

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

**Diplombiologe Tim Krüger
aus Karlsruhe**

Tag der mündlichen Prüfung: _____

**Charakterisierung von
Phosphatidylinositol-metabolisierenden
Enzymen in
*Plasmodium falciparum***

Gutachter: Prof. Dr. Michael Lanzer
Prof. Dr. Christine Clayton

Die vorliegende Arbeit wurde am Hygiene-Institut der Universität Heidelberg, Abteilung Parasitologie, in der Zeit von Oktober 2003 bis März 2008 unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Lanzer durchgeführt.

DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei Prof. Dr. Michael Lanzer für die Bereitstellung des Themas, die große Unterstützung während der Arbeit mit Rat und Tat sowie die Freiheiten, die mir beim Ausgestalten des Themas gewährt wurden.

Bei Prof. Dr. Christine Clayton möchte ich mich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Der AG Lanzer für die gesamte Zeit: Ceci für die große Unterstützung bei den letzten Experimenten; Kathi, Theodora und Philipp für gemeinsame “Bay”-Zeiten und allen anderen, die Teil der Gruppe waren oder sind (Judith, Susi, Armand, Jeremy, Elise, Marina, Eli, Anurag, Alex, Yvonne, Astuti, Sybille und Yulin).

Ein großes Dankeschön geht an Kai Matuschewski und seine Gruppe, die mir die Knock Out-Experimente in *Plasmodium berghei* ermöglicht haben. Unterstützt wurde ich dabei vor allem von Kirsten und Markus. Ein “Cheers” an Markus, Taco und Elyzana.

Danke auch an die AGs Frischknecht, Kappes, Borrmann und Meissner. Besonderer Dank geht hierbei an Geli, die nie aufgehört hat, mich zu motivieren, zu unterstützen und zu betreuen. Vielen Dank!

Meinen Eltern Erich und Sabine danke ich...für ziemlich viel, hier hat es definitiv zuwenig Platz, alles aufzuzählen, aber als Start: Danke für das entgegengebrachte Vertrauen und die immerwährende Unterstützung, auch wenn manche Dinge überhaupt nicht wie geplant laufen!

Meinem Patenneffen Moritz mitsamt Mama Marnie und Papa Marcus für...alles Mögliche und auch ziemlich viel...

Meinen Freundinnen und Freunden, dass ich sie als Freundinnen und Freunde bezeichnen kann!

Und last, but not least, danke ich Kathi, wegen der es sich gelohnt hat, so lange im Labor zu stehen und so lange für diese Arbeit zu brauchen. Als ob ich drauf gewartet hätte...Und außerdem würde das hier ohne sie mit absoluter Sicherheit nicht so aussehen, wie es aussieht...Danke!

Abkürzungen

°	Grad
α	anti
A	Adenin
aa	Aminosäure
amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, Celsius
cam	Chloramphenicol
cDNA	copy DNA
cm	Zentimeter
Δ	Deletion, Delta
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxyribonucleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
3D7	<i>P. falciparum</i> Parasitenklon 3D7
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EST	“expressed sequence tag”

F	Farad (Einheit der Kapazität des elektrischen Feldes)
g	Gramm bzw. Zentrifugationseinheit für das Maß der Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	Green fluorescent protein
h	Stunde
Hkt	Hämatokrit
IPP	Inositolpolyphosphat(ase)
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
iRBC	<i>Plasmodium</i> -infizierter Erythrozyt
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
λ	Lambda, Wellenlänge
μ	Mikro (10^{-6})
m	Meter, Milli (10^{-3})
M	molar
mA	Milliampere
MACS	“magnetic activated cell sorter” (Magnetische Zellsortierung)
Mb	Megabasen
MCS	“multiple cloning site”
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	“messenger RNA” (Boten-RNA)
mV	Millivolt
MW	Molekulargewicht
n	Nano (10^{-9})

nt	Nucleotid
N-Terminus	Amino-Terminus
nm	Nanometer (10^{-9})
O	Ohm, Einheit des elektrischen Widerstandes
OD	Optische Dichte
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei $\lambda=600$ nm
p	Piko (10^{-12}), Plasmid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>Pb</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	“potentia hydrogenii” (pH-Wert)
PI	Phosphatidylinositol
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PI(4)P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI-3-kinase	Phosphatidylinositol-3-kinase
PI-4-kinase	Phosphatidylinositol-4-kinase
PIP-5-kinase	Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-kinase
PV	parasitophore Vakuole
PVM	Membran der parasitophoren Vakuole
RBC	“red blood cell” (Erythrozyt)
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	“rounds per minute” (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannte, -r
SSC	saline sodium-citrate

t	Zeit
T	Thymin
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA
TM	Transmembran
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	“unit” (biochemische Einheit für Enzymaktivität)
ü.N.	über Nacht
ü.N.K	Über-Nacht-Kultur
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	“volume to volume” (Volumenprozent)
w/v	“weight to volume” (Gewichtsvolumenprozent)
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	I
Abkürzungen	II
Inhaltsverzeichnis	VI
Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	3
1.1 Ursprung und Evolution des Malaria-Erregers	3
1.2 Historische Bedeutung der Malaria	4
1.3 Aktuelle Malaria-Situation	4
1.4 Lebenszyklus des Malaria-Erregers <i>Plasmodium</i>	6
1.4.1 Sexuelle Fortpflanzung	6
1.4.2 Asexuelle Fortpflanzung	7
1.5 Klinische Merkmale der Malaria	9
1.6 Chemotherapie der Malaria	10
1.7 Interaktionen zwischen Parasit und Wirtszelle	11
1.8 Lipide	13

1.8.1	Rolle der Lipide in der Zelle	13
1.8.2	Struktur und Funktion der Phospholipide	14
1.8.3	Struktur und Funktion der Phosphatidylinositole	16
1.9	Lipide in <i>P. falciparum</i>	18
1.10	PI-metabolisierende Enzyme	19
1.10.1	PI-metabolisierende Kinasen	19
1.10.1.1	Phosphatidylinositol-4-Kinasen	21
1.10.2	PI-metabolisierende Phosphatasen	21
1.10.2.1	Synaptojanin	22
1.10.3	PI-metabolisierende Phosphatasen und Kinasen in <i>P. falciparum</i>	23
1.11	Zielsetzung der Arbeit	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Materialien	25
2.1.1	Laboraausstattung	25
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	27
2.1.3	Chemikalien	28
2.1.4	Puffer, Medien, Lösungen	28
2.1.5	Molekularbiologische Kits	32
2.1.6	Enzyme	33
2.1.7	Größenmarker Protein und DNA	33
2.1.8	Vektoren	33
2.1.9	Stämme	34
2.1.10	Oligonukleotide	34
2.1.11	Antikörper	36
2.2	Methoden	36
2.2.1	DNA-Methoden	36
2.2.1.1	PCR- Polymerase Kettenreaktion	36
2.2.1.2	Restriktionsverdau	37
2.2.1.3	Ligation von DNA-Fragmenten	38
2.2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	38
2.2.1.4	Präzipitation von DNA	39
2.2.1.5	Sequenzierreaktion	39
2.2.1.6	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	40
2.2.2	Mikrobiologische Methoden	40

2.2.2.1	Plattenkulturen	40
2.2.2.2	Flüssigkulturen von <i>E.coli</i>	40
2.2.2.3	Dauerkulturen	41
2.2.2.4	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i>	41
2.2.2.5	Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> PMC 103	41
2.2.2.6	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> BL21-Ril(DE3)	42
2.2.2.7	Screening der Bakterienkolonien	43
2.2.2.8	Analyse bakterieller Transformanden	43
2.2.2.8.1	Cracking Gel	43
2.2.2.8.2	PCR-Screening	43
2.2.2.9	Präparation und Analyse von Nukleinsäuren	44
2.2.2.9.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Zellen	44
2.2.2.9.2	Analytische Isolierung: Mini-Präparation	44
2.2.2.9.3	Präparative Isolierung: Maxi-Präparation	45
2.2.3	RNA-Methoden	46
2.2.3.1	mRNA-Isolierung	46
2.2.3.2	RT-PCR	46
2.2.3.3	Northern Blot	47
2.2.3.4	RNA-Hybridisierung mittels radioaktiv markierter Sonden	48
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	49
2.2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.2.4.2	Western Blot	50
2.2.4.3	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	50
2.2.4.4	Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels Affinitätschromatografie	51
2.2.4.5	Dialyse	51
2.2.4.6	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	52
2.2.5	<i>Plasmodium</i> -spezifische Methoden	52
2.2.5.1	Kultivierung von <i>P. falciparum</i> <i>in vitro</i>	52
2.2.5.2	Mikroskopische Darstellung von <i>P. falciparum</i> mittels Giemsa-Färbung	53
2.2.5.3	Bestimmung der Parasitämie	53
2.2.5.4	Einfrieren von Parasiten	54
2.2.5.5	Auftauen von Parasiten	54
2.2.5.6	Synchronisierung von <i>P. falciparum</i> -Kulturen mit Sorbitol	54
2.2.5.7	Anreicherung von Trophozoiten und Schizonten durch Gelatine-Sedimentation	55
2.2.5.8	Anreicherung von Trophozoiten und Schizonten durch magnetische Separation	55
2.2.5.9	Stabile Transfektion von <i>Plasmodium falciparum</i>	56
2.2.5.10	Isolierung genomischer DNA	57
2.2.5.11	Proteinextraktion aus <i>P. falciparum</i>	57
2.2.5.12	<i>Plasmodium berghei</i> -Transfektion	58
2.2.5.12.1	Präparation der Parasiten und <i>in vitro</i> -Kultur der Erythrozyten-Stadien	58
2.2.5.12.2	Transfektion der Parasiten mithilfe des Amaxa-Systems	58
2.2.5.12.3	Selektion der Parasiten.	59
2.2.5.12.4	Herstellung von Blutstabilaten	59
2.2.5.12.5	Präparation genomischer DNA aus Blutstadien	60
2.2.6	Zellbiologische Methoden	60
2.2.6.1	Immuno Fluorescence Assay (IFA)	60

3	Ergebnisse	63
3.1	Das Phosphatidylinositol-4-Kinase-like (PI4K) Protein in <i>Plasmodium</i>	63
3.1.1	Bestimmung der <i>Pf</i> -PI4K-Genstruktur	63
3.1.2	Detektion von <i>Pf</i> -PI4K mittels Northern Blot	65
3.1.3	Alignment von <i>Pf</i> -PI4K mit verschiedenen Orthologen	66
3.1.4	Stabile Transfektion eines GFP- <i>Pf</i> -PI4K-Konstrukts in <i>P. falciparum</i>	67
3.1.5	Untersuchungen zur <i>Pf</i> -PI4K-Genfunktion mittels "reverse genetics"	69
3.1.5.1	"Gene-knock-out" von <i>Pf</i> -PI4K durch Deletion in <i>P. falciparum</i>	69
3.1.5.2	"Gene-knock-out" von <i>Pf</i> -PI4K durch Integration in <i>P. falciparum</i>	71
3.1.5.3	"Gene-knock-out" durch Deletion des PI4K-Orthologs in <i>P. berghei</i>	73
3.1.9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - der Modellorganismus.	74
3.1.9.1	"in vivo"-Analyse von temperatursensitiven <i>S. cerevisiae</i> -Pik1p Mutanten durch Komplementation mit dem <i>P. falciparum</i> -PI4K	76
3.1.9.2	Plasmid-Analyse komplementierter Hefe-Zellen	76
3.2	Das Synaptojanin-like (Sjl) Protein in <i>Plasmodium</i>	78
3.2.1	Bestimmung der <i>Pf</i> -Sjl-Genstruktur	78
3.2.2	Vergleich von <i>Pf</i> -Sjl mit verschiedenen Paralogen	79
3.2.3	Rekombinante Expression des <i>Pf</i> -Sjl-Peptids	80
3.2.4	Aufreinigung des <i>Pf</i> -Sjl-Peptids	80
3.2.5	Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen das <i>Pf</i> -Sjl-Peptid	81
3.2.6	Austestung des <i>Pf</i> -Sjl-Peptid-spezifischen Antiserums per Western Blot	81
3.2.7	Immuno Fluorescence Assay (IFA) mit dem <i>Pf</i> -Sjl-Antiserum	83
3.2.8	Stabile Transfektion eines GFP- <i>Pf</i> -Sjl-Konstrukts in <i>P. falciparum</i>	84
3.2.9	Untersuchungen zur <i>Pf</i> -Sjl-Genfunktion mittels "reverse genetics"	85
3.2.9.1	"Gene-knock-out" von <i>Pf</i> -Sjl durch Deletion in <i>P. falciparum</i>	85
3.2.9.2	"Gene-knock-out" durch Deletion des <i>Pf</i> -Sjl-Orthologs in <i>P. berghei</i>	85
4	Diskussion	88
4.1	Das Phosphatidylinositol-4-Kinase-like (PI4K) Protein in <i>Plasmodium</i>	88
4.2	Das Synaptojanin-like (Sjl) Protein in <i>Plasmodium</i>	93
4.3	Ausblick	96
5	Referenzen	97

Zusammenfassung

Der einzellige Parasit *Plasmodium falciparum* aus der Familie der Apicomplexa ist für etwa 95% der Malaria-bedingten Todesfälle weltweit verantwortlich. Betroffen sind vor allem Gebiete im Afrika südlich der Sahara. Auch über hundert Jahre nach der Identifizierung des Erregers existiert noch kein effektives Vakzin und die zunehmende Verbreitung resistenter Parasiten, gegen die gebräuchliche Chemotherapeutika unwirksam geworden sind, stellen zusätzliche Herausforderungen in der Bekämpfung der Malaria dar.

Die durch *P. falciparum* verursachte schwere Verlaufsform der Malaria tropica liegt in der Fähigkeit begründet, über den infizierten Erythrozyten an Endothelzellen von Kapillaren adhären zu können und so dem wirtseigenen Immunsystem zu entkommen. Da Erythrozyten als terminal differenzierte Zellen über keinerlei Organellen, eine Lipid- oder Proteinbiosynthesemaschinerie verfügen, muss der Parasit ein eigenes Netzwerk aufbauen, um Proteine und Lipide an die Oberfläche der infizierten Wirtszelle transportieren zu können.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Phosphatidylinositole gemäß eines neuen regulatorischen Paradigmas neben ihrer Funktion als Sekundärbotenstoff auch an der Kontrolle verschiedenster Signaltransduktionen sowie an Proteintransportmechanismen beteiligt sind. Dieser Prozess erfolgt durch die Rekrutierung regulatorischer Proteine an Signalkomplexe in Zellmembranen.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal eine Phosphatidylinositol 4-Kinase aus *Plasmodium falciparum* funktionell charakterisiert werden. Dabei handelt es sich um ein etwa 183 kDa großes Protein, das im Zytosol des Parasiten lokalisiert werden konnte. Als sogenannte Minigene exprimierte Fragmente des Proteins, einschließlich der hochkonservierten C-terminalen, katalytischen Domäne, waren ausreichend für die Komplementation des temperatursensitiven *Pik1p^{ts}*-Stammes von *S. cerevisiae*. Damit konnte durch *in vivo*-Analyse die Phosphatidylinositol 4-Kinase-Aktivität des annotierten Proteins nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Gen sowohl in *P. falciparum*, als auch das Ortholog in *P. berghei* essenziell für die Entwicklung im asexuellen Erythrozytenstadium ist.

Eine antagonistische Phosphatase, *Pf-Sjl*, wurde teilweise charakterisiert. So konnte ein Antikörper generiert werden, der in Immuno Fluorescence Assays genutzt wurde, um ebenfalls eine zytosolische Lokalisierung von *Pf-Sjl* nachzuweisen. Weiterhin scheint *Pf-Sjl* auch essenziell für das Überleben von *P. falciparum* und *P. berghei* während der intraerythrozytären Stadien zu sein.

Summary

The unicellular apicomplexan parasite *Plasmodium falciparum* is the causative agent of the majority (> 95%) of malaria-induced deaths worldwide with areas in sub-Saharan Africa being affected the hardest. Although the pathogen has already been discovered one hundred years ago, still no effective vaccine exists and the increased spreading of parasites displaying resistencies against the most common anti-malarial chemotherapeutics draws back the attempts to fight malaria.

In *P. falciparum*-induced malaria tropica, the most severe form of the disease, the parasite is able to adhere through the infected erythrocyte to capillary's endothelial cells and to thereby evade the host's splenic clearance mechanism. Since erythrocytes are terminally differentiated cells which contain neither organelles nor a protein- and lipid biosynthesis machinery, the parasite has to establish its own infrastructure inside the red blood cell to traffic proteins to the host cell's surface.

Recent studies have outlined a new regulatory paradigm, in which phosphoinositides are involved in the control of a variety of cellular trafficking and signalling processes by recruiting regulatory proteins to signalling complexes organized in cellular membranes.

For the first time, a phosphatidylinositol 4-kinase from *Plasmodium falciparum* could be characterised functionally in this work. The approximately 183 kDa protein could be localised to the parasite's cytosol. Fragments of the protein including the highly conserved C-terminal catalytic domain were expressed as so-called minigenes in the temperature-sensitive yeast strain *Pik1p^{ts}* and were sufficient to restore the wild-type phenotype. This *in vivo*-analysis proved the annotated phosphatidylinositol 4-kinase activity. Furthermore, it could be shown that the gene is essential for development in the asexual erythrocytic phase in *P. falciparum* and in *P. berghei*.

An antagonistic phosphatase, *Pf-Sjl*, was partially characterised. Generation of a polyclonal antibody allowed for the cytosolic localisation of *Pf-Sjl* in immunofluorescence assays. Furthermore, *Pf-Sjl* also seems to be essential for development and survival of *P. falciparum* and *P. berghei* asexual erythrocytic stages.

1 Einleitung

1.1 Ursprung und Evolution des Malaria-Erregers

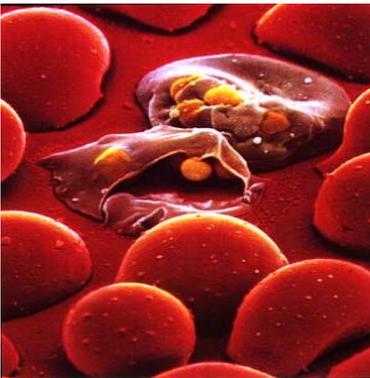


Abbildung 1.1
Plasmodium falciparum-
Merozoiten beim Verlassen
des Erythrozyten (Griffin-
Smith, 2005)

Ursächlich für eine Malaria-Erkrankung ist die Infektion mit einzelligen Parasiten aus der Familie der *Plasmodiae* (siehe Abbildung 1.1). Bis heute wurden fast 120 verschiedene *Plasmodien*-Arten entdeckt und beschrieben, deren Wirtsspektrum innerhalb der Vertebraten von Säugetieren bis zu Vögeln und Reptilien reicht. Lediglich vier Spezies können eine Malaria beim Menschen auslösen: *Plasmodium falciparum* (Malaria tropica), *P. vivax* (Malaria tertiana), *P. ovale* (Malaria tertiana) und *P. malariae* (Malaria quartana) (Carter und Mendis, 2002). Diese hohe Wirtsspezifität bezeugt sowohl den antiken Ursprung des Parasiten als auch eine ausgeprägte Co-Evolution mit seinem Wirt. Molekulargenetische Daten weisen auf einen freilebenden, Chloroplast-enthaltenden Protozoen als Ausgangsorganismus hin (Wilson und

Williamson, 1997). Mit dem Auftreten der Diptera (Zweiflügler: Mücken, Fliegen) vor 150-200 Millionen Jahren erlangten die ursprünglichen Malariaparasiten die Fähigkeit zur Entwicklung im Mitteldarm der im Wasser lebenden Insektenlarven. Während oder nach dieser Periode entwickelten bestimmte Linien einen Zwei-Wirte-Lebenszyklus, der sich wiederum an die Ernährungsgewohnheiten des Wirtes mit Blut anpasste (Carter und Mendis, 2002). Durch den Vergleich genomischer Sequenzen der verschiedenen Spezies konnte festgestellt werden, dass sich *P. falciparum* und *P. ovale* ausgehend von der afrikanischen Sub-Sahararegion verbreiteten, während *P. vivax* und *P. malariae* ihren Ursprung in Süd-Ost-Asien haben. Während *P. ovale* lediglich in West-Afrika zu finden ist, waren die restlichen humanpathogenen Erreger bis vor kurzer Zeit noch im Mittelmeerraum verbreitet. Da sich *P. vivax* auch bei Temperaturen unterhalb 20°C entwickeln kann, sprechen einige Indizien dafür, dass diese Art das südliche Europa vor dem temperatursensitiven Erreger *P. falciparum* erreicht hat, welcher vermutlich erst nach der letzten Eiszeit vor etwa 20.000 Jahren auftrat (Retief und Cilliers, 2006).

1.2 Historische Bedeutung der Malaria

Die frühesten Berichte über Malariaerkrankungen stammen aus der Zeit des alten Ägyptens, Indiens und Chinas vor mehreren tausend Jahren. Die Chinesen hatten bereits vor 2.000 Jahren ein Gegenmittel zur Hand, ein "Qinghao" genanntes Beifußgewächs, dessen Wirkstoff Artemisinin heutzutage immer weiter in den Fokus der pharmakologischen Forschung rückt. Der erste überlieferte Bericht zur Malaria in Europa stammt aus der Feder des griechischen Arztes Hippokrates (460-377 v. Chr.), der die typischen Symptome von mit Schüttelfrost einhergehenden, zyklischen Fieberschüben beschrieb.

Nachdem das Auftreten der Malaria mit Feuchtgebieten in der Nähe von Siedlungen in Zusammenhang gebracht werden konnte, wurden unter der Ägide des Römischen Reiches (50 v. Chr. bis 400 n. Chr.) ausgedehnte Sumpflandschaften trockengelegt und somit dort die Malaria für mehrere Jahrhunderte ausgerottet (Carter und Mendis, 2002).

Während des gesamten Mittelalters wurden keine neuen Erkenntnisse über die Malaria gewonnen. Hingegen setzte sich die sogenannte Miasmen-Theorie durch, in der übelriechende, ansteckende (engl. "miasmic") Sumpfgase für den Ausbruch der Krankheit verantwortlich gemacht wurden. Auch die 1440 von Carnaro erstmals erwähnte Benennung der Krankheit nach dem italienischen "mala aria" (schlechte Luft) basiert auf eben dieser Hypothese (Retief und Cilliers, 2006). Erst im Jahre 1880 konnte die Miasmen-Theorie mit dem Nachweis des Parasiten im Blut von Malaria-Patienten durch Alphonse Laveran verworfen werden. Der Lebenszyklus des Parasiten und die Übertragung durch die *Anopheles*-Mücke wurden 1899 von Ronald Ross beschrieben. Beide Forscher wurden für ihre Entdeckungen mit dem Nobelpreis ausgezeichnet (Guillemin, 2002), Ross 1903 und Laveran 1907.

1.3 Aktuelle Malaria-Situation

Obwohl mehr als ein Jahrhundert seit der Aufklärung des Erregers und seines Lebenszyklus vergangen ist, stellt die Malaria immer noch eine ernste Bedrohung für einen großen Teil der Weltbevölkerung dar. Die Ausbreitung der Krankheit ist stark an das Verbreitungsgebiet des Vektors, der *Anopheles*-Mücke, gekoppelt, da diese für ihre Entwicklung eine Minimaltemperatur von 15°C benötigt (Hales und Woodward, 2005). In der Mitte des letzten Jahrhunderts konnte die Malaria erfolgreich aus Europa verbannt werden und heutzutage

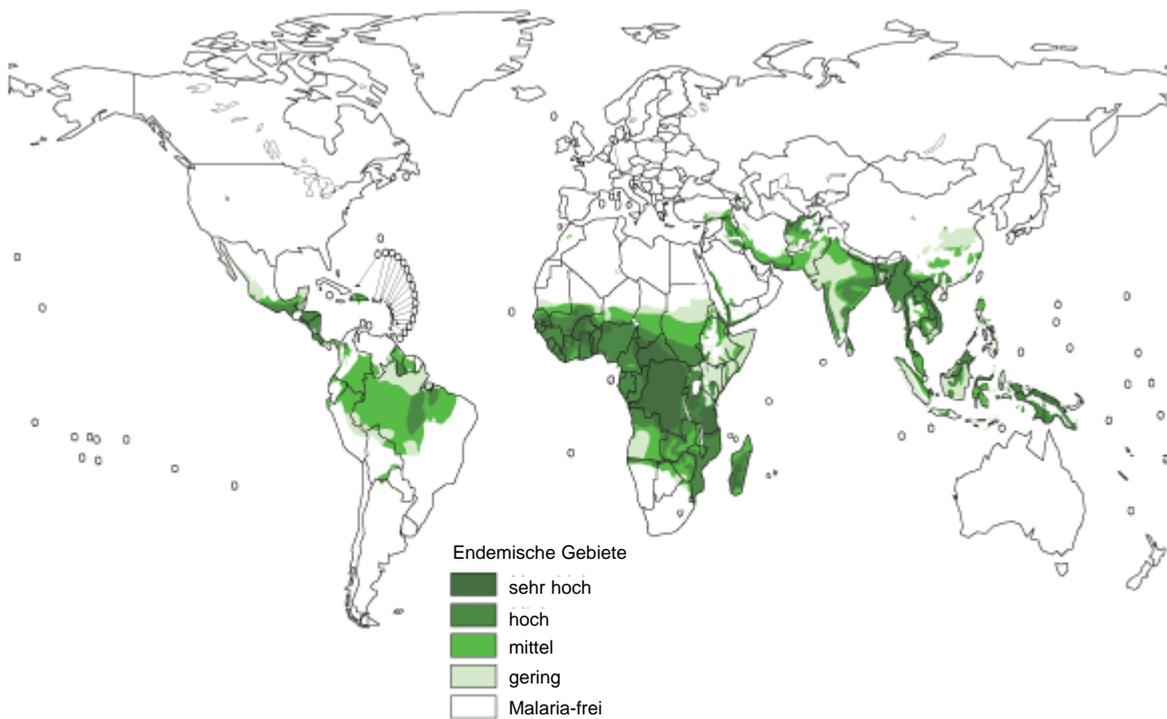


Abbildung 1.2
Weltweite Verteilung der endemischen Malaria-Gebiete (verändert nach World Health Organization, 2005)

Die Regionen, in denen ein sehr hohes (dunkelgrün gekennzeichnet) oder geringes Risiko (hellgrün) einer Infektion mit Malaria besteht, verteilen sich weltweit auf Afrika, Südasien und Teile Südamerikas. Hingegen zählen Nordamerika, Europa und Australien nicht zu den endemischen Gebieten.

umfassen die endemischen Gebiete Teile Süd- und Mittelamerikas, des Mittleren Ostens, Süd-Asiens sowie vor allem Afrikas (siehe Abbildung 1.2).

In den betroffenen Regionen sind etwa 40% der Weltbevölkerung beheimatet. Schätzungen belaufen sich auf jährlich bis zu 500 Millionen Neuerkrankungen mit schwerem Verlauf, von denen mindestens zwei Millionen tödlich ausgehen (Bremant et al., 2004). Die überwältigende Mehrheit (> 90%) dieser Todesfälle tritt in Afrika südlich der Sahara auf, wo Malaria die Hauptursache der Kindersterblichkeit darstellt (Snow et al., 2005). Grund hierfür ist die vorwiegende Infektion mit der Species *P. falciparum*, die die schwerste Verlaufsform der Krankheit verursacht sowie die Verbreitung von *Anopheles*-Vektoren, die sich resistent gegen unterschiedlichste Insektizide zeigen (WHO, 2000).

Malaria beeinflusst allerdings nicht nur stark die demografische Entwicklung betroffener Familien, Dörfer und Länder, sondern auch deren ökonomische. Schätzungen zufolge verursacht die Malaria weltweit einen volkswirtschaftlichen Schaden von etwa 12 Milliarden Dollar pro

Jahr und kann somit als eine entscheidende Behinderung für die ökonomische Entwicklung eines betroffenen Landes angesehen werden (Gallup und Sachs, 2001).

In der Vergangenheit wurden verschiedene Versuche unternommen, Malaria durch Vektorkontrolle, die intensive chemotherapeutische Behandlung Erkrankter sowie die Aufklärung der betroffenen Bevölkerung einzudämmen. Obwohl in einigen Gebieten ein teilweise beträchtlicher Rückgang der Krankheits- und Sterberate verzeichnet werden konnte, ist eine umfassende Lösung für das tropische Afrika sowie viele Gebiete Süd-Ost-Asiens noch immer nicht in Sicht (Greenwood et al., 2005).

1.4 Lebenszyklus des Malaria-Erregers *Plasmodium*

Protozoa der Gattung *Plasmodium* sind obligate Endoparasiten, deren komplexer Lebenszyklus aus drei grundsätzlichen Entwicklungsstadien bestehen: dem innerhalb des Moskitos der Gattung *Anopheles*, sowie dem Leber- und Blutstadium im Vertebraten-Wirt. Der Zyklus ist unbedingt mit einem Wechsel des Wirts sowie dem Wechsel von sexueller zu asexueller Reproduktion verbunden. Dabei findet die sexuelle Entwicklung im Insekt statt, während asexuelle Stadien ausschließlich im Blut von Vertebraten auftreten (Marti et al., 2004).

Es sind kleinere Unterschiede in der Entwicklung verschiedener *Plasmodium*-Spezies und Stämme zu beobachten, jedoch ist das Grundprinzip in allen gleich. Die folgende Beschreibung sowie die Grafik beziehen sich auf *P. falciparum*, den Erreger der Malaria tropica.

1.4.1 Sexuelle Fortpflanzung

Weibliche *Anopheles*-Mücken nehmen während eines Blutmahls an einem mit *Plasmodium* infizierten Menschen den Parasiten in Form von weiblichen und männlichen Gametozyten auf. Diese verschmelzen im Mitteldarm der Mücke zu einer diploiden Zygote, die sich in die Länge streckt und als Ookinet durch das Darmepithel in die umgebende Muskelschicht eindringt. Nach der Transformation zur Oozyste und darauffolgender multipler Duplikation des Zellkerns bilden sich Tausende von Sporozoiten, die anschließend aktiv über die Hämolymphe in die Speicheldrüse der *Anopheles*-Mücke einwandern (Cowman und Crabb, 2006).

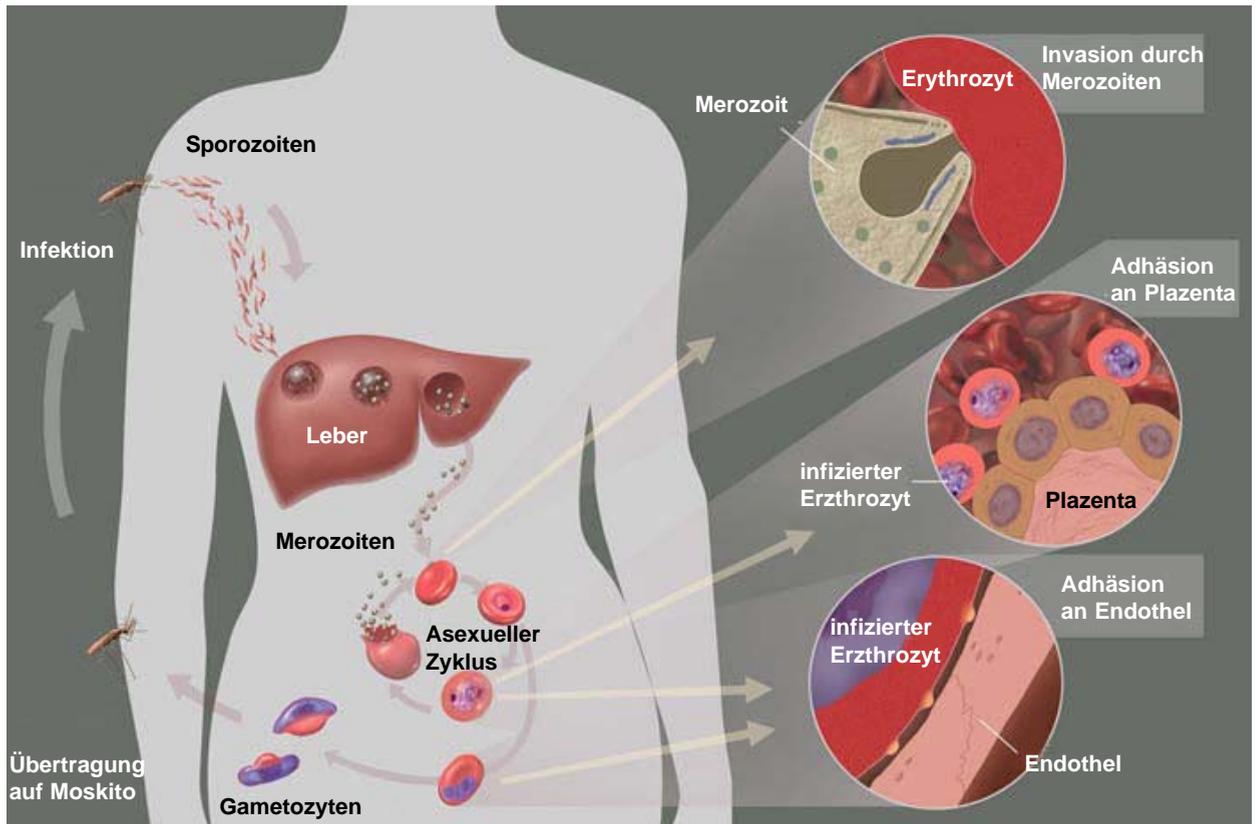


Abbildung 1.3

Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* (verändert nach <http://history.nih.gov/exhibits/bowman/SSmalaria.htm>)

Im Entwicklungszyklus von *Plasmodium* kommt es zu einem Wirtswechsel vom Arthropoden (*Anopheles*-Moskito) zum Vertebraten (Mensch). Weibliche Mücken nehmen beim Blutmahl an einem infizierten Menschen weibliche und männliche Gametozyten, aus denen nach dem Durchlaufen eines sexuellen Reproduktionszyklus infektiöse Sporozoiten entstehen.

Diese werden während einer erneuten Blutmahlzeit auf den Menschen übertragen. Der Parasit reproduziert sich zunächst einmal in Hepatozyten. Die entstehenden Merozoiten infizieren daraufhin Erythrozyten und es folgt die zyklisch verlaufende, asexuelle Vermehrung in roten Blutzellen. Durch die Präsentation verschiedener parasitärer Antigene auf der Oberfläche der Wirtszelle erlangen die infizierten Zellen die Fähigkeit zur Adhäsion an Endothelzellen der Blutkapillaren in verschiedenen Organen oder auch der Plazenta.

Nach einigen Zyklen der erythrozytären Vermehrung bilden sich sexuelle Stadien, die von Moskitos zusammen mit Blut aufgenommen werden können.

