

**Identifizierung von dynamischen
Strukturen während der Leberphase von
*Plasmodium***

Dissertation

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

vorgelegt von
Diplombiologin
Kerstin Rindte

Tag der mündlichen Prüfung 13. Dezember 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Parasitologie am Department für Infektiologie der Universität Heidelberg im Zeitraum von November 2007 bis Oktober 2010 unter Anleitung von Prof. Dr. Kai Matuschewski durchgeführt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Lanzer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Kai Matuschewski

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Abkürzungsverzeichnis

α	anti, gegen
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-, 10^{-6}
A	Adenin
AK	Antikörper
Abb	Abbildung
Asn	Asparagin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw	Beziehungsweise
C	Cytosin
ca	circa
cDNA	komplementäre DNA, die bei der reversen Transkription von RNA entsteht
CSP	circumsporozoites protein
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
ddH ₂ O	zweimal destilliertes Wasser
DHE	Golgi- <i>Knockdown</i> Zelllinie
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DHFR/TS	Dihydrofolat-Reduktase-Thimidylatsynthase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (=DNS)
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dNTPs	Desoxyribonucleosid-Triphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEF	exo-erythrozytäre Formen
FCS	Fötales Kälberserum
for	forward, in „sense“ Richtung des Gens
FRAP	<i>fluorescence recovery after bleaching</i>

G	Guanin
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
h	Stunde
HeLa	humane Zervixkarzinom-Zelllinie
Hepa 1-6	murine Leberzelllinie
HcpG2	humane Leberzelllinie
HFF	<i>human foreskin fibroblasts</i>
HuH7	humane Leberzelllinie
HSP70	Heat Shock Protein 70
IFA	Immunfluoreszenz-Assay
i.p.	<i>intraperitoneal</i>
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen(-paare)
KD	<i>knockdown</i>
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
m	Milli- (10^{-3})
M	Molar
Mb	Megabasen(-paare)
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Msp-1	<i>merozoite surface antigen 1</i>
n	Nano-
N°	Nummer
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid

NMRI	Naval Medical Research Institute (Maus)
N-Terminus	Amino-Terminus
O ₂	molekularer Sauerstoff
OD ₂₆₀	optische Dichte gemessen bei $\lambda=260$ nm
OD ₂₈₀	optische Dichte gemessen bei $\lambda=280$ nm
p	Piko- (10 ⁻⁹), Plasmid
<i>P. berghei</i> , <i>Pb</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P. yoelii</i> , <i>Py</i>	<i>Plasmodium yoelii</i>
pABA	para-Aminobenzoesäure
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	„potentia hydrogenii“, pH-Wert
PM	Plasmamembran
PV	parasitophore Vakuole
PVM	parasitophore Vakuolenmembran
rev	revers, in „antisense“ Richtung des Gens
RNA	Ribonucleinsäure
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
Ser	Serin
ssp	alle Arten der Gattung
T	Thymin
<i>T. gondii</i> , <i>Tg</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Tab	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA

Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TM	Transmembrandomäne
TRAP	<i>thrombospondin related anonymous protein</i>
U	<i>unit</i> , biochemische Einheit für die Enzymaktivität
U373MG	Glioblastom Zelllinie
UIS	<i>upregulated in infectious sporozoites</i>
ÜN	über Nacht
UTR	un-translatierte Region (untranslated region)
V	Volt
WHO	<i>World Health Organisation</i> = Welt Gesundheits Organisation
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung	5
2 Summary	6
3 Einleitung	7
3.1 Klinisches Bild der Malaria	8
3.2 Der Plasmodium Lebenszyklus	9
3.3 Prä-erythrozytäre Stadien	12
3.3.1 Sporozoiten	12
3.3.2 Leberstadien	13
3.3.3 Proteine mit einer essentiellen Funktion in der Leberstadien-Entwicklung	15
3.4 Parasitophore Vakuole	18
3.5 Organellen-Assoziationen bei intrazellulären Parasiten	19
3.6 Zielsetzung der Arbeit	26
4 Ergebnisse	27
4.1 <i>uis3mCherry</i> Parasiten	28
4.1.1 Transfektion in den <i>UIS3</i> Locus	28
4.1.2 <i>uis3mCherry</i> Parasiten können den Lebenszyklus durchlaufen	29
4.1.3 Phänotypische Analyse der <i>uis3mCherry</i> Parasiten	30
4.1.4 Lokalisationsanalysen der <i>UIS3mCherry</i> -PVM	32
4.2 <i>uis7mCherry</i> Parasiten	34
4.2.1 Phänotypische Analyse der <i>uis7mCherry</i> Parasiten	34
4.3 <i>uis4mCherry</i> Parasiten	35
4.3.1 Transfektion in den <i>UIS4</i> Locus	35
4.3.2 <i>uis4mCherry</i> Parasiten können den Lebenszyklus durchlaufen	36
4.3.3 Phänotypische Analyse der <i>uis4mCherry</i> Parasiten	37
4.3.4 Dynamik der <i>UIS4mCherry</i> -PVM	39
4.3.5 PVM Dynamik in verschiedenen Zelllinien	43
4.3.5.1 Frühe Leberstadien-Entwicklung	43
4.3.5.2 Späte Leberstadien-Entwicklung	47
4.3.6 Parasiten Lokalisation in der Wirtszelle	48

4.3.7 Assoziieren Wirtszellorganellen mit der PVM?	50
4.3.7.1 Assoziation mit der Kernhülle	50
4.3.7.2 Assoziation mit Lysosomen	53
4.3.7.3 Assoziation mit Mitochondrien	54
4.3.7.4 Assoziation mit dem Endoplasmatischen Retikulum	55
4.3.7.5 Einfluß von Tubulin auf die PVM Dynamik	56
4.3.8 Die Parasiten nehmen Kontakt mit dem Golgi-Apparat auf	59
4.3.8.1 Golgi-Fluoreszenz-Konstrukte zur Veranschaulichung des Golgi-Apparates	59
4.3.8.2 Ist die Verbindung des Parasiten zum Golgi-Apparat essentiell?	63
4.3.9 Korrelative Elektronenmikroskopische Analyse der PVM	66
4.3.10 FRAP-Analyse der PVM	70
4.4 PVM Dynamik in P.berghei Mutanten mit einem Defekt in der Leberstadienentwicklung	73
4.4.1 PVM Visualisierung in <i>uis3(-)</i> Parasiten	73
4.4.1.1 Transfektion in den <i>UIS4</i> Locus in <i>uis3(-)</i> Parasiten	73
4.4.1.2 Klonierung und Transfektion des <i>uis4mCherry/uis3(-)</i> -Konstruktes	74
4.4.1.3 Die Bildung und Dynamik der PVM in <i>uis4mCherry/uis3(-)</i> Parasiten	76
4.4.1.4 Der Kontakt der PVM-Ausläufer zum Golgi-Apparat kann auch in <i>uis4mCherry/uis3(-)</i> Parasiten aufgebaut werden	79
4.4.2 PVM Visualisierung in <i>uis4(-)</i> Parasiten	80
4.4.2.1 Klonierung des <i>uis3mCherry-hdhfr</i> -Transfektionskonstruktes	80
4.4.2.2 Klonierung des <i>uis3mCherry/uis4(-)</i> -Konstruktes und Transfektion in den <i>UIS4</i> Locus	81
4.4.3 PVM Visualisierung in <i>p36p(-)/p36(-)</i> Parasiten	82
4.4.3.1 Transfektion der <i>UIS3</i> - und <i>UIS4</i> -Fusionskonstrukte in <i>p36p(-)/p36(-)</i> Parasiten	82
4.4.3.2 Charakterisierung der <i>uis4mCherry/p36p(-)/p36(-)</i> Mutante	83
4.4.3.3 Die Bildung und Dynamik der PVM in <i>p36p(-)/p36(-)</i> Parasiten	84
5 Diskussion	89
6 Material und Methoden	100
6.1 Material	100
6.1.1 Geräte	100
6.1.2 Verbrauchsmaterial	100

6.1.3 Chemikalien.....	101
6.1.4 Medien und Lösungen	103
6.1.5 Molekularbiologische Kits	104
6.1.6 Größenmarker und Ladepuffer	104
6.1.7 Enzyme	104
6.1.8 Antikörper.....	104
6.1.9 Oligonukleotide	105
6.1.10 Stämme und Vektoren	106
6.1.10.1 <i>E.coli</i> Stämme.....	106
6.1.10.2 Nagerwirte	107
6.1.10.3 Zelllinien.....	107
6.1.10.4 Moskito-Stämme	108
6.1.10.5 Parasiten Stämme	108
6.1.10.6 <i>Plasmodium berghei</i> Vektoren	108
6.1.10.7 Wirtszell-Transfektions-Vektoren	109
6.2 Methoden	109
6.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	109
6.2.1.1 <i>E.coli</i> Flüssigkulturen.....	109
6.2.1.2 Plattenkulturen.....	110
6.2.1.3 Herstellung einer Bakterien-Stammkultur.....	110
6.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	110
6.2.2.1 Agarose-Gel-Elektrophorese	110
6.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	111
6.2.2.3 Restriktions-Endonukleasen	112
6.2.2.4 Ligation.....	113
6.2.2.5 Transformation kompetenter Bakterienzellen	113
6.2.2.6 Plasmid-Reinigung	114
6.2.2.7 Plasmid-Aufreinigung	114
6.2.2.8 DNA-Sequenzierung	114
6.2.2.9 DNA-Fällung	115
6.2.2.10 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	115
6.2.3 Zellkulturmethoden	116
6.2.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen	116
6.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl.....	116

6.2.3.3 DNA-Transfektion in humane Zelllinien	116
6.2.4 <i>P.berghei</i> Methoden	117
6.2.4.1 Transfektion von <i>Plasmodium berghei</i>	117
6.2.4.1.1 Vorbereitung der Transfektionsvektoren.....	119
6.2.4.1.2 Präparation und in vitro-Kultur der Erythrozyten-Stadien	119
6.2.4.1.3 Isolation der Schizonten und Elektroporation	119
6.2.4.1.4 Selektion	120
6.2.4.2 Giemsa-Färbung	121
6.2.4.3 Untersuchung der Exflagellation von <i>P.berghei</i> -Gametozyten.....	121
6.2.4.4 Herstellung von Blutstabilaten	122
6.2.4.5 Isolierung genomischer DNA.....	122
6.2.4.6 Parasiten-Klonierung.....	123
6.2.5 Tierexperimentelle Methoden.....	123
6.2.5.1 Anästhesie und Blutentnahme	123
6.2.5.2 Applikationsmethoden.....	124
6.2.6 Mosquito Methoden.....	124
6.2.6.1 Bestimmung der Oocysten-Zahl.....	124
6.2.6.2 Bestimmung der Zahl der Mitteldarm-Sporozoiten.....	124
6.2.6.3 Bestimmung der Zahl der Speicheldrüsen-Sporozoiten	125
6.2.7 Zellbiologische Methoden	125
6.2.7.1 <i>Gliding Assay</i>	125
6.2.7.2 Leberstadien-Entwicklungsstudien.....	126
6.2.7.3 Lokalisationsanalysen von mit <i>P.berghei</i> infizierten eukaryotischen Zelllinien.....	127
6.2.7.4 Wirtsorganellen Lokalisationsanalysen von mit <i>P.berghei</i> infizierten eukaryotischen Zelllinien	127
6.2.7.5 <i>live cell imaging</i>	128
7 Danksagung.....	129
8 Literatur	131

1 Zusammenfassung

Die Etablierung einer Infektion mit dem Malaria Parasiten *Plasmodium* findet in der Leber statt. Während dieser essentiellen aber klinisch stillen Entwicklung bildet *Plasmodium* Tausende von pathogenen Merozoiten aus einem einzigen invadierten Sporozoiten. In dieser Arbeit wurde die parasitophore Vakuolenmembran (PVM), die Pathogen/Wirts-Schnittstelle, durch die Generation eines Fusionsproteins von den Leberstadien-spezifischen Proteinen UIS3 und UIS4 und des fluoreszenten mCherry Proteins visualisiert. UIS3 und UIS4 sitzen in der Membran der parasitophoren Vakuole, die eine Parasiten geschaffene Replikationsnische darstellt.

Mit verschiedenen *live cell imaging* Analysen konnten bisher unbekannte dynamische Veränderungen in der PV enthüllt werden. In dieser Phase entwickelt sich der Parasit von intrazellulärer Transformation über eine Wachstumsphase zu der Bildung der pathogenen Merozoiten.

Nach dem Beginn der Parasiten Replikation ist die PV in der frühen Leberstadien-Entwicklung eine hoch-dynamische Struktur, die dicke Ausläufer Strukturen in das Wirtszellzytoplasma ausbildet und Vesikel-artige Strukturen sekretiert. Teilweise werden dünne Ausläufer ausgebildet, die weit ins Wirtszellzytoplasma hineinragen und hohe Geschwindigkeiten erreichen die für eine aktive Bewegung sprechen. Diese Ausläufer nehmen Kontakt mit dem Golgi-Apparat der Wirtszelle auf und spielen möglicherweise eine vitale Rolle bei der intrazellulären Parasiten Reifung.

Durch subzelluläre Auflösung mit Hilfe der Korrelations-Mikroskopie konnten die verschiedenen Ausläufer-Strukturen bestätigt werden und die dünnen Ausläufer als durchgängige membranöse Schläuche beschrieben werden. Während der späten Leberstadien-Entwicklung konnte die PV als statische Struktur beschrieben werden, die keine Strukturen ins Wirtszellzytoplasma ausbildet. Der Vergleich der Bildung der PV und der PVM-Ausläufer in verschiedenen Wirtszellen ergab deutliche Unterschiede je nach Eignung der Zelle für eine *Plasmodium* Entwicklung.

Die Visualisierung der PVM in Mutanten mit einem Defekt in der Leberstadien-Entwicklung konnte ebenfalls mit den oben beschriebenen Fusionsproteinen durchgeführt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die PVM sowie PVM-Ausläufer in der *uis3(-)* Mutante vergleichbar zu WT ausgebildet werden konnte. Dagegen liegt ein Defekt dieser Ausbildung in *p36p(-)/p36(-)* Parasiten vor.

2 Summary

Establishment of an infection with the malaria parasite occurs in the liver. During this essential, yet clinically silent, expansion phase *Plasmodium* forms thousands of pathogenic merozoites from a single invaded sporozoite. In this study, we visualized the pathogen/host interface by fluorescent tagging of the liver-stage specific proteins UIS3 and UIS4 with the mCherry protein. UIS3 and UIS4 reside in the membrane of the parasitophorous vacuole (PV), a parasite-derived replication niche.

Several live cell imaging techniques of infected cells revealed previously unrecognized dynamic changes of the PV as the parasite progresses from intracellular transformation and growth to formation of pathogenic merozoites.

Upon initiation of parasite replication the PV is a highly dynamic structure. In the early liver stage development the PV forms primarily thick processes and secretes vesicle-like structures into the host cell. Highly dynamic processes transiently form at the PV and extend into distant regions of the host cell. The speed of these processes is very high (up to 2µm/sec) suggesting an active movement rather than passive diffusion. The processes contact the host cell golgi stacks and may play a vital role in parasite maturation.

Subcellular resolution employing correlation microscopy confirmed the presence of the different types of protrusions originating from the parasite. The thin processes could be described as continuous membranous structures. During late liver stage development the PV could be described as a rather static structure that lost the ability to build PVM-processes. Considering the establishment of the PV and PV-processes in non-hepatic cell lines one could show clear differences dependent on the cell line.

The visualization of the PV in mutant parasite lines which are affected in liver stage development was performed using the same fusion proteins. Here it was demonstrated that the *uis3(-)* mutant could build a normal PVM as well as PVM processes whereas the *p36p(-)/p36(-)* parasites showed a defect in the PVM building.

3 Einleitung

Malaria wird durch den eukaryotischen Einzeller *Plasmodium sp.* hervorgerufen, der durch den Stich einer weiblichen Stechmücke der Gattung *Anopheles* übertragen wird. Der Parasit ist auf diesen Vektor für das Durchlaufen seines Lebenszyklus angewiesen. Im Wirt infiziert der Erreger nacheinander zwei unterschiedliche Zelltypen, zuerst Leberzellen und dann Erythrozyten. Nur die erythrozytäre Phase ist für den Krankheitsverlauf der Malaria verantwortlich.

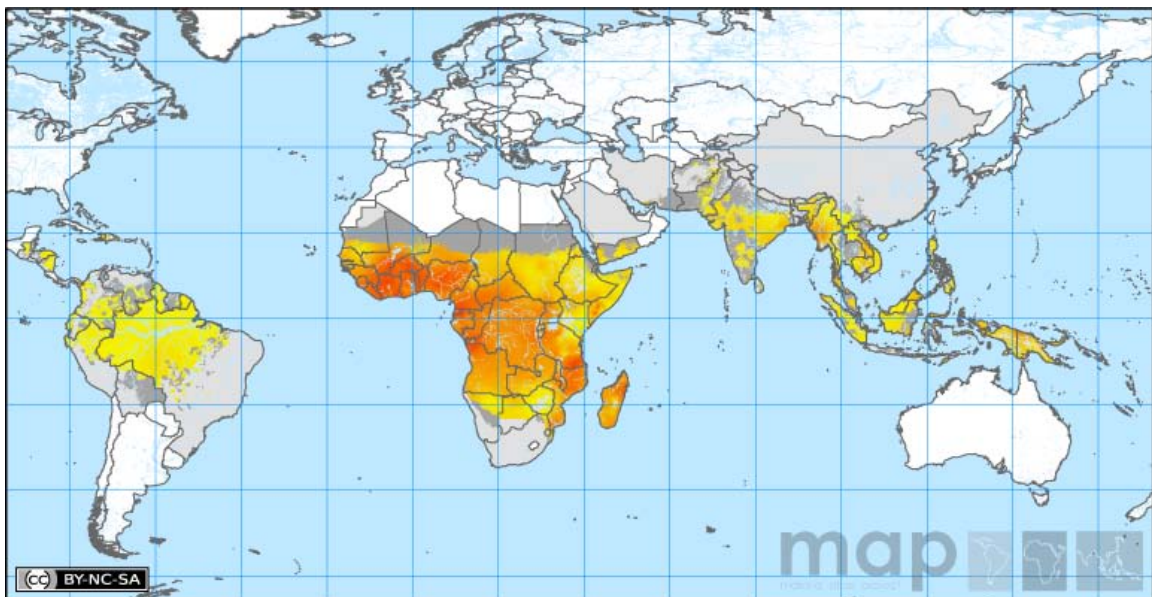


Abbildung 3-1 Weltweite Verbreitung der endemischen Malaria

Die Malaria ist hauptsächlich in den Tropen und Subtropen Afrikas, Asiens und Südamerikas zu finden (www.map.ox.ac.uk)

Malaria ist eine der bedeutendsten Tropenkrankheiten, an der jährlich etwa 250 Millionen Menschen neu erkranken. Nach WHO Schätzungen sterben knapp eine Millionen Menschen pro Jahr an den Folgen der Malaria. Die meisten Todesfälle betreffen dabei Säuglinge und Kleinkinder. Man geht davon aus, dass ca. 40% der Welt-Bevölkerung dem Risiko an Malaria zu erkranken ausgesetzt sind (WHO 2009). Die Hauptgebiete umfassen dabei das südlich der Sahara gelegene Afrika. Asien sowie Süd und Mittel-Amerika sind weniger stark betroffen (Abbildung 3-1).

Der französische Arzt Charles Louis Alphonse Laveran entdeckte 1880 in Algerien zum ersten Mal den Parasiten im Blut von an Malaria erkrankten Menschen. Die Rolle der Moskitos als Überträger der Krankheit fanden Ronald Ross und Giovanni Grassi heraus.

3.1 Klinisches Bild der Malaria

Heute kennt man mehr als 100 verschiedene *Plasmodium*-Spezies, die sowohl viele Säuger-Arten als auch Vögel und Reptilien infizieren können. Von den fünf humanpathogenen Erregern *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale*, *P.malariae* und *P.knowlesi* ist *P.falciparum* der bedrohlichste Erreger. *P.falciparum* ist weltweit für den weitaus größten Teil der Malaria bedingten Todesfälle verantwortlich. Während *P.falciparum* nicht zu zyklischen Fieberschüben führt, treten bei *P.ovale* und *P.vivax* die Schübe alle 48 Stunden (*Malaria tertiana*) und bei *P.malariae* alle 72 Stunden auf (*Malaria quartana*).

P.vivax tritt meist in Asien und Lateinamerika auf und ist nur selten für einen tödlichen Krankheitsverlauf verantwortlich. Gleiches gilt für *P.ovale*. Dieser Erreger wird meist in West-Afrika gefunden. Gemein haben *P.ovale* und *P.vivax* persistierende Leberstadien, sogenannte Hypnozoiten, die Jahre später zu einer erneuten Infektion führen können. *P.malariae* ist weltweit zu finden. Die Infektion mit *P.malariae* kann zu einem chronischen Krankheitsverlauf und zur Ausbildung eines nephrotischen Syndroms führen.

Etwa nur 1% der Malaria-Infektionen führt zu einer schweren Erkrankung, dennoch ist die Anzahl der dadurch bedingten Todesfälle (ca. 1 Millionen pro Jahr) erheblich (Snow *et al.*, 2005). Die Krankheit äußert sich meist durch hohes wiederkehrendes Fieber, Schüttelfrost, Krämpfe und Gliederschmerzen. Diese Symptome werden nur durch die asexuellen Blutstadien ausgelöst. Infektionen mit Leberstadien und Gametozyten-Stadien sind asymptomatisch. Beim Entlassen der Merozoiten aus den Schizonten und dem gleichzeitigen Aufplatzen der Erythrozyten gelangen nicht nur die Parasiten sondern auch Toxine in die Blutbahn, gegen die das Immunsystem heftig reagiert, was wiederum Fieber zur Folge hat. Dabei spielt zum Beispiel das PfMSP-1 (*merozoite surface antigen 1*) Protein eine Rolle, welches zur Zytokinausschüttung führt und für die Fieberschübe verantwortlich ist. Das klinische Bild der leichten Malaria ist eine fieberhafte Erkrankung. Der Grund für die erhöhte Virulenz von *P.falciparum* im Vergleich zu den anderen humanpathogenen Erregern liegt zum Einen in der Fähigkeit kleine Kapillaren durch Anheftung der Erythrozyten zu verstopfen, sowie zum Anderen an der schnellen Teilung

des Erregers, die nach 3-4 Lebenszyklen eine für ein Kind lebensbedrohliche Menge an Parasiten entwickelt sowie der Fähigkeit in alle Erythrozyten und nicht nur in Retikulozyten einzudringen (Perlmann & Troye-Blomberg 2002, Kapitel Malaria: Pathogenity and Disease).

Eine schwerwiegende Malaria-Infektion durch *P.falciparum* kann auch durch Anämie, welche durch die Zerstörung der roten Blutkörperchen bedingt ist, sowie durch die zerebrale Malaria, die aufgrund der Festsetzung der Parasiten in Kapillaren zu Zirkulationsstörungen im Gehirn führt, entstehen (Mackintosh *et al.*, 2004).

3.2 Der *Plasmodium* Lebenszyklus

Im Gegensatz zu anderen Vektor-übertragenen Pathogenen, haben die *Plasmodium* Spezies eine sehr strikte Wirtsspezifität und infizieren nur untereinander eng verwandte Wirte. 1948 wurde von Vincke und Lips der Nager-Erreger *P.berghei* entdeckt. Der natürliche Wirt von *P.berghei* ist im Kongo zu finden. Dazu gehören die Nager *Grammomys surdaster*, *Praomys surdaster*, *Leggada bella* (Lucius und Loss-Frank, 1997). Der natürliche Vektor ist *Anopheles.dureni millescamps*, im Labor wird jedoch *Anopheles.stephensi* verwendet. Der Nagererreger zeigt ein ähnliches Krankheitsbild wie der humane Erreger *P.falciparum* und ist sensitiv gegen die gleichen Medikamente (Sherman, 1998). Damit liefert die Forschung an diesem Erreger wichtige Erkenntnisse über die humanen Malaria-Infektionen.

Während des Lebenszyklus durchlaufen die Parasiten extrazelluläre Invasionsstadien sowie intrazelluläre Replikationsstadien (Matuschewski, 2006). Dazu gehören die sexuelle Reproduktion (die Gametogonie), die Sporogonie, aus der Sporozoiten hervorgehen, sowie die nach Invasion der Sporozoiten stattfindende Schizogonie.

Die invasiven Stadien der *Apicomplexa* sind motil (Mota und Rodriguez, 2002). Der ihnen eigene Apikal-Komplex besteht aus sekretorischen Organellen, den Rhoptrien, Mikronemen, *dense granules* und aus den apikalen Polar-Ringen mit dem Conoid. Rhoptrien und Mikronemen enthalten Proteine, die für die Bewegung und die Adhäsion an Wirtszellen sowie die Invasion in Wirtszellen wichtig sind (Morissette und Sibley, 2002). Außerdem besitzen Malaria-Parasiten und andere Mitglieder der Familie der *Apicomplexa* den Apicoplast, ein Organell, dass Ähnlichkeit zu den Chloroplasten der Pflanzen und Algen aufweist (Foth & McFadden, 2003).

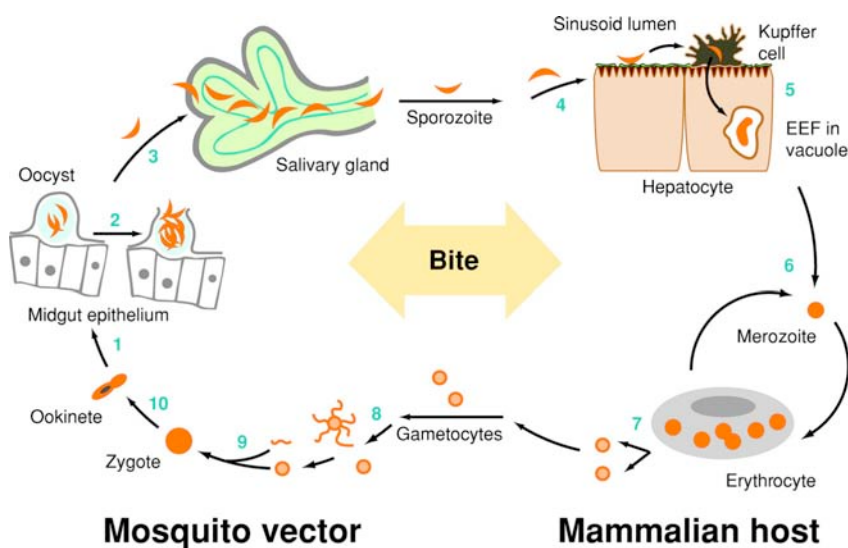


Abbildung 3-2 Lebenszyklus von *Plasmodium spec.*

Beschreibungen zu den einzelnen Abschnitten des Lebenszyklus sind im Text in Klammern mit der entsprechenden Nummer zu finden (Kappe 2004).

