO4* und *6* führt erst bei hoher Infektivität zum deutlichen Rückgang der Melanisierung in G3/dsCTL-MA2 Mücken

Um die Zahl der möglichen Kandidatengene aus dem Dreifach-Knockdown einzugrenzen, wurden G3 Mücken mit einem Gemisch aus dsCTL-MA2 und dsPPO4/6 dreimal hintereinander injiziert bzw. Kontrollmücken mit dsCTL-MA2 und 2x dsGFP.

Die *PPO4/6* Knockdown-Mücken zeigen bei nahezu identischer Gesamtinfektivität eine geringfügig verminderte Einkapselungsfähigkeit von Parasiten gegenüber den Kontrollmücken (Abb. 3.13). Erst bei sehr hoher Infektionsrate (>300 Parasiten pro Mitteldarm) sinkt die Melanisierungsrate drastisch auf 2,2% ab, während sie bei den Kontrollmücken nach wie vor über 40% (hier 42%) liegt.

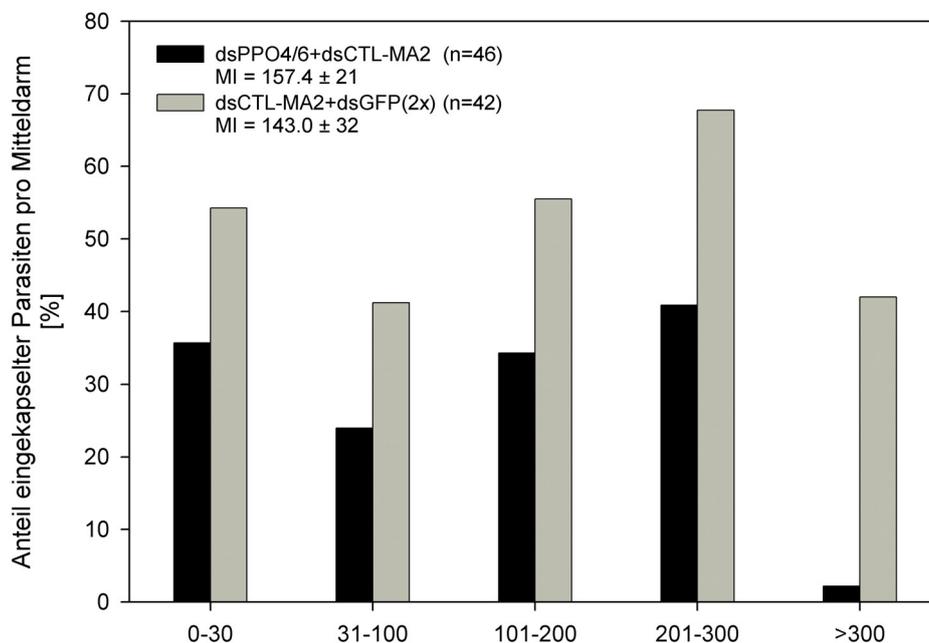


Abb. 3.13 Parasitenverteilung pro Mitteldarm von dsPPO4/6 und 2x dsGFP injizierten G3/dsCTL-MA2 Mücken

Die Daten aus drei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. Mitteldärme sind entsprechend ihrer Gesamtzahl an Parasiten in fünf Infektionsstufen unterteilt (0-30, 31-100, 101-200, 201-300 und >300). Die Anzahl der Mitteldärme pro Infektionsstufe - sofern nicht ≥ 10 - lautet wie folgt: 0-30 dsPPO4/6 8 Mitteldärme, 31-100 dsGFP (2x) 6 Mitteldärme, 101-200 dsGFP (2x) 7 Mitteldärme, 201-300 dsPPO4/6 u. dsGFP (2x) ≥ 5 Mitteldärme und >300 dsGFP (2x) 6 Mitteldärme. Das Verhältnis an eingekapselten Parasiten zur Gesamtzahl der Parasiten in der jeweiligen Gruppe ist in Prozent ausgedrückt. Mittlere Infektivität (MI) und Gesamtzahl der Mitteldärme (n) sind in der Legende aufgeführt.

3.1.4.1.3 Nur der Einzelknockdown von *PPO1* zeigt eine verminderte Einkapselungsfähigkeit

Die *PPO*-Gene 1, 4 und 6 wurden einzeln in G3/dsCTL-MA2 Mücken durch RNA-Interferenz herunterreguliert und ihre Auswirkungen auf die melanotische Einkapselung von *P. berghei* Parasiten untersucht. Hierfür wurden G3 Mücken mit einem Gemisch aus dsCTL-MA2 und dsPPO1, 4 oder 6 zweimal hintereinander injiziert bzw. mit dsCTL-MA2/dsGFP als Kontrolle behandelt.

Obwohl die mittlere Infektionsrate bei den Versuchsmücken des *PPO1*-Knockdowns deutlich höher gegenüber den Kontrollmücken ist, bewirkt die Herunterregulierung von *PPO1* eine verminderte Einkapselungsfähigkeit bei starker Beanspruchung des Immunsystems (ab >30 Parasiten pro Mitteldarm, Abb. 3.14).

G3/dsCTLMA2 Mücken, in denen die Expression von *PPO4* herunterreguliert wurde, zeigen ein nahezu identisches Einkapselungsverhalten bei gleichzeitig höherer, mittlerer Infektionsrate (Abb. 3.15). Ebenso führt der Knockdown von *PPO6* bei einer erhöhten mittleren Infektionsrate zu einem nahezu identischen Einkapselungsverhalten bzw. sogar zu einer stärkeren Melanisierung bei geringer Mitteldarminfektivität (<100, Abb. 3.16).

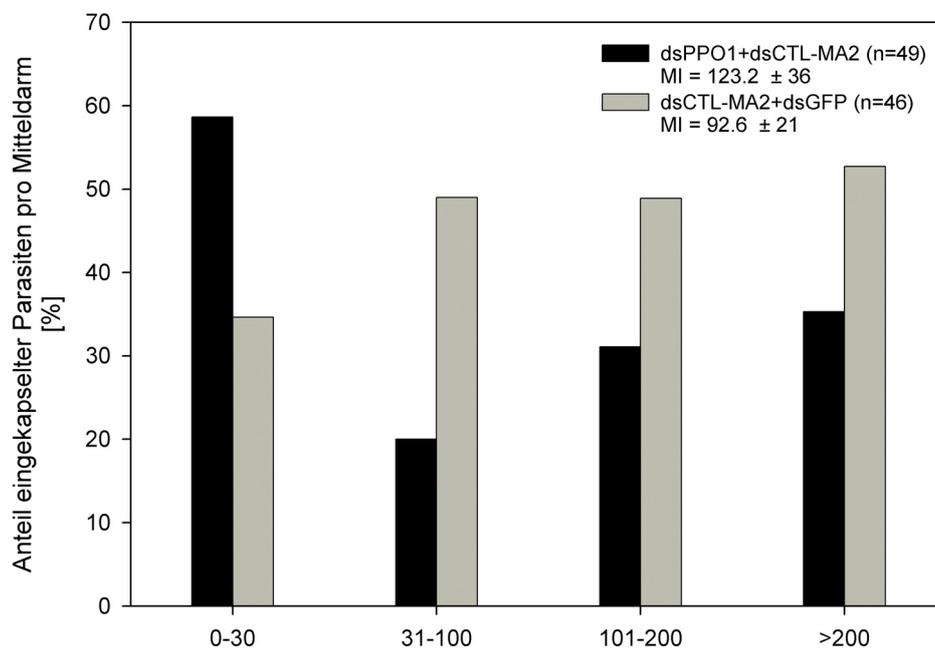


Abb. 3.14 Parasitenverteilung pro Mitteldarm nach *PPO1* KD in G3/dsCTL-MA2 Mücken

Die Daten aus drei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. Mitteldärme sind entsprechend ihrer Gesamtzahl an Parasiten in vier Klassen (0-30, 31-100, 101-200, >200) unterteilt. Pro Infektionsstufe waren mindestens 10 Mitteldärme vorhanden. Das Verhältnis an eingekapselten Parasiten zur Gesamtanzahl der Parasiten in der jeweiligen Gruppe ist in Prozent ausgedrückt. Mittlere Infektivität (MI) und Gesamtzahl der Mitteldärme (n) sind in der Legende angegeben.

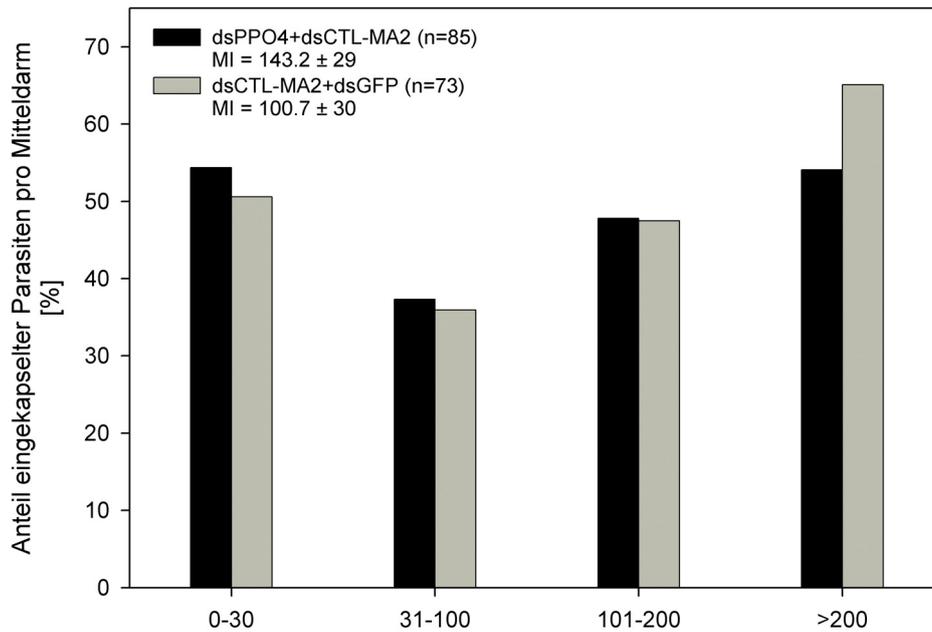


Abb. 3.15 Parasitenverteilung pro Mitteldarm nach *PPO4* KD in G3/dsCTL-MA2 Mücken

Die Daten aus sechs unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. Weitere Abbildungsdetails stimmen mit denen unter Abb. 3.14 aufgeführten Beschreibungen überein.

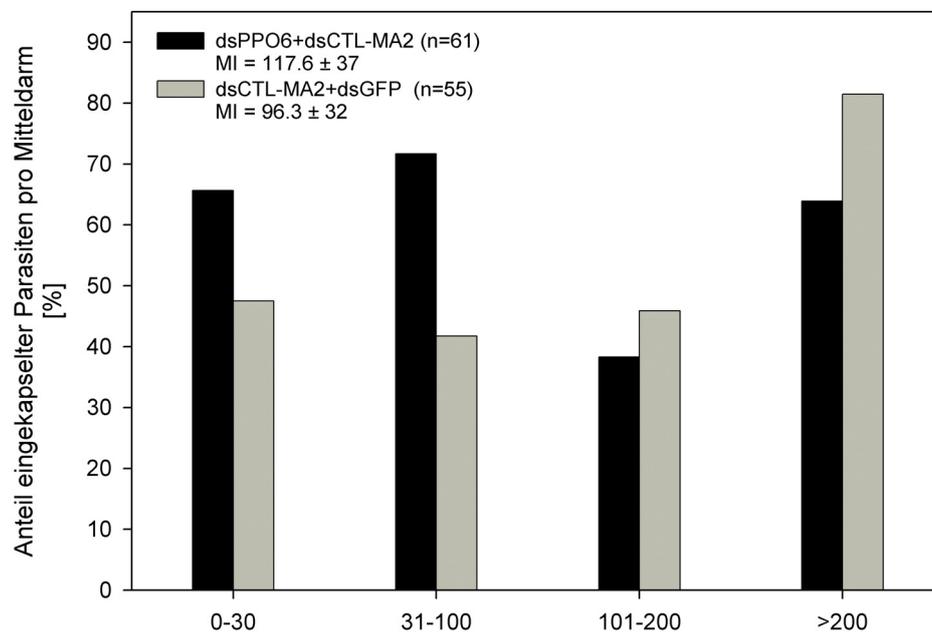


Abb. 3.16 Parasitenverteilung pro Mitteldarm nach *PPO6* KD in G3/dsCTL-MA2 Mücken

Die Daten aus fünf unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. Der weitere Aufbau stimmt mit dem unter Abb. 3.14 überein.

3.1.4.1.4 Kombiniertes Knockdown von *PPO3/5/9* in *G3/dsCTL-MA2* Mücken bewirkt bei hoher Infektivität einen Rückgang in der Melanisierung

Analog zu 3.1.4.1.1 wurde ein kombinierter Knockdown von *PPO3*, *5* und *9* in *G3/dsCTL-MA2* Mücken durchgeführt.

Die Versuchsmücken, in denen die Expression von *PPO3*, *5* und *9* herunterreguliert wurde, kapseln weniger Parasiten ein als die Kontrollmücken. Bei einer Infektionsrate von 101-200 Erreger pro Mitteldarm ist die Melanisierungsreaktion sogar um die Hälfte reduziert (Versuchsmücken 24.5% - Kontrollmücken 51.9%, Abb. 3.17).

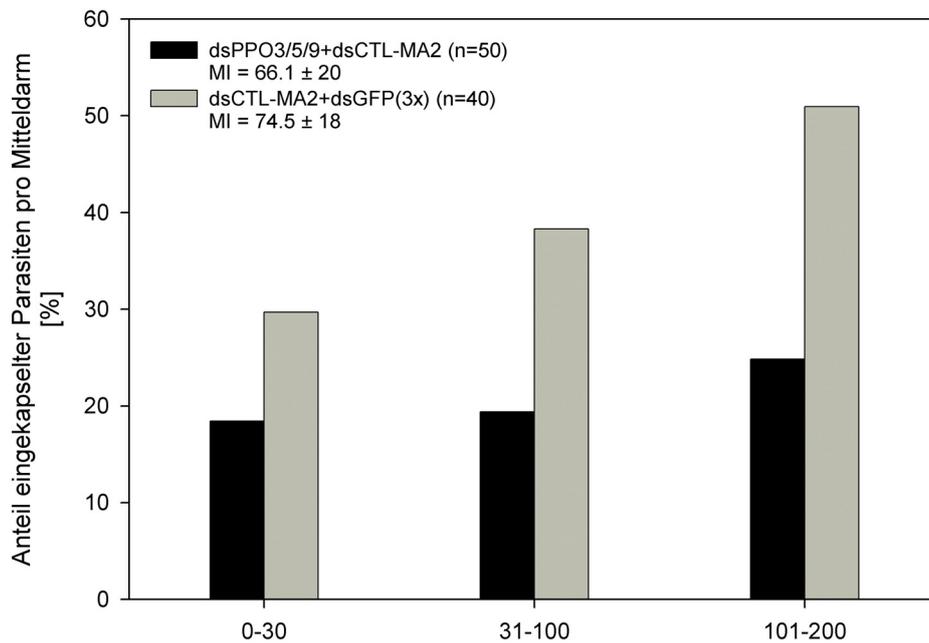


Abb. 3.17 Parasitenverteilung pro Mitteldarm nach KD von *PPO3/5/9* in *G3/dsCTL-MA2* Mücken

Die Daten aus vier unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. Mitteldärme sind entsprechend ihrer Gesamtzahl an Parasiten in drei Infektionsstufen (0-30, 31-100, 101-200) unterteilt. Pro Infektionsstufe waren mindestens 10 Mitteldärme vorhanden; Ausnahme: 101-200 8 Mitteldärme bei dsGFP(3x). Die weiteren Abbildungsbeschreibungen sind mit denen von Abb. 3.14 identisch.

3.1.4.1.5 Weder der kombinierte KD von *PPO3/5* noch die Einzelknockdowns von *PPO3*, *5* und *9* bewirken eine Reduktion der Melanisierung in G3/dsCTL-MA2 Mücken

Um zu überprüfen, welche der Gene aus dem Dreifach-Knockdown für die Melanisierung entscheidend sind, wurden analog zu 3.1.4.1.2 und 3.1.4.1.3 *PPO3* und *5* gemeinsam, sowie *PPO3*, *5* und *9* einzeln herunterreguliert.

Weder der kombinierte Knockdown von *PPO3* und *5* (Abb. 3.18) noch die Einzelknockdowns von *PPO3* (Abb. 3.19), *PPO5* (Abb. 3.20) und *PPO9* (Abb. 3.21) führten zu einer verminderten Einkapselung von *P. berghei* Parasiten in G3/dsCTL-MA2 Mücken.

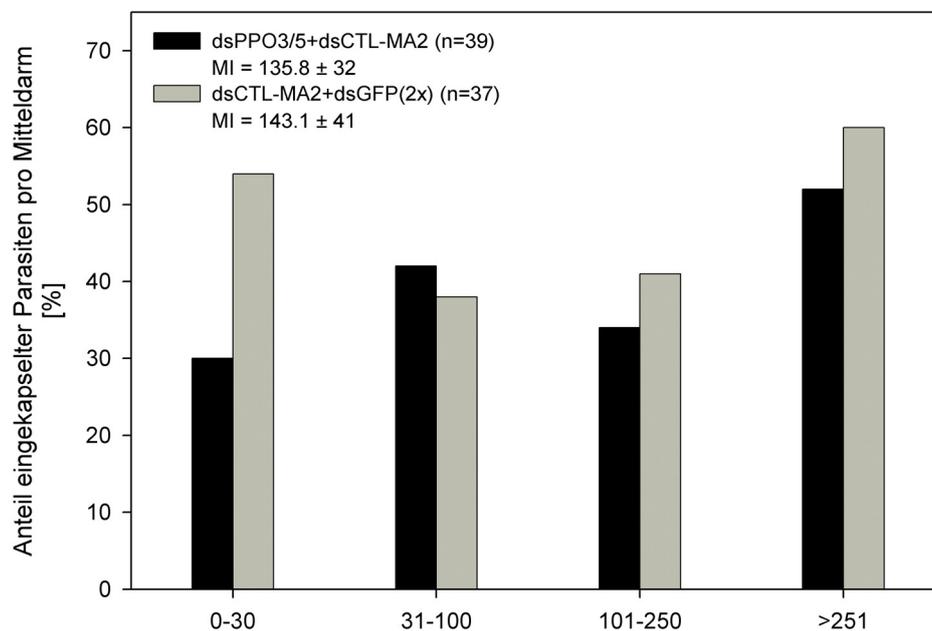


Abb. 3.18 Parasitenverteilung pro Mitteldarm nach KD von *PPO3/5* in G3/dsCTL-MA2 Mücken

Die Daten aus drei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. Mitteldärme sind entsprechend ihrer Gesamtzahl an Parasiten in vier Infektionsstufen (0-30, 31-100, 101-250, >251) unterteilt. Die Anzahl der Mitteldärme pro Infektionsstufe - sofern nicht ≥ 10 - lautet wie folgt: 0-30 9 Mitteldärme bei dsPPO3/5, 31-100 6 Mitteldärme bei dsGFP(2x), 101-250 8 Mitteldärme bei dsGFP(2x), >251 6 Mitteldärme bei dsPPO3/5 und 9 Mitteldärme bei dsGFP(2x). Die weiteren Abbildungsbeschreibungen stimmen mit denen unter Abb. 3.14 aufgeführten überein.

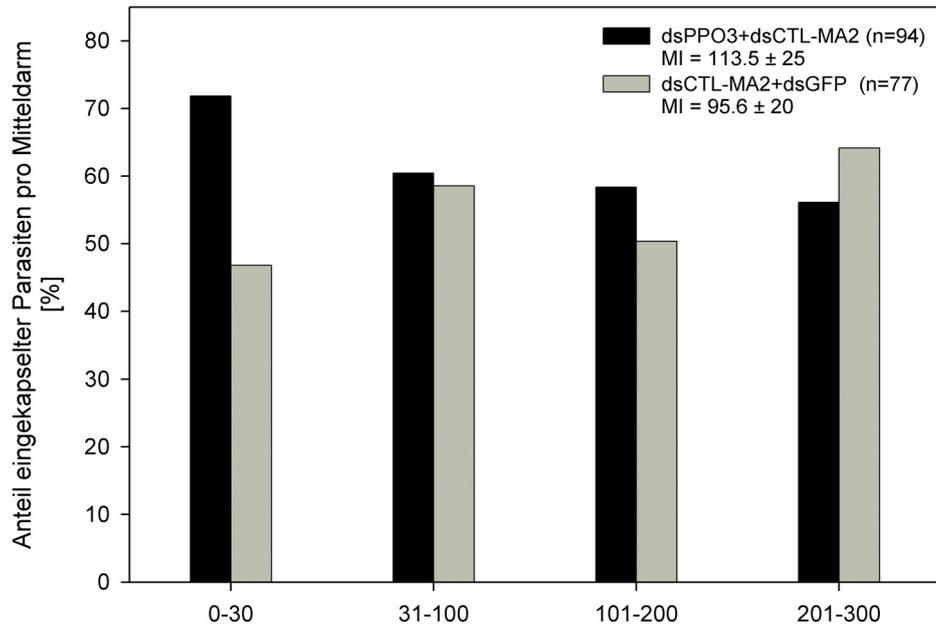


Abb. 3.19 Parasitenverteilung pro Mitteldarm nach KD von *PPO3* in G3/dsCTL-MA2 Mücken

Die Daten aus fünf unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. Mitteldärme sind entsprechend ihrer Gesamtzahl an Parasiten in vier Infektionsstufen unterteilt (0-30, 31-100, 101-200, 201-300). Die Anzahl der Mitteldärme pro Infektionsstufe betrug ≥ 10 Mitteldärme. Weitere Abbildungsdetails siehe Abb. 3.14.

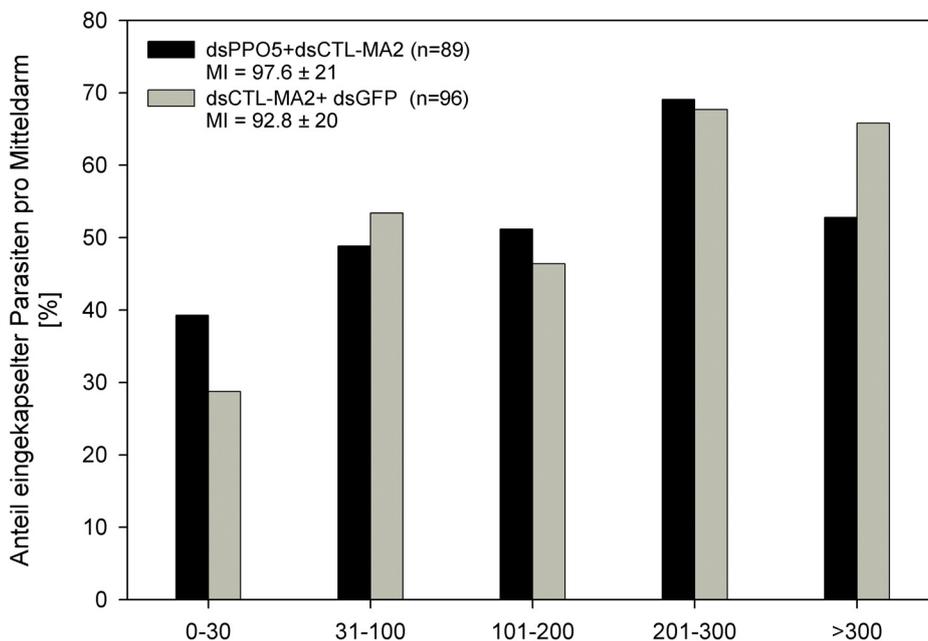


Abb. 3.20 Parasitenverteilung pro Mitteldarm nach KD von *PPO5* in G3/dsCTL-MA2 Mücken

Die Daten aus vier unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. Mitteldärme wurden entsprechend ihrer Gesamtzahl an Parasiten in fünf Infektionsklassen aufgeteilt (0-30, 31-100, 101-200, 201-300 und >300). Die Anzahl der Mitteldärme pro Infektionsstufe betrug >10 . Weitere Abbildungsangaben stimmen mit denen unter Abb. 3.14 überein.