1.4.2 Asexuelle Fortpflanzung

Eine Infektion des Menschen mit *Plasmodium* erfolgt, wenn ein bereits infizierter Moskito während eines Blutmahls Sporozoiten zusammen mit Speichelflüssigkeit in subkutanes Gewebe

oder, weitaus seltener, direkt in den Blutstrom des Wirtes injiziert (Cowman und Crabb, 2006; Miller et al., 2002). Im nächsten Entwicklungsschritt erfolgt die aktive Invasion von Leberzellen. Vor dem Eindringen in eine Hepatozyte müssen die Sporozoiten zuerst eine Kupffer'sche Zelle passieren, ein Vorgang der etwa 15-30 Minuten nach der Infektion stattfindet (Frevort et al., 1993). Außerdem gibt es Hinweise, dass ein Sporozoit mehrere Hepatozyten passiert, bevor der nächste Entwicklungsschritt induziert wird (Mota et al., 2001). Innerhalb der Hepatozyten differenzieren sich die Sporozoiten zu mehrkernigen Leber-Schizonten, die wiederum sich durch mitotische Teilung zu mehreren zehntausend Merozoiten entwickeln (Miller et al., 2002). Am Ende dieses ersten asexuellen Zyklus werden die Merozoiten aus der aufgebrochenen Hepatozyte in den Blutstrom entlassen, woraufhin die Invasion der Erythrozyten stattfindet. Die asexuelle Vermehrung in den roten Blutzellen nimmt bei *Plasmodium falciparum* etwa 48 Stunden in Anspruch.

Beim Eindringen in den Erythrozyten bildet *Plasmodium* eine parasitophore Vakuole aus, die dem Parasiten in der Folge als geeigneter Raum für Wachstum und Vermehrung dient (Bozdech et al., 2003). Die erste Entwicklungsphase, das sogenannten Ringstadium, ist durch eine niedrige metabolische Aktivität sowie geringe Veränderungen von Morphologie und Größe gekennzeichnet (de Rojas und Wasserman, 1985).

Im Gegensatz dazu sind für das nachfolgende Trophozoitenstadium eine hohe metabolische Aktivität, Zunahme an Größe sowie die Replikation des Genoms charakteristisch. Als Energie- und damit Aminosäurequelle dient während dieser Entwicklungsphase das Hämoglobin der Wirtszelle, welches über spezielle Transporter aufgenommen und durch Cystein- und Aspartatproteasen gespalten wird. Die beim Abbau anfallende, cytotoxische Häm-Gruppe des Moleküls wird in der Nahrungsvakuole des Parasiten zum für *Plasmodium*-Infektionen charakteristischen Hämozoin kristallisiert und gespeichert (Francis et al., 1997).

Die letzte Phase der intraerythrozytären Entwicklung, das sogenannte Schizonten-Stadium bereitet den Parasiten auf die Re-Invasion neuer Erythrozyten vor. Durch vielfache Replikation des Genoms und einhergehende Kernteilungen bilden sich bis zu 32 Merozoiten, die beim Aufbrechen des Erythrozyten in den Blutstrom entlassen werden (Cowman und Crabb, 2006). Nach dem Durchlaufen mehrerer asexueller Generationen differenzieren einige Parasiten zu sexuellen Gametozyten, weiblichen Makro- und männlichen Mikrogametozyten. Diese können von einer Mücke aufgenommen werden und den Lebenszyklus von *P. falciparum* komplettieren.

1.5 Klinische Merkmale der Malaria

Die durch *Plasmodium falciparum* verursachte Malaria tropica ist eine schnell fortschreitende Infektion, die bei fehlender, falscher oder verspäteter Diagnose in die schwere Verlaufsform münden kann (Miller et al., 2002).

Die ersten Indizien für eine Malaria treten erst rund ein bis zwei Wochen nach der eigentlichen Infektion auf, da das Leberstadium asymptomatisch verläuft (Todryck und Hill, 2007). Das Muster des Krankheitsverlaufs in den endemischen Gebieten hängt stark von der individuellen Immunantwort des Patienten ab, zeigt aber im Allgemeinen zuerst die Symptome Kopfschmerzen, leichtes Fieber, Erschöpfung und Unwohlsein (Marsh und Snow, 1997). Eben diese Symptome werden vor allem durch das Aufbrechen der Erythrozyten verursacht, wobei Malaria-Antigene, das Hämozoïn und weitere Stoffwechselprodukte in den Blutkreislauf gelangen. Diese Substanzen stimulieren Makrophagen zur Produktion von TNF- α und proinflammatorischen Cytokinen, wodurch eine Immunantwort induziert wird. Außerdem lösen hohe TNF- α -Konzentrationen körperliche Reaktionen wie Durchfall und Übelkeit aus (Kwiatkowski et al., 1989).

Durch die Synchronisierung der parasitären Schizogonie, genauer gesagt durch das fast gleichzeitige Aufbrechen der Erythrozyten, tritt etwa alle 48 Stunden eine Fieberattacke auf, die mit der Dauer des intraerythrozytären Lebenszyklus korreliert. Im Vergleich dazu führen nicht synchronisierte Parasiten zu dauerhaftem, hohem Fieber oder täglichen Fieberattacken. Unbehandelte Malaria führt zu einer chronischen Vergrößerung der Milz des Patienten, da das Organ einerseits durch den Abbau von Erythrozytenfragmenten, andererseits durch die Beteiligung an der Immunantwort stark belastet wird (Rasti et al., 2004).

Die schwere Verlaufsform der Malaria äußert sich des Weiteren in drei übergreifenden Symptomen: Anämie, Koma und respiratorischen Problemen (Marsh und Snow, 1997). Eine schwere Anämie definiert sich über eine Hämoglobin-Konzentration von unter 5 g/L (Warrell et al., 1990) und wird hauptsächlich durch den Verlust an Erythrozyten verursacht. Einen geringeren Einfluss hat dagegen die durch das ausgeschüttete TNF- α verursachte Unterdrückung der Erythropoese (Kirchgatter et al., 2005).

Während der Entwicklung von *P. falciparum* im Erythrozyten induziert der Parasit einige Modifikationen der Wirtszellmembran. Durch die Präsentation verschiedener *P. falciparum*-Antigene an der Oberfläche des Erythrozyten erlangen die Parasiten die Fähigkeit, durch Adhärenz der Wirtszelle an Endothelzellen der Blutkapillaren (Craig und Scherf, 2001) dem wirtseigenen Filtrationssystem zu entgehen, durch das die Milz alte, beschädigte oder eben infizierte Blutzellen aus der Zirkulation entnimmt und abbaut (Miller et al., 2002).

Ausschlaggebend für die Zytoadhärenz ist das *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (*PfEMP1*), eine Gruppe von Membranproteinen, die in der großen *var* Multigen-Familie kodiert ist (Su et al., 1995). Der Parasit ist in der Lage, die Expression der *var*-Gene so zu steuern, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt immer nur eine Version eines *PfEMP1* exprimiert wird. Das befähigt ihn, seinen immunologischen “Mantel” zu wechseln und damit einer spezifischen Immunantwort des Wirts zu entgehen (Craig und Scherf, 2001). *PfEMP1* besitzt unterschiedliche Adhäsionsdomänen und kann dadurch verschiedene Liganden der Wirtszellen binden, darunter ICAM1, CSA und CD36 (Kyes et al., 2001). Die Anheftung der infizierten Erythrozyten in Organen wie Gehirn, Lunge, Leber oder Niere führen zu den bereits beschriebenen Symptomen der schweren Malaria (Miller et al., 2002). Die gestörte Durchblutung der Organe, speziell des Gehirns, kann Koma und Tod des Patienten zur Folge haben (Warrell et al., 1990).

Die respiratorischen Probleme sind hauptsächlich mit einer Laktat-Azidose assoziiert (English et al., 1996). Meist ist überschüssiges Laktat das Resultat von anaerobem Metabolismus im Gewebe, welcher durch Sauerstoffmangel ausgelöst wird. Somit tragen die schwere Anämie sowie die verminderte Durchblutung des Gewebes zu diesem Symptom bei (Marsh und Snow, 1997).

1.6 Chemotherapie der Malaria

In Ermangelung eines wirksamen Impfstoffes ist die die Applikation von Chemotherapeutika die einzig zur Verfügung stehende Möglichkeit, Malaria zu bekämpfen (Matuschewski und Mueller, 2007). Erschwert wird die Therapie durch die geringe Anzahl an Wirkstoffen und die beständig zunehmende Verbreitung von resistenten Parasiten, bei denen eine Behandlung mit den gängigen Chemotherapeutika keinen Effekt zeigt (siehe Abbildung 1.4).

Die grundlegende Problematik bei der Entwicklung antiparasitärer Wirkstoffe beruht auf den hinsichtlich ihrer biochemischen Aktivität sehr unterschiedlichen Entwicklungsphasen von *Plasmodium*. Bestimmte Stadien, wie Sporozoiten und Merozoiten, sind metabolisch praktisch komplett inaktiv und bieten Chemotherapeutika somit auch keinen Angriffspunkt. Im Gegensatz dazu besitzt das Schizonten-Stadium einen höchst aktiven Metabolismus und ist folglich auch Ziel der meisten bekannten Chemotherapeutika. Die wichtigsten heutzutage verwendeten Wirkstoffe sind Quinin- und Artemisinin-Derivate sowie Substanzen, die in die Tetrahydrofolat-Biosynthese des Parasiten eingreifen (Linares und Rodriguez, 2007).

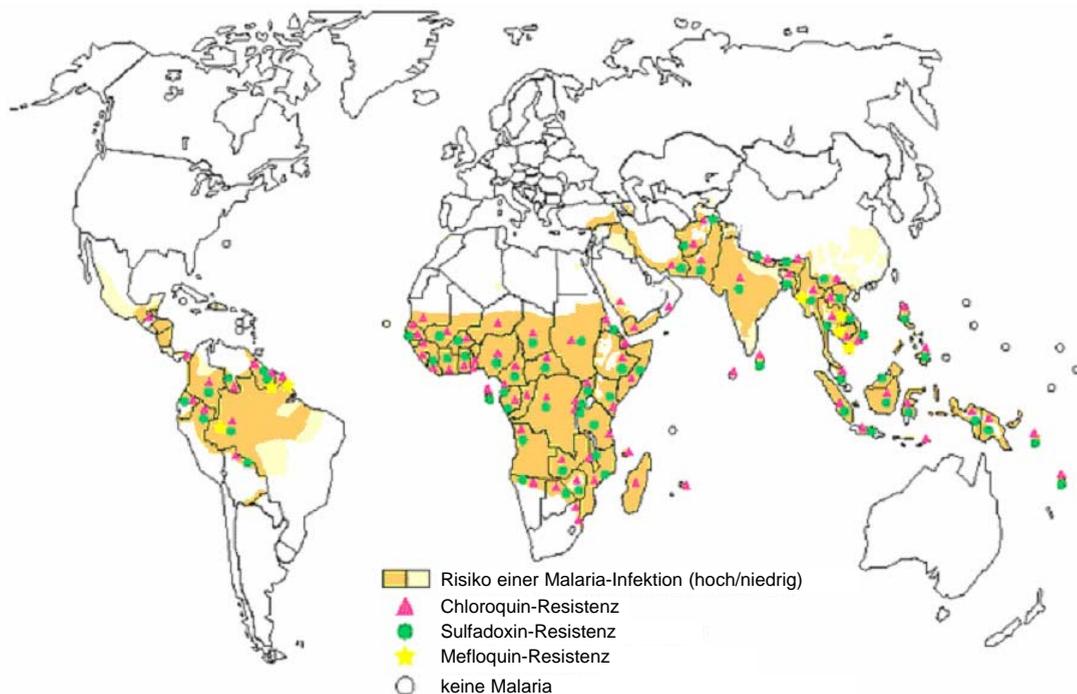


Abbildung 1.4

Verbreitung resistenter Parasiten (verändert nach World Health Organization, 2005)

Durch die Verbreitung von *Plasmodium*-Stämmen, die Resistenzen gegen einen oder sogar mehrere der gängigen Wirkstoffe (Chloroquin, Sulfadoxin, Mefloquin) erlangt haben, ist die Behandlung einer Infektion mit diesen Medikamenten praktisch in den meisten endemischen Gebieten (orange) unwirksam.

1.7 Interaktionen zwischen Parasit und Wirtszelle

Zwar bietet die Ausbildung der parasitophoren Vakuole (PV) *Plasmodium* den Vorteil, seine Entwicklung innerhalb eines vom umgebenden Erythrozyten geschützten, physiologischen Milieus fortzusetzen, allerdings bringt diese evolutionäre Entscheidung auch eine Reihe von Nachteilen mit sich. So hat der Parasit beispielsweise keinen direkten Zugang zum Zytoplasma des Erythrozyten und den dort vorhandenen Nährstoffen.

Als terminal differenzierte Zelle verfügt ein Erythrozyt außerdem weder über eine endozytotische Maschinerie noch über ein Protein-Exportsystem. Dementsprechend ist auch keine *de novo* Protein- oder Lipidbiosynthese mehr möglich (Schrier, 1985; Chasis et al., 1989). Im Verlauf der

intraerythrozytären Reifung ist *Plasmodium* daher gezwungen, sowohl Strategien für die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Blutstrom zu entwickeln als auch dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen (Cooke et al., 2004). Somit ist es für Reifung und Überleben des Parasiten eine essenzielle Notwendigkeit, ein eigenes Protein-Exportsystem aufzubauen und zu regulieren, um Proteine und Lipide zu verschiedenen Zielen inner- und außerhalb der Wirtszelle lenken zu können. Die vom Parasiten induzierten Veränderungen verursachen entscheidende Veränderungen der morphologischen, biochemischen und funktionellen Eigenschaften des Erythrozyten (Marti et al., 2005).

Im Zuge der Invasion beginnt der Parasit, neben der Ausbildung der PV ein Netzwerk von Membranstrukturen im Zytoplasma des Erythrozyten aufzubauen (Horrocks und Muhia, 2005). Diese Strukturen werden als “tubovesicular membrane network” (TVM) sowie als Maurer's Clefts (MC; Lanzer et al., 2006) bezeichnet, wobei das TVM in direktem Kontakt mit der PV-Membran (PVM) zu stehen scheint (Lauer et al., 1997).

Die möglichen Funktionen der MC schließen Signaltransduktion, Reifung der Merozoiten, die Phospholipidbiosynthese und weitere biochemische Vorgänge ein (Lanzer et al., 2006).

Betrachtet man den Transport *Plasmodium*-kodierten und -exprimierten Proteinen in den Erythrozyten, so besteht diese aus zwei wesentlichen Schritten: der Sekretion der Proteine in das Lumen der parasitophoren Vakuole und der sich anschließenden Translokation über die Membran der PV in das Zytoplasma des Erythrozyten (siehe Abbildung 1.5). Es wird vermutet, dass der Exportprozess von einer zweiteiligen Signalsequenz vermittelt wird (Horrocks und Muhia, 2005).

Der Export von *Plasmodium*-kodierten und -exprimierten Proteinen in die PV weist alle Charakteristika eines klassischen vesikulären Transports mit den entsprechenden Signalsequenzen auf. Allerdings ist die Translokation eines Proteins über die Membran der PV abhängig von einer weiteren Signalsequenz. Zwei unabhängige Studien (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004) wiesen ein Signal nach, das entweder als PEXEL (*Plasmodium* export element) oder VTS (vacuolar targeting signal) bezeichnet wird. Dieses pentamere Motiv liegt 15-20 Aminosäuren stromabwärts von der N-terminalen ER-Signalsequenz und weist die Konsensussequenz R/KxLxE/Q auf. Lokalisierungsstudien von chimären Proteinen, die aus einer ER-Signalsequenz, dem PEXEL/VTS-Motiv und einem Reporterprotein (green fluorescent protein, GFP) bestanden, lieferten den experimentellen Nachweis, dass das Motiv eine entscheidende Rolle in der Translokation von Proteinen über die PVM spielt (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004; Przyborski et al., 2005b). Der vorherrschende Weg für den Transport von Proteinen aus dem Parasiten in seine Wirtszelle scheint abhängig zu sein von dem pentameren Motiv, trotzdem gibt es einige Proteine wie TRAP oder *Pf*-Sbp-1, die das PEXEL/VTS-Signal nicht tragen und dennoch exportiert werden (Spielmann et al., 2006). Diese Ausnahmen offenbaren somit auch die Existenz eines oder mehrerer weiterer Exportmechanismen.

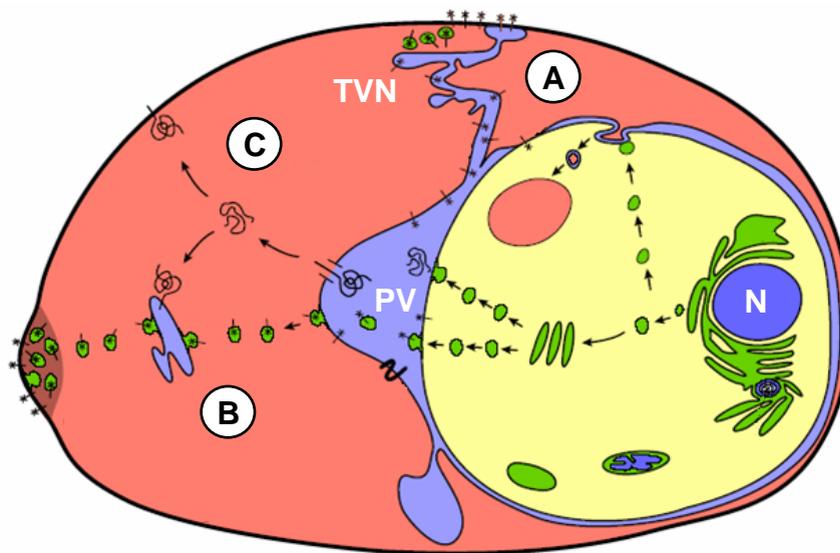


Abbildung 1.5

Proteintransport vom Parasiten in die Wirtszelle (verändert nach Przyborski et al., 2005a)

Es bestehen verschiedene Theorien bezüglich des Proteinexports vom Parasiten in das Zytoplasma sowie an die Oberfläche des Erythrozyten. Demnach können Proteine

A direkt über die PV und die PVM in das Erythrozyten-Zytoplasma abgegeben werden;

B über vesikulären Transport oder über das TVN zu den Maurer's Clefts gelangen, wo sie final prozessiert und verschickt werden;

C von Chaperonen unterstützt zur Zelloberfläche gelangen.

N Nucleus; PV parasitophore Vakuole; TVN tubo-vesikuläres Netzwerk

1.8 Lipide

1.8.1 Rolle der Lipide in der Zelle

Als wichtigste Bestandteile einer Zelle, der Grundeinheit eines jeden Organismus, sind neben Proteinen, Nukleinsäuren und weiteren biochemischen Substanzen vor allem die Lipide zu nennen. Sie sind es, die durch ihre Struktur Membranen ausbilden können, welche Zellen und deren Organellen umschließen um so strukturell und biochemisch voneinander getrennte Kompartimente zu erzeugen. Diese räumliche Trennung erlaubt das parallele Ablaufen einer Reihe teilweise gegensätzlicher chemischer Reaktionen, was in der Evolution eine unerlässliche Voraussetzung für die zunehmende Komplexität der Zellen und Organismen war. Neben ihrer Funktion als Strukturkomponenten in Zellmembranen dienen Lipide auch als Energiespeicher, im

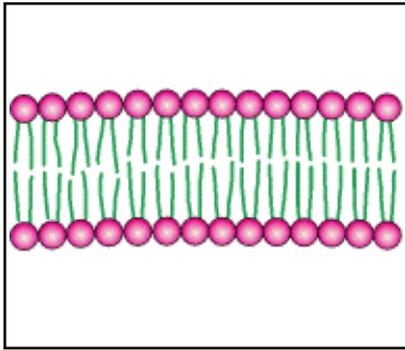


Abbildung 1.6
Schematische Darstellung
einer Lipid-Doppelschicht in
Wasser

(Berg et al., 2005)

Die amphipatischen, membranbildenden Lipide ordnen sich spontan so, dass nur die hydrophilen Kopfgruppen dem wässrigen Milieu zugewandt sind, die hydrophoben Schwänze hingegen im Inneren der Doppelschicht vom Wasser abgeschirmt sind.

vesikulären Transport, aber vor allem als Signalmoleküle in Signaltransduktionswegen.

Als Lipide bezeichnet wird die chemisch sehr heterogene Klasse weitgehend hydrophober Substanzen, die sich schlecht in Wasser, aber sehr gut in organischen Lösungsmitteln wie Ether, Benzol oder Chloroform lösen. Sie werden unterteilt in neutrale und polare Lipide. Zu den neutralen Lipiden gehören die Triglyzeride, Cholesterin (ein Isoprenoid) und fettlösliche Vitamine, zu den polaren Lipiden gehören die Phospho-, Glyko- und Sphingolipide.

Das wichtigste Merkmal der membranbildenden Lipide besteht ist ihre amphipatische Eigenschaft, d.h., sie enthalten sowohl hydrophile als auch hydrophobe Gruppen. Das Molekül besteht aus einer Fettsäure, die durch ein hydrophiles Kopfstück (z.B. Inositol) und einen langen hydrophoben Schwanz aus Alkylgruppen charakterisiert ist. Bringt man solche Fettsäuren in Wasser, bildet sich spontan eine Doppelschicht aus, bei der die Kopfgruppen zum Wasser hin orientiert sind und deren Schwanzgruppen über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander interagieren

(siehe Abbildung 1.6). Aufgrund ihrer exponierten Stelle an Membranen treten diese Lipide ständig in Kontakt mit integralen und peripheren Membranproteinen sowie mit Enzymen, durch die sie modifiziert werden können. Dementsprechend können die Phospho-, Glyko-, und Sphingolipide sowie das Cholesterin einer eukaryotischen Zelle indirekt wie direkt an unterschiedlichsten Prozessen wie der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, Signaltransduktion, Membran- und Vesikeltransport sowie Zellwachstum beteiligt sein.

1.8.2 Struktur und Funktion der Phospholipide

Phospholipide stellen eine Untergruppe der polaren Lipide dar, für die eine Phosphorsäureester-Gruppe charakteristisch ist. Zusammen mit den anderen polaren Lipiden - Glykolipiden und Cholesterin - sind Phospholipide wesentlich am Aufbau von biologischen Membranen beteiligt und zählen folgerichtig zu den Strukturlipiden. Phospholipide sind in allen Organismen in unter-

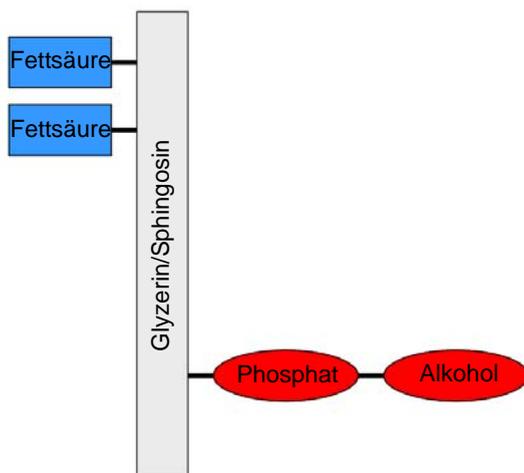


Abbildung 1.7

Schematische Struktur der Phospholipide

Die membranbildenden Phospholipide besitzen amphipathischen Charakter: an das Grundgerüst aus Glycerin oder Sphingosin sind zwei hydrophobe Fettsäurereste sowie über einen Phosphatrest die hydrophile Kopfgruppe (Alkohol) kovalent gebunden.

schiedlichen Mengen verbreitet. Beim Menschen kommen sie besonders reichlich im Zentralen Nervensystem und den Myelinscheiden der Neuronen vor. Phospholipide unterteilen sich in die vom Glycerin abgeleiteten Phosphoglyceride und die vom Sphingosin abgeleiteten Sphingolipide.

Ein Phospholipidmolekül ist aus vier Komponenten aufgebaut: Ein Grundgerüst aus Glycerin oder Sphingosin ist kovalent mit zwei Fettsäurereste und einer Phosphatgruppe verbunden, von denen letztere einen alkoholischen Rest trägt (siehe Abbildung 1.7).

Das einfachste Phosphoglycerid, welches keine weiteren Gruppen gebunden hat, ist das Diacylglycerin-3-Phosphat. Es kommt in der Membran nur in geringen Mengen vor, ist jedoch eine Schlüsselsubstanz bei der Biosynthese anderer Phosphoglyceride, bei

der sich eine Esterbindung zwischen der Phosphatgruppe des Diacylglycerin-3-Phosphats mit der Hydroxylgruppe eines Alkohols ausbildet. Diese Alkoholkomponenten in Phosphoglyceriden sind gewöhnlich Inositol, Cholin, Serin, Ethanolamin oder Glycerin. Dementsprechend werden die Endprodukte als Phosphatidylinositol, Phosphatidylcholin usw. bezeichnet. Als Beispiel für ein Phospholipid mit Sphingosingerüst kann das Sphingomyelin aufgeführt werden.

Cholesterin hingegen ist ein Phospholipid, das sich strukturell grundlegend von den anderen Phospholipiden unterscheidet. Sein Grundgerüst bildet ein Steroid und es fungiert ebenfalls als Ausgangspunkt für die Synthese einer Vielzahl weiterer Steroide. Es ist in fast allen tierischen Zellen, vor allem in neuronalen Zellen (bis zu 25 %), zu finden. Pflanzen hingegen haben nur wenig Cholesterin, Hefe und Pilze enthalten lediglich Cholesterin-ähnliche Substanzen. Das Cholesterin ist ein für die Fluidität der Plasmamembran essentielles, extrem wasserunlösliches Lipid, welches hauptsächlich in der Leber synthetisiert und mit Hilfe von Lipoproteinen im Körper verteilt wird. Innerhalb der Plasmamembran ist Cholesterin mit integralen Membranproteinen für die Ein- und Ausschleusung von Signalstoffen zuständig.

Die Funktionen der Phospholipide sind vielschichtig, sehr wahrscheinlich ist jedoch, dass sie

multiple und für jedes Phospholipid unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Die Sphingosin- und Glycerin-enhaltenden Phospholipide sind, mit Ausnahme von pathologischen Zuständen, am stärksten im tierischen Nervengewebe konzentriert.

Die Sphingo-, Glyko- und Glycerophosphate besitzen neben ihren strukturellen Aufgaben auch Funktionen bei Interaktion und Kommunikation zwischen Zellen, der Signaltransduktion. Eine in der intrazellulären Weiterleitung extrazellulärer Signale involvierte Gruppe der Phosphoglyzeride umfasst die in verschiedenen Phosphorylierungsstufen auftretenden Phosphatidylinositole (Berridge und Irvine, 1989; Berridge, 1993)

1.8.3 Struktur und Funktion der Phosphatidylinositole

Bei den Phosphatidylinositolen oder deren phosphorylierten Derivaten (Phosphoinositide, PI) handelt es sich um eine Gruppe von Phospholipiden, bei der das Phosphoglyzerolipid mit einem Inositolrest verbunden ist (siehe Abbildung 1.8). In absoluten Mengen gesehen sind sie zwar weniger bedeutend, jedoch kommt ihnen eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion zu, da die Phosphatidylinositole ein wichtiges Ausgangsprodukt für die Synthese einer ganzen Reihe von Botenmolekülen, sogenannten second messengers, darstellen. Außerdem fungieren sie als Ausgangsprodukt für GPI-Anker (Glykosyl-phosphatidyl-inositol), die kovalent Proteine binden und diese als hydrophobe Fettsäure-Anker an die Membran assoziieren.

Phosphatidylinositole zeigen insgesamt eine erstaunliche Vielfalt an Funktionen. So können sie mit integralen, peripheren und zytoplasmatischen Proteinen über deren PI-Bindedomäne interagieren und so z.B. Enzymaktivitäten modifizieren und Konformationsänderungen auslösen. Dadurch sind sie sowohl räumlich als auch zeitlich in der Lage, Prozesse wie Proteintransport/-

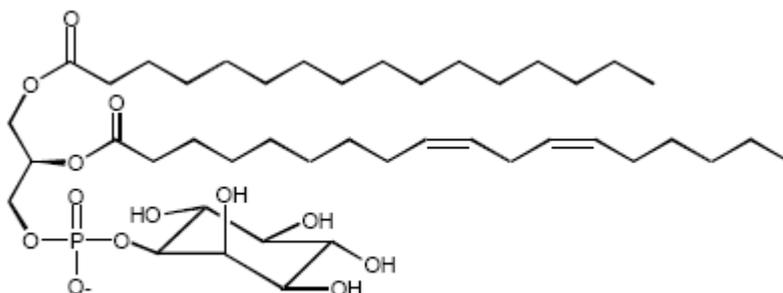


Abbildung 1.8
Struktur eines
Phosphatidylinositols (nach
Toker et al., 1994)
 Bei Phosphatidylinositol ist der
 Zuckerrest kovalent an das
 Phosphoglyzerolipid gebunden.

export und Signaltransduktion zu regulieren (Berridge und Irvine, 1989; Behnia und Munro, 2005).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die verschiedenen PI-Spezies auch unterschiedliche subzelluläre Lokalisierungen aufweisen. So zeigen die Membranen des Golgi-Apparates eine Anreicherung von Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI4P), während stärker phosphorylierte Derivate wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI4,5P₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PI3,4,5P₃) hauptsächlich an der dem Zytosol der Zelle zugewandten Seite der Plasmamembran zu finden sind. Endosomale Organellen werden wiederum durch Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) und die davon abgeleiteten Derivate charakterisiert. Damit konnte postuliert werden, dass die Verteilung der PI zur Spezifizierung der Organellenidentität notwendig ist, was zur Rekrutierung von Proteinen mit den entsprechenden Bindedomänen führt (de Matteis und de Godi, 2004; di Paolo und de Camilli, 2006).

Interessanterweise können die einzelnen PI-Spezies schnell und reversibel durch die regulierte Aktivität von spezifischen Kinasen und Phosphatasen ineinander überführt werden. Das führt konsequenterweise zu Veränderungen der Bindekapazitäten und dementsprechend der Spezifität und Funktionalität einer Membrandomäne. Folglich müssen PI-metabolisierende Enzyme komplexen Netzwerken innerhalb der Zellen angehören, da sie als empfindliche Schalter für die Generierung subzellulärer Pools von PI mit dazugehörigen, spezifischen Funktionen fungieren. In den meisten Fällen findet die Interaktion über elektrostatische Wechselwirkungen statt, bei der die negativ geladene, polare Kopfgruppe des Lipids lose an die positiv geladenen Reste des Proteins bindet.

Trotz erheblicher Forschungsanstrengungen ist es nach wie vor nicht eindeutig geklärt, wie die gleiche PI-Spezies abhängig von dem physiologischen Zustand der Zelle oder des Organells in der Lage ist, unterschiedliche Prozesse zu beeinflussen.

Das wohl bekannteste Beispiel für ein in einen Signaltransduktionsmechanismus involviertes Phosphoinositid beginnt mit Aktivierung der membrangebunden Phospholipase C (PLC) durch ein aktives G-Protein. Dabei spaltet die PLC das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI4,5P₂) in eine membranständige Einheit, den Lipidschwanz Diacylglycerol (DAG), und eine lösliche Einheit, bestehend aus der polaren Kopfgruppe, dem Inositol-3,4,5-triphosphat (IP₃). IP₃ wandert zum ER und öffnet dort Ca²⁺-Kanäle, während DAG die Proteinkinase C aktiviert. Die Proteinkinase C benötigt zur Aktivierung wiederum Ca²⁺ und kann dann eine Reihe von Zielproteinen phosphorylieren, die sich von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden. Dieser Signalweg konnte auch in *Plasmodium* nachgewiesen werden (Elabaddi et al., 1994), wo er eine Rolle bei der Exflagellation von männlichen (Mikro-)Gametozyten spielt (Martin et al., 1994).

Die enorme Bandbreite an Funktionen, die ein einzelnes PI haben kann, kann durch (PI4,5P₂) veranschaulicht werden. So kann es neben der bereits angeführten Rolle als Substrat für die PLC

auch als Substrat für eine TypI PI3-Kinase dienen, die es in ein dreifach phosphoryliertes PI überführt. (PI3,4,5P₃) greift dann in humanen Zellen in Prozesse wie z.B. Zellwachstum und -proliferation, Resistenz gegen Apoptose, Regulierung der zytoskelettalen Dynamik, Membrantransport und sogar in die vielfältigen metabolischen Antworten der Zelle auf Insulin ein (Cantley, 2002).

1.9 Lipide in *P. falciparum*

Wie alle anderen eukaryotischen Zellen besitzen auch *Plasmodium ssp.* die enzymatische Ausstattung für einen funktionierenden Lipid-Metabolismus (Gardner et al., 2002). Bei der außergewöhnlichen Situation eines *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten fällt auf, dass dieser durch das Fehlen sämtlicher Organellen konsequenterweise auch über keine Möglichkeit verfügt, Lipide neu zu synthetisieren (van Deenen, 1979). Da der Parasit eigene Strukturen wie die Maurer's Clefs und das TVM innerhalb des Erythrozyten aufbauen muss, geht mit der Invasion eine beträchtliche Steigerung der Syntheserate für Phospholipide einher. So steigt der Gehalt der Phosphoinositide, absolut gesehen, von 3% auf 11% (Vial et al., 1990). Neben den Funktionen als Membranlipide und als Ausgangspunkt für die Synthese von Botenmolekülen sind die Phosphoinositide auch das initiale Substrat für die Bildung von GPI-Ankern. Hierbei werden im ER Zuckerreste sequenziell an das PI-Gerüst addiert. Die für den Menschen und Wirt toxischen Eigenschaften von GPI wurden bereits in vielen Arbeiten beschrieben (Schofield und Hackett, 1993; Naik et al., 2000; Debierre-Grockiego et al., 2006) Dabei sind die Mehrheit der während des asexuellen Blutstadiums auf der Oberfläche des Erythrozyten exponierten *Plasmodium*-Proteine über GPI-Anker in der Plasmamembran fixiert. Diese Proteine (unter anderem das "merozoite surface protein" (MSP)-1, -2, -4, -5, -10, rhoptry-associated membrane antigen, apical sushi protein, Pf92, Pf38, Pf12, und Pf34) sind Angriffspunkte für neutralisierende Antikörper oder dienen als vielversprechende Kandidaten für Vakzine (Gilson et al., 2006). Dementsprechend sind potenziell sämtliche an der PI- und an der GPI-Biosynthese beteiligten Enzyme Ziele für Wirkstoffentwicklung und Vakzinierungsstrategien sofern sie sich ausreichend vom menschlichen Ortholog unterscheiden.

1.10 PI-metabolisierende Enzyme

Der Phosphoinositid-Metabolismus ist als Schlüsselereignis in der Übertragung von mitogenen und entwicklungspezifischen Signalen in Reaktion auf Hormone und Wachstumsfaktoren. Bis jetzt wurden zwei Signaltransduktionswege charakterisiert, der PLC-Weg und die Phosphorylierung von PI an der C-3 Position, um Lipid-Botenmoleküle zu generieren.

Jede eukaryotische Zelle besitzt, wie bereits beschrieben, eine Reihe von Enzymen, die an einem oder beiden dieser Prozesse und somit direkt wie indirekt an der Regulation spezifischer PI-Pools beteiligt sind.

So existieren an den verschiedenen Organellen unterschiedliche PI-Spezies durch die Aktivität der verschiedenen Isoformen von Kinasen und Phosphatasen (siehe Tabelle 1.1).

In einem einzelligen Parasiten wie *Plasmodium*, der während der Evolution bereits eine Verkleinerung seines Genoms vorgenommen hat, stellt sich die Situation reduziert dar. So besitzt *Plasmodium* sämtliche Enzyme, die z.B. für den Phospholipid-Metabolismus notwendig sind, ebenso eine Vielzahl von Enzymen wie die Phospholipase C oder die DAG-Kinase, die für eine funktionierende Signaltransduktion benötigt werden, allerdings ist die Anzahl der Isoformen der jeweiligen Enzyme weitaus geringer als z.B. in Säugerzellen.