Der Lebenszyklus beginnt während der Blutmahlzeit der infizierten *Anopheles* Mücken am Säugerwirt. Die Weibchen benötigen die Blutmahlzeit für ihre Eiproduktion (die Männchen ernähren sich von Pflanzensäften). Dabei gelangen durch den Stich des Moskitos wenige bis hin zu 200 Sporozoiten in die Haut des Wirtes (Medica und Sinnis, 2005). Während des Stiches durchsucht das Moskito die Haut des Säuger-Wirtes nach einer Kapillare und gibt dabei Speichel ab, der neben Vasodilatoren, Antikoagulanzen auch die Sporozoiten enthält (Amino *et al.*, 2006). Diese wandern durch die Dermis bis sie ein Blutgefäß erreichen. Als nächstes dringen sie in kleine Blutgefäße ein und gelangen so über den Blutstrom in die Leber (4). Dort haften die Sporozoiten am sinusoiden Epithelium der Leberzellen und dringen über Kupferzellen (5) in die darunter liegenden Hepatozyten ein (Frevort *et al.*, 2005).

P.vivax und *P.ovale* besitzen ruhende Leberstadien (Hypnozoiten), die mehrere Wochen bis Jahre in der Leber verweilen können bis sie die exoerythrozytäre Schizogonie durchlaufen. Diese Stadien sind für Malaria-Rückfälle, Jahre später, verantwortlich (Cogswell, 1992).

Die Sporozoiten entwickeln sich in den Hepatozyten innerhalb einer parasitophoren Vakuole innerhalb von 2-10 Tagen (je nach *Plasmodium* Spezies) zu exoerythrozytären

Formen (EEF). Diese EEFs wachsen und bilden Tausende von Merozoiten (Exoerythrozytäre Schizogonie). Dem Entlassen der Merozoiten aus den Hepatozyten folgt die Invasion in Erythrozyten und der Start der erythrozytären Schizogonie (6). Diese Schizogonie zeigt sich bei den einzelnen *Plasmodium* Arten von unterschiedlicher Dauer, so etwa 22-24 Stunden bei *P.berghei* und etwa 48 Stunden bei *P.falciparum*. Dort entwickelt sich der Parasit über ein Ring-, Trophozoiten- und Schizonten-Stadium. Diese Entwicklung findet ebenfalls innerhalb einer parasitophoren Vakuole statt (Lingelbach und Joiner, 1998).

Während dieser erythrozytären Phase modifiziert der Parasit die Wirtszelle um sich einen Lebensraum zu verschaffen. Dabei kommt es zur Ausbildung der parasitophoren Vakuole, der Bildung der *Knobs* für die Zytoadhärenz sowie der Erhöhung der Durchlässigkeit der Erythrozyten-Membran für kleine Metabolite, die der Parasit für sein Wachstum benötigt. Einige wenige Merozoiten differenzieren sich in sexuelle Stadien, die Gametozyten, die durch eine Blutmahlzeit von einer *Anopheles*-Mücke aufgenommen werden können (7). Die männlichen Gametozyten exflagellieren im Mitteldarm der Mücke (bedingt durch den Temperaturabfall um mindestens 5°C, Xanthurensäure und pH-Änderung im Moskito) und bilden je 8 bewegliche Mikrogameten (8). Die weiblichen Makrogametozyten entwickeln sich zu Makrogameten. Mikro- und Makrogamet fusionieren im Mitteldarm der Mücke und bilden eine Zygote (9), die sich innerhalb von 18-24h zu einem beweglichen Ookinet (10) entwickelt (Perlmann & Troye-Blomberg 2002, Kapitel Structure and Life Cycle).

Der Ookinet durchquert die peritrophe Membran und Mitteldarmepithelzellen (1). An der Basallamina des Mitteldarms wandelt sich der Ookinet in eine Oozyste um. Diese Entwicklung unterhalb der Basallamina scheint den Parasiten vor dem Abwehrsystem des Moskitos schützen zu können. Die Differenzierung der Oozyste ist das längste Stadium im Entwicklungszyklus und auch das einzige extrazelluläre Entwicklungsstadium des Parasiten. Die Oozysten vollziehen mehrere mitotische Teilungen und bilden Sporoblasten, aus denen sich nach etwa 10-14 Tagen durch Knospung die Sporozoiten lösen (2). Die Sporozoiten verlassen die Oozysten aktiv und gelangen so in die Hämolymphe. Der Transport zu den Speicheldrüsen erfolgt wahrscheinlich passiv mit der Hämolymphe. Im Anschluß an die Adhäsion an die Speicheldrüsen durchqueren sie deren Basallamina und sammeln sich im Speicheldrüsen Kanal an (3). In dieser Phase sind die infizierten *Anopheles* Mücken infektiös, und können *Plasmodium* auf einen neuen Wirt übertragen.

3.3 Prä-erythrozytäre Stadien

3.3.1 Sporozoiten

Die Forschung an Blutstadien stand lange im Vordergrund im Vergleich zu Sporozoiten/Leberstadien, da Sporozoiten und Leberstadien schwieriger zu isolieren sind und außerdem keine Pathologie erzeugen. Doch durch Fortschritte in Genom- und Proteomforschung konnten viele neue Informationen zu den prä-erythrozytären Stadien gewonnen werden (Kappe *et al.*, 2004).

So konnten z.B. in letzter Zeit wichtige Erkenntnisse über Sporozoiten-spezifische Proteine gewonnen werden, die an der Interaktion mit den Wirten beteiligt sind.

Die Sporozoiten-Proteine CSP (*circumsporozoite protein*), TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*) und MAEBL sind für die Anheftung und Invasion in die Speicheldrüsen von Bedeutung. Das CS-Protein ist auf der gesamten Sporozoiten Oberfläche zu finden und ist ein viel versprechender Kandidat für eine rekombinante prä-erythrozytäre Malaria-Vakzine (Stoute *et al.*, 1997). CSP scheint für die initiale Anheftung an Speicheldrüsen wichtig zu sein, während TRAP bei der nachfolgenden Invasion der Speicheldrüsen eine entscheidende Rolle spielt. MAEBL scheint bei der initialen Bindung mit CSP zu kooperieren. Des Weiteren scheint auch die Gleitbewegung für die Anlagerung und Bindung an die Speicheldrüsen nicht benötigt zu werden. Interessanterweise konnten phänotypische Unterschiede zwischen den Oozysten und Speicheldrüsen-Sporozoiten festgestellt werden: Während die Speicheldrüsen-Sporozoiten infektiös für den Säuger-Wirt sind, kontinuierliche Gleitbewegungen ausführen und eine schützende Immunantwort auslösen können, zeigen die Oozysten-Sporozoiten keine dieser Eigenschaften (Vanderberg *et al.*, 1974). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Speicheldrüsen-Sporozoiten für die Infektion des Wirbeltieres programmiert sind und dadurch die Fähigkeit verloren haben, erneut Speicheldrüsen zu invadieren (Touray *et al.*, 1992).

Mit einer subtraktiven Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass die phänotypischen Unterschiede in den beiden Sporozoiten-Stadien mit Unterschieden in der Gen-Expression korrelieren (Matuschewski *et al.*, 2002). Dabei konnten 30 Gene identifiziert werden, die spezifisch in Speicheldrüsen-Sporozoiten angeschaltet werden (*UIS-Gene- upregulated in infectious sporozoites*). Diese Gene sind mögliche Kandidaten für die Interaktion mit dem Säugewirt und die Transformation in EEF (Kappe *et al.*, 2004). Die molekulare Grundlage

für die unterschiedliche Expression ist bisher ungeklärt. Entweder ist ein zeitabhängiges Entwicklungsprogramm oder ein Signal durch den Kontakt mit den Speicheldrüsen dafür verantwortlich (Kappe *et al.*, 2004). Allerdings zeigen neueste Studien, dass die Expression von UIS3 und UIS4 durch einen Regulator, das *sporozoite and liverstage asparagine-rich protein* (SLARP) kontrolliert wird (Silvie *et al.*, 2008).

Die meisten *Apicomplexa* sind beweglich und fähig aktiv in Zellen einzudringen. Sie können recht schnell auf Oberflächen gleiten - und das ohne Zilien oder Flagellen. Die Gleitbewegung der Sporozoiten, genannt *Gliding motility*, ist ein aktiver Substrat abhängiger Bewegungsprozess (Vanderberg, 1974).

Die *Gliding motility* wird durch die Aktin-Myosin-Maschinerie angetrieben. Das beteiligte Myosin, das sog. MyoA – bildet eine eigene Klasse (XIV) und ist ausschließlich in *Apicomplexa* zu finden. Proteine der TRAP-Familie stellen die Verbindung zwischen dem intrazellulären Motor und dem extrazellulären Substrat her. TRAP-Proteine binden mit dem extrazellulären Teil an das Substrat und sind intrazellulär an Aktin-Oligomere durch Aldolase-Tetramere immobilisiert. Myosine bewegen die Aktin-Oligomere, so daß der Parasit sich nach vorne bewegt. (Kappe *et al.*, 2004).

3.3.2 Leberstadien

Plasmodium-Leberstadien sind eine obligate Phase im *Plasmodium*-Lebenszyklus (Shortt & Garnham, 1948). Experimentell sind die Stadien schwer zugänglich, da nur wenige Hepatozyten infiziert sind. Ein detailliertes Verständnis der Biologie der Leberstadien-Entwicklung ist die Voraussetzung für neue Therapie- und Präventionskonzepte gegen Malaria.

Die Infektion mit Leberstadien ist zwar symptomlos, jedoch bilden Leberstadien Tausende von Merozoiten und stellen somit die Grundlage für die Infektion der Erythrozyten dar. Die reduzierte Geschwindigkeit in der Blutzirkulation in der Leber erleichtert die Anheftung der Sporozoiten in der Leber. Dabei kommt es zu einer spezifischen Interaktion zwischen dem CS-Protein und Wirtsmolekülen (Cerami *et al.*, 1992).

Der Parasit wandert am Leber-Endothelium entlang und interagiert über das CS-Protein mit *Heparan sulphate proteoglycanen* (HSPGs) in den Lebersinusoiden (Mota, 2006). Während das CS-Protein wohl bei der Anheftung der Sporozoiten eine wichtige Rolle spielt, scheint TRAP für das Eindringen wichtig zu sein (Mota, 2006).

Sporozoiten gelangen über Kupferzellen, residente Makrophagen, die permanent in der Leber zwischen sinusoiden Endothelzellen lokalisiert sind, in die Leber. Die Sporozoiten binden aktiv an Kupferzellen und durchwandern diese. Von dort wandern sie in Hepatozyten, wo sie sich in sogenannte exo-erythrozytäre Formen (EEFs) entwickeln (Frevert und Pradel, 2001). Auffällig ist, dass die Sporozoiten zunächst mehrere Hepatozyten durchwandern (Mota *et al.*, 2001). Dies wird durch das Aufbrechen der Plasmamembran, gefolgt von schneller Reparatur dieser Zellen ohne Ausbildung einer Vakuole um den Parasiten, erreicht. Danach dringen sie in eine geeignete Leberzelle ein, wobei sich eine parasitophore Vakuole ausbildet und die Entwicklung zu den Leberstadien vollzogen wird. Es konnte jedoch in axenischen Kulturen gezeigt werden, dass Sporozoiten nicht auf Hepatozyten angewiesen sind um ihre Transformation in frühe EEFs zu vollziehen. Allerdings konnten keine lebenden Parasiten nach 48h detektiert werden, was für Transformation, jedoch keine Replikation außerhalb der Wirtszelle spricht (Kaiser *et al.*, 2003).

Plasmodium berghei kann abhängig von der Wirtszelle verschiedene Invasionswege nutzen. So findet die Invasion in HepG2, HuH7 und HeLa Zellen CD81- und Wirtsmembran-Cholesterol unabhängig statt, wohingegen die Invasion in Hepa1-6-Zellen auf CD81 auf der Wirtszelle sowie Cholesterol angewiesen ist (Silvie *et al.*, 2006). Die Invasion in primäre Hepatozyten kann interessanterweise mit beiden Invasionswegen erfolgen (Silvie *et al.*, 2006). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß ein Cystein-Protease Inhibitor (ICP) für die Sporozoiten Invasion wichtig ist und zusätzlich die Wirtszell-Apoptose verhindert (Rennenberg *et al.*, 2010). ICP lokalisiert in den Leberstadien in der PV. Eine schützende Immunität, die experimentell durch eine Immunisierung mit Sporozoiten erreicht werden kann, ist durch viele Faktoren bestimmt. Die CD8⁺T-Zellen spielen dabei eine entscheidende Rolle.

Über die letzte Phase der Leberstadienentwicklung, das Entlassen der Merozoiten aus den Hepatozyten, ist noch recht wenig bekannt. Jedoch hat man für *P.berghei* beobachtet, dass die Merozoiten durch die Bildung von Vesikeln (sogenannten Merosomen) entlassen werden und so in das Lebersinusoidlumen gelangen und nicht, wie zunächst vermutet, durch Aufplatzen der Wirts-Zellen (Sturm *et al.*, 2006). Die Membran der Merosomen stammt von den Hepatozyten ab und schützt die Merosomen somit vor der Erkennung durch dendritische Zellen oder Kupferzellen auf ihrem Weg in die Blutbahn (Sturm *et al.*, 2006).

3.3.3 Proteine mit einer essentiellen Funktion in der Leberstadien-Entwicklung

In den letzten Jahren konnten Proteine identifiziert werden, die eine essentielle Funktion für die Entwicklung in der Leberzelle haben. Dazu gehören die Sporozoiten und Leberstadien-spezifischen Proteine UIS3 und UIS4 (Mueller *et al.*, 2005a+b), P36p (aus der Familie der 6-Cys-Proteine) (van Dijk *et al.*, 2005) sowie SLARP (Silvie *et al.*, 2008). Immunisierungen mit den Knockout-Mutanten dieser Gene führte mit der Ausnahme von *slarp(-)* Parasiten, zum Schutz vor einer nachfolgenden natürlichen Sporozoiten Infektion.

UIS3 und UIS4

Die UIS-Gene *UIS3* (PB000892.03.0) und *UIS4* (PB100551.00.0) wurden bei einem *transcriptional profiling* identifiziert und scheinen in infektiösen Sporozoiten hoch reguliert zu sein (Matuschewski *et al.*, 2002). Das *UIS3* Gen kodiert in *P.berghei* für ein 222 Aminosäure Protein und das *UIS4* Gen kodiert in *P.berghei* für ein 220 Aminosäure Protein. Beide enthalten ein N-terminales Signalpeptid und eine Transmembran-Domäne (Abbildung 3-3).

Das *UIS3* Protein lokalisiert in der Leberstadienentwicklung in der PVM (Mikolajczak *et al.*, 2007). Die präzise *Deletion* der *UIS3* und *UIS4* Gene führt zu einem Arrest des Leberstadienwachstums nach der Invasion (Mueller *et al.*, 2005a+b). *uis3(-)* Parasiten bleiben klein und bilden keine Tochter-Merozoiten aus. Eine Infektion mit *uis3(-)* Sporozoiten führt daher nicht zu einem Malaria-Ausbruch. Durch den Wachstums-Arrest in der Leberzelle können *uis3(-)* Sporozoiten als Impfstoff eingesetzt werden. Immunisierungen mit *uis3(-)* Sporozoiten konnte Mäuse komplett gegen eine Neu-Infektion mit Sporozoiten schützen (Mueller *et al.*, 2005a). Auch in T- und B-Zell defizienten *rag1(-/-)* Mäusen blieben Infektionen mit *uis3(-)* Sporozoiten Blutstadien-negativ. Allerdings konnte bei diesen Immunisierungen kein Schutz mehr vermittelt werden. Immunisierungen mit *uis3(-)* Sporozoiten in B-Zell defizienten Mäusen blieben jedoch erfolgreich. Diese Experimente legen nahe, daß der Schutz bei Immunisierungen primär durch CD8⁺-T-Zellen gewährleistet wird (Mueller *et al.*, 2007).

Mit Hilfe des *Yeast-two-hybrid*-Systems konnte gezeigt werden, daß *UIS3* mit L-FABP (*liver fatty acid binding protein*) interagiert (Mueller *et al.*, nicht publiziert; Mikolajczak *et al.*, 2007). Eine Herunter-Regulierung von L-FABP in Hepatozyten führte zu einem

Entwicklungsdefekt der Parasiten, wohingegen eine Überexpression zu einer besseren Entwicklungsfähigkeit führte (Mikolajczak *et al.*, 2007).

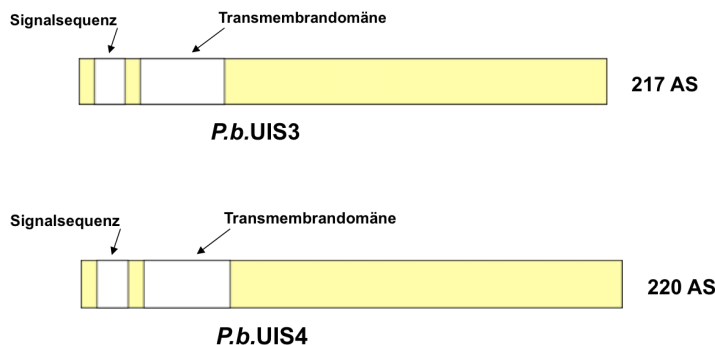


Abbildung 3-3 Schematische Darstellung des P.b.UIS3 und UIS4-Proteins

Das UIS4 Protein gehört ebenfalls zu den PVM-lokalisierenden Proteinen (Mueller *et al.*, 2005b). Diese Proteine werden auch als *early transcribed membrane proteins* (ETRAMPs) bezeichnet (Spielmann *et al.*, 2003). Wie auch UIS3 ist es für die Leberstadien-Entwicklung essentiell, allerdings konnten bei Infektionen mit sehr hohen *i.v.*-Dosen von *uis4(-)* Sporozoiten sogenannte *Breakthrough*-Infektionen beobachtet werden. In Immunisierungs-Experimenten konnte ebenso wie mit *uis3(-)* Sporozoiten kompletter Schutz gegen eine Neu-Infektion vermittelt werden (Mueller *et al.*, 2005b). Für UIS4 konnte durch ein *yeast-two-hybrid-Screening* eine Interaktion mit Apolipoprotein A1 (ApoA1) gezeigt werden (Schulz *et al.*, nicht publiziert).

Zusätzlich zu den Einzelmутanten *uis3(-)* und *uis4(-)* wurde der *uis3(-)/uis4(-)*-Doppelknockout im Hinblick auf schützende Immunisierungen getestet. Dabei konnten *uis3(-)/uis4(-)*-Sporozoiten in C57BL/6 Mäusen, wie erwartet sterilen Schutz vor WT-Infektionen gewährleisten (Jobe *et al.*, 2007). Der Schutz war CD8⁺-T-Zell vermittelt, da CD8⁺-T-Zell defiziente Mäuse nicht geschützt werden konnten. Die stimulierten T-Zellen produzierten das Zytokin Interferon-gamma (Jobe *et al.*, 2007).

In *P.yoelii* konnte bei Immunisierungen mit *uis3(-)* und *uis4(-)* Sporozoiten ebenfalls Schutz aufgebaut werden. Dabei sind erneut CD8⁺ T-Zellen essentiell für diesen Schutz (Tarun *et al.*, 2007).

P36p/P36

Das *P.berghei* Gen *P36p* (PB000892.00.0) kodiert in *P.berghei* für ein 441AS Protein und enthält eine N-terminale Signalsequenz sowie eine C-terminale Transmembran-Domäne.

p36p(-)-Sporozoiten können in Hepatozyten eindringen, aber keine Leberstadien-Entwicklung abschließen (van Dijk *et al.*, 2005). Immunisierungen mit *p36p(-)* Sporozoiten konnte Mäusen Schutz gegen eine Neu-Infektion verleihen. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß *p36p(-)* Parasiten die Apoptose der infizierten Hepatozyten induzieren (van Dijk *et al.*, 2005). Das Ortholog von *P36p* in *P.falciparum* ist *p52*. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß *p52(-)*-Parasiten zwar normale *Gliding Motility* und Zellinvasion zeigen, die Entwicklung zu Leberstadien jedoch kurz nach der Invasion in primäre Hepatozyten blockiert ist (van Schaijk *et al.*, 2008). Die Generation einer *p52(-)/p36(-)* Doppelmutante in *P.yoelii* zeigte ebenfalls normale Entwicklung der Sporozoiten, jedoch einen Defekt in der Leberstadienentwicklung (Labaied *et al.*, 2007). Die Parasiten konnten keine PV ausbilden und sich nicht zu Leberstadien entwickeln. Des Weiteren konnte keine Blutstadien-Infektion etabliert werden und Immunisierungen mit *p52(-)/p36(-)* Sporozoiten führte zu einem komplettem Immun-Schutz.

SLARP

Das Asparagin-reiche Protein SLARP ist spezifisch in Sporozoiten und Leberstadien exprimiert. *slarp(-)* Parasiten zeigen ebenfalls einen Defekt in der Leberstadien-Entwicklung, wobei die Invasion in Hepatozyten und die PVM-Bildung nicht betroffen sind (Silvie *et al.*, 2008). Allerdings ist das *Remodelling* der PVM beeinträchtigt, so daß die *slarp(-)* Parasiten einen Arrest in der sehr frühen Leberphase zeigen (Silvie *et al.*, 2008). Die *slarp(-)* Parasiten zeigen eine Herunter-Regulierung von PVM-Proteinen (UIS3, UIS4). Immunisierungen mit *slarp(-)* Sporozoiten konnten nur teilweise und kurzfristig schützen. Slarp könnte somit als Gen-Regulator von Leberstadien-spezifischen Genen fungieren (Silvie *et al.*, 2008).

UIS7

Das *UIS7*-Gen (PB107461.00.0; PY03831) wurde bei einem *transcriptional profiling* identifiziert und scheint in infektiösen Sporozoiten hoch reguliert zu sein (Matuschewski *et al.*, 2002). Das *P.berghei* Gen umfaßt 298bp und kodiert für ein aus 98 Aminosäuren bestehendes 11kDa großes Protein.

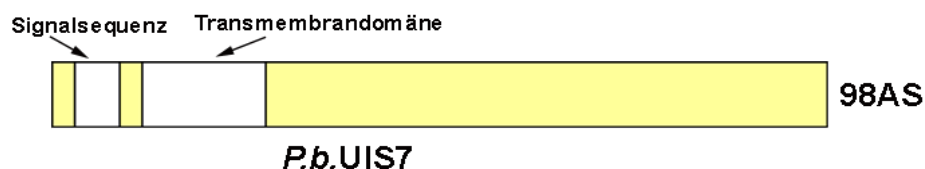


Abbildung 3-4 Schematische Darstellung des *P.b.UIS7*-Proteins

Das Protein enthält eine Transmembran-Domäne sowie eine Signalsequenz. Daher könnte das UIS7-Protein ein sezerniertes Oberflächenprotein sein, welches eine Verbindung zwischen dem Wirt und dem Parasiten vermittelt. Eine *uis7(-)*-Mutante konnte bereits generiert werden, jedoch zeigte die Mutante keinen Defekt im Lebenszyklus (Heiss *et al.*, nicht publiziert).

3.4 Parasitophore Vakuole

Die intrazelluläre Lebensweise bietet Pathogenen Vor- sowie Nachteile in seiner Entwicklung. Vorteilhaft ist der Schutz vor T-Zell-vermittelter Immunabwehr (CD4- und CD8-T-Zellen). Allerdings greift die angeborene Immunabwehr intrazellulär an. So kann es z.B. zu einer Fusion mit Lysosomen, Autophagie oder Wirtszell- Apoptose kommen, wodurch die Pathogen-Infektion eliminiert wird (Kumar und Valdivia 2010).

Viele Parasiten wie z.B. *Plasmodium*, *Toxoplasma* und *Cryptosporidium* replizieren sich in einer sog. parasitophoren Vakuole (PV), um der Immunabwehr der Wirtszelle zu entgehen. Nachteilig ist dabei allerdings, daß die Replikation der Pathogene dadurch möglicherweise beeinträchtigt ist und kein direkter Zugang zu Wirtsmetaboliten besteht.

Theileria, ein verwandter Parasit aus dem Genus *Apicomplexa*, hat die Möglichkeit entwickelt, die PV wieder zu verlassen und sich im Wirtszellzytoplasma weiter zu entwickeln (Plattner und Soldati-Favre 2008). Die Entwicklung in der Vakuole ist offensichtlich ein Kompromiß zwischen eingeschränkten Wachstumsbedingungen und einem optimalen Schutz vor der Immunabwehr der Wirtszelle (Kumar und Valdivia 2010). Die Vakuole kann als maßgeschneidertes Wirtsorganell bezeichnet werden, da die Vakuole aktiv während der Parasiten-Invasion aus der Wirtsplasmamembran gebildet wird (Bsp. *Toxoplasma*, *Plasmodium*). Zunächst teilt die Vakuole viele Eigenschaften mit frühen Endosomen, wird dann jedoch durch Pathogen-gebildete Proteine oder Lipide modifiziert, wodurch sie auch die Eigenschaft mit Wirtsorganellen zu fusionieren verliert. Im Falle des Eindringens durch Rezeptor-vermittelte Endozytose entspricht die Vakuole Strukturen der

Wirtszelle. Die Vakuole ist also ein besonderes Organell, daß Merkmale von Endosomen/Lysosomen (*Salmonella*), frühen Endosomen (*Mykobakterien*), Endoplasmatischen Retikulum (*Legionella*) bzw. keine besonderen Merkmale mit Wirtsorganellen (*Toxoplasma*, *Chlamydia*) teilt (Meresse *et al.*, 1999). Pathogene haben ähnliche Strategien entwickelt die Vakuole und die Wirtszelle zu verlassen. Als erstes wird die Vakuolenmembran durch Pathogen-sekretierte Lipasen und Proteasen zerstört (Heussler *et al.*, 2009). Im Folgenden kommt es zum Wirtszelltod. Bei *Plasmodium* Leberstadien bleibt die Wirtszelle intakt und Merosomen werden gebildet. In *Plasmodium* Blutstadien, *Toxoplasma* und intrazellulären Bakterien wird die Wirtszellmembran durch Wirtsproteasen zerstört und es kommt zur Lyse der Wirtszelle und zum Entlassen der Pathogene (Heussler *et al.*, 2009). Chlamydien können zusätzlich auch durch Knospung von Blasen (Bakterien noch innerhalb der Vakuolenmembran) aus der Wirtszelle entlassen werden.