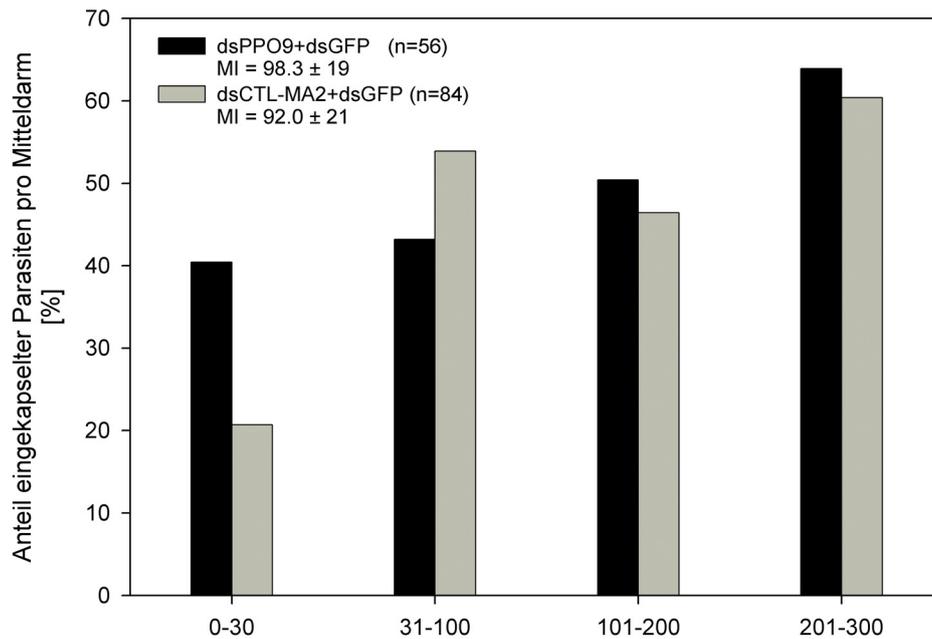


Abb. 21 Parasitenverteilung pro Mitteldarm nach KD von *PPO9* in G3/dsCTL-MA2 Mücken

Die Daten aus fünf unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. Mitteldärme wurden entsprechend ihrer Gesamtzahl an Parasiten in vier Infektionsstufen unterteilt (0-30, 31-100, 101-200 und 201-300). Die Anzahl der Mitteldärme pro Infektionsstufe war jeweils >10. Weitere Abbildungsangaben stimmen mit denen unter Abb. 3.14 überein.

3.1.4.2 L3-5

3.1.4.2.1 Der gleichzeitige Knockdown von *PPO1/4/6* und *PPO3/5/9* in L3-5 Mücken reduziert die Anzahl eingekapselter Parasiten

Die Einkapselung von G3/dsCTL-MA2 und L3-5 Mücken beruht vermutlich auf einem unterschiedlichen genetischen Hintergrund. Daher wurden Auswirkungen der bereits in G3/dsCTL-MA2 erfolgreich getesteten Dreifach-Knockdownkombinationen von *PPO1/4/6* und *PPO3/5/9* auch in L3-5 Mücken überprüft.

L3-5 Mücken wurden entweder mit einer Kombination aus dsPPO1/4/6, dsPPO3/5/9 oder dsGFP(3x) drei mal hintereinander injiziert und nach einer dreitägigen Rekonvaleszenzzeit mit *P. berghei* Parasiten infiziert. Sieben Tage nach der Infektion wurden die Mitteldärme herauspräpariert und die Anzahl der eingekapselten Parasiten mit Durchlichtmikroskopie quantifiziert bzw. mit Fluoreszenzmikroskopie auf lebende Oozysten hin untersucht.

Sowohl die Herunterregulierung von *PPO1/4/6* als auch von *PPO3/5/9* bewirken eine signifikante Reduktion der Anzahl eingekapselter Parasiten in den L3-5 Versuchsgruppen

gegenüber den Kontrollmücken (Abb. 3.22 und 3.23), nicht aber ein Überleben der Parasiten in Form von lebenden Oozysten. Da keine Oozysten in den Knockdown-Mücken beobachtet wurden, entspricht somit die Anzahl der eingekapselten Parasiten auch gleichzeitig der „sichtbaren“ Gesamtinfektivität.

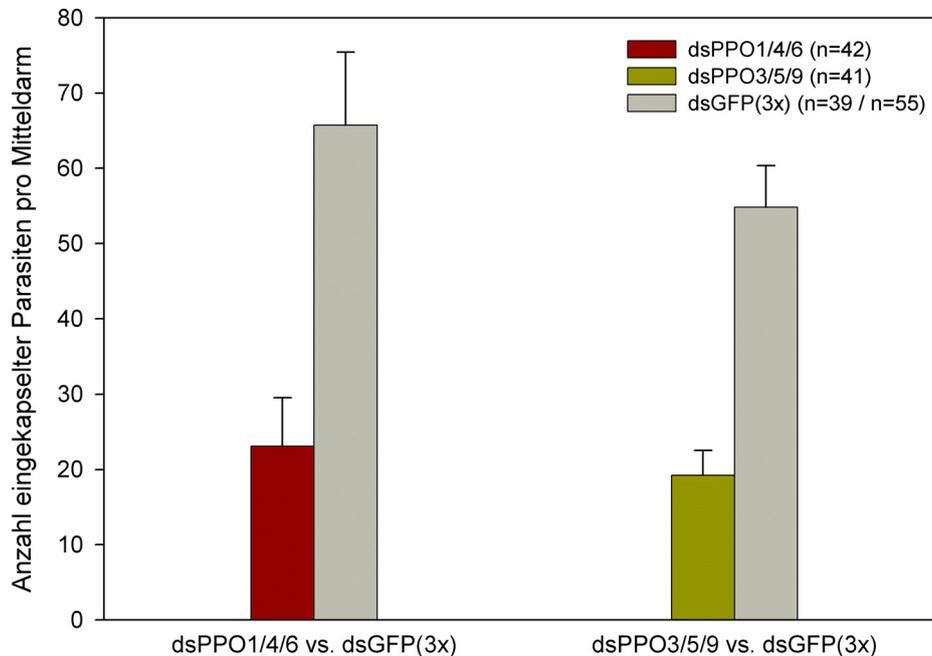


Abb. 3.22 Anzahl eingekapselter Parasiten bzw. Gesamtinfektivität nach *PPO1/4/6* und *PPO3/5/9* KD in L3-5 Mücken

Die Daten aus vier unabhängigen (KD *PPO1/4/6*) bzw. fünf unabhängigen (KD *PPO3/5/9*) Experimenten wurden zusammengefasst und in einer gemeinsamen Grafik dargestellt. Die Anzahl der eingekapselten Parasiten entspricht auch gleichzeitig der Gesamtinfektivität, da weder in den Versuchs- noch Kontrollgruppen Oozysten vorhanden waren. Die Anzahl der Mitteldärme (n) ist in der Legende aufgeführt.

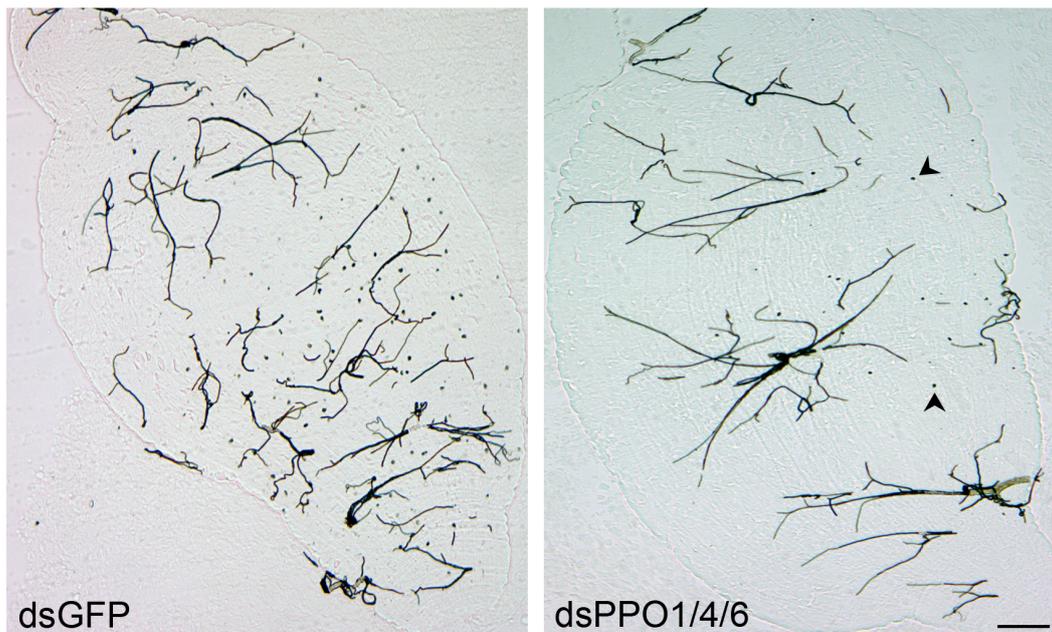


Abb. 3.23 Mitteldärme von dsPPO1/4/6 injizierten L3-5 Mücken weisen weniger eingekapselte Parasiten auf, aber keine Oozysten

Die Abbildung zeigt einen herauspräparierten Mitteldarm der Kontroll-Gruppe dsGFP(3x), und einen infizierten Mitteldarm der Versuchsgruppe dsPPO1/4/6 sieben Tage nach *P. berghei* Infektion. Die Anzahl der eingekapselten Parasiten ist in der Versuchsgruppe deutlich geringer. ▲ Markierung einzelner melanisierter Erreger in der Knockdowngruppe; — entspricht 100 µm.

Ergebnisse – Teil II *Anopheles*

**Speicheldrüsen-Rezeptoren von *Anopheles gambiae* als
potentielle Angriffspunkte, die Übertragung von
Plasmodium berghei Parasiten zu stoppen**

3.2 Ergebnisse – Teil II

Die Invasion der *Plasmodium* Sporozoiten in die Speicheldrüsen der Mücke ist entscheidend für die Übertragung in den menschlichen Wirt. Bislang sind die molekularen Prozesse, vor allem der Erkennungsmechanismus zwischen Sporozoiten und Speicheldrüsen, noch immer wenig verstanden. Genaue Kenntnisse hierin sind essentiell für die Identifizierung neuer Angriffspunkte, um die Übertragung der Malaria-Parasiten zu verhindern.

3.2.1 Aufbau der Speicheldrüsen

Die Speicheldrüsen adulter Mücken liegen paarig vor und sind sexuell dimorph. Jede Drüse besteht aus drei Lappen: zwei lateralen und einem medialen. Bei den Männchen sind die Lappen einander ähnlich und die Speicheldrüsen insgesamt kleiner. Die Speicheldrüsen der Weibchen zeigen aufgrund ihrer hematophagen Lebensweise eine strukturelle und funktionelle Differenzierung (Moreira-Ferro et al., 1999). Die lateralen Lappen gliedern sich hier in eine ausgeprägte proximale und distale Region, wobei erstere vom Proteinprofil den männlichen Speicheldrüsen ähnelt und mit der Zuckeraufnahme in Verbindung gebracht wird. Der mittlere Lappen setzt sich aus einer kurzen Halsregion und einem distalen Bereich zusammen (Abb. 3.24).

Jeder Lappen besitzt einen zentralen Kanal, umgeben von einer einlagigen, sekretorischen Epithelschicht, die von außen durch eine Basallamina abgegrenzt wird. Die Kanäle jedes Lappens vereinen sich zu einem einheitlichen Speicheldrüsengang an der Basis des Organs.

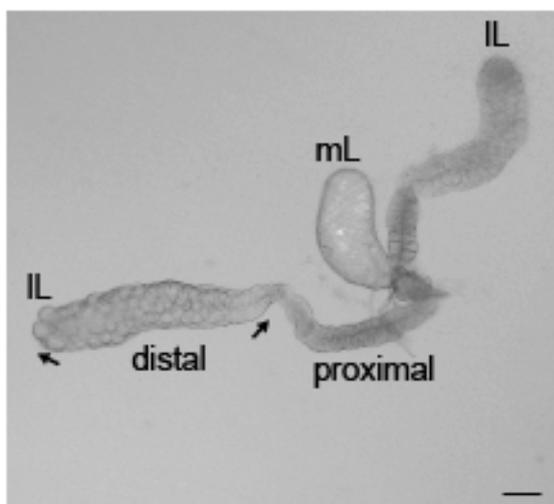


Abb. 3.24 Speicheldrüse von *An. gambiae*
Dargestellt ist die Unterteilung einer weiblichen Speicheldrüse von *An. gambiae* im Phasenkontrast-Mikroskop. Sie besteht aus zwei lateralen Lappen (IL) und einem medialen Lappen (mL). Die lateralen Lappen differenzieren sich in einen proximalen und distalen Bereich. — 50 μ m

3.2.2 Invasionsverlauf von *Plasmodium*-Sporozoiten

Bereits frühe Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass die Differenzierung der weiblichen Speicheldrüsen mit dem charakteristischen Invasionsverhalten von *Plasmodium*-Sporozoiten einhergeht (Sterling et al., 1973; Rossignol et al., 1984).

Die Sporozoiten invadieren bevorzugt die distalen Bereiche der lateralen Lappen sowie den medialen, wobei die Invasion zunächst in den lateralen Lappen beginnt und sich erst nach fast vollständiger Invasion im medialen Lappen fortsetzt (Abb. 3.25).

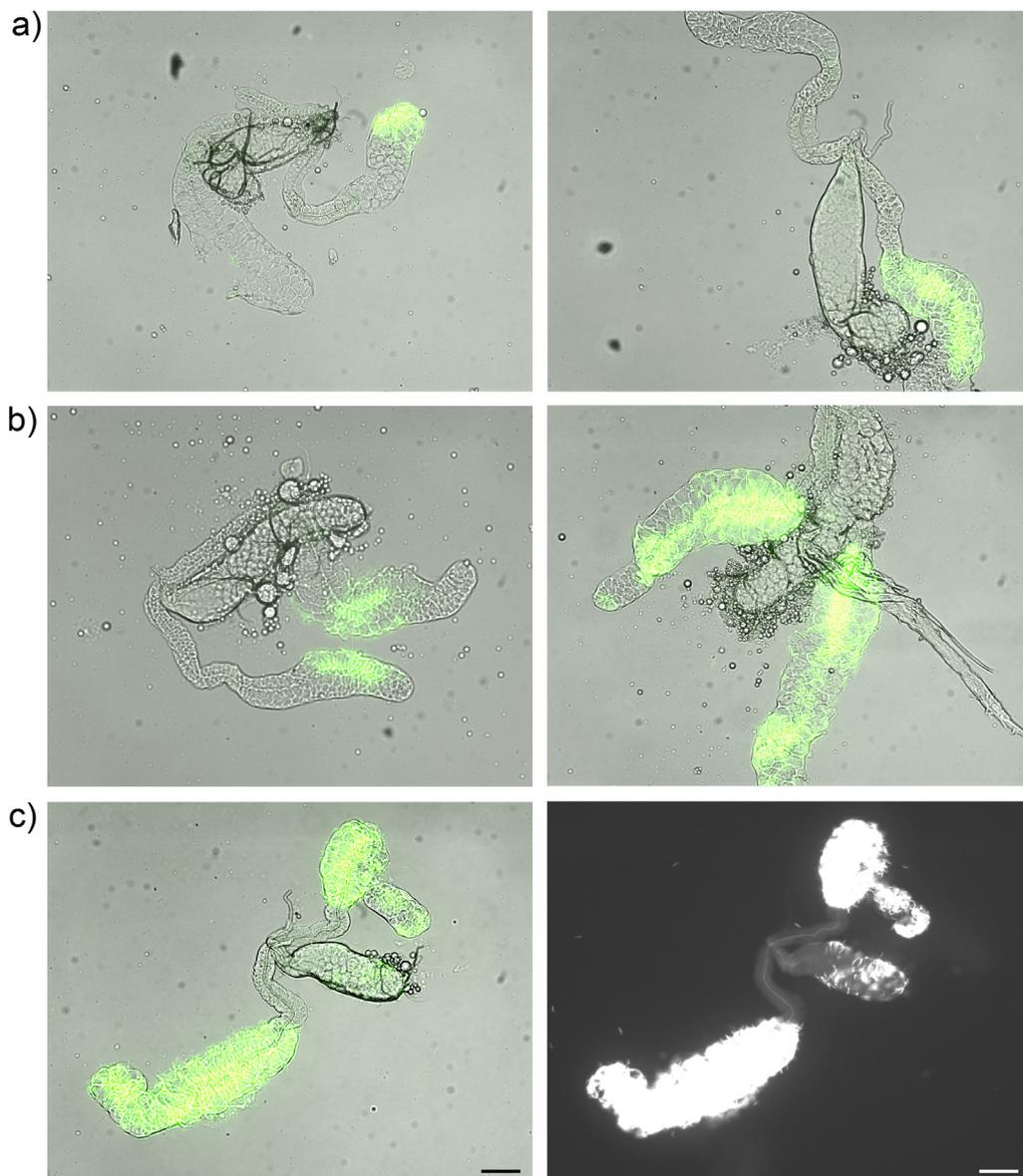


Abb. 3.25 Zeitlicher Ablauf der Speicheldrüseninvasion von *P. berghei* Sporozoiten bei *An. gambiae*

Weibliche *An. gambiae* Mücken wurden mit *P. berghei* infiziert und ihre Speicheldrüsen 15 – 17 Tage nach der Blutmahlzeit herauspräpariert. Die Intensität der Parasiteninvasion wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Sporozoiten invadieren zunächst die distalen Bereiche eines oder beider lateraler Lappen (a und b). Erst wenn diese nahezu vollständig invadiert sind, dringen die Parasiten auch in den medialen Lappen ein (c). — 50 µm

Noch ist nicht bekannt, welche Komponenten für die Erkennung und Bindung der Sporozoiten an die Speicheldrüsen verantwortlich sind – ob es sich um spezifische Rezeptoren oder andere Oberflächenstrukturen wie z.B. Kohlenhydratverbindungen handelt.

So konnte z.B. mit Lektinen, die spezifisch an Speicheldrüsen-assoziierte Kohlenhydrate binden, die Invasion von *P. gallinaceum* (Malariaparasit von Vögeln) in Speicheldrüsen von *Aedes aegypti* inhibiert werden (Barreau et al., 1995). Auf der anderen Seite blockierte ein monoklonaler Antikörper gegen ein Weibchen-spezifisches *An. gambiae* Speicheldrüsenprotein die Invasion von *P. yoelii* Sporozoiten zu 75% (Brennan et al., 2000). Vermutlich sind mehrere Komponenten an der Invasion beteiligt.

Für das nachfolgende Experiment war die Tatsache entscheidend, dass die Sporozoiten zunächst die distalen Bereiche der lateralen Lappen und erst dann den medialen Lappen invadieren. Ausgehend von der Annahme, dass das verstärkte Vorhandensein eines Faktors in der distalen Region der lateralen Lappen das Invasionsschema begünstigt und es sich hierbei um ein Protein handelt, wurde das Expressionsprofil von lateralen und medialen Lappen weiblicher *An. gambiae* Speicheldrüsen miteinander verglichen. Durch die Subtraktion einer medial-spezifischen gegen eine lateral-spezifische cDNA-Bibliothek (*suppression subtractive hybridization*), wurden Klone von Genen identifiziert, die ausschließlich bzw. verstärkt in den lateralen Lappen exprimiert werden.

3.2.3 *Suppression subtractive hybridization screen lateral-spezifischer Speicheldrüsen-gene von An. gambiae*

Für den Screen wurden ca. 200 Speicheldrüsen weiblicher, blutgefütterter *An. gambiae* Mücken herauspräpariert. Laterale und mediale Lappen wurden voneinander getrennt, die mRNA beider Populationen isoliert, in cDNA konvertiert und für die subtrahierte Hybridisierung eingesetzt.

Insgesamt 90 Klone von Genen, die ausschließlich bzw. verstärkt in den lateralen Lappen exprimiert werden, wurden in einem ersten Durchgang erfolgreich sequenziert. In der Tabelle 3.3 sind nachfolgend alle Gene aufgelistet, von denen mehr als ein Klon bei der Sequenzierung identifiziert wurde. Wichtigstes Kriterium war neben dem wiederholten Auftreten auch das Vorhandensein einer Transmembrandomäne im jeweiligen Protein (mit Rot in der Tabelle hervorgehoben), da die entsprechenden Kandidaten auf der Oberfläche der lateralen Lappen exprimiert sein sollten.

Anzahl der Klone	Genfamilien bzw. Gene
25	<i>An. gambiae D7-related proteins</i>
→ 14	→ <i>D7-r2</i>
5	<i>D7-r3</i>
2	<i>D7-r5</i>
1	<i>D7-r1</i>
(3	<i>D7-related gene cluster</i>)
7	<i>An. gambiae hypothetical proteins</i>
→ 4	→ <i>protein N° 17</i>
3	<i>protein N° 15</i>
6	<i>An. gambiae putative SGS genes</i>
→ 4	→ <i>SGS4</i>
1	<i>SGS5</i>
1	<i>pseudogene</i>
2	<i>An. gambiae antigen 5-related protein</i>
	→ <i>protein N° 1</i>
2	<i>An. gambiae Apyrase</i>
2	<i>An. gambiae gSG2-like protein</i>
2	<i>An. gambiae gene „CACT“</i>

Tab. 3.3 Erster Sequenzierungsdurchlauf der subtrahierten lateral-spezifischen cDNA-Bibliothek weiblicher *An. gambiae* Speicheldrüsen

Aufgelistet ist die Anzahl der identifizierten Klone – sofern sie mehrfach auftraten – und ihre Zuordnung zu den entsprechenden Genfamilien (fett dargestellt) bzw. Genen. Die Proteine der Gene, die mit rot markiert sind, besitzen eine Transmembrandomäne und sind daher von besonderem Interesse. Die Proteine der anderen Gene (schwarz) werden sezerniert.

3.2.4 SGS-Familie als potentielle Rezeptoren für *Plasmodium*-Parasiten

Die Speicheldrüsen blutsaugender Insekten sind sekretorisch hochaktiv. Ihr Speichel enthält eine Vielzahl pharmakologischer Wirkstoffe wie Vasodilatoren, Antikoagulanzen oder Thrombozytenaggregationshemmer (Bsp. Apyrase). Von den in Tab. 3.3 aufgeführten Genen konnten die Familien der *D7-related proteins*, *antigen 5-related proteins*, *hypothetical proteins* und *Apyrase* bereits erfolgreich in einer Speicheldrüsen-spezifischen cDNA-Bibliothek blutgefütterter *An. gambiae* Mücken als Transkripte sezernierter Proteine nachgewiesen werden (Francischetti et al., 2002). Desweiteren wurde durch *in situ* Hybridisierung auch die spezifische Expression des *D7-r2* Gens in den lateralen Lappen

weiblicher *An. gambiae* Mücken bestätigt (Arcà et al., 1999; Abb. 3.26), was für die Qualität und Spezifität der subtrahierten cDNA-Bibliothek lateraler Speicheldrüsenlappen spricht.

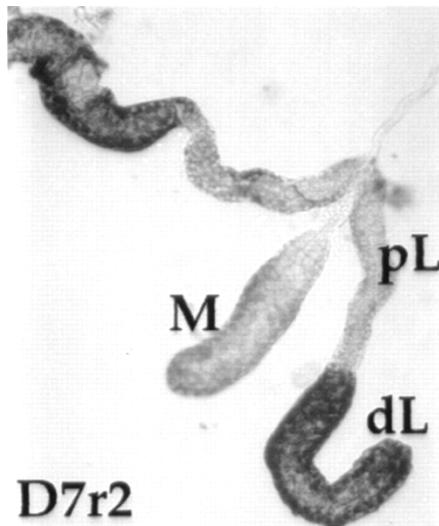


Abb. 3.26 In situ Hybridisierung von D7-r2
Gezeigt ist die *in situ* Hybridisierung weiblicher *An. gambiae* Speicheldrüsen mit der *antisense* Probe von D7r2; pL: proximal-lateraler Lappen, dL: distal-lateraler Lappen; M: medialer Lappen (modifiziert von Arcà et al., 1999).