1.10.1 PI-metabolisierende Kinasen

Der erste Schritt in der Synthese des Botenmoleküls Inositol-1,4,5-Triphosphat besteht in der Phosphorylierung von Phosphatidylinositol an der C-4 Position durch eine Phosphatidylinositol-4-Kinase (PI4K). Die weiteren Schritte beinhalten dann die Phosphorylierungsreaktionen durch eine Phosphatidylinositol-3-Kinase und eine Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase (PI4P5K). Alle Enzyme weisen eine hochkonservierte, katalytische Lipidkinase-Domäne an ihrem C-Terminus auf, die entfernt verwandt ist mit der Proteinkinase-Domäne.

Phosphatidylinositol-Kinasen von Säugern werden außerdem unterschiedlichen Typen zugeordnet. So werden PI-3-Kinasen in die Typen I, II und III eingeteilt, wobei eine erste Unterscheidung aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifität zu treffen ist. Typ I ist als heterodimeres Enzym definiert, das aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit aufgebaut ist. Dabei wird noch einmal aufgrund von Sequenzunterschieden zwischen Typ IA und IB differenziert. Typ II und Typ III werden aufgrund von Struktur- und Funktionsunterschieden voneinander getrennt.

Tabelle 1.1 Eigenschaften von PI- und PIP-Kinasen (nach Roth, 2002)

Enzym	Lokalisierung	Spezies	Molekulargewicht	Substrat	Produkt
3-Kinasen					
PtdIns3KIII	Golgi, Endosom	Säuger	101	PtdIns	PtdIns(3)P
VPS34p	Golgi, Endosom	<i>S. cerevisiae</i>	101	PtdIns	PtdIns(3)P
PtdIns3KIIC2 α	Clathrin Pits	Säuger	170	PtdIns	PtdIns(3)P
				PtdIns(4)P	PtdIns(3,4)P ₂
				PtdIns(4,5)P ₂	PtdIns(3,4,5)P ₃
4-Kinasen					
PtdIns4KIII β	Golgi	Säuger	90	PtdIns	PtdIns(4)P
PikI	Nukleus, Golgi	<i>S. cerevisiae</i>	125	PtdIns	PtdIns(4)P
PtdIns4KII α	Golgi, Synapse	Säuger	55	PtdIns	PtdIns(4)P
PtdIns4KII β	PM, ER, Golgi	Säuger	55	PtdIns	PtdIns(4)P
LSB6/PIK2	?	<i>S. cerevisiae</i>	55	PtdIns	PtdIns(4)P
5-Kinasen					
PIP5KA	PM	Säuger	61	PtdIns	PtdIns(5)P
				PtdIns(4)P	PtdIns(4,5)P ₂
				PtdIns(3)P	PtdIns(3,5)P ₂
				PtdIns(3,4)P ₂	PtdIns(3,4,5)P ₃
PIP5KB	PM	Säuger	61	PtdIns	PtdIns(5)P
				PtdIns(4)P	PtdIns(4,5)P ₂
				PtdIns(3)P	PtdIns(3,5)P ₂
				PtdIns(3,4)P ₂	PtdIns(3,4,5)P ₃
PIP5KC	Synapse		87, 90	PtdIns(4)P	PtdIns(4,5)P ₂
				PtdIns(3)P	PtdIns(3,5)P ₂
				PtdIns(3,4)P ₂	PtdIns(3,4,5)P ₃
Mss4	Nukleus, PM	<i>S. cerevisiae</i>	89	PtdIns(4)P	PtdIns(4,5)P ₂
				PtdIns(3)P	PtdIns(3,4)P ₂
PIKfyve	Spätes Endosom	Säuger	235	PtdIns	PtdIns(5)P
				PtdIns(3)P	PtdIns(3,5)P ₂
Fab1p	Vakuole	<i>S. cerevisiae</i>	257	PtdIns(3)P	PtdIns(3,5)P ₂

Typ II besteht aus drei katalytischen Isoformen C2 α , C2 β und C2 γ , besitzt aber keine regulatorischen Untereinheiten. So werden C2 α und C2 β im gesamten Körper exprimiert, C2 γ hingegen ausschließlich in Hepatozyten. Typ III-Kinasen sind in der Funktion Typ II sehr ähnlich, strukturell allerdings näher an Typ I (Lindmo und Stenmark, 2005).

PI4P5-Kinasen werden nach ähnlichen Maßstäben unterteilt, so gibt es die Typen 1A, 1A, 1C, 2A, 2B und 2C.

1.10.1.1 Phosphatidylinositol-4-Kinasen

Die Einteilung der PI4-Kinasen unterscheidet sich historisch bedingt von den anderen PI-Kinasen. So wurde als Typ I eine potenzielle Kinase bezeichnet, die als PI3-Kinase charakterisiert wurde. Dementsprechend existieren heute nur noch die Typen II α , II β und III α , III β für die Familie der PI4-Kinasen (Balla und Balla, 2006). Die erste in *Saccharomyces cerevisiae* klonierte PI4-Kinase war Pik1p (Flanagan et al., 1993). Kurz darauf konnte nachgewiesen werden, dass sie für das Überleben der Hefezelle essenziell ist (Garcia-Bustos et al., 1994). Strukturell und funktionell konnte das Enzym dem Nukleus (Garcia-Bustos et al., 1994), aber auch dem trans-Golgi zugeordnet werden (Walch-Solimena und Novick, 1999). So konnte bestätigt werden, dass Pik1p für die Aufrechterhaltung der Struktur des Golgi-Apparates sowie dessen sekretorischer Funktion in Hefe benötigt wird (Sciorra et al., 2005). Als interagierendes Protein, das an der korrekten Lokalisierung von Pik1p beteiligt ist, wurde Frequenin, ein Calcium-bindendes, N-myristoyliertes Protein identifiziert (Hendricks et al., 1999). Die erste Säuger-Phosphatidylinositol-4-Kinase wurde 1994 kloniert und charakterisiert (Wong et al., 1994). Biochemische Analysen zeigten anschließend, dass den verschiedenen Isoformen auch unterschiedliche subzelluläre Lokalisierungen zuzuordnen sind (Wong et al., 1997). In *Arabidopsis thaliana* wurde nachgewiesen, dass PIPK1 an das Aktin-Zytoskelett gebunden vorliegt und PI4K1 ebenfalls dorthin rekrutiert (Davis et al., 2007). Diese Daten bestätigen insgesamt die funktionelle Diversität, die von Phospholipiden, speziell den Phosphatidylinositolen, ausgeht und damit deren synthetisierende Enzymen zu einem Gegenstand intensiver Forschung machen.

1.10.2 PI-metabolisierende Phosphatasen

Die diverse Unterfamilie der PI-metabolisierenden Phosphatasen aus der Familie der Hydrolasen kann in zwei Enzymklassen eingeteilt werden. Zum einen die PI-5-Phosphatase, die die Reaktion $\text{PI}(4,5)\text{P}(2) \rightarrow \text{PI}(4)\text{P} + \text{P}$ katalysiert, zum anderen die, die in der Lage ist, mehrfach phosphorylierte Substrate wie $\text{PI}(1,4,5)\text{P}_3$ und/oder $\text{PI}(1,3,4,5)\text{P}_4$ an der C-5 Position des Inositolrings zu dephosphorylieren. Der herausragende Unterschied zwischen diesen beiden Klassen ist die fehlende Eigenschaft der Inositol-Polyphosphat 5-Phosphatase, Phosphatidylinositole zu verstoffwechseln. Sie ist ausschließlich in der Lage phosphorylierte Inositole wie das Botenmolekül

Ins1,4,5triphosphat zu dephosphorylieren, was gleichzeitig eine Beteiligung an Signaltransduktionsmechanismen impliziert. Die PI-5-Phosphatase hingegen kann beide Reaktionen katalysieren, jedoch wird angenommen, dass sie *in vivo* Phosphatidylinositole gegenüber den Inositolphosphaten bevorzugt. Die Bedeutung dieser Phosphatasen wird z.B. durch das Lowe-Syndrom verdeutlicht, einer seltenen, X-chromosomal vererbten Erkrankung, die durch geistige Behinderung, kongenitalen Katarakt und eine renale Tubulopathie charakterisiert ist. Auslöser hierfür ist eine Mutation im OCRL-Gen, welches für eine Polyphosphatidylinositol-5-Phosphatase kodiert.

1.10.2.1 Synaptojanin

Der Name Synaptojanin ist einerseits abgeleitet von Janus, dem römischen Gott des Ein- und Ausgangs sowie der zellulären Lokalisierung, an der das Enzym zum ersten Mal beschrieben wurde, der Synapse. Synaptojanine sind Polyphosphatidylinositol-Phosphatasen, die an der Plasmamembran der Synapse Endozytose-beteiligte Proteine binden und dadurch indirekt am Recycling von Neurotransmittern beteiligt sind.

Synaptojanine zeigen prinzipielle Strukturmerkmale. So gibt es ein bis zwei N-terminale "Suppressor of Actin"-(Sac)-Domänen (homolog zu *S. cerevisiae* Sac1p), eine zentrale PI5Phosphatase-Domäne sowie eine C-terminale "Proline rich domain" (PRD).

Die Sac-Domäne zeigt dabei eine Phosphatidylinositolpolyphosphat-Phosphatase Aktivität, bei der das Phosphat von allen drei möglichen Positionen des Inositolrings (3,4 und 5) durch Hydrolyse abgespalten werden kann. Angrenzende Phosphate sind wahrscheinlich aufgrund sterischer Effekte resistent gegen Hydrolyse, d.h., die Sac-Domäne kann kein PI(4,5)P₂, PI(3,4)P₂ oder PI(3,4,5)P₃ dephosphorylieren, aber z.B. PI(3,5)P₂ (www.expasy.org). Eine Ausnahme stellt hSac2 dar, ein Protein, das eine Sac-Domäne enthält und eine PI5Phosphatase-Aktivität bei PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ aufweist (Minagawa et al., 2001).

Synaptojanine vom Typ I reagieren nur mit den löslichen Inositol(3,4,5)P₃ sowie Inositol(1,3,4,5)P₄ und sind wohl an der Termination von Inositol(3,4,5)P₃ induzierter Ca²⁺-Mobilisierung beteiligt (Johanning et al., 2004).

Synaptojanine vom Typ II können sowohl Inositol(3,4,5)P₃, Inositol(1,3,4,5)P₄ sowie PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ dephosphorylieren (Jackson et al., 1995).

Die Sac-Domäne besteht aus sieben hochkonservierten Motiven, die für die regulatorischen sowie katalytischen Eigenschaften der Phosphatase verantwortlich sind. Die C-terminale PRD

fungiert als Interaktionspartner für Proteine mit SH3-Domäne, welche spezifische Bindungen mit Kinasen und Strukturproteinen vermittelt.

Die bisher beschriebenen Synaptojanine erfüllen durchweg für die Zelle wichtige, wenn nicht sogar essenzielle Funktionen. So konnte in *C. elegans* gezeigt werden, dass verschiedene, mutierte Isoformen zu einem fehlerhaften Recycling der synaptischen Vesikel führten (Harris et al., 2000). Spleiß-Varianten des humanen Synaptojanins konnten zu unterschiedlichen Zeitpunkten an Clathrin-bedeckten Bereichen, sogenannten “Clathrin coated Pits”, lokalisiert werden, was die Beteiligung an einem dynamischen PI-Metabolismus während der Endozytose impliziert (Perera et al., 2006).

In *Saccharomyces cerevisiae* existieren neben Sac noch weitere PI-Phosphatasen, unter anderem die Inositolpolyphosphat5-Phosphatasen INP51, INP52 und INP53, die auch Synaptojanin-like (Sjl) 1, 2 und 3 bezeichnet werden (Stolz et al., 1998). Diese fungieren unter anderem als Regulatorproteine für die subzelluläre Verteilung von PI(4,5)P₂ (Stefan et al., 2002). Die Entfernung einzelner Sjl-Gene aus dem Genom hatte keine Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit der Hefezellen, während kombinierte Deletionen von sjl1/sjl2 und sjl2/sjl3 eingeschränktes Zellwachstum zur Folge hatte und die Dreifach-Mutante von sjl1/sjl2/sjl3 letal war (Srinivasan et al., 1997; Stolz et al., 1998).

1.10.3 PI-metabolisierende Phosphatasen und Kinasen in *P. falciparum*

In *Plasmodium falciparum* existieren laut PlasmoDB, der genomischen Datenbank der verschiedenen *Plasmodium*-Spezies, drei Inositolphosphatasen (MAL8P1.151, PF13_0285 und PF07_0024) sowie verschiedene PI-Kinasen, darunter eine Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K; PFE0765w), eine PI3,4-Kinase (PFC0475c), zwei PI4-Kinasen (PFE0485w und PFD0965W) und eine PI4P5-Kinase (PFA0515w).

Für alle genannten Annotationen konnten ESTs nachgewiesen werden, jedoch fehlt eine komplette Charakterisierung der Gene bzw. ihrer Produkte. In *S. cerevisiae* konnte eine genetische Interaktion zwischen Pik1p und den Sjl-Proteinen experimentell belegt werden (Nguyen et al., 2005). Dabei konnte gezeigt werden, dass Pik1p und die drei Sjl-Proteine mehrfach genetisch interagieren, also in denselben Prozess eingreifen, und somit koordiniert den sekretorischen Export über den PI4P-Level regulieren. Damit besteht die Möglichkeit, dass eine derartige Wechselwirkung auch in *Plasmodium* besteht. Die entsprechenden Orthologe von *P. falciparum*

sind die PI4-Kinase (PFE0485w) sowie das Synaptojanin-like Protein *Pf*-Sjl (PF07_0024), die Gegenstand dieser Arbeit sind.

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren, die direkt wie indirekt an Signaltransduktionsmechanismen oder am vesikulären Transport im Parasiten und im Erythrozyten beteiligt sein können.

Zwei solcher Proteine aus *P. falciparum* sind die in PlasmoDB annotierte putative PI4-Kinase *Pf*-PI4K (PFE0485w) sowie die putative Phosphatidylinositol- und Inositol-Polyphosphatase Synaptojanin-like *Pf*-Sjl (PF07_0024). In Hefe konnte eine genetische Interaktion der Orthologe experimentell belegt werden. Diese zwei *P. falciparum*-Gene wurden ausgewählt, um durch verschiedene molekularbiologische Methoden funktionell und strukturell charakterisiert zu werden. So musste die Annotierung der Daten in PlasmoDB in Bezug auf Größe des Transkripts, Start-Kodon und Introns überprüft werden. Desweiteren sollten funktionelle Analysen mittels Deletion des jeweiligen Gens, Komplementation sowie die zelluläre Lokalisierung der Proteine durch Antikörper und GFP-Fusionsproteine nachgewiesen werden.

Die so erhaltenen Daten sollen zu einem besseren Verständnis von grundlegenden Vorgängen in *P. falciparum* führen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborausstattung

Analytische Waagen L310 und 1872	Sartorius, Göttingen
Autoklav Systec 2420	Tuttnauer Systec, Wettenberg
Brutschränke	
B5060EC/CO2	Heraeus Instruments, Hanau
Cell Star Incubator, Cytoperm2	Heraeus Instruments, Hanau
Hera Cell	Heraeus Instruments, Hanau
Digital-Kamera DC 120 zoom	Kodak, New York, USA
Elektrophoreseapparaturen	Biorad, München
Eismaschine AF 30	Scotsman, Mailand, Italien
Elektroporationsgerät (für Parasiten)	
GenePulser II	Biorad, München
Capacitance Extender	Biorad, München
Pulse Controller Plus	Biorad, München
Nucleofector Amaxa	Amaxa GmbH, Köln
Elektroporationsgerät (für Bakterien) EasyJect	Equibio, Ashford, UK
Expositionskassette	Sigma, Taufkirchen
Filmentwicklermaschine Hyperprocessor	Amersham Pharmacia, Freiburg
Feinwaage SBC 32	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Gasbrenner gasprofi 1 micro	WLD-TEC, Göttingen
Gefrierschränke -20°C	Liebherr, Biberach
Gefrierschrank -80°C, UF85-300S	Heraeus Instruments, Hanau
Geigerzähler LB122	Berthold, Wildbad
GS Gene Linker™ UV Chamber	Biorad, München
Heizblock Digi-Block	JR Laboratory devices INC, USA
Hybridisierungsöfen HB-1D	Techne, Cambridge, UK
Hybridisierungsröhren	Techne, Cambridge, UK
Konfokales Laserscanningmikroskop LSM510	Zeiss, Jena

Kühlschränke	Liebherr, Biberach
Kühlzentrifuge Sorvall RC5B, RC5C	Du Pont, Bad Homburg
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Wetzlar
Lichtmikroskop Axiolab	Zeiss, Jena
MACS-Gerät	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mikrowellenherd Micromat	AEG, Nürnberg
Netzgerät Powersupply Power Pac 300	Biorad, München
PCR-Maschine T gradient Thermocycler	Biometra, Göttingen
PC-Software	
Adobe Photoshop 5.0	Adobe Systems Inc, USA
BLASTn	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/
Internet Explorer	Microsoft, Seattle, USA
MS-Office	Microsoft, Seattle, USA
pDRAW32	AcaClone software, www.acaclone.com
QuarkXpress 5.0	Quark Inc, Denver, USA
pH-Meter 537	WTW, Weilheim
Pipetten Pipetman Gilson P20, P200, P1000	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann Labortechnik, Eberstadt
Pipettierhilfe Pipetus Standard	Hirschmann Labortechnik, Eberstadt
Quarzküvetten	Hellma, Mühlheim
Rotoren SS-34, GS-3, GSA, SM24	DuPont Instruments, Bad Homburg
Schüttelinkubator Innova 4000, Innova 4300	New Brunswick Scientific Co. Inc.
Schüttelinkubator Pilot Shake System	Kühner, Korntal-Münchingen
Schüttler GFL 3017	Kühner, Korntal-Münchingen
Spektrophotometer UVIKON 923	Kontron Instruments, Neufahrn
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus Instruments, Hanau
Stickstofftank BT 40	Air Liquide, Ludwigshafen
Szintillationszähler TRI-CARB 2100	Packard, Billerica, USA
Tischzentrifuge MicroCen 13	HeroLab, Wiesloch
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus Instruments, Hanau
Tischzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Ultrazentrifuge RCM11206X	Sorvall, Langensebold
Ultrazentrifuge Rotor Ti100	Beckman Instruments, Palo Alto, USA
UV-Handlampe N-6 L	Benda Laborgeräte, Wiesloch

UV-Tisch Transilluminator	Gibco BRL, Karlsruhe
Vortex Genie2	Roth, Karlsruhe
Wasserbad Julabo 7A	Julabo, Seelbach
Zentrifuge J2-MC	Beckman Instruments, Palo Alto, USA
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge RC5Bplus	Sorvall, Langensebold

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Einmalhandschuhe (Latex)	Hartmann, Heidenheim
Einmalröhrchen Polystyren 6/38 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einmalröhrchen Polystyren 12/75 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Frischhaltefolie Saran	Roth, Karlsruhe
Glaswolle	Sigma, Taufkirchen
Glaskügelchen	Sigma, Taufkirchen
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Kimwipes Lite 200	Kimberley Clark, Darmstadt
Küvetten Plastik	Sarstedt, Nümbrecht
MACS-Säulen CS	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Nitrocellulose-Membran Optitran	Schleicher & Schuell, Einbeck
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Parafilm	American International Can, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße	Corning Incorporation, Bodenheim
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipetten 1, 2, 5, 10, 25 ml	Corning Incorporation, Bodenheim
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PVDF-Membran ImmunoBlot	Biorad, München
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße Safe-Lock 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße Falcon 15, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Sterilfilter 0,2 und 0,5 µm	Schleicher & Schuell, Einbeck
Sterilfiltrationssets	Corning Incorporation, Bodenheim
Szintillationsgefäße 6 ml	Zinsser, Frankfurt
Whatman 3MM Papier	Whatman Paper Company, Dassel
Zentrifugenröhrchen 15, 50 ml	Corning Incorporation, Bodenheim

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Biosciences, Freiburg; Braun, Melsungen; Difco Laboratories, Augsburg; Fermentas, St. Leon-Rot; Fluka, Neu-Ulm; GibcoBRL, Karlsruhe; Gibco Invitrogen, Karlsruhe; Invitrogen, Karlsruhe; JT Baker, Deventer, Niederlande; Merck, Darmstadt; Riedel-de Haen, Hannover; peqlab, Erlangen; Roche, Mannheim; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Taufkirchen.

2.1.4 Puffer, Medien, Lösungen

Alkalischer Lyse-Puffer	0,2 M NaOH 1% (w/v) SDS
Ampicillin-Stammlösung (1.000x)	100 mg/ml Ampicillin in ddH ₂ O
Blockierlösung Western Blot	5% Magermilchpulver in 1x TBS
Chloramphenicol-Stammlösung (500x)	34 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol (absolut)
Coomassie-Färbelösung	5% Methanol 10% Essigsäure 0,125 % Brilliant blue R250

Coomassie-Entfärbelösung	5% Methanol 10% Essigsäure
Cytomix	120 mM KCl 0,15 mM CaCl ₂ 10 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,6 25 mM HEPES pH 7,6 2 mM EGTA 5 mM MgCl ₂
Denhardt's Lösung (100x)	2% Ficoll 2% Polyvinylpyrrolidone 2% BSA
DEPC-H ₂ O	0,05% DEPC
DNA-Elutions-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
Einfrierlösung <i>Plasmodium</i>	28% Glycerol 3% D-Sorbitol 0,65% NaCl
Gelatine-Lösung	0.5% (w/v) Gelatine in RPMI 1640
Hybridisierungspuffer Northern Blot	50% Formamid 5x SSC 1 mM Tris pH 7,5 1x Denhardt's Lösung 10% Dextransulfat 1 mg/ml Lachssperma-DNA
Hypotonischer Lysepuffer	5 mM HEPES, pH 7.4 50 mM NH ₄ Cl 2 mM EDTA

Lade-Puffer DNA (5x)	60% Glycerin 60 mM EDTA 0.25% Bromophenol Blau
LB-Agar	1% (w/v) Trypton/Pepton, pH 7,0 1% (w/v) NaCl 0,5% (w/v) Hefeextrakt 2% (w/v) Bacto-Agar
LB-Medium	1% (w/v) Trypton/Pepton, pH 7,0 1% (w/v) NaCl 0,5% (w/v) Hefeextrakt
MACS-Puffer	1x PBS 0,5% BSA (w/v) 2 mM EDTA
MOPS-Puffer (20x)	0,4 M MOPS 40 mM Natriumacetat 5 mM EDTA (pH 8,0)
PBS (1x)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH_2PO_4 8,1 mM Na_2HPO_4
Prä-Hybridisierungspuffer Northern Blot	50% Formamid 5x SSC 1 mM Tris pH 7,5 1x Denhardt's Lösung 10% Dextransulfat
RPMI-Medium für <i>Plasmodium</i> -Kultivierung	500 ml RPMI 1640 mit 25 mM HEPES, L-Glutamin, NaHCO_3 10% humanes 0+ Serum 200 μM Hypoxanthin 20 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin

SDS-Page-Probenpuffer (2x)	250 mM Tris, pH 6,8 6,6% SDS 24% Glycerin 10 mM EDTA 6% β -Mercaptoethanol Bromphenolblau
SDS-Page-Laufpuffer (1x)	192 mM Glyzin 25 mM Tris, pH 6,8 0,1% SDS
SDS-Page-Transferpuffer (1x)	192 mM Glyzin 25 mM Tris, pH 6,8 20% Methanol 0,01% SDS
SOC-Medium	2% Trypton 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM $MgCl_2$ 10 mM $MgSO_4$ 20 mM Glukose
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat
TAE-Puffer (50x)	200 mM Trizma Base, pH 8,5 10 mM Na-EDTA 57,1 ml Acetat
TBS (1x)	20 mM Tris, pH 7,6 137 mM NaCl
TBST	20 mM Tris, pH 7,6 137 mM NaCl 0,1% Tween

TE	10 mM Tris, pH 8,0 1mM EDTA
TS1 <i>Plasmodium</i> Thawing solution 1	12 % NaCl
TS2 <i>Plasmodium</i> Thawing solution 2	1,6% NaCl
TS3 <i>Plasmodium</i> Thawing solution 3	0,9% NaCl 0,2% Glukose
Waschlösung Northern Blot 1	2x SSC 0,1% SDS
Waschlösung Northern Blot 2	0,1x SSC 0,1% SDS

2.1.5 Molekularbiologische Kits

BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)	Roche, Mannheim
HexaLabel™ DNA Labelling Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
Long Range-PCR Kit	Roche, Mannheim
Micro-FastTrack 2.0 Kit	Invitrogen, Karlsruhe
QIAamp RNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAamp DNA-Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
SuperScript™ III First Strand Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.6 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs GmbH, Schwalbach; MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Invitrogen, Karlsruhe; und Roche, Mannheim bezogen.

2.1.7 Größenmarker Protein und DNA

1 kb+ DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
1 kb DNA-Leiter	peqlab, Erlangen
100 bp DNA-Leiter	peqlab, Erlangen
100 bp DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
supercoiled DNA Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
peqGOLD Protein-Marker I	peqlab, Erlangen
peqGOLD Prestained Protein-Marker III	peqlab, Erlangen

2.1.8 Vektoren

GFP-Transfektionsvektor (<i>P. falciparum</i>) pARL1a+	B. Crabb, Melbourne, Australien
KO-Transfektionsvektor (<i>P. falciparum</i>) pHTK	A. Cowman, Melbourne, Australien
KO-Transfektionsvektor (<i>P. berghei</i>) b3D.DT ^H . ^Δ D	A.P. Waters, Leiden, Niederlande
Proteinexpressionsvektor (<i>E. coli</i>) pGEX-4-T1	Amersham Biosciences, Freiburg
Komplementationsvektor (<i>S. cerevisiae</i>) pESC-TRP	Stratagene, LaJolla, USA

2.1.9 Stämme

<i>P. falciparum</i> 3D7	MR4, Manassas, USA
<i>P. berghei</i> ANKA	A.P. Waters, Leiden, Niederlande
Mäuse NMRI	Naval Medical Research Institute
Ratten Wistar	Sprague Dawley (SD), WIST
<i>E. coli</i> PMC 103	Doherty et al., 1993
<i>E. coli</i> BL21-Ril(DE3)	Novagen, Darmstadt
<i>S. cerevisiae</i> JC203-3	Ales Vancura

2.1.10 Oligonukleotide

Tabelle 2.1 Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer (Thermo, Ulm)

Die Restriktionsschnittstellen stehen, falls vorhanden, in Klammern bzw. sind in der Nukleotidsequenz unterstrichen.

<i>Pf</i>-Sjl Antikörperherstellung	Sequenz 5' - 3'
<i>Pf</i> -Sjl-AK-for1 (BamHI)	CGC GCG <u>GAT CCG</u> AAA TGA CAC ACA ATC ACA GC
<i>Pf</i> -Sjl-AK-rev1 (XhoI)	CCG <u>CTC GAG</u> CGA TCT TCT GAT AAA GCC TCT G
<i>P. falciparum</i> GFP-Konstrukte	Sequenz 5' - 3'
<i>Pf</i> -Sjl-GFP-for1 (XhoI)	CGC <u>CTC GAG</u> ATG AAT GCATAT AAC ACA GAC G
<i>Pf</i> -Sjl-GFP-rev1 (AvrII)	CCG <u>CCT AGG</u> CTT TAT GTA AAT TAC TTT AAA TAC
<i>Pf</i> -Sjl-GFP-rev2 (AvrII)	CCG <u>CCT AGG</u> CTT TCG ATA TAT AAA TAA TGC GGG C
<i>Pf</i> -Sjl-GFP-rev3 (AvrII)	CCG <u>CCT AGG</u> ACT TAA TAA TCT CCA TTT CTC TAC TAC
<i>Pf</i> -Sjl-GFP-rev4 (AvrII)	CCG <u>CCT AGG</u> CGT GTT ATT ACA TGC AGA TGT

P. falciparum* GFP-Konstrukte*Sequenz 5' - 3'**

<i>Pf</i> -Pik-GFP-for1 (XhoI)	CGC <u>CTC GAG</u> ATG GAG GAT GAT AAA GAT AAC
<i>Pf</i> -PI4K-GFP-rev1 (AvrII)	CCG <u>CCT AGG</u> TTC AAT GTC AAC TTC ATT CAG
<i>Pf</i> -PI4K-GFP-rev2 (AvrII)	CCG <u>CCT AGG</u> CTC ATC TTT TAC TCC TTC CTC
<i>Pf</i> -PI4K-GFP-rev3 (AvrII)	CCG <u>CCT AGG</u> ACG CAT ATG TGT AAC TTC ATC
<i>Pf</i> -PI4K-GFP-rev4 (AvrII)	CCG <u>CCT AGG</u> ATC AAC ACA CCC ATT CTT C
<i>Pf</i> -PI4K-GFP-rev5 (AvrII)	CCG <u>CCT AGG</u> GTA GTC ATA CTG GAC ACT TCG

P. falciparum* KO-Konstrukte*Sequenz 5' - 3'**

<i>Pf</i> -Sjl-KO-for-5'UTR (AvrII)	CCG <u>CCT AGG</u> TTG TGT TTG GTA CAC ACG TT
<i>Pf</i> -Sjl-KO-rev-5'UTR (EcoRI)	CCG <u>GAA TTC</u> GAT GCT GTA ATT ATT CCA AAG
<i>Pf</i> -Sjl-KO-for-3'UTR (HpaI)	CCG <u>GTT AAC</u> GGG AAA TAC AGG AAA TAA AG
<i>Pf</i> -Sjl-KO-rev-3'UTR (SpeI)	<u>GGA CTA GTC</u> TAA CTG GTT TAT GAT CAC T
<i>Pf</i> -PI4K-KO-for-5'UTR (AvrII)	CCG <u>CCT AGG</u> GAT ATG AGT TAT CCA AAA TTG
<i>Pf</i> -PI4K-KO-rev-5'UTR (EcoRI)	CCG <u>GAA TTC</u> CTA TTA CTA TCA TCA TCA CC
<i>Pf</i> -PI4K-KO-for-3'UTR (HpaI)	CCG <u>GTT AAC</u> AAC GTG GGA TCT AAA ATG TG
<i>Pf</i> -PI4K-KO-rev-3'UTR (SpeI)	<u>GGA CTA GTA</u> CAT CGA CTG TCA GAT TGG T

P. berghei* KO-Konstrukte*Sequenz 5' - 3'**

<i>Pb</i> -Sjl-KO-for-5'UTR (KpnI)	GTT <u>GGT ACC</u> GTA TAC GTA TAC GTA GCA GTA CTC C
<i>Pb</i> -Sjl-KO-rev-5'UTR (HindIII)	GTT <u>AAG CTT</u> GCA GCA TGC AAA AAT AGC TC
<i>Pb</i> -Sjl-KO-for-3'UTR (BamHI)	GTT <u>GGA TCC</u> ACA TAT GAA TTA TAA GAC AC
<i>Pb</i> -Sjl-KO-rev-3'UTR (XbaI)	GTT <u>TCT AGA</u> ACG AAA ATA TAC AAT TAG CA
<i>Pb</i> -Sjl-KO-Test-for	GAG ATC TAT TGA AGA TAT GC
<i>Pb</i> -Sjl-KO-Test-rev	TTC AAT CAC GAA AAT ATA CAA TTA GC
<i>Pb</i> -PI4K-KO-for-5'UTR (KpnI)	GGG <u>GTA CCC</u> GGG AAA TCA TTC ACA AGG T
<i>Pb</i> -PI4K-KO-rev-5'UTR (HindIII)	CCC <u>AAG CTT</u> ACT GGA TCA TTT AAA TCA GAC
<i>Pb</i> -PI4K-KO-for-3'UTR (BamHI)	CGG <u>GAT CCC</u> GGG GAT CTT AAA TGT GTCATAG
<i>Pb</i> -PI4K-KO-rev-3'UTR (XbaI)	GCT <u>CTA GAG</u> CTG TAG CTC ATT GTA TGT GTC A

Komplementation in *S. cerevisiae***Sequenz 5' - 3'**

<i>Pf</i> -PI4K-YC-for (BamHI)	CCG <u>GGA TCC</u> ATG CGT TTA AGA AAT AGA GA
<i>Pf</i> -PI4K-YC-rev (ApaI)	CAC <u>GGG CCC</u> GTG TAG TCA TAC TGG ACA CTT CG
<i>Sc</i> -Pik1p-YC-for (BamHI)	CCG <u>GGA TCC</u> ATG CAT AAA GCA TCC AGT TC
<i>Sc</i> -Pik1p-YC-rev (ApaI)	CAC <u>GGG CCC</u> GTC TGT GTA ATA AGT TGA AAT TG

2.1.11 Antikörper

Tabelle 2.2 Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Anwendung	Quelle
anti-Synaptojanin	1: 1.000	Western Blot	Eigenherstellung AG Krohne, Würzburg
	1: 200	IFA	
Ziege anti-Meerschwein-Alexa 488 nm	1: 1.000	IFA	Molecular Probes, München
anti-c-myc (AP-konjugiert, monoklonal, Maus)	1: 1.000	Western Blot	Roche, Mannheim
anti-SBP1 (polyklonal, Maus)	1:1.000	IFA	C. Braun-Breton, Montpellier

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Methoden

2.2.1.1 PCR- Polymerase Kettenreaktion

Es wurden 50 µl-Ansätze verwendet. In jedem PCR-Experiment wurde zudem eine Negativkontrolle ohne DNA angesetzt, um eine Kontamination der Bestandteile ausschließen zu können.

Eine PCR Reaktion wurde mit den folgenden Komponenten und Bedingungen durchgeführt:

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>PCR Reaktion</u>			
Reaktionspuffer	1x				
dNTPs	400-800 mM	1	94°C	1-5'	
MgCl ₂ (nach Bedarf)	2 mM	2	94°C	30"] 25-35 x
Primer forward	0.5 pM	3	50-62°C	30"	
Primer reverse	0.5 pM	4	68°C/72°C	3-10'	
DNA template	20-100 ng	5	68°C	10'	
Polymerase	0,05 U/μl				
ddH ₂ O	ad 50 μl				

Die Annealingtemperatur (3) wurde in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Die Extensionstemperatur während des Zyklus (4) sowie des finalen Extensionsschrittes (5) wurden der eingesetzten Polymerase sowie der Länge des PCR-Produkts angepasst, die Zyklenzahl entsprechend der Menge an DNA template gewählt. Bei Reaktionsende wurden die Proben auf 4°C gekühlt.

2.2.1.2 Restriktionsverdau

In analytischen Restriktionsverdau wurden zwischen 100 ng und 500 ng DNA eingesetzt. Für präparative Verdau wurden generell >1 μg verwendet. Ein Verdau enthielt:

50 μL Restriktionsverdau

NEB Reaktionspuffer	5 μl
BSA (10 mg/ml)	5 μl
DNA (100-500 ng)	x μl
DNA Restriktionsendonuklease(n) (1-5 U/μL)	0,5-4 μl
ddH ₂ O	ad 50 μl

Der jeweilige Puffer sowie die Konditionen für Doppelverdau wurden entsprechend den von

NEB empfohlenen Bedingungen gewählt. Alle Verdau wurden für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Verdau wurde der Restriktionsansatz auf ein Agarosegel (1-1,5% (w/v)) aufgetragen, aufgetrennt und analysiert oder eventuell ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe Agarose-Gelelektrophorese).