3.5 Organellen-Assoziationen bei intrazellulären Parasiten

Um die Replikation innerhalb der Vakuole zu sichern muß gewährleistet sein, daß die Vakuole stabil bleibt. Dies sichern einige Pathogene beispielsweise durch eine Interaktion mit dem Zytoskelett der Wirtszelle (Poh *et al.*, 2008). In der Wirtszelle spielt das Zytoskelett eine wichtige Rolle bei der Organellen-Positionierung und dem Vesikel-Transport zwischen Membran-gebundenen Organellen, wobei die Spezifität durch SNARE- und Rab-Proteine erreicht wird. Manche Pathogene modulieren die Rab-Rekrutierung, um so mit gezieltem Vesikel-Transport die Vakuolen-Stabilität zu sichern. Cholesterol ist eine bedeutende strukturelle Komponente von Membranen. Einige Pathogene reichern Cholesterol an ihrer Vakuole an. Inwieweit das Cholesterol-Level die Vakuolen-Stabilität bestimmt, ist noch nicht geklärt. Die Stabilität der Vakuole könnte ein neuer Angriffspunkt für therapeutische Strategien sein (Kumar und Valdivia 2010). Im Folgenden werden verschiedene Parasiten in Bezug auf eine Assoziation mit Wirtszellorganellen beschrieben.

Toxoplasma

Toxoplasma gondii (*T.gondii*) gehört zu den *Apicomplexa* und ist der Verursacher der Toxoplasmose. *T.gondii* hat ein sehr breites Wirtszellspektrum und kann jede kern-haltige Zelle infizieren. Im gesunden Wirt verläuft die Krankheit meist asymptomatisch. Die Lipide der PVM stammen bei *Toxoplasma* hauptsächlich von der Wirtszellmembran (Suss-Toby *et al.*, 1996). Die Vakuole ist bei *Toxoplasma* ebenfalls vom Wirts-Vesikel-Trafficking separiert. Der Parasit verfügt über ein Membran-Tubuläres-Netzwerk (MTN), wodurch eine Oberflächenvergrößerung erzielt wird, was die Nahrungsaufnahme erleichtert (Kumar und Valdivia 2010).

Die PVM von *T.gondii* enthält offensichtlich keine integralen Wirts-Membranproteine, sondern wird durch sekretierte Parasiten Proteine modifiziert (Sinai und Joiner 1997). Die Proteine stammen aus den exkretorischen/sekretorischen Organellen Rhoptrien und dichte Granula, die unmittelbar nach der Invasion sezerniert werden (Sinai und Joiner 1997). Durch die Modifizierung der PVM können Zucker und Aminosäuren durch eine noch nicht charakterisierte Pore diffundieren (Plattner und Soldati-Favre 2008) (Schwab *et al.*, 1994). Die Interaktion von *Toxoplasma* mit Wirts-Mitochondrien wird über das Rhoptrien-Protein Rop2 vermittelt (Sinai *et al.*, 2001). Rop2 lokalisiert in der PVM, wobei der N-terminale Teil ins Wirtszytosplasma reicht und als Mitochondrien-Targeting-Signal wirkt (Sinai *et al.*, 2001). Cholesterol erlangt der Parasit über mit Cholesterol-beladene lysosomale Vesikel, die ins Vakuolen-Lumen transportiert werden. Der Cholesterol Transport ist dabei unabhängig von Transportwegen zwischen Wirts-Golgi und ER (Coppens *et al.*, 2000). Die Lipide erhält *T.gondii* durch die Assoziation mit dem ER und Mitochondrien (Plattner und Soldati-Favre 2008).

In mit *Toxoplasma* infizierten dendritischen Zellen konnte ein Transfer von Wirts-ER Komponenten in die PV der Parasiten beobachtet werden, was eine Fusion zwischen ER und PV implizieren würde (Goldszmid *et al.*, 2009). Diese Interaktion kann für die Antigen-Präsentation in MHC-Klasse I Komplexen und die CD8+-T-Zell Aktivierung wichtig sein.

Die Infektion von entkernten Zellen (Zytoblasten) mit *Toxoplasma* führt zu einer normalen Invasion und Replikation der Parasiten innerhalb einer PV (Romano *et al.*, 2007). Die PV wird dabei von Mikrotubuli umrundet und kann mit ER und Mitochondrien interagieren. Die Parasiten, die sich in Zytoblasten entwickeln, können in neue Zellen eindringen, d.h. nukleare Funktionen/Wirtstranskriptionsaktivitäten sind für die Parasiten-Entwicklung nicht notwendig. (Romano *et al.*, 2007). In Golgi-defizienten Zytoblasten konnten die

Parasiten ebenfalls eine PV ausbilden und eine normale Replikation durchführen. Demnach ist auch ein intakter Golgi-Apparat nicht für das Parasiten-Wachstum notwendig (Romano *et al.*, 2007).

Die *dense granule* Proteine GRA1 und GRA2 sind in die Ausbildung des intravakuolaren Netzwerkes (Membraniumfasste Schläuche innerhalb des PV-Raumes) involviert. GRA1 scheint in das Lumen der Vakuole sekretiert zu werden und mit diesem Netzwerk zu assoziieren, wobei GRA2 in multi-lameare Vesikel sekretiert wird, die aus Einstülpungen des Parasiten heraus entlassen werden (Sibley *et al.*, 1995). Diese Vesikel formen schließlich das intravakuolare Netzwerk. Durch dieses Netzwerk kommt es zu einer Oberflächenvergrößerung und somit zu verbessertem Stoffaustausch (Plattner und Soldati-Favre 2008). Ein weiteres *dense granule* Protein (GRA3) assoziiert mit der PVM und PVM-Ausläufern, die ins Wirtszytosplasma hineinreichen (Bermudes *et al.*, 1994).

Die PV von *Toxoplasma* wird von Mikrotubuli umrundet. Diese Assoziation wird 4-6h nach der Invasion aktiv vom Parasiten initiiert (Coppens *et al.*, 2006). Durch diese Rekrutierung gelangen auch Endo-Lysosomen zur PV, die letztlich um die PV herum vorliegen (Coppens *et al.*, 2006). Der Golgi-Apparat der Wirtszelle liegt an der PV in kleinen Fragmenten vor und endozytische Kompartimente lagern sich ebenfalls an der PV an. Es kommt allerdings nicht zu einer Fusion von Wirtsvesikeln mit der PVM. Die Assoziation der Endo-Lysosomen mit der PVM konnte durch das Eingreifen in die Lysosomen-Beweglichkeit, beispielsweise Chloroquin-Behandlung oder die Zerstörung der Wirtsmikrotubuli verhindert werden (Coppens *et al.*, 2006). Innerhalb des PV-Raumes konnten PVM-Einstülpungen gezeigt werden, die als H.O.S.T (*host-organelle-sequestering tubulo-structures*) bezeichnet werden und einen zentralen Wirtszellmikrotubulus enthalten (Coppens *et al.*, 2006).

Die Endo-Lysosomen werden entlang von Wirtszellmikrotubuli zur PV transportiert und an die PVM angelagert. Die Endosomen werden intakt durch Mikrotubuli-basierte Einstülpungen der PVM in die Vakuole eingebracht (durch H.O.S.T enthaltende Mikrotubuli) (Coppens *et al.*, 2006). Der Inhalt der Lysosomen kann dann über spezielle Transporter über die Plasmamembran des Parasiten transportiert werden.

Cryptosporidium

Cryptosporidien gehören ebenfalls zu den *Apicomplexa*. Sie infizieren Enterozyten in allen Vertebraten und führen zu Durchfall-Erkrankungen und benötigen nur einen Wirt für die sexuelle und asexuelle Vermehrung.

Wie auch *Toxoplasma* und *Plasmodium* replizieren sie in einer nicht-fusionierenden PV. Dadurch sind sie zwar vor der Wirtszell-Abwehr geschützt, haben aber keinen Zugang zu Wirtsmetaboliten (Beyer *et al.*, 2002). Die Replikation findet intrazellulär aber exozytosolisch statt, da die Parasiten während der Invasion ein Kompartiment etablieren, das vom Wirtszytosol separiert ist und in das Lumen des Darms hineinragt (Elliott *et al.*, 2000). Möglicherweise können die Parasiten durch diese Lokalisation direkt Nährstoffe aus dem Lumen des Darms aufnehmen (Plattner und Soldati-Favre 2008). Eine Interaktion mit Aktin konnte ebenfalls gezeigt werden. Durch Modifizierung des Aktin-Gerüsts des Wirts wird beim Eindringen ein Aktin Plaque an der Wirt/Parasit-Schnittstelle ausgebildet (Elliott *et al.*, 2000). Des Weiteren könnte Aktin den Vesikel-Transport ermöglichen, wodurch die Aufnahme von Nährstoffen aus der Wirtszelle gewährleistet sein kann (Zeng *et al.*, 2006).

Theileria

Die *Apicomplexa Theileria spp* infizieren hauptsächlich Lymphozyten und führen zu einer Lymphoproliferativen Krankheit, die für große Verluste in der Viehzucht in Afrika verantwortlich ist. Kurz nach der Invasion der Zellen wird die PV aufgelöst und der Parasit liegt frei im Zytosol vor. Im Folgenden kommt es zur Assoziation mit Mikrotubuli und eine unkontrollierte Wirtszellproliferation wird vom Parasiten initiiert. Dabei wird eine klonale Expansion der transformierten Zelle ausgelöst (Dobbelaere *et al.*, 2004).

Andere *Apicomplexa* zerstören die Wirts-Zelle für ihre Weitergabe, *Theileria* erreicht die Weitergabe durch Assoziation an den Mitosekomplex und wird so auf die Tochterzellen aufgeteilt (Schneider *et al.*, 2007).

Leishmania

Die Leishmanien gehören zu den Protozoen und sind als Pathogen für die Leishmaniose verantwortlich. Dabei unterscheidet man zwischen kutanen, viszeralen und mukokutanen Formen. Sie entwickeln sich intrazellulär in Makrophagen und Fibroblasten innerhalb einer parasitophoren Vakuole. Diese Vakuole hat viele Merkmale mit den Lysosomen gemein (niedriger pH-Wert, enthält Lysosom-spezifische Membranproteine und saure Hydrolasen) (Wilson *et al.*, 2008). Während der intrazellulären Entwicklung expandiert die PV von *Leishmania amazonensis* drastisch, wodurch der Parasit besser in der Wirtszelle überleben kann und so z.B. vor oxidativen Schäden geschützt ist (Wilson *et al.*, 2008). In infizierten Zellen konnte eine verstärkte Expression von LYST/Beige, was normalerweise die

Lysosomengröße reguliert, beobachtet werden. Dies führt zu einer kleineren PV der Parasiten und somit schlechterem Parasiten-Wachstum führt (Wilson *et al.*, 2008). Die PV fusioniert mit Endosomen (Russel *et al.*, 1995).

Trypanosoma cruzi

Die infektiösen Formen von *Trypanosoma cruzi* (Trypomastigote) können verschiedene Zelltypen infizieren. Während der Invasion rekrutiert und fusioniert der Parasit mit Lysosomen wodurch Membran für die parasitophore Vakuole zur Verfügung steht (Andrade und Andrews 2005). Bei einem alternativen Invasionsweg kommt zu Invasion durch eine Einstülpung der Plasmamembran wodurch eine intrazelluläre Vakuole gebildet wird die nachfolgend mit Lysosomen fusioniert. Dieser Invasionsweg ist unabhängig von Aktin-Polymerisierung. Die Lysosomen-artige parasitophore Vakuole wird relativ schnell nach der Invasion zerstört, so daß der Parasit frei im Zytosol vorliegt. Die Bildung der PV mit lysosomalen Eigenschaften ist essentiell, damit die Parasiten den Lebenszyklus komplettieren können und nicht zu früh die Wirtszelle verlassen (Andrade *et al.*, 2004). Ohne eine Fusion mit Lysosomen verlassen die Parasiten die Wirtszelle. Dabei können die Lysosomen durch ihre Verbindung zu Mikrotubuli als Anker für die sonst sehr motilen Parasiten dienen, die so am Zytoskelett der Wirtszelle befestigt sind. (Andrade und Andrews 2005).

Chlamydia

Das Bakterium *Chlamydia trachomatis* wird beispielhaft für intrazelluläre Bakterien beschrieben. *Chlamydia* gehört zu den am häufigsten sexuell übertragbaren Bakterien-Spezies. Durch die Serotypen D-K kann es zu Entzündungen des Urogenitaltraktes bei Männern und Frauen kommen. Chronische Chlamydien Infektionen können bei Frauen zu Unfruchtbarkeit führen. Die Serotypen A-C verursachen eine Augeninfektion und können zu Erblindung führen. Die Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien, die sich innerhalb einer Membran-gebundenen Vakuole, der *Inclusion*, vermehren. Diese *Inclusion* wird durch Sekretion von Bakterien-Proteinen gebildet (Subtil *et al.*, 2000, Subtil *et al.*, 2001). Die *Inclusion* stellt für die Bakterien eine Nische dar und ist von lysosomaler Degradierung abgegrenzt. Die Fusion mit den Lysosomen wird dabei aktiv vom Bakterium durch Modulierung der *Inclusion* unterbunden (Scidmore *et al.*, 2003; Heinzen *et al.*, 1996). Allerdings konnte eine Interaktion mit dem Golgi-Apparat, multivesikulären *Bodies* und *Lipid droplets* gezeigt werden (Kumar *et al.*, 2006; Beatty *et al.*, 2006).

Die Bakterien sind auf Wirts-eigene Lipide angewiesen, die in ER und Golgi-Apparat gebildet werden (van Ooij *et al.*, 2000). Interessanterweise konnte gezeigt werden, daß die Bakterien-Infektion von Epithelzellen eine Golgi-Fragmentierung induziert, wobei Golgi-Stapel um die *Inclusion* herum zu sehen sind (Heuer *et al.*, 2009). Diese Mini-Stapel-Bildung scheint durch eine Golgin84-Spaltung hervorgerufen zu werden, welche von den *Chlamydien* induziert wird. Des Weiteren konnte durch eine Blockierung der Golgin84-Spaltung eine Golgi-Fragmentierung verhindert und im Folgenden ein Entwicklungsdefekt der Bakterien erreicht werden. In stabilen Zelllinien mit einem fragmentierten Golgi konnte eine verbesserte Reproduktionsfähigkeit der *Chlamydien* beobachtet werden (Heuer *et al.*, 2009).

Es konnte bereits gezeigt werden, daß die *Chlamydien* Rab-Proteine zur *Inclusion* rekrutieren (Rzomp *et al.*, 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Rab-Proteine Rab6A und Rab11A die *Chlamydien* Entwicklung regulieren (Reijmann-Lipinski *et al.*, 2009). Rab6 und Rab11 sind für die Golgi-Stabilität von Bedeutung. Rab6A oder Rab11A ist essentiell für die *Chlamydien*-induzierte Golgi-Fragmentierung und somit Bakterien-Entwicklung (Reijmann-Lipinski *et al.*, 2009).

Im Gegensatz zu anderen Bakterien wird die *Inclusion* der *Chlamydien* sehr schnell vom Endomembran-Transport-Weg separiert (Kumar und Valdivia 2010). Die *Inclusion* wandert an Mikrotubuli zum Mikrotubuli-Organisations-Zentrum (MTOC) und assoziiert mit RabGTPasen, wodurch ein Kontakt zu ER/Golgi-Vesikeln etabliert wird. Die *Inclusion* kann Lipide und Nährstoffe durch Wirtsorganellen aus dem Zytoplasma aufnehmen (Kumar und Valdivia 2010).

Plasmodium

Es wird vermutet, daß der Großteil der PVM von *Plasmodium* aus der Wirtsplasmamembran gebildet wird (Prudencio *et al.*, 2006). Der genaue Aufbau der PVM bleibt jedoch noch zu klären. Allerdings konnten bereits einige Proteine mit einer PVM-Lokalisation beschrieben werden. So z.B. UIS3 (Mikolajczak *et al.*, 2007), UIS4 (Mueller *et al.*, 2005b) und EXP1 (Simmons *et al.*, 1978). Teilweise können Sporozoiten in den Zellkern eindringen, allerdings wird keine PVM ausgebildet und die Parasiten sind nur begrenzt entwicklungsfähig (Silvie *et al.*, 2006). Die Parasiten entwickeln sich in Kern-Nähe und interagieren mit dem Endoplasmatischen Retikulum (Bano *et al.*, 2007). Eine Interaktion mit Mitochondrien oder Lysosomen konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Die Durchlässigkeit der PVM wird durch die Parasiten aktiv verändert wodurch Kanäle

entstehen, die wie eine Pore einen Material-Austausch erlauben (Bano *et al.*, 2007). Die Größe der Moleküle ist dabei auf max. 855Da begrenzt.

Die Visualisierung der Replikationsnische Vakuole ist bei Pathogenen, die durch Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden, nicht möglich, da die Vakuole Wirtzellstrukturen entspricht. In der parasitophoren Vakuole der *Apicomplexa*, wie z.B. *Plasmodium* findet jedoch ein „*Remodelling*“ der Vakuole nach der Invasion statt, während dessen Parasiten Proteine in die Vakuole eingebaut werden. Dadurch wird die Visualisierung der PV durch das Visualisieren von spezifischen Parasiten Proteinen ermöglicht. Durch die Technik der *P.berghei* Transfektion können so Fluoreszenz-markierte Proteine im Parasiten generiert werden, womit dann die PV verfolgt werden kann.

3.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Wissen über die Biologie der *Plasmodium* Leberstadien hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen und zur Identifizierung verschiedener Gene geführt, die für die Leberstadienentwicklung von Bedeutung sind. Von der Identifizierung und Charakterisierung dieser Gene, die essentiell für die prä-erythrozytäre Phase des Lebenszyklus sind, erhofft man sich interessante Ziele für die Medikamenten- und Vakzin-Entwicklung.

Die *UIS*-Gene *UIS3* und *UIS4* gehören zu diesen Genen mit einer essentiellen Funktion in der Leberphase und *uis3(-)* bzw. *uis4(-)* Parasiten zeigen einen Arrest während der Leberstadien-Entwicklung (Mueller et al., 2005a+b). Das *UIS3* und *UIS4* Protein lokalisiert in der PVM (Mikolajczak et al., 2007; Mueller et al., 2005b).

Die PVM stellt die Schnittstelle zwischen dem Parasiten und dem ihn umgebenden Wirtszytosplasma dar. Einerseits bietet diese Replikationsnische Schutz vor der Immunabwehr der Wirtszelle. Andererseits entbehren die Pathogene so aber direkten Zugriff auf Wirtsmetabolite und Nährstoffe. Daher rekrutieren manche Pathogene wie z.B. *Toxoplasma* oder Chlamydien Organellen der Wirtszelle zur Vakuolenmembran, um so an Nährstoffe zu gelangen ((Sinai et al., 2001; Heuer et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit sollte die PVM in der *P.berghei* Leberstadien-Entwicklung genauer untersucht werden und mögliche Interaktion mit Organellen der Wirtszelle analysiert werden. Dafür sollten *UIS3-* bzw. *UIS4mCherry* Fusionsproteine generiert werden, die die Verfolgung des Proteins in der Leberstadien-Entwicklung ermöglichen sollten. Da *UIS3* und *UIS4* in der PVM lokalisieren, sollten diese Fusionen als Marker für die PVM verwendet werden. Die PVM Bildung sowie mögliche Interaktionen mit Organellen/Strukturen der Wirtszelle wie ER, Mitochondrien, Golgi-Apparat, Lysosomen, Kernhülle und Mikrotubuli sollten mit Hilfe von *live cell imaging* Analysen untersucht werden.

Zusätzlich sollten Mutanten mit einem Defekt in der Leberstadien-Entwicklung wie *uis3(-)*, *uis4(-)* und *p36p(-)/p36(-)* hinsichtlich der Fähigkeit zur PVM-Bildung und Assoziation mit Wirts-Organellen analysiert werden.

4 Ergebnisse

Die experimentelle Genetik erlaubt nicht nur die Herstellung von Deletionsmutanten sondern auch die Visualisierung des nativen Proteins in der lebenden Zelle. Durch die *in-frame* Klonierung mit einem fluoreszierenden Protein kann das Protein sowohl zeitlich als auch örtlich verfolgt werden. In dieser Arbeit sollten die UIS3, UIS4 und UIS7 Proteine im Lebenszyklus visualisiert werden. Dazu wurden jeweils mCherry Fusionsproteine generiert. Diese bieten im Vergleich zu Antikörpern den Vorteil, daß dadurch die Proteine auch *live* verfolgt werden können. Für die mCherry Fusion wurden Konstrukte generiert in denen der Carboxy-Terminus der Proteine an das mCherry Protein fusioniert wurde. Die Fusionen wurden unter dem endogenen Promotor des jeweiligen Gens exprimiert, so daß die Fusionsproteine in den Stadien gebildet werden in denen auch die WT Proteine vorkommen.

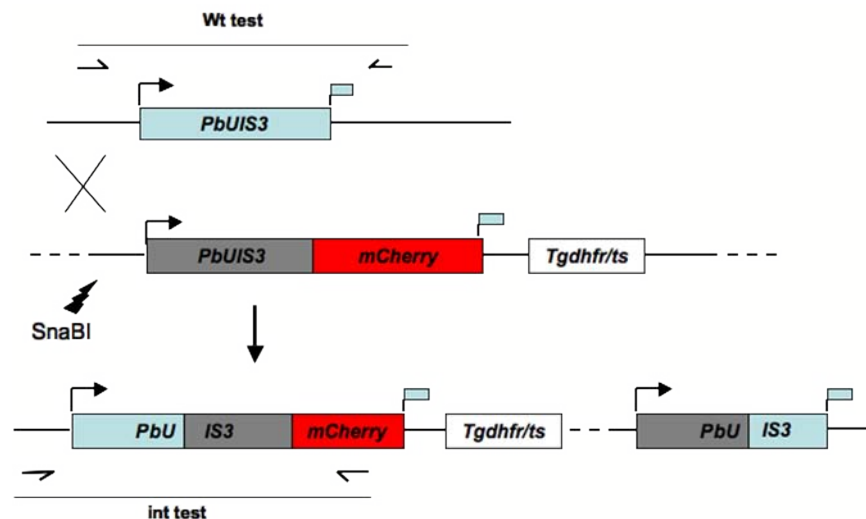


Abbildung 4-1 Schematische Darstellung der Integrationstrategie für die mCherry Fusion

Die generierten Konstrukte zur Visualisierung der UIS-Proteine sind am Beispiel der UIS3mCherry-Fusion dargestellt. Die UIS4mCherry und UIS7mCherry Fusionen wurden analog dazu hergestellt. Oben ist der Wildtyp-Locus des endogenen *UIS3*-Gens dargestellt. Der Pfeil zeigt das Startcodon und die Fahne das Stopcodon. Die kleinen Pfeile zeigen die spezifischen Oligonukleotidkombinationen zum Nachweis der Integration, Test1, sowie des Wildtyp-Locus an. Die spezifischen Kombinationen sind dabei:

UIS3: Integrations-Test1: (*mcherryRev/P.b.UIS3-test for 5*), WT-Test: (*UIS3for/UIS3rev*).

UIS7: Integrations-Test: (*mcherryRev/P.b.UIS7-test for*), WT-Test: (*UIS7testfor/UIS7testrev*)

UIS4: Integrations-Test1: (*mcherryRev/P.b.UIS4-test for*), WT-Test: (*UIS4for/UIS4rev*).

Für die Linearisierung des Targeting-Vektors wurden folgende Enzyme verwendet:

UIS3: *SnaBI*; UIS7: *NdeI*; UIS4: *HpaI*

4.1 *uis3mCherry* Parasiten

4.1.1 Transfektion in den *UIS3* Locus

Von der mit dem Restriktionsenzym *Sna*BI linearisierten Plasmid-DNA der *UIS3mCherry*-Minipräparation wurde 5 µg DNA durch Elektroporation in aufgereinigte Schizonten des *P.berghei* Wildtyp GFP-507 cl bzw. NK65 eingebracht. Der Transfektionsverlauf wurde in den folgenden Tagen durch Blutaussstriche kontrolliert. Die durch orale Pyrimethamin-Gabe im Trinkwasser selektierten rekombinanten Parasiten-Populationen waren zwischen Tag 8-12 zu sehen. Aus den Tieren wurde Blut entnommen und für die Anfertigung von Parasiten-Stabilaten, die Isolierung genomischer Parasiten DNA sowie einen Frischbluttransfer verwendet. Aus den Transfermäusen wurden ebenfalls Parasiten-Stabilate und genomische DNA isoliert. Bei der Genotypisierung der Parasiten wurde die isolierte gDNA sowohl mit der Integrations-spezifischen Primerkombination Test1 (*mcherryRev/P.b.UIS3-test for 5*) sowie der WT Primerkombination (*UIS3testfor5/UIS3rev3'*cloning) getestet. Die Integrations-spezifische Bande von 2,2kb sowie die WT-spezifische Bande von 2,3kb konnte in beiden parentalen Populationen nachgewiesen werden.