Die SGS-Familie stellt die einzige Gruppe von Genen innerhalb des Screens dar, die - vertreten mit 6 Klonen - zu den stärker exprimierten Genen zählt und deren Proteine gleichzeitig eine Transmembrandomäne besitzen. Die Literaturrecherche ergab darüberhinaus, dass die Proteine eine Heparin-Bindungsdomäne sowie die höchste Dichte an Tyrosin-Sulfatierungsstellen aller *An. gambiae* Proteine besitzen (Korochkina et al., 2006). Da die Hauptvertreter der Sporoziten-Oberflächenproteine (CS und TRAP) ebenfalls an Heparin binden und während der Leberinvasion mit Sulfokonjugaten interagieren, stellen die Vertreter der SGS-Familie – allen voran SGS4 – mögliche Rezeptorkandidaten für die Speicheldrüseninvasion von *Plasmodium*-Sporoziten dar.

Durch RNA-Interferenz sollte die Expression des *SGS4* und *SGS5* Gens in *An. gambiae* herunterreguliert und die Auswirkungen auf die Sporoziten-Invasion der Speicheldrüsen analysiert werden.

3.2.5 Die Genexpression von *SGS5* ist nach dsRNA-Injektion nicht herunterreguliert

Die dsRNA-Herstellung für *SGS4* und *SGS5* erfolgte analog zu Abschnitt 3.1.2.1 des Ergebnisteils 3.1. Um zunächst die Knockdowneffizienz zu überprüfen, wurde dsSGS5 bzw. dsGFP in 1-Tage alte, weibliche *An. gambiae* Mücken injiziert. Drei Tage nach der Injektion wurde die grNA der Mücken isoliert, in cDNA konvertiert und das Transkriptionsprofil von *SGS5* mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert.

Es konnte kein Unterschied in der Transkript-Menge von *SGS5* zwischen dsSGS5- und dsGFP-injizierten Mücken festgestellt werden (Abb. 3.27).

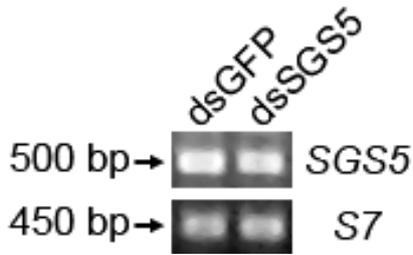


Abb. 3.27 SGS5 Expressionsprofil nach dsRNA-Injektion

Semiquantitative RT-PCR von *An. gambiae* Mücken, die drei Tage zuvor mit dsSGS5 bzw. dsGFP als Kontrolle injiziert wurden. Für die Standardisierung wurden *S7* spezifische Primer eingesetzt. Die Transkript-Menge von *S7* wurde in 21 Zyklen, die von *SGS5* in 31 Zyklen bestimmt.

Im nachfolgenden wurde auch die Effizienz der dsRNA von *SGS4* überprüft, der *gene-silencing* Effekt im einzelnen nach 2, 4, 8, 20, 27, 32, 44 und 57 Stunden analysiert, die Mengen beider dsRNAs durch dreimaliges Injizieren erhöht sowie eine neue dsRNA synthetisiert, die sich gegen alle Gene der *SGS*-Familie richtet (dsSGSM). Bei keinem der Ansätze konnte eine Reduktion der *SGS*-Transkript-Menge als Folge der dsRNA-Injektion detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe fluoreszenzmarkierter *small-interfering* RNAs (siRNAs) soll in zukünftigen Knockdown-Experimenten ausgetestet werden, ob die Moleküle von den Speicheldrüsen überhaupt erfolgreich aufgenommen werden und wie lange die Halbwertszeit der siRNAs in den Speicheldrüsenzellen ist.

Ergebnisse – Teil III *Plasmodium*

**Die Rolle von *PbUOS3* bei der Invasion von
Speicheldrüsen und Hepatozyten**

3.3 Ergebnisse – Teil III

3.3.1 Das *UOS3* Gen ist spezifisch in Sporozoiten exprimiert

Das *UOS3* Gen (*upregulated in oocyst sporozoites 3*) wurde im Rahmen einer subtrahierten cDNA-Bibliothek identifiziert, bei der das Transkriptionsprofil von Oozysten- und Speicheldrüsen-Sporozoiten miteinander verglichen wurde (Matuschewski et al., nicht publiziert). In einem weiteren *transcriptional profiling* für prä-erythrozytäre Proteine, die nicht in Blutstadien exprimiert sind, konnte *UOS3* erneut identifiziert werden (Kaiser et al., 2004).

Das Gen besitzt ein Ortholog in *Plasmodium falciparum* und kodiert für ein 260 kDa großes Transmembranprotein, welches die zytoplasmatische Domäne der TRAP-Familie am Carboxy-Terminus aufweist (Abb. 3.28). Diese Domäne ist durch einen subterminalen Tryptophan-Rest sowie zwei nicht zusammenhängende Bereiche negativ geladener Aminosäuren charakterisiert. Jüngste Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass das glykolytische Enzym Aldolase TRAP über diese zytoplasmatische Domäne mit Aktin verbindet und so die Verknüpfung mit dem Akto-Myosin Motor herstellt, der unterhalb der Plasmamembran des Parasiten lokalisiert ist (Jewett und Sibley, 2003; Buscaglia et al., 2003).



Abb. 3.28 Schematische Darstellung des UOS3 Proteins von *P. berghei*

Dargestellt ist das *UOS3* Protein von *P. berghei* mit seinen Proteindomänen. Die Zahlen über der Graphik geben die Länge der Aminosäuresequenz wieder. Die Transmembrandomäne (*) sowie die zytoplasmatische Domäne der TRAP-Familie (▲) am Carboxy-Terminus (C) sind entsprechend durch Symbole gekennzeichnet.

3.3.2 Die *UOS3* Genexpression beginnt bereits im Ookineten

Eine eingehendere Analyse des *UOS3* Genexpressionsprofils wurde mittels semiquantitativer RT-PCR durchgeführt. Die Entdeckung des *UOS3* Gens in einer gegen Merozoiten subtrahierten Sporozoiten-cDNA Bibliothek (Kaiser et al., 2004) setzte hierbei den Fokus auf die in der Mücke relevanten *Plasmodium*-Stadien.

Ookineten einer Übernachtkultur, Mitteldarmsporozoiten, Hämözölsporozoiten und Speicheldrüsenporozoiten WT-infizierter *An. stephensi* Mücken wurden isoliert, die RNA extrahiert, in cDNA konvertiert und in die PCR eingesetzt (Abb. 3.29). Für die Standardisierung der Probenmengen wurden spezifische Primer gegen das Gen des *Circumsporozoite Proteins* (CSP) verwendet, das in allen Sporozoiten-Stadien konstitutiv exprimiert wird (Matuschewski et al., 2002). Lediglich in den Speicheldrüsenporozoiten nimmt die Expression leicht ab. Aus diesem Grund erfolgte die Anpassung der cDNA-Menge von Speicheldrüsenporozoiten über die Anzahl der PCR-Zyklen. 33 Zyklen waren notwendig, um die Transkript-Menge für *CS* denen der anderen Proben anzupassen.

Mit diesen Parametern ergab sich folgendes Profil für *UOS3*: die Genexpression beginnt im Ookineten, setzt sich in Mitteldarmsporozoiten fort, nimmt in Hämözölsporozoiten stark ab und ist in Speicheldrüsenporozoiten kaum noch vorhanden. Selbst mit 33 Zyklen ließ sich nur eine sehr geringe Menge an *UOS3* Transkript amplifizieren, womit die *UOS3* Genexpression in Speicheldrüsenporozoiten vernachlässigbar ist.

Die schwache Expression sowohl von *CS* als auch *UOS3* deuten daraufhin, dass Speicheldrüsenporozoiten im allgemeinen transkriptionell weniger aktiv sind. Dies stimmt mit der Annahme überein, dass die Sporozoiten in diesem Stadium bereits mit allen essentiellen Proteinen ausgestattet sind, die ihnen eine erfolgreiche Invasion in den Wirtsorganismus und ihre darauffolgende Weiterentwicklung zu Leberstadien ermöglichen.

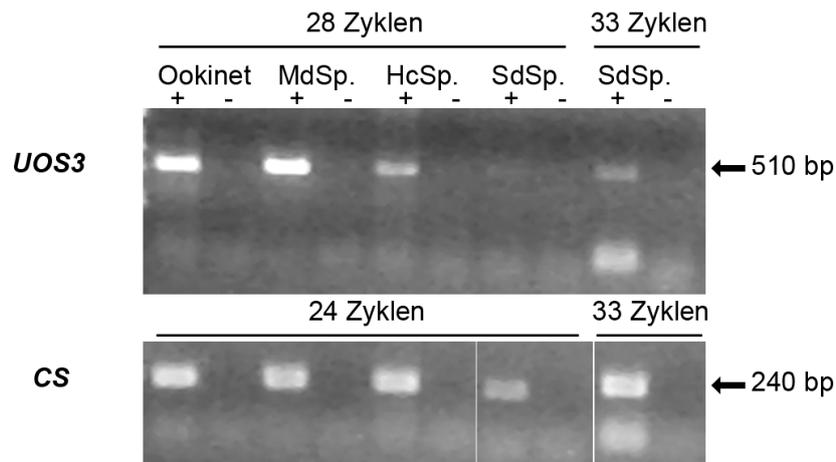


Abb. 3.29 *UOS3* wird am stärksten in Ookineten und Mitteldarmsporozoiten exprimiert
Die cDNA von Ookineten, Mitteldarm- (MdSp.), Hämozöl- (HcSp.) und Speicheldrüsensporozoiten (SdSp.) wurde semiquantitativ durch PCR amplifiziert. Als interne Ladekontrolle wurde die *CS*-Transkript-Menge mit 24 PCR-Zyklen bestimmt, bzw. mit 33 Zyklen bei der Speicheldrüsensporozoiten-Probe. Die Amplifikation von *UOS3* erfolgte mit 28 Zyklen bzw. analog zu *CS* zusätzlich mit 33 Zyklen.

3.3.3 Das *UOS3* Protein wird am stärksten in Speicheldrüsensporozoiten exprimiert

Die stadienspezifische Expression von *UOS3* wurde mittels Immunoblot-Verfahren analysiert. Je 10^5 Mitteldarm-, Hämozöl- und Speicheldrüsensporozoiten wurden eingesetzt. Durch den Nachweis des *CS* Proteins, das in allen Sporozoitenstadien in gleichen Mengen vorhanden ist, wurde zusätzlich gewährleistet, dass vergleichbare Proteinmengen untersucht wurden.

UOS3 wird in allen Sporozoiten-Stadien exprimiert (Abb. 3.30). Im Gegensatz zum Genexpressionsprofil nimmt die Proteinmenge von Mitteldarm- zu Speicheldrüsensporozoiten stark zu.

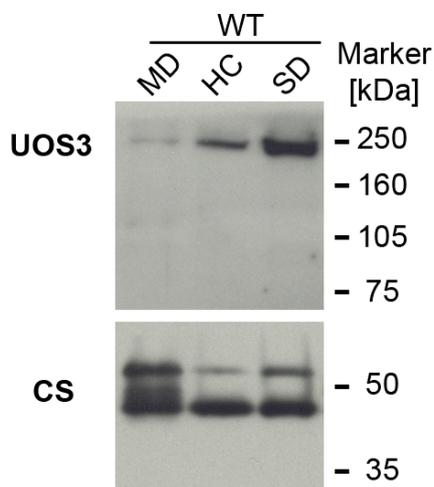


Abb. 3.30 Die *UOS3* Expression steigt von Mitteldarm- zu Speicheldrüsensporozoiten stark an

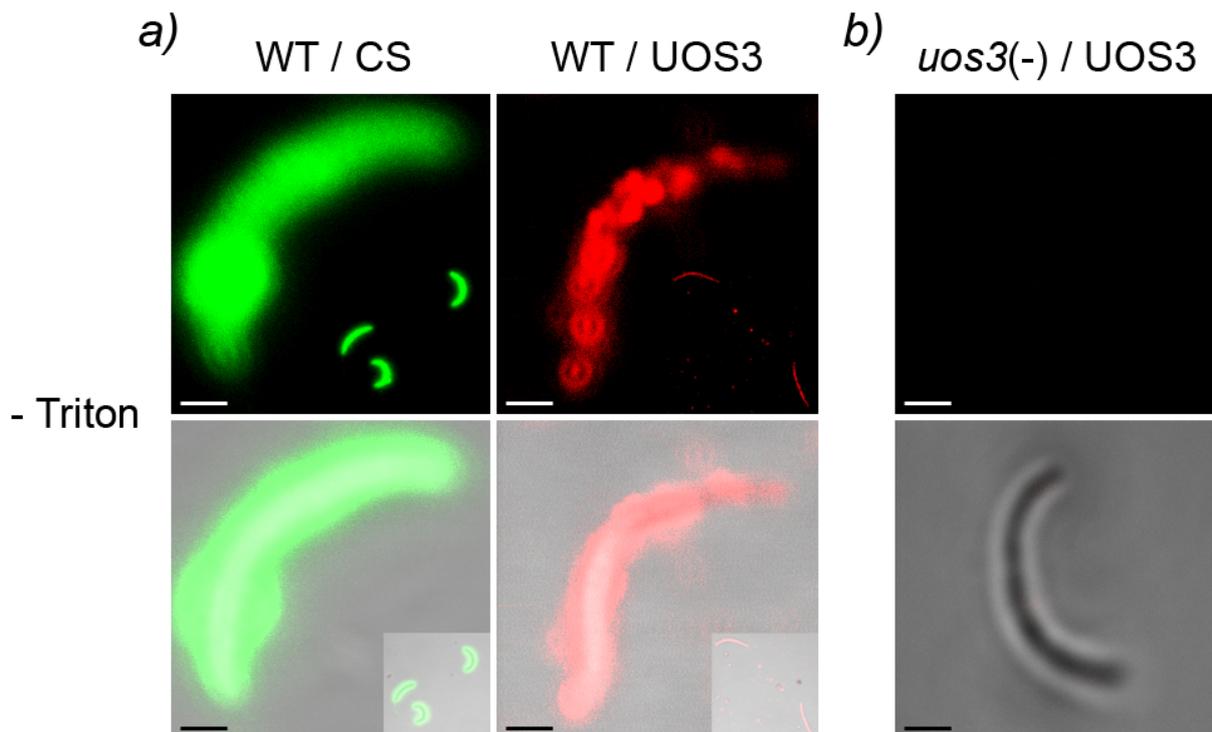
Mitteldarmsporozoiten (MD) wurden am Tag 14, Hämozölsporozoiten (HC) am Tag 16 und Speicheldrüsensporozoiten (SD) am Tag 17 nach der Blutmahlzeit WT-infizierter *An. stephensi* Mücken isoliert und die Proteine extrahiert. In jeder Spur wurde die Gesamtproteinmenge von 10^5 der entsprechenden Sporozoiten-Stadien durch 7% SDS-Page aufgetrennt und anschließend transferiert. *UOS3* wurde mit den Antikörpern Kaninchen Anti-*UOS3* (polyklonal) und Ziege Anti-Kaninchen HRP sichtbar gemacht. Der Nachweis des *CS* Proteins erfolgte durch die Antikörper Maus Anti-*CS* (monoklonal) und Ziege Anti-Maus HRP.

3.3.4 UOS3 wird auf der Oberfläche von Sporozoiten exprimiert

Für die Lokalisierung von UOS3 wurden Wildtyp-Hämözölsporozoiten fixiert, entweder ausschließlich mit Saponin permeabilisiert oder zusätzlich mit Triton behandelt, und anschließend mittels Immunofluoreszenz analysiert. Triton entfernt die Zellmembran, so dass Proteine, die auf der Oberfläche des Parasiten exprimiert werden - wie CS -, nach der Triton-Behandlung nicht mehr nachweisbar sind.

Die Abb. 3.31a zeigt, dass die Parameter für die UOS3-Lokalisierung identisch mit denen von CS sind. Nach der Behandlung mit Triton kann kein UOS3 Protein detektiert werden. Folglich wird das Protein auf der Oberfläche des Parasiten exprimiert.

Als Kontrolle für die Spezifität des Anti-UOS3 Antikörpers in der Immunofluoreszenz-Analyse (IFA) wurden parallel *uos3(-)* Hämözölsporozoiten untersucht, auf deren Erzeugung im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird. Die Sporozoiten weisen nach einfacher Permeabilisierung mit Saponin, ohne anschließende Triton-Zugabe, kein UOS3 Protein auf (Abb. 3.31b).



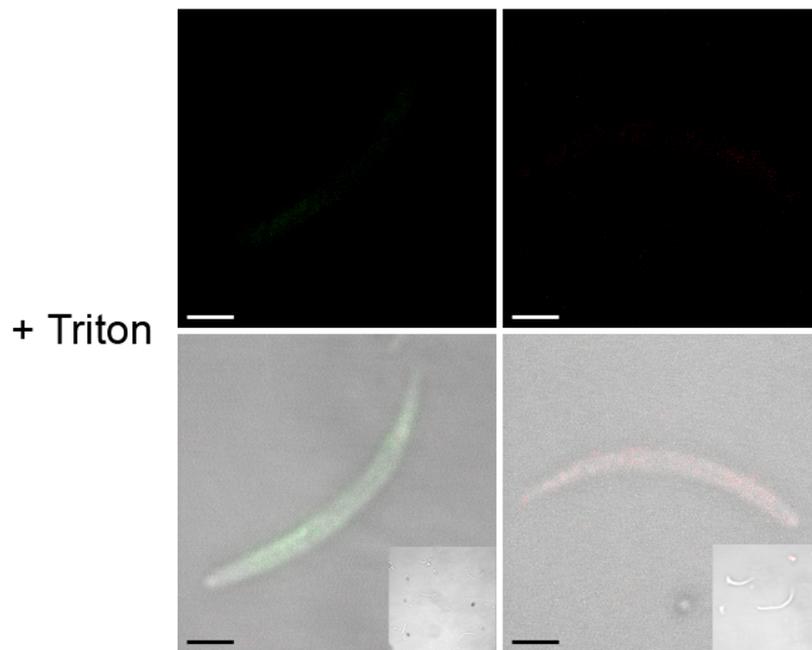


Abb. 3.31 Lokalisation von UOS3 auf der Oberfläche von *P. berghei* Sporozoiten

Dargestellt ist die konfokale Immunfluoreszenzanalyse von WT Hämazölsporozoiten. Die Zellmembran wurde mit Saponin permeabilisiert und bei den mit “+ Triton“ gekennzeichneten Parasiten zusätzlich extrahiert. UOS3 wurde mit dem primären Antikörper Kaninchen Anti-UOS3 (1:50) und dem sekundären Antikörper Ziege Anti-Kaninchen Alexa Fluor-546 (rot) detektiert. Das Oberflächenprotein CS diente als Kontrolle und wurde mit dem primären Antikörper Anti-CS (1:1.000) und dem sekundären Antikörper Ziege Anti-Maus Alexa Fluor-488 (grün) nachgewiesen. Für den Spezifitätsnachweis des Anti-UOS3 Antikörpers im IFA wurden *uos3(-)* Hämazölsporozoiten (b) permeabilisiert und entsprechend der Abb. a) angefärbt. Übersichtsbilder wurden verkleinert jeweils rechts unten im Bild dargestellt. Von den *uos3(-)* Sporozoiten konnte keine Übersicht wiedergegeben werden, da die Konzentration und somit die Dichte der Sporozoiten für eine Abbildung zu gering war. — 2 μm

3.3.5 Knockout von *UOS3* durch *Replacement*-Strategie

Da *UOS3* nicht in Blutstadien-Parasiten exprimiert wird, kann das Gen mit Hilfe des *Plasmodium berghei*-Transfektionssystems (Van Dijk et al., 1995; Waters et al., 1997; Ménard und Janse, 1997) in Blutstadien-Schizonten ausgeschaltet werden. Das Transfektionssystem nutzt die Tatsache aus, dass *Plasmodium* nur während eines sehr kurzen Lebensabschnitts in der Mücke (Zygote) ein diploides Genom besitzt. In allen anderen Phasen, also auch in den Blutstadien, ist das Genom haploid, was den Knockout von Genen in diesen Stadien erleichtert.

Der endogene *UOS3*-Gen-Lokus wurde mittels der *Replacement*-Strategie inaktiviert. Hierfür wurden zwei *UOS3*-Sequenzen, welche die beiden Enden des Gens flankieren, in den b3D.DT^H.^D-Transfektionsvektor zu beiden Seiten des Selektionsmarkers TgDHFR/TS kloniert (Abb. 3.32). Die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) von *Toxoplasma gondii* erlaubt ein späteres Selektionieren mit Pyrimethamin. Nach erfolgreicher Transfektion in *P. berghei* wird das endogene Zielgen durch doppeltes *Crossover* vollständig durch den Selektionsmarker ersetzt (*replacement*). Von Vorteil bei der *Replacement*-Strategie ist, dass es zu keiner Reversion des mutierten Locus kommen kann, bedingt durch das doppelte *Crossover*. Das Zielgen wird vollständig ersetzt und somit eine vollkommene Geninaktivierung gewährleistet.

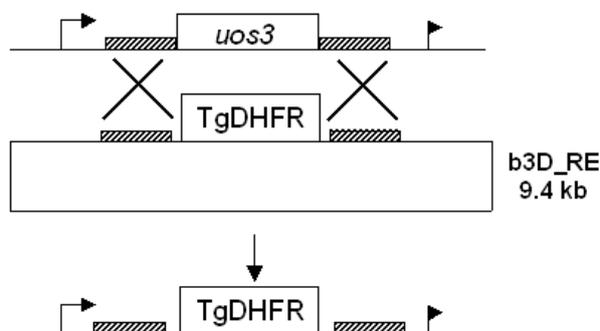


Abb. 3.32 Schematische Darstellung der *Replacement*-Strategie zur Inaktivierung von *PbUOS3*

Gezeigt ist die schematische Übersicht über den Genaustausch des endogenen *UOS3* Gens durch den Selektionsmarker TgDHFR via doppeltem *Crossover* an den beiden homologen Regionen

Bei der Transfektion wurden die Blutstadien-Schizonten des *P. berghei* Stammes ANKA durch Elektroporation transfiziert und das gewünschte Zielkonstrukt durch homologe Rekombination in das Parasiten-Genom integriert. Die rekombinanten Parasiten wurden anschließend intravenös in Ratten injiziert und vom ersten Tag an nach der Transfektion mit Pyrimethamin selektioniert. Tabelle 3.4 zeigt den Parasitämieverlauf der Versuchstiere sowie den Behandlungszyklus mit Pyrimethamin.

Die parentalen Ratten R1 und R2 sowie deren Transfermäuse M1 und M2 zeigen den typischen Parasitämieverlauf bei der Selektion rekombinanter Parasiten. Durch die Pyrimethaminbehandlung werden zunächst alle nicht-rekombinanten Parasiten abgetötet, wodurch die Parasitämie sinkt. Unter dem Selektionsdruck von Pyrimethamin bilden sich verstärkt Gametozyten aus. Die Behandlung mit dem Antimalariamittel wird solange durchgeführt, bis erstmalig keine Parasiten mehr in den Blutaussstrichen nachweisbar sind. Sie setzt erst wieder ein, sobald die Parasitämie über 0,1% gestiegen ist. Der Parasitämieanstieg der parentalen Ratten unter Pyrimethamin-Verabreichung deutet auf eine resistente Population hin. Zur weiteren Selektion werden die Parasiten jeweils in eine naive NMRI Maus transferiert und ebenfalls mit Pyrimethamin behandelt.

Die parentalen Ratten sowie deren Transfer-Mäuse werden für die nachfolgende Genotypisierung der Parasiten geblutet, sobald deren Parasitämie über 1% liegt und die genomische DNA der *Plasmodium*-Blutstadien isoliert.

Tag	R1		R2	
1	0,5%, B		0,8%, B	
2	0,2%, Gam. B		0,3%, Gam. B	
3	Gam. B		Gam. B	
4	Gam. B		Gam. B	
5	Gam. B		Gam. B	
6	neg. B		neg. B	
7	neg.		neg.	
8	neg.		neg.	
9	neg.		neg.	
10	pos. 0,7% B	↓ M1	pos. 1,2% B	↓ M2
11	pos. 1,7%	n.d.	pos. 3,6%	n.d.
12	geblutet	1,3% B	geblutet	1,4% B
13		3,2%		2,9%
14		geblutet		geblutet

Tab. 3.4 Transfektion von *P. berghei* mit dem Konstrukt b3D_UOS3REpl.