2.2.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für eine Ligation wurde der gewünschte Vektor mit zwei Enzymen in einem Restriktionsverdau “aufgeschnitten”. Die entsprechenden Enzyme wurden ebenfalls für das zu klonierende PCR-Produkt verwendet (siehe Restriktionsverdau). Die so erhaltenen, geschnittenen DNA-Fragmente wurden nach Aufreinigung in die Ligationsreaktion wie folgt eingesetzt:

10 µL Ligation

5x T4-DNA-Ligasepuffer	2 µl
DNA (100-300 ng) aus PCR	5-6 µl
Vektor-DNA (~100 ng)	1-2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl

Die Ligationsreaktion wurde bei 16°C und über Nacht durchgeführt. Diese Temperatur liegt zwar weit unter dem Temperaturoptimum der T4-Ligase von 37°C, aber eine Temperatur von 16°C stellt den besten Kompromiss zwischen Aktivität des Enzyms und gegenseitiger Anheftung überhängender DNA-Enden dar. Anschließend wurden 1-3 µl der Ligation in der Transformation eingesetzt

2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für analytische bzw. präparative Zwecke wurden 10 bzw. 100% des Volumens einer PCR oder eines Restriktionsverdau 1:1 mit DNA-Probenpuffer versetzt. Für DNA-Fragmente <500 bp

wurde 2% (w/v) Agarose in TAE (1x) verwendet, für Fragmente zwischen 500 und 2.000 bp 1% (w/v) und für Fragmente >2 kb 0,7% (w/v). DNA-Moleküle laufen aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld zur Anode. Verwendet wurden Feldstärken von ~10V/cm. Die Agarose-Gele waren mit 0,001% Ethidiumbromid versetzt und wurden nach ausreichenden Auftrennung der Proben auf dem UV-Tisch fotografiert.

Bei einem präparativen Gel war die Vorgehensweise prinzipiell gleich, jedoch wurde am UV-Tisch nur 70% Leistung verwendet, um DNA-Strangbrüche zu vermeiden. Die gewünschte Bande wurde dann mithilfe eines Deckglases ausgeschnitten und anschließend mittels eines Kits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (QIAGEN PCR Purification Kit).

2.2.1.4 Präzipitation von DNA

Ein Volumenteil wässriger DNA-Lösung wurde mit 0,6 Volumen 8 M Ammoniumacetat-Lösung und 5 Volumen 100% Ethanol (T= -20°C) versetzt, die Lösung durch vortexen gemischt und bei -20°C inkubiert. Die Inkubationszeit hing hierbei von der zu fällenden Menge DNA ab: je mehr DNA vorhanden war, desto kürzer konnte die Fällungszeit gewählt werden.

Anschließend wurde für 30 min bei 4°C und 13.000 rpm in der Heraeus-Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 10 Volumen 70% (v/v) Ethanol gewaschen und noch einmal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde bei RT unter der Sterilbank getrocknet.

2.2.1.5 Sequenzierreaktion

Pro Sequenzierreaktion wurden mindestens 200-500 ng DNA benötigt, die in Wasser oder 10 mM Tris (ohne EDTA) gelöst waren. Die Primer wurden in einer Konzentration von 10 pmol/µl mitversendet. Alle Sequenzierungen wurden von Geneart (Regensburg) durchgeführt und mit der Software Chromas (share-it! - Digital River GmbH) ausgewertet.

2.2.1.6 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Konzentrationen von Nukleinsäuren werden spektrophotometrisch bestimmt, wobei die Absorption der ultravioletten Strahlung direkt proportional zum Nukleinsäure-Gehalt der Lösung ist. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei Verwendung von Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm ergibt sich bei einem Absorptionswert von $A_{260}=1$ eine Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ für doppelsträngige DNA. Proteine haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Der Reinheitsgrad einer DNA-Präparation lässt sich aus dem Quotienten der gemessenen Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ermitteln; eine reine DNA-Präparation sollte ein A_{260}/A_{280} Verhältnis von 1,8 bis 2,0 aufweisen.

Die DNA-Proben wurden 1:50 (Endvolumen 1 ml) verdünnt und ihre Extinktionen gegen H_2O als Nullwert gemessen.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Plattenkulturen

Plattenkulturen dienen der Anzucht einzelner Bakterienkolonien. Dazu wurden die Bakterien mithilfe einer sterilen Glaspipette auf Agarplatten (LB-Platten), die ein entsprechendes Antibiotikum enthielten, ausplattiert und bei 37°C über Nacht angezogen. Die anschließende Lagerung der Platten erfolgte bei 4°C.

2.2.2.2 Flüssigkulturen von *E. coli*

Zur Anzucht von *E.coli*-Flüssigkulturen wurden Nährmedien wie LB (LuriaBroth, für die MiniPrep), SB (Super Broth, für die MaxiPrep) oder 2xYT (Yeast-Tryptone, für die Proteinexpression) mit Bakterien aus einer Vorkultur oder als Einzelkolonie von der Platte

angeimpft und über Nacht bei 240 rpm und 37°C inkubiert. Die Nährmedien enthielten zur positiven Selektion ein Antibiotikum, welches je nach Resistenzmarker des verwendeten Plasmids ausgewählt und in der empfohlenen Konzentration eingesetzt wurde. Die Flüssigkulturen wurden am folgenden Morgen weiter bearbeitet.

2.2.2.3 Dauerkulturen

Zur dauerhaften Lagerung transformierter Bakterienkulturen wurde eine üNK in Glycerin (Endkonzentration 20%) in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren.

2.2.2.4 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

In einem 50 ml Falcon wurden 10 ml Super Broth (SB) mit einer Einzelkolonie *E. coli* PMC 103 von einer Selektionsmedium-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm angezogen. Am darauffolgenden Morgen wurde die Kultur 1:100 in 600 ml SB verdünnt und für weitere 3 h angezogen. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei 6.000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde dreimal in eiskaltem, sterilem Millipore-Wasser und abschließend in eiskaltem, sterilem Glycerin (10%) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1,2 ml eiskaltem Glycerin aufgenommen, als 50 µl-Aliquote in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und schockgefroren (Trockeneis + Ethanol). Die so erhaltenen Pellets wurden bei -80°C gelagert.

2.2.2.5 Transformation elektrokompetenter *E. coli* PMC 103

Elektrokompetente *E. coli* PMC 103 wurden auf Eis aufgetaut und anschließend 1:3 in 10% Glycerin verdünnt. Je Transformation wurden etwa 60 µl Zellsuspension verwendet und zu 1-3 µl eines Ligationsansatzes bzw. 100 ng Plasmid-DNA gegeben. Das Gemisch wurde in eine 2

mm BioRad-Elektroporationsküvette überführt und bei 2,5 kV elektroporiert. Anschließend wurden sofort 500 µl 37°C warmes LB-Glucose-Medium hinzugegeben, die Zellen kurz auf Eis gestellt und dann für etwa 45 min bei 37°C und 230 rpm inkubiert. Anschließend wurde der komplette Ansatz auf einer LB-Agarplatte (supplementiert mit entsprechenden Antibiotika) ausplattiert und die Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37°C angezogen. Gewachsene Klone wurden am nächsten Tag analysiert.

2.2.2.6 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* BL21-Ril(DE3)

Für die Überexpression von Proteinen wurden chemisch-kompetente *E. coli* BL21-Ril(DE3) durch Hitzeschock mit Plasmid-DNA transformiert. Dazu wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 1:1 mit 10% Glycerin verdünnt. Pro Ansatz wurden 50 µL Zellsuspension mit etwa 100 ng Plasmid-DNA gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und anschließend für 1 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 950 µL LB-Medium wurden die Zellen für 45 min bei 37°C und 230 rpm inkubiert und anschließend durch Zentrifugation pelletiert (3 min bei 4.000 rpm). Der gesamte Ansatz wurde auf einer LB-Agarplatte (supplementiert mit entsprechenden Antibiotika) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C angezogen.

2.2.2.7 Screening der Bakterienkolonien

Um zu überprüfen, ob die Bakterien das transformierte Plasmid enthalten, wurden einige Kolonien mit einer Pipettenspitze von der Platte gepickt und eine 5 ml-Vorkultur angeimpft. Nachdem sich die Bakterien mit den darin enthaltenen Plasmiden über Nacht vermehrt hatten, wurden die Plasmide isoliert. Die Plasmid-DNA wurde mit den zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzymen geschnitten, so dass das Insert aus dem Vektor herausgeschnitten wird, und anschließend in einem Agarosegel überprüft.

2.2.2.8 Analyse bakterieller Transformanden

2.2.2.8.1 Cracking Gel

Das "Cracking Gel" ist eine schnelle und kostengünstige Methode, um bakterielle Transformanden auf das Vorhandensein eines Plasmids mit Insert zu untersuchen. Hierfür wurden über Nacht gewachsene Einzelkolonien von den LB-Agarplatten (mit entsprechendem Antibiotikum) mithilfe von sterilen Pipettenspitzen gepickt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Gleichzeitig wurde ein Abstrich von jeder Einzelkolonie auf einer weiteren Agarplatte gemacht um jeden potenziell positive Klon nach der Identifikation weiter analysieren zu können. In jedes Reaktionsgefäß wurden 15 µl 10 mM Na-EDTA gegeben, diese wurden leicht gevortext und dann abzentrifugiert. Es folgte die Zugabe von 15 µl einer Lösung aus 0,5% SDS, 0,2 N NaOH und 20% Sucrose. Das Ganze wurde für 30 s stark gevortext und wiederum abzentrifugiert. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei 65°C im Thermoblock und anschließendes Abkühlen auf RT. Danach wurden 2 µl 2 M KCl/DNA-Auftragspuffer zugegeben, mit erneutem Vortexen für 30 s und anschließender kurzer Zentrifugation. Die Reaktionsgefäße wurden für 5 min auf Eis gestellt und anschließend für 3 min bei 13.000 rpm (Heraeus Tischzentrifuge) pelletiert. Je Probe wurden 25 µl des Überstandes auf ein Agarosegel (0,7% in TAE) aufgetragen und die verschiedenen Nukleinsäure-Spezies für 45 min bei 140 V aufgetrennt und verglichen. Als Marker wurde die "Supercoiled Ladder" verwendet.

2.2.2.8.2 PCR-Screening

Neben der unspezifischen Analyse durch das Cracking Gel konnte man auch spezifischer vorgehen, indem man die gepickten Einzelkolonie in einem PCR-Reaktionsgefäß (500 µl) als DNA-Matrize ausstrich und 25 µL eines entsprechenden Testmix hinzugab. Der Unterschied zu einer normalen PCR bestand in leicht veränderten Parametern. Diese waren beim Screening:

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>PCR Reaktion</u>			
Reaktionspuffer	1x				
dNTPs	400-800 mM	1	94°C	10'	
MgCl ₂	2 mM	2	94°C	1'] 25 x
Primer forward	0.5 pM	3	45°C	1'	
Primer reverse	0.5 pM	4	68°C	1'	
Polymerase	0,05 U/μl	5	68°C	10'	
ddH ₂ O	ad 25 μl				

2.2.2.9 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren

2.2.2.9.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Je nach benötigter DNA-Menge wurden unterschiedliche Verfahren zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen angewandt, die jedoch auf gleichen Prinzipien beruhen. Hierfür wurden die Reagenzien des “QIAprep Spin Miniprep”- Kits und des “HiSpeed Plasmid Maxi”-Kits verwendet.

Die zu isolierende Plasmid-DNA ist ein geschlossener helikaler Doppelstrang-Ring. Diese Eigenschaft macht sie, im Gegensatz zur chromosomalen Bakterien-DNA, resistenter gegen eine alkalische Denaturierung (P2-Puffer). Somit können Plasmide nach einer Denaturierung schneller renaturieren (N3-Puffer), wodurch die beiden DNA-Typen voneinander separiert werden können.

2.2.2.9.2 Analytische Isolierung: Mini-Präparation

Für die schnelle Überprüfung von Klonierungsschritten wurde Plasmid-DNA im kleinen Maßstab präpariert und anschließend durch einen Restriktionsverdau analysiert.

5 ml einer Übernachtskultur wurden pelletiert (8 min, 3.800 rpm), die Zellen in 250 μl P1(Lyse)-

Puffer (mit 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 250 µl P2(Denaturierungs)-Puffer wurde die Suspension für 5 min bei RT inkubiert und anschließend mit 350 µl N3(Neutralisations)-Puffer versetzt. Das Gefäß wurde mehrmals invertiert, 5 min auf Eis inkubiert und dann 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dadurch befindet sich die renaturierte Plasmid-DNA im Überstand, während denaturierte chromosomale DNA präzipitiert.

Der Überstand wurde auf eine Säule gegeben und für 1 min zentrifugiert. Dadurch bindet die DNA an die Säule, während die übrigen Bestandteile des Überstandes abgetrennt werden. Die gebundene DNA wurde mit PE(Wasch)-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit Elutionspuffer aus der Säule gelöst und in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß aufgefangen.

2.2.2.9.3 Präparative Isolierung: Maxi-Präparation

Für Transfektionen, Klonierungen und Transformationen werden größere Mengen an Plasmid-DNA in sehr reiner Qualität (Quotient $OD_{260}/OD_{280} = 1,8-2,0$) benötigt und können durch die Plasmid-Maxipräparation gewonnen werden.

Übernacht-Kulturen (in 150 bis 200 ml LB-Medium) wurden für 20 min bei 4°C und 4.000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml P1(Resuspensions)-Puffer (mit 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Anschließend wurde die Zelllyse durch Zugabe von 10 ml P2(Lyse)-Puffer eingeleitet. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde dieser Prozess durch Zugabe von 10 ml gekühltem P3-Puffer neutralisiert. Die entstandene Suspension wurde auf einen Faltenfilter gegeben, um die denaturierten Proteine und die genomische DNA abzufiltern. Der Durchfluss wurde auf eine zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierten "HiSpeed Maxi Tip" gegeben. Die daran gebundene Plasmid-DNA wurde mit 60 ml QC(Wasch)-Puffer gewaschen und anschließend mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Zum Fällern der DNA wurde dem Eluat 10,5 ml (0,7x Volumen) Isopropanol beigemischt und für 5 min inkubiert. Das Gemisch wurde auf einen Filter (Qiaprecipitator) gegeben, um die DNA daran zu binden. Nach einmaligem Waschen mit 70% Ethanol wurde die Plasmid-DNA in 1 ml Elutionspuffer aufgenommen. Anschließend konnte die Konzentration und Reinheit der DNA durch spektrophotometrische Messungen bestimmt werden.

2.2.3 RNA-Methoden

2.2.3.1 mRNA-Isolierung

Um die Expression bestimmter Gene zu untersuchen, wurde mRNA über eine Oligo(dT)-Säule aus Parasiten isoliert. Hierfür wurden die Reagenzien des “Micro-FastTrack 2.0 Kits” verwendet. Infizierte Zellen wurden mittels Sorbitol- und Gelatine-Behandlung angereichert, in 1 ml Lyse-Puffer (mit 20 µl Protein/RNase Degradier) aufgenommen und für 20 min bei 45°C inkubiert, um Proteine und Ribonukleasen zu verdauen. Zur Präzipitation der DNA wurde dem Zelllysat 63 µl NaCl beigegeben, so dass die NaCl-Endkonzentration bei 0,5 M lag. Das Lysat wurde auf Oligo(dT)-Zellulose gegeben und für 20 min inkubiert. Dabei binden die poly(A)-Enden der mRNA an die oligo(dT)-Säule und können von den nicht polyadenylierten RNAs wie tRNA oder rRNA getrennt werden. Die Oligo(dT)-Zellulose mit der gebundenen mRNA wurde drei Mal mit 1,3 ml Binde-Puffer gewaschen, auf eine Zentrifugationssäule überführt und nochmals gewaschen, bis der Durchfluss eine OD₂₆₀ von weniger als 0,05 hatte. Um SDS und nicht gebundene RNAs zu entfernen, wurde die Säule zweimal mit 200 µl Waschpuffer bei niedriger Salzkonzentration gewaschen. Die gebundene mRNA wurde mit 200 µl Elutionspuffer von der Säule gelöst. Um die mRNA zu fällen wurden 10 µl Glykogen-Carrier (2 mg/ml), 30 µl 2 M Natriumacetat und 600 µl 100% Ethanol beigegeben und über Nacht bei -80°C präzipitiert. Am folgenden Tag wurde die mRNA für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert, das Pellet in 10 µl Elutionspuffer aufgenommen und bis auf weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 RT-PCR

Die RT-PCR ermöglicht es, eine sogenannte copyDNA(cDNA)-Bibliothek zu erstellen, in der alle zum Zeitpunkt der Präparation exprimierten mRNA-Spezies einer Zelle mithilfe einer viralen Reversen Transkriptase (RT) in die stabilere Form der DNA transkribiert werden. Die daraus resultierende cDNA-Bibliothek kann dann als Matrize für die Amplifizierung unterschiedlicher PCR-Fragmente verwendet werden. Zur Gewinnung der cDNA wurde ausschließlich das SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR-Kit verwendet.

2.2.3.3 Northern Blot

Beim Northern Blotting handelt es sich um eine Methode, bei der RNA auf eine Nitrocellulose-Membran zur späteren Detektion übertragen wird. Detektiert wird sie mithilfe einer radioaktiv markierten, zur gesuchten RNA-Spezies komplementären Sonde.

Bei Arbeiten mit RNA muss vor allem auf sehr sauberes Arbeiten geachtet werden, da RNA-Präparationen sehr anfällig für den endo- und exonucleolytischen Abbau durch RNAsen sind.

Für den Northern Blot wurde ein Agarosegel (1,25%) gegossen, welches aus einem speziellem Laufpuffer (10% Formaldehyd, 1x MOPS, DEPC-behandeltes H₂O) und sogenannter "low melting"-Agarose (Seakam) und 0,5 µl Ethidiumbromid bestand. Die Gelkammer sowie der -schlitten waren dabei mit H₂O₂ gespült worden. Die in Probenpuffer aufgenommene RNA wurde für 5 min bei 65°C aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wurden maximal 5 µg RNA pro Spur aufgetragen und bei 80 V konstant für etwa 4 h aufgetrennt.

Das Gel wurde anschließend wie die Nitrocellulose-Membran für 5 min in 10x SSC äquilibriert. Die Anordnung (siehe Abbildung 2.1) beim Blotten war dergestalt, dass ein langes Stück Whatman-Papier auf einer Glasscheibe lag und beide Enden im 10x SSC schwammen. Auf dieses Papier wurde das Gel gelegt und darauf die stark positive Membran. Oberhalb der Membran wurden noch 3-5 Whatman-Papiere gelegt, darauf etliche Lagen Zellstoff. Das Ganze wurde mit einer weiteren Glasplatte beschwert und über Nacht (etwa 16-20 h) geblotet.

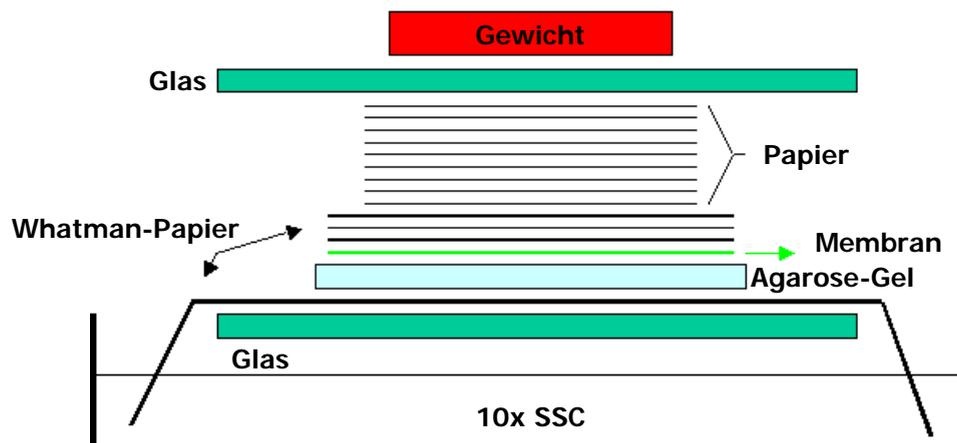


Abbildung 2.1
Prinzipieller Aufbau Northern Blot

Das Blotten fand dabei einerseits durch die Saugwirkung der Kapillarkräfte statt, andererseits durch die Wechselwirkung der negativ geladenen RNA mit der stark positiven Membran.

Nach dem Blotten wurde die Membran für 5 min in 3x SSC gewaschen, auf einem Whatman-Papier luftgetrocknet, bei 80°C unter Vakuum für 2 h gebacken und anschließend bis auf weiteren Gebrauch bei RT gelagert.

Für die Vorbereitung der Hybridisierung wurde die Membran für mindestens 60 min in der Prä-Hybridisierungslösung äquilibriert. Die Hybridisierung fand statt in 5 ml Hybridisierungspuffer, dem das gewünschte Volumen an markierter, hitzedenaturierter Sonde zugegeben wurde (~1 Million cpm/ml). Die Inkubation erfolgte bei 45°C und über Nacht. Am folgenden Tag wurde die Membran 3x für 20 min bei RT in Waschlösung 1 gewaschen. Es folgten noch zwei weitere Waschschrte bei 50°C in Lösung 2. Die Membran wurde dann in Frischhaltefolie faltenfrei eingewickelt und die Banden durch Exposition eines Röntgenfilms zur Analyse sichtbar gemacht.

2.2.3.4 RNA-Hybridisierung mittels radioaktiv markierter Sonden

Zur Größendetektion von spezifischen mRNAs wurden Sonden hergestellt, die komplementär zur gesuchten Sequenz sind. Verwendet wurden dafür verdauten Fragmente, die mittels des *E.coli* Klenow-Fragments und α -[³²P]-dATP (Amersham) aufgefüllt und somit radioaktiv markiert waren. Verwendet wurde das HexaLabel™ DNA Labelling Kit nach der Anleitung des Herstellers. Der Einbau des α -[³²P]-dATP erfolgte für 60 min bei 37°C.

Zur Entfernung nicht inkorporierter dNTPs wurde das "QiaQuick Nucleotide Removal Kit" nach Angaben des Herstellers verwendet. Um die Inkorporationsrate abschätzen zu können wurde von dem Eluat 1 µl in 2 ml Szintillationslösung gegeben und gemessen. Anschließend wurden 500 µl Salmon Sperm-DNA bei 95°C für 10 min denaturiert, der Lösung zugegeben, auf Eis gebracht und das gewünschte Volumen der Hybridisierungslösung zugegeben.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, bei der Proteine unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Die dabei verwendete Matrix besteht aus polymerisiertem Acrylamid und N,N'-Methylbisacrylamid. Die Porengröße und damit die Trennungseigenschaften des Gels hängen vom Anteil des Acrylamid und dessen Vernetzungsgrad ab. Dadurch lassen sich je nach Größe des aufzutrennenden Proteins entsprechende Gele verwenden. In der vorliegenden Arbeit wurden zweiphasige Gele verwendet, die aus einem Sammelgel und einem Trenngel unterschiedlicher Porengröße (6-10% Acrylamid) waren (siehe Tabelle 2.3)

Die zu analysierenden Proteine werden durch β -Mercapthoethanol reduziert und erhalten durch das SDS (Sodiumdodecyl-Sulfat) eine gleichmäßige negative Ladung, die eine Auftrennung gemäß ihrer molaren Masse im Trenngel ermöglicht. Vor dem Aufladen wurden die Proben für 5 min bei 95°C im SDS-Probenpuffer denaturiert.

Der Lauf erfolgte bei 40 mA konstant bis zum Auslaufen der Bromphenol-Blau-Front.

Die Gele wurde dann, je nach Bedarf, entweder für 20 min in Coomassie-Lösung ge- und anschließend in Entfärbelösung entfärbt oder für den Western Blot vorbereitet.

Tabelle 2.3
Lösungen zur Herstellung von SDS-PAGE-Gelen.

Substanz	2 mL Sammelgel		10 mL Trenngel		
	5%	6%	8%	10%	
H ₂ O	1,4 ml	2,4 ml	3,2 ml	4 ml	
30% Acrylamid/Bisacryl 29:1	330 μ l	2 ml	2,6 ml	3,3 ml	
1 M Tris (pH 6.8)	250 μ l	-	-	-	
1.5 M Tris (pH 8.8)	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	
10% SDS	20 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	
10% APS	20 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	
TEMED	2 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l	

2.2.4.2 Western Blot

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

Der Transfer erfolgte im Nass-Blot-Verfahren. Dafür wurden Membran, Gel, Filterpapiere und die Schwämme in Transferpuffer äquilibriert und luftblasenfrei zusammengesetzt: Schwamm, 3 Whatman-Filterpapiere, Nitrocellulosemembran (Anodenseite), Trenngel (Kathodenseite), 3 Whatman-Filterpapiere und erneut ein Schwamm.

Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 70 Volt für 60 min bei 4°C auf die Membran transferiert.

Zur Vorbereitung der Immundekoration mit spezifischen Antikörpern wurde die Membran anschließend für zwei Mal 5 min in 1x TBS-Tween (TBST) gewaschen. Es folgte die Blockierung unspezifischer Bindungen für mindestens 2 h bei RT in 5% Magermilchpulver/1x TBST, gefolgt von vier Waschschritten in 1x TBST für je 10 min. Die Membran wurde anschließend mit dem jeweiligen primären Antikörper für 60 min bei 4°C inkubiert. Nach weiteren vier Waschschritten in 1x TBST erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Alkalisches Phosphatase (AP)-konjugiert) für 60 min. Nach vier erneuten 10-minütigen Waschschritten in 1x TBST wurden die Proteine mittels Chemilumineszenz und Film detektiert.

2.2.4.3 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Für die Überexpression rekombinanter Proteine wurden BL21-Ril(DE3)-Zellen verwendet. Diese zeichnen sich aus durch ein zusätzliches Plasmid, welches die tRNA-Gene für argU, ileY, und leuW trägt. Diese Gene kodieren für die Triplets AGA/AGG, AUA und CUA. Die Präsenz dieser Gene ist für die optimierte Expression AT-reicher Sequenzen wichtig, wie sie z.B. *Plasmodium* besitzt. Desweiteren vermittelt das Plasmid zusätzlich Resistenz gegen Chloramphenicol.

BL21-Ril(DE3)-Zellen wurden mit dem entsprechenden Plasmid transformiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Am darauffolgenden Tag wurde eine Einzelkolonie verwendet, um eine 5 ml-Vorkultur (mit Ampicillin und Chloramphenicol) anzupflanzen. Diese wuchs über Nacht bei 37°C und 230 rpm im Schüttler und wurde am nächsten Tag verwendet, um eine 400

ml 2xYT-Kultur (mit Ampicillin und Chloramphenicol) anzuimpfen. Bei einer OD_{600} zwischen 0,6 und 0,9 wurde mit 0,1- 0,5 mM IPTG (Endkonzentration) die Expression des rekombinanten Proteins induziert. Die Proteine wurden für 3 h exprimiert, die Zellen bei 5.000 rpm für 10 min pelletiert und anschließend bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C eingefroren.

2.2.4.4 **Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels Affinitätschromatografie**

Die Aufreinigung des *Plasmodium*-GST-Fusionsproteins fand unter nativen Bedingungen bei 4°C statt, um die Denaturierung zu minimieren. Die pelletierten Zellen wurden in 1x PBS/Triton X-100 (supplementiert mit Lysozym) resuspendiert und anschließend durch mehrfach wiederholtes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei RT aufgebrochen. Das so erhaltene Lysat wurde bei 13.000 rpm und 4°C für 30 min aufgetrennt. Der lösliche Überstand wurde für die Aufreinigung weiter verwendet, die unlösliche Membranfraktion verworfen.

Die weitere Aufreinigung des GST-Fusionsproteins mithilfe der Glutathion Sepharose™ 4B (Amersham Pharmacia) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dabei bindet das GST-Fusionsprotein an das über die Sepharose immobilisierte, reduzierte Glutathion. Alle anderen Proteine werden ausgewaschen, während das Fusionsprotein durch Konkurrenz mit freiem, reduziertem Glutathion eluiert werden kann. Die eluierten Fraktionen wurden anschließend durch SDS-PAGE analysiert und dialysiert, um das reduzierte Glutathion zu entfernen.

2.2.4.5 **Dialyse**

Die aus einer Aufreinigung erhaltenen Fraktionen mit dem gewünschten Protein wurden gepoolt und in einen Dialyse-Schlauch mit einem cut off von 12-14 kDa überführt. Der Schlauch wurde mit jeweils einer Klemme an der Unter- und Oberseite verschlossen und an einem Erlenmeyerkolben mit Acryl-Klebeband befestigt. Es wurde das 100fache Volumen der gepoolten Fraktionen an korrespondierendem Puffer hinzugegeben und über Nacht dialysiert. Ein Magnetrührer sorgte bei kleiner Drehzahl für eine ausreichende Durchmischung des Puffers. Am folgenden Tag wurde der Puffer verworfen und zwei weitere Male mit dem 100fachen Volumen

des gleichen Puffers für jeweils 1-2 h dialysiert. Dadurch sollten alle unterhalb der Porengröße des Schlauches liegenden, niedermolekularen Ionen und Proteine ausgewaschen werden.

2.2.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bei der Bindung von Coomassie Brilliantblau G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung (Bradford, 1976).

Die Färbelösung (Bio-Rad) wurde bei jeder Bestimmung frisch angesetzt, im Verhältnis 1:5 mit ddH₂O. Nach Zugabe der Färbelösung zur Proteinlösung wurde gut gemischt, 5 min inkubiert und vor der Messung erneut gemischt. Die Absorption der Probe sollte dabei im Bereich zwischen 0,1 und 1 liegen. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von Rinderserum-Albumin (BSA; 0, 50, 100, 200, 300, 400 µg/ml in Wasser) wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration der Probe ermittelt wurde.

2.2.5 Plasmodium-spezifische Methoden

2.2.5.1 Kultivierung von *P. falciparum* in vitro

Die erythrocytären Parasitenstadien von *P. falciparum* können in einem geeigneten Medium kontinuierlich in Kultur gehalten werden (Trager und Jensen, 1976).

Je nach Bedarf wurden 10 bzw. 25 cm Petri-Schalen verwendet mit 14/35 ml Medium und 0,5/1,5 ml O-Blut. Das dabei verwendete Kulturmedium war mit 5% humanem O-Serum, 5% Albumax und 200 µl Gentamycin (50 mg/ml) supplementiertes RPMI-Medium. Das Serum wurde aus Plasma von Eigenblutspenden gewonnen. Dafür wurden die bei -80°C gelagerten Plasmakonserven aufgetaut und unter sterilen Bedingungen in 50 ml-Falcons abgefüllt. Um Qualitätsunterschiede ausgleichen zu können, wurden jeweils Konserven von zwei Spendern vereinigt. Pro 25 ml Plasma wurden 300 µl 1 M CaCl₂-Lösung hinzugefügt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Aliquots über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Das ausge-

fallen Fibrin wurde durch Zentrifugation bei 4.000 rpm, RT und für 30 min in der MegafugeR20 pelletiert und der Überstand bei -20°C gelagert oder direkt für das Medium verwendet. Das verwendete Blut (nicht älter als zwei Wochen) wurde vom Blutspendedienst des Universitätsklinikums Heidelberg bezogen. Es wurde ebenfalls aliquotiert, in RPMI-Medium gewaschen und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert. Die Parasiten wurden im Inkubator unter den optimalen Bedingungen von 3% CO₂, 5% O₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% bei stabilen 37°C kultiviert. Je nach Experiment und Parasitämie wurden das Medium sowie das Blut alle 1-4 Tage ausgetauscht.

2.2.5.2 Mikroskopische Darstellung von *P. falciparum* mittels Giemsa-Färbung

Zur Bestimmung der Parasitämie (relative Anzahl infizierter Erythrozyten) und zur Unterscheidung einzelner Blutstadien wurden vom Boden der Kulturschale mit einer 1 ml-Pipette sedimentierte Erythrozyten aufgenommen und auf einem Objektträger mithilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Der Ausstrich wurde luftgetrocknet, anschließend in 100% Methanol fixiert, um dann in frisch angesetzter Giemsa-Färbelösung (1:10 v/v in ddH₂O) für etwa 5 min gefärbt. Die Ausstriche wurden mit Wasser abgewaschen, getrocknet und bei 50-100facher Vergrößerung mit einem Öl-Immersionsobjektiv analysiert.

2.2.5.3 Bestimmung der Parasitämie

Die Parasitämie spiegelt die Infektionsrate *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten wider. Zur Bestimmung der Parasitämie wurde ein Bereich des Objektträgers mit einlagiger Schicht Erythrozyten ausgewählt. In zehn nebeneinanderliegenden Sichtfeldern wurde die Anzahl der Erythrozyten und der Parasiten ausgezählt. Mehrfachinfektionen wurden einfach gezählt.

Die Parasitämie berechnet sich wie folgt:

$$(\text{Anzahl Parasiten}/\text{Anzahl Erythrocyten}) \cdot 100 = \text{Parasitämie in \%}$$

2.2.5.4 Einfrieren von Parasiten

Für die Langzeit-Aufbewahrung von z.B. genetisch modifizierten Parasiten musste die gewünschte Zelllinie im Ringstadium eingefroren werden. Dafür synchronisierte man die Parasiten und pelletierte sie bei 1,900 rpm für 2 min. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in gleichem Volumen Einfrierlösung aufgenommen. Das Ganze wurde in Kryoröhrchen überführt und in einem Gemisch aus 99% Ethanol und Trockeneis für etwa 20 min schockgefroren. Die so eingefrorenen Parasiten kamen über Nacht in den -80°C-Schrank, bevor sie bei -196°C in flüssigem Stickstoff langfristig gelagert wurden.

2.2.5.5 Auftauen von Parasiten

Die Kryoröhrchen mit den Parasiten wurden dem Stickstofftank entnommen, im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Pro 1 ml Blut wurden 0,2 ml T1 tropfenweise unter ständigem Mischen zugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden 5 ml T2 ebenfalls tropfenweise und unter ständigem Schütteln zugegeben und ebenso für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 5 ml T3 tropfenweise unter ständigem Mischen zugegeben. Nach wiederum 5-minütiger Inkubation bei RT konnte die Parasitensuspension abzentrifugiert werden (1.900 rpm, 2 min, RT). Das Pellet wurde dann mit 25 ml RPMI 1640 gewaschen, anschließend in 13 ml Medium mit 0,5 ml Erythrozyten resuspendiert und in eine Petri-Schale überführt.

Alle benötigten Salzlösungen waren sterilfiltriert oder autoklaviert und konnten so längere Zeit bei 4°C gelagert werden. Vor Gebrauch wurden sie auf 37°C aufgewärmt.

2.2.5.6 Synchronisierung von *P. falciparum*-Kulturen mit Sorbitol

Die kontinuierliche Kultur von *P. falciparum* führt zu einem asynchronen Wachstum, d.h., es sind verschiedene Erythrozytenstadien des Parasiten gleichzeitig vorhanden. Für einige Experimente oder das Einfrieren der Parasiten war es notwendig, nur ein spezifisches Stadium zu benutzen.