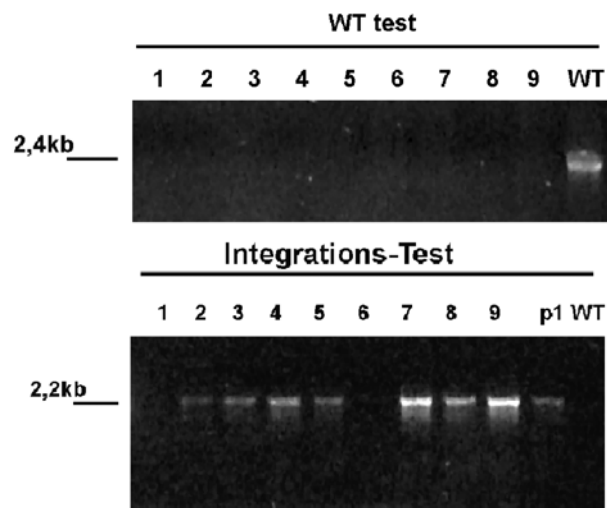


Abbildung 4-2 Integrations-spezifische PCR-Analyse der parentalen und klonalen *uis3mCherry* Populationen

Gezeigt ist die PCR-Analyse mit der Primerkombination Test1, die die erfolgreiche Integration am *UIS3*-Locus in der klonalen Parasiten Population zeigt. Die Abwesenheit eines WT-spezifischen-PCR-Fragments bestätigt den klonalen Ursprung der rekombinanten *uis3mCherry* Parasiten.

Mit der parentalen Population aus Maus # 1 ANKA-GFP wurde eine Klonierung durchgeführt, um auf eine klonale Population zu selektionieren, die nur aus UIS3mCherry Parasiten besteht. Die Genotypisierung der erhaltenen Parasiten-Populationen ergab, daß 7 klonale *uis3mCherry* Parasiten-Populationen generiert werden konnten.

4.1.2 *uis3mCherry* Parasiten können den Lebenszyklus durchlaufen

Um zu bestätigen, daß die generierten *uis3mCherry* Parasiten tatsächlich ein funktional aktives UIS3 Protein bilden können, wurde getestet ob sie den Lebenszyklus komplett durchlaufen können. Die Blutstadien Entwicklung verlief ohne Defekt, ebenso konnten Moskitoinfektionen erreicht werden (Tabelle 4-1). Die gebildeten Oozysten sowie Sporozoiten waren in Größe und Anzahl vergleichbar mit WT Parasiten. Ebenso konnten die Speicheldrüsen-Sporozoiten normale *gliding motility* zeigen (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4-1 Entwicklungsvermögen der *uis3mCherry* Parasiten *in vivo*

Parasitenpopulation	Mitteldarm- Infektivität	Speicheldrüsen- Sporozoiten/ Moskito	Anzahl der infizierten/ Anzahl der injizierten Tiere	Präpatenzzeit
<i>uis3mCherry</i> (Klon)	80%	7650 (+-3700)	5/5	Tag 3.9
WT	100%	10.000 (+-3000)	5/5	Tag 3

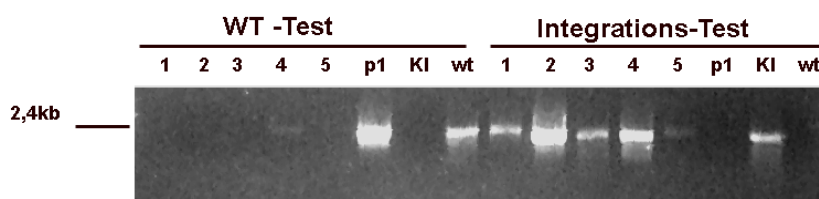


Abbildung 4-3 Genotypisierung der Sporozoiten-induzierten Populationen

Die PCR-Analyse mit der Integrations-spezifischen Primerkombination Test1 konnte bei allen 5 Sporozoiten-induzierten *uis3mCherry*-Populationen ein Fragment bestätigen. Mit der Wildtyp-Kontrolle läßt sich bei 4/5 dieser Populationen keine Bande amplifizieren, was für rein klonale Populationen spricht. Als Kontrolle dient WT gDNA sowie gDNA einer klonalen *uis3mCherry* Population.

Da *UIS3* essentiell für die Leberstadienentwicklung ist (Müller *et al.*, 2005) wurden Speicheldrüsen-Sporozoiten isoliert und je 10.000 Sporozoiten i.v. in 5 C57BL/6 Mäuse injiziert. Alle Mäuse waren an Tag 3 oder 4 Blutstadien-positiv, was in etwa dem Verlauf einer WT Infektion entspricht. Um zu testen, ob Revertanten, die durch Reversion des Integrationsereignisses entstehen können, auftraten, wurden die Parasiten aus den Sporozoiten-Infektionsversuchen genotypisiert. Es konnte gezeigt werden, daß alle Parasiten noch das UIS3mCherry Fusionsprotein enthalten.

Somit ist das UIS3mCherry Fusionsprotein funktionell und führt nicht zu einem Entwicklungsdefekt des Parasiten.

4.1.3 Phänotypische Analyse der *uis3mCherry* Parasiten

Bei einer erfolgreichen UIS3mCherry Fusion sollte das Fusionsprotein aufgrund der Aktivität des endogenen *UIS3* Promotors in Speicheldrüsen Sporozoiten sowie in den Leberstadien exprimiert sein. Um eine komplette Analyse durchzuführen wurden Mitteldarm-Oozysten und Mitteldarm- sowie Speicheldrüsen-Sporozoiten isoliert und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei konnte wie erwartet weder in Mitteldarm-Oozysten noch in Mitteldarm-Sporozoiten ein mCherry Signal nachgewiesen werden (Abbildung 4-4 A). In Speicheldrüsen-Sporozoiten jedoch war ein punktiertes mCherry Muster zu erkennen (Abbildung 4-4 B). Auffällig war, daß auch in kompletten Speicheldrüsen ein mCherry Signal in der Membran der Speicheldrüsen zu sehen war (Abbildung 4-4 C). Ein Teil der isolierten Sporozoiten wurde für eine Hepatozyten Infektion benutzt. Dabei wurden die entwickelnden Leberstadien zu verschiedenen Zeitpunkten (24h, 48h, 72h nach Infektion) gestoppt und anschließend mikroskopiert. Das beobachtete Signal des UIS3mCherry Fusionsproteins in der PVM ist übereinstimmend mit der erwarteten Lokalisation des UIS3 Proteins in der PVM in Leberstadien. Interessanterweise fiel bei frühen Leberstadien (24h nach Infektion) zusätzlich ein mCherry Signal als Ausläufer ins Wirtszytoplasma auf (Abbildung 4-4 D). Diese Strukturen konnten in späteren Stadien (48h) nicht mehr beobachtet werden; jedoch war die Intensität des mCherry Signals und somit der Expression des UIS3 Proteins in späten Leberstadien wesentlich stärker. Dies könnte auf eine wichtige Funktion des Proteins gerade in der späteren Leberstadienentwicklung hindeuten.

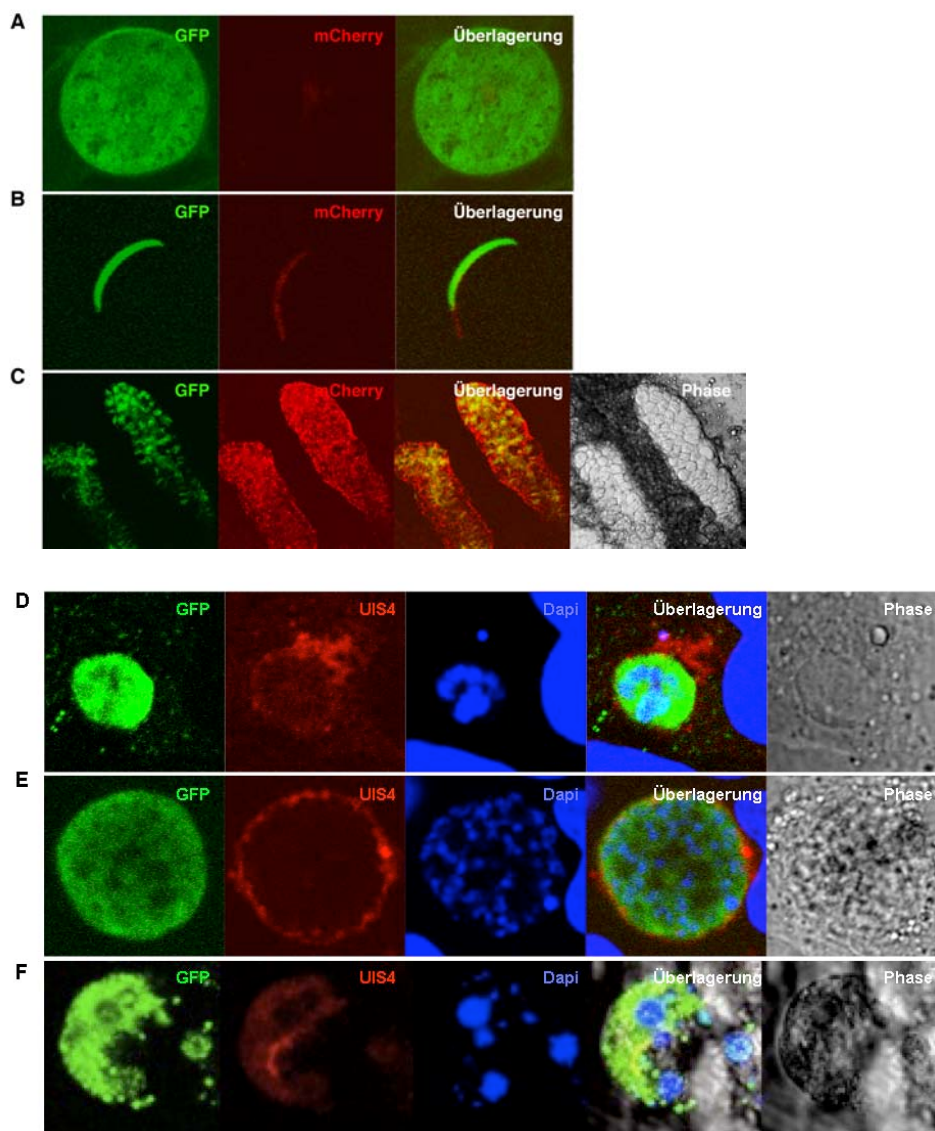


Abbildung 4-4 UIS3 wird in Speicheldrüsen-Sporozoiten und in Leberstadien exprimiert

Gezeigt sind Immunfluoreszenzen von *uis3mCherry* Mitteldarm-Oozysten und Speicheldrüsen-Sporozoiten sowie HuH7 Zellen, die mit 10.000 *uis3mCherry* Sporozoiten infiziert wurden. In den Moskito-Stadien wird UIS3mCherry in Speicheldrüsen-Sporozoiten (**B, C**) exprimiert. In der Leberphase kann UIS3 in der PVM in 24h (**D**) und 48h (**E**) Leberstadien detektiert werden. In Merosomen (**F**) ist nur wenig UIS3-Expression zu erkennen.

Zum Ende der Leberstadienentwicklung werden Merosomen gebildet. In diesen konnten nur noch wenig des UIS3mCherry Proteins gefunden werden, die mit Überresten der PVM assoziiert schienen. Der *UIS3* Promotor sollte in Blutstadien inaktiv sein und demzufolge auch kein UIS3mCherry Fusionsprotein gebildet werden. Um diese Hypothese zu testen wurde einer *uis3mCherry* Blutstadien-positiven Maus mittels Schwanzpunktion ein

Tropfen Blut entnommen und mit dem Fluoreszenzmikroskop auf mCherry Signale untersucht. In keinem der Parasiten konnte ein mCherry Signal nachgewiesen werden, was dafür spricht, daß das UIS3mCherry Fusionsprotein in Blutstadien nicht exprimiert wird (Daten nicht gezeigt).

4.1.4 Lokalisationsanalysen der UIS3mCherry-PVM

Die bisherigen mikroskopischen Aufnahmen mit fixierten Zellen gaben lediglich Aufschluß über die Lokalisation des UIS3 Proteins. Im Folgenden wurden *live cell imaging* Analysen verwendet um sowohl Aussagen über die Dynamik als auch die unterschiedliche Intensität des UIS3mCherry Fusionsproteins machen zu können.

Mit *uis3mCherry* Sporozoiten infizierte HuH7 Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit der dem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Biostation) analysiert. Zunächst wurden Langzeit Filme aufgenommen um zu untersuchen wie sich die UIS3mCherry Lokalisation im Laufe der Leberstadienentwicklung verändert. Dabei konnte beobachtet werden, daß das Fusionsprotein während der gesamten Leberstadienentwicklung (bis zur Schizonten-Ruptur) in der PVM lokalisiert ist. Es waren immer wieder Bereiche zu erkennen in denen auch der Vakuolenraum mCherry positiv war und eine Ankonzentrierung vorzuliegen schien (Abbildung 4-5 A). Diese Bereiche variierten, was auf eine leichte Dynamik in der PVM hindeutet. Interessanterweise, nahm diese Dynamik in späteren Stadien (48h) ab, die beobachteten Bereiche veränderten sich nicht und die PVM erschien als eher statische Struktur (Abbildung 4-5 B). Der Vergleich zwischen frühen und späteren Leberstadien zeigte deutlich, daß die Intensität des mCherry Signals in späteren Stadien deutlich zunahm, diese Beobachtung ist konsistent mit den bereits beschriebenen IFA Daten. Des weiteren konnten die schon in fixierten Proben beobachteten PVM-Ausläufer in frühen Stadien gezeigt werden. Diese Ausläufer erschienen als dynamische Strukturen, die Material ins Wirtszellzytoplasma abzugeben schienen (Abbildung 4-5 C).

Das UIS3mCherry Fusionsprotein kann demnach als Marker für die PVM genutzt werden. Durch Detektion des mCherry Signals kann die PVM bzw. deren Bildung im Lebenszyklus verfolgt werden. Hier konnten zum ersten Mal dynamische Strukturen der PVM beschrieben werden.

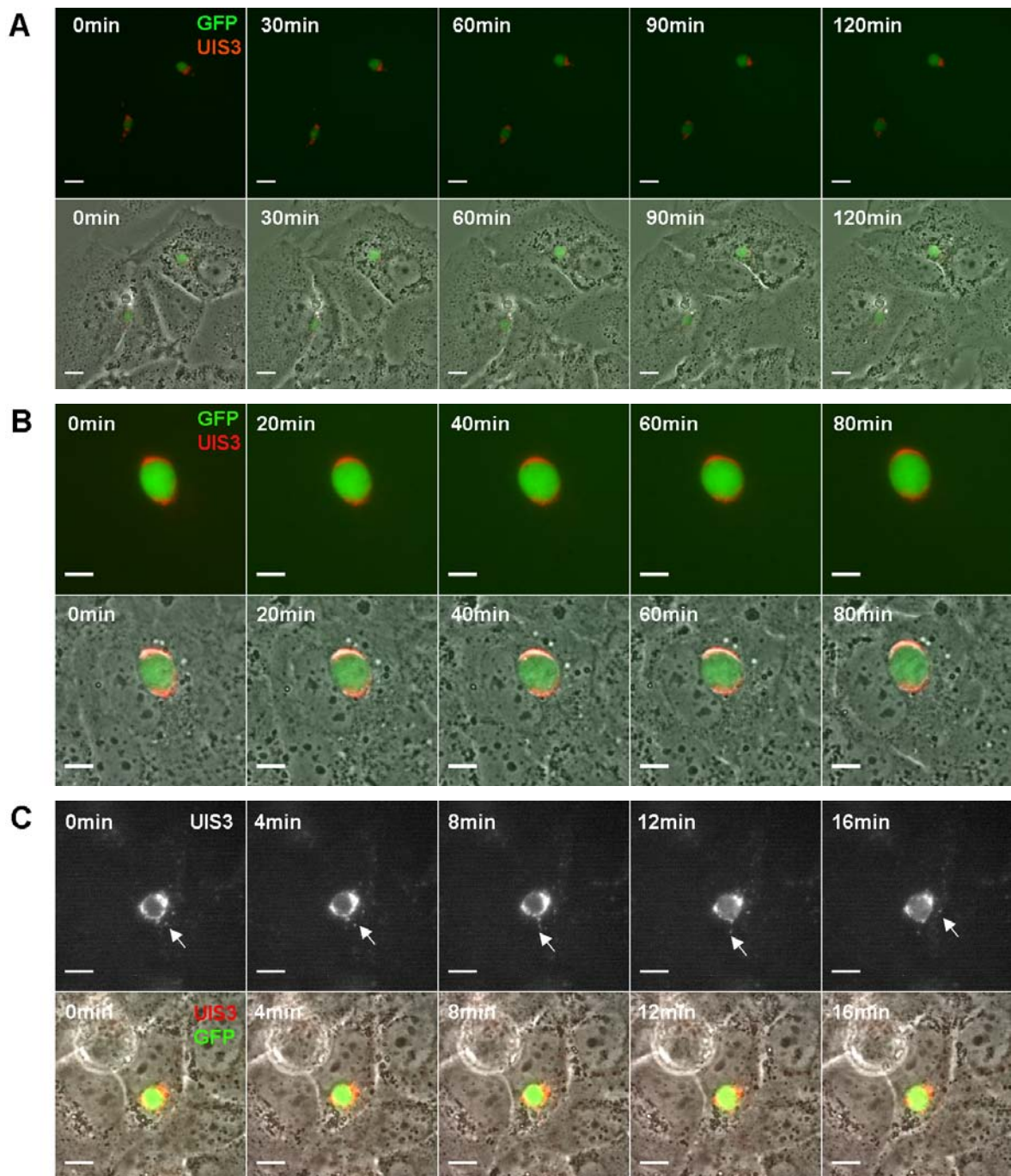


Abbildung 4-5 *uis3mCherry* Parasiten können als Marker für die Visualisierung der PVM verwendet werden

Gezeigt sind Videosequenzen von *uis3mCherry* Leberstadien in HuH7 Zellen, die mit dem inversen Fluoreszenz-Mikroskop generiert wurden. Die PVM kann mit Hilfe der UIS3mCherry Fusion in 21h **(A)** und 43h **(B)** Leberstadien *live* verfolgt werden. Die PVM ist eine dynamische Struktur in frühen Leberstadien (27h) **(C)**. Skalierungsbalken = 10µm.

4.2 *uis7mCherry* Parasiten

In Analogie zur *UIS3mCherry* Fusion wurde ein *UIS7mCherry*-Konstrukt mit dem Restriktionsenzym *NdeI* linearisiert und in *P.berghei* Wildtyp GFP-507 cl Parasiten eingebracht. Die Genotypisierung der rekombinanten Parasiten bestätigte die Integration in den *UIS7* Locus (Daten nicht gezeigt).

4.2.1 Phänotypische Analyse der *uis7mCherry* Parasiten

Zur Durchführung der phänotypischen Analyse der *uis7mCherry* Parasiten wurde ein Blutstabilat in eine NMRI Maus injiziert und die Parasiten Population bei erfolgreicher Exflagellation auf Moskitos transferiert. Die herauspräparierten Mitteldärme und Speicheldrüsen-Sporozoiten wurden mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei konnte in den untersuchten Sporozoiten kein mCherry Signal detektiert werden (Abbildung 4-6 A), was für eine erfolglose *UIS7mCherry* Fusion spricht, da *UIS7* aufgrund der Verwendung des endogenen *UIS7*-Promotors in Speicheldrüsen-Sporozoiten exprimiert sein sollte. Ein Teil der isolierten Speicheldrüsen-Sporozoiten wurde für eine Hepatozyten Infektion verwendet. Die infizierten Zellen wurden 24h, 48h und 72h später gestoppt und ebenfalls mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Auch hier konnte kein mCherry Signal detektiert werden (Abbildung 4-6 B).

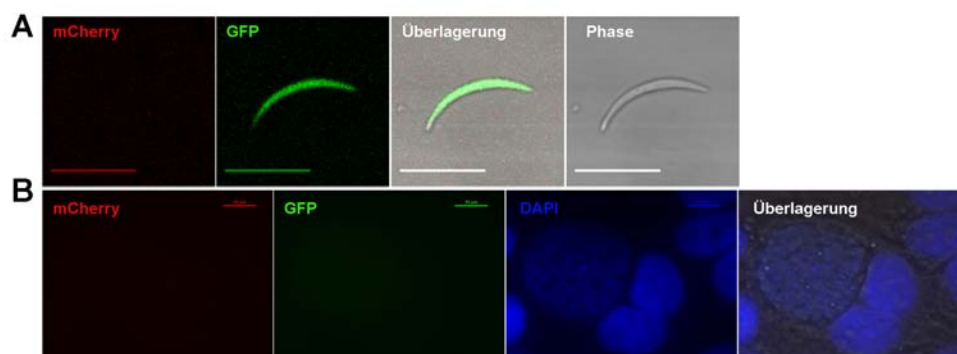


Abbildung 4-6 Immunfluoreszenzen in *uis7mCherry* Sporozoiten und Leberstadien

Immunfluoreszenzen von Speicheldrüsen-Sporozoiten (**A**) und 48h Leberstadien (**B**) von mit 10.000 *uis7mCherry* Speicheldrüsen-Sporozoiten infizierten HuH7 Zellen zeigen kein mCherry Signal. Skala = 10µm.

Entsprechend muß davon ausgegangen werden, daß die *UIS7mCherry* Fusion nicht funktioniert hat, da zumindest in einem der getesteten Stadien *UIS7mCherry* Fusions-Proteine zu finden sein sollten.

4.3 *uis4mCherry* Parasiten

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse mit den *uis3mCherry* Parasiten, sollte getestet werden, ob diese Daten mit einem *UIS4mCherry* Fusionsprotein reproduzierbar sind und dadurch möglicherweise eine stärkere Fluoreszenz erzielt werden kann.

4.3.1 Transfektion in den *UIS4* Locus

Von der mit dem Restriktionsenzym *HpaI* linearisierten Plasmid-DNA der *UIS4mCherry*-Minipräparation wurde 5 µg DNA durch Elektroporation in aufgereinigte Schizonten des *P.berghei* Wildtyp GFP-507 cl bzw. NK65 eingebracht. Der Transfektionsverlauf wurde in den folgenden Tagen durch Blutaussstriche kontrolliert. Die durch orale Pyrimethamin-Gabe im Trinkwasser selektionierten rekombinanten Parasiten-Populationen waren zwischen Tag 8-12 zu sehen. Das aus den Tieren entnommene Blut wurde für die Anfertigung von Parasiten-Stabilaten, die Isolierung genomischer Parasiten DNA sowie Frischbluttransfer verwendet.

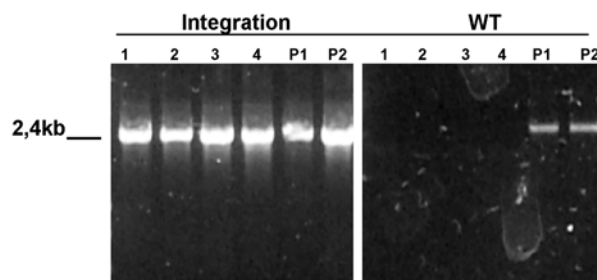


Abbildung 4-7 Integrationsspezifische PCR-Analyse der parentalen und klonalen *uis4mCherry* Populationen

Die PCR-Analyse zeigt, dass mit Primerkombination Test1, die erfolgreiche Integration am *UIS4*-Locus in Population 1+2 bestätigt werden kann. Die Abwesenheit eines WT-spezifischen-PCR-Fragments bestätigt den klonalen Ursprung der rekombinanten *uis4mCherry* Parasiten.

Aus den Transfermäusen wurden ebenfalls Parasiten-Stabilate und genomische DNA isoliert. Bei der Genotypisierung der Parasiten wurde die isolierte gDNA sowohl mit der Integrations-spezifischen Primerkombination Test1 (*mcherryRev/P.b.UIS4-test for*) sowie der WT Primerkombination (*UIS4testfor/UIS4rev3`UTR*) getestet. Eine Integrations-spezifische Bande von 2,4kb konnte in beiden Populationen nachgewiesen werden. Mit der parentalen Population aus Maus # 2 ANKA-GFP wurde eine Klonierung durchgeführt, um

auf eine klonale Population zu selektionieren, die nur aus UIS4mCherry fusionierten Parasiten besteht. Die Genotypisierung der erhaltenen Parasiten-Populationen ergab, daß 4 klonale *uis4mCherry* Parasiten-Populationen generiert werden konnten.

4.3.2 *uis4mCherry* Parasiten können den Lebenszyklus durchlaufen

Die Funktionalität der generierten *uis4mCherry* Parasiten wurde im Lebenszyklus getestet, da bekannt ist, daß *uis4(-)* Parasiten in der Leberphase arretieren (Mueller *et al.*, 2005b). Wie auch schon mit den *uis3mCherry* Parasiten verlief die Blutstadien Entwicklung sowie die Moskitoinfektion ohne Defekt (Tabelle 4-2). Die isolierten Speicheldrüsen-Sporozoiten konnten ebenfalls eine normale Gleitbewegung vollziehen (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4-2 Entwicklungsvermögen der *uis4mCherry* Parasiten *in vivo*

Parasitenpopulation	Mitteldarm- Infektivität	Speicheldrüsen- Sporozoiten/ Moskito	Anzahl der infizierten/ Anzahl der injizierten Tiere	Präpatenzzeit
<i>uis4mCherry</i> (Klon)	90%	10000 (+3500)	3/3	Tag 3.6
WT	100%	10.000 (+3000)	5/5	Tag 3

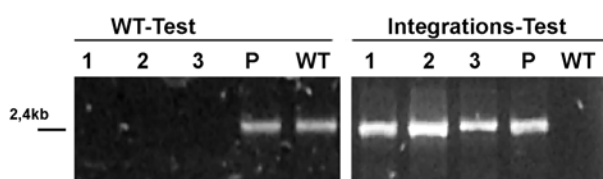


Abbildung 4-8 Genotypisierung der Sporozoiten-induzierten Populationen

Gezeigt ist ein Phaerogramm der Fragmente, die mit der Integrations-spezifischen Primerkombination Test1 bei allen Sporozoiten-induzierten *uis4mCherry*-Populationen amplifiziert werden konnten. Mit der Wildtyp-Kontrolle läßt sich bei diesen Populationen kein Signal erzeugen, was für eine rein klonale Population spricht. P= Parentale *uis4mCherry* Population dient als Kontrolle.