Dargestellt ist der Transfektionsverlauf für die Inaktivierung des endogenen *UOS3* Gens durch *Replacement*. Der zeitliche Verlauf der Parasitämie von zwei parentalen Ratten (R1 und R2) und zwei Transfermäusen (M1 und M2) ist in % angegeben. Tag 1 entspricht dem ersten Tag nach der intravenösen Injektion des elektroporierten Schizonten-Pellets. **B** bezeichnet die Tage, an denen die Tiere mit Pyrimethamin selektioniert wurden. Gam.: Gametozyten, neg.: negativ im Giemsa-gefärbten Blutaussstrich, ↓: Frischbluttransfer, n.d.: nicht detektiert, geblutet: Ausbluten der Tiere und Präparation der genomischen Parasiten-DNA

3.3.6 Genotypische Analyse der *uos3(-)* Parentalgeneration

Das *Replacement*-Konstrukt (RE) ist so konstruiert, dass eine Religation des linearisierten Plasmids während der Transfektion nicht möglich ist. Um dennoch Pyrimethaminresistenz durch einen episomal vorliegenden Vektor sicher ausschließen zu können, wurde die genomische DNA (gDNA) der selektionierten Parasitenpopulationen isoliert und auf den erfolgreichen Austausch des endogenen *UOS3* Gens durch den Selektionsmarker mittels PCR überprüft. Dabei wurden die spezifischen Oligonukleotide für die PCR so eingesetzt, dass nur bei dem integrierten Konstrukt eine Sequenz amplifiziert werden konnte, nicht jedoch bei Wildtyp Parasiten oder einem episomalen Plasmid (test 1). Abb. 3.33 gibt einen Überblick der verschiedenen Test-Primerkombinationen.

Die PCR-Analyse der parentalen Parasitenpopulationen aus den Ratten 1 und 2 sowie aus deren Transfermäusen ist in Abb. 3.34 dargestellt und wird im Folgenden von oben nach unten besprochen. Das test 1 Primerpaar bindet innerhalb des Selektionsmarkers und des endogenen *UOS3*-Gen-Lokus. Somit findet nur dann eine Amplifikation statt, wenn das endogene Zielgen durch doppeltes *Crossover* vollständig durch den Selektionsmarker ersetzt wurde. Die gDNA der beiden Parental- und transferierten Generationen erzeugt ein spezifisches Produkt (1,9 kb). Das test 2 Primerpaar bindet an das Ende der 5'-klonierten *UOS3* Sequenz und innerhalb des endogenen *UOS3*-Genlokus. Liegt das Plasmid episomal vor, führt die PCR zu keinem Produkt. Test 2 amplifiziert ein spezifisches Produkt in der zu erwartenden Größe von 1,4 kb in der Wildtyp-Population sowie den Populationen aus der Transfektion, die ebenfalls noch Wildtyp-Parasiten enthalten können. Das test 3 Primerpaar bindet am 5'-Ende der klonierten *UOS3* Sequenz und innerhalb des Selektionsmarkers. Die Primerkombination weist das Konstrukt im Parasiten nach, unterscheidet aber nicht zwischen Integration und Episom. Die PCR hat, wie zu erwarten, eine spezifische Bande von 1,5 kb in der gDNA der Transfektionspopulationen sowie der Plasmid-DNA des Konstrukts detektiert.



3.33 Schematische Darstellung der Integrations-spezifischen PCR für *uos3(-)*re

Übersicht des in *P. berghei* integrierten *Replacement*-Konstrukts mit den spezifischen Primerkombinationen zur Überprüfung des erfolgreichen Austauschs durch doppeltes *Crossover*. Die Pfeile symbolisieren die mit den Oligonukleotid-Kombinationen amplifizierten Fragmente und deren Amplifikationsrichtung.

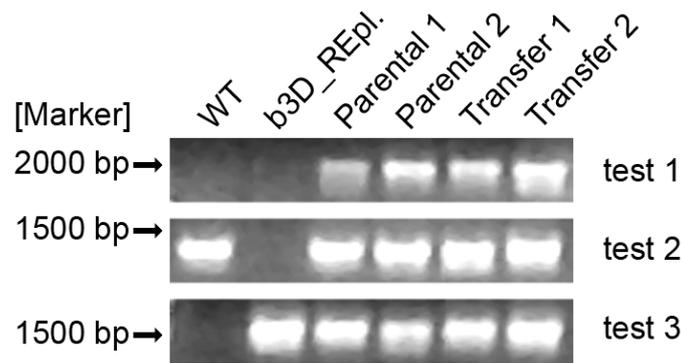


Abb. 3.34 PCR-Analyse des Genknockouts durch *Replacement* am *UOS3* Locus

Die gDNA der parentalen Parasitenpopulationen aus Ratte 1 und 2 sowie deren Transfermäuse wurden auf erfolgreiches doppeltes *Crossover* am endogenen *UOS3* Genlocus überprüft. Die Hybridisierungsstellen der Primerkombinationen sind Abb. 3.33 zu entnehmen.

3.3.7 Klonierung der *uos3(-)* Parasiten und anschließende Genotypisierung

Trotz eindeutigen Integrationsnachweises kann eine Kontamination durch resistente Wildtyp-Populationen nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden die Parasiten kloniert.

Von der Parentalgeneration 1 wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, die es ermöglicht, statistisch gesehen einen Parasiten pro Maus intravenös zu injizieren (Tab. 3.5). Insgesamt 15 NMRI Mäuse wurden so infiziert, von denen drei nach acht bzw. neun Tagen Parasitämien aufwiesen. Dieses Ergebnis liegt innerhalb der Erwartungen des statistischen Mittels, was für die Qualität der Verdünnungsreihe spricht.

<i>uos3(-)re</i>
Parasitämie für Klonierung = 0,5%
bei 7×10^6 Erythrozyten/ μ l Blut $3,5 \times 10^4$ Parasiten/ μ l

Tab. 3.5 Verdünnungsansatz für die Klonierung von *uos3(-)* Parasiten

Die parentale Parasitenpopulation 1 wurde in naive NMRI Mäuse injiziert und bei einer Parasitämie zwischen 0,1 und 1% für die Klonierung eingesetzt.

Die drei positiven Mäuse der Klonierung wurden geblutet und die gDNA der Blutstadien-Parasiten isoliert. Die Genotypisierung der drei klonalen *uos3(-)* Populationen (I-3, I-5 und II-3) erfolgte nach dem Amplifikationsschema aus Abb. 3.35. Das Ergebnis der PCR-Analyse ist in Abb. 3.36 dargestellt. Von der gDNA aller drei Parasitenklone konnte ein 1,9 kb Produkt mit dem test 1 Primerpaar amplifiziert werden, das spezifisch für den Austausch des endogenen *UOS3* Gens durch den Selektionsmarker ist. Das Vorhandensein des Zielkonstrukts konnte in allen drei Parasitenklonen sowie der entsprechenden Plasmid-DNA

durch die test 3 Primerkombination nachgewiesen werden. Das test 4 Primerpaar, das innerhalb der 5'-klonierten *UOS3* Sequenz und innerhalb des endogenen *UOS3*-Genlokus bindet, schloss eine Kontamination mit resistenten Wildtyp-Parasiten in den klonalen *uos3(-)* Populationen eindeutig aus. Somit bestätigt die PCR-Analyse, dass es sich bei den drei *uos3(-)* Parasiten um klonale Populationen handelt.



Abb. 3.35 Schematische Darstellung der integrations- und wildtypsp. PCR für *uos3(-)re*

Test 1 weist den Austausch des endogenen Genlokus durch das Zielkonstrukt nach, test 3 das Vorhandensein des Zielkonstrukts und test 4 die Kontamination mit Wildtyp Parasiten.

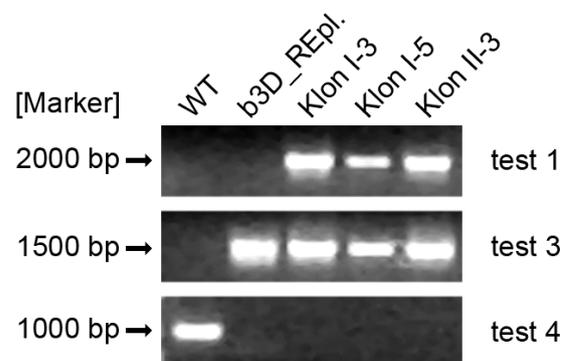


Abb. 3.36 PCR-Analyse der Parasitenpopulationen aus den Klonierungsmäusen I-3, I-5 und II-3

Die gDNA der drei *uos3(-)* Populationen I-3, I-5 und II-3 wurden auf Vorhandensein des Zielkonstrukts und Wildtypkontamination getestet. Die Hybridisierungsstellen der Primerkombinationen sind Abb. 3.35 zu entnehmen.

3.3.8 Das *UOS3* Gen wurde erfolgreich ausgeknockt

Durch die Genotypisierung der klonalen *uos3(-)* Parasiten konnte bereits der erfolgreiche Austausch des endogenen *UOS3* Gens durch den Selektionsmarker nachgewiesen werden. Als weitere Kontrolle wurde die Effizienz des Knockouts auf Transkriptions- und Translationsebene in der klonalen *uos3(-)* Population I-3 überprüft. Hierfür wurden Mitteldarmsporozoitien am Tag 14 und Hämözölsporozoitien am Tag 16 nach der Blutmahlzeit *uos3(-)* infizierter *An. stephensi* Mücken isoliert und für semiquantitative RT-PCR bzw. Immunoblot aufbereitet. Für die Immunoblotanalyse von *uos3(-)* Speicheldrüsenporozoitien, in deren Entwicklungsphase das Protein am stärksten exprimiert sein sollte, konnte auch nach mehrmaligen Versuchen leider nicht genügend Material gewonnen werden (siehe funktionelle Charakterisierung 3.3.9). Als interne Ladekontrolle diente erneut CS.

Wie aus Abb. 3.37 hervorgeht, konnte von der cDNA der *uos3(-)* Mitteldarmsporozoiten kein *UOS3* Transkript amplifiziert werden. Ebenso konnte im Immunoblot von *uos3(-)* Mitteldarm- und Hämozölsporozoiten kein *UOS3* Protein nachgewiesen werden (Abb. 3.38). Somit ist das *UOS3* Gen in den Knockout-Parasiten vollständig inaktiviert worden.

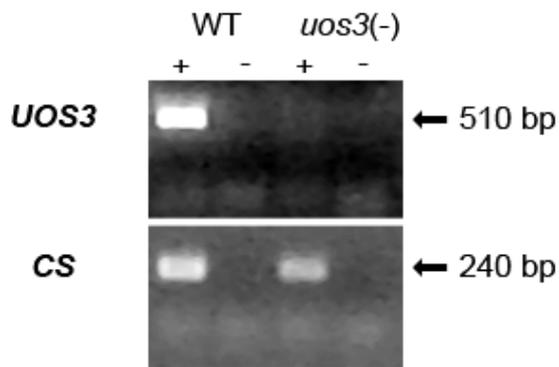


Abb. 3.37 *uos3(-)* Mitteldarmsporozoiten exprimieren das Gen nicht

Semiquantitative RT-PCR von WT und *uos3(-)*/Klon I-3 Mitteldarmsporozoiten. In der WT Population wurde das *UOS3* Transkript in der zu erwartenden Größe von 510 bp amplifiziert, in der *uos3(-)* Population nicht; obwohl die eingesetzte Probenmenge – dargestellt durch *CS*-Transkript – in beiden Fällen fast identisch war. Die Negativkontrolle der RT-PCR ist durch “-“ dargestellt.

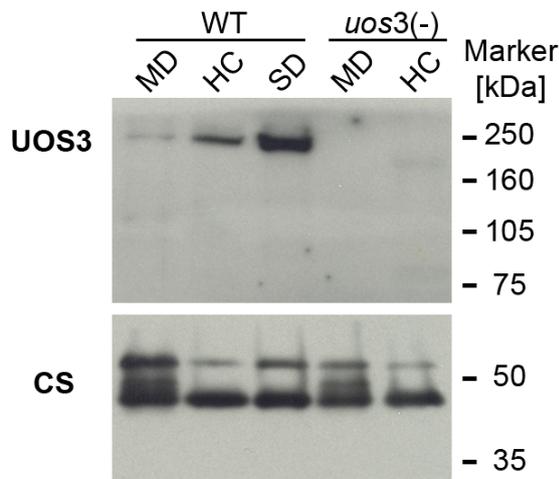


Abb. 3.38 *uos3(-)* Parasiten exprimieren das Protein nicht

Mitteldarmsporozoiten (MD) von Tag 14, Hämozölsp. (HC) von Tag 16 und Speicheldrüsensp. (SD) von Tag 17 WT bzw. *uos3(-)* infizierter *An. stephensi* wurden isoliert und die Proteine extrahiert. Für *uos3(-)* Speicheldrüsensp. reichte das Material nicht aus. Pro Spur wurde die Gesamtproteinmenge von 10^5 der entsprechenden Sporozoiten-Stadien durch 7% SDS-Page aufgetrennt und anschließend transferiert. *UOS3* wurde mit den Antikörpern Kaninchen Anti-*UOS3* (polyklonal) und Ziege Anti-Kaninchen HRP sichtbar gemacht. Der Nachweis von *CS* erfolgte durch die Antikörper Maus Anti-*CS* (monoklonal) und Ziege Anti-Maus HRP.

3.3.9 Funktionelle Charakterisierung von UOS3 in der *Anopheles*-Mücke

Die steigende Proteinakkumulation von UOS3 (Abb. 3.30) in den späten Sporozoiten-Stadien – Hämözöl- und Speicheldrüsen-sporozoiten – lassen einen erhöhten Bedarf des Proteins in dieser Entwicklungsphase vermuten. Durch die Quantifizierung von *uos3(-)* Mitteldarm- und Speicheldrüsen-sporozoiten sollte zunächst der Entwicklungsverlauf der Parasiten beobachtet und die Fähigkeit der gereiften Sporozoiten in die Speicheldrüsen einzudringen, untersucht werden. In den nachfolgenden Experimenten werden die *uos3(-)* Parasiten der klonalen Population I-3 verwendet, sofern nicht anderweitig darauf hingewiesen.

Für die Experimente wurden Mitteldarmsporozoiten am Tag 14 und Speicheldrüsen-sporozoiten am Tag 17 nach der Blutmahlzeit aus WT und *uos3(-)* infizierten *An. stephensi* Mücken isoliert und die Sporozoitenzahl pro infizierter Mücke bestimmt.

Bei den Mitteldarmsporozoiten wurden aus beiden Parasiten-Populationen ähnliche Sporozoitenzahlen ermittelt (Abb. 3.39). Auch die Untersuchung von WT und *uos3(-)* infizierten Mitteldärmen am Tag 10 nach der Blutmahlzeit durch Fluoreszenzmikroskopie lassen keinen Unterschied in der Entwicklung erkennen (Abb. 3.40). *Uos3(-)* Oozysten sind in Form und Größe identisch mit den WT Oozysten.

Bei den Speicheldrüsen-sporozoiten zeigen die *uos3(-)* Parasiten eine signifikante Reduktion in der Gesamtzahl pro infizierter Mücke gegenüber der WT Population ($p < 0.031$, Abb. 3.41). Zusätzlich bestätigen isolierte Speicheldrüsen *uos3(-)* und WT-infizierter Mücken am Tag 17 nach der Blutmahlzeit, dass nur ein geringer Teil der *uos3(-)* Sporozoiten in der Lage ist, die Speicheldrüsen zu invadieren (Abb. 3.42).

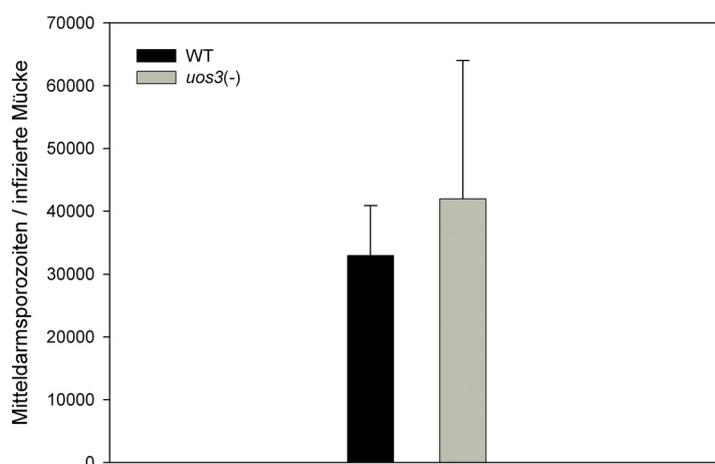


Abb. 3.39 *uos3(-)* Mitteldarmsporozoiten entwickeln sich normal

Gezeigt ist die Anzahl der *uos3(-)* und WT Mitteldarmsporozoiten pro infizierter Mücke am Tag 14. Die Abbildung fasst die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten zusammen, bei denen nur Fütterungen mit > 20.000 Mitteldarmsporozoiten / infizierter Mücke berücksichtigt wurden. WT: 33.000 ± 7.900, *uos3(-)*: 42.000 ± 22.000.

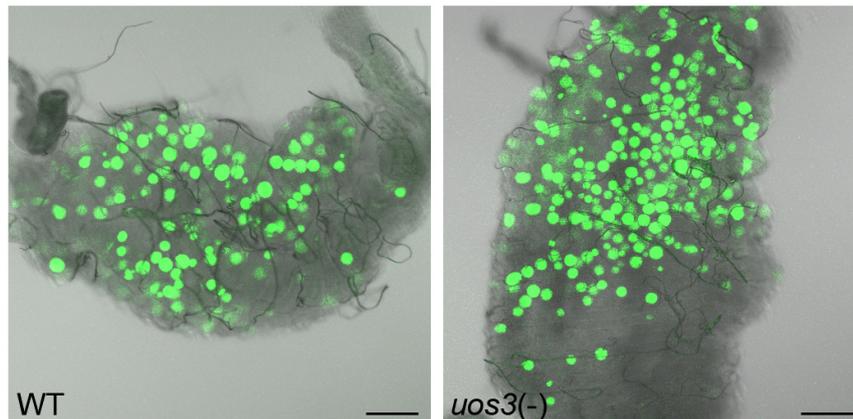


Abb. 3.40 *uos3(-)* Oozysten entsprechen in Form und Größe denen der WT-Parasiten
Mitteldärme infizierter WT und *uos3(-)* Mücken wurden 10 Tage nach der Blutmahlzeit herauspräpariert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Form und Größe der Oozysten sind in beiden Populationen identisch. — 100 μ m.

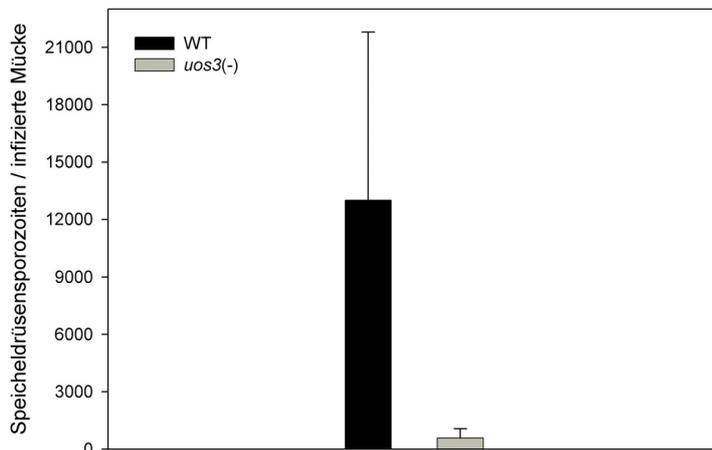


Abb. 3.41 Signifikant weniger *uos3(-)* Sporozoiten invadieren die Speicheldrüsen

Gezeigt ist die Anzahl der *uos3(-)* u. WT Speicheldrüsensporozoiten pro infizierter Mücke am Tag 17. Die Abb. fasst die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten zusammen (> 20.000 Mitteldarmsporozoiten / infizierter Mücke). WT: 13.000 \pm 8.800, *uos3(-)*: 590 \pm 480.

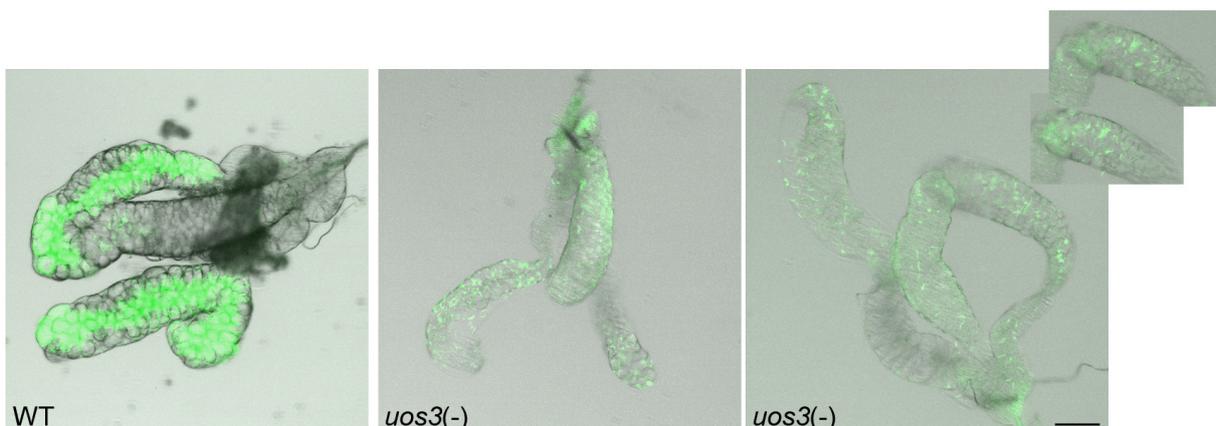


Abb. 3.42 *uos3(-)* Sporozoiten sind bei der Invasion der Speicheldrüsen beeinträchtigt
Speicheldrüsen infizierter WT und *uos3(-)* Mücken wurden 17 Tage nach der Blutmahlzeit herauspräpariert und mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Im Vergleich zur WT Population befinden sich deutlich weniger *uos3(-)* Sporozoiten in den Speicheldrüsen. Durchfokussieren der Speicheldrüsenlappen lokalisiert die Sporozoiten innerhalb des Organs. — 50 μ m.

3.3.9.1 Die Übertragung von *uos3(-)* Speicheldrüsensporozoiten auf den Säugetierwirt ist beeinträchtigt

Um zu verifizieren, ob *uos3(-)* Sporozoiten die Speicheldrüsen wirklich invadieren, oder lediglich an der Oberfläche adherieren, wurden Parasiten-Transmissions-Versuche durchgeführt. Hierfür wurden maximal fünf WT und *uos3(-)* infizierte *An. stephensi* Mücken 17 Tage nach der Blutmahlzeit erneut an naiven Sprague/Dawley-Ratten (SD) gefüttert, die besonders suszeptibel für *Plasmodium*-Sporozoiten sind. Die Parasitämie der Tiere wurde täglich bis zu 14 Tage nach der Infektion mit Blutaussstrichen untersucht.

Bei den *uos3(-)* infizierten Tieren bildete sich die Blutstadien-Infektion entweder signifikant verzögert oder in 5 von 11 Fällen überhaupt nicht aus (Abb. 3.43). Dieses Ergebnis bestätigt, dass *uos3(-)* Sporozoiten die Speicheldrüsen invadieren (erfolgreiche Transmission in 6 Fällen), der Anteil der invadierten Sporozoiten aber teilweise für die Ausbildung einer Infektion zu gering ist.