Zur Anreicherung von Ringstadien wurde die asynchrone Parasitenkultur abzentrifugiert (1.900 rpm, 2 min, RT) und das Pellet in 9 Volumen sterilem 5% Sorbitol resuspendiert. Sorbitol dringt in das bei Ringstadien noch nicht so stark ausgeprägte tubulär-vesikuläre System der Parasiten ein. Nach 5 min Inkubationszeit bei RT wurde erneut zentrifugiert und das Pellet anschließend in Parasitenmedium resuspendiert. Dabei platzen alle späten Parasitenstadien aufgrund eines osmotischen Schocks beim Wechsel von Sorbitol zu RPMI 1640 (Lambros und Vanderberg, 1979). Aus diesem Grund ist es auch nur dann sinnvoll die Kulturen mit Sorbitol zu behandeln, wenn eine ausreichende Menge an Ringstadien vorhanden ist. Um die Kultur stärker zu synchronisieren wurde die Behandlung nach 4 bzw. 48 h wiederholt.

2.2.5.7 Anreicherung von Trophozoiten und Schizonten durch Gelatine-Sedimentation

Für einige Versuche wurden Trophozoiten und Schizonten in höheren Parasitämien benötigt als durch normale Kulturbedingungen erreicht werden können. Durch Gelatine-Sedimentation kann man spätere Parasitenstadien anreichern, ohne dass die Parasiten geschädigt werden (Jensen, 1978). Eine Parasitenkultur mit hauptsächlich Trophozoiten und Schizonten wurde abzentrifugiert (1.900 rpm, 2 min, RT) und das Pellet (~0,5 ml) in 4,5 ml 0,5% Gelatine resuspendiert. Nach 30-60 min waren die Phasen getrennt. Der Überstand enthielt die Trophozoiten und Schizonten, das zierte Erythrozyten, Ringstadien, "knobless" spätere Stadien und Rosetten. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (1.900 rpm, 2 min, RT). Die infizierten Erythrozyten wurden einmal mit 10 ml RPMI 1640 gewaschen und anschließend zurück in Kultur gegeben.

2.2.5.8 Anreicherung von Trophozoiten und Schizonten durch magnetische Separation

Malaria-Parasiten verstoffwechseln das Hämoglobin der Erythrozyten, wobei unlösliche, oxidierte Häm-Produkte entstehen, die als Hämozoin polymerisieren. Aufgrund der paramagnetischen Eigenschaften des Hämozoin lassen sich Trophozoiten und Schizonten mittels magnetisch-

er Separation von nicht-infizierten Erythrozyten und Parasiten im Ringstadium trennen (Uhlemann et al., 2000). Mit dieser Methode erhält man Parasitämien bis zu 95-99%.

Die magnetischen Säulen (MACS Separation Columns CS) wurden nach den Angaben des Herstellers in den Magneten (Vario MACS) eingespannt und mit MACS-Puffer äquilibriert. Die Parasiten konnten anschließend direkt auf die Säule gegeben werden. Die Parasiten sollten die Säule langsam durchlaufen, damit Trophozoiten und Schizonten gut binden können. Die Säule wurde so lange mit MACS-Puffer gewaschen (ungefähr 5-6 Säulenvolumen), bis der Durchfluss klar ist und keine Erythrozyten mehr enthält. Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und die gebundenen, infizierten Erythrozyten konnten mit MACS-Puffer eluiert werden. Das Eluat wurde zentrifugiert (1.900 rpm, 2 min, RT) und das Pellet im gewünschten Puffer resuspendiert.

2.2.5.9 Stabile Transfektion von *Plasmodium falciparum*

Die stabile Transfektion von *P. falciparum* (Stamm 3D7) erfolgte durch Elektroporation mit 100-500 µg Plasmid-DNA. Verwendet wurden hochsynchrone Parasiten im Ringstadium, vorzugsweise mit einer Parasitämie von 1-2%. Eine höhere Parasitämie birgt die Gefahr, dass die Kultur sterben ("crashen") kann. Wurde eine höhere Parasitämie verwendet, so wurde 24 h Post-Transfektion die Kultur auf zwei Platten aufgeteilt.

Das zu transfizierende, präzipitierte Plasmid wurde in 15 µl sterilem, 37°C warmen TE-Puffer (pH 7,6) resuspendiert. Es wurden 385 µl unvollständiges Cytomix hinzugegeben und gemischt, bis das Pellet komplett gelöst war. Währenddessen wurde die Parasitenkultur abzentrifugiert (1.900 rpm, 2 min) und der Überstand verworfen. Etwa 200 µl der Parasiten wurden zu dem Plasmid-Cytomix-Gemisch hinzugegeben, vorsichtig gemischt und in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation wurde bei hoher Kapazität, 0,310 kV und 950 µF durchgeführt. Die Zeitkonstante für den Puls sollte idealerweise zwischen 7 und 12 ms liegen. Die Probe wurde sofort in eine auf 37°C vorgewärmte Kulturschale mit 14 ml Transfektionsmedium und 0,4 ml Erythrozyten überführt, und für 24 h im Inkubator belassen. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und zur Kontrolle der Parasitämie ein Giemsa-Ausstrich gemacht. Ab Tag 2 Post-Transfektion wurde das Medium bis Tag 10 täglich gewechselt und zur Selektion immer mit 5 nM (Endkonzentration) WR99210 supplementiert. Das Absterben der Parasiten, die nicht das gewünschte Plasmid enthielten, konnte per Giemsa-Ausstrich verfolgt werden. Ab Tag 11 wurde das Medium nur noch zwei Mal pro Woche gewech-

selt, der Selektionsdruck durch WR99210-Zugabe jedoch beibehalten. Ab Tag 25 bis spätestens Tag 50 sollten die erfolgreich transfizierten Parasiten im Ausstrich nachzuweisen sein.

2.2.5.10 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA (gDNA) wurden mindestens zwei große *P. falciparum*-Kulturplatten mit einer möglichst hohen Parasitämie (5-10%) benötigt. Die Platten wurden in 50 ml-Falconröhrchen überführt und für 2 min bei 1.900 rpm (RT) zentrifugiert. Die so sedimentierten Erythrozyten wurden mit 0,1% Saponin lysiert und anschließend 8 min bei 2.800 rpm pelletiert. Das Pellet wurde zwei Mal in 1x PBS gewaschen und in 400 µl Lysispuffer resuspendiert. Ebenfalls hinzugegeben wurden 100 µl 18% SDS. Das Ganze wurde anschließend durch Invertieren gut durchmischt und für 2 min bei RT inkubiert. Es folgten zwei Phenol-/Chloroform-Extraktionsschritte mit anschließender Ethanolpräzipitation. Das so erhaltene Pellet wurde in einem seiner Größe entsprechendem Volumen 1x TE-Puffer aufgenommen und durch wiederholte Extraktion mit Phenol/Chloroform und anschließender Präzipitation mit Ethanol von möglichen Kontaminationen gereinigt. Es wurde in einem entsprechenden Volumen 1x TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.2.5.11 Proteinextraktion aus *P. falciparum*

Zur Isolierung von *P. falciparum*-Proteinen war mindestens eine große Kulturplatte mit hoher Parasitämie nötig, deren Parasiten über eine MACS-Säule angereichert wurden. Die so ankonzentrierten Zellen wurden für 2 min bei 1.900 rpm und 4°C pelletiert und zwei Mal mit 4°C-kaltem 1x PBS gewaschen. Resuspendiert wurde in 50 µl PBS und 1 ml Hypotonischem Lysepuffer, anschließend wurden verschiedene Proteaseinhibitoren zugegeben (20 µg/ml Leupeptin, 50 µg/ml Aprotinin und 1 mM PMSF). Nach Inkubation für 3 min auf Eis wurde die Probe für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand entsprach dem Erythrozyten-Zytosol. Das Pellet wurde erneut in Hypotonischem Lysepuffer resuspendiert, pelletiert und in PBS gewaschen. Anschließend konnte es in 250 µl PBS und 5 mM MgCl₂ mit den entsprechenden Proteaseinhibitoren aufgenommen werden. Es folgte ein erneuter Waschschrift

mit PBS und erneute Resuspendierung (s. oben), sowie ein Zyklus aus Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen in Wasser bei RT. Die so behandelte Probe wurde dann bei 40.000 rpm für 90 min ultrazentrifugiert. Das erhaltene Pellet entsprach den parasitären Membranfraktionen und der Überstand dem Zytosol. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde per Bradford Assay durchgeführt, die Proben in 3x SDS-Ladepuffer aufgenommen und bei -20°C bis auf weiteren Gebrauch aufbewahrt. Um den hohen Anteil an Hämoglobin zu relativieren, wurde bei Western Blots das die 2,5-fache Proteinmenge der zytosolischen Erythrozytenfraktion aufgetragen.

2.2.5.12 *Plasmodium berghei*-Transfektion

2.2.5.12.1 Präparation der Parasiten und *in vitro*-Kultur der Erythrozyten-Stadien

Parasiten des Pyrimethamin-sensitiven *P. berghei*-Stammes NK65 wurden intraperitoneal in 100-150 g schwere Wistar-Ratten injiziert. Drei Tage nach Injektion sollte die Parasitämie bei 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) enthielt. Die roten Blutkörperchen wurden bei 200 g für 8 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit Kulturmedium auf 50 ml aufgefüllt und in einen Erlenmeyerkolben überführt, in dem bereits 100 ml erwärmtes Kulturmedium vorgelegt waren. Die 150 ml Kultur wurden in einem Inkubator bei 10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂ bei 37°C über Nacht für 15-16h bei 77-80 rpm vorsichtig geschüttelt. Während dieser Zeit reiften die meisten Parasiten zu Schizonten, die am folgenden Tag mittels Gelatine-Flotation für die Transfektion präpariert werden konnten.

2.2.5.12.2 Transfektion der Parasiten mithilfe des Amaxa-Systems

Die aufgereinigten Schizonten wurden in 30 ml Kulturmedium resuspendiert. Es wurde 1 ml davon abgenommen (entspricht 1-3x 10⁷ Parasiten) und erneut pelletiert (13.000 rpm für 5 s). Der Überstand wurde verworfen, anschließend 100 µl "Human T-Cell Nucleofactor™"-Lösung

(Amaxa) inklusive 5-10 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA zugegeben und resuspendiert. Das Gemisch wurde in eine Elektroporationsküvette überführt und mit dem Amaxa Gene Pulser (Protokoll U33) transfiziert. Direkt nach der Transfektion wurden 50 µl Kulturmedium hinzugegeben und das Gemisch der Maus oder Ratte intravenös gespritzt. Um die Venen anschwellen zu lassen und somit die Injektion zu vereinfachen, wurde der Schwanz des Tieres zuvor in warmes Wasser gehalten.

2.2.5.12.3 Selektion der Parasiten

Am Tag nach der Transfektion wurde die Parasitämie der Tiere mittels Giemsa-Blutausstrich untersucht. Während der ersten 24 h nach der Transfektion konnten die Parasiten einen kompletten Zyklus der asexuellen Teilung ohne Selektionsdruck durch Pyrimethamin durchlaufen. 27 bis 30 h nach der Transfektion wurde mit der Pyrimethamin-Behandlung begonnen. Dazu wurde den Tieren mit Pyrimethamin behandeltes Wasser als einzige Flüssigkeitsquelle angeboten. Der Selektionsdruck wurde kontinuierlich beibehalten, auch wenn keine Parasiten im Blutausstrich zu detektieren waren. Mit Erscheinen einer Pyrimethamin-resistenten Parasitenpopulation ist 8 bis 10 Tage nach Transfektion zu rechnen. Sie wird als parentale resistente Population bezeichnet. Sollten Parasiten später auftauchen, so handelt es sich meist um eine resistente WT-Population.

2.2.5.12.4 Herstellung von Blutstabilaten

Zur längerfristigen Lagerung von infektiösen Blutstadien wurden Stabilate angefertigt. Dazu wurde nach der Herzpunktion ein Aliquot von 100-300 µl Blut mit dem zweifachen Volumen an Einfrierlösung gemischt und in einem 2 ml Kryoröhrchen direkt in flüssigen Stickstoff eingefroren. Mit einem solchen Stabilat konnten zu einem späteren Zeitpunkt Mäuse oder Ratten erneut infizieren werden, um Parasitenmaterial zu erhalten.

2.2.5.12.5 Präparation genomischer DNA aus Blutstadien

Zur Aufreinigung der Erythrozyten aus dem Vollblut der Tiere wurde das Blut über eine Säule aufgereinigt. In einer Spritze diente Watte als untere Begrenzung. Für das Blut einer Maus wurden 5 ml-, für das einer Ratte 20 ml-Spritzen verwendet. Die Watte wurde überschichtet mit Fibrose Cellulose Puder (zum Entfernen der Leukozyten) und Glasperlen (zum Entfernen der Thrombozyten). Zum Äquilibrieren wurde die Säule mehrfach mit 1x PBS gespült. Anschließend wurde das Blut auf die Säule gegeben und durch Waschen der Säule mit 1x PBS konnten die Erythrozyten ausgespült werden. Die Erythrozyten einer Maus wurde in 14 ml, dass einer Ratte in 50 ml PBS aufgenommen. Nach einer Zentrifugation bei 1.500 rpm für 8 min und RT wurde das Pellet zum Aufschließen der Erythrozyten in 0,2% Saponin resuspendiert. Die so freigesetzten Parasiten wurden anschließend für 8 min bei 2.800 rpm und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Danach wurde für 2 min bei 7.000 rpm und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen. Zur Isolierung der genomischen DNA wurde das "QIAamp DNA Blood Kit" (nach Protokoll) verwendet. Die genomische DNA wurde anschließend bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

2.2.6 Zellbiologische Methoden

2.2.6.1 Immune Fluorescence Assay (IFA)

Von der gewünschte Parasitenkultur wurde ein Ausstrich angefertigt und dieser luftgetrocknet. Anschließend wurde er in eiskaltem (-20°C) 90% Aceton/10% Methanol für 5 min fixiert. Die Ausstriche wurden erneut luftgetrocknet. Es wurde mit Fettstift ein Quadrat auf dem Objektträger aufgetragen, wobei das Fett als Barriere für die Antikörper- bzw. Waschlösungen fungierte. Die Parasiten wurden für mindestens 60 min in 5 % Magermilchpulver in 1x PBS blockiert. Der Primärantikörper wurde in der gewünschten Konzentration zugegeben (in 5 % Magermilchpulver in 1x PBS), und die Objektträger für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde 3x für 5 min in 1xPBS/Tween (0,01%) gewaschen und der Sekundärantikörper (1:1.000) für 2 hinzugegeben. 20 min vor Ablauf der Inkubationszeit wurde eine Hoechst-Färbung für die Markierung der

Nukleinsäuren addiert. Es wurde erneut dreimal in 1x PBS/Tween (0,01%) gewaschen und anschließend mit Moviol abgedeckt. Ein aufgelegtes und mit Klarnagellack fixiertes Deckglas sorgte für einen luftdichten Abschluss der Proben. Um die Eigenfluoreszenz der Proben zu quenchen, wurde der fertige Objektträger über Nacht bei 4°C gelagert und erst am folgenden Tag mikroskopisch analysiert.

3 Ergebnisse

Die Genomsequenz des humanpathogenen Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum* wurde 2002 veröffentlicht. Im Verlaufe der Sequenzierung wurden etwa 5.300 vorläufige offene Leseraster (open reading frame, ORF) annotiert (Gardner et al., 2002), wobei über 60% dieser Gene keine Orthologe in anderen Organismen besitzen. Insgesamt besteht das Genom mit einer Größe von 23 Mb aus 14 Chromosomen. Zusätzlich kommen noch etwa 5,9 kb des mitochondrialen und etwa 35 kb des plastidären Genoms hinzu.

Die Sequenz des Genoms von *P. falciparum* unterliegt einer ständigen Re-Evaluierung. So wurde im Zuge dessen die ursprüngliche Zahl von etwa 5.300 Genen auf nun 5.595 festgelegt. Diese Zahl spiegelt allerdings eine möglicherweise immer noch unvollständig assemblierte Sequenz wider. Von den 5.595 Genen kodieren 5.420 für Proteine, 102 sind z.B. rRNA-kodierend und 97 sind sogenannte Pseudogene. Pseudogene besitzen den gleichen Aufbau wie Gene, allerdings sind sie durch z.B. Mutationen so stark beschädigt worden, dass sie nicht mehr transkribiert werden.

Der Großteil der im asexuellen Erythrozytenstadium exprimierten Gene zeigt ein jeweils distinktes Maximum und Minimum der Transkription. Die Expression der verschiedenen Gene bzw. ganzer Gengruppen ist also spezifisch für einen bestimmten Zeitpunkt der intra-erythrozytären Entwicklung, um so eine optimale Funktionalität gewährleisten zu können (Bozdech und Ginsburg, 2004).

Der sehr hohe AT-Gehalt des Genoms von etwa 80% stellt für molekularbiologische und biochemische Arbeiten ein großes Problem dar. So kann die DNA in heterologen Systemen wie *E. coli* instabil sein, was Plasmid- oder Proteinüberexpressionen erschwert. Auch die Transfektionseffizienz für z.B. GFP-Konstrukte und die Methoden für "reverse genetics" sind nicht optimal. So kann sich ein einzelnes Knock Out-Experiment zur Charakterisierung einer Genfunktion über einen Zeitraum von bis zu sechs Monaten erstrecken, im Gegensatz zu zwei bis vier Wochen in *P. berghei*. Das induzierbare Tet-System (Meissner et al., 2001) oder RNA-Interferenz-Techniken sind für *Plasmodium* noch nicht ausgereift und etabliert.

3.1 Das Phosphatidylinositol-4-Kinase-like (PI4K) Protein in *Plasmodium*

Die Entdeckung der PH(Pleckstrin Homology)-Domänen von Proteinen und ihrer damit verbundenen Fähigkeit, Phosphatidylinositol 4-Phosphat (PI4P) spezifisch zu binden, veränderte die Sichtweise auf PI4P. Es stellt nicht mehr nur ein Zwischenprodukt bei der Synthese von Sekundärbotenstoffen wie Inositoltriphosphat dar, sondern hat durch seine direkte Beteiligung z.B. an der Ausbildung von Proteinkomplexen an Membranen einen für die Zelle erheblich höheren Stellenwert. Da die Synthese von PI4P abhängig von der enzymatischen Aktivität der Kinase ist, spielen PI4-Kinasen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität. Folglich weisen die PI4-Kinasen ein weitaus breiteres Wirkungsspektrum auf als früher vermutet und machen sie zu einem Gegenstand intensiver Forschung (Balla und Balla, 2006).

3.1.1 Bestimmung der *Pf*-PI4K-Genstruktur

In der *Plasmodium*-Datenbank (www.PlasmoDB.org) war ein hypothetisches Protein annotiert, das eine hohe Homologie zu einer Phosphatidylinositol-4-Kinase (PI4K) aufwies (PFE0485w). Die Größe des *Pf*-PI4K-Gens war mit 5.044 Nukleotiden, die kodierende Sequenz mit 4.680 Nukleotiden angegeben (siehe Abbildung 3.1 A). Somit kodierte es für ein Protein mit 1.559 Aminosäuren und etwa 183 kDa (siehe Abbildung 3.1 B). Aufgrund der Größe des Transkripts wird hier auf eine Abbildung der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen verzichtet und auf www.plasmodb.org (Gene ID PFE0485w) verwiesen.

Der Translationsstart bzw. das Start-ATG konnte durch Kombination verschiedener Primer wie in PlasmoDB annotiert bestätigt werden. Dabei ergaben die Primer keine Produkte, deren komplementäre Sequenzen nicht mehr auf der cDNA zu finden waren, während Primer inklusive Start-ATG bzw. die innerhalb der cDNA-Sequenz lagen, ein Produkt nach PCR liefern konnten (ohne Abbildung).

Durch eine Long Range-PCR konnte das komplette Transkript auf cDNA- wie auch auf gDNA-Ebene amplifiziert werden. Dabei konnten experimentell durch RT-PCR und eine darauffolgende PCR die in PlasmoDB annotierten Introns bestätigt werden (siehe Abbildung 3.1 A).

Auffallend waren die bei der PCR-Amplifizierung der cDNA auftretenden zwei zusätzlichen

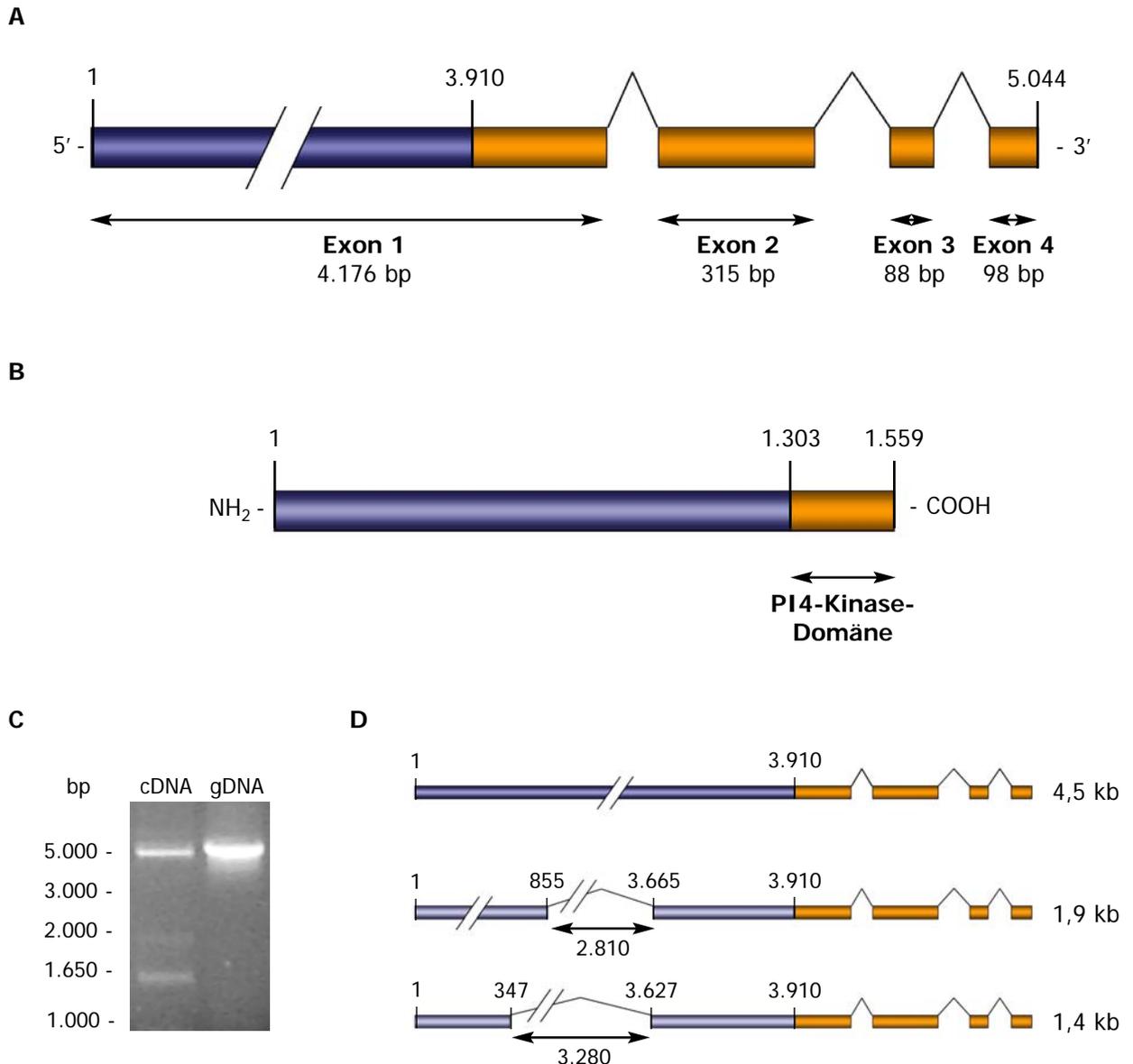


Abbildung 3.1

A Schematische Darstellung der Genstruktur von *Pf*-PI4K

Das *Pf*-PI4K Gen umfasst 5.044 Nukleotide auf Chromosom 5 und besteht aus vier Exons.

B Schematische Darstellung der putativen Proteinstruktur von *Pf*-PI4K

Charakteristisch für Phosphatidylinositol4kinase-like Proteins wie *Pf*-PI4K (1.559 aa) ist die C-terminale Kinasedomäne (PI4-Kinase-Domäne).

C Pherogramm der PCR-Amplifizierung von *Pf*-PI4K

PCR-Amplifizierung von *Pf*-PI4K auf cDNA (4,5 kb; 1,9 kb; 1,4 kb) führt zu drei Fragmenten, während auf gDNA lediglich ein Fragment entsteht (~5 kb).

D Schematische Darstellung der amplifizierten Formen von *Pf*-PI4K

Auf cDNA-Ebene konnten neben der annotierten Sequenz zwei weitere, verkürzte Formen (1,4 kb bzw. 1,9 kb) von *Pf*-PI4K isoliert werden. Deletiert sind in den kleineren Formen jeweils zentrale Bereiche des Gens, wobei die Kinase-Domäne intakt bleibt.

Banden in der Größe von etwa 1,4 kb und 1,9 kb (siehe Abbildung 3.1 C). Da die Möglichkeit gegeben war, dass es sich dabei um alternative prozessierte mRNA-Transkripte handelte, wurden sie kloniert und sequenziert. Dabei stellte es sich heraus, dass beide Banden verkürzte Formen des *Pf*-PI4K-Gens darstellen, wobei ein zentraler Teil des ursprünglichen Gens deletiert war (siehe in Abbildung 3.1 D). Nach Bestimmung der Aminosäuresequenz und Vergleich der drei Formen konnte festgestellt werden, dass die zwei zusätzlichen Transkripte ebenfalls über einen offenen Leserahmen verfügen. Da die hochkonservierte, für die Funktionalität der putativen Kinase notwendige katalytische Domäne von der Deletion unbeeinflusst blieb, konnten alternative Spleißformen angenommen werden.

3.1.2 Detektion von *Pf*-PI4K mittels Northern Blot

Durch die Detektion eines spezifischen mRNA-Transkripts kann gleichzeitig der Nachweis der Expression, die Bestimmung der Größe der terminal prozessierten mRNA durchgeführt und somit das Auftreten von alternativen Transkripten überprüft werden.

Die mit α -[32 P] radioaktiv markierten Sonden umfassten die Nukleotide 1 bis 300 (siehe Abbildung 3.1 A) von *Pf*-PI4K. So sollten alle möglichen, auf PCR-Ebene amplifizierten Transkripte detektiert werden können. Der Northern Blot sollte einen ersten Hinweis darauf geben, ob die experimentell erhaltenen PCR-Daten mit den drei Varianten korrekt waren.

Im Northern Blot war die einzige Bande bei über 6 kb zu detektieren, was der Größe des in PlasmODB annotierten PI4K-Gens mit 4.680 Nukleotiden inklusive der untranslatierten Regionen im 5'- und 3'-Bereich des Gens entspricht. Es konnten keine weiteren Banden detektiert und damit mögliche Spleißvarianten ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 3.2).

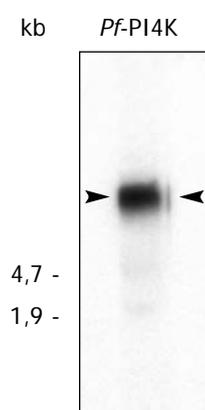


Abbildung 3.2

Northern Blot zur Detektion der *Pf*-PI4K-mRNA

Die verwendete Sonde umfasste die ersten 300 Nukleotide des *Pf*-PI4K-Gens. Ein Signal wurde entsprechend der annotierten Sequenz bei über 6 kb detektiert. Es konnten keine Spleiß-Varianten nachgewiesen werden.

3.1.3 Alignment von *Pf*-PI4K mit verschiedenen Orthologen

Durch Datenbankvergleich wurden orthologe PI4-Kinasen ermittelt. Zum einen wurden Kinasen der *Plasmodium* ssp. miteinander verglichen, zum anderen die ausgewählter Modellorganismen. Aus den so ermittelten Sequenzidentitäten sind die Verwandtschaftsgrade der verschiedenen Spezies ersichtlich. Die miteinander verglichenen PI4-Kinasen der *Plasmodium* ssp. sind naturgemäß näher miteinander verwandt als die *Pf*-PI4-Kinase mit den entsprechenden Orthologen der phylogenetisch weiter entfernten *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana* etc. (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1
Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten der *Pf*-PI4-Kinase zu Orthologen in *Plasmodium* ssp.

<i>Plasmodium</i> ssp.	Identität (in %)	Ähnlichkeit (in %)
<i>Plasmodium vivax</i> (1.526 aa)	47,9	70,5
<i>Plasmodium berghei</i> (1.393 aa)	42,9	61,7
<i>Plasmodium yoelii</i> (1.655 aa)	49,3	69,1
<i>Plasmodium knowlesi</i> (1.540 aa)	49,5	71,8

Tabelle 3.2
Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten der katalytischen Domäne der *Pf*-PI4-Kinase zu Orthologen in anderen Spezies

Spezies	Identität (in %)	Ähnlichkeit (in %)
<i>Plasmodium vivax</i>	92,7	98,4
<i>Plasmodium berghei</i>	71,2	83,9
<i>Plasmodium yoelii</i>	82	94,4
<i>Plasmodium knowlesi</i>	85,9	94,1
<i>Toxoplasma gondii</i>	57,1	80,1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40,4	69,2
<i>Homo sapiens</i> beta-chain	44,9	76,5
<i>Arabidopsis thaliana</i>	42,6	69,5
<i>Drosophila melanogaster</i>	38,4	67,3

Ein jedoch in allen untersuchten Organismen gleiches Schema bezüglich der Struktur der PI4-Kinasen ist die hochkonservierte, katalytische Kinasedomäne am C-Terminus des Proteins (siehe Tabelle 3.2).

3.1.4 Stabile Transfektion eines GFP-*Pf*-PI4K-Konstrukts in *P. falciparum*

Die Generierung eines Antikörpers gegen *Pf*-PI4K schlug fehl, somit konnte kein Immuno Fluorescence Assay (IFA) zur Detektion des Proteins in der Zelle durchgeführt werden. Eine Alternative zum IFA ist die Möglichkeit, das Zielprotein an das “green fluorescent protein” (GFP) gekoppelt zu exprimieren und es durch Anregung mit kurzwelligem Licht bei konfokaler Lichtmikroskopie zu visualisieren.

Für *Plasmodium falciparum* existiert der pARL1a+-Vektor, der routinemäßig für die Generierung von GFP-Fusionsproteinen und für stabile Transfektionen eingesetzt wird (Crabb et al., 2004).

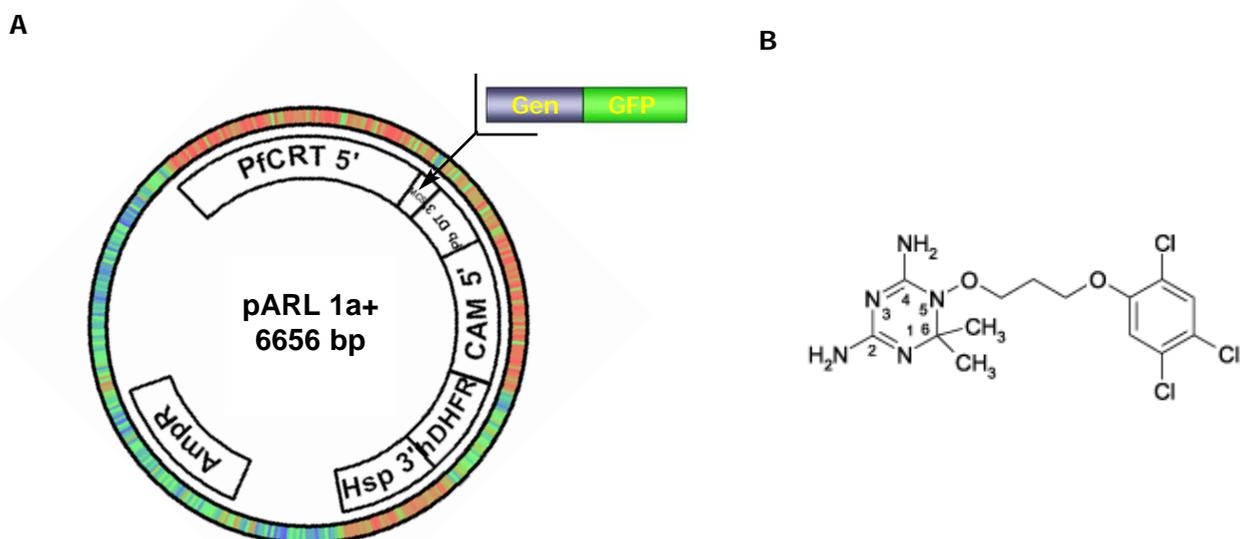


Abbildung 3.3

A Transfektionsvektor pARL1a+

Das für das GFP-Fusionsprotein kodierende Fragment wird in die MCS kloniert.

B Struktur des synthetischen Pyrimethamin-Derivates WR99210

Neben der Expressionskassette für das GFP trägt der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen für die bakterielle Selektion sowie die humane Variante der Dihydrofolat-Reduktase. Diese vermittelt Resistenz gegen das synthetische Pyrimethamin-Derivat WR99210 (Fidock und Wellems, 1997; siehe Abbildung 3.1.5).

Das *Pf*-PI4K-Protein enthält an seinem N-Terminus zwei putative PEXEL-Motive (Aminosäuren 30-34: **KNLKE** und 80-84: **KNLNE**). Dieses Motiv spielt, wie bereits beschrieben, eine entscheidende Rolle in der Translokation von Proteinen über die PVM. Somit war es durchaus möglich, dass das *Pf*-PI4K in den Erythrozyten transportiert werden würde. Die generierten Konstrukte bestanden aus den Aminosäuren 1-20/-40/-70/-100/-350 sowie der kompletten PI4-Kinase (mit 1.559 Aminosäuren), wobei das GFP jeweils C-terminal fusioniert war.

Nach erfolgter Transfektion und Kultivierung einer gegen den Selektionsmarker WR99210 resistenten Population konnte in jedem konfokal-mikroskopisch untersuchten Parasiten die Expression von GFP nachgewiesen werden. Die zelluläre Lokalisierung des Fusionsproteins bzw. die Fluoreszenz war dabei immer im Zytosol von *P. falciparum* zu finden. Es konnte kein Parasit identifiziert werden, in dem definierte Strukturen wie das ER, der Apicoplast innerhalb seiner Zelle oder Strukturen im Erythrozyten wie z.B. die Maurer's Clefs angefärbt waren. Aufgrund dessen wird auf die Abbildung aller Parasitenlinien verzichtet und exemplarisch nur eine dargestellt (siehe Abbildung 3.4).