Die Parasiten konnten Oozysten sowie Sporozoiten bilden, die in Anzahl, Größe und Morphologie WT Parasiten entsprachen. Aufgrund der essentiellen Funktion des UIS4 Proteins in der Leberstadienentwicklung, wurden Speicheldrüsen-Sporozoiten isoliert und je 10.000 Sporozoiten i.v. in 3 C57BL/6 Mäuse injiziert. Alle Mäuse zeigten an Tag 3/4

Blutstadien-Parasiten, was dem Verlauf einer WT Infektion entspricht. Die Genotypisierung ergab die Anwesenheit des transgenen Locus und damit den Nachweis, daß das Fusionsprotein den Knockout komplementieren kann. Demzufolge führt eine UIS4mCherry Fusion nicht zu einem Defekt in der Entwicklung des Parasiten.

4.3.3 Phänotypische Analyse der *uis4mCherry* Parasiten

In Analogie zu den Ergebnissen mit der *uis3mCherry* Mutante sollte ein mCherry Signal in Speicheldrüsen Sporozoiten sowie in den Leberstadien detektiert werden. Dafür wurden Mitteldarm-Oozysten und Mitteldarm- sowie Speicheldrüsen-Sporozoiten isoliert und mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. In Mitteldarm-Oozysten und Mitteldarm-Sporozoiten konnte kein mCherry Signal nachgewiesen werden wohingegen in Speicheldrüsen-Sporozoiten ein ähnlich punktiertes mCherry Muster wie in der UIS3mCherry Fusion zu erkennen war (Abbildung 4-9 A,B). Die Analyse der Leberstadienentwicklung wurde durch eine Infektion von HuH7 Zellen mit isolierten Sporozoiten durchgeführt wobei die Entwicklung nach verschiedenen Zeitpunkten (24h, 48h, 72h nach Infektion) gestoppt und nachfolgend mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop studiert wurde.

Das UIS4mCherry Fusionsprotein konnte sowohl in frühen als auch in späten Leberstadien in der PVM detektiert werden. Das bestätigt die bereits durch Antikörper gezeigte Lokalisation (Mueller *et al.*, 2005b). Zusätzlich konnten auch hier ausschließlich in frühen Leberstadien (24h nach Infektion) Ausläuferstrukturen ins Wirtszytoplasma gezeigt werden (Abbildung 4-9 C). Die Intensität des mCherry Signals und somit der Expression des UIS4 Proteins war in späten Leberstadien (48h) erneut deutlich stärker. Bei den späteren Stadien konnten häufig Strukturen im Inneren des Parasiten als mCherry-positiv erkannt werden (Abbildung 4-9 E). Diese Strukturen erschienen als dichtes Netzwerk. Gleichmaßen nahm die Intensität der eigentlichen PVM-Färbung (den Parasiten umgebend) zum Ende der Entwicklung ab. Teilweise war am Ende der Leberstadien-Entwicklung (60h-70h) zu beobachten, daß der Wirtszellkern von einer mCherry-positiven PVM umschlossen wurde (Abbildung 4-9 F). Möglicherweise wird damit die Merosomen-Bildung initiiert. Abschließend konnte nur noch wenig UIS4mCherry Signal in den Merosomen (72h) gezeigt werden, was möglicherweise Reste, die mit Überresten der PVM assoziiert sind, darstellt. Es wird erwartet, daß das UIS4 Protein aufgrund der Inaktivität des Promotors nicht in Blutstadien gebildet wird.

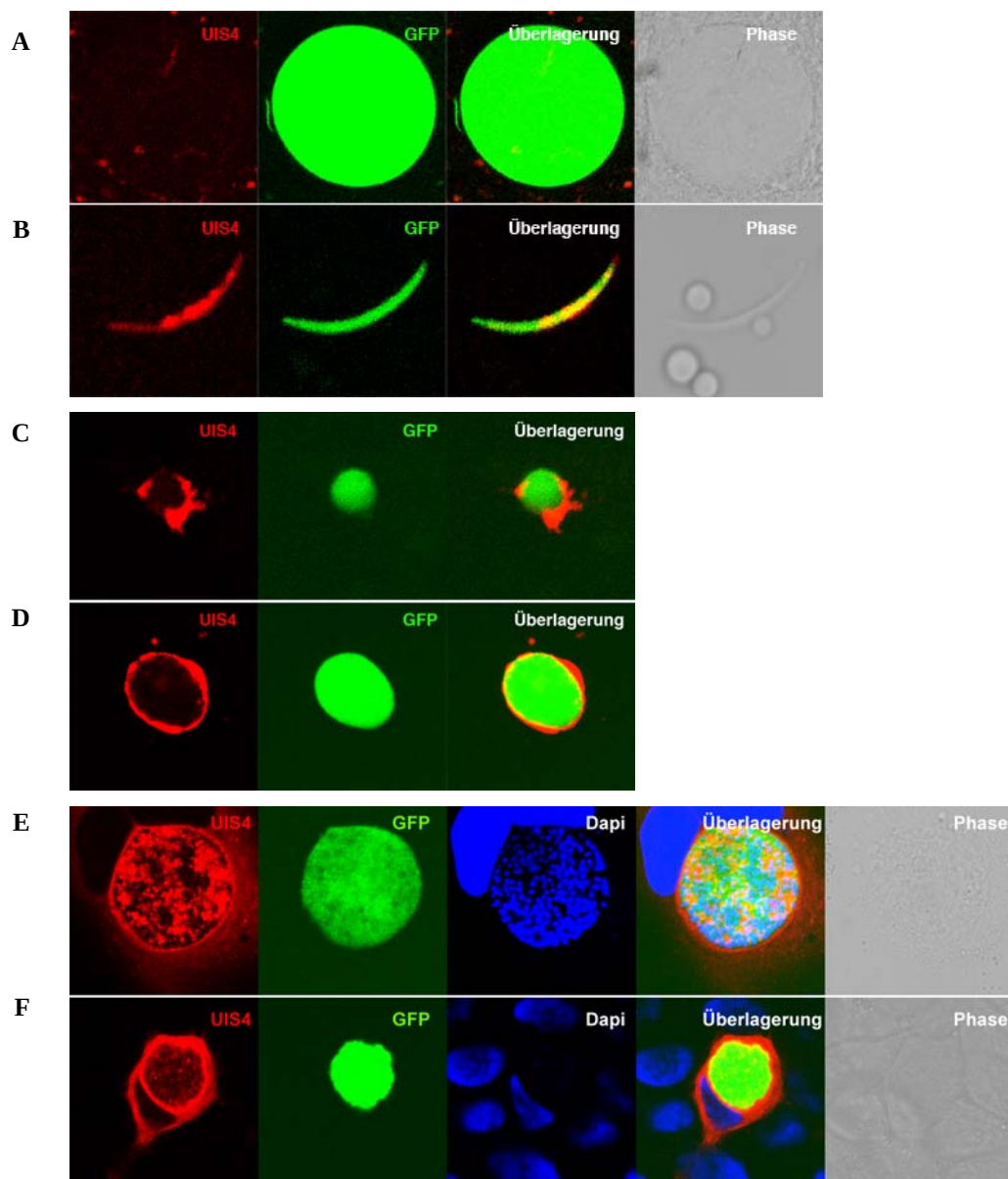


Abbildung 4-9 Die Expression des UIS4 Proteins kann in Speicheldrüsen-Sporozoiten und in Leberstadien (24-72h) gezeigt werden

Immunfluoreszenzen von *uis4mCherry* Mitteldarm-Oozysten und Speicheldrüsen-Sporozoiten sowie HuH7 Zellen, die mit 10.000 *uis4mCherry* Sporozoiten infiziert wurden. UIS4mCherry wird in den Moskito-Stadien in Speicheldrüsen-Sporozoiten (**B**) exprimiert. In der Leberphase kann UIS4 in der PVM in 24h (**C**) und 48h (**D**) Leberstadien detektiert werden. Am Ende der Leberstadien-Entwicklung (70h) ist ein UIS4mCherry Netzwerk im Inneren des Parasiten (**E**) sowie eine Umrundung des Wirtszellkerns durch die PVM (**F**) zu erkennen.

Zur Bestätigung dieser Vermutung wurde ein Tropfen Blut einer *uis4mCherry* Blutstadien-positiven Maus entnommen und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Es konnte kein mCherry Signal detektiert werden (nicht gezeigt). Damit wurde bestätigt, daß das UIS4 Protein nicht in Blutstadien gebildet wird.

4.3.4 Dynamik der UIS4mCherry-PVM

Aufgrund der Lokalisation des UIS4 Proteins in der PVM, können die *uis4mCherry* Parasiten für die Analyse der PVM verwendet werden. Die UIS4mCherry-positive PVM sollte im Folgenden genauer betrachtet werden.

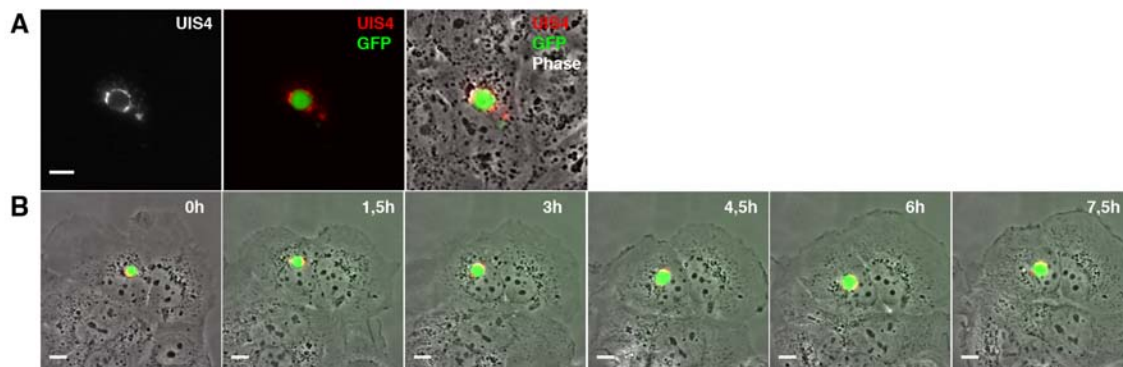


Abbildung 4-10 Die PVM kann in *uis4mCherry* Parasiten verfolgt werden

Videosequenzen von Fluoreszenz-Mikroskopischen Aufnahmen von frühen *uis4mCherry* Leberstadien in HuH7 Zellen. Die PVM kann mit Hilfe der UIS4 Fusion in 24h Stadien visualisiert werden (A). Die Parasiten können über einen Zeitraum von über 7h (21h-28h Leberstadienentwicklung) hinsichtlich der PVM Ausbildung verfolgt werden (B). Die gezeigten Daten sind repräsentative Sequenzen von 60 Experimenten. Skala = 10µm.

Dafür wurden *live cell imaging* Analysen von mit *uis4mCherry* infizierten HuH7 Zellen durchgeführt und die verschiedenen Entwicklungsstadien hinsichtlich der PVM Bildung sowie Dynamik mit dem inversen Fluoreszenz-Mikroskop bzw. dem *Spinning Disk* Mikroskop studiert.

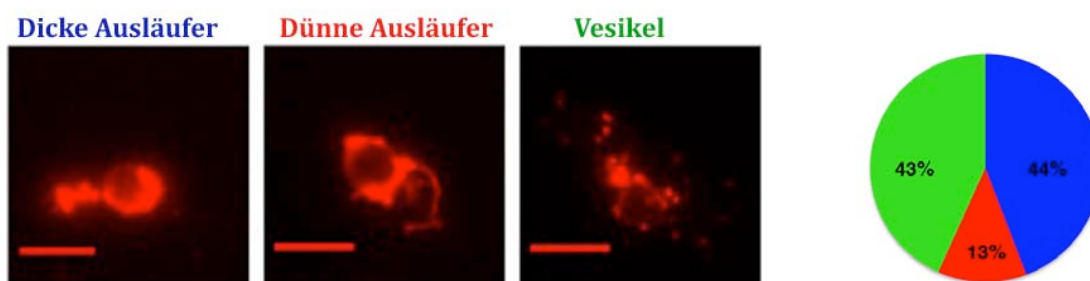


Abbildung 4-11 Die PVM-Ausläufer können als 3 Subtypen beschrieben werden

Immunfluoreszenzen von 24h *uis4mCherry* Leberstadien mit den unterschiedlichen PVM-Ausläufern, die mit Hilfe der inversen Fluoreszenz-Mikroskopie generiert wurden. Im Kuchendiagramm sind die relativen Häufigkeiten der Ausläufer-Strukturen dargestellt. Die dicken Ausläufer und Vesikel treten am häufigsten auf. Skalierungsbalken = 10µm.

Frühe Leberstadienentwicklung (20-24h)

Zunächst wurden Langzeit-Aufnahmen von frühen Stadien aufgezeichnet. Dabei konnten Parasiten in einem Zeitraum von über 7 Stunden (21h-29h ihrer Leberstadienentwicklung) verfolgt werden (Abbildung 4-10). Die schon in fixierten Proben beobachteten Ausläufer der frühen Leberstadien (20h-24h) zeigten sich als dynamische Strukturen die teilweise weit ins Wirtszellzytoplasma hineinragten (Abbildung 4-10). Des weiteren konnte zwischen drei verschiedenen Strukturen unterschieden werden, die sich in der Häufigkeit ihres Auftretens unterschieden (Abbildung 4-11).

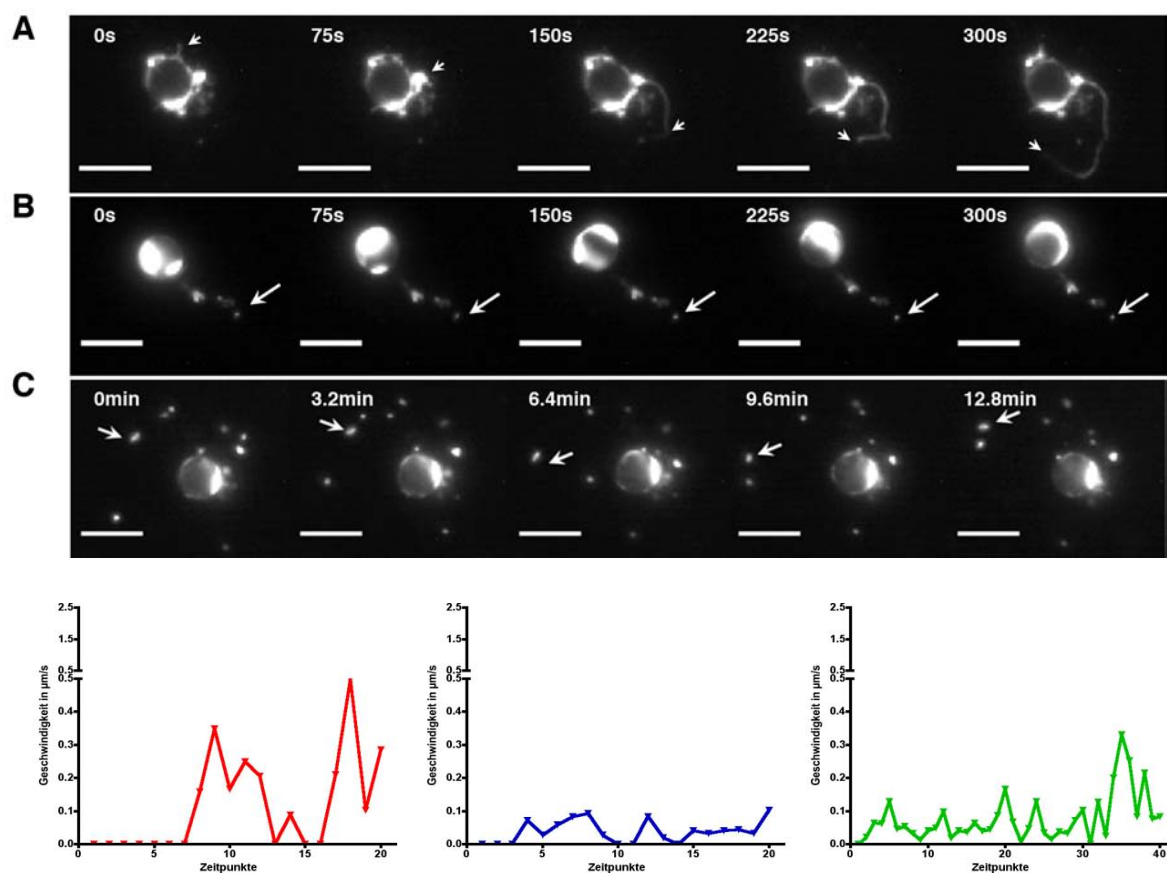


Abbildung 4-12 Die Geschwindigkeit der dünnen UIS4mCherry-PVM-Ausläufer deutet auf eine aktive Bewegung hin

Videosequenzen von *uis4mCherry* Parasiten nach 24-stündiger Entwicklung in HuH7 Zellen sowie die graphische Darstellung der Geschwindigkeiten der Ausläufer-Strukturen. Die dünnen Ausläufer (A) erreichten die größte Geschwindigkeit (rot) wohingegen die dicken Ausläufer (B) bzw. die Vesikel (C) nur geringe Geschwindigkeiten aufweisen konnten (blau bzw. grün). Skalierungsbalken = $10\mu\text{m}$.

Am häufigsten traten dicke Ausläufer (44%) sowie Vesikel-artige Strukturen (43%), die ins Wirtszytoplasma abgegeben wurden, auf. Seltener waren die dynamischeren dünnen Ausläufer zu sehen (13%). Wie schon in fixierten Proben angedeutet konnten diese Ausläufer in späteren Stadien nicht beobachtet werden.

Um die Dynamik der PVM im Detail zu analysieren wurden im Folgenden kürzere Filme mit hoher Bild-Rate aufgenommen. Hier wurde ersichtlich, daß sich die ausgebildeten Strukturen neu ausbilden oder auch abbauen können. Die Dynamik und somit Geschwindigkeit dieser Ausläufer-Strukturen unterschied sich stark voneinander. Die dünnen Ausläufer erreichten die höchsten Geschwindigkeiten von über $0,5\mu\text{m}/\text{sec}$ was auf eine aktive Bewegung hindeutet (Abbildung 4-12 A). Die dicken Ausläufer hatten eine max. Geschwindigkeit von $0,1\mu\text{m}/\text{sec}$. Die Vesikel-Strukturen erreichten zum Teil Geschwindigkeiten von $0,3\mu\text{m}/\text{sec}$ (Abbildung 4-12 C), die durchschnittliche Geschwindigkeit war allerdings deutlich niedriger ($0,1\mu\text{m}/\text{sec}$) was eine passive Bewegung vermuten läßt

Späte Leberstadienentwicklung (48h)

Bei der Analyse der späten Leberstadien-Entwicklung fiel auf, daß der Parasit keine PVM-Ausläufer mehr ausbildet. Des weiteren konnte die PVM als vergleichsweise statische Struktur beschrieben werden, die nicht mit der dynamischen Struktur der frühen Stadien verglichen werden kann. In Analogie zu den IFA-Daten (Abbildung 4-9) konnte gezeigt werden, daß die Intensität des mCherry Signals in 48h Stadien deutlich anstieg. Dabei bildete der Parasit teilweise mCherry-positive Blasen in der PVM aus (Abbildung 4-13 B). Die Videoaufzeichnungen ergaben, dass eine Verschiebung dieser Bereiche möglich war, allerdings nur über einen langen Zeitraum (von einigen Stunden). Die Strukturen im Inneren des Parasiten (UIS4mCherry-Netzwerk) (Abbildung 4-13 C) konnten als beweglich beschrieben werden. Hier schien ein reger Stoffaustausch stattzufinden.

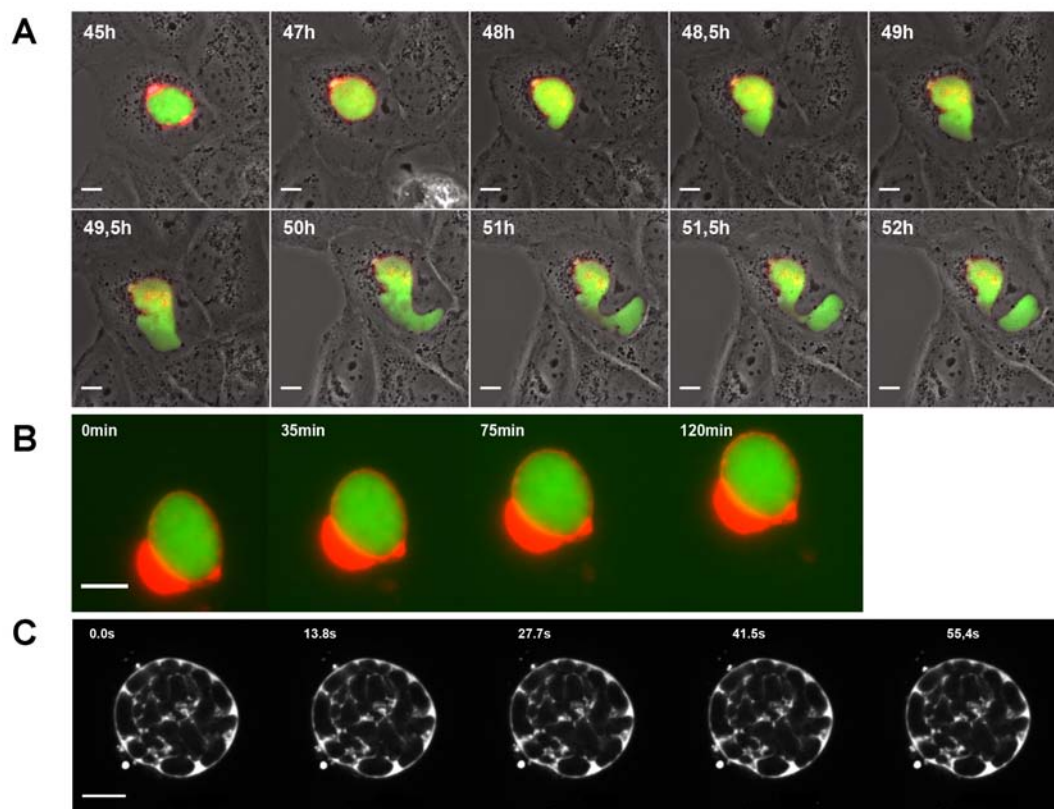


Abbildung 4-13 Die PVM ist in der späten Leberstadien-Entwicklung eine statische Struktur

Videsequenzen von *uis4mCherry* Leberstadien (48h) in HuH7 Zellen. Die PVM kann über mehrere Stunden verfolgt werden (A). Ein langsames Abschnüren eines Teils des Parasiten über einen Zeitraum von 3 Stunden konnte dargestellt werden. Die PVM ist eine statische Struktur mit einem UIS4mCherry gefüllten Vakuolenraum (B). Das UIS4mCherry Netzwerk im Inneren des Parasiten zeigt eine geringe Dynamik (C). Skalierungsbalken = 10µm.

Ende der Leberstadienentwicklung (72h)

In den Videsequenzen der *uis4mCherry*-Merosomen konnten nur noch Rückstände eines mCherry Signals detektiert werden. Diese repräsentierten vermutlich PVM-Reste. Demnach schienen die Merosomen nicht von einer mCherry-positiven PVM sondern möglicherweise von der Wirtsmembran umgeben zu sein (Abbildung 4-14) .

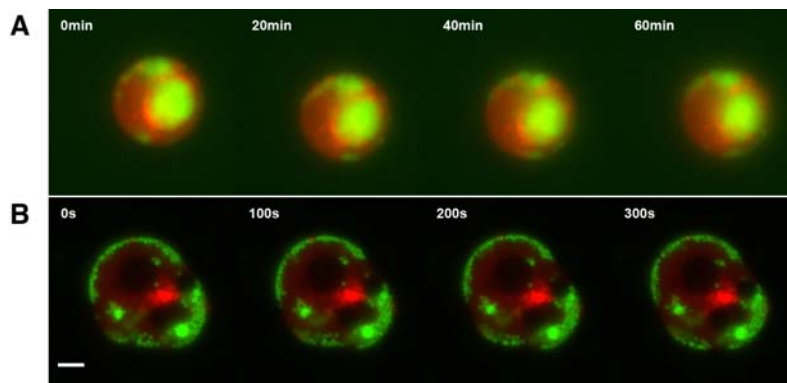


Abbildung 4-14 Die Merosomen werden nicht von der PVM umgeben

Videsequenzen von *uis4mCherry* Merosomen (72h) in HuH7 Zellen zeigen, dass ausschließlich PVM-Reste vorhanden sind, mit denen UIS4mCherry assoziiert vorliegt (A,B). Skala = 10µm.

4.3.5 PVM Dynamik in verschiedenen Zelllinien

Der Nager-Erreger *P.berghei* kann sich im Gegensatz zu anderen *Plasmodien*-Arten (*P.falciparum* oder *P.yoelii*) *in vitro* auch in anderen Wirtszell-Kulturen entwickeln und ist nicht auf Hepatozyten angewiesen. Beispielsweise können EEFs in HFF (*human foreskin fibroblasts*) oder HeLa Zellen ausgebildet werden (Calvo-Calle *et al.*, 1994). Die PVM-Ausläufer wurden bisher nur in infizierten HuH7 Zellen beobachtet. Es stellt sich daher die Frage, ob diese Strukturen tatsächlich wirtszell-spezifisch sind oder auch in anderen Zelllinien in *in vitro* Kulturen ausgebildet werden könnten. Im folgenden wurden verschiedene humane und murine Zelllinien mit *uis4mCherry* und *uis3mCherry* Sporozoiten infiziert und mit dem inversen Fluoreszenz-Mikroskop bzw. dem Spinning Disk Mikroskop nach 24 bzw. 48-stündiger Entwicklung untersucht (Abbildung 4-15).

4.3.5.1 Frühe Leberstadien-Entwicklung

Maus-Hepatoma Zelllinie

Die Entwicklung in der murinen Hepatoma-Linie Hepa1-6 war wie erwartet nicht von der Entwicklung in HuH7 Zellen abzugrenzen. Auch in dieser Zelllinie bildet der Parasit dynamische PVM-Ausläufer aus, die sich in die drei bereits beschriebenen Untergruppen einteilen lassen (Abbildung 4-15).