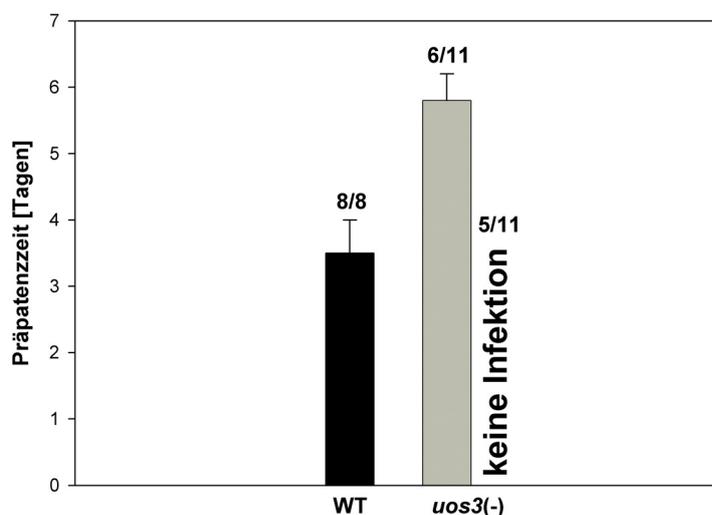


Abb. 3.43 Blutstadien-Infektion bei *uos3(-)* Fütterungsversuchen bildet sich verzögert oder gar nicht aus

Von fünf Mücken saugten im Schnitt 2,8 der WT infizierten und 3,4 der *uos3(-)* infizierten an jeweils einer naiven SD-Ratte. Das Auftreten erythrozytärer Stadien (Präpatenzzeit) wurde täglich mit Blutaussstrichen und anschließender Giemsa-Färbung kontrolliert. Die Abb. fasst die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten zusammen.

WT: 8 Ratten Tag $3,5 \pm 0,5$;
uos3(-): 11 Ratten, 5 davon negativ, 6 Ratten Tag $5,8 \pm 0,4$

3.3.9.2 Die *uos3(-)* Sporozoiten akkumulieren in der Hämolymphe

Von rund 42.000 Mitteldarmsporozoiten invadieren lediglich 600 die Speicheldrüsen von der *uos3(-)* Population (Abschnitt 3.3.9). Normalerweise erreicht rund ein Drittel der Mitteldarmsporozoiten die Speicheldrüsen.

Um herauszufinden, was mit der großen Mehrheit der *uos3(-)* Sporozoiten passiert, wurden Hämözölsporozoiten an Tag 15 bzw. 16 nach der Blutmahlzeit WT und *uos3(-)* infizierter *An. stephensi* Mücken aus deren offener Leibeshöhle isoliert und ihre Anzahl bestimmt.

Die Gesamtzahl der Hämözölsporozoiten pro infizierter Mücke ist bei der *uos3(-)* Population signifikant erhöht ($p < 0.038$, Abb. 3.44). Verdeutlicht wird die Akkumulation der *uos3(-)* Sporozoiten im Hämözöl in Abb. 3.45. Hier wurden Hämözölsporozoiten separat an Tag 15 und 16 nach der Blutmahlzeit isoliert und quantifiziert. Während bei der WT Population die Hämözölsporozoitenzahl pro infizierter Mücke in etwa konstant bleibt, ist sie bei der *uos3(-)* Population im Vergleich schon deutlich erhöht und steigt von Tag 15 auf 16 noch weiter an.

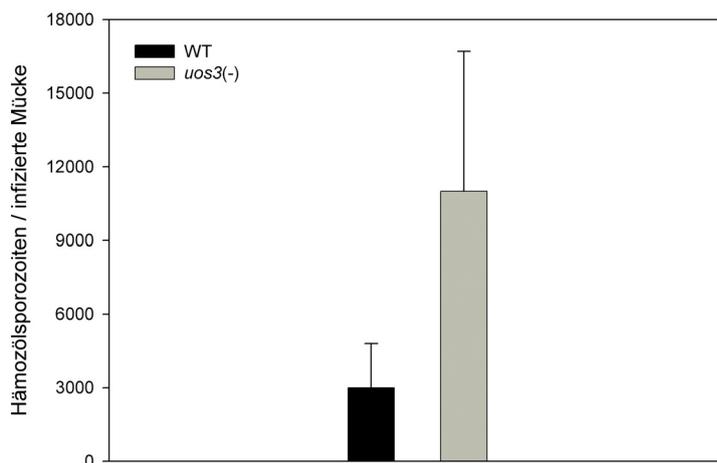


Abb. 3.44 Signifikanter Anstieg der *uos3(-)* Sporozoiten im Hämözöl infizierter Mücken

Gezeigt ist die Anzahl der *uos3(-)* und WT Hämözölsporozoiten pro infizierter Mücke, isoliert an Tag 15 oder 16. Die Abb. fasst die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Exp. zusammen (> 20.000 Mitteldarmsp./infizierte Mücke). WT: 3.000 ± 1.800 ; *uos3(-)*: 11.000 ± 5.700

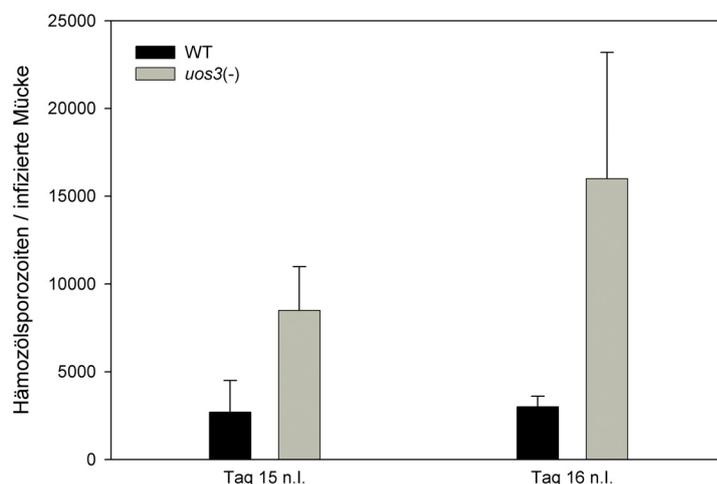


Abb. 3.45 Gradueßer Anstieg der *uos3(-)* Hämözölsporozoiten von Tag 15 auf 16

Gezeigt ist die Anzahl der *uos3(-)* und WT Hämözölsporozoiten pro infizierter Mücke, separat isoliert an Tag 15 und Tag 16 nach der Infektion (n.I.). Die Abb. fasst die Ergebnisse aus drei unabhängigen Exp. zusammen. WT: 2.700 (Tg15), 3.000 (Tg16); *uos3(-)*: 8.500 (Tg15), 16.000 (Tg16)

3.3.9.3 Der Entwicklungsverlauf ist auch bei *uos3(-)* Klon II-3 identisch

Als zusätzliche Verifizierung der bisherigen Ergebnisse wurde der Lebenszyklus eines weiteren *uos3(-)* Klons (II-3) in der Mücke durch Quantifizierung der Sporozoitenzahlen analysiert.

Die Daten wurden bestätigt. Während die Gesamtzahl der Mitteldarmsporozoiten pro infizierter Mücke in der WT und *uos3(-)* Population nahezu identisch sind, steigt sie bei den *uos3(-)* Hämozölsporozoiten drastisch an und sinkt bei den Speicheldrüsenporozoiten stark ab im Vergleich zu den entsprechenden WT Sporozoiten (Abb. 3.46).

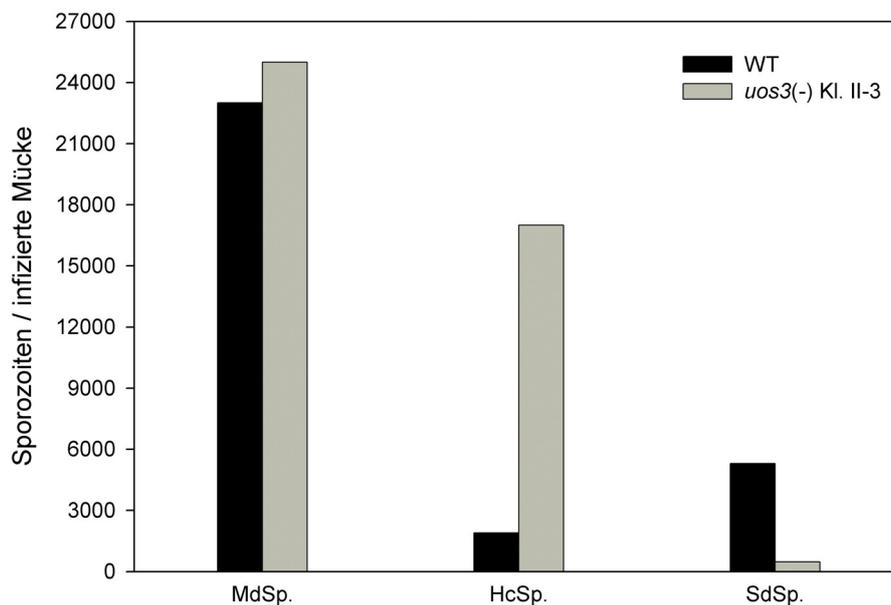


Abb. 3.46 Entwicklungsverlauf des *uos3(-)* Klons II-3 in *An. stephensi*

Mitteldarmsporozoiten (MdSp.) wurden am Tag 14, Hämozölsporozoiten (HcSp.) am Tag 16 und Speicheldrüsenporozoiten (SdSp.) am Tag 17 nach der Blutmahlzeit WT und *uos3(-)* Kl. II-3 infizierter *An. stephensi* Mücken isoliert. Dargestellt ist die jeweilige Sporozoitenzahl pro infizierter Mücke. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. WT: 23.000 (MdSp.), 1.900 (HcSp.), 5.300 (SdSp.); *uos3(-)* Kl. II-3: 25.000 (MdSp.), 17.000 (HcSp.), 470 (SdSp.).

3.3.9.4 *uos3(-)* Sporozoiten sind in ihrer *gliding motility* eingeschränkt

Sporozoiten von *Plasmodium* besitzen eine einzigartige Form der Fortbewegung, die als *gliding motility* bezeichnet wird (Vanderberg, 1974). Dabei bildet der Parasit Liganden-Rezeptor-Komplexe mit dem Substrat aus, auf dem er sich fortbewegt, und hinterlässt eine Spur von Oberflächenproteinen, die mit Hilfe von Antikörpern angefärbt werden kann.

Noch ist unklar, wie die Sporozoiten im Hämözöl der Mücke die Speicheldrüsen erreichen und anschließend invadieren; ob sie passiv mit der Hämolymphe zu den Speicheldrüsen getragen werden oder wie neuere *in vitro* Studien gezeigt haben, aktiv durch Chemotaxis von den Speicheldrüsen angelockt werden können (Akaki und Dvorak, 2005).

Um die Funktionalität der *uos3(-)* Hämözölsporozoiten durch Analyse des Bewegungsverhaltens zu untersuchen, wurden jeweils 10.000 Sporozoiten von *uos3(-)* und WT Parasiten auf eine BSA-beschichtete Oberfläche gegeben. Die beim Gleiten gebildete Spur wurde mittels Immunofluoreszenz sichtbar gemacht. Die Gesamtzahl der Sporozoiten nach der Antikörperfärbung wurde ausgezählt und davon der Anteil gleitender Sporozoiten ermittelt. Für die Quantifizierung wurde ein Sporozoit als gleitend erachtet, wenn seine Spur einen ganzen Kreis beschrieben hat.

Die WT Parasiten liegen mit einem Anteil von 55% gleitender Sporozoiten im Durchschnitt (Abb. 3.47). Hämözölsporozoiten gleiten im allgemeinen etwas weniger gut als Speicheldrüsenporozoiten (bis zu 85%, Sultan et al., 1997). Die *uos3(-)* Sporozoiten dagegen zeigen eine dramatische Reduktion in ihrer *gliding motility*. Nur 3% zeigen Bewegungsmuster, wobei die Gleitspuren nicht durchgängig sind (Abb. 3.48). Die große Mehrheit ist unbeweglich.

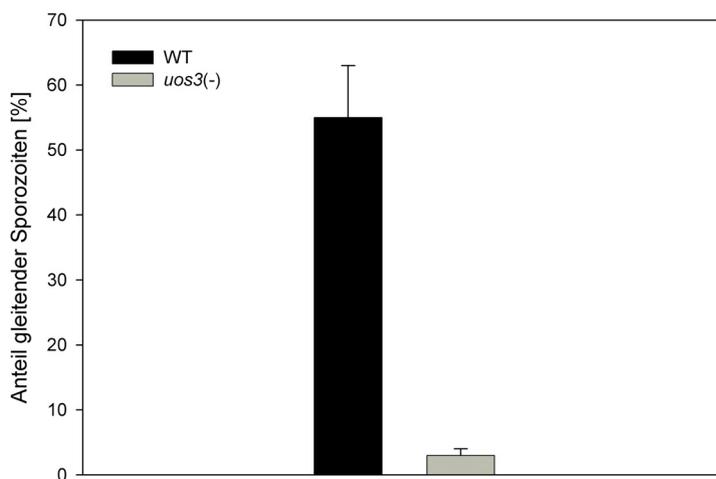


Abb. 3.47 *uos3(-)* Hämözölsporozoiten gleiten signifikant weniger als WT Parasiten

Ausgehend von 10.000 Hämözölsporozoiten wurde die Gesamtzahl der Sporozoiten nach der Antikörperfärbung bestimmt und der Anteil gleitender Sporozoiten in % ausgedrückt. Die Abbildung fasst die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten zusammen.

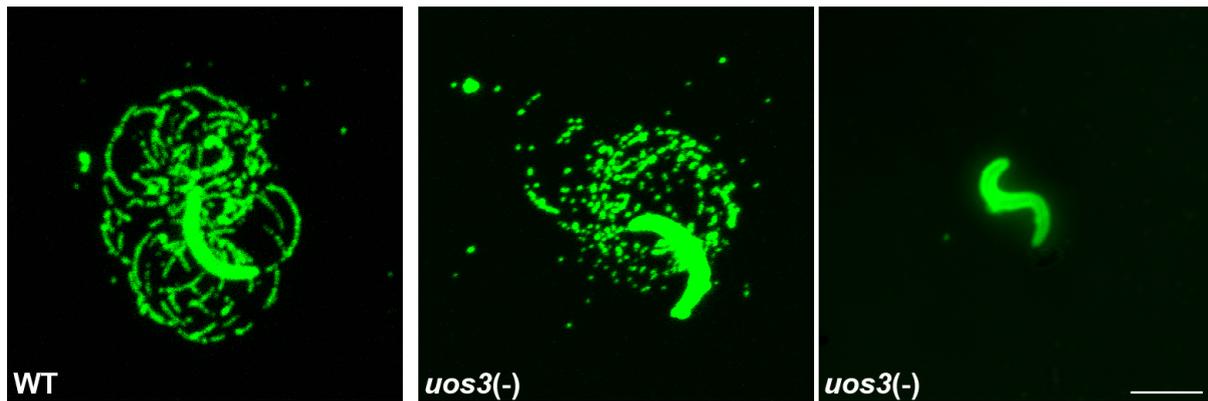


Abb. 3.48 *uos3(-)* Hämozytosporen sind in ihrer *gliding motility* beeinträchtigt
 Hämozytosporen WT und *uos3(-)* infizierter *An. stephensi* Mücken wurden am Tag 16 nach der Blutmahlzeit isoliert, auf eine BSA-beschichtete Oberfläche gegeben, die beim Gleiten gebildete Spur von Oberflächenproteinen mittels CS-Antikörper detektiert und durch Immunofluoreszenz sichtbar gemacht. Der WT zeigt das typische zirkuläre Gleitmuster; bei *uos3(-)* Sporozoiten ist dieses entweder bruchstückhaft oder gar nicht vorhanden. — 5 μ m

3.3.9.5 Analyse der *gliding motility* im Phasenkontrast-Mikroskop bestätigen die IFA-Ergebnisse

Um Artefakte bei der Immunofluoreszenzfärbung der Gleitspuren ausschließen zu können, wurde das Bewegungsverhalten von Hämozyt- und Speicheldrüsenporozoiten im Phasenkontrast-Mikroskop unter Echtzeit-Bedingungen untersucht. Hierfür wurden Hämozytosporen am Tag 16 nach der Blutmahlzeit WT und *uos3(-)* infizierter *An. stephensi* Mücken isoliert bzw. Speicheldrüsenporozoiten am Tag 17. Die Parasiten wurden in einem möglichst kleinem Volumen auf Glas-Objektträger überführt und ihnen 10 Minuten Zeit zum Anheften gegeben. Da sich die *uos3(-)* Sporozoiten selbst nach 30 Minuten noch nicht abgesetzt hatten, musste bei ihnen auf Polylysin-beschichtete Glas-Objektträger zur besseren Haftung zurückgegriffen werden.

Die Abb. 3.49 fasst die verschiedenen Bewegungsformen von WT und *uos3(-)* Sporozoiten zusammen. Die große Mehrheit der WT Hämozyt- und Speicheldrüsenporozoiten zeigte, wie im IFA auch, das typische zirkuläre Gleitverhalten. Die wenigen WT Sporozoiten, die davon abwichen, waren entweder unbeweglich oder wiesen Bewegungsmuster wie Biegen und Strecken auf, die in keiner Fortbewegung der Zelle resultierten (Vanderberg, 1974).

Im Gegensatz dazu führten über 90% der *uos3(-)* Hämozyt- und Speicheldrüsenporozoiten unproduktive Bewegungsformen aus. Die Parasiten waren entweder lediglich mit einem Zellpol an der Substrat-Oberfläche adhäriert (Abb. 3.49 b-1), zeigten nur ansatzweise

zirkuläre Bewegungen, die jedoch nicht vollständig ausgeführt werden konnten (Abb. 3.49 b-2) oder wiesen vollkommen unkoordinierte Bewegungsabläufe auf (Abb. 3.49 b-3).

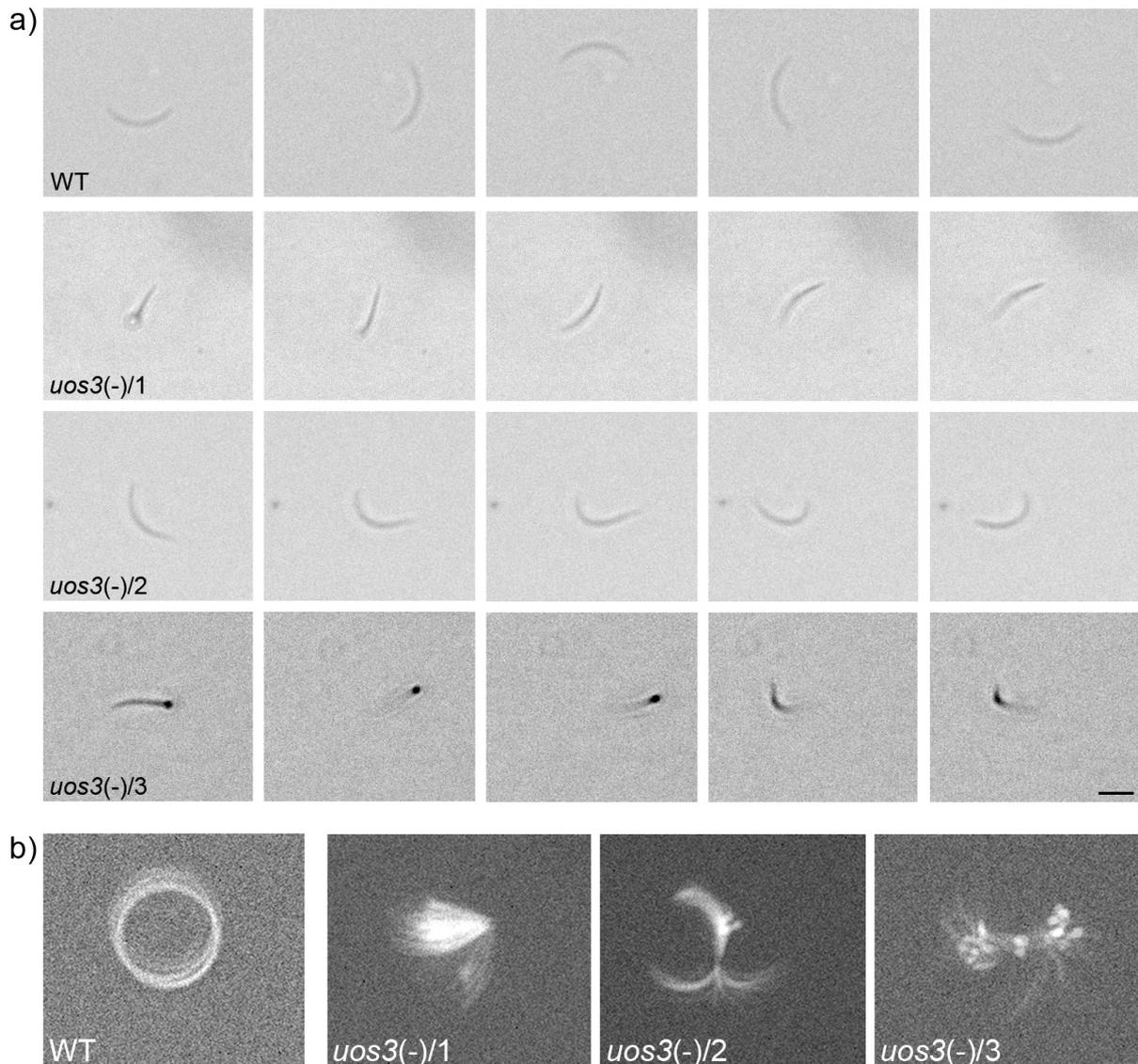


Abb. 3.49 Zeitraffer-Aufnahmen von *uos3(-)* und WT Sporozoiten in 3 sek Intervallen

a) Dargestellt sind die Zeitraffer-Aufnahmen von gleitenden *uos3(-)* und WT Sporozoiten auf Polylysin-beschichteten bzw. einfachen Glas-Objektträgern im Phasen-Kontrast-Mikroskop. Die Aufnahmen erfolgten in 3 sek Intervallen; zwischen jedem ausgewählten Bild liegen 18 sek. Abb. b) stellt alle Bildsequenzen eines Films übereinandergelegt dar und zeichnet somit den Bewegungsablauf des Parasiten nach; — 5 μ m.

3.3.10 Invasionsverhalten der *uos3(-)* Sporozoiten im Säugetierwirt

Sporozoiten sind die einzigen Stadien innerhalb des Lebenszyklus von *Plasmodium*, welche in der Lage sind, zwei vollkommen unterschiedliche Wirtsorgane zu invadieren – die Speicheldrüse der Mücke und die Leber des Säugetiers.

Die Versuche aus Abschnitt 3.3.9 haben bereits gezeigt, dass nur ein geringer Anteil der *uos3(-)* Sporozoiten fähig ist, in die Speicheldrüsen der Mücke einzudringen. In diesem Abschnitt soll nun das Invasionsverhalten von *uos3(-)* Sporozoiten im Säugetier analysiert werden.

Aufgrund der begrenzten Anzahl verfügbarer *uos3(-)* Speicheldrüsen Sporozoiten, wurden die nachfolgenden Experimente mit Hämözölsporozoiten durchgeführt. Die Untersuchungen der *gliding motility* von *uos3(-)* Hämözöl- und Speicheldrüsen Sporozoiten unter Echtzeit-Bedingungen aus Abschnitt 3.3.9.5 ließen keine Unterschiede im Bewegungsverhalten der beiden Sporozoitenstadien erkennen. Desweiteren zeigten *uos3(-)* Speicheldrüsen Sporozoiten aus gemeinsamen Fütterungsversuchen sowohl eingeschränkte Motilität im Phasenkontrast-Mikroskop, als auch eine verzögerte Infektivität bei SD Ratten im Rahmen von Parasiten-Transmissions-Fütterungen (Abschnitt 3.3.9.1). Dies bestätigt die Annahme, dass sowohl *uos3(-)* Sporozoiten mit normalem als auch unproduktiven Bewegungsmuster die Speicheldrüsen der Mücke erfolgreich invadieren können. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden Hämözölsporozoiten anstelle von Speicheldrüsen Sporozoiten für die Experimente im Säugetierwirt verwendet.

3.3.10.1 Eingeschränktes Invasionsverhalten der *uos3(-)* Hämözölsporozoiten bei Hepatozyten *in vitro*

Gliding motility und der Eintritt in die Wirtszelle beruhen auf den selben molekularen Mechanismen (Kappe et al., 2003). Die vorangegangenen Experimente aus Abschnitt 3.3.9 haben bereits gezeigt, dass das eingeschränkte Bewegungsverhalten der *uos3(-)* Hämözölsporozoiten mit einer dramatischen Reduktion der Sporozoitenzahlen in den Speicheldrüsen der Mücke einhergeht.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob UOS3 auch für die Invasion der Leber im Säugetier notwendig ist. Hierfür wurden zwei *in-vitro*-Ansätze verfolgt: zum einen wurde das unmittelbare Invasionsverhalten der *uos3(-)* Hämözölsporozoiten bei kultivierten Hepatozyten 90 Minuten nach gemeinsamer Inkubation analysiert. Dies geschah mit Hilfe einer auf zwei unterschiedlichen Immunofluoreszenz-Signalen basierenden Färbung von intra- und extra-

zellulären Sporozoiten, durch die das Verhältnis der internalisierten zu den außenliegenden Parasiten bestimmt werden konnte. Zum anderen wurde im nachfolgenden Abschnitt 3.3.10.2 die Anzahl der letztendlich erfolgreich infizierten Hepatozyten zwei Tage nach der Invasion ermittelt.