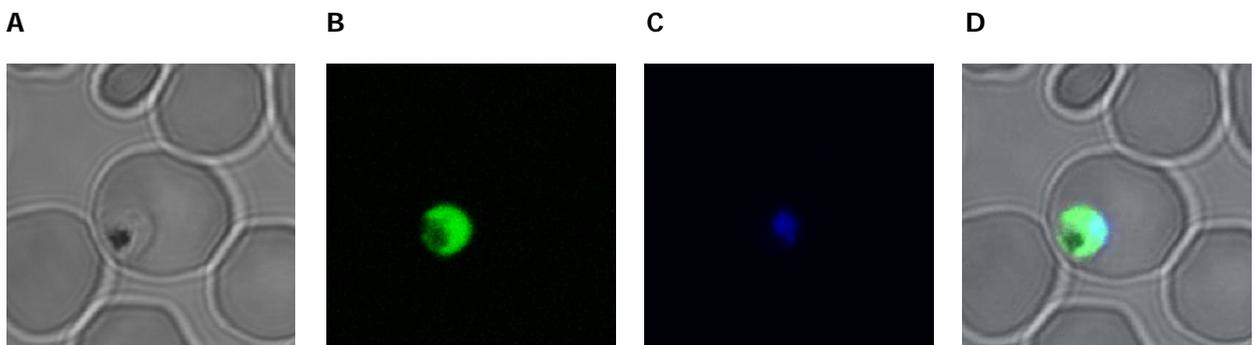


Abbildung 3.4

Lokalisierung von *Pf*-PI4K-GFP-Chimären in infizierten Erythrozyten

Die konfokale Aufnahme zeigt die subzelluläre Lokalisierung des *Pf*-PI4K-GFP-Fusionsproteins im Zytosol des Parasiten (frühes Trophozoitenstadium).

A Durchlicht

B GFP

C Hoechst33342

D Überlagerung der Aufnahmen A-C

3.1.5 Untersuchungen zur PI4K-Genfunktion mittels "reverse genetics"

3.1.5.1 "Gene-knock-out" von *Pf*-PI4K durch Deletion in *P. falciparum*

Die Strategie ein Gen in *P. falciparum* zu deletieren unterscheidet sich nur unwesentlich von der in *P. berghei* verfolgten (siehe 3.1.5.3) - auch hier musste ein Transfektionskonstrukt hergestellt werden, bei dem Teile der 5'- und 3'-UTRs sowie der kodierenden Sequenzen im 5'- und 3'-Bereich von *Pf*-PI4K kloniert wurden.

Der für *P. falciparum* verwendete Transfektionsvektor pHTK trägt neben der humanen Variante der Dihydrofolat-Reduktase, die Resistenz gegen das Pyrimethamin-Derivat WR99210 verleiht, noch einen weiteren, negativen Selektionsmarker (siehe Abbildung 3.5).

Dabei handelt es sich um das Gen für die Thymin-Kinase (TK), die im *Herpes simplex Virus* (HSV) entdeckt und kloniert wurde. Als synthetisches Substrat für die TK dient das Guanin-Analogon Ganciclovir (GC), welches dem Kulturmedium für die transfizierten Parasiten zugegeben wird. Zunächst wird das GC von der TK zum Monophosphat, anschließend von endogenen *Pf*-Guaninkinasen zum Triphosphat phosphoryliert. Dieses Triphosphat wird dann als syn-

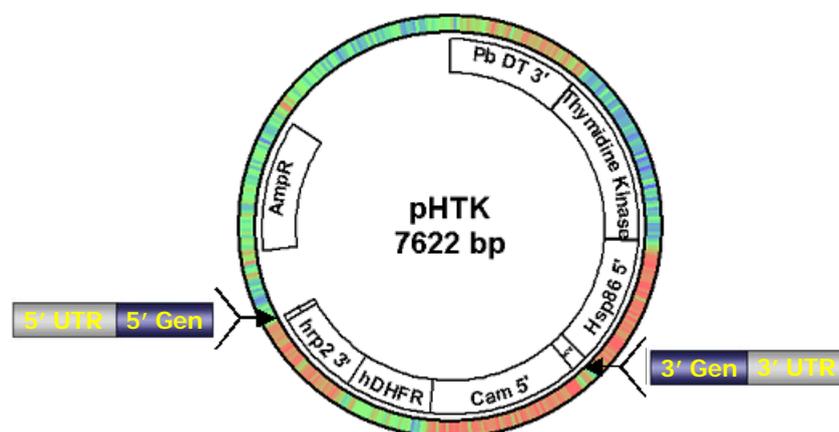


Abbildung 3.5
Transfektionsvektor pHTK

Um eine vollständige Deletion des Zielgens in *P. falciparum* zu erreichen werden genspezifische Fragmente zu beiden Seiten der hDHFR-Kassette kloniert und Parasiten mit dem Plasmid transfiziert.

thetisches Nukleosid-Analogon bei der DNA-Replikation eingebaut und führt somit zum Kettenabbruch. Die Parasiten sind nicht mehr in der Lage, ihren intra-erythrozytären Lebenszyklus zu Ende zu führen und sterben ab.

Durch die Art und Weise, wie das Plasmid konstruiert ist, verliert dieses bei einem “double crossover”, d.h., bei der homologen Rekombination, sein Grundgerüst inklusive der HSV-TK. Konsequenterweise überleben somit nur Parasiten, bei denen ein “double crossover” stattgefunden hat und das Gen für die TK nicht mehr vorhanden ist. Das bedeutet, dass auch die Parasiten absterben, die zwar erfolgreich transfiziert wurden, das Plasmid und folglich die TK allerdings noch episomal tragen.

Nach Transfektion und Positivselektion auf pHTK/*Pf*-PI4K tragende Parasiten wurden drei verschiedene Vorgehensweisen für die Negativselektion mit GC gewählt:

- 1) nach Auftreten der ersten Parasiten im Ausstrich sofortige Supplementation des Kulturmediums mit 4 μ M GC bis zum Absterben der Parasiten, bis keine Parasiten mehr im Ausstrich zu detektieren sind; weiterhin Zugabe von WR99120.
- 2) nach Auftreten der ersten Parasiten im Ausstrich drei Wochen Kultivierung ohne WR99120, um gegen Episome und für die Integration des Konstrukts zu selektionieren, anschließend mit 4 μ M GC wie unter 1) verfahren.
- 3) wie unter 2), nur wurde 6 Wochen auf den Selektionsdruck durch WR99120 verzichtet.

Nach Zugabe von GC konnte das Absterben der Parasiten verfolgt werden. Waren im Ausstrich keine Parasiten mehr zu detektieren, wurde das GC abgesetzt und die Parasiten normal weiter kultiviert. Parasiten, die durch double crossover das endogene *Pf*-PI4K mit dem Vektor rekombiniert haben, sollten nach 30-40 Tagen im Blutausstrich zu detektieren sein.

Die erste Runde der Transfektion mit anschließender Negativ-Selektion durch GC führte zu keiner Parasitenpopulation, die resistent gegen WR99210 und GC war.

Die nach der Transfektion erhaltenen Parasiten, die positiv waren für das pHTK-PI4K-Konstrukt, wurden eingefroren und anschließend für weitere Selektionszyklen aufgetaut. Da homologe Rekombinationen ein statistisch unwahrscheinliches Ereignis darstellen, wurde die gesamte Prozedur noch zwei Mal wiederholt. Dabei konnte nie eine Population generiert werden, nachdem sie durch Zugabe von GC nicht mehr im Ausstrich zu detektieren war.

So wurden drei Ansätze mit insgesamt 9 Versuchen durchgeführt. Im dritten Ansatz wurden auch unterschiedliche GC-Konzentrationen zur Negativ-Selektion eingesetzt, um eine resistente Population zu erhalten. Auch dies führte zu keinen rekombinierten Parasiten.

Das erhaltene Ergebnis lässt somit die Vermutung zu, dass es sich bei dem PI4K-Gen von *P. falciparum* um ein für seine Proliferation während des intra-erythrozytären Stadiums essenzielles Gen bzw. es sich bei der kodierten Kinase um ein essenzielles Enzym handelt.

3.1.5.2 "Gene-knock-out" von *Pf*-PI4K durch Integration in *P. falciparum*

Eine alternative Strategie ein Gen auszuschalten, ist die Integration von komplementärer DNA in den WT-Lokus. Dabei wird das offene Leseraster zerstört und es kann nicht zur Expression eines funktionsfähigen Proteins kommen. Das Integrationskonstrukt besteht aus einem beliebigen Plasmid, z.B. pARL1a+, mit einer zum Zielgen komplementären Sequenz. Da nur ein Sequenzabschnitt kloniert ist, kann es bei der Integration im Gegensatz zur Deletion, die mit zwei spezifischen Sequenzen funktioniert (siehe pHTK-Vektor, Abbildung 3.5), nicht zu einem doppelten Crossover kommen. Dieses nur einfache Rekombinationsereignis hat den theoretischen Vorteil der größeren Wahrscheinlichkeit, ist also leichter herbeizuführen als der Austausch. Die Strategie des Austauschs bzw. der Deletion hat wiederum den Vorteil, stabiler zu sein, da durch das doppelte Crossover keine Reversion des so mutierten Locus möglich ist.

Für diesen Versuch wurde das pARL-Konstrukt (siehe Abbildung 3.3 A) verwendet, das die ersten 1.050 Nukleotide des *Pf*-PI4K-Gens enthielt. Nach erfolgreicher Transfektion und Anzucht einer resistenten Population wurde WR99210 aus dem Kulturmedium entfernt. Somit wurde kein Selektionsdruck mehr auf die Parasiten ausgeübt, die daraufhin das episomale pARL-Konstrukt entweder verloren oder, sehr viel seltener, es in ihr Genom integrierten. Bei dieser Art des Versuchs liegt der Nachteil des pARL-Vektors darin, dass er verschiedene *P. falciparum*-spezifische Sequenzen enthält und folglich mehrere homologe Sequenzen zur Rekombination zur Verfügung stehen, wie z.B. die *Pf*-CRT-UTR.

Die Parasiten wurden 3, 6 und 10 Wochen ohne WR99210 kultiviert, um sie nach Ablauf der Phase wieder unter Selektionsdruck zu setzen. Parasiten, die ihren episomalen pARL-Vektor verloren hatten, starben. Die, die ihn integriert hatten, besaßen noch immer die humane DHFR und überlebten somit die Behandlung mit WR99210.

Bei Wiederaufnahme des Selektionsdrucks war häufig zu beobachten, dass die Parasiten nicht unter das Detektionslimit im Blutaussstrich kamen. Was entweder bedeutete, dass die Parasiten ihr Episom nicht verloren hatten oder, was sehr viel unwahrscheinlicher war, bereits eine Population mit integriertem Plasmid in der Kultur vorhanden war. Nach PCR-Analyse der präparierten genomischen DNA wurde diese Annahme in fast allen Fällen bestätigt.

In einem Fall konnte eine Population kultiviert werden, bei der es nicht möglich war, das Plasmid zu präparieren. Jedoch war sie resistent gegen die Behandlung mit WR99210 und musste folglich noch die hDHFR tragen.

Nach der Präparation der genomischen DNA wurde mit einer PI4K-spezifischen Primerkombination der Locus amplifiziert. Auf dem analytischen Agarosegel ist bei der gDNA des Integranden eine Verschiebung des PCR-Produkts festzustellen (siehe Abbildung 3.6 B). Das

entsprechenden Fragment wurde kloniert und sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass der Locus verändert wurde durch die zweifache Insertion einer repetitiven Sequenz, die allerdings das offene Leseraster nicht unterbrach (siehe Abbildung 3.6 A).

Die so genetisch modifizierten *Plasmodien* zeigten weder eine abnorme Morphologie noch verlangsamte Wachstumsraten, wiesen also keinen charakterisierbaren Phänotyp auf.

A

Nukleotid	351					400
<i>Pf</i> -PI4K-3D7-gDNA	TGATGATGGT	GATGATGATG	ATG.....GT		GATGATGATG
<i>Pf</i> -PI4K-Int-gDNA	TGATGATGGT	GATGATGATG	ATG ATGATGA	TGATGATGGT		GATGATGATG
<i>Pf</i> -PI4K-3D7-cDNA	TGATGATGGT	GATGATGATG	ATG.....GT		GATGATGATG
	401					450
<i>Pf</i> -PI4K-3D7-gDNA	ATGATGATGA	TGATGATGAT	GGTGATGATG	ATGGTGATGA		TGATGGTGAT
<i>Pf</i> -PI4K-Int-gDNA	ATGATGATGA	TGATGATGAT	GGTGATGATG	ATGGTGATGA		TGATGGTGAT
<i>Pf</i> -PI4K-3D7-cDNA	ATGATGATGA	TGATGATGAT	GGTGATGATG	ATGGTGATGA		TGATGGTGAT
	451					500
<i>Pf</i> -PI4K-3D7-gDNA	GATGATGGTG	ATGATG....
<i>Pf</i> -PI4K-Int-gDNA	GATGATGGTG	ATGATG ATGA	TGATGATGAT	GATGATGGTG	ATGATGATGA	
<i>Pf</i> -PI4K-3D7-cDNA	GATGATGGTG	ATGATG....
	501					550
<i>Pf</i> -PI4K-3D7-gDNA	GTGATGATGA	TAGTAATAGT		AACGATGATA
<i>Pf</i> -PI4K-Int-gDNA	TGATGATGGT	GATGATGATG	GTGATGATGA	TAGTAATAGT		AACGATGATA
<i>Pf</i> -PI4K-3D7-cDNA	GTGATGATGA	TAGTAATAGT		AACGATGATA

B

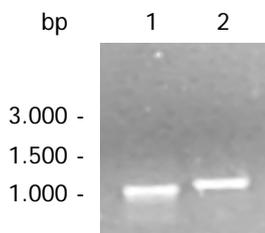


Abbildung 3.6

Integration in den *Pf*-PI4K-Lokus

Nach Transformation von 3D7-Wildtyp-Parasiten mit dem pARL-PI4K-Integrationskonstrukt konnten zusätzliche Nukleotide im 5'-Bereich des *Pf*-PI4K-Gens nachgewiesen werden.

A Vergleich Wildtyp- und Integrations-Sequenz

Zusätzliche Nukleotide im Integrations-Stamm sind rot markiert

B Vergleich der PCR-Fragmente des *Pf*-PI4K-Lokus

1 gDNA 3D7 Wildtyp

2 gDNA Integrationsstamm

3.1.5.3 "Gene-knock-out" durch Deletion des PI4K-Orthologs in *P. berghei*

Zur Überprüfung und Verifizierung der für *P. falciparum* erhaltenen Daten zum Deletionsversuch von Pf-PI4K wurde auf das etablierte System des nahe verwandten Erregers *P. berghei* zurückgegriffen.

Für *P. berghei*, den Erreger der Nagetier-Malaria, wurde ein neuartiges Transfektionsprotokoll etabliert. Dabei kann eine Transfektionseffizienz von 10^3 - 10^4 erreicht werden, was die Effizienz gegenüber dem alten Protokoll um ein Hundertfaches steigert. Das erspart neben dem zeitlichen Aufwand für die Selektion auch den Bedarf an Versuchstieren für dieses Experiment (Janse et al., 2006).

Das Protokoll verwendet die "nonviral nucleofector technology" (Amaza) und aufgereinigte *P.*

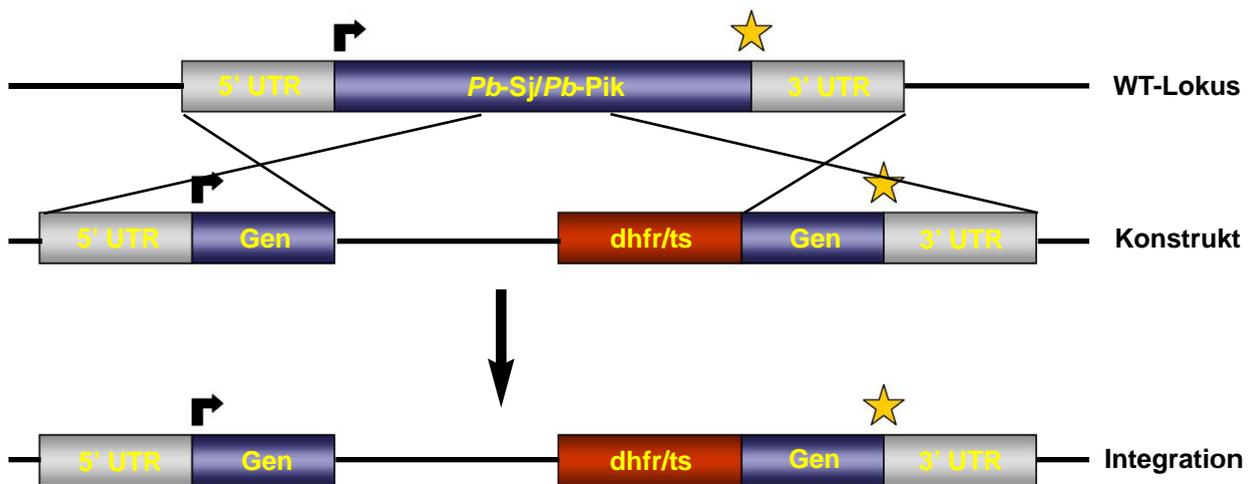


Abbildung 3.7

Schematische Darstellung der Knock Out-Strategie für *Plasmodium berghei*

Die *P. berghei*-Wildtyploci von Pik1p und Sj1 mit ihren flankierenden UTRs sind oben dargestellt, das komplementäre KO-Konstrukt mit Selektionsmarker (dhfr/ts) darunter. Die unterste Zeile stellt die Situation nach Integration des Konstrukts in den Wildtyp-Lokus dar.

UTR untranslated region; dhfr/ts Dihydrofolatreduktase; Pfeil Transkriptionsstart; Stern Transkriptionsstopp

berghei-Schizonten, die weitaus stabiler gegenüber dem Transfektionsprozess sind als z.B. die bei *P. falciparum* verwendeten Ringstadien. So können stabile Transfektanden schon nach wenigen Tagen erhalten und analysiert werden.

Für die Integrationsstrategie wurde ein verkürzter Abschnitt des *Pf*-PI4K-Orthologs in den b3d-Transfektionsvektor kloniert. Dem Integrationsfragment fehlen Teile des 5' Endes sowie des 3' Endes, sodass kein funktionelles Protein entstehen kann (siehe Abbildung 3.7). Die Lokalisation der Insertionssequenz innerhalb der Transfektionsvektors wurde direkt hinter der 3' UTR des Selektionsmarkers *TgDHFR/TS* gewählt. Die homologen Sequenzabschnitte im linearisierten Konstrukt lösen im Parasiten einen double-strand-break-repair-Mechanismus aus. Dieser hat eine homologe Rekombination mit dem endogenen *Pb*-PI4K zur Folge, wobei ein einfaches crossover stattfindet. Auf diese Weise wird das *Pb*-PI4K-Gen innerhalb des Genoms deletiert. Der rekombinante Locus ist allelisch diploid, da es nach Insertion zu einer Verdopplung der Sequenzen kommt. Da das Konstrukt mit DHFR/TS von *Toxoplasma gondii* eine artfremde Form der Dihydrofolat-Reduktase zur Selektion mit Pyrimethamin enthält, wird die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination mit dem endogenen *P. berghei* DHFR/TS-Gen minimiert.

Die Transfektion des b3d-*Pb*-PI4K-Konstrukts wurde wie beschrieben durchgeführt und die Ab- bzw. Zunahme der Parasitämie durch Auszählen infizierter Erythrozyten verfolgt. Dabei war zu beobachten, dass an Tag 3 Post-Transfektion, also zwei Tage nach Applikation von Pyrimethamin, die Parasitämie auf ein nicht mehr optisch detektierbares Niveau sank.

Unter normalen Umständen ist das Auftreten von erfolgreich transfizierten Parasiten nach etwa 7 bis 9 Tagen zu beobachten.

Der Versuch der Deletion des *Pb*-PI4K-Gens wurde insgesamt 3x durchgeführt, jedoch konnten nie Parasiten im Blutausschlag der Tiere nachgewiesen werden. Daraus lässt sich folgern, dass es sich bei dem PI4K-Ortholog von *Plasmodium berghei* um ein für die Proliferation im Blutstadium essenzielles Gen bzw. Protein handelt. Somit konnten die Daten aus den Knock Out-Experimenten in *P. falciparum* bestätigt werden.

3.1.9 *Saccharomyces cerevisiae* - der Modellorganismus

Die Expression von *Plasmodium falciparum*-Proteinen in heterologen Systemen stellt aufgrund des AT-reichen Genoms oftmals ein unüberwindbares Hindernis dar. So wurde im Verlauf dieser Arbeit auf vielfältige Art und Weise versucht, in unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen das komplette PI4K-Protein sowie Fragmente davon inklusive der katalytischen Domäne heterolog zu

exprimieren. Konnte eine Expression im Coomassie-gefärbten Gel nachgewiesen werden, so stellte sich bei weiterer Überprüfung die Unlöslichkeit des Produkts heraus, d.h., das Fusionsprotein war in “inclusion bodies” eingeschlossen und somit einer biochemischen “*in vitro*”-Charakterisierung nicht zugänglich.

Durch Sequenzvergleiche mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) von orthologen Proteinen aus den unterschiedlichsten Organismen konnte angenommen werden, dass das annotierte Gen für eine Phosphatidylinositol-4-Kinase kodiert (siehe Abbildung 3.1 und Tabelle 3.1 und 3.2). Diese “*in silico*”-Aussage beruht nur auf einer berechneten Wahrscheinlichkeit, die ohne jeden experimentellen Nachweis getroffen wurde.

Eine große Rolle in der molekulargenetischen Forschung spielt seit Jahrzehnten die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Hefezellen sind nicht nur sehr gut zu kultivieren, sondern auch leicht genetisch zu manipulieren und besitzen darüber hinaus eine ausgeprägte subzelluläre Morphologie für ultrastrukturelle Untersuchungen. Diese Eigenschaften machten *S. cerevisiae* zum Modellorganismus der Molekularbiologie und zum ersten eukaryotischen Genom, welches komplett sequenziert wurde (Goffeau et al., 1996).

Von *Saccharomyces cerevisiae* gibt es ganze Mutantenbibliotheken, deren Phänotypen komplett charakterisiert und veröffentlicht sind.

Unter einer Komplementation versteht man die Rückführung eines für ein bestimmtes Gen bzw. Protein defizienten Hefestammes in den Wildtyp-Phänotyp. Das geschieht mithilfe des zu untersuchenden Orthologs, welches in den Hefestamm transformiert, dort zur Expression gebracht wird und dadurch die Funktion des endogenen, aber fehlenden Proteins übernehmen kann.

Zur *P. falciparum*-PI4Kinase existieren zwei Orthologe in *S. cerevisiae*, STT4 und Pik1p. Beide Gene, Mutanten davon und deren Phänotypen sind charakterisiert (Flanagan et al. 1993; Garcia-Bustos et al., 1994; Pramanik et al., 1997). Weder von Pik1p noch von STT4 konnten lebensfähige Nullmutanten generiert werden, d.h., beide Genprodukte erfüllen essenzielle Aufgaben innerhalb der Zelle.

Es existiert eine synthetische, temperatursensitive Mutante Pik1pts, die bei der permissiven Temperatur von 30°C wachsen kann, bei der nicht-permissiven Temperatur von 37°C hingegen nicht. Dieser Phänotyp wurde für die Komplementationsstudie mit *Pf*-PI4K ausgewählt, da er eine leichte Identifizierung von transformierten Hefezellen ermöglicht, deren Phänotyp mithilfe des *P. falciparum*-Orthologs “gerettet” werden konnte.

3.1.9.1 “in vivo“-Analyse von temperatursensitiven *S. cerevisiae*-Pik1p Mutanten durch Komplementation mit dem *P. falciparum*-PI4K

Mithilfe des temperatursensitiven *Saccharomyces cerevisiae*-Stammes JC203-3 konnte nachgewiesen werden, dass Pik1p genetisch mit den einzelnen Sjl-Genen von *S. cerevisiae* interagiert, eine wichtige Rolle in der Regulation der Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungszyklen der Phosphatidylinositole spielt und in den Membrantransport der Hefezelle eingreift (Nguyen et al., 2005).

Als Vektor verwendet wurde pESC-TRP (Stratagene), der es einem damit transformierten Tryptophan(TRP)biosynthese-defizienten Hefestamm ermöglicht, in einem Tryptophan-Mangelmedium zu wachsen. Die in das Plasmid klonierten Gene liegen unter der Kontrolle der durch Galaktose induzierbaren GAL1- und GAL10-Promotoren.

Die zwei verkürzten Versionen des *Pf*-PI4K-Gens mit 1,4 und 1,9 kb wurden als “Minigene” kloniert, da eine heterologe Expression der Kinase in verkürzter Form erfolgsversprechender erschien. Das endogene *S. cerevisiae*-Pik1p wurde als Positivkontrolle ebenfalls kloniert. Anschließend wurden sie jeweils in den Hefe-Stamm JC203-3 transformiert. Als Negativkontrolle fungierte der “leere” pESC-TRP-Vektor. Das Ganze wurde auf Tryptophan-defizientem Galaktosemedium ausplattiert und bei 30°C und 37°C für zwei bis vier Tage inkubiert.

Die 30°C-Platte fungierte dabei als Positivkontrolle. Auf der 37°C-Platte gewachsene Kolonien wurden somit doppelt selektioniert: auf Vorhandensein des Konstrukts sowie auf eine erfolgreiche Komplementation mithilfe der *Plasmodium falciparum*-PI4K-Isoformen. Die so generierten und identifizierten Hefe-Stämme wurden zur Verifizierung des Befundes weiter analysiert. Von den komplementierten Stämmen wurde jeweils ein Klon ausgewählt und analysiert (siehe Abbildung 3.8 A und B).

3.1.9.2 Plasmid-Analyse komplementierter Hefe-Zellen

Die nach der Transformation mit dem exogenen *Pf*-PI4K auf Induktionsplatten bei 37°C gewachsenen Pik1pts-Mutanten wurden auf Vorhandensein der pESC-*Pf*-PI4K-Konstrukte untersucht. Dabei wurden die zu analysierenden Hefe-Klone über Nacht angezogen, aufgeschlossen und die Plasmid-DNA präpariert. Die so erhaltene DNA wurde anschließend zur Vermehrung in elek-

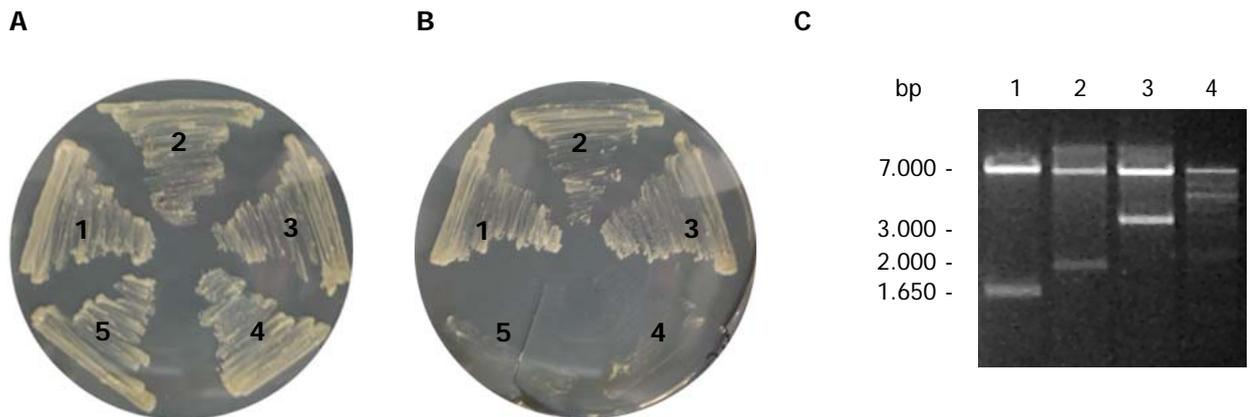


Abbildung 3.8

Komplementation des temperatursensitiven *S. cerevisiae*-Stammes JC203-3

- 1 JC203-3 mit pESC-*Pf*-PI4K (1,4 kb Minigen)
- 2 JC203-3 mit pESC-*Pf*-PI4K (1,9 kb Minigen)
- 3 JC203-3 mit pESC-*Sc*-PI4K
- 4 JC203-3 mit pESC (leerer Vektor)
- 5 JC203-3

A Wachstum der verschiedenen Hefestämme bei der permissiven Temperatur von 30°C

B Wachstum der verschiedenen Hefestämme bei der nicht-permissiven Temperatur von 37°C

C "Plasmid-rescue" und enzymatischer Verdau (BamHI/ApaI) des mit den Vektoren 1-4 transformierten Stammes JC203-3

trokompetente, bakterielle PMC-Zellen transformiert und das Plasmid im Mini-Präp-Maßstab am

folgenden Morgen gewonnen. Durch einen Restriktionsverdau wurde die Identität des Plasmids inklusive seines Inserts aufgeklärt.

Die entsprechenden Plasmide konnten aus den erfolgreichen transformierten JC203-3-Hefezellen isoliert werden, d.h., es waren nach dem Restriktionsverdau das pESC-Grundgerüst (~6,5 kb) und die erwarteten Inserts zu detektieren; das endogene *Sc*-Pik1p bei einer Größe von etwa 3,2 kb, die *P. falciparum*-PI4K-Formen bei etwa 1,4 und 1,9 kb (siehe Abbildung 3.8 C).

3.2 Das Synaptojanin-like (Sjl) Protein in *Plasmodium*

3.2.1 Bestimmung der *Pf*-Sjl-Genstruktur

Aufgrund der bereits für das *Pf*-PI4K-Gen beschriebenen Probleme bei der in PlasmoDB veröffentlichten Daten war es auch beim Sjl-Gen notwendig, den Translationsstart sowie die Größe der kodierenden Region zu definieren.

Der Translationsstart wurde durch die strategische Wahl verschiedener Primer definiert. Die Position des Start-ATG konnte wie in PlasmoDB identifiziert und lokalisiert werden (ohne Abbildung).

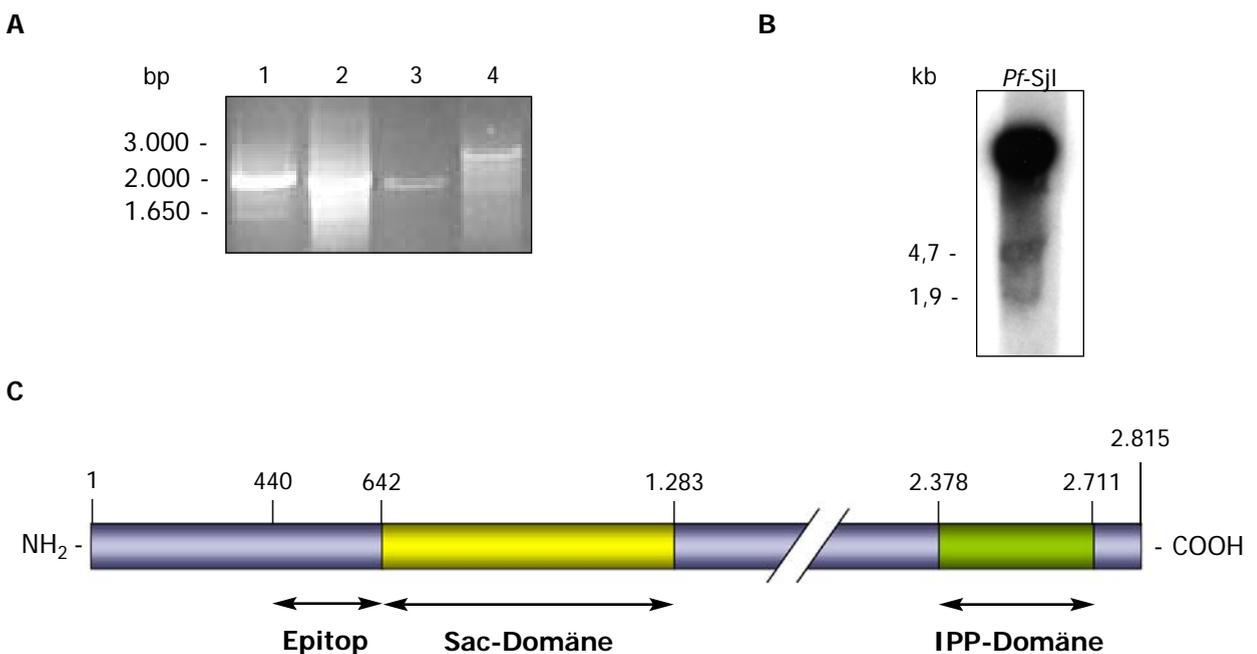


Abbildung 3.9

Das Sjl-Protein in *P. falciparum*

A PCR-Amplifizierung der *Pf*-Sjl-Fragmente auf cDNA

B Northern Blot mit *Pf*-Sjl-spezifischer Sonde

Es konnten keine Spleißvarianten von *Pf*-Sjl detektiert werden.

C Schematische Darstellung der Proteinstruktur von *Pf*-Sjl

Charakteristisch für Sjl-Proteine sind die Sac-Domäne sowie die C-terminale IPP-Domäne. Ein Fragment (Epitop aa 440-642) wurde für die Gewinnung eines spezifischen Antikörpers rekombinant exprimiert.

Das Sjl-Gen besteht aus zwei Exons, unterbrochen von einem Intron mit 241 Nukleotiden. Annotiert war es mit 8.686 Nukleotiden mit einem offenen Leseraster von 8.445 Nukleotiden, was auch experimentell bestätigt werden konnte. Wegen der Gesamtlänge von beinahe 9 kb war es praktisch unmöglich, eine durchgängige Amplifizierung des Gens zu erreichen, da zuerst in der RT-PCR ein komplettes cDNA-Transkript hergestellt werden musste, das auch in einer darauffolgenden Long Range-PCR reproduzierbar war.

Für die Größenbestimmung wurde das Sjl-Gen in 2 - 2,5 kb Stücke fragmentiert und auf cDNA-Ebene amplifiziert (siehe Abbildung 3.9 A). Da die Primer überlappend waren, der jeweilige reverse-Primer also immer komplementär zum forward-Primer für den darauffolgenden Abschnitt war, konnte ein durchgängiges Leseraster auf cDNA-Ebene in der Größe von 8.445 Nukleotiden bestätigt werden. Somit kodiert es für ein Protein mit 2.814 Aminosäuren mit etwa 330 kDa. Mittels Northern Blot unter der Verwendung einer für die ersten 300 Nukleotide spezifischen Sonde konnten die Größe des Transkripts bestätigt und Spleißvarianten ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 3.9 B).

Aufgrund der Größe des Transkripts wird hier auf eine Abbildung der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen verzichtet und auf www.plasmodb.org (Gene ID PF07_0024) verwiesen.

3.2.2 Vergleich von *Pf-Sjl* mit verschiedenen Orthologen

Fast alle in PlasmoDB aufgeführten *Plasmodium*-Orthologe von Sjl besitzen eine ungefähr gleiche Größe. Aufgrund dessen wird an dieser Stelle von einem Alignment der Gene abgesehen und die relativen Übereinstimmungen der einzelnen Orthologe werden nur tabellarisch dargestellt (siehe Tabelle 3.3).

Gleichbleibendes Schema bei allen ist jedoch die Genstruktur, bei der eine zentrale Sac-Domäne und eine C-terminale, zusätzliche Phosphatase-Domäne zu finden ist (siehe Abbildung 3.9 C).

Tabelle 3.3
Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten der *Pf-Sjl* zu Orthologen in *Plasmodium* ssp.

<i>Plasmodium</i> ssp.	Identität (in %)	Ähnlichkeit (in %)
<i>Plasmodium vivax</i> (2.755 aa)	43,2	67,6
<i>Plasmodium berghei</i> (2.436 aa)	44,6	67
<i>Plasmodium yoelii</i> (2.498 aa)	43,6	65,1
<i>Plasmodium knowlesi</i> (2.661 aa)	43	67,9

3.2.3 Rekombinante Expression des *Pf*-Sj1-Peptids

Für die Gewinnung von Antikörpern gegen die von *Plasmodium* kodierten Proteine bzw. gegen Peptide dieser Proteine war deren heterologe Expression in *E. coli* notwendig, da kein homologes Transformationssystem für die Überexpression von Proteinen in *Plasmodium* existiert. Somit musste das bakterielle Expressionsplasmide pGEX4T1 (Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase) verwendet werden. Die Fusionsproteine konnten dann in *E. coli* BL21(RIL) zur Expression gebracht werden.