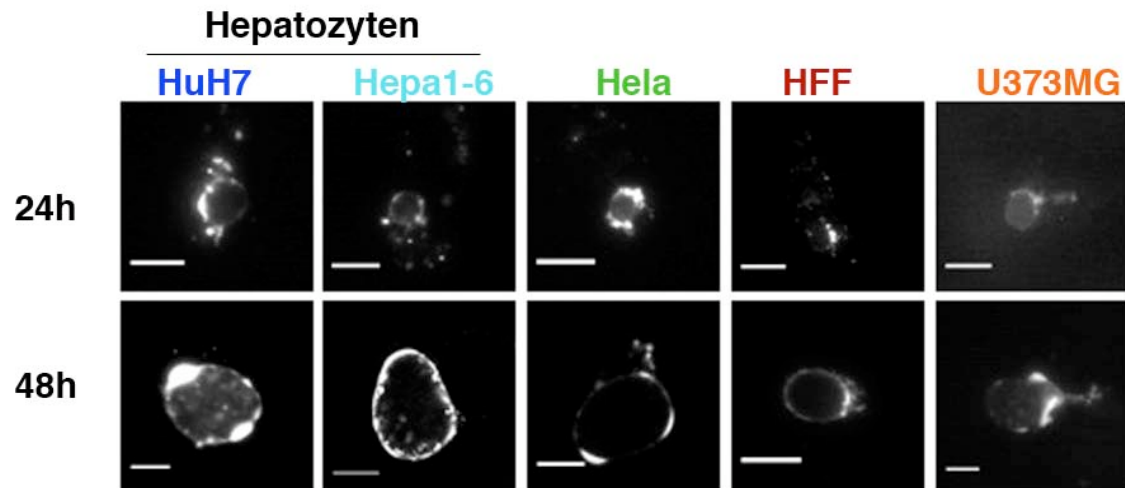


Abbildung 4-15 Die PVM von *uis4mCherry* Parasiten in verschiedenen Zelllinien

Immunfluoreszenzen von mit *uis4mCherry* Sporozoiten infizierten Zellen zeigen die Ausbildung der PVM in verschiedenen Zelllinien nach 24h bzw. 48h. Die PVM-Ausläufer können nach 24h in allen getesteten Zelllinien ausgebildet werden. Allerdings konnten in HFF nur Vesikel-Strukturen und in U373MG Zellen (infiziert mit *uis3mCherry* Parasiten) hauptsächlich dicke Ausläufer erfaßt werden. Nach 48h kann die PVM ebenfalls in allen Zelllinien ausgebildet werden, wobei die PVM-Ausläufer in HeLa, HFF und U373MG Zellen noch immer zu sehen sind. Skalierungsbalken = 10µm.

Humane Karzinoma Zelllinie

Die Entwicklung zu EEFs in HeLa Zellen verlief ebenfalls vergleichbar zu Hepatoma Zellen. Es konnte weder ein Unterschied in der Größe der Parasiten noch in der PVM Ausbildung festgestellt werden. Zwar konnten die Parasiten in HeLa Zellen alle drei PVM-Ausläufer Strukturen ausbilden, jedoch mit einer abweichenden Häufigkeit.

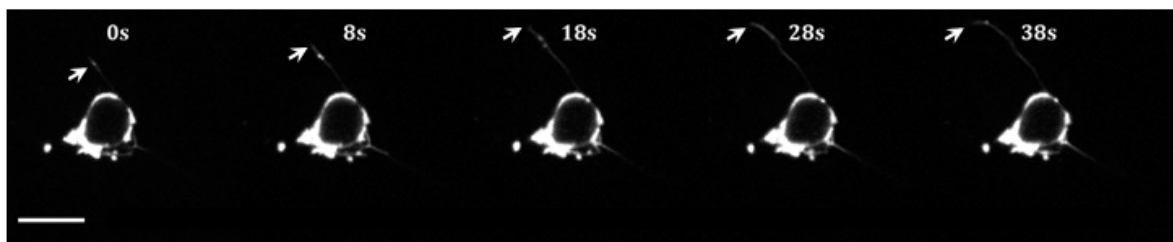


Abbildung 4-16 Die dünnen PVM-Ausläufer können in HeLa Zellen weit ins Wirtszytoplasma hineinreichen.

Videosequenzen von 24h-*uis4mCherry* Parasiten wurden mit dem *Spinning Disk* Mikroskop generiert und zeigen die PVM-Dynamik der dünnen Ausläufer in HeLa Zellen. Die Ausläufer können weit ins Zytoplasma hineinreichen. Skalierungsbalken = 10µm.

Eine Quantifizierung der beobachteten Ausläufer-Typen ergab, dass der Großteil der Parasiten dicke Ausläufer oder Vesikel ausbildet und ca. 20% die dynamischen dünnen Strukturen (Abbildung 4-17). Dünne Ausläufer waren dabei zahlreicher als in HuH7 Zellen (12%, Abbildung 4-11) und konnten die gemessenen Geschwindigkeiten in HuH7 Zellen außerdem signifikant übertreffen. Die max. Geschwindigkeit von $2,2\mu\text{m/s}$ implizierte eine aktive Bewegung, die vom Parasiten ausgeht hin (Abbildung 4-17). Die dünnen Ausläufer konnten dabei teilweise weit ins Wirtszytosplasma hineinreichen (Abbildung 4-16).

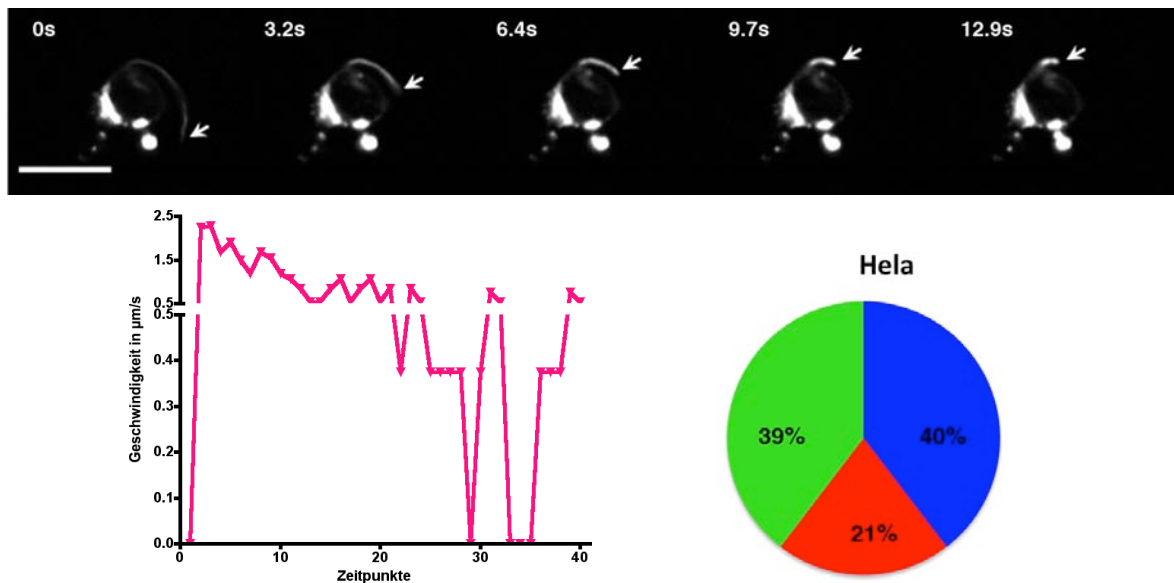


Abbildung 4-17 Die Geschwindigkeit der dünnen PVM-Ausläufer ist in HeLa Zellen besonders hoch.

Videosequenzen von 24h-*uis4mCherry* Parasiten, die mit dem *Spinning Disk* Mikroskop generiert wurden zeigen die PVM-Dynamik der dünnen Ausläufer in HeLa Zellen. Die Geschwindigkeit dieser Ausläufer-Struktur ist graphisch dargestellt. Im Kuchendiagramm ist die Häufigkeit der Ausläufer-Strukturen dargestellt. Die Verteilung der dicken Ausläufer (blau), Vesikel (grün) und dünnen Ausläufer (rot) ist mit der in Hepatoma Zellen vergleichbar. Jedoch ist der Anteil der dünnen Ausläufer deutlich erhöht (siehe Abb.3-12). Skalierungsbalken = $10\mu\text{m}$.

Humane Fibroblasten Zelllinie

Auch in HFF Zellen konnten 24h EEFs gebildet werden. Im Vergleich zu HuH7 Zellen erreichten die Parasiten zwar eine ähnliche Größe, die PVM Dynamik war aber deutlich zu unterscheiden. Während in Hepatozyten alle drei Arten der Ausläufer-Strukturen zu finden waren, konnten in HFF Zellen nur die Vesikel-artigen Strukturen und teilweise dicke Ausläufer gezeigt werden (Abbildung 4-15). Die Intensität der PVM Färbung in HFF

Zellen war wesentlich geringer, was für eine verminderte Expression des UIS4 Proteins oder eine schwächere Ausbildung der PVM sprechen könnte.

Glioblastom Zelllinie

Für die Infektion der U373MG Zellen wurden im Gegensatz zu den anderen getesteten Zelllinien *uis3mCherry* Sporozoiten verwendet. Auch hier konnten sich 24h EEf entwickeln obwohl diese Zelllinie als ungewöhnlich für eine *Plasmodium* Entwicklung angesehen werden kann. Diese Beobachtung bestätigt, dass sich *P.berghei* in sehr vielen unterschiedlichen Wirtszellen *in vitro* erfolgreich entwickeln kann. Auch konnten Ausläufer Strukturen gebildet werden, allerdings beschränkte sich die Bildung hauptsächlich auf die dicken Strukturen (Abbildung 4-15). Durch die Verwendung der *uis3mCherry* Parasiten bei denen auch bei einer Hepatozyten Infektion kaum dünne Ausläufer gezeigt werden konnten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass *uis4mCherry* Parasiten auch in den U373MG Zellen dünne Ausläufer induzieren könnten. Die PVM Färbung zeigte keinen Unterschied zu Hepatozyten Infektionen was für eine funktionale PVM Bildung spricht (Abbildung 4-18A).

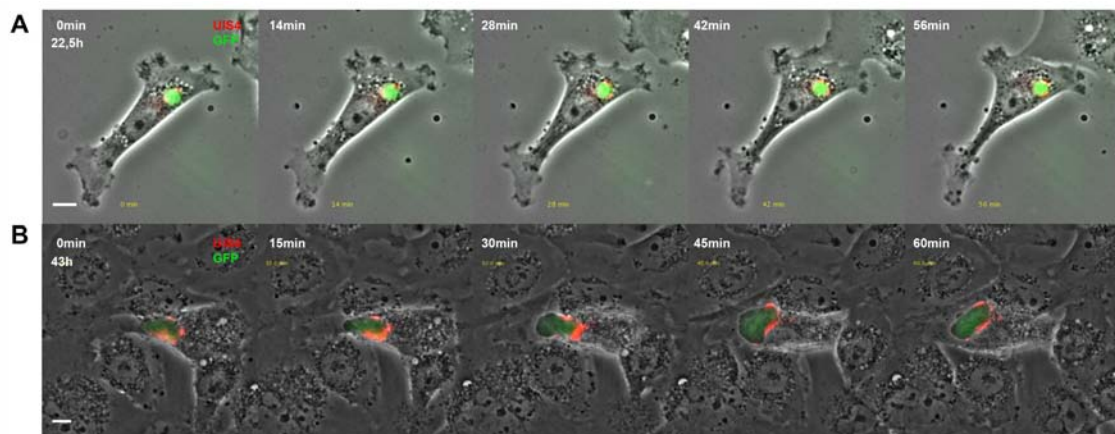


Abbildung 4-18 Die PVM kann auch in U373MG Zellen ausgebildet werden

Videosequenzen von Fluoreszenz-Mikroskopie-Aufnahmen von mit *uis3mCherry* Sporozoiten infizierten U373MG Zellen zeigen die PVM-Ausbildung nach 24- (A) bzw. 43-stündiger (B) Entwicklung. Die PVM kann in U373MG Zellen nach 24h vergleichbar zu Hepatoma Zellen ausgebildet werden. Nach 48h sind allerdings nach wie vor PVM-Ausläufer zu erkennen. Skalierungsbalken = 10µm.

4.3.5.2 Späte Leberstadien-Entwicklung

Maus Hepatoma Zelllinie

Übereinstimmend mit der Ausprägung der PVM Dynamik in der frühen Leberstadienentwicklung und der Ähnlichkeit der beiden Zelllinien konnte bei späten Leberstadien kein signifikanter Unterschied zu HuH7 Zellen erfaßt werden. Die dynamischen Ausläufer wurden nicht mehr ausgebildet und die Intensität des UIS4mCherry Signals nahm deutlich zu (Abbildung 4-15).

Humane Karzinoma Zelllinie

Die Entwicklung der Parasiten zu späteren EEFs in HeLa Zellen zeigte deutliche Unterschiede zur Hepatozyten Entwicklung. Die Parasiten waren kleiner aber zeigten keinen morphologischen Defekt. Des weiteren konnten abweichend zur Reifung in Hepatoma Zellen, noch immer PVM-Ausläufer beobachtet werden (Abbildung 4-15). Diese erschienen dabei nicht als einzelne dünne Ausläufer sondern als eher dicke Ausläufer, die teilweise mehrfach nebeneinander auftraten. Diese Ausläufer zeigten weiterhin Bewegung, die aber wesentlich geringer als die Geschwindigkeit in der frühen Parasiten Entwicklung war.

Humane Fibroblasten Zelllinie

Die Entwicklung zu 48h EEFs war in HFF Zellen deutlich beeinträchtigt. Es konnten sich nur vereinzelte Parasiten so weit entwickeln. Darüber hinaus waren diese kleiner als WT Parasiten zu diesem Zeitpunkt (Abbildung 4-15). Diese Ergebnisse lassen auf einen Entwicklungsdefekt in HFF Zellen schließen. Wie zuvor in HeLa Zellen beschrieben, konnten auch in diesem späten Entwicklungsstadium neben der üblichen PVM Färbung auch PVM-Ausläufer erfaßt werden, welche jedoch keine Dynamik zeigten. Demzufolge wäre es möglich, dass sich die Parasiten noch in einer früheren Entwicklungsphase befanden und so länger auf die Ausbildung der Strukturen angewiesen waren.

Glioblastom Zelllinie

Ähnlich zu den Ergebnissen in HFF Zellen zeigte die Entwicklung in U373MG Zellen einen deutlichen Defekt (Abbildung 4-15). Auch hier konnten nur wenige Parasiten zu späten EEFs heranwachsen, die in ihrer Größe stark von WT Werten abwichen.

Die Ausbildung der Ausläufer war noch ausgeprägter als in HFF Zellen. Das spricht dafür, dass die Parasiten in dieser Wirtszelle auch nach über 40-stündiger Infektion in einem sehr frühen Entwicklungszustand verweilen in dem sie Strukturen ausbilden, die die frühe Entwicklung maßgeblich bestimmen (Abbildung 4-18 B).

4.3.6 Parasiten Lokalisation in der Wirtszelle

Die Entwicklung der Parasiten findet in den Leberzellen in direkter Nähe zum Nukleus statt. Dabei kann man sogar von einer regelrechten Anlagerung sprechen (Bano *et al.*, 2007). Um zu testen ob diese Anlagerung Wirtszell-spezifisch ist wurden 24h EEFs in verschiedenen Zelllinien qualitativ sowie quantitativ ausgewertet. Parasiten, die eng an den Zellkern angelagert waren wurden als „Zellkern-assoziiert“ gezählt, solche bei denen kein direkter Kontakt zum Kern bestand als „entfernt vom Zellkern“ (Abbildung 4-19).

Dabei fiel auf, dass sowohl in humanen (HuH7) als auch in murinen (Hepa1-6) Hepatoma Zellen ca. 90% der Parasiten als Zellkern-assoziiert vorlagen. Die restlichen Parasiten wiesen zwar keine enge Anlagerung an den Kern vor, waren jedoch in unmittelbarer Nähe zu finden (Abstand ca. 2-3 μm). Somit scheint die Kern-Assoziation mit der Permissivität für die *Plasmodium* EEF-Entwicklung zu korrelieren.

Diese Parasiten Lokalisation unterschied sich stark von der Lokalisation in HeLa und HFF Zellen. In diesen Zellen lagerte sich nur etwa die Hälfte der ausgewerteten Parasiten direkt am Nukleus an (Abbildung 4-19). Die andere Hälfte lokalisierte zum Teil in weit entfernt liegenden Bereichen des Wirtszytoplasmas. Noch deutlicher war der Unterschied in der Glioblastomzelllinie U373MG, in der die Mehrzahl (ca. 70%) der Parasiten ohne direkten Kontakt zum Zellkern beobachtet wurden.

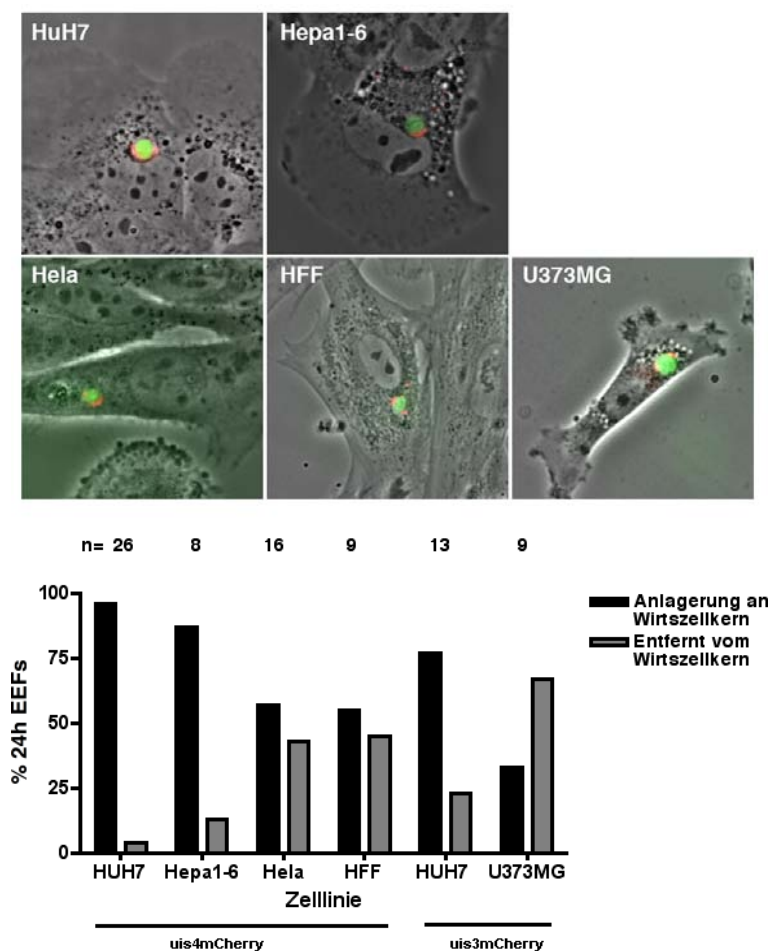


Abbildung 4-19 Die Lokalisation des Parasiten am Wirtszellkern variiert in verschiedenen Zelllinien

Die Parasiten-Lokalisation wurde mit Hilfe von Videomikroskopieaufnahmen als Kern-angelagert und Kern-entfernt kategorisiert. In Immunfluoreszenzen der *uis4mCherry* 24h Entwicklungsstadien in den verschiedenen Zelllinien wird ersichtlich, dass sich die Parasiten in Hepatoma Zellen fast ausschließlich am Kern anlagern wohingegen nur noch etwa die Hälfte der untersuchten Parasiten in HeLa, HFF und U373MG Zellen eine Kern-Anlagerung aufweisen.

Diese Ergebnisse korrelieren invers mit der Eignung einer Zelle für eine *Plasmodium* EEF-Entwicklung. Die beobachtete Distanz zum Kern könnte u.a. eine Erklärung für die beeinträchtigte Entwicklung der Parasiten zu reifen EEFs in den getesteten Wirtszellen sein, da die Parasiten gerade in Bezug auf die Größe des 48h Entwicklungsstadiums einen Defekt aufwiesen.

4.3.7 Assoziieren Wirtszellorganellen mit der PVM?

Um zu testen, ob sich die dynamischen Ausläufer gerichtet oder stochastisch ausbilden, wurde die Ausrichtung in der Zelle quantifiziert (Abbildung 4-20). Diese Analyse der Richtung, in die dünne und dicke PVM-Ausläufer zeigten, ergab dass 80% in Richtung Wirtszellkern bzw. parallel dazu zeigten. Nur 20% der Ausläufer bildeten sich in die entgegengesetzte Richtung (ins Wirtszyttoplasma) aus.

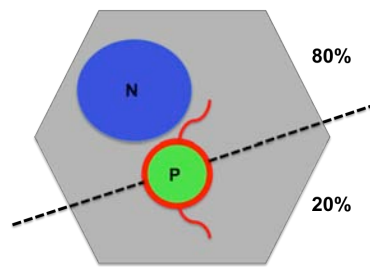


Abbildung 4-20 Quantitative Analyse der Richtung der PVM-Ausläufer

Die quantitative Auswertung der Richtung in welche die PVM-Ausläufer zeigen ergibt, dass der Großteil parallel zum Kern ausgerichtet ist. Die schematische Darstellung repräsentiert die Quantifizierung von 70 Parasiten.

Die enge Anlagerung der Parasiten an den Nukleus sowie die Richtung der Ausläufer während der Leberstadienentwicklung wirft die Frage auf, ob diese Nähe zum Kern selbst eine Funktionalität besitzt oder aber Kern-assoziierte Organellen so ebenfalls Kontakt mit dem Parasiten oder speziellen Strukturen wie z.B. der PVM oder den PVM-Ausläufern aufnehmen können. Im Folgenden wurden deshalb verschiedene Fluoreszenzmarker für Wirtszellorganellen auf eine Ko-Lokalisierung bzw. Interaktion mit dem Parasiten getestet.

4.3.7.1 Assoziation mit der Kernhülle

Um zu testen, ob die Anlagerung des Parasiten an den Kern ebenfalls in einer Assoziation der PVM/PVM-Ausläufer mit der Wirtszellkernhülle resultiert, wurden Kernhüllenproteine entweder mit Antikörpern oder mit einem Fluoreszenzfusions-Protein angefärbt.

Bei den Lokalisationsanalysen mit α -NUP98 Antikörpern wurden Hepatozyten mit *uis4mCherry* Sporozoiten infiziert, nach 24, 48 und 72 Stunden fixiert und ein IFA wie beschrieben durchgeführt. Die gefärbten Proben wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

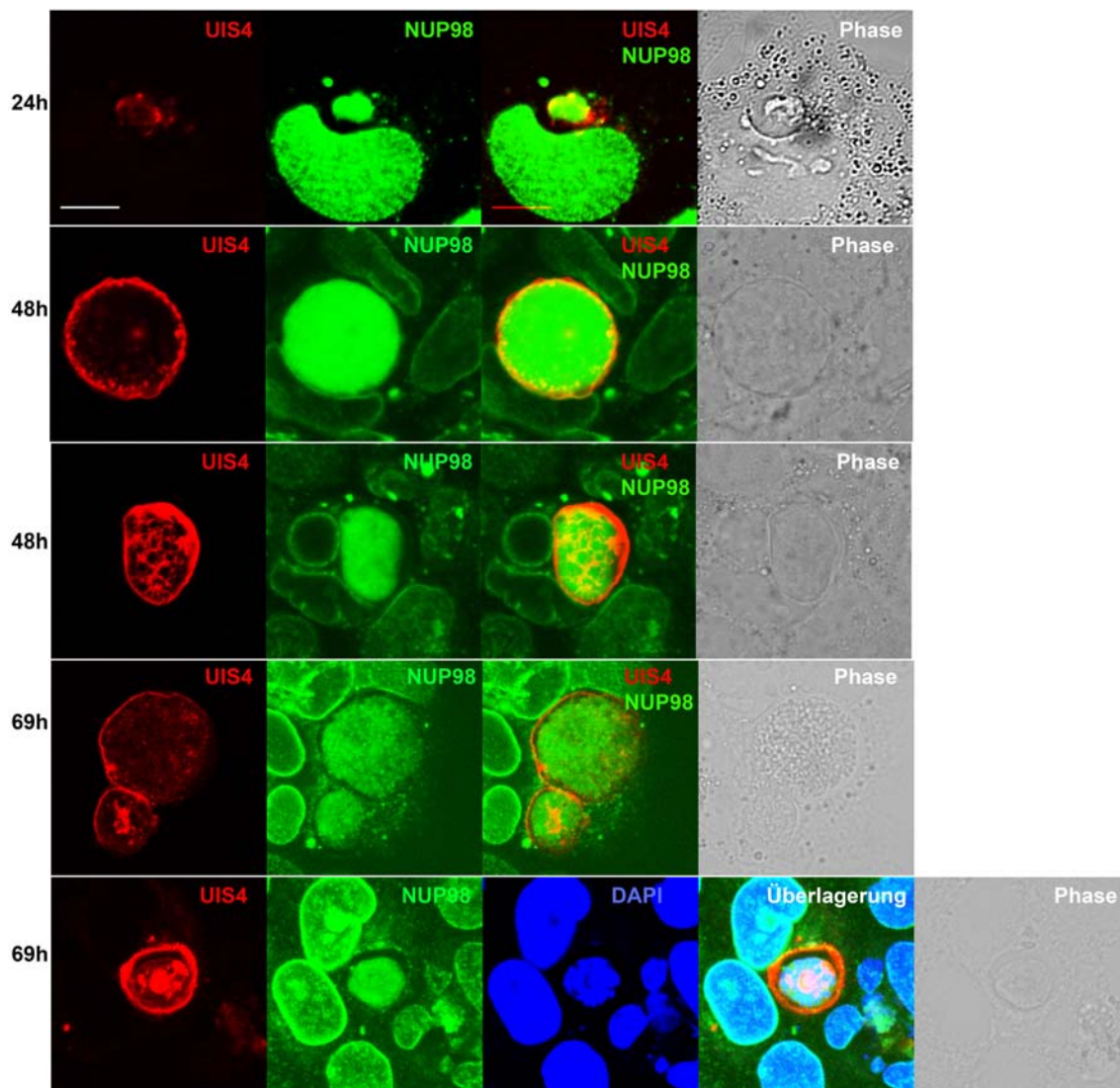


Abbildung 4-21 Die Parasiten PVM lagert sich eng an die Kernhülle der Wirtszelle an

In Immunfluoreszenzen mit 10.000 *uis4mCherry*-Sporozoiten infizierten HuH7 Zellen wurden das NUP98-Protein nach 24, 48 sowie 69h mit α -Nup98 (grün) angefärbt. Dabei wird gezeigt, dass die PVM die Kernhülle während der Leberstadien-Entwicklung berührt.