Wie aus Abb. 3.50 hervorgeht, ist die Anzahl der in die Zellen eingedrungenen Parasiten bei der *uos3(-)* Population deutlich geringer als beim WT. Im Vergleich dazu sind mehr *uos3(-)* Sporozoiten außerhalb der Hepatozyten, während der Anteil an Sporozoiten, die sich halb innerhalb, halb außerhalb einer Zelle befinden, bei beiden Populationen in etwa identisch ist. Auffällig bei diesem Versuch war, dass bei den *uos3(-)* Parasiten deutlich weniger Sporozoiten adhiert hatten. Während für die Auswertung der Invasionsstudie bei der WT Population jeweils 100 Parasiten pro *well* eines *chamberslides* ausgezählt wurden, musste bei der *uos3(-)* Population ein *chamberslide* vollständig ausgezählt werden, um auf 100 Parasiten zu kommen. Eine genaue Quantifizierung der Parasitenzahlen war jedoch nicht möglich, da sich aufgrund der vielen Waschschriffe bei der zweifachen Immunofluoreszenzfärbung zahlreiche Hepatozyten wieder abgelöst hatten.

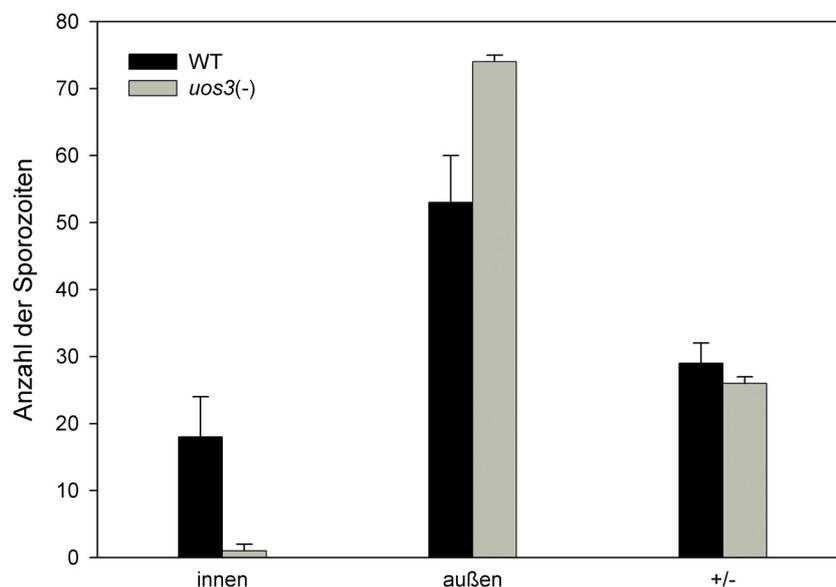


Abb. 3.50 Invasionsstudie von *uos3(-)* Hämozölsporozoiten bei Hepatozyten *in vitro*

Dargestellt ist die Anzahl an invadierten Sporozoiten (innen), nicht-invadierten (außen) und Sporozoiten, die sich halb in, halb außerhalb der Hepatozyten-Zelle (+/-) 90 Minuten nach der *in vitro* Infektion mit *uos3(-)* bzw. WT Hämozölsporozoiten befinden. Bei WT wurden jeweils 100 Parasiten pro *well*, und je zwei *wells* von zwei *chamberslides* ausgezählt und der Mittelwert errechnet (innen: 18; außen: 53; +/-: 29). Aufgrund der deutlich geringeren Anzahl adhaerierter *uos3(-)* Parasiten konnten hier jeweils nur 100 Parasiten pro *chamberslide* (von insgesamt zweien) ausgezählt und analysiert werden (innen: 1; außen: 74; +/-: 26).

3.3.10.2 Reduzierte Infektivität von *uos3(-)* Hämozölsporozoiten bei Hepatozyten *in vitro*

Durch die Blutmahlzeit der Mücke gelangen die Speicheldrüsen Sporozoiten in den Säugetierwirt. Dort befallen sie innerhalb kürzester Zeit die Leberzellen und durchlaufen ein Stadium der Schizogonie, bei dem sie als exo-erythrozytäre Formen (EEF) oder Leberstadien vorliegen. Mit dem sog. Hepatozyten-Invasions-Assay können diese Stadien *in vitro* durch Antikörperfärbung analysiert werden (Frevert et al., 1996).

Für das Experiment wurden *uos3(-)* und WT Hämozölsporozoiten in verschiedenen Konzentrationen auf eine subkonfluente, definierte Schicht an Hepatozyten gegeben. Nach Ablauf einer festen Zeitspanne wurden die Leberstadien mit Antikörperfärbung detektiert und anschließend durch Immunofluoreszenz-Analyse ausgezählt.

Die *uos3(-)* Hämozölsporozoiten zeigen in allen drei Konzentrationen eine signifikante Reduktion der Infektivität. Bei der Injektion von 1.000 Sporozoiten hat sich nicht ein einziger Sporozoit zur exo-erythrozytären Form in den Hepatozyten weiterentwickelt (Tab. 3.6, Abb. 3.51).

Parasiten- population	Anzahl der Hämozöl- sporozoiten	Anzahl der Leberstadien (EEFs)
WT	100.000	778 ± 571
	10.000	83,2 ± 40,3
	1.000	8 ± 5,3
<i>uos3(-)</i>	100.000	19,8 ± 13,8
	10.000	2,6 ± 1,5
	1.000	0 ± 0

Tab. 3.6: Leberstadien-Entwicklungs-Assay von *uos3(-)* Hämozölsporozoiten *in vitro*

Je 100.000, 10.000 und 1.000 *uos3(-)* und WT Hämozölsporozoiten wurden zu einer konstanten Anzahl an Hepatozyten gegeben und die Zahl der infizierten Hepatozyten (EEFs) nach 48 Std. bestimmt. Die Tabelle fasst die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten zusammen.

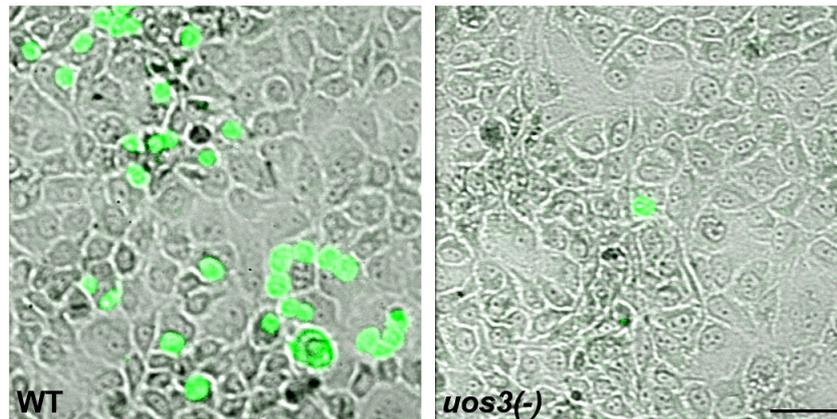


Abb. 3.51 Infektivität von *uos3(-)* und WT Hämozölsporozoiten in kultivierten Hepatozyten

10.000 Hämozölsporozoiten von *uos3(-)* und WT-infizierten *An. stephensi* Mücken wurden am Tag 16 nach der Blutmahlzeit isoliert und zu einer subkonfluenten, einlagigen Zellschicht an Hepatozyten gegeben. 48 Stunden nach der Invasion wurden die Leberstadien durch Detektion des Hitzeschockproteins (HSP) 70 des Parasiten sichtbar gemacht und mittels Immunfluoreszenz ausgezählt. — 50 μ m

3.3.10.3 Reduzierte Infektivität von *uos3(-)* Hämozölsporozoiten bei jungen SD-Ratten *in vivo*

Um die Infektivität von *uos3(-)* Hämozölsporozoiten auch unter *in vivo* Bedingungen zu testen, wurden je 100.000, 10.000 oder 1.000 Sporozoiten intravenös in naive SD-Ratten injiziert, die eine hohe Suszeptibilität für *Plasmodium*-Sporozoiten aufweisen. Durch tägliche Blutausrich bis zu 14 Tage nach der Injektion wurde die Parasitämie der infizierten Tiere untersucht.

Für 100.000 und 10.000 Hämozölsporozoiten konnte kein signifikanter Unterschied in der Präpatenzzeit von WT und *uos3(-)* infizierten Ratten ermittelt werden (Abb. 3.52). Bei 1.000 injizierten *uos3(-)* Hämozölsporozoiten bildete sich jedoch keine Blutstadien-Infektion aus. Lediglich in einem von zehn Tieren wurden an Tag 5 Blutstadien im Ausstrich detektiert.

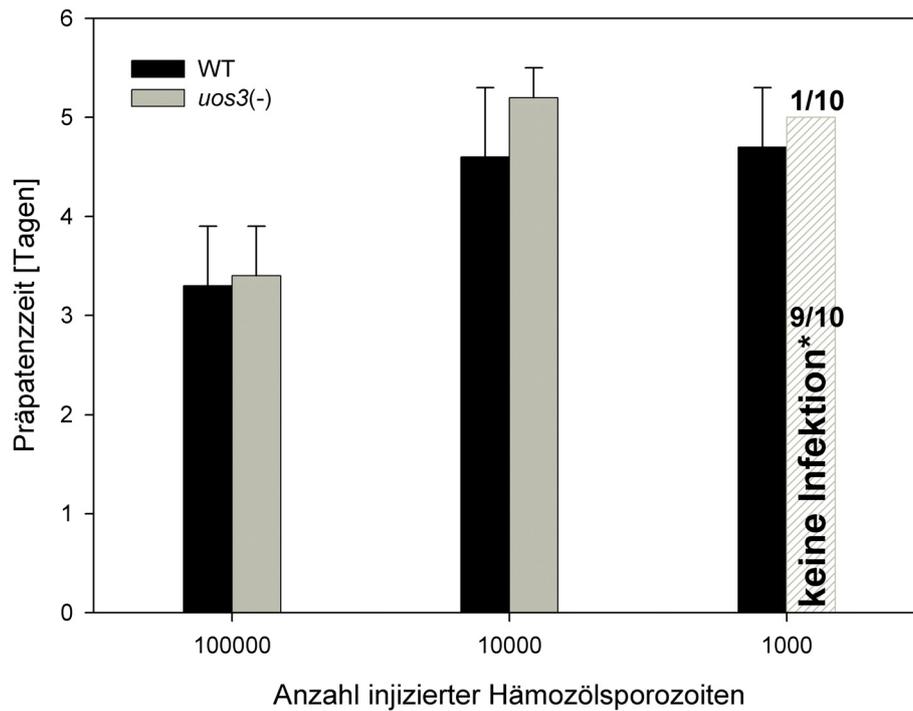


Abb. 3.52 Infektivität von *uos3(-)* Hämozölsporozoit in jungen SD-Ratten *in vivo*

Je 100.000, 10.000 und 1.000 Hämozölsporozoit aus WT und *uos3(-)* infizierten *An. stephensi* Mücken wurden isoliert und intravenös in junge SD-Ratten injiziert. Das Auftreten von erythrozytären Stadien wurde täglich durch Blutausschrie mit anschließender Giemsa-Färbung kontrolliert (Präpatenzzeit). Die Abbildung fasst die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten zusammen. Die Tierzahlen setzen sich wie folgt zusammen: 100.000 Sporozoit - 3 (WT), 5 (*uos3(-)*); 10.000 Sporozoit – jeweils 8 und 1.000 Sporozoit – jeweils 10. *Nur in einem von 10 Tieren bildete sich eine Blutstadien-Infektion bei 1.000 injizierten *uos3(-)* Hämozölsporozoit nach 5 Tagen aus.

4. Diskussion

4.1 Teil I

In *An. gambiae* existieren nach derzeitigem Wissensstand zwei verschiedene Immunreaktionen gegen Mitteldarm-invadierende *Plasmodium*-Parasiten: Lyse und Melanisierung. Der für *Plasmodien* refraktäre L3-5 Stamm von *An. gambiae* wurde auf seine Fähigkeit hin, Mitteldarmstadien des Malaria-Erregers vollständig zu melanisieren, genetisch selektioniert (Collins et al., 1996). Die Parasiten werden hierbei im subepithelialen Raum zwischen Mitteldarmzellschicht und äußerer Basallamina melanisiert, der von Hämolymphe umgeben, von den Hämozyten - den Blutzellen der Insekten – jedoch abgegrenzt ist (Abb. 3.1). Auch der suszeptible G3 Stamm von *An. gambiae* kann durch *gene-silencing* von *CTL-MA2* in einen partiell refraktären Stamm umgewandelt werden, der 53% der normalerweise durchkommenden Parasiten melanotisch einkapselt (Osta et al., 2004; Abb. 3.3). Da die Melanisierungsreaktion im L3-5 und dem durch RNA-Interferenz modifizierten G3/dsCTL-MA2 Stamm einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund haben kann, war es notwendig, die funktionelle Charakterisierung der PPOs durch *in vivo* RNAi-Studien in beiden Stämmen vorzunehmen.

Im Mittelpunkt stand die Frage, ob und welche der neun *An. gambiae* PPOs an der Melanisierungsreaktion beteiligt sind. Zudem galt es zu klären, ob Melanisierung die *Plasmodien* auch tötet. Eingehende Untersuchungen der Morphologie und zeitlichen Dynamik der Ookineten während der Invasion im refraktären L3-5 Stamm haben Blandin et al. (2004) zu der Schlussfolgerung veranlasst, dass die Tötung der Parasiten durch TEP-1 vermittelt und durch bisher unbekannte Komponenten ausgeführt wird. Erst nachfolgend soll Lyse oder Melanisierung einsetzen, um die toten Zellkörper aus dem Gewebe zu beseitigen. Lange Zeit galt Melanisierung als effektive Immunantwort, um Pathogene durch Einschleusen in einer Melaninkapsel verhungern und ersticken zu lassen (Chen und Chen, 1995) oder durch toxische, reaktive Sauerstoffintermediate umzubringen (Gillespie et al., 1997; Nappi und Vass, 2001). Bisher konnte jedoch nur in der Mücke *Armigeres subalbatus* eine direkte Beteiligung der humoralen Melanisierung beim Töten von Pathogenen (Mikrofilarien) mittels *PPO-antisense* RNA erfolgreich bestätigt werden (Shiao et al., 2001).

Die intrathorakale Injektion von dsRNA in Mücken ist eine etablierte Methode (Blandin et al., 2002), um die Expression einzelner Gene drastisch zu reduzieren. Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR haben bestätigt, dass eine effiziente (Abb. 3.6), und am Beispiel

von *PPO9* auch eine spezifische (Abb. 3.7), Herunterregulierung der *PPO*-Transkription möglich ist. Obwohl die Sequenzen der dsRNAs auf ihre Spezifität für das jeweilige *PPO*-Gen hin ausgewählt wurden, kann eine Kreuzreaktion einzelner dsRNAs untereinander jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, zumal die einzelnen *PPOs* untereinander eine sehr hohe Sequenzhomologie aufweisen und die dsRNAs in der Zelle zu 21 Nukleotid kurzen *small-interfering RNAs* (siRNAs) gespalten werden, die durch Anlagerung an die Zielsequenz letztendlich die Zerstörung der mRNA einleiten. Für die prinzipielle Klärung der Frage, ob *PPOs* an der Melanisierung beteiligt sind und Pathogene töten können, wären Kreuzreaktionen - aufgrund der technischen Beschränkungen bezüglich der dsRNA-Mengen (Abschnitt 3.1.4) - zunächst nicht unerwünscht.

Erschwerend bei den durch RNA-Interferenz vermittelten *PPO*-Knockdowns kommt die hohe Stabilität einiger *PPOs* hinzu (Abb. 3.8) sowie die konstitutive Expression einzelner *PPOs* in den entsprechenden Entwicklungsstadien der Mücke (Abschnitt 3.1.2.4). Wie aus Abb. 3.10 hervorgeht, muss die dsRNA ein bis zwei Tage vor Expressionsbeginn ihres jeweiligen Gens injiziert werden, um auch auf Translationsebene eine effiziente Herabregulierung zu bewirken. Von der daraus resultierenden zeitversetzten dsRNA-Injektion bei kombinierten Knockdowns anderer *PPOs* zusammen mit *PPO5* oder *6* in 4. Larvenstadium (ds*PPO5* oder *6*) und erneut in 1-Tage-alte Mücken (ds*PPOx*) wurde jedoch abgesehen. Die zweimalige Verletzung durch die Injektion führte sowohl in Versuchs- als auch Kontrollmücken des L3-5 Stammes zu einer sehr starken Schwächung der Mücken, einhergehend mit einer deutlich verkürzten Lebensdauer (Abschnitt 3.1.4). Stattdessen wurde im Falle von *PPO5*- und *6*-Knockdowns in adulten Mücken davon ausgegangen, dass die bis zur dsRNA-Injektion synthetisierte Proteinmenge für die Melanisierung eingesetzt und aufgebraucht wird, der Nachschub an Protein jedoch blockiert und die Melanisierungsfähigkeit somit beeinträchtigt wird.

Im genetisch veränderten G3/dsCTL-MA2 führten die Knockdown-Kombinationen *PPO1/4/6* und *PPO3/5/9* zu einer erheblichen Reduktion der Anzahl melanisierter Parasiten pro infizierter Mücke bei gleichzeitig steigender Oozystenanzahl (Abb. 3.12 und 3.17). Die Tatsache, dass sich im Gegensatz zur Kontrollgruppe mehr Parasiten zu Oozysten weiterentwickeln, spricht für eine direkte Beteiligung der *PPOs* am Tötungsprozess von *Plasmodium*-Parasiten im G3/dsCTL-MA2 Stamm von *An. gambiae* und unterstreicht ihre wichtige Funktion als „Immunproteine“.

Bei den getesteten Zweier- und Einzelknockdowns konnte nur bei *PPO4/6* ein deutlicher Rückgang bzw. bei hoher Infektionsrate (>300 Parasiten pro Mücke) ein dramatischer Einbruch der Melanisierung verzeichnet werden (Abb. 3.13), ebenso bei *PPO1* (Abb. 3.14). *PPO4*, 6, 3, 5 und 9 im Einzelknockdown sowie *PPO3/5* im kombinierten Knockdown bewirkten keine Veränderung des G3/dsCTL-MA2 Phänotyps (Abb. 3.15, 3.16, 3.19 – 3.21 und Abb. 3.18). Da nur *PPO1*, das aufgrund seiner Sequenzhomologie zu den *PPOs* höherer Dipteren als ursprünglich angesehen wird und im Gegensatz zu den anderen *PPOs* von *An. gambiae* auf dem rechten Arm des Chromosoms 2 lokalisiert ist (Abb. 1.7), als einziges *PPO*-Gen im Einzelknockdown Auswirkung auf die Melanisierung gezeigt hat, muss von einer hohen genetischen Redundanz der übrigen *PPOs* untereinander ausgegangen werden. Dies erschwert eine genaue Identifizierung einzelner *PPOs*, die maßgeblich an der Melanisierungsreaktion beteiligt sein könnten, erheblich.

Interessant wäre, wie sich das Melanisierungsverhalten der G3/dsCTL-MA2 Mücken in Abhängigkeit unterschiedlicher Knockdownkombinationen verändert. Es würde jedoch einen enormen Zeit- und Arbeitsaufwand bedeuten, alle statistisch möglichen Dreier- und Zweierknockdowns auszutesten und es bleibt fraglich, ob dadurch ein entscheidender Mehrertrag an Informationen erzielt werden kann.

Erstaunlich bei den RNAi-Studien im L3-5 Stamm war, dass die Ergebnisse nicht mit denen des Inhibitor-Experiments (Abschnitt 3.1.1.1) korrelierten. Anstelle lebender Oozysten (Abb. 3.4) konnte bei den kombinierten Knockdowns von *PPO1/4/6* und *PPO3/5/9* lediglich eine signifikant reduzierte Anzahl an melanisierten Parasiten pro infizierter Mücke beobachtet werden, jedoch keine lebenden Parasiten (Abb. 3.22 und 3.23).

Zweifelsohne können die Ergebnisse des PTU-Experiments in L3-5 kontrovers diskutiert werden. Kumar et al. (2003) haben gezeigt, dass hohe Mengen reaktiver Sauerstoffintermediate zum Melanisierungsphänotyp in L3-5 beitragen. Es kann deshalb nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die Reversion des L3-5 Phänotyps im PTU-Experiment ausschließlich auf eine vollständige Blockade aller *PPOs* zurückzuführen ist. Auch eine mögliche antioxidative Wirkung des Inhibitors muss in Betracht gezogen werden. Die Ergebnisse der Knockdownstudien in L3-5 belegen jedoch, dass auch die *PPOs* eine entscheidende Rolle spielen. Aufgrund der Tatsache, dass die *PPOs* durch RNA-Interferenz im Gegensatz zum Inhibitor nicht vollständig ausgeschaltet werden, könnten die verbleibenden *PPO*-Mengen immer noch zur Einkapselung eines Teils der *Plasmodien*

herangezogen werden, während die restlichen Parasiten durch einen anderen Mechanismus getötet werden.

Laut Blandin et al. (2004) werden in L3-5 100% der Ookineten, die das Mitteldarmepithelium überqueren, durch Lyse oder Melanisierung getötet bzw. beseitigt. Unter der Annahme, dass Lyse und Melanisierung direkt am Tötungsprozess der *Plasmodien* beteiligt sind, könnte folgendes Modell die Ergebnisse der Knockdown-Studien in L3-5 im Zusammenhang mit dem PTU-Experiment erklären: durch das *gene-silencing* von *PPOs* und der damit einhergehenden Beeinträchtigung der Melanisierungsfähigkeit, findet eine Verlagerung der Immunabwehr in Richtung Lyse statt; weniger Parasiten werden eingekapselt. Für eine Verlagerung des Melanisierungs-Lyse-Gleichgewichts spricht auch, dass die Gesamtzahl der Parasiten pro infizierter Mücke bei den PTU-behandelten L3-5 Mücken tendenziell geringer ist als in der Kontrollgruppe, wenn auch nicht signifikant (Tab. 3.1). Die Lyse-Reaktion kann vermutlich nur bis zu einem gewissen Grad das System abpuffern. Werden dem System, wie im Falle des PTU-Experiments, die *PPO*-Proteine gänzlich entzogen bzw. die Melanisierung vollkommen blockiert, können einige Parasiten die Immunbarriere des Mitteldarms durchbrechen und sich weiterentwickeln.

Die melanotische Einkapselung der Parasiten kann in verschiedenen Stämmen unterschiedlichen genetischen Kontrollen unterliegen, sowie aufgrund der physiologischen Gegebenheiten eine direkte oder indirekte Rolle in der Immunabwehr einnehmen. Im Falle des G3/dsCTL-MA2 Stamms spielen die *PPOs* eine essentielle Rolle bei der *Plasmodien*-Abwehr.

Eine dsRNA, welche die Genexpression aller *PPOs* gleichzeitig herunterreguliert, könnte die Frage eindeutig klären, ob *PPOs* die Parasiten in L3-5 töten oder die toten Zellkörper lediglich entfernen. Würden dieselben Ergebnisse wie beim Inhibitor erzielt, spräche das für eine direkte Beteiligung der *PPOs* am Tötungsvorgang. Fraglich ist, ob aufgrund des speziellen Expressionsmusters einiger *PPOs* (wie *PPO5* und *6*) sowie deren hoher Proteinstabilität ein vollständiger Knockdown mittels RNA-Interferenz überhaupt erreicht werden kann. Andere Methoden, die einen Knockout aller *PPO*-Gene unter der Kontrolle eines stadienspezifischen Promotors ermöglichen, sollten hierfür in Betracht gezogen werden.