Bei der heterologen Expression von Genen in *E. coli* nehmen verschiedene Faktoren Einfluss auf die Menge und die Eigenschaften des gebildeten Proteins. Über die Induktionszeit, die Anzuchttemperatur, IPTG-Konzentration und die Wahl des Bakterienstammes lassen sich unter anderem die Expressionsrate des Gens sowie die Löslichkeit und die Stabilität des Translationsproduktes beeinflussen. Jeder dieser Parameter musste zunächst optimiert werden, um bei der präparativen Expression eine möglichst hohe Ausbeute zu erhalten.

Es existiert ein gegen das humane Sj1-Ortholog gerichteter, kommerzieller Antikörper. Durch Vergleich der Region, die für die Herstellung des Antikörpers ausgewählt wurde, konnte auch für das *Pf*-Sj1-Gen ein potenziell immunogener Bereich ausgemacht werden. Weitere *in silico*-Analysen deuteten für diese Region auch eine hohe Oberflächenwahrscheinlichkeit angenommen werden.

Die Aminosäuren 442-640 wurden als Peptid für die Immunisierung ausgewählt. Mithilfe entsprechender Primer wurde das Fragment auf cDNA-Ebene PCR-amplifiziert (siehe Abbildung 3.10 A). Nach erfolgreicher Klonierung wurde die lösliche Expressierbarkeit des GST-Fusionsproteins getestet und anschließend im präparativen Maßstab für die Aufreinigung hergestellt.

3.2.4 Aufreinigung des *Pf*-Sj1-Peptids

Das in den *E. coli* Expressionsvektor pGEX4T1 klonierte Fragment von *Pf*-Sj1 (Nt 1.326-1.920) wurde mit dem GST(Glutathion-S-Transferase)-Tag am N-Terminus exprimiert. Der Vorteil bei GST-getagten Fusionsproteinen ist deren höhere Löslichkeit und die höhere Stabilität als vergleichbare Fusionsproteine, ein Nachteil liegt hingegen in der Größe des GST von ~26 kDa.

Nach Aufschluss der Zellen wurde der lösliche Überstand verwendet, um das Antigen über

Glutathion-Sepharose aufzureinigen. Dabei bindet das GST-Fusionsprotein an das über die Glutathion Sepharose 4B immobilisierte, reduzierte Glutathion. Nicht gebundene Proteine wurden durch mehrfaches Waschen entfernt und man erhielt eine für die Immunisierung ausreichende Reinheit des Antigens (siehe Abbildung 3.10 B).

So ist auf dem Coomassie-Gel der Aufreinigung die Durchlauf-Fraktion zu erkennen, die noch sehr viele unspezifische Proteine enthielten. Der Waschschrift mit 1x PBS wurde immer solange durchgeführt, bis die OD_{280} der Fraktion unter 0,1 war, d.h., es kaum noch Protein in der Lösung vorhanden war. Die anschließende Elution mit reduziertem Glutathion führte dann zu Fraktionen mit relativ großer Reinheit (siehe Elutionsfraktionen 1 und 2 in Abbildung 3.10 B). Das so gewonnene Antigen wurde ausreichend gegen 1x PBS dialysiert und die Konzentration per Bradford bestimmt. Die durch heterologe Expression gewonnene Menge an Gesamtprotein für das Pf-Sj1-Fragment betrug 440 $\mu\text{g/ml}$. Das aufbereitete Antigen war somit in einer ausreichenden Menge für die anschließende Immunisierung vorhanden.

3.2.5 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen das Pf-Sj1-Peptid

Die Immunisierung wurde von der AG Krohne in Würzburg durchgeführt. Dafür wurden zwei Meerschweinchen vier Mal alle 14 Tage 100 μg des Antigens subkutan gespritzt. Verwendet wurde dabei Freund-Adjuvans, um die Immunreaktion der Tiere zu "boosten" und eine bessere Ausbeute zu erhalten. Nach Ablauf des Immunisierungsplans wurden die Tiere getötet, ausgeblutet und das Serum für die weitere Verwendung präpariert.

3.2.6 Austestung des Pf-Sj1-Peptid-spezifischen Antiserums per Western Blot

Um den Immunisierungsgrad eines Tieres gegen ein bestimmtes Antigen zu verfolgen, können verschieden Tests durchgeführt werden. Der ELISA-Test (enzyme linked immunosorbent assay) ist ein quantitatives Verfahren, das z.B. die Zunahme des Antikörper-Titers untersucht. Andere, nur qualitative Verfahren sind der Western Blot oder der IFA.

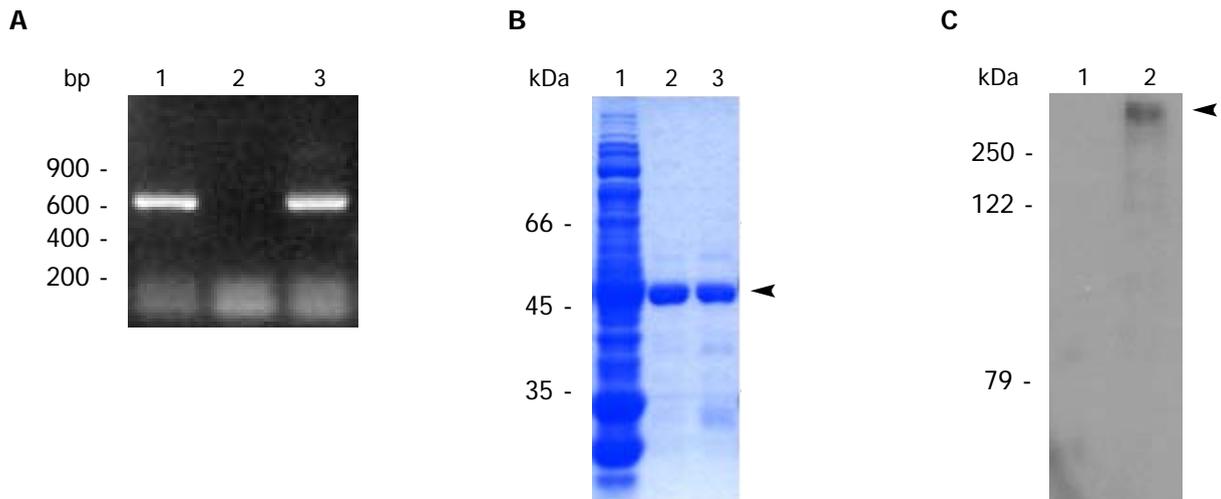


Abbildung 3.10

Herstellung eines polyklonalen anti-*Pf-SjI*-Antikörpers

A PCR-Amplifizierung des ausgewählten *Pf-SjI*-Epitops (Nukleotide 1326-1920)

- 1 cDNA
- 2 Wasser-Kontrolle
- 3 gDNA

B Aufreinigung des GST-fusionierten *Pf-SjI*-Peptids mittels Affinitätschromatographie

- 1 Durchfluss
- 2 Elutionsfraktion 1
- 3 Elutionsfraktion 2

Das aufgereinigte Peptid hat eine Größe von etwa 47 kDa (siehe Pfeil).

C Austestung des polyklonalen *Pf-SjI*-Antiserums in Western Blot

- 1 Erythrozytenlysat (uninfizierte Zelle)
- 2 Lysat *P. falciparum*-infizierte Erythrozyten

Das hergestellte Antiserum bindet spezifisch *Pf-SjI* im Lysat infizierten Erythrozyten (siehe Pfeil)

Da weder Prä-Immunsereen noch Zwischenstufensereen von der AG Krohne zur Verfügung gestellt wurden, konnte kein ELISA zur Austestung der Spezifität des polyklonalen Antiserums durchgeführt werden. Es wurde stattdessen ein Western Blot durchgeführt, bei dem die Reaktion des polyklonalen Serums gegen Proteinextrakte aus *P. falciparum*-infizierten und nicht-infizierten Erythrozyten miteinander verglichen wurden (siehe Abbildung 3.10 C).

Wie auf dem Blot zu sehen, konnte keine unspezifische Bande und somit keine Kreuzreaktivität des Antiserums mit humanen Erythrozyten-Proteinen detektiert werden. Im Gegensatz dazu erkennt das Serum eine hochspezifische Bande im Extrakt von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten bei weit über 250 kDa, was in der annotierten und in dieser Arbeit bereits verifizierten Größe des *Pf-SjI*-Proteins entspricht.

3.2.7 Immuno Fluorescence Assay (IFA) mit dem *Pf*-SjI-Antiserum

Der Immuno Fluorescence Assay ist eine indirekte, immunhistochemische Methode, die zur Identifizierung und subzellulären Lokalisierung von Proteinen eingesetzt wird. Das Funktionsprinzip beruht dabei auf der Wechselwirkung bzw. der starken Affinität eines Antikörpers zu dem Epitop eines Proteins. Als Epitop definiert wird ein kleiner, immunogener Molekülabschnitt von 8-10 Aminosäuren, zumeist auf der Oberfläche des Proteins. In einem folgenden Schritt wird ein sekundärer Antikörper zugegeben, der wiederum den konstanten Teil des Primär-Antikörpers erkennen und somit binden kann. Dadurch entsteht ein sehr stabiler Komplex aus Protein (mit Epitop), Primär- und Sekundär-Antikörper. Der Sekundär-Antikörper ist dann entweder an ein Enzym (z.B. Alkalische Phosphatase) gekoppelt oder trägt eine farbgebende Gruppe, ein sogenanntes Fluorochrom (z.B. Fluorescein, FITC etc.).

Die bei dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper waren Alexa488- und Alexa546-gekoppelt, Fluorochrome, welche bei einer Wellenlänge von 488 nm und 546 nm ein Anregungsmaximum besitzen. Um den Nukleus des Parasiten sichtbar zu machen, wurde der Farbstoff Hoechst33342 eingesetzt, der spezifisch Nukleinsäuren bindet und ein

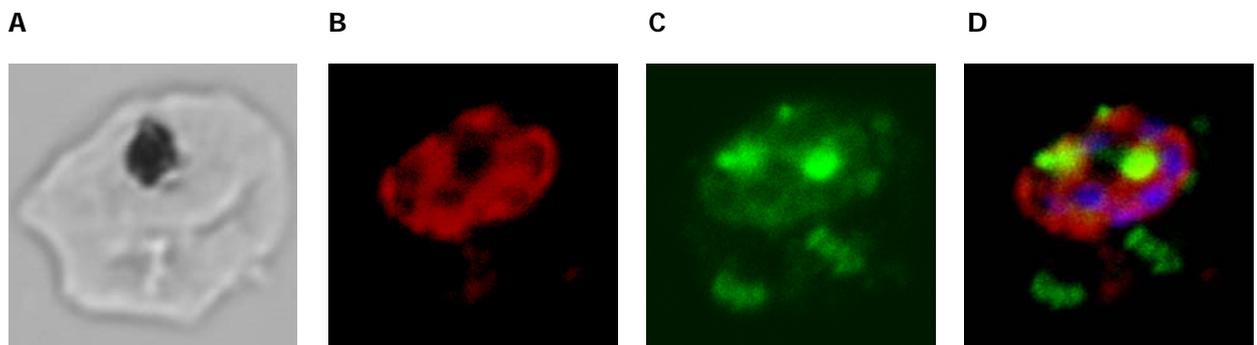


Abbildung 3.11

IFA zur Lokalisierung von *Pf*-SjI und *Pf*-SBP1 in infizierten Erythrozyten

Die konfokale Aufnahme zeigt die subzelluläre Lokalisierung von *Pf*-SjI im Zytosol des Parasiten und *Pf*-SBP1 in den Maurer's Clefts (Schizontenstadium).

A Durchlicht

B anti-*Pf*-SjI (Sekundärantikörper Alexa546-gekoppelt)

C anti-*Pf*-SBP1 (Sekundärantikörper Alexa488-gekoppelt)

D Überlagerung der Aufnahmen A-C und Hoechst33342 (Anfärbung der Nukleinsäuren)

Absorptionsmaximum bei 340 nm hat.

Der IFA mit dem Pf-Sjl-Antikörper (siehe Abbildung 3.11) zeigt eine deutliche zytosolische Lokalisierung von *Pf-Sjl*. Es wurden weder der Nukleus, das ER oder der Golgi spezifisch angefärbt, noch konnten Strukturen wie die Maurer's Clefts außerhalb des Parasiten angefärbt werden. Um das zu verdeutlichen, wurde eine Doppelmarkierung mit dem Maurer's Clefts-Marker *Pf-Sbp-1* (Blisnick et al., 2000) durchgeführt. Wie die Überlagerung der Einzelbilder deutlich sichtbar macht, kommt es zu keiner Co-Lokalisierung der beiden durch Antikörper markierten Proteine.

3.2.8 Stabile Transfektion eines GFP-*Pf-Sjl*-Konstrukts in *P. falciparum*

Zur Verifizierung der IFA-Daten wurden die Nukleotide 1-900 des Synaptojanin-like Gens in den Transfektionsvektor pARL1a+ kloniert. Da es technisch ausgeschlossen schien, die kompletten 8,5 kb des Gens zu klonieren und auch zu exprimieren, wurde dieser Weg gewählt. Dieser Bereich sollte ausreichend sein für eine korrekte Lokalisierung des Fusionsproteins.

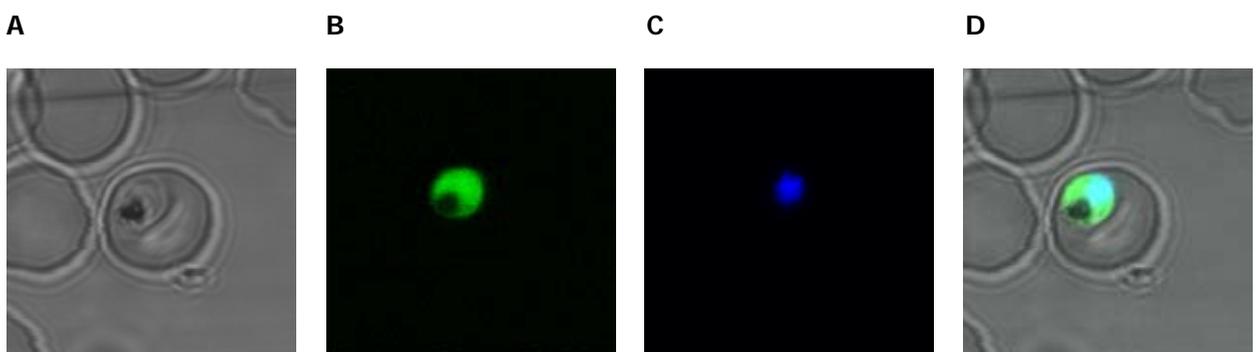


Abbildung 3.12

Lokalisierung von *Pf-Sjl*-GFP-Chimären in infizierten Erythrozyten

Die konfokale Aufnahme zeigt die subzelluläre Lokalisierung des *Pf-Sjl*-GFP-Fusionsproteins im Zytosol des Parasiten (frühes Trophozoitenstadium).

A Durchlicht

B GFP

C Hoechst33342

D Überlagerung der Aufnahmen A-C

Nach Transfektion und erfolgter Positivselektion einer resistenten Parasitenpopulation konnte durch konfokale Lichtmikroskopie die Expression des GFP-Sjl-Fragments nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.12).

Die Parasiten zeigten durchgehend und Stadium-unspezifisch eine Lokalisierung im parasitären Zytosol. Auch hier konnte weder der Nukleus, das ER oder der GA spezifisch angefärbt, noch konnten Strukturen wie die Maurer's Clefts außerhalb des Parasiten markiert werden.

Somit wurden die im IFA erhaltenen Daten zur Lokalisierung des endogenen *Pf*-Sjl durch das GFP-Sjl-Fusionsprotein bestätigt.

3.2.9 Untersuchungen zur *Pf*-Sjl-Genfunktion mittels "reverse genetics"

3.2.9.1 "Gene-knock-out" von *Pf*-Sjl durch Deletion in *P. falciparum*

Die verfolgte Strategie, das Sjl-Gen in *Plasmodium falciparum* zu deletieren, erfolgte analog zu der des *Pf*-PI4K-Gens (siehe Abschnitt 3.1.5.2), d.h., es wurden wiederum drei verschiedene Ansätze gewählt, um durch eine doppelte homologe Rekombination des Knock Out-Konstrukts mit der endogenen Sequenz eine Deletion zu erreichen. Da dies nach dem ersten Experiment mit den drei Strategien (siehe Abschnitt 3.1.5.2) fehlschlug, wurde das gesamte Prozedere noch zweimal mit den drei unterschiedlichen Ansätzen wiederholt. Dabei konnten ebenfalls keine resistenten, rekombinierten *Plasmodien*-Populationen gewonnen werden.

Somit war es in *P. falciparum* trotz unterschiedlicher Strategien nicht möglich, das Sjl-Gen zu deletieren. Dadurch vermehrten sich die Indizien auf eine essenzielle Funktion des Synaptojanin-like-Gens/-Proteins während der intra-erythrozytären Entwicklung von *Plasmodium falciparum*.

3.2.9.2 "Gene-knock-out" durch Deletion des *Pf*-Sjl-Orthologs in *P. berghei*

Die verfolgte Strategie, das Sjl-Gen in *Plasmodium berghei* zu deletieren, war analog zu der des

Pb-PI4K-Gens (siehe Abschnitt 3.1.5.3). Das b3d-Konstrukt enthielt ebenfalls sowohl genspezifische als auch UTR-spezifische Sequenzen von *Pb*-Sjl. Auch die Durchführung der Transfektion und die Selektion mit Pyrimethamin war gleich.

Im Gegensatz zum Deletionsversuch mit *Pb*-PI4K konnten aus insgesamt sechs Tieren zwei Populationen gewonnen werden, die eine Resistenz gegen Pyrimethamin aufwiesen. Diese Parasiten konnten allerdings erst 10 bzw. 12 Tage nach der Transfektion im Blutausschlag der Tiere nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.12 A). Von den so erhaltenen Parasiten wurden Stabiate hergestellt und die genomische DNA für das Nachweis-Screening per PCR präpariert. Für die Analyse des *Pb*-Sjl-Lokus der resistenten Parasiten wurden Primerkombinationen gewählt, die eine eindeutige Aussage zuließen, ob eine Rekombination stattgefunden hatte oder nicht (siehe Abbildung 3.13 A).

Die erste PCR-Analyse (siehe Abbildung 3.13 B) zeigte das Vorhandensein des Vektors innerhalb der Population auf. Die darauf folgende PCR ergab hingegen kein Produkt, wobei die Primer so gewählt waren, dass nur bei verändertem WT-Lokus (also bei erfolgter Rekombination) ein Produkt möglich gewesen wäre (siehe Abbildung 3.13 A). Damit war der *Pb*-Sjl-Lokus gegenüber dem WT-Lokus nicht verändert und die Integration des Konstrukts in das Genom und damit die Deletion des *Pb*-Sjl-Gens konnte ausgeschlossen werden.

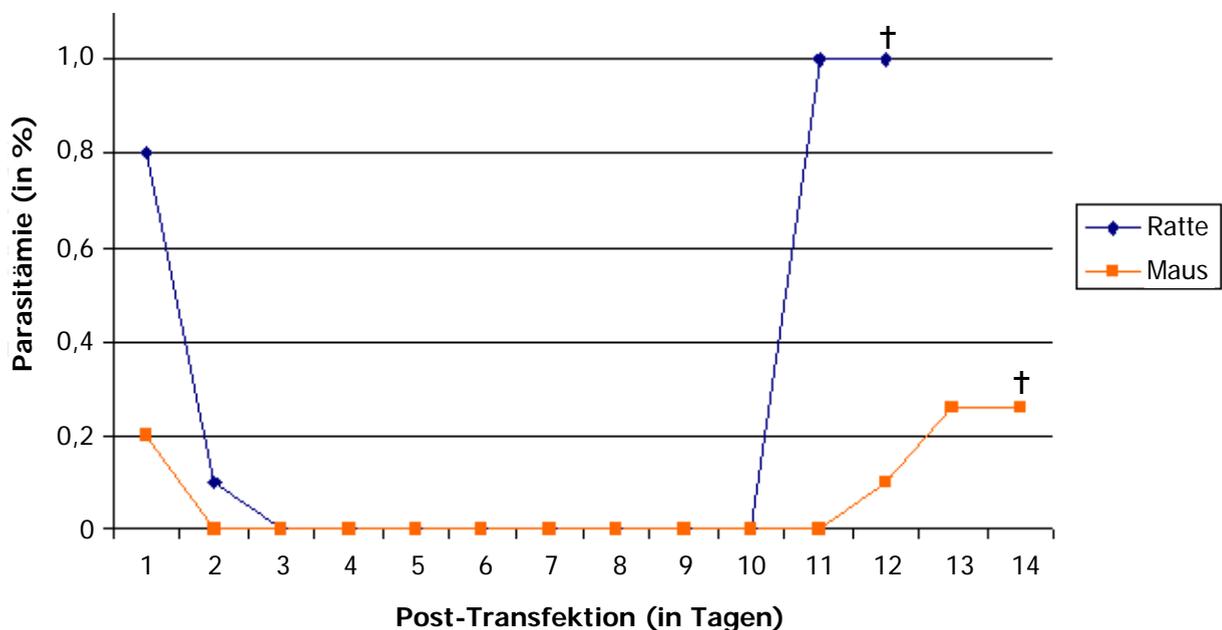


Abbildung 3.12

Verlauf der *P. berghei*-Parasitämie in infizierten Tieren nach Applikation von Pyrimethamin
Nach Auftreten resistenter Parasiten wurden die Tiere geblutet (†) und genomische DNA von *P. berghei* zur PCR-Analyse präpariert.

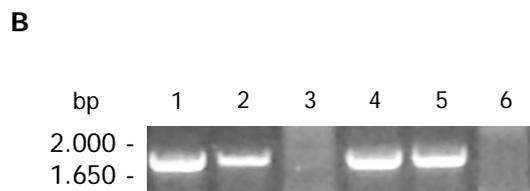
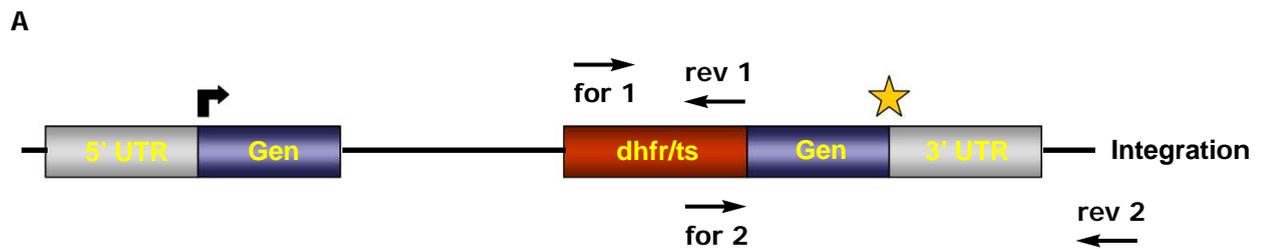


Abbildung 3.13

A Schematische Darstellung des *Pb-Sjl*-Lokus nach Integration und Lokalisierung der Verifizierungsprimer

B PCR-Screen resistenter *P. berghei*-Parasiten

Verwendete Primerkombination for 1 und rev 1

1 *P. berghei* WT (ANKA) nach Transfektion (gDNA)

2 Transfektionskonstrukt b3d-*Pb-Sjl*

3 *P. berghei* WT (ANKA) (gDNA)

4 *P. berghei* WT (ANKA) nach Transfektion (gDNA)

5 Transfektionsplasmid b3d-*Pb-Sjl*

6 *P. berghei* WT (ANKA) (gDNA)

PCR-Amplifizierung mit Primerkombination for 2 und rev 2 ergab kein Produkt; es konnten keine resistenten Parasiten mit Integration im *Pb-Sjl*-Lokus nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 Das Phosphatidylinositol-4-Kinase-like (PI4K) Protein in *Plasmodium*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal eine Phosphatidylinositol 4-Kinase aus *Plasmodium falciparum* (*Pf*-PI4K) beschrieben und funktionell charakterisiert. Ausgangspunkt war die in PlasmoDB gefundene Annotierung eines Gens (*PFE0485w*), welches eine hohe Homologie zu entsprechenden, für PI4-Kinasen kodierenden Genen aufwies.

Zu Beginn wurde die Struktur des Gens sowie die Struktur des sich daraus ableitenden Proteins bzw. der Isoformen bestimmt. Dabei wurde zunächst der Translationsstart sowie die Introns im 3'-Bereich des Gens verifiziert, die wie in PlasmoDB annotiert vorliegen (siehe Abbildung 3.1 A). Interessanterweise ergab die Größenbestimmung der mRNA-Transkripte durch RT-PCR und anschließender Folge-PCR drei unterschiedliche Banden bei etwa 1,4 kb, 1,9 kb und den annotierten 4,7 kb (siehe Abbildung 3.1 C). Dies war bei der Amplifizierung von cDNA bei jeder Primerkombination zu beobachten. Klonierung und Sequenzierung dieser Banden ergaben jeweils distinkte, offene Leserahmen, die für die *Pf*-PI4Kinase kodierten, aber verkürzte Formen darstellten (siehe Abbildung 3.1 D).

Allen drei Formen gemein sind die im 3'-Bereich des Gens liegenden Introns, die 97, 151 und 116 Nukleotide lang sind und die einzelnen Exons voneinander abtrennen (siehe Abbildung 3.1 A). Bei den beiden zusätzlichen Banden fehlen zentrale Teile des Gens (siehe Abbildung 3.1 D). Im Northern Blot (siehe Abbildung 3.2) konnte ausschließlich die Bande detektiert werden, die den annotierten 4,7 kb plus der in der mRNA noch vorhandenen untranslatierten Regionen entspricht. Somit konnte die Existenz weiterer Introns im Gen bzw. *Pf*-PI4K-Isoformen ausgeschlossen werden. Bei den gefundenen Banden handelt es sich eindeutig um bei der PCR-Amplifizierung entstandene Artefakte. Diese können durch sogenannte "low complexity regions" der mRNA induziert worden sein, in denen sich wegen repetitiver Nukleotidabfolgen Sekundärstrukturen ausbilden. Da die RT-PCR bei 37°C abläuft, könnte die mRNA nicht ausreichend denaturiert (d.h. linearisiert) vorliegen, wodurch eine komplette Amplifizierung durch die Reverse Transkriptase unterbunden würde.

Paarweise Sequenzvergleiche des 4,7 kb-PI4K-Gens mit Orthologen aus *Plasmodium* ssp. ergaben identische Übereinstimmungen von etwa 43% (*P. berghei*) zu fast 50% (*P. knowlesi*), die chemisch ähnlichen Aminosäuren rangierten zwischen 62% und 72% (siehe Tabelle 3.1).

Um orthologe Proteine in weiteren Organismen zu identifizieren, wurde der BLAST-Algorithmus von PubMed verwendet. Dabei wurde offensichtlich, dass die C-terminale, katalytische Domäne aller PI4-Kinasen stark konserviert ist, da die Homologien in diesem Bereich durchgehend sehr hoch waren.

Diese Aussage wurde durch die Sequenzvergleiche der katalytischen Domänen untereinander bestätigt. Diese liegt bei *Pf*-PI4K zwischen den Aminosäuren 1.250 bis 1.559. Somit wurden von jedem PI4K-Ortholog die C-terminal liegenden, letzten 300 Aminosäuren für den Vergleich verwendet. Als Algorithmen dienten dabei GGSearch und GLSearch (Global:Global (GG), Global:Local(GL)alignment with statistics; http://wrpmg5c.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=compare&pgm=gnw).

Die daraus resultierende identische Übereinstimmung bzw. der Anteil an ähnlichen Aminosäuren der katalytischen Domänen war folglich auch wesentlich höher. So reichten die identischen Aminosäuren bei den Spezies von *Plasmodium* von etwa 71% bis auf fast 93% und die chemisch ähnlichen von etwa 84% auf über 98% (siehe Tabelle 3.1). Selbst die Übereinstimmungen mit den Domänen phylogenetisch weit entfernter Organismen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Homo sapiens* rangierten zwischen 40% und 45% in der Identität und wiesen eine Ähnlichkeit von 70% bis zu 77% auf.

Diese Resultate zeigen zum einen den hohen Verwandtschaftsgrad zwischen den genannten Spezies der Gattung *Plasmodium* auf, zum anderen sprechen sie für ein funktionell hochkonserviertes Protein.

Durch die hohe Sequenzhomologie der katalytischen Domäne von *Pf*-PI4K verglichen mit den bereits charakterisierten Orthologen in *Saccharomyces cerevisiae* (Flanagan et al., 1993; Garcia-Bustos et al., 1994), *Homo sapiens* (Wong und Cantley, 1994; Wong et al., 1996) und *Arabidopsis thaliana* (Preuss et al., 2004) war ein erster, starker Hinweis in Bezug auf die eigentliche Funktion des annotierten Proteins gegeben, da in allen genannten Organismen eine spezifische PI4K-Funktion nachgewiesen werden konnte.

Um *Pf*-PI4K auf seine tatsächliche enzymatische Funktion hin zu untersuchen, wurde versucht, verschiedene Varianten für die biochemische Charakterisierung heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Da dies aufgrund der bereits erwähnten Probleme (AT-Gehalt, Kodon-Verwendung von *Plasmodium*) fehlschlug, wurde die Komplementation eines PI4Kinase-defizienten Hefestammes durchgeführt.

Diese Art des Experiments stellt eine weitere Möglichkeit dar, um die funktionelle Charakterisierung eines *Plasmodium*-Proteins zu erreichen. Die Komplementation von Hefemutanten wurde bereits mit einer Reihe von *P. falciparum*-Proteinen erreicht (Volkman et al., 1995; Bhattacharyya et al., 2002; Shams-Eldin et al., 2002; Wengelnik und Vial, 2007).

Der bei der Komplementation verwendete Stamm JC203-3 (Nguyen et al., 2005) trägt ein tem-

peraturesensitives Allel Pik1p^{ts} , welches Wachstum bei den permissiven Temperaturen von 23°C und 30°C erlaubt, nicht hingegen bei der nicht-permissiven Temperatur von 37°C. Bei der Komplementation des temperaturesensitiven Stammes JC203-3 wurde auf eine Quantifizierung der Komplementationsrate verzichtet und ausschließlich nach qualitativen Kriterien entschieden. Dafür verwendet wurden die beiden *Pf*-PI4K-Minigene mit 1,4 kb und 1,9 kb, da deren Klonierung in *E. coli* und die Expression in *S. cerevisiae* erfolgsversprechender schien als *Pf*-PI4K mit 4,7 kb Gen und über 180 kDa Protein. Die von den Minigenen kodierten Proteine mit etwa 54 und 69 kDa beinhalteten beide den N-terminalen Bereich von *Pf*-PI4K sowie die hochkonservierte katalytische Domäne (siehe Abbildung 3.1 D).

Es konnte erfolgreich demonstriert werden, dass die zwei verkürzten Formen von *Pf*-PI4K die Temperatursensitivität von JC203-3 rückgängig machen konnten (siehe Abbildung 3.1.13), so dass der Stamm bei der eigentlich nicht-permissiven Temperatur von 37°C wieder wuchs. Die Regenerierung der Transformations-Plasmide aus dem erfolgreich transformierten Stamm bestätigten das gefundene Ergebnis (siehe Abbildung 3.8 C).

Die Funktionen des *S. cerevisiae*- Pik1p^{ts} sind sehr vielfältig. So spielt es eine wichtige Rolle im Membrantransport (Hama et al., 1999; Walch-Solimena et al., 1999) und ist im Nukleus genauso zu finden wie am Trans-Golgi, wo es am Membrantransport und der Aufrechterhaltung der Golgi-Struktur beteiligt ist (Walch-Solimena et al., 1999; Audhya et al., 2000).

Grundlegend für die Funktionalität des Proteins ist die katalytische, am C-Terminus liegende PI4K-Domäne. Der Sequenzvergleich der Kinase-Domänen von *S. cerevisiae* und *P. falciparum* ergab eine identische Übereinstimmung der Aminosäuren von über 40% und eine Ähnlichkeit von fast 70% (siehe Tabelle 3.2).

Aufgrund der gleichen Substratspezifität der beiden Proteine, nämlich die in ihrer Struktur ubiquitär vorkommenden, unterschiedlichen Phosphatidylinositole PI3P, PI5P oder PI3,5P2, waren die Chancen einer qualitativ erfolgreichen Komplementation gegeben. Es ist anzunehmen, dass die *Pf*-PI4Kinase ebenso löslich wie ihr Gegenpart ist und folglich ihre Funktion im Zytosol der Hefezelle wahrnehmen konnte.

Aufgrund der erfolgreichen *in vivo*-Komplementation kann angenommen werden, dass es sich bei dem annotierten Gen PFE0485w tatsächlich um eine PI-Kinase handelt, die das C-4 des Inositolrings phosphorylieren kann. Ob *Pf*-PI4K noch weitere Substrate phosphorylieren oder andere, zusätzliche Aufgaben wahrnimmt, ist mit Abschluss dieser Arbeit noch nicht zu sagen.

Um die Bedeutung eines einzelnen Gens für eine Zelle abschätzen zu können, kann man sich einer Vielfalt von Methoden bedienen. Dabei werden Gene bzw. Genprodukte temporär (z.B. durch RNA-Interferenz oder induzierbare Knock Out von Genen, sogenannte Knock Downs) oder permanent (z.B. durch Deletion des kompletten Gens) aus der Zelle entfernt. So kann unter anderem der Promotor und folglich das Expressionsniveau des gewünschten Gens verändert, der

offene Leserahmen deletiert oder mutiert werden. Existiert kein offener Leserahmen, oder ist die Primärsequenz des Proteins nicht mehr ursprünglich und durchgängig, kann auch kein Protein synthetisiert werden. Je nach Wichtigkeit des Genprodukts für die Zelle entsteht so möglicherweise ein charakterisierbarer Phänotyp.

Bei den angesprochenen Methoden handelt es sich um “reverse genetics”, weil sie im Gegensatz zu den “forward genetics” nicht die genetische Basis für einen bestimmten Phänotyp untersuchen, sondern den möglichen Phänotypen eines Gens bestimmen wollen.

In einem haploiden Organismus wie *Plasmodium* stellt sich die Situation theoretisch vereinfacht dar, da nur eine Kopie des Gens vorhanden ist. Jedoch liegt das Hauptproblem von funktionellen genomischen Studien in *Plasmodium* ssp. in der geringen Erfolgsrate von gezielten Gen-Deletionen durch homologe Rekombination. Vielmehr wurden in der Mehrzahl der veröffentlichten Daten eine Insertion durch “single crossover” in *Plasmodium* ssp. beobachtet (Brühning-Richardson und McConkey, 2005).