Bei der Analyse der verschiedenen Zeitpunkte fiel auf, dass die PVM in der Tat direkt an die Kernhülle angelagert ist. Diese Lokalisation konnte in allen untersuchten Parasiten in der frühen und späten Leberstadienentwicklung bestätigt werden (Abbildung 4-21). Zusätzlich konnte bei manchen Parasiten an der vom Kern entfernten Seite der PVM eine Anreicherung des NUP98 Proteins gezeigt werden. Dabei erschien die PVM von NUP98-Proteinen umgeben (Abbildung 4-21). Dies könnte auf eine mögliche Interaktion der PVM mit der Kernhüllenkomponente hinweisen welche evtl. für die Anlagerung des Parasiten an den Kern notwendig sein könnte.

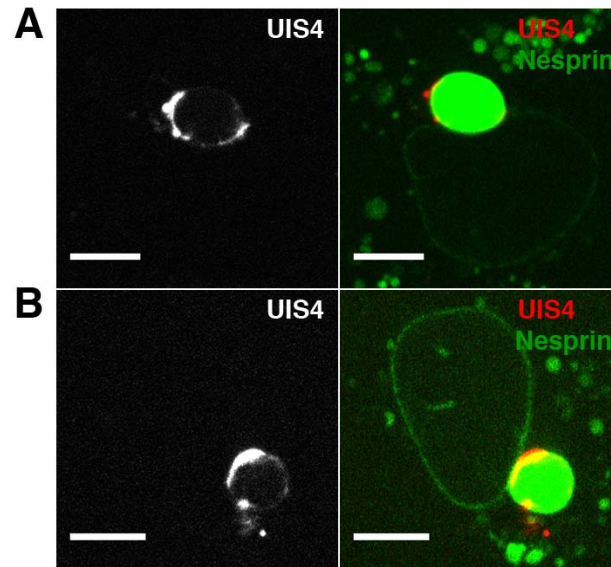


Abbildung 4-22 Die PVM-Ausläufer nehmen keinen Kontakt zur Kernhülle auf

HuH7 Zellen wurden mit Nesprin-GFP Baculoviren transduziert. Nach 24h wurden die Zellen mit 100.000 Sporozoiten infiziert und 24h später mit dem *Spinning Disk* Mikroskop analysiert. Die PVM der 24h Leberstadien (rot) steht in Kontakt mit der Kernhülle (grün). Skalierungsbalken = 10µm.

Für eine *live cell imaging* Analyse der Kernhüllen/Parasiten Interaktion wurde *Organelle Lights* Nesprin-GFP von Invitrogen benutzt. Dabei wird die Sequenz für ein Nesprin-GFP Fusionsprotein auf dem Baculovirus Genom kodiert und über eine Baculovirus Transduktion in die Wirtszelle eingebracht. Die so transduzierten Zellen wurden mit *uis4mCherry* Sporozoiten infiziert und nach 24-stündiger Inkubation mit dem *Spinning Disk* Mikroskop analysiert und Filme verschiedener Länge aufgenommen. Dabei stellte es sich als problematisch heraus eine transduzierte und zugleich infizierte Zelle zu finden. Möglicherweise ist der Prozeß der Transduktion für eine nachfolgende *P.berghei* Infektion ungeeignet weil die Invasion oder die Entwicklung der Parasiten in der Zelle durch die Baculoviren beeinträchtigt ist. Der Versuch die Infektion der Zellen mit den Sporozoiten der Baculovirus-Transduktion voranzustellen führte dazu, dass keine frühen Leberstadienentwicklungszeitpunkte analysiert werden konnten, da das Nesprin-GFP Fusionsprotein erst 24h nach der Transduktion synthetisiert wird.

Die Analyse der Nesprin-GFP sowie mit *uis4mCherry* Parasiten infizierten Hepatoma Zellen ergab wie erwartet eine Anlagerung der PVM an die Kernhülle. Jedoch wurde keinerlei Dynamik bzw. Interaktion der PVM-Ausläufer mit der Kernhülle beobachtet (Abbildung 4-22). Dies kann bedeuten, dass die PVM-Ausläufer keinen direkten Kontakt

zur Kernhülle ausüben. Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass die PVM zwar direkt an die Kernhülle angelagert ist, jedoch keine eindeutige Interaktion zwischen PVM und Kernhülle besteht.

4.3.7.2 Assoziation mit Lysosomen

Lysosomen sind Membranvesikel, die sich vom Golgi-Apparat abschnüren und hydrolytische Enzyme wie Proteasen, Nukleasen und Lipasen zur intrazellulären Verdauung von Material enthalten (Alberts 2008).

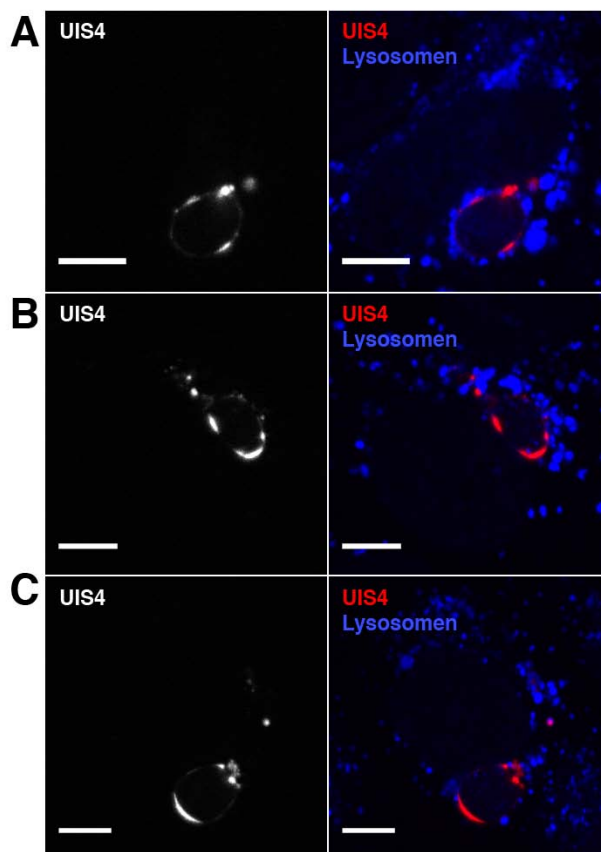


Abbildung 4-23 Die Wirtszell-Lysosomen interagieren partiell mit 24h Leberstadien

HuH7 Zellen wurden mit *uis4mCherry* Sporozoiten infiziert und nach 24h mit dem *Lyso-Tracker Blue* inkubiert und anschließend mit dem *Spinning Disk* Mikroskop analysiert. Gezeigt sind Bildsequenzen in denen sich die Lysosomen (blau) teilweise an die PVM (A) bzw. die PVM-Ausläufer (rot) (B, C) anlagern. Skala = 10µm.

Möglicherweise könnten die PVM-Ausläufer eine Verbindung zu den Lysosomen aufbauen, um so entweder verdautes Material bzw. Enzyme aufzunehmen oder aber Parasiten-Material abzugeben. Die mit *uis4mCherry* Parasiten infizierten Hepatozyten wurden nach 24-stündiger Entwicklung mit dem Organellenmarker *Lyso-Tracker Blue* inkubiert und anschließend mit dem *Spinning Disk* Mikroskop studiert. Die Konzentration auf die frühen Zeitpunkte der Leberstadienentwicklung ist dabei mit dem ausschließlichen

Vorkommen der PVM-Ausläufer in dieser Phase begründet. Tatsächlich konnte ich eine Interaktion der Lysosomen mit dem Parasiten beschreiben. Dabei lagerten sich einzelne Lysosomen an den Parasiten an und umgaben die PVM zum Teil komplett (Abbildung 4-23 A). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die PVM-Ausläufer partiell in direktem Kontakt mit einzelnen Lysosomen stehen. Diese setzten unmittelbar an die Ausläufer an, sowohl an die Spitze der Struktur als auch an Bereiche, in denen die Ausläufer gerade aus der PVM austraten (Abbildung 4-23 B). Des weiteren konnten einige Lysosomen, die in Verbindung mit dem Parasiten standen, als dynamisch beschrieben werden, da sie sich an der PVM bzw. den Ausläufer Strukturen entlang bewegten (Abbildung 4-23 C). Es sollte aber angemerkt werden, dass die Lysosomen in der nicht infizierten Wirtszelle gleichmäßig verteilt sind, so dass es schwierig war, aufgrund der gezeigten Lokalisationen eindeutig auf eine spezifische Parasit / Lysosomen Interaktion zu schließen.

4.3.7.3 Assoziation mit Mitochondrien

Mitochondrien dienen als „Energiekraftwerke“ der Zelle. Da in *T.gondii* eine Rekrutierung von Mitochondrien beobachtet werden konnte (Sinai *et al.*, 2001) sollte eine mögliche Interaktion auch in *Plasmodium* untersucht werden.

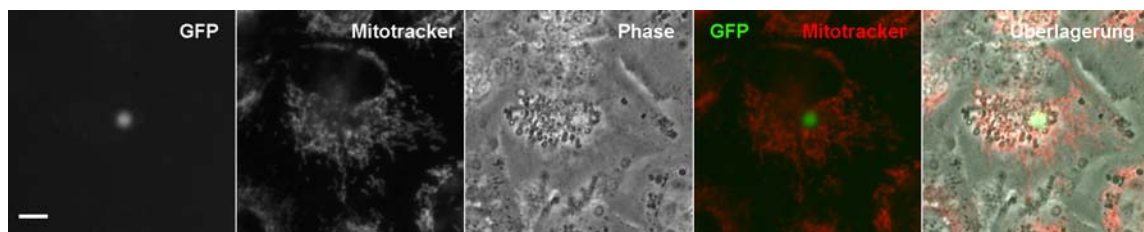


Abbildung 4-24 Die Wirtszell-Mitochondrien umgibt den Parasiten

Immunfluoreszenzen von 20h WT Leberstadien (grün) in HuH7 Zellen. Die Mitochondrien (rot) umgeben den Parasiten (grün). Skalierungsbalken = 10µm.

Der Versuch eine mögliche Parasiten Interaktion mit Mitochondrien zu untersuchen, wurde mit Hilfe eines *Mito-Tracker Red* (Invitrogen) durchgeführt. Zunächst wurden WT Parasiten für eine Hepatoma Infektion verwendet und die Proben nach 20h mit *Mito-Tracker Red* inkubiert und mit dem inversen Fluoreszenz-Mikroskop studiert (Abbildung 4-24).

Dabei fiel auf, dass die 20h Leberstadien zum Teil von Wirtszell-Mitochondrien umgeben schienen. Diese Lokalisierung erschien jedoch nicht dynamisch zu sein, da in den aufgenommenen Filmen keine Veränderung zu erkennen war (Abbildung 4-24).

4.3.7.4 Assoziation mit dem Endoplasmatischen Retikulum

Das Endoplasmatische Retikulum ist ein weit verzweigtes Kanalsystem von Zisternen, welches von Membranen umschlossen ist. Das ER dient der Translation, Proteinfaltung, posttranslationalen Modifikationen von Proteinen und Proteintransport von Transmembranproteinen und sekretorischen Proteinen (Alberts 2008).

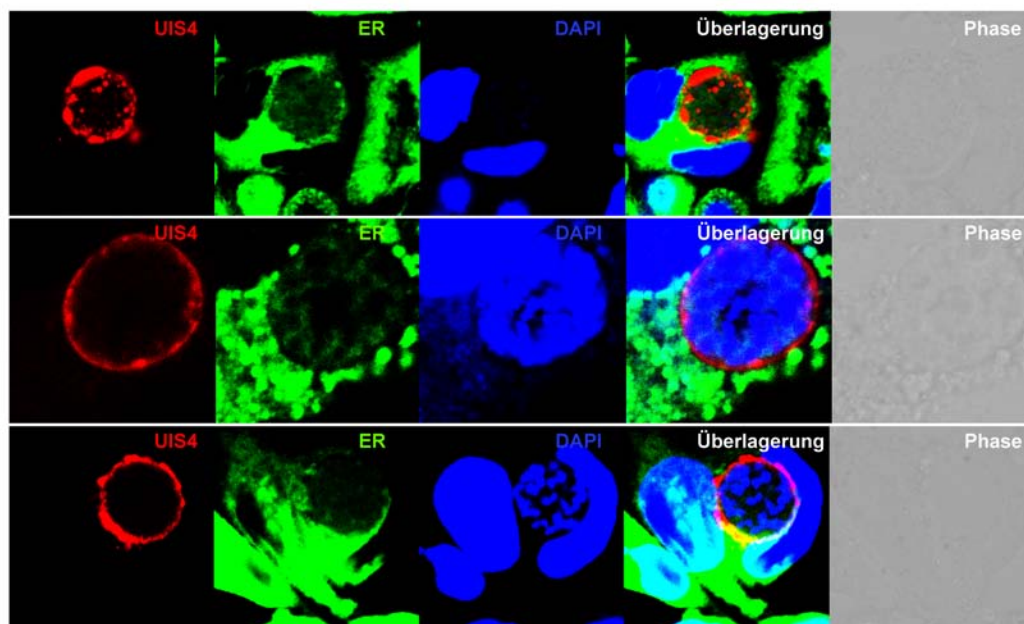


Abbildung 4-25 Das Wirtszell-ER lagert sich an der PVM des Parasiten an

Immunfluoreszenzen von 48h *uis4mCherry* Leberstadien in HuH7 Zellen, die mit dem Konfokalen Mikroskop erstellt wurden. Das ER (grün) lagert sich an die PVM (rot) der Parasiten an.

Die Anlagerung des Wirts-ER an *Plasmodium berghei* Leberstadien konnte bereits gezeigt werden (Bano *et al.*, 2007). Es wurde postuliert, dass die Anlagerung des ER an den Parasiten, eine Rolle bei der Parasiten-Versorgung mit Lipiden spielen könnte.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es eine spezifische Interaktion mit der PVM bzw. den PVM-Ausläufern und dem Endoplasmatischen Retikulum gibt. Dafür wurden HuH7 Zellen mit *uis4mCherry* Parasiten infiziert und nach 24-bzw. 48-stündiger

Entwicklung mit dem *ER-Tracker Green* inkubiert und anschließend mikroskopiert. Wie beschrieben (Bano *et al.*, 2007) konnte eine Anlagerung des ER an den Parasiten in frühen Leberstadien gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise waren die späteren Stadien teilweise komplett von ER umgeben, dabei kam es zu einer direkten Anlagerung des ER an die PVM wodurch möglicherweise ein direkter Stoffaustausch vollzogen wird (Abbildung 4-25). In Bezug auf eine Interaktion mit den PVM-Ausläufern konnte keine Überlagerung oder spezifische Lokalisation der Ausläufer und des ER beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

4.3.7.5 Einfluß von Tubulin auf die PVM Dynamik

Mikrotubuli sind röhrenförmige Proteinfilamente, die zusammen mit den Mikrofilamenten und Intermediärfilamenten das Zytoskelett bilden. Sie dienen der mechanischen Stabilisierung der Zelle und ihrer äußeren Form, der aktiven Bewegung der Zelle sowie Transporten innerhalb der Zelle. Mikrotubuli bestehen aus $\alpha\beta$ -Tubulindimeren, die Subfilamente bilden. Mikrotubuli sind in der Zelle an ein Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) gebunden (Alberts 2008).

Die beobachtete PVM Dynamik kann durch Parasiten oder Wirtszell-Mechanismen erreicht werden. Beispielsweise könnte Wirtszell-Tubulin für die PVM-Dynamik verantwortlich sein indem es an den PVM-Ausläufern ansetzt und die Bewegung induziert. Um diese Hypothese zu untersuchen wurden zwei Ansätze durchgeführt:

Einerseits wurden Immunfluoreszenzanalysen mit Tubulin-Antikörpern auf fixierten EEF Proben durchgeführt. Andererseits wurde *Tubulin-Tracker Green* (*Oregon Green 488 Taxol*) verwendet. Taxol oder auch Paclitaxel genannt, bindet polymerisiertes Tubulin, stabilisiert sie und verhindert so deren Abbau. Dadurch sind die Zellteilung sowie andere Funktionen der Zelle, die Tubulin-abhängig sind, möglicherweise beeinträchtigt. Durch diesen Farbstoff kann man also polymerisiertes Tubulin in Zellen anfärben und im *live cell imaging* verfolgen.

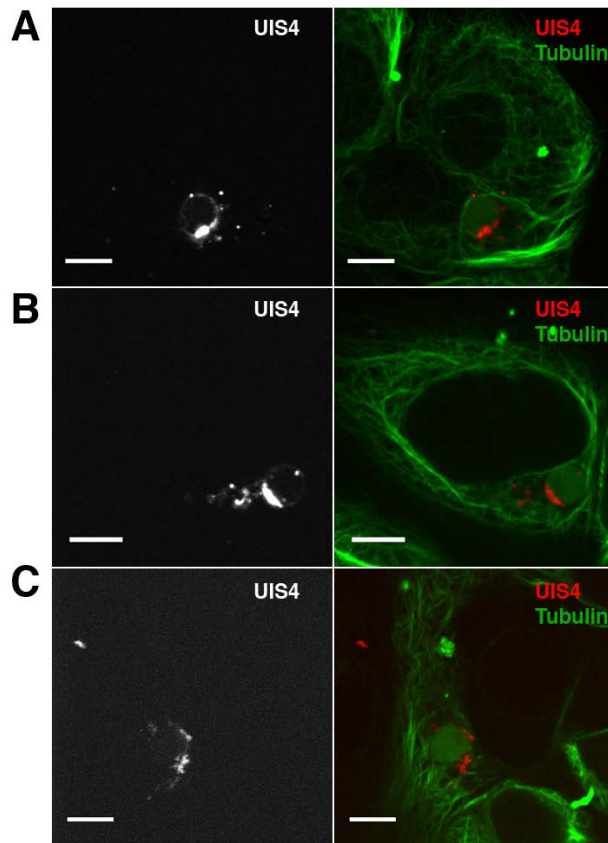


Abbildung 4-26 Wirtszell-Tubulin interagiert partiell mit 24h Leberstadien

Videosequenz von 24h *uis4mCherry* Leberstadien in HuH7 Zellen. Wirtstubulin (grün) wurde mit *Tubulin-Tracker Green* angefärbt und umgibt teilweise den Parasiten (A) oder lagert sich an die PVM (rot) (B, C) an. Die Videosequenzen wurden mit dem *Spinning Disk* Mikroskop generiert. Skalierungsbalken = 10µm.

Tubulin-Tracker Green

Die mit *uis4mCherry* Parasiten infizierten HuH7 Zellen wurden nach 24h mit dem *Tubulin-Tracker* inkubiert und anschließend mit dem *Spinning Disk* Mikroskop studiert. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf das Ende der PVM-Ausläufer gelegt werden, da dies ein Angriffspunkt für Tubulin sein könnte. Hier konnte in den ausgewerteten Filmen keine spezifische Anlagerung gezeigt werden, was die oben formulierte Hypothese widerlegt. Allerdings konnten kaum dünne Ausläufer beobachtet werden. Hingegen konnte bei manchen Parasiten eine leichte Umrundung mit Wirtstubulin erfaßt werden (Abbildung 4-26 A). Dies könnte auf eine Funktion von Tubulin für die Ausrichtung des Parasiten in der Zelle (z.B. für die Nähe zum Zellkern) hindeuten. Des weiteren, konnte die Hypothese der Parasiten-Tubulin-abhängigen PVM Dynamik nicht eindeutig geklärt werden. Überlagerungen der Tubulin-Färbung mit den dickeren PVM-Ausläufer Strukturen wurden nicht erfaßt (Abbildung 4-26 B). Eine solche Ko-Lokalisierung würde dafür sprechen, dass die Ausläufer u.a. aus Parasiten-Tubulin gebildet werden. Jedoch könnte die erreichte mikroskopische Auflösung ein kritischer Faktor sein um diese Überlagerung überhaupt erkennen zu können.

α -Tubulin Antikörper

Als zweiter Ansatz wurden Tubulin-Antikörper verwendet, die α - bzw. β -Tubulin detektierten. Dafür wurden *uis4mCherry* infizierte Huh7 Zellen zu 24 und 48h Zeitpunkten fixiert, angefärbt und mit Hilfe des Konfokalen Fluoreszenzmikroskops studiert.

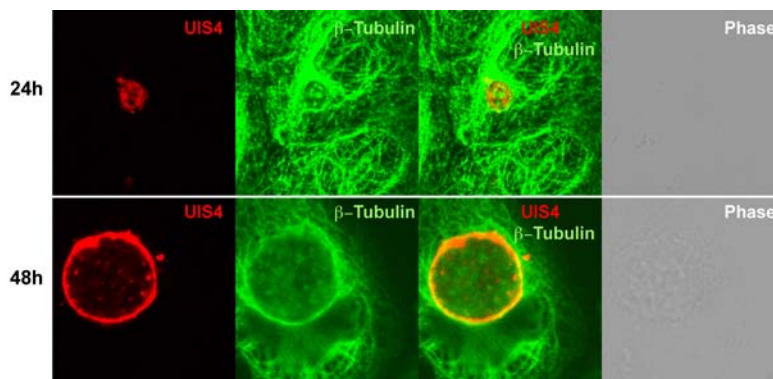


Abbildung 4-27 Leberstadien sind in fixierten Proben von Tubulin umgeben

Immunfluoreszenzen von HuH7 Zellen, die mit 10.000 *uis4mCherry* Sporozoiten infiziert wurden und nach 24 sowie 48h mit α -Tubulin (grün) angefärbt und mit dem konfokalen Mikroskop analysiert wurden. Die PVM (rot) wird von Tubulin umgeben.

Ergänzend zu den Ergebnissen mit dem *Tubulin-Tracker* konnte auch hier ein Umschließen der Parasiten mit Wirts-Tubulin erfaßt werden. Interessanterweise schienen die Parasiten teilweise komplett von Tubulinfasern umgeben zu sein. Diese Beobachtung traf sowohl bei frühen (24h) als auch bei späten Leberstadien (48h) zu (Abbildung 4-27). Nachträgliche Literaturrecherche ergab, dass diese Umrundung, die einem Zusammenziehen der Tubulinfasern entspricht, auf die Fixierung mit PFA zurückzuführen sein kann.

Infolgedessen erscheint es schwierig, eine Assoziation von Wirts-Tubulin und Parasit mit Antikörpern oder fluoreszenten Farbstoffen zu überprüfen, da eine Beeinträchtigung der normalen Tubulin Funktion bzw. Lokalisierung nicht ausgeschlossen werden kann.

4.3.8 Die Parasiten nehmen Kontakt mit dem Golgi-Apparat auf

Die Ausrichtung der PVM-Ausläufer parallel zum Kern lassen vermuten, dass Kern-nahe Organellen eine wichtige Rolle spielen könnten. Aus diesem Grund wurde nachfolgend eine mögliche Interaktion des Parasiten und der PVM mit dem Golgi-Apparat untersucht. Gerade die dünnen PVM-Ausläufer waren sehr dynamisch und zeigten eine spezifisch gerichtete Bewegung. Dessenungeachtet konnten sie schlecht in fixierten Proben im IFA gezeigt werden da diese Strukturen nach der Fixierung nur selten präsent waren (evtl. zieht der Parasit diese dünnen Ausläufer während der Fixierung zurück). Demzufolge wurden *live cell imaging* Analysen durchgeführt um die Dynamik einer möglichen Interaktion der PVM mit dem Golgi-Apparat zu beschreiben.

Der Golgi-Apparat bildet einen membranumschlossenen Reaktionsraum innerhalb der Zelle (Alberts 2008). Die Funktionen des Golgi-Apparates umfassen folgende Bereiche:

1. Modifikation von Proteinen
2. Synthese und Modifizierung von Glycoproteinen
3. Modifikation von Fetten
4. Bildung von lysosomalen Proteinen (primäres Lysosom)
5. Bildung und Speicherung sekretorischer Vesikel

4.3.8.1 Golgi-Fluoreszenz-Konstrukte zur Veranschaulichung des Golgi-Apparates

Die Visualisierung des Golgi-Apparates wurde mit Fluoreszenz-markierten Golgi Proteinen gewährleistet (Plasmide wurden von Dr. Dagmar Heuer, MPI Berlin zur Verfügung gestellt). Die Golgi Proteine waren dabei zumeist strukturelle Komponenten, die eine spezifische Golgi Anfärbung ermöglichten. Entsprechende Plasmide, die für ein Golgi-GFP/YFP-Fusionsprotein kodierten wurden mittels des *Lipofectamine 2000* Transfektionsprotokolls in HuH7 oder HeLa Zellen eingebracht. Die Zellen konnten dabei entweder vor oder nach der Golgi-Konstrukt-Transfektion mit *P.berghei* Sporozoiten infiziert und nachfolgend mit der Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden.

Die Analyse konzentrierte sich dabei zunächst auf die 24h Leberstadien-Zeitpunkte, um die PVM-Ausläufer auf mögliche Interaktionen mit dem Golgi-Apparat zu untersuchen.

Frühe Leberstadien-Entwicklung

Von den Golgin84-GFP transfizierten und mit *uis4mcherry* Sporozoiten infizierten Zellen wurden Langzeit-Videos sowie kurze Filme mit einer hohen Bild-Rate der frühen EEF Entwicklung aufgenommen. Interessanterweise nahmen die beobachteten dünnen Ausläufer direkt Kontakt mit dem Golgi-Apparat auf. Dies konnte sowohl in HuH7 als auch in HeLa Zellen gezeigt werden (Abbildung 4-28).

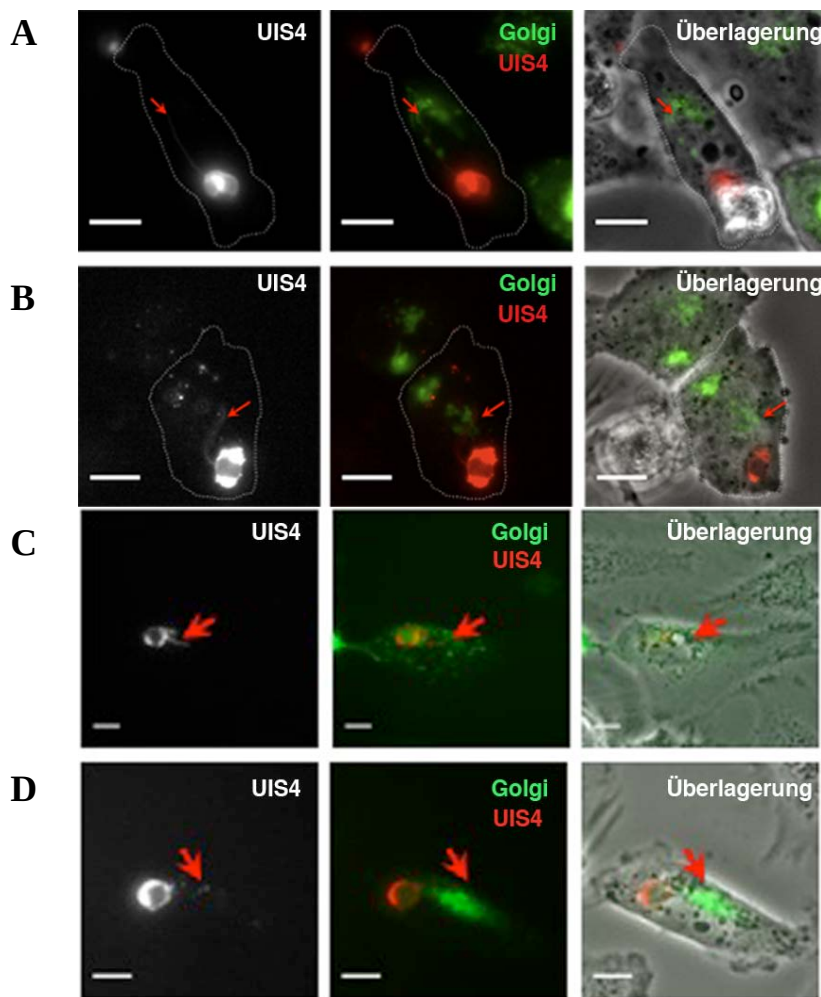


Abbildung 4-28 Die Parasiten nehmen über die PVM-Ausläufer Kontakt zum Golgi-Apparat auf

Ausschnitte von Videosequenzen (inverse Fluoreszenz-Mikroskopie) von mit *uis4mCherry* Sporozoiten infizierten HeLa (**A, B**) und HuhH7-Zellen (**C, D**), in denen der Golgi-Apparat durch Golgin84-GFP (**A, C**) bzw. Mannosidase-YFP (**B, D**) Fusionsproteine (grün) visualisiert wurde. Die PVM-Ausläufer sowie Vesikel (Pfeil, rot) nehmen Kontakt mit dem Golgi-Apparat (grün) auf. Skalierungsbalken = 10µm.

Erstaunlich war dabei, dass sich manche Ausläufer nach dem ersten Kontakt zurückzogen und später erneut Kontakt mit dem Golgi aufnahmen (Abbildung 4-29). Demzufolge scheinen sich die Ausläufer in eine bestimmte Richtung zu bewegen was für eine spezifische Interaktion zwischen dem Parasiten und dem Golgi-Apparat spricht. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die PVM Vesikel ebenfalls in Kontakt mit dem Golgi traten. Dabei wurde ein permanenter Transport zum Golgi beobachtet, was andeutet, dass der Parasit sich den wirtseigenen Sekretionsweg zu Nutze macht.

Eine weitere interessante Beobachtung in den Golgin-GFP transfizierten Zellen war, dass der Golgi-Apparat in den HuH7 Zellen größtenteils fragmentiert vorlag (Abbildung 4-28 C). Dies könnte an der Überexpression des Golgin84 Proteins liegen, da dieses Strukturprotein im Überschuss für eine beeinträchtigte Struktur des Golgi verantwortlich sein könnte. Im Gegensatz dazu war die Struktur des Golgi in HeLa Zellen nicht betroffen. Möglicherweise sind die HeLa Zellen insgesamt robuster und kompakter was dazu führt, dass die Struktur des Golgi-Apparates nicht so leicht aufgelockert wird.

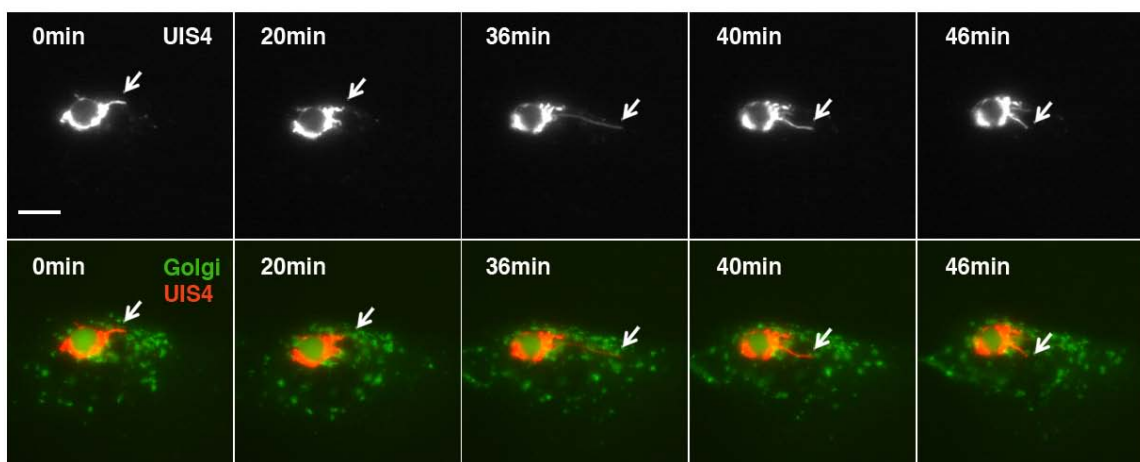


Abbildung 4-29 Der Kontakt des Parasiten zum Golgi-Apparat wird stetig erneuert und kann verfolgt werden

Die Videosequenzen von mit Golgin84-GFP (grün) visualisierten und *uis4mCherry* Sporozoiten infizierten HuH7 Zellen wurden nach 23h mit dem inversen Fluoreszenz-Mikroskop erstellt. Der Kontakt der dünnen PVM-Ausläufer zum Golgi-Apparat kann über einen Zeitraum von 46 Minuten verfolgt werden. Skalierungsbalken = 10µm.

Von den Mannosidase-YFP (Man-YFP) transfizierten und mit *uis4mCherry* Sporozoiten infizierten Zellen wurden analog zu den Golgin84-GFP Proben Filme aufgenommen. Da das Mannosidase Protein ebenfalls ein Golgi-Struktur Protein ist war zu erwarten, dass die Beobachtungen ähnlich zu den Ergebnissen mit den Golgin84-transfizierten Zellen

ausfallen würden. In der Tat konnten auch in diesen Proben PVM-Ausläufer sowie Vesikel, die Kontakt mit dem Golgi aufnahmen beobachtet werden (Abbildung 4-28). Interessanterweise lag der Golgi-Apparat in infizierten Man-YFP-HuH7 Zellen größtenteils fragmentiert vor, wohingegen er in uninfizierten Zellen zumeist keine Fragmentierung zeigte. Dies könnte bedeuten, dass der Parasit mit dem Struktur-Bereich für den das Mannosidase Protein wichtig ist, wechselwirkt und so zu einer Auflockerung der Golgi-Struktur beiträgt.

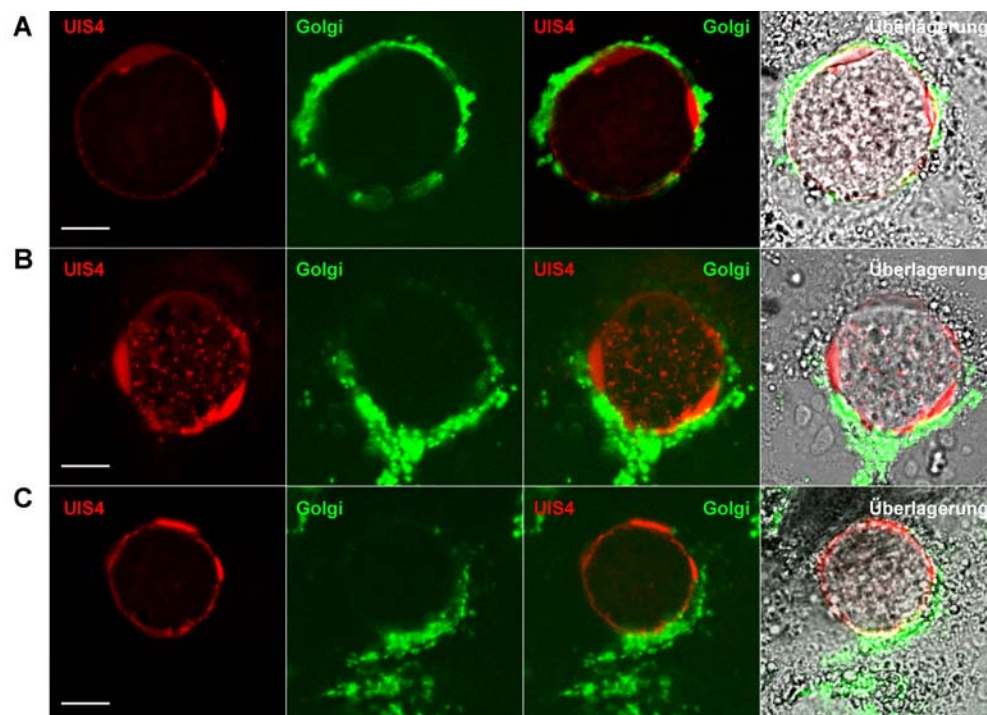


Abbildung 4-30 Der Kontakt des Parasiten zum Golgi-Apparat in späten Leberstadien

Die Bildsequenzen von mit Golgin84-GFP (**A**) und Man-YFP (**B, C**) visualisierten und mit *uis4mCherry* Sporozoiten infizierten HuH7 Zellen wurden nach 48h mit dem Konfokalen Mikroskop erstellt. Der Kontakt des Golgi-Apparates (grün) zur PVM (rot) ist als Umrundung des Parasiten (**A**) bzw. Anlagerung (**B, C**) zu sehen. Skala = 10µm.

Späte Leberstadien-Entwicklung

Die späte Leberphase zeigte zwar keine PVM-Ausläufer sollte aber dennoch auf eine mögliche Golgi/Parasiten Interaktion hin getestet werden. Dabei fiel auf, dass die Parasiten teilweise von Golgi Fragmenten umlagert wurden (Abbildung 4-30 A). Allerdings konnte aufgrund der Größe der Parasiten (die Parasiten nehmen zum 48h Zeitpunkt einen

erheblichen Anteil des Wirtszellzytoplasmas ein) keine eindeutige Aussage zur Lokalisation gemacht werden. Man könnte sich auch vorstellen, dass die Parasiten große Bereiche des Wirtszellzytoplasmas verdrängen und es so zu einer unspezifischen Anlagerung von Golgi Fragmenten an den Parasiten kommt. Auffällig war jedoch, dass die einzelnen Fragmente direkt an die PVM angelagert waren (Abbildung 4-30).

4.3.8.2 Ist die Verbindung des Parasiten zum Golgi-Apparat essentiell?

Bisher wurde nur eine Verbindung zwischen den PVM-Ausläufern und dem Golgi-Apparat erfaßt. Es blieb unklar ob diese Interaktion eine essentielle Funktion für die Entwicklung des Parasiten hat. So ist unklar, ob sie eine Rolle bei der Ausbildung der Ausläufer spielt oder die Ausbildung durch Interferieren mit der Golgi-Struktur beeinträchtigt wäre. Zum anderen blieb offen ob die Parasiten in Golgi-defizienten Zellen einen Entwicklungsdefekt aufweisen. Weiterhin wurde bislang kein spezielles Golgi Protein identifiziert, das direkt an der Ausbildung der Interaktion beteiligt sein könnte.

Tabelle 4-3 Golgi-KD Zelllinien

Zelllinie	Zielgen
DHE002	Luciferase (Kontrolle)
DHE005	Golgin84
DHE006	Arf1
DHE007	Giantin3
DHE011	Rab1A
DHE015	Rab33b
DHE019	Giantin
DHE020	p115

Um diese Fragestellungen etwas genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Golgi-Protein *Knockdown* Zelllinien (Golgi-KD) mit *uis4mCherry* sowie WT Parasiten infiziert und in Bezug auf das Entwicklungsvermögen des Parasiten, die PVM Dynamik und die Ausbildung der Ausläufer untersucht. Die verwendeten Golgi-KD Linien sind dabei mit Hilfe der shRNA (*short hairpin* RNA) Technik als *Knockdown* für bestimmte Golgi Komponenten (Tabelle 4-3) generiert worden (durchgeführt von Dr. Dagmar Heuer, MPI Berlin).

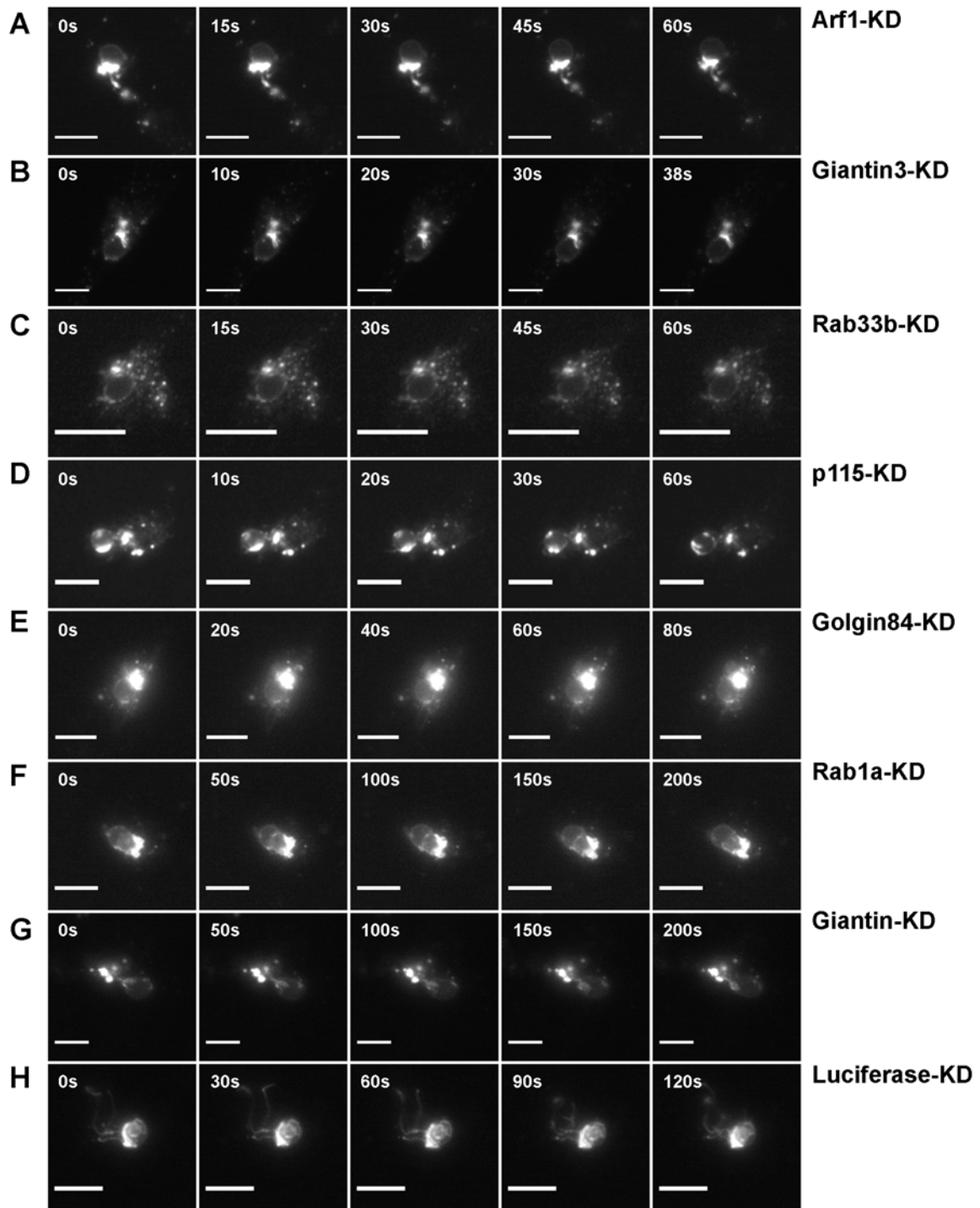


Abbildung 4-31 Die PVM-Ausläufer werden auch in Golgi-KD Zelllinien ausgebildet

Videosequenzen die mit Hilfe der inversen Fluoreszenz-Mikroskopie generiert wurden, zeigen mit *uis4mCherry* Sporoziten infizierte Golgi-KD HeLa Zellen. Die Parasiten können in 24h Stadien in Arf1-KD Zellen (**A**), Giantin3-KD Zellen (**B**) und Giantin-KD Zellen (**G**) dicke PVM-Ausläufer ausbilden. Die PVM-Vesikel sind in Rab33b-KD Zellen (**C**) und Rab1a-KD Zellen (**F**) zu beobachten. Auch die dynamischen dünnen Ausläufer können in p115-KD Zellen (**D**) und Golgin84-KD Zellen (**E**) ausgebildet werden. Die Luciferase-KD Zellen (**H**) dienen als Kontrolle und zeigen die typischen dynamischen dünnen Ausläufer. Skalierungsbalken = 10µm.

Die Golgi-KD Linien wurden zunächst mit WT Parasiten infiziert und die Entwicklung zu EEFs nach verschiedenen Zeitpunkten (24h und 48h) gestoppt und quantitativ und qualitativ ausgewertet. Hierbei fiel auf, dass sich die Parasiten in allen getesteten Linien entwickeln konnten. Allerdings gab es leichte Unterschiede zwischen den einzelnen Linien. Zusätzlich gab es Unterschiede in der Größe der 48h Stadien (Daten nicht gezeigt). Für die Analyse der PVM Dynamik und PVM-Ausläufer wurden die KD-Zellen mit *uis4mCherry* Parasiten infiziert. Die Proben wurden für *live cell imaging* Analysen sowie nach Fixierung für Immunfluoreszenzanalysen verwendet. In Hinblick auf die PVM Dynamik der 24h Stadien konnte gezeigt werden, dass in allen untersuchten Golgi-KD Zelllinien PVM-Ausläufer gebildet werden konnten. Dabei konnten sowohl Vesikel und dicke Ausläufer sowie dynamische dünne Ausläufer beobachtet werden (Abbildung 4-31).

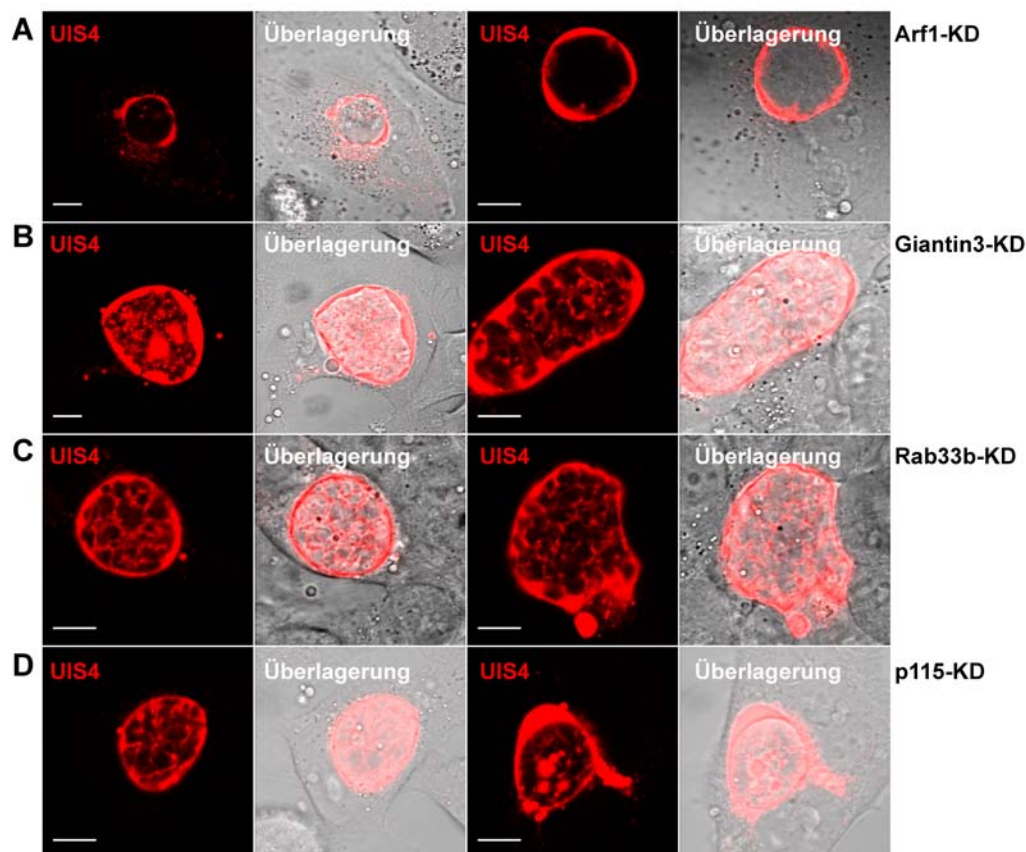


Abbildung 4-32 Die PVM der 48h Stadien wird auch in Golgi-KD Zellen ausgebildet

Bildsequenzen die mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie generiert wurden, zeigen mit *uis4mCherry* Sporozoiten infizierte Golgi-KD HeLa Zellen, die nach 48h fixiert wurden. Die Parasiten können in 48h Stadien in Arf1-KD Zellen (A), Giantin3-KD Zellen (B), Rab33b-KD Zellen (C) und p115-KD Zellen (D) eine PVM ausbilden. Skala = 10µm.

Für die Analyse der späteren EEF Entwicklung wurden die verschiedenen DHE Linien mit *uis4mCherry* Parasiten infiziert, nach 48h fixiert und mit dem Konfokalen Mikroskop aufgenommen. Hierbei fiel auf, dass die Parasiten in allen Zelllinien eine PVM ausbilden konnten, die mit der PVM in 48h Stadien in HuH7 Zellen vergleichbar war (Abbildung 4-32). Demnach beeinträchtigen die Golgi-KD Zelllinien die PVM-Ausbildung des Parasiten auch nach 48h nicht.

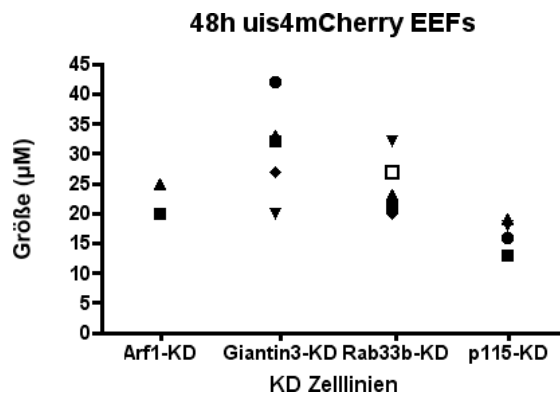


Abbildung 4-33 Die Größe der 48h Stadien unterscheidet sich in Golgi-KD Zellen

In Giantin3-KD Zellen konnten die 48h Stadien am größten werden wohingegen die Parasiten in p115-KD Zellen vergleichsweise klein waren.

Allerdings konnten leichte Unterschiede in der Größe der 48h Stadien in den DHE-Linien festgestellt werden. Die Parasiten waren beispielsweise in DHE007 Zellen (Giantin3-KD) am größten und vergleichsweise kleiner in DHE020 Zellen (p115-KD) (Abbildung 4-33).

4.3.9 Korrelative Elektronenmikroskopische Analyse der PVM

Die PVM-Ausläufer wurden bisher nur mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie beschrieben. Doch es blieb unklar ob die unterschiedlichen Ausläufer-Typen ähnlich aufgebaut sind bzw. ob man sie überhaupt hochauflösend darstellen kann. Um einen genaueren Eindruck über die Art dieser Strukturen zu erlangen, wurden elektronenmikroskopische Analysen hinzugezogen. Damit ein direkter Bezug zu den *live cell imaging* Daten hergestellt werden konnte, wurde eine korrelative Analyse durchgeführt. Hierbei werden zunächst Fluoreszenzdaten eines Parasiten und der mCherry-positiven PVM sowie deren Ausläufer generiert, die dann durch elektronenmikroskopische Aufnahmen ergänzt wurden.

Für die hier analysierten Proben wurden HuH7 Zellen mit *uis4mCherry* Sporozoiten infiziert und die Proben nach 24-stündiger Leberstadienentwicklung zunächst mit dem *Biozero 8000 Digital Fluoreszenz-Mikroskop* aufgenommen, fixiert und für die EM-Messung vorbereitet.

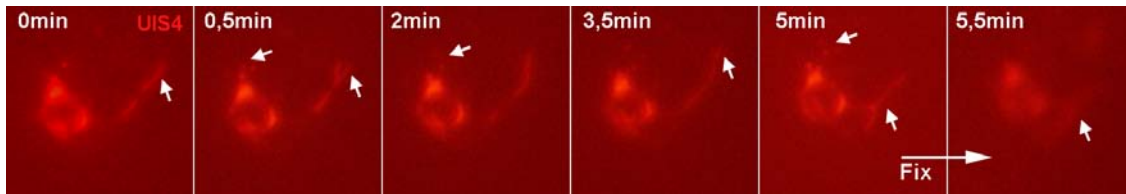


Abbildung 4-34 Die PVM zeigt sich als dynamische Struktur mit dünnen Ausläufern

Videosequenzen von *uis4mCherry* Parasiten in HuH7 Zellen zeigen dünne PVM-Ausläufer (Pfeil) sowie PVM-Vesikel (Pfeil) in den 24h Leberstadien.

Bei der *live cell imaging* Aufnahme wurden Vesikel beobachtet, die an einer Seite des Parasiten aus der PVM austraten. Anzumerken ist, dass an dieser Stelle die PVM