4.2 Teil II

Malaria-Sporozoiten müssen die Speicheldrüsen der Mücke invadieren, um auf den Vertebratenwirt übertragen werden zu können. Dieser obligate Schritt eröffnet neue potentielle Angriffspunkte für die Malaria-Bekämpfung. Bisher fehlen jedoch genaue Kenntnisse über die Art der Wechselwirkung zwischen Sporozoiten und Speicheldrüsenzellen und deren beteiligten Komponenten. Vieles deutet daraufhin, dass die Invasion der Speicheldrüsen durch spezifische Rezeptor-Liganden-Interaktionen vermittelt wird (Touray et al., 1992; Barreau et al., 1995; Brennan et al., 2000; Myung et al., 2004).

Auffällig ist, dass die Sporozoiten zunächst präferentiell die distalen Regionen der lateralen Speicheldrüsenlappen und dann erst den medialen Lappen invadieren (Sterling et al., 1973; Rossignol et al., 1984; Pimenta et al., 1994; siehe auch Abb. 3.25). Aufgrund dieser Beobachtung wurde eine gegen den medialen Lappen subtrahierte cDNA-Bibliothek von *Anopheles gambiae* Speicheldrüsen erstellt, welche für die lateralen Lappen spezifisch ist, mit dem Ziel, Oberflächenproteine zu identifizieren, die am Invasionsprozess der Sporozoiten beteiligt sind.

Von 90 sequenzierten Klonen der cDNA-Bibliothek wurden sieben Gene bzw. Genfamilien identifiziert, deren Klone mehr als einmal im *Screen* auftraten und somit vermutlich verstärkt exprimiert sind (Tab. 3.3). Drei der Gene bzw. Genfamilien kodierten für Proteine mit Transmembrandomänen und waren aufgrund der potentiell einhergehenden Oberflächenspezifität von besonderem Interesse. Allem voran die *SGS*-Gene 4 und 5, deren Klone unter den drei Kandidaten insgesamt gesehen am häufigsten vertreten waren.

Laut Literatur besitzen die *SGS* Proteine darüber hinaus eine Heparin-Bindungsdomäne sowie die höchste Dichte an Tyrosin-Sulfatierungsstellen aller *An. gambiae* Proteine (Korochkina et al., 2006). Da CSP und TRAP, die Hauptoberflächenproteine von Sporozoiten, ebenfalls an Heparin binden und während der Leberinvasion mit Sulfokonjugaten interagieren (Frevert et al., 1993), macht sie das zu möglichen Rezeptorkandidaten für die Speicheldrüseninvasion der Sporozoiten.

Wie aussagekräftig ist jedoch der *Screen*? Wegen der geringen Größe der Speicheldrüsen erfordert es sehr viel Fingerspitzengefühl, die Organe sauber aus der Mücke herauszupäparieren und anschließend laterale und mediale Lappen voneinander zu trennen. Durch die Subtraktion sollte der Hintergrund zwar weitest gehend minimiert sein, falsch-positive Klone können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Für die Qualität der lateral-spezifischen cDNA-Bibliothek spricht die Identifizierung des *D7-r2* Gens. Arcà und Kollegen haben durch *in situ* Hybridisierung die spezifische Expression des Gens in den lateralen Lappen nachweisen können, nicht aber im medialen (Arcà et al., 1999; Abb. 3.26). Desweiteren wurden von der *SGS*-Genfamilie nur die Klone von *SGS4* und *SGS5* entdeckt. Die *SGS*-Familie umfasst aber 5 Gene – *SGS2*, 3, 4, 5 und ein putatives Pseudogen, das hohe Sequenzhomologie zu *SGS4* besitzt. Während *SGS2* und 3 im Thorax männlicher und weiblicher Mücken exprimiert sind, konnte eine *SGS4* und 5-Expression ausschließlich in Speicheldrüsen weiblicher Mücken nachgewiesen werden. (Korochkina et al., 2006). All dies spricht für eine hohe Spezifität der cDNA-Bibliothek.

Mittels RNA-Interferenz sollten *SGS4* und 5 herunterreguliert und ihre Funktion in *An. gambiae* analysiert werden. Semiquantitative RT-PCR konnte jedoch keine Reduktion der Genexpression von *SGS5* drei Tage nach dsRNA-Injektion detektieren (Abb. 3.27). Nachfolgend wurden die Zeitabstände zur Überprüfung der *SGS*-Transkript-Mengen kürzer gefasst, die dsRNA von *SGS4* getestet sowie die dsRNA-Mengen durch mehrmalige Injektionen hintereinander erhöht. Eine Herabregulierung der Genexpression als Folge der dsRNA-Injektion blieb allerdings aus.

Jüngste Forschungsergebnisse postulieren, dass *gene-silencing* in den Speicheldrüsen der Mücke größere dsRNA-Mengen erfordert als in anderen Geweben (Boisson et al., 2006). Auf der anderen Seite wurden bereits Knockdowns von Speicheldrüsenengen in *An. gambiae* unter Verwendung der gängigen Konzentrationen erfolgreich erzielt (Kristin Michel, persönliche Mitteilung). Entscheidend für die Herunterregulierung eines Gens durch RNA-Interferenz ist immer auch sein Expressionsstatus. Induzierte Gene lassen sich leichter ausschalten als Gene, die konstitutiv exprimiert werden, wie es bei *SGS4* und 5 der Fall ist.

Weitere RNAi-Studien mit fluoreszenzmarkierten *small-interfering* RNAs (siRNAs) für *SGS4* und 5 werden zeigen, ob die Moleküle von den Speicheldrüsenzellen aufgenommen werden, wie lange ihre Halbwertszeit ist und ob sie letzten Endes eine effiziente Herunterregulierung der *SGS*-Gene bewirken können.

4.3 Teil III *Plasmodium*

Das *UOS3* Gen von *Plasmodium berghei* wurde unabhängig voneinander im Rahmen zweier *transcriptional profilings* für prä-erythrozytäre Transkripte als Sporozoiten-spezifisches Gen identifiziert (Kaiser et al., 2004; Matuschewski et al., nicht publiziert). Es besitzt ein Ortholog in *Plasmodium falciparum* und kodiert für ein 260 kDa großes Transmembranprotein, welches die zytoplasmatische Domäne der TRAP-Familie am Carboxy-Terminus aufweist.

Genetische Deletionsstudien von *TRAP*, dem Gründungsmitglied der TRAP-Familien-Invasine von Apikomplexa-Parasiten, haben gezeigt, dass das Gen essentiell für die *gliding motility* sowie die Infektion der *Plasmodium*-Sporozoiten ist (Sultan et al., 1997). Entscheidend für die *gliding motility* ist hierbei die zytoplasmatische Domäne, die über Aldolase mit dem Aktin der Motormaschinerie des Parasiten verbunden ist (Buscaglia et al., 2003; Jewett und Sibley, 2003). TRAP-ähnliche Moleküle könnten somit zentrale Komponenten der Bewegungs- und Invasionsmaschinerie des Parasiten darstellen, die essentiell für einen erfolgreichen Infektionszyklus des Malaria-Erregers ist und weiterer Aufklärung der molekularen und zellulären Mechanismen bedarf.

Aufgrund der Identifikation von *UOS3* in einer gegen Merozoiten subtrahierten Sporozoiten-cDNA-Bibliothek (Kaiser et al., 2004) wurde der Schwerpunkt einer differenzierten Genexpressionsanalyse auf die in der Mücke relevanten *Plasmodium*-Entwicklungsstadien gesetzt.

Mittels semiquantitativer RT-PCR konnte die *UOS3*-Transkription nicht nur in den verschiedenen Sporozoiten-Stadien sondern auch im Ookineten nachgewiesen werden (Abb. 3.29). Die Genexpression ist in Ookineten und Mitteldarmsporozoiten am stärksten, nimmt bei den Hämozölsporozoiten stark ab und ist in Speicheldrüsenporozoiten kaum noch detektierbar. 33 PCR-Zyklen waren nötig, um überhaupt eine geringe Transkript-Menge nachweisen zu können (im Vergleich zu 28 Zyklen bei den anderen Proben).

Auffällig ist, dass die *UOS3* Proteinexpression zur Genexpression genau gegenläufig ist. Während die Konzentration des Proteins in Mitteldarmsporozoiten nur sehr gering ist, steigt sie bis zu den Speicheldrüsenporozoiten stark an (Abb. 3.30). Da auf Transkriptionsebene sowohl *CS* als auch *UOS3* bereits in Ookineten stark exprimiert werden (Abb. 3.29), aber nur für *CS* auch eine entsprechend hohe Proteinmenge in Mitteldarmsporozoiten detektiert wurde,

könnte die Ursache eine – durch eventuell bestimmte Faktoren – verzögerte Translation bei UOS3 sein, einhergehend mit einer hohen Stabilität des Proteins.

Aufgrund der Transmembrandomäne sowie der zytoplasmatischen Domäne der TRAP-Familie war bei UOS3 von einer zu TRAP ähnlichen Proteinlokalisierung auszugehen. Immunofluoreszenz-Analysen von Hämazölsporoziten mit polyklonalen Kaninchen Anti-UOS3 Antikörper bestätigten das Vorhandensein von UOS3 auf der Oberfläche des Parasiten (Abb. 3.31a). Wie TRAP (Rogers et al., 1992) ist UOS3 ungleichmäßig auf der Parasitenoberfläche verteilt, im Gegensatz zum CS Protein.

Um UOS3 funktionell zu charakterisieren, wurde das Gen mittels *Replacement*-Strategie in *P. berghei* inaktiviert (Ménard et al., 1997). Da das endogene Zielgen dabei vollständig durch den Selektionsmarker ersetzt wird (*replacement*; Abb. 3.32), ist diese Form der Genaktivierung wesentlich effizienter und stabiler als die Integrationsstrategie. Eine Reversion des mutierten Locus ist, bedingt durch das doppelte *Crossover*, nicht möglich. Allerdings stellt das doppelte *Crossover* ein statistisch äußerst seltenes Ereignis dar, so dass die Transfektion in der Regel mehrmals wiederholt werden muss. In diesem Fall ist das gewünschte Integrationsereignis bei der Transfektion des b3D_REpl. Vektors gleich beim ersten Mal eingetreten. Die genotypische Analyse der beiden auf Pyrimethamin-Basis selektierten Parentalgenerationen sowie ihrer Transfermäuse mit spezifischen Primerkombinationen (Abb. 3.33) bestätigten den erfolgreichen Austausch des endogenen UOS3-Genlocus durch den Selektionsmarker (Abb. 3.34). Aus der anschließenden Klonierung der Parentalgeneration 1 (Tab. 3.5) gingen drei klonale *uos3(-)* Populationen hervor, die nachweislich das Zielkonstrukt integriert hatten und keine Pyrimethamin-resistenten Wildtyp-Parasiten enthielten (Abb. 3.36).

Zusätzliche Überprüfung der klonalen *uos3(-)* Parasiten auf Transkriptions- und Translationsebene bestätigten, dass weder das Gen (Abb. 3.37) noch das Protein (Abb. 3.38) exprimiert werden.

Im Mittelpunkt der phänotypischen Charakterisierung stand zunächst der Entwicklungsverlauf der *uos3(-)* Parasiten in der Mücke. Wegen des spezifischen Gen- und Proteinexpressionsprofils von UOS3 wurde der Fokus der Untersuchungen auf die Ausbildung und Entwicklung der Oozysten sowie der Mitteldarm- und Speicheldrüensporoziten gelegt. Weder qualitative Unterschiede in der Oozystenbildung noch quantitative in der Entwicklung der

Mitteldarmsporozoiten konnten festgestellt werden. Oozysten von *uos3(-)* und WT-Populationen waren einander identisch in Form und Größe 10 Tage nach der Infektion (Abb. 3.40) und die Anzahl der aus infizierten *An. stephensi* isolierten Mitteldarmsporozoiten pro Mücke lagen im Wertebereich der WT-Populationen (Abb. 3.39).

Dagegen zeichneten sich die Speicheldrüsenporozoiten der Knockout-Mutante durch eine verminderte Invasionsfähigkeit der Speicheldrüsen aus. Die Anzahl der Speicheldrüsenporozoiten pro infizierter Mücke waren signifikant reduziert im Vergleich zu den WT-Parasiten ($p < 0,031$; Abb. 3.41 und 3.42).

Die erfolgreiche Übertragung von *uos3(-)* Speicheldrüsenporozoiten auf junge SD-Ratten durch die Blutaufnahme infizierter Mücken (*by bite feeding*), die in 6 von 11 Fällen in einer verzögerten Blutstadieninfektion resultierte (Abb. 3.43), bestätigte, dass die Knockout-Parasiten die Speicheldrüsen der Mücke tatsächlich invadieren und nicht nur auf der Oberfläche adherieren.

Normalerweise invadieren etwa ein Drittel der Mitteldarmsporozoiten letztendlich die Speicheldrüsen der Mücke. Bei den *uos3(-)* Parasiten ist dieser Anteil drastisch reduziert. Was aber passiert mit der großen Mehrheit der Sporozoiten?

Die Isolierung und Quantifizierung der im Hämazöl befindlichen *uos3(-)* Sporozoiten an den Tagen 15 bis 16 nach der Infektion ergab eine signifikant erhöhte Anzahl pro infizierter Mücke im Vergleich zu den WT-Parasiten ($p < 0,038$, Abb. 3.44). Betrachtet man die Zahlen der Hämazölsporozoiten pro infizierter Mücke gesondert an den Tagen 15 und 16, stellt man einen starken Anstieg auf Seiten der *uos3(-)* Population fest, während die Anzahl der WT-Parasiten relativ konstant bleibt (Abb. 3.45). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die *uos3(-)* Sporozoiten aufgrund ihrer eingeschränkten Invasionsfähigkeit der Speicheldrüsen in der Hämolymphe der Mücke akkumulieren.

Der charakteristische Entwicklungsverlauf der *uos3(-)* Sporozoiten mit stark erhöhten Parasitenzahlen im Hämazölstadium und erheblich reduzierten im Speicheldrüsenstadium konnte auch beim *uos3(-)* Klon II-3 nachgewiesen werden (Abb. 3.46). Dies bestätigt noch einmal, dass die phänotypischen Veränderungen in der Knockout-Mutante wirklich auf das Fehlen des UOS3 Proteins zurückzuführen sind.

Für die Funktionalität der *uos3(-)* Sporozoiten war ihre Fähigkeit zu gleiten ausschlaggebend. Immunofluoreszenz-Analysen der beim Gleiten von Hämazölsporozoiten gebildeten Spuren sowie Untersuchungen der Bewegungsabläufe bei Hämazöl- und Speicheldrüsenporozoiten im Phasen-Kontrast-Mikroskop zeigten deutliche Defizite in der *gliding motility* der

Knockout-Parasiten. Lediglich bei 3% der *uos3(-)* Hämözölsporozoiten konnten Gleitspuren im IFA detektiert werden (Abb. 3.47) und selbst diese wichen mit ihrem unregelmäßigen Muster von den durchgängigen Kreisen der WT-Parasiten ab (Abb. 3.48). Die Hämözölsporozoiten der WT-Populationen lagen dagegen mit einem 55%-igen Anteil gleitender Parasiten im Durchschnitt dessen, was für dieses Entwicklungsstadium üblich ist. Auch die Analyse von Hämözöl- und Speicheldrüensporozoiten im Phasen-Kontrast-Mikroskop bestätigte eine drastische Reduktion der *gliding motility* bei den *uos3(-)* Parasiten im Vergleich zu den WT-Parasiten. Eine eingehende Quantifizierung war allerdings aufgrund der schwachen Fluoreszenz der GFP-exprimierenden *P. berghei* Parasiten bei beiden Populationen nicht möglich.

Die Mehrheit der *uos3(-)* Sporozoiten zeigten entweder ansatzweise zirkuläre Bewegungen, die jedoch nur zur Hälfte ausgeführt werden konnten, waren lediglich mit einem Zellpol an der Oberfläche adhäriert und nicht in der Lage, vollständig auf das Substrat abzusinken oder wiesen komplett unkoordinierte Bewegungsabläufe auf (Abb. 3.49a und b).

Zwar kann man diese Bewegungsmuster sporadisch auch bei WT-Sporozoiten neben den mehrheitlichen Kreisbewegungen oder gänzlich nicht-motilen Sporozoiten beobachten, aber nicht in einem solchen Ausmaß wie bei der *uos3(-)* Mutante.

UOS3 ist somit ein weiteres essentielles Protein, das neben TRAP (Sultan et al., 1997) bei der *gliding motility* von *Plasmodium*-Sporozoiten eine Rolle spielt.

Gliding motility und der Eintritt in die Wirtszelle sind mechanistisch miteinander verwandt (Kappe et al., 2003). In der Mücke konnte bereits erfolgreich demonstriert werden, dass der Knockout von *UOS3* zu einer verminderten Invasion der Sporozoiten in die Speicheldrüsen führt (siehe oben). Speicheldrüensporozoiten aus Fütterungen, die einerseits eingeschränkte Motilität im Phasen-Kontrast-Mikroskop zeigten, andererseits aber zu einer Infektion in SD-Ratten – wenn auch verzögert – führten, belegen, dass nicht nur die wenigen motilen *uos3(-)* Sporozoiten die Speicheldrüsen invadieren, sondern auch diejenigen, die unproduktive Bewegungsformen aufweisen.

Unklar bleibt, ob weniger *uos3(-)* Sporozoiten die Speicheldrüsen invadieren, weil sie aufgrund ihrer reduzierten Motilität diese nicht erreichen oder wegen eines Defekts in der Invasionsmaschinerie nicht in die Wirtszelle eindringen können. Generell geht man von einem passiven Transport der Sporozoiten zu den Speicheldrüsen über die zirkulierende Hämolymphe aus (Ménard, 2001). Jüngste *in vitro* Studien haben jedoch gezeigt, dass Sporozoiten durch die Sezernierung bestimmter Komponenten von den Speicheldrüsen

chemotaktisch angelockt werden können (Akaki und Dvorak, 2005). Vermutlich tragen sowohl die verminderte Gleitfähigkeit als auch ein Defekt in der Wirtszellinvasion zur geringeren Anzahl an *uos3(-)* Sporozoiten in den Speicheldrüsen bei.

Sporozoiten besitzen die einzigartige Fähigkeit, zwei komplett unterschiedliche Organe zu invadieren – die Speicheldrüse der Mücke und die Leber des Säugetiers. Dementsprechend konnte auch bei den Hepatozyten eine reduzierte Invasionsfähigkeit der *uos3(-)* Sporozoiten festgestellt werden. Die Infektivität der Knockout-Parasiten war bei jungen SD-Ratten *in vivo* sowie bei einer permanenten Hepatozyten-Zelllinie *in vitro* in Abhängigkeit von den jeweils eingesetzten Zahlen der *uos3(-)* Hämozytsporozoiten signifikant reduziert, bis dahingehend, dass sich bei 1.000 *uos3(-)* Sporozoiten keine exo-erythrozytären Formen (EEF) in den kultivierten Hepatozyten ausbildeten (Tab. 3.6) bzw. 9 von 10 SD-Ratten keine Blutstadien-Infektion etablierten (Abb. 3.52).

Das Verhältnis von intra- zu extrazellulären Sporozoiten 90 Minuten nach der Hepatozyteninvasion *in vitro* zeigte, dass sich deutlich weniger *uos3(-)* Hämozytsporozoiten in den Zellen, dafür aber mehr außerhalb befanden, im Vergleich zu den WT-Parasiten (Abb. 3.50). Die Anzahl der Parasiten, welche die Hepatozyten noch nicht vollständig invadiert hatten, war dagegen annähernd identisch. Bleibt die Frage, wie viele der unvollständig invadierten *uos3(-)* Sporozoiten letzten Endes bis in die Zelle vordringen und ob die Zahl der invadierten Hepatozyten dann mit der Anzahl ausgebildeter EEFs aus dem vorangegangenen Experiment übereinstimmt. Benötigen die *uos3(-)* Sporozoiten aufgrund ihrer verminderten Beweglichkeit mehr Zeit oder kann der Invasionsprozess eventuell gar nicht vollständig ausgeführt werden? Wiederholungen des Hepatozyten-Invasions-Assays, auch im Hinblick auf weitere Messpunkte, könnten mehr Aufschluß geben.

Auffällig bei diesem Versuch war, dass deutlich weniger *uos3(-)* Sporozoiten an die Hepatozyten adheriert hatten (Abschnitt 3.3.10.1). Während bei der WT-Population von einem *Chamberslide* je 100 Parasiten pro *well* ausgezählt wurden, musste bei der *uos3(-)* Population ein ganzer *Chamberslide* herangezogen werden, um auf identische Parasitenzahlen zu kommen. Eine quantitative Analyse war jedoch nicht möglich, da aufgrund der vielen Waschschriffe im Versuchsprotokoll am Ende keine durchgängige subkonfluente Hepatozytenschicht mehr geben war. Eine einfache Antikörperfärbung zur ausschließlichen Detektion der adherierten Parasiten würde dagegen die einlagige Zellschicht erhalten.

Auch die Beobachtung, dass *uos3(-)* Sporozoiten deutlich besser an Polylysin-beschichtete Objektträger anstelle einfacher Glas-Objektträger binden, deuten auf eine verminderte Adhäsionsfähigkeit hin und eine genaue Quantifizierung würde Gewissheit bringen.

Mit UOS3 wurde ein weiteres Protein der TRAP-Familie charakterisiert, das eine essentielle Funktion bei der *gliding motility* und Zellinvasion von *Plasmodium*-Sporozoiten ausübt und, damit verbunden, die Infektivität erheblich beeinflusst. Anhand der Mutante können weitere wichtige Aspekte des Bewegungs- und Invasionsverhaltens untersucht werden.

In Analogie zu *trap(-)* sind auch einige wenige *uos3(-)* Parasiten immer in der Lage, den Gendeffekt zu kompensieren und normales Gleitverhalten zu zeigen. Interessant wäre, ob durch mehrmaliges Durchlaufen des kompletten Lebenszyklus in Mücke und Nager der Selektionsdruck sich zugunsten der normal funktionierenden Knockout-Parasiten verschieben würde. Expressionsanalysen im hohen Durchsatzverfahren wie z.B. Microarrays könnten Aufschluss geben, welches oder welche Gene kompensatorisch hochreguliert wurde(n) und damit weitere Einblicke in das Zusammenwirken der Aktin-Myosin Motormaschinerie geben.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der Dissertationsarbeit wurden drei Projekte verfolgt, die sich mit den molekularen Mechanismen der *Plasmodium-Anopheles* Interaktionen beschäftigen.

1. Die melanotische Einkapselung von *Plasmodium*-Parasiten im Mitteldarm der *Anopheles gambiae* Mücke stellt eine effiziente Immunantwort dar, die den Lebenszyklus des Malaria-Erregers unterbrechen kann. Die Prophenoxidasen (PPOs) gelten als Schlüsselenzyme dieser Reaktion. Eine funktionelle Charakterisierung der neun PPOs von *An. gambiae* erfolgte durch die gezielte Herunterregulierung der Gene mittels RNA-Interferenz in der adulten Mücke, verbunden mit anschließenden Infektionsexperimenten. Für sechs *PPO*-Gene konnte unter bestimmten Knockdown-Voraussetzungen eine deutliche Reduktion der melanisierten Parasiten nachgewiesen werden. Interessanterweise hatte das *gene-silencing* in suszeptiblen und refraktären Mücken unterschiedliche Auswirkungen. Während der Rückgang der melanisierten Parasiten beim G3/dsCTL-MA2 gleichzeitig in einer steigenden Anzahl lebender Oozysten resultierte, führte die Reduktion der eingekapselten *Plasmodien* im refraktären L3-5 Stamm dagegen zu keiner erhöhten Überlebensrate.

2. Die Invasion der *Plasmodium*-Sporozoiten in die Speicheldrüse der Mücke ist entscheidend für die Übertragung auf den Säugetierwirt. Da Sporozoiten präferentiell die beiden lateralen Lappen der Speicheldrüsen und erst dann den medialen Lappen invadieren, wurde mittels subtraktiver cDNA-Hybridisierung eine lateral-spezifische cDNA-Bibliothek erstellt, um potentielle Speicheldrüsen-Rezeptoren zu identifizieren. Als mögliche Kandidaten wurden die Gene *SGS4* und *5* der *SGS*-Familie von *An. gambiae* beschrieben.

3. Sporozoiten sind die einzigen Stadien innerhalb des *Plasmodium*-Lebenszyklus, die in der Lage sind, zwei vollkommen unterschiedliche Organe zu invadieren – die Speicheldrüse der Mücke und die Leber des Säugetiers. Im dritten Teil der Arbeit stand die molekulare und funktionelle Charakterisierung des Sporozoiten-spezifischen *UOS3* Gens von *Plasmodium berghei* im Mittelpunkt. Genetische Deletionsstudien haben gezeigt, dass *UOS3* essentiell für die *gliding motility* und Zellinvasion der Sporozoiten in die Speicheldrüsen der Mücke und Hepatozyten des Säugetiers ist. Damit konnte erstmals neben dem Invasin TRAP ein weiteres Parasiten-Gen beschrieben werden, das zentrale Sporozoiten-Funktionen vermittelt.

6. Summary

Three projects are presented in this PhD thesis, which focus on the molecular interactions between the *Plasmodium berghei* parasite and its vector *Anopheles gambiae*.

1. The melanotic encapsulation of *Plasmodium* parasites in the midgut of *Anopheles gambiae* mosquitoes is a powerful immune response, which can interrupt the life cycle of the malaria parasite. Prophenoloxidasases (PPOs) are considered as key enzymes of this melanization reaction. Nine *PPO* genes in *An. gambiae* are known and were functionally characterized by RNA-interference. For six of these nine *PPOs* the knockdowns resulted in a distinct reduction of melanized parasites under certain conditions. Interestingly the gene-silencing had different effects on susceptibility and refractoriness of mosquitoes. The decline of melanized parasites resulted in an increasing number of living oocysts in G3/dsCTL-MA2, whereas in L3-5 no change in parasite survival has been observed.

2. The invasion of *Plasmodium* sporozoites into mosquito salivary glands is essential for parasite transmission. Sporozoites preferentially invade the lateral lobes of the salivary glands first, before invading the medial lobe. Therefore a suppression subtractive hybridization (SSH) approach was used, to screen for possible salivary gland receptors. *SGS4* and *5* from the *An. gambiae* *SGS*-family were identified as potential candidate genes.

3. Sporozoites are the only stages of the *Plasmodium* life cycle that have the capacity to invade two entirely different host organs, the mosquito salivary gland and the mammalian liver. The last part of my thesis focused on the molecular and functional characterization of the sporozoite-specific *UOS3* gene from the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Gene targeting* revealed that *UOS3* plays a critical role for the infection of mosquito salivary glands and the rat liver on the one hand and for the sporozoite's gliding motility on the other hand. Therefore *UOS3* represents together with *TRAP* another important sporozoite-specific gene, that acts in life cycle progression of the malaria transmission stage.

7. Literaturverzeichnis

- Abraham, E. G., S. B. Pinto, et al. (2005). "An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(45): 16327-32.
- Akaki, M. and J. A. Dvorak (2005). "A chemotactic response facilitates mosquito salivary gland infection by malaria sporozoites." *J Exp Biol* **208**(Pt 16): 3211-8.
- Arakane, Y., S. Muthukrishnan, et al. (2005). "Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(32): 11337-42.
- Arca, B., F. Lombardo, et al. (1999). "Trapping cDNAs encoding secreted proteins from the salivary glands of the malaria vector *Anopheles gambiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4): 1516-21.
- Ashida, M. (1971). "Purification and characterization of pre-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*." *Arch Biochem Biophys* **144**(2): 749-62.
- Ashida, M., Y. Ishizaki, et al. (1983). "Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell walls or beta-1,3-glucans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*." *Biochem Biophys Res Commun* **113**(2): 562-8.
- Aspan, A. u. S., K. (1991). "Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells, and its activation by an endogenous serine proteinase." *Insect. Biochemistry* **21**: 363-373.
- Barreau, C., M. Touray, et al. (1995). "*Plasmodium gallinaceum*: sporozoite invasion of *Aedes aegypti* salivary glands is inhibited by anti-gland antibodies and by lectins." *Exp Parasitol* **81**(3): 332-43.
- Beerntsen, B. T., A. A. James, et al. (2000). "Genetics of mosquito vector competence." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(1): 115-37.
- Beerntsen, B. T., S. Luckhart, et al. (1989). "*Brugia malayi* and *Brugia pahangi*: inherent difference in immune activation in the mosquitoes *Armigeres subalbatus* and *Aedes aegypti*." *J Parasitol* **75**(1): 76-81.
- Beeson, J. G., S. J. Rogerson, et al. (2000). "Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria." *Nat Med* **6**(1): 86-90.
- Billker, O., V. Lindo, et al. (1998). "Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito." *Nature* **392**(6673): 289-92.
- Binnington, K. C. and F. M. Barrett (1988). "Ultrastructural localization of phenoloxidases in cuticle and haemopoietic tissue of the blowfly *Lucilia cuprina*." *Tissue Cell* **20**(3): 405-19.
- Blandin, S. and E. A. Levashina (2004). "Mosquito immune responses against malaria parasites." *Curr Opin Immunol* **16**(1): 16-20.
- Blandin, S., L. F. Moita, et al. (2002). "Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene." *EMBO Rep* **3**(9): 852-6.

- Blandin, S., S. H. Shiao, et al. (2004). "Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*." *Cell* **116**(5): 661-70.
- Boisson, B., J. C. Jacques, et al. (2006). "Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi." *FEBS Lett* **580**(8): 1988-92.
- Bottius, E., A. Guanziroli, et al. (1996). "Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **90**(1): 15-9.
- Brennan, J. D., M. Kent, et al. (2000). "*Anopheles gambiae* salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13859-64.
- Buscaglia, C. A., I. Coppens, et al. (2003). "Sites of interaction between aldolase and thrombospondin-related anonymous protein in *Plasmodium*." *Mol Biol Cell* **14**(12): 4947-57.
- Chen, C. C. and C. S. Chen (1995). "*Brugia pahangi*: effects of melanization on the uptake of nutrients by microfilariae in vitro." *Exp Parasitol* **81**(1): 72-8.
- Chow, C. Y. (1958). "Insecticide susceptibility and resistance in anopheline mosquitoes in Java." *Indian J Malariol* **12**: 345-66.
- Christophides, G. K., D. Vlachou, et al. (2004). "Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*." *Immunol Rev* **198**: 127-48.
- Christophides, G. K., E. Zdobnov, et al. (2002). "Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*." *Science* **298**(5591): 159-65.
- Collins, F. H., R. K. Sakai, et al. (1986). "Genetic selection of a *Plasmodium*-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*." *Science* **234**(4776): 607-10.
- Deharo, E., F. Coquelin, et al. (1996). "The erythrocytic schizogony of two synchronized strains of *Plasmodium berghei*, NK65 and ANKA, in normocytes and reticulocytes." *Parasitol Res* **82**(2): 178-82.
- della Torre, A., C. Fanello, et al. (2001). "Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa." *Insect Mol Biol* **10**(1): 9-18.
- Diatchenko, L., Y. F. Lau, et al. (1996). "Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 6025-30.
- Dimopoulos, G., H. M. Muller, et al. (1999). "How does *Anopheles gambiae* kill malaria parasites?" *Parassitologia* **41**(1-3): 169-75.
- Dimopoulos, G., H. M. Muller, et al. (2001). "Innate immune defense against malaria infection in the mosquito." *Curr Opin Immunol* **13**(1): 79-88.
- Dubremetz, J. F. u. F., E. (1978). "Capping of cationised ferritin by coccidian zoites." *Journal of Protozoology* **25**: 9B.

- Favia, G., A. Lanfrancotti, et al. (2001). "Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s." *Insect Mol Biol* **10**(1): 19-23.
- Francischetti, I. M., J. G. Valenzuela, et al. (2002). "Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*." *J Exp Biol* **205**(Pt 16): 2429-51.
- Frevert, U., S. Engelmann, et al. (2005). "Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver." *PLoS Biol* **3**(6): e192.
- Frevert, U., P. Sinnis, et al. (1993). "Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes." *J Exp Med* **177**(5): 1287-98.
- Frevert, U., P. Sinnis, et al. (1996). "Cell surface glycosaminoglycans are not obligatory for *Plasmodium berghei* sporozoite invasion *in vitro*." *Mol Biochem Parasitol* **76**(1-2): 257-66.
- Fujita, Y., S. Kurata, et al. (1998). "A novel lectin from *Sarcophaga*. Its purification, characterization, and cDNA cloning." *J Biol Chem* **273**(16): 9667-72.
- Gantt, S., C. Persson, et al. (2000). "Antibodies against thrombospondin-related anonymous protein do not inhibit *Plasmodium* sporozoite infectivity *in vivo*." *Infect Immun* **68**(6): 3667-73.
- Garcia, G. E., R. A. Wirtz, et al. (1998). "Xanthurenic acid induces gametogenesis in *Plasmodium*, the malaria parasite." *J Biol Chem* **273**(20): 12003-5.
- Gillespie, J. P., M. R. Kanost, et al. (1997). "Biological mediators of insect immunity." *Annu Rev Entomol* **42**: 611-43.
- Greenwood, B. and T. Mutabingwa (2002). "Malaria in 2002." *Nature* **415**(6872): 670-2.
- Harbach, R. E. u. K., I.J. (1998). "Phylogeny and classification of the *Culicidae*." *Systematics of Entomology* **23**: 327-370.
- Heintzelman, M. B. and J. D. Schwartzman (1997). "A novel class of unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*." *J Mol Biol* **271**(1): 139-46.
- Hernandez-Martinez, S., H. Lanz, et al. (2002). "Cellular-mediated reactions to foreign organisms inoculated into the hemocoel of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae)." *J Med Entomol* **39**(1): 61-9.
- Hillyer, J. F. and B. M. Christensen (2005). "Mosquito phenoloxidase and defensin colocalize in melanization innate immune responses." *J Histochem Cytochem* **53**(6): 689-98.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**: 1-13.
- Jewett, T. J. and L. D. Sibley (2003). "Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites." *Mol Cell* **11**(4): 885-94.

- Jiang, H., Y. Wang, et al. (1998). "Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: a bacteria-inducible protein similar to *Drosophila easter*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12220-5.
- Jiang, H., Y. Wang, et al. (2003). "Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: a clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs." *Insect Biochem Mol Biol* **33**(10): 1049-60.
- Kaiser, K., K. Matuschewski, et al. (2004). "Differential transcriptome profiling identifies *Plasmodium* genes encoding pre-erythrocytic stage-specific proteins." *Mol Microbiol* **51**(5): 1221-32.
- Kanost, M. R. and H. Jiang (1997). "Serpins from an insect, *Manduca sexta*." *Adv Exp Med Biol* **425**: 155-61.
- Kanost, M. R., H. Jiang, et al. (2004). "Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*." *Immunol Rev* **198**: 97-105.
- Kappe, S., T. Bruderer, et al. (1999). "Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites." *J Cell Biol* **147**(5): 937-44.
- Kappe, S. H., C. A. Buscaglia, et al. (2004). "Apicomplexan gliding motility and host cell invasion: overhauling the motor model." *Trends Parasitol* **20**(1): 13-6.
- Kappe, S. H., K. Kaiser, et al. (2003). "The *Plasmodium* sporozoite journey: a rite of passage." *Trends Parasitol* **19**(3): 135-43.
- King, C. A. (1988). "Cell motility of sporozoan protozoa." *Parasitol Today* **4**(11): 315-9.
- Korochkina, S., C. Barreau, et al. (2006). "A mosquito-specific protein family includes candidate receptors for malaria sporozoite invasion of salivary glands." *Cell Microbiol* **8**(1): 163-75.
- Kumar, S., G. K. Christophides, et al. (2003). "The role of reactive oxygen species on *Plasmodium* melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 14139-44.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lai-Fook, J. (1966). "The repair of wounds in the integument of insects." *Journal of Insect Physiology* **12**: 195-226.
- Lavine, M. D. and M. R. Strand (2002). "Insect hemocytes and their role in immunity." *Insect Biochem Mol Biol* **32**(10): 1295-309.
- Lee, S. Y., M. Y. Cho, et al. (1998). "Molecular cloning of cDNA for pro-phenol-oxidase-activating factor I, a serine protease is induced by lipopolysaccharide or 1,3-beta-glucan in coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae." *Eur J Biochem* **257**(3): 615-21.

- Lee, S. Y., T. H. Kwon, et al. (1998). "In vitro activation of pro-phenol-oxidase by two kinds of pro-phenol-oxidase-activating factors isolated from hemolymph of coleopteran, *Holotrichia diomphalia* larvae." *Eur J Biochem* **254**(1): 50-7.
- Lee, S. Y., R. Wang, et al. (2000). "A lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning." *J Biol Chem* **275**(2): 1337-43.
- Levashina, E. A., L. F. Moita, et al. (2001). "Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*." *Cell* **104**(5): 709-18.
- Ligoxygakis, P., N. Pelte, et al. (2002). "A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*." *Embo J* **21**(23): 6330-7.
- Lindl, T. (2000). „Zell- und Gewebekultur.“ Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Lowenberger, C. (2001). "Innate immune response of *Aedes aegypti*." *Insect Biochem Mol Biol* **31**(3): 219-29.
- Lucius R., L.-F. B. (1997). "Parasitologie. Grundlagen für Biologen, Mediziner, Veterinärmediziner." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Luckhart, S., Y. Vodovotz, et al. (1998). "The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10): 5700-5.
- Luen, S. C. and A. M. Shalaby (1962). "Preliminary note on the development of DDT-resistance in *Anopheles culicifacies* Giles in Panchmahals District, Gujerat State, India." *Bull World Health Organ* **26**: 128-34.
- Ma, C. and M. R. Kanost (2000). "A beta-1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade." *J Biol Chem* **275**(11): 7505-14.
- Matuschewski, K., J. Ross, et al. (2002). "Infectivity-associated changes in the transcriptional repertoire of the malaria parasite sporozoite stage." *J Biol Chem* **277**(44): 41948-53.
- May, J., F. P. Mockenhaupt, et al. (1999). "High rate of mixed and subpatent malarial infections in southwest Nigeria." *Am J Trop Med Hyg* **61**(2): 339-43.
- Meissner, M., D. Schluter, et al. (2002). "Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion." *Science* **298**(5594): 837-40.
- Menard, R. (2001). "Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite." *Cell Microbiol* **3**(2): 63-73.
- Menard, R. and C. Janse (1997). "Gene targeting in malaria parasites." *Methods* **13**(2): 148-57.

- Menard, R., A. A. Sultan, et al. (1997). "Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes." *Nature* **385**(6614): 336-40.
- Menendez, C., J. Ordi, et al. (2000). "The impact of placental malaria on gestational age and birth weight." *J Infect Dis* **181**(5): 1740-5.
- Moreira-Ferro, C. K., O. Marinotti, et al. (1999). "Morphological and biochemical analyses of the salivary glands of the malaria vector, *Anopheles darlingi*." *Tissue Cell* **31**(3): 264-73.
- Morrisette, N. S. and L. D. Sibley (2002). "Cytoskeleton of apicomplexan parasites." *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(1): 21-38; table of contents.
- Mueller, A. K., M. Labaied, et al. (2005). "Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine." *Nature* **433**(7022): 164-7.
- Muller, H. M., G. Dimopoulos, et al. (1999). "A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes." *J Biol Chem* **274**(17): 11727-35.
- Myung, J. M., P. Marshall, et al. (2004). "The *Plasmodium* circumsporozoite protein is involved in mosquito salivary gland invasion by sporozoites." *Mol Biochem Parasitol* **133**(1): 53-9.
- Nappi, A. J. and E. Vass (2001). "The effects of nitric oxide on the oxidations of l-dopa and dopamine mediated by tyrosinase and peroxidase." *J Biol Chem* **276**(14): 11214-22.
- Natori, S. (2001). "Insect lectins and innate immunity." *Adv Exp Med Biol* **484**: 223-8.
- Ochiai, M. and M. Ashida (1999). "A pattern recognition protein for peptidoglycan. Cloning the cDNA and the gene of the silkworm, *Bombyx mori*." *J Biol Chem* **274**(17): 11854-8.
- Oduol, F., J. Xu, et al. (2000). "Genes identified by an expression screen of the vector mosquito *Anopheles gambiae* display differential molecular immune response to malaria parasites and bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21): 11397-402.
- Osta, M. A., G. K. Christophides, et al. (2004). "Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development." *Science* **303**(5666): 2030-2.
- Paskewitz, S. M. u. G., M.J. (1999). "Mosquito immunity and malaria parasites." *American Entomologist* **45**: 80-94.
- Pimenta, P. F., M. Touray, et al. (1994). "The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland." *J Eukaryot Microbiol* **41**(6): 608-24.
- Pope, B. and H. M. Kent (1996). "High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res* **24**(3): 536-7.
- Powell, J. R., V. Petrarca, et al. (1999). "Population structure, speciation, and introgression in the *Anopheles gambiae* complex." *Parassitologia* **41**(1-3): 101-13.

- Rogers, W. O., M. D. Rogers, et al. (1992). "Characterization of the gene encoding sporozoite surface protein 2, a protective *Plasmodium yoelii* sporozoite antigen." *Mol Biochem Parasitol* **53**(1-2): 45-51.
- Rossignol, P. A., J. M. Ribeiro, et al. (1984). "Increased intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes." *Am J Trop Med Hyg* **33**(1): 17-20.
- Russell, D. G. (1983). "Host cell invasion by Apicomplexa: an expression of the parasite's contractile system?" *Parasitology* **87** (Pt 2): 199-209.
- Sallum, M. A., Schultz, T.R. und Wilkerson, R.C (2000). "Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on morphological characters." *Ann. Entomol. Soc. Am.* **93**: 745-775.
- Saute, F., C. Menendez, et al. (2002). "Malaria in pregnancy in rural Mozambique: the role of parity, submicroscopic and multiple *Plasmodium falciparum* infections." *Trop Med Int Health* **7**(1): 19-28.
- Schatten, H., L. D. Sibley, et al. (2003). "Structural evidence for actin-like filaments in *Toxoplasma gondii* using high-resolution low-voltage field emission scanning electron microscopy." *Microsc Microanal* **9**(4): 330-5.
- Shaw, M. K. and L. G. Tilney (1999). "Induction of an acrosomal process in *Toxoplasma gondii*: visualization of actin filaments in a protozoan parasite." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9095-9.
- Sherman, I. W. (1998). "Malaria." Washington, DC, American Society for Microbiology Press.
- Sherman, I. W., I. E. Crandall, et al. (1995). "The sticky secrets of sequestration." *Parasitol Today* **11**(10): 378-84.
- Shiao, S. H., S. Higgs, et al. (2001). "Effect of prophenoloxidase expression knockout on the melanization of microfilariae in the mosquito *Armigeres subalbatus*." *Insect Mol Biol* **10**(4): 315-21.
- Sibley, L. D. (2004). "Intracellular parasite invasion strategies." *Science* **304**(5668): 248-53.
- Sidjanski, S. and J. P. Vanderberg (1997). "Delayed migration of *Plasmodium* sporozoites from the mosquito bite site to the blood." *Am J Trop Med Hyg* **57**(4): 426-9.
- Sidjanski, S. P., J. P. Vanderberg, et al. (1997). "*Anopheles stephensi* salivary glands bear receptors for region I of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol* **90**(1): 33-41.
- Sinden, R. E. and N. A. Croll (1975). "Cytology and kinetics of microgametogenesis and fertilization in *Plasmodium yoelii nigeriensis*." *Parasitology* **70**(1): 53-65.
- Sinnis, P. and E. Nardin (2002). "Sporozoite antigens: biology and immunology of the circumsporozoite protein and thrombospondin-related anonymous protein." *Chem Immunol* **80**: 70-96.

- Snow, R. W., C. A. Guerra, et al. (2005). "The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria." *Nature* **434**(7030): 214-7.
- Söderhäll, K., Cerenius, L. und Johansson, M.W. (1996). "The prophenoloxidase activating system in invertebrates." *New Directions in Invertebrate Immunology*: 229-243.
- Soerono, M., G. Davidson, et al. (1965). "The Development and Trend of Insecticide-Resistance in *Anopheles Aconitus* Doenitz and *Anopheles Sundaicus* Rodenwaldt." *Bull World Health Organ* **32**: 161-8.
- Sterling, C. R., M. Aikawa, et al. (1973). "The passage of *Plasmodium berghei* sporozoites through the salivary glands of *Anopheles stephensi*: an electron microscope study." *J Parasitol* **59**(4): 593-605.
- Stewart, M. J. and J. P. Vanderberg (1991). "Malaria sporozoites release circumsporozoite protein from their apical end and translocate it along their surface." *J Protozool* **38**(4): 411-21.
- Suderman, R. J., N. T. Dittmer, et al. (2006). "Model reactions for insect cuticle sclerotization: cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols." *Insect Biochem Mol Biol* **36**(4): 353-65.
- Sugumaran, M., K. Nellaiappan, et al. (2000). "Insect melanogenesis. III. Metabolon formation in the melanogenic pathway-regulation of phenoloxidase activity by endogenous dopachrome isomerase (decarboxylating) from *Manduca sexta*." *Arch Biochem Biophys* **378**(2): 393-403.
- Sultan, A. A., V. Thathy, et al. (1997). "TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites." *Cell* **90**(3): 511-22.
- Thathy, V. and R. Menard (2002). "Gene targeting in *Plasmodium berghei*." *Methods Mol Med* **72**: 317-31.
- Theopold, U., D. Li, et al. (2002). "The coagulation of insect hemolymph." *Cell Mol Life Sci* **59**(2): 363-72.
- Touray, M. G., A. Warburg, et al. (1992). "Developmentally regulated infectivity of malaria sporozoites for mosquito salivary glands and the vertebrate host." *J Exp Med* **175**(6): 1607-12.
- van der Wel, A. M., A. M. Tomas, et al. (1997). "Transfection of the primate malaria parasite *Plasmodium knowlesi* using entirely heterologous constructs." *J Exp Med* **185**(8): 1499-503.
- van Dijk, M. R., C. J. Janse, et al. (1996). "Expression of a *Plasmodium* gene introduced into subtelomeric regions of *Plasmodium berghei* chromosomes." *Science* **271**(5249): 662-5.
- van Dijk, M. R., A. P. Waters, et al. (1995). "Stable transfection of malaria parasite blood stages." *Science* **268**(5215): 1358-62.
- Vanderberg, J. P. (1974). "Studies on the motility of *Plasmodium* sporozoites." *J Protozool* **21**(4): 527-37.

- Vincke, I. H. and M. Lips (1950). "[Cyclic transmission of *Plasmodium berghei*.]" *Ann Soc Belg Med Trop* **30**(6): 1605-11.
- Volz, J., M. A. Osta, et al. (2005). "The roles of two clip domain serine proteases in innate immune responses of the malaria vector *Anopheles gambiae*." *J Biol Chem* **280**(48): 40161-8.
- Waters, A. P., A. W. Thomas, et al. (1997). "Transfection of malaria parasites." *Methods* **13**(2): 134-47.
- Waters, A. P., R. M. van Spaendonk, et al. (1997). "Species-specific regulation and switching of transcription between stage-specific ribosomal RNA genes in *Plasmodium berghei*." *J Biol Chem* **272**(6): 3583-9.
- Weis, W. I., M. E. Taylor, et al. (1998). "The C-type lectin superfamily in the immune system." *Immunol Rev* **163**: 19-34.
- Wengelnik, K., R. Spaccapelo, et al. (1999). "The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands." *Embo J* **18**(19): 5195-204.
- Wenk, P., Renz, A. (2003). „Parasitologie, Biologie der Humanparasiten.“ Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- Wetzel, D. M., S. Hakansson, et al. (2003). "Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites." *Mol Biol Cell* **14**(2): 396-406.
- Wirth, D. F. (2002). "Biological revelations." *Nature* **419**(6906): 495-6.
- Wu, Y., L. A. Kirkman, et al. (1996). "Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3): 1130-4.
- Yoshida, N., R. S. Nussenzweig, et al. (1980). "Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite." *Science* **207**(4426): 71-3.
- Yu, X. Q., H. Gan, et al. (1999). "Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase." *Insect Biochem Mol Biol* **29**(7): 585-97.
- Zhao, X., M. T. Ferdig, et al. (1995). "Biochemical pathway of melanotic encapsulation of *Brugia malayi* in the mosquito, *Armigeres subalbatus*." *Dev Comp Immunol* **19**(3): 205-15.
- Zhu, Y., Y. Wang, et al. (2003). "*Manduca sexta* serpin-3 regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase-activating proteinases." *J Biol Chem* **278**(47): 46556-64.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Datum

Marion Steinbüchel