Um weitere Daten zur Charakterisierung von *Pf*-PI4K zu erhalten wurde mithilfe des pHTK- und des pARL-Vektors in *P. falciparum* versucht, das Gen zu deletieren bzw. den Leserahmen zu zerstören und den daraus resultierenden Phänotyp zu beschreiben. Die Deletion war trotz mehrerer Durchführungen nicht erfolgreich, d.h., es konnte keine rekombinante Parasitenpopulation generiert werden. Das gleiche Ergebnis wurde erzielt beim Versuch, das *P. berghei*-Ortholog zu deletieren. Auch hier war es trotz des sehr effizienten Transfektionssystems mithilfe der Amaxa™-Technologie nicht möglich, rekombinante Parasiten zu erhalten.

Bei der Strategie der Integration durch einen einfachen Crossover in den genomischen *Pf*-PI4K-Lokus konnte dieser zwar verändert werden, jedoch blieb der Leserahmen intakt (siehe Abbildungen 3.6 A und B). Dieses Experiment bestätigte jedoch die Zugänglichkeit des genomischen Locus für solche Rekombinationsereignisse, wodurch ein wesentlicher Faktor für die Verhinderung einer solchen Deletion ausgeschlossen werden konnte.

Aufgrund der erhaltenen Daten ist davon auszugehen, dass es sich sowohl in *P. falciparum* als auch in *P. berghei* bei PI4K um ein für die Entwicklung im intra-erythrozytären Stadium essenzielles Gen bzw. Protein handelt.

Dieses Resultat wird gestützt durch Experimente in anderen Organismen. So konnte gezeigt werden, dass Orthologe von *Pf*-PI4K essenziell für das Überleben der Zelle sind: Pik1p in *S. cerevisiae* (Garcia-Bustos et al., 1994), PI4K92 in humanen Zellen (Szivak et al., 2006) oder *Ce*-PI4K in *C. elegans* (F35H12.4; Rual et al., 2004).

Auffällig bei dem Ergebnis der Essenzialität von *Pf*-PI4K war, dass seine Funktion nicht von anderen, funktionell wie strukturell überlappenden Enzymen ausgeführt werden kann, um den letalen Ausgang der Deletion zu vermeiden. Auch in *S. cerevisiae* war das mit dem Pik1p-Homolog STT4 nicht möglich (Garcia-Bustos et al., 1994), was auf eine räumliche und/oder

zeitliche Trennung der beiden Kinasen hinweist.

Vergleicht man das Expressionsniveau der zwei PI4-Kinasen in *P. falciparum*, so zeigt das hier untersuchte Gen eine konstitutive Expression, während das PI3,4K-Gen (PFC0475c) ein Minimum im Ringstadium (1-24 h nach Erythrozyten-Invasion) und ein Maximum an der Grenze zwischen Trophozoiten- und Schizontenstadium (etwa 36 h nach Invasion) zeigt (www.plasmodb.org). Dementsprechend sind beide Kinasen die Hälfte der intra-erythrozytären Phase nicht gleichzeitig vorhanden. Dadurch kann es zu einem Mangel innerhalb des Ringstadiums kommen, der zum Absterben der Parasiten führt. Ob die PI3,4Kinase bei durchgehender Expression die Funktion von PI4K komplementieren könnte, wäre nur durch ein entsprechendes Experiment nachprüfbar.

Zur zellulären Lokalisierung von *Pf*-PI4K wurden GFP-Fusionsproteine generiert. Seit der Entdeckung und Isolierung des Green Fluorescent Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* ist es ein zu einem immens wichtigen Bestandteil zellbiologischer Forschung geworden. So kann durch die Fusion des GFP an ein Zielprotein dessen Expression sowie die räumliche und zeitliche Verteilung in der Zelle verfolgt werden. Durch die Entwicklung von GFP-Derivaten ist es heute möglich, Co-Lokalisierungen interagierender Proteine relativ einfach durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen. Ein Nachteil des GFP ist allerdings seine Größe von ~27 kDa, was zu Veränderungen am Zielprotein in Bezug auf die Expression, Lokalisierung und Funktion führen kann.

Zu Beginn der Arbeit mit *Pf*-PI4K war es nicht möglich, dessen genaue subzelluläre Lokalisierung aufgrund von Signalpeptiden vorherzusagen. Da die Generierung eines Antikörpers gegen *Pf*-PI4K fehlschlug, wurden GFP-Fusionsproteine im Parasiten exprimiert. Die bei PI4K vorhandenen PEXEL-/HCT-Motive (Aminosäuren 30-34: **KNLKE**; 80-84: **KNLNE**) wiesen auf einen möglichen Transport des Proteins in den Erythrozyten hin. Daraufhin wurde der N-terminale Bereich des Proteins in Fragmente zerlegt und diese an GFP fusioniert. Die Fusionsproteine enthielten die Aminosäuren 1-20/-40/-70/-100/-350 und zeigten alle eine zytosolische Lokalisierung, ebenso wie das Volllängen-Protein mit 1.559 Aminosäuren (siehe Abbildung 3.7).

Die spezifische Lokalisierung eines Proteins impliziert auch immer seine spezifische Funktion. Betrachtet man das *S. cerevisiae* Pik1p, so ist es eine lösliche 125 kDa-Kinase, die am Nukleus sowie an Trans-Golgi-Kompartimenten lokalisiert ist (Flanagan und Thorner, 1992; Garcia-Bustos et al., 1994; Walch-Solimena und Novick, 1999). Dort ist sie direkt beteiligt an späten Prozessen der Sekretion, Knospung von sekretorischen Vesikeln, der Aufrechterhaltung der Golgi-Struktur sowie der Zytokinese (Garcia-Bustos et al., 1994; Hama et al., 1999; Walch-Solimena und Novick, 1999; Audhya et al., 2000).

In humanen Zellen existieren eine Reihe von PI4K-Isoformen. Zwei davon, PI4K230 und

PI4K92 (alias PI4K) sind charakterisiert (Heilmeyer et al., 2003; Szivak et al., 2006; Kakuk et al., 2007). PI4K230 wurde im Nukleolus von neuronalen Zellen sowie an den äußeren Membranen des rauen ER, der Mitochondrien sowie an vesikulären Strukturen lokalisiert. PI4K92 konnte, neben einer unspezifischen Lokalisierung im Kern der Zelle, eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Golgi-Struktur nachgewiesen werden. Die Aktivität dieses mehrfach phosphorylierten Enzyms konnte durch Antikörper, die gegen spezifische Phosphorylierungsstellen gerichtet waren, komplett ausgeschaltet werden, was im Endeffekt zum Absterben der Zelle führte (Szivak et al., 2006).

In *Plasmodium falciparum* sind zwei weitere PI4K-Isoformen annotiert, eine PI4Kinase (PFD0965W) mit über 5.000 Aminosäuren sowie eine PI3,4Kinase (PFC0475c) mit 953 Aminosäuren. Insgesamt gibt es also drei mögliche PI-Kinasen mit derselben katalytischen Funktion. Für einen intrazellulären Parasiten, der über Jahrtausende mit seinem Wirt co-evolviert ist und sein Genom in Laufe dieser Zeit immer weiter reduzierte, muss das einen physiologische Hintergrund haben. So könnten die drei Isoformen in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten funktionell aktiv sein.

Der BLAST-Sequenzvergleich der *Pf*-Kinasen mit der *S. cerevisiae*-Datenbank ergab für die PI3,4Kinase (PFC0475c) keine nennenswerten Übereinstimmungen, während die untersuchte PI4Kinase (PFE0485w) eindeutig ortholog war zu *Sc*-Pik1p (YNL267W; www.yeastgenome.org).

Die Analyse möglicher Motive für die subzelluläre Lokalisierung durch den ProSite-Algorithmus (HUSAR, DKFZ) ergab für *Pf*-PI4K ein Kernlokalisierungssignal im C-Terminus des Proteins, was experimentell nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Analog zu der bereits erwähnten Struktur-Funktion-Beziehung kann somit eine ähnliche Situation angenommen werden wie für die Orthologe in *S. cerevisiae* (Pik1p, YNL267W) und *H. sapiens* (PI4K92; NM_002651.1). Beide sind sowohl nukleär als auch zytosolisch lokalisiert und erfüllen dort sehr ähnliche Aufgaben wie z.B. die Aufrechterhaltung der Golgi-Struktur.

4.2 Das Synaptojanin-like (Sjl) Protein in *Plasmodium*

In *Saccharomyces cerevisiae* konnte eine genetische Interaktion zwischen dem *Pf*-PI4K-Ortholog Pik1p und den *Pf*-Sjl-Orthologen Sjl1, 2 und 3 nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde *Pf*-Sjl teilweise charakterisiert.

Nach Verifizierung des Translationsstarts sowie der Amplifizierung der überlappenden cDNA-Fragmente des Sjl-Gens (siehe Abbildung 3.9) konnte die Primärstruktur inklusive der Intronengrenzen, wie in PlasmoDB annotiert, bestätigt werden. Daraus ergab sich ein 8.445 Nukleotide langer offener Leserahmen, der für 2.814 Aminosäuren und ein Protein von etwa 331 kDa kodiert. Im 3'-Bereich des Gens befindet sich zudem ein 241 Nukleotide langes Intron, das zwischen den Nukleotiden 7.831 und 7.832 des offenen Leserahmens liegt, womit die genomische Sequenz des Sjl-like Gens somit 8.686 Nukleotide lang ist. Es wurden keine weiteren Spleißvarianten identifiziert.

Paarweise Aminosäure-Sequenzvergleiche mithilfe des bereits für PI4K verwendeten Algorithmus (siehe oben) ergaben für die Sjl-Orthologe aus den *Plasmodium* ssp. ähnlich hohe Prozentzahlen. Diese variierten zwischen 63% für die identischen Übereinstimmungen und 68% für chemisch ähnliche Aminosäuren. Die annotierten Größen der Gene bzw. Proteine waren ebenso vergleichbar wie der prinzipielle Aufbau der *Plasmodium* ssp. Sjl-Gene (siehe Abbildung 3.9 B). All dies spricht wiederum für ein hohen Verwandtschaftsgrad der verglichenen Organismen und ihrer Proteine bzw. ihrer Funktion.

Im Gegensatz zur Situation bei PI4K ist ein klarer Unterschied zwischen den *Plasmodium* ssp. Sjl-Genen und weiteren eukaryotischen Orthologen zu verzeichnen. Diese sind wesentlich kleiner und bestehen aus jeweils nur einer Domäne. So haben *S. cerevisiae* und *H. sapiens* jeweils drei Sjl-Gene (Inp51, 52 und 53) zwischen 3 und 3,5 kb (*Sc*) und zwischen 4 und 4,5 kb (*Hs*). Zur weiteren Charakterisierung von *Pf*-Sjl wurde ebenfalls mithilfe des pHTK- und des pARL-Vektors versucht, das Gen zu deletieren bzw. den Leserahmen zu zerstören. Die Deletion war trotz mehrerer Durchführungen nicht erfolgreich, d.h., es konnte keine rekombinante Parasitenpopulation generiert werden. Das gleiche Ergebnis wurde beim Versuch erzielt, das *P. berghei*-Ortholog zu deletieren. Auch hier konnten trotz des sehr effizienten Transfektionssystems keine rekombinanten Parasiten sondern nur resistente WT-Populationen erhalten werden.

Die Strategie der Integration, bei der mithilfe des GFP-Konstrukts (inklusive der Nukleotide 1-900 von *Pf*-Sjl) durch einen einfachen Crossover mit dem genomischen *Pf*-Sjl-Lokus versucht wurde, den Leserahmen zu unterbrechen, war ebenfalls nicht erfolgreich. Damit konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob das Sjl-Gen für die intra-erythrozytäre Entwicklung von *P. falciparum* essenziell ist oder ob der genomische Locus für eine Rekombination nicht zugänglich ist. Dieses sollte bei einem konstitutiv exprimierten Gen allerdings nicht der Fall sein.

Die Einzeldelation der Sjl-Gene in *S. cerevisiae* hatte keinerlei Auswirkungen auf den Phänotyp, da die Proteine überlappende Funktionen haben, während kombinierte Deletionen der Gene, wie Inp51/Inp52 und Inp52/Inp53, eingeschränktes Zellwachstum zur Folge hatte. Die Deletion aller drei Gene war letal (Srinivasan et al., 1997; Stolz et al., 1998). Ebenso letal war die Deletion des

Synaptojanin-1 Gens in Mäusen, das dort eine essenzielle Funktion im Recycling von synaptischen Vesikeln einnimmt (Cremona et al., 1999).

In *Plasmodium falciparum* existieren neben dem untersuchten Sjl-Gen noch zwei weitere, ähnliche Gene (PF13_0285 und MAL8P1.151), deren Expression im Erythrozytenstadium durch ESTs und Microarray-Daten bestätigt werden konnte. Beiden gemein ist, dass sie nur die Sac-like Domäne besitzen, aber nicht zusätzlich noch die IPP-Domäne wie *Pf-Sjl*. PF13_0285 besitzt weiterhin drei annotierte Transmembrandomänen und ist folglich wahrscheinlich membranassoziiert. Alle drei genannten Gene scheinen eine im erythrozytären Stadium durchgehende Transkriptionsrate zu haben, sind somit parallel vorhanden (www.plasmodb.org). Möglicherweise erfüllt das untersuchte *Pf-Sjl*-Gen mit seiner Sac-like und seiner IPP-Domäne eine spezielle, essenzielle Funktion im Blutstadium des Parasiten. So trägt es als einziges der drei ein Kernlokalisierungssignal und könnte somit, wie *Pf-PI4K*, am spezifischen PI-Zyklus im Nukleus des Parasiten teilnehmen und dort eine nicht komplementierbare Funktion übernehmen, während die zytosolische Funktion auch von ähnlichen Phosphatasen durchgeführt werden könnte.

Die subzelluläre Lokalisierung von *Pf-Sjl* wurde durch die erfolgreiche Generierung eines Antikörpers gegen die Aminosäuren 442-640 des *Pf-Sjl*-Proteins ermöglicht. Bestimmend dabei war die Frage, ob das *Plasmodium*-Protein ähnlich wie z.B. seine drei Orthologe in *S. cerevisiae* (Inp51, 52 und 53) peripher an die Membran oder an das Aktin-Zytoskelett assoziiert waren (Stolz et al., 1998; Guo et al., 1999). Die Mehrzahl der humanen Formen sind zytosolisch lokalisiert (Perera et al., 2006; Astle et al., 2007).

In jedem durchgeführten Immuno Fluorescence Assay (IFA) konnte eine eindeutig zytosolische Lokalisierung des *Pf-Sjl*-Proteins nachgewiesen werden. Durch die Doppelfärbung mit einem Antikörper gegen den MC Marker *Pf-Sbp-1* konnte eine Lokalisierung von *Pf-Sjl* außerhalb des Parasiten eindeutig ausschließen (siehe Abbildung 3.11).

Desweiteren konnte keine spezifische Markierung von Membranstrukturen, dem Aktinskelett etc. beobachtet werden. Aufgrund der Spezifität des Antiserums im Western Blot (siehe Abbildung 3.10 C) konnte auch hier von einer spezifischen Reaktion ausgegangen werden. Somit nimmt das *Pf-Sjl*-Protein zumindest teilweise seine Funktion im parasitären Zytosol wahr.

Der Nachweis der GFP-Fluoreszenz eines Fusionsproteinen sollte vor allem die im IFA erhaltenen Ergebnisse stützen. Da es aufgrund der Größe des Synaptojanin-like Proteins praktisch unmöglich war, das komplette Protein mit GFP zu fusionieren, wurde ein Fusionsprotein mit den ersten 300 Aminosäuren kloniert und transfiziert. Auch hier wurde ausschließlich eine zytosolische Lokalisierung des GFP-Fusionproteins gefunden (siehe Abbildung 3.10). Dadurch konnte das im IFA erhaltene Ergebnis bestätigt werden.

4.3 Ausblick

Um noch genauere Aussagen über die Funktionsweise und Lokalisierung der untersuchten Proteine *Pf*-PI4K und *Pf*-Sjl treffen zu können, sind noch weitergehende Untersuchungen notwendig. So wäre es hilfreich, ein induzierbares Knock Out-System nutzen zu können, um den endgültigen Beweis für die Essenzialität der Gene liefern zu können. Außerdem könnten Lokalisierungsstudien mit den Kernlokalisierungssignalen der Proteine, fusioniert an GFP, generiert werden, um der Frage nachzugehen, ob diese tatsächlich an einem nukleären PI-Zyklus beteiligt sind. Elektronenmikroskopische Aufnahmen könnten dies anschließend weiter verifizieren. Die heterologe, lösliche Expression von PI4K könnte dieses Protein einer biochemischen *in vitro*-Analyse zugänglich machen. Dadurch könnte die Substratspezifität ebenso wie enzymatische Daten ermittelt werden, die dabei helfen würden, ein noch genaueres Bild dieses interessanten Enzyms zu entwerfen.

5 Referenzen

- Astle MV, Horan KA, Ooms LM, Mitchell CA (2007)** The inositol polyphosphate 5-phosphatases: traffic controllers, waistline watchers and tumour suppressors? *Biochem Soc Symp* (74): 161-181
- Audhya A, Foti M, Emr SD (2000)** Distinct roles for the yeast phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p, in secretion, cell growth, and organelle membrane dynamics. *Mol Biol Cell* (8): 2673-2689
- Balla A und Balla T (2006)** Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions. *Trends Cell Biol.* 16(7): 351-361
- Behnia R und Munro S (2005)** Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* 438: 597-604
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2005)** *Biochemistry*. 5th edition, Palgrave Macmillan, New York
- Berridge MJ, Irvine RF (1989)** Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341: 197-205
- Berridge MJ (1993)** Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-325
- Bhattacharyya MK, Hong Z, Kongkasuriyachai D, Kumar N (2002)** *Plasmodium falciparum* protein phosphatase type 1 functionally complements a *glc7* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Parasitol* 32(6): 739-747
- Blisnick T, Morales Betoulle ME, Barale JC, Uzureau P, Berry L, Desroses S, Fujioka H, Mattei D, Braun Breton C (2000)** Pfsbp1, a Maurer's cleft *Plasmodium falciparum* protein, is associated with the erythrocyte skeleton. *Mol Biochem Parasitol* 111(1): 107-121
- Bozdech Z, Ginsburg H (2004)** Antioxidant defense in *Plasmodium falciparum*--data mining of the transcriptome. *Malar J* 9(3): 23
- Bozdech Z, Llinás M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL (2003)** The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biology* 1: 1-16
- Bradford MM (1976)** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Breman JG, Alilio MS, Mills A (2004)** Conquering the intolerable burden of malaria : what's new, what's needed: a summary. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71: 1-15

Brühning-Richardson A und McConkey GA (2005) RNAi in the Malaria parasite *Plasmodium*.

in: Sohail M (ed.) Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application. 3rd edition CRC Press, Boca Raton, USA

Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296(5573): 1655-1657

Carter R und Mendis KN (2002) Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 564-594

Chasis JA, Prenant M, Leung A, Mohandas N (1989) Membrane assembly and remodeling during reticulocyte maturation. *Blood* 74: 1112-1120

Cooke BM, Lingelbach K, Bannister LH, Tilley L (2004) Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Trends in Parasitology* 20: 582-589

Cowman A und Crabb B (2006) Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell* 124: 755-766

Crabb BS, Rug M, Gilberger TW, Thompson JK, Triglia T, Maier AG, Cowman AF (2004) Transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods Mol Biol* 270: 263-276

Craig A und Scherf A (2001) Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Molecular and Biochemical Parasitology* 115: 129-143

Cremona O, Di Paolo G, Wenk MR, Lüthi A, Kim WT, Takei K, Daniell L, Nemoto Y, Shears SB, Flavell RA, McCormick DA, De Camilli P (1999) Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99(2): 179-188

Davis AJ, Im YJ, Dubin JS, Tomer KB, Boss WF (2007) *Arabidopsis* phosphatidylinositol phosphate kinase 1 binds F-actin and recruits phosphatidylinositol 4-kinase beta1 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 282(19): 14121-14131

Debierre-Grockiego F, Schofield L, Azzouz N, Schmidt J, Santos de Macedo C, Ferguson MAJ, Schwarz T (2006) Fatty Acids from *Plasmodium falciparum* Down-Regulate the Toxic Activity of Malaria Glycosylphosphatidylinositols. *Infection and Immunity* 74(10): 5487-5496

De Matteis MA und De Godi A (2004) Protein-lipid interactions in membrane trafficking at the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta*. 1666(1-2): 264-274

de Rojas MO und Wassermann M (1985) Temporal relationships on macromolecular synthesis during the asexual cell cycle of *Plasmodium falciparum*. *Transcripts of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 79: 792-796

Di Paolo G und De Camilli P (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443: 651-657

Doherty JP, Lindeman R, Trent RJ, Graham MW, Woodcock DM (1993) *Escherichia coli* host strains SURE and SRB fail to preserve a palindrome cloned in lambda phage: improved alternate host strains.
Gene 124: 29-35

Elabbadi N, Ancelin ML, Vial HJ (1994) Characterization of phosphatidylinositol synthase and evidence of a polyphosphoinositide cycle in *Plasmodium*-infected erythrocytes.
Mol Biochem Parasitol. 63(2): 179-192

English M, Waruiru C, Amukoye E, Murphy S, Crawley J, Mwangi I, Peshu N, Marsh K (1996) Deep breathing in children with severe malaria: indicator of metabolic acidosis and poor outcome.
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 55: 521-524

Fidock DA, Wellems TE (1997) Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil.
Proc Natl Acad Sci U S A 94(20):10931-10936

Flanagan CA und Thorner J (1992) Purification and characterization of a soluble phosphatidylinositol 4-kinase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
J Biol Chem 267(33): 24117-24125

Flanagan CA, Schnieders EA, Emerick AW, Kunisawa R, Admon A, Thorner J (1993) Phosphatidylinositol 4-kinase: gene structure and requirement for yeast cell viability.
Science 262(5138): 1444-1448

Francis SE, Sullivan DJ Jr, Goldberg DE (1997) Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.
Annual Reviews in Microbiology 51: 97-123

Frevert U, Sinnis P, Cerami C, Shreffler W, Takacs B, Nussenzweig V (1993) Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes.
Journal of Experimental Medicine 177: 1287-1298

Gallup JL und Sachs JD (2001) The economic burden of malaria.
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 64: 85-96

Garcia-Bustos JF, Marini F, Stevenson I, Frei C, Hall MN (1994) PIK1, an essential phosphatidylinositol 4-kinase associated with the yeast nucleus.
EMBO J. 13(10): 2352-2361

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Perte M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.
Nature 419(6906): 498-511

Gilson PR, Nebi T, Vukcevic D, Moritz RL, Sargeant T, Speed TP, Schofield L, Crabb BS (2006) Identification and Stoichiometry of Glycosylphosphatidylinositol-anchored Membrane Proteins of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*.
Molecular & Cellular Proteomics 5: 1286-1299

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) Life with 6000 genes.

Science 274: 1051-1052

Guillemin J (2002) Choosing scientific patrimony: Sir Ronald Ross, Alphonse Laveran, and the mosquito-vector hypothesis for malaria.

J Hist Med Allied Sci. 57: 385-409

Guo S, Stolz LE, Lemrow SM, York JD (1999) SAC1-like domains of yeast SAC1, INP52, and INP53 and of human synaptojanin encode polyphosphoinositide phosphatases

J Biol Chem 274(19): 12990-12995

Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA (2005) Malaria.

Lancet 365: 1487-1498

Griffin-Smith, B (2005) Malaria-free mosquitoes.

Journal of Young Investigators. Volume 17 (2)

Hales S und Woodward A (2005) Global climate change and malaria.

The Lancet Infectious Diseases 5: 258-259

Hama H, Schnieders EA, Thorner J, Takemoto JY, DeWald DB (1999) Direct involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate in secretion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

J Biol Chem 274(48): 34294-34300

Harris TW, Hartweg E, Horvitz HR, Jorgensen EM (2000) Mutations in synaptojanin disrupt synaptic vesicle recycling.

J Cell Biol. 150(3): 589-600

Heilmeyer LM Jr, Vereb G Jr, Vereb G, Kakuk A, Szivák I (2003) Mammalian phosphatidylinositol 4-kinases.

IUBMB Life 55(2): 59-65

Hendricks KB, Wang BQ, Schnieders EA, Thorner J (1999) Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of phosphatidylinositol-4-OH kinase.

Nat Cell Biol 1(4): 234-241

Hiller NL, Bhattacharjee S, van Ooij C, Liolios K, Harrison T, Lopez-Estraño C, Haldar K (2004) A host targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection.

Science 306: 1934-1937

Horrocks P und Muhia D (2005) PEXEL/VTS: a protein-export motif in erythrocytes infected with malaria parasites.

Trends in Parasitology 21: 396-399

Jackson SP, Schoenwaelder SM, Matzaris M, Brown S, Mitchell CA (1995) Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate is a substrate for the 75 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase and a novel 5-phosphatase which forms a complex with the p85/p110 form of phosphoinositide 3-kinase.

EMBO J. 14(18): 4490-4500

Jensen JB (1978) Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum*.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 27: 1274-1276

- Johenning FW, Wenk MR, Uhlén P, Degray B, Lee E, De Camilli P, Ehrlich BE (2004)** InsP3-mediated intracellular calcium signalling is altered by expression of synaptojanin-1. *Biochem J*.382(Pt 2): 687-694
- Kakuk A, Friedlander E, VerebG, Kasa A, Balla A, Balla T, Heilmeyer LM Jr, Gergely P, Vereb G (2007)** Nucleolar Localization of Phosphatidylinositol 4-Kinase PI4K230 in Various Mammalian Cells. *Cytometry Part 69A*: 1174-1183
- Kilejian A, Abati A, Trager W (1977)** *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium coatneyi*: immunogenicity of "knob-like protrusions" on infected erythrocyte membranes. *Experimental Parasitology* 32: 157-164
- Kirchgatter K, Del Portillo HA (2005)** Clinical and molecular aspects of severe malaria. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 77: 455-475
- Knuepfer E, Rug M, Klonis N, Tilley L, Cowman AF (2005)** Trafficking of the major virulence factor to the surface of transfected *P. falciparum*-infected erythrocytes. *Blood* 105: 4078-4087
- Kwiatkowski D, Cannon JG, Manogue KR, Cerami A, Dinarello CA, Greenwood BM (1989)** Tumour necrosis factor production in *falciparum* malaria and its association with schizont rupture. *Clinical and Experimental Immunology* 77: 361-366
- Kyes S, Horrocks P, Newbold C (2001)** Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annual Reviews in Microbiology* 105: 311-315
- Lambros C und Vanderberg JP (1979)** Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *Journal of Parasitology* 65: 418-420
- Lanzer M, Wickert H, Krohne G, Vincensini L, Braun Breton C (2006)** Maurer's clefts: A novel multi-functional organelle in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *International Journal for Parasitology* 36: 23-26
- Lauer SA, Rathod PK, Ghori N, Haldar K (1997)** A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science* 276: 1122-1125
- Liñares GE und Rodriguez JB (2007)** Current status and progresses made in malaria chemotherapy. *Current medicinal chemistry* 14: 289-314
- Lindmo K, Stenmark H (2006)** Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci* 119: 605-614
- Marsh K und Snow RW (1997)** Host-parasite interaction and morbidity in malaria endemic areas. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, biological sciences* 352: 1385-1394

- Marti M, Good RT, Rug M, Knuepfer E, Cowman AF (2004)** Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte.
Science 306: 1930-1933
- Marti M, Baum J, Rug M, Tilley L, Cowman AF (2005)** Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte.
Journal of Cell Biology 171: 587-592
- Martin SK, Jett M, Schneider I (1994)** Correlation of phosphoinositide hydrolysis with exflagellation in the malaria microgametocyte.
J Parasitol. 80(3): 371-378
- Matuschewski K und Mueller AK (2007)** Vaccines against malaria - an update.
FEBS Journal 274: 4680-4687
- Meissner M, Brecht S, Bujard H, Soldati D (2001)** Modulation of myosin A expression by a newly established tetracycline repressor-based inducible system in *Toxoplasma gondii*.
Nucleic Acids Res 29(22): E115
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK (2002)** The pathogenic basis of malaria.
Nature 415: 673-679
- Minagawa T, Ijuin T, Mochizuki Y, Takenawa T (2001)** Identification and characterization of a sac domain-containing phosphoinositide 5-phosphatase.
J Biol Chem 276(25): 22011-22015
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodríguez A (2001)** Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection.
Science 291: 141-144
- Naik RS, Branch OH, Woods AS, Vijaykumar M, Perkins DJ, Nahlen BL, Lal AA, Cotter RJ, Costello CE, Ockenhouse CF, Davidson EA, Gowda DC (2000)** Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis.
J Exp Med 192(11): 1563-1576
- Nguyen PH, Hasek J, Kohlwein SD, Romero C, Choi JH, Vancura A (2005)** Interaction of Pik1p and Sjl proteins in membrane trafficking.
FEMS Yeast Res. 5(4-5): 363-371
- Perera RM, Zoncu R, Lucast L, De Camilli P, Toomre D (2006)** Two synaptojanin 1 isoforms are recruited to clathrin-coated pits at different stages.
Proc Natl Acad Sci U S A. 103(51): 19332-19337
- Pramanik A, Garcia E, Ospina R, Powell M, Martinez M, Alejo W, McKoy J, Moore CW (1997)** Cloning, characterization and identification of the gene encoding phosphatidylinositol 4-kinase.
Cell Mol Biol 43(7): 1007-1018
- Preuss ML, Serna J, Falbel TG, Bednarek SY, Nielsen E (2004)** The *Arabidopsis* Rab GTPase RabA4b localizes to the tips of growing root hair cells.
Plant Cell 16(6): 1589-1603

- Przyborski JM, Lanzer M (2005a)** Protein transport and trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Parasitology* 130: 373-388
- Przyborski JM, Miller SK, Pfahler JM, Henrich PP, Rohrbach P, Crabb BS, Lanzer M (2005b)** Trafficking of STEVOR to the Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *EMBO Journal* 24: 2306-2317
- Rasti N, Wahlgren M, Chen Q (2004)** Molecular aspects of malaria pathogenesis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 41: 9-26
- Retief F und Cilliers L (2006)** Periodic pyrexia and malaria in antiquity. *SAM Journal* 96: 684-688
- Roth MG (2004)** Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol Rev* 84(3): 699-730
- Rual JF, Ceron J, Koreth J, Hao T, Nicot AS, Hirozane-Kishikawa T, Vandehaute J, Orkin SH, Hill DE, van den Heuvel S, Vidal M (2004)** Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library. *Genome Res* 14(10B): 2162-2168
- Schofield L und Hackett F (1993)** Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* 177(1): 145-153
- Schrier S.L. (1985)** Red cell membrane biology - introduction. *Clinical Haematology* 14: 1-12
- Sciorra VA, Audhya A, Parsons AB, Segev N, Boone C, Emr SD (2005)** Synthetic genetic array analysis of the PtdIns 4-kinase Pik1p identifies components in a Golgi-specific Ypt31/rab-GTPase signaling pathway. *Mol Biol Cell*. 16(2): 776-793
- Shams-Eldin H, Azzouz N, Kedees MH, Orlean P, Kinoshita T, Schwarz RT (2002)** The GPI1 homologue from *Plasmodium falciparum* complements a *Saccharomyces cerevisiae* GPI1 anchoring mutant. *Mol Biochem Parasitol* 120(1): 73-81
- Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI (2005)** The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434: 214-217
- Spielmann T, Hawthorne PL, Dixon MW, Hannemann M, Klotz K, Kemp DJ, Klonis N, Tilley L, Trenholme KR, Gardiner DL (2006)** A cluster of Ring Stage-specific Genes Linked to a Locus Implicated in Cytoadherence in *Plasmodium falciparum* Codes for PEXEL-negative and PEXEL-positive Proteins Exported to the Host Cell. *Molecular Biology of the Cell* 17: 3613-3624
- Stefan CJ, Audhya A, Emr SD (2002)** The yeast synaptojanin-like proteins control the cellular distribution of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate. *Mol Biol Cell*. 13(2): 542-557

Stevenson-Paulik J, Love J, Boss WF (2003) Differential Regulation of Two *Arabidopsis* Type III Phosphatidylinositol 4-Kinase Isoforms. A Regulatory Role for the Pleckstrin Homology Domain1.

Plant Physiology 132 (2): 1053-1064

Stolz LE, Kuo WJ, Longchamps J, Sekhon MK, York JD (1998) INP51, a yeast inositol polyphosphate 5-phosphatase required for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate homeostasis and whose absence confers a cold-resistant phenotype.

J Biol Chem. 273(19): 11852-11861

Srinivasan S, Seaman M, Nemoto Y, Daniell L, Suchy SF, Emr S, De Camilli P, Nussbaum R (1997) Disruption of three phosphatidylinositol-polyphosphate 5-phosphatase genes from *Saccharomyces cerevisiae* results in pleiotropic abnormalities of vacuole morphology, cell shape, and osmohomeostasis.

Eur J Cell Biol.74(4): 350-360

Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, Ravetch JA, Wellems TE (1995) The large diverse gene family *var* encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes.

Cell 82: 89-100

Szivak I, Lamb N, Heilmeyer LM Jr (2006) Subcellular Localization and Structural Function of Endogenous Phosphorylated Phosphatidylinositol 4-Kinase (PI4K92).

J Biol Chem 281 (24): 16740-16749

Todryck S M und Hill AVS (2007) Malaria vaccines: the stage we are at.

Nature Reviews in Microbiology 5: 487-489

Toker A, Meyer M, Reddy KK, Falck JR, Aneja R, Aneja S, Parra A, Burns DJ, Ballas LM, Cantley LC (1994) Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3.

J Biol Chem 269(51): 32358-32367

Trager W und Jensen JB (1976) Human malaria parasites in continuous culture.

Science 193: 673-675

Uhlemann AC, Staalsoe T, Klinkert MQ, Hviid L (2000) Analysis of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells.

MACS & more 4: 7-8

Van Deenen LL (1979) Structural organization and dynamics of phospholipids in red cell membranes.

Prog Clin Biol Res. 30: 451-456

Vial HJ, Ancelin ML, Philippot JR, Thuet MJ (1990) Biosynthesis and dynamics of lipids in *Plasmodium*-infected mature mammalian erythrocytes.

Blood Cells 16(2-3): 531-565

Volkman SK, Cowman AF, Wirth DF (1995) Functional complementation of the *ste6* gene of *Saccharomyces cerevisiae* with the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*.

Proc Natl Acad Sci USA 92(19): 8921-8925

Walch-Solimena C und Novick P (1999) The yeast phosphatidylinositol-4-OH kinase *pik1* regulates secretion at the Golgi.

Nat Cell Biol 1(8): 523-525

- Warrel DA (1990)** Severe und complicated malaria.
Transcripts of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 84 Supplementary (2): 1-65
- Wengelnik K und Vial HJ (2007)** Characterisation of the phosphatidylinositol synthase gene of *Plasmodium* species.
Res Microbiol 158: 51-59
- Wilson RJM und Williamson DH (1997)** Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa.
Microbiology and Molecular Biology Reviews 61: 1-16
- Wong K und Cantley LC (1994)** Cloning and characterization of a human phosphatidylinositol 4-kinase.
J Biol Chem 269(46): 28878-28884
- Wong K, Meyers DDR, Cantley LC (1997)** Subcellular locations of phosphatidylinositol 4-kinase isoforms.
J Biol Chem 272(20): 13236-13241
- World Health Organization (2000)** WHO Expert Committee on Malaria.
WHO Technical Report Series 892: 1-74
- World Health Organization (2005)** World malaria report 2005.
WHO, Geneva (available online from <http://rbm.who.int/wmr2005/html/map1.htm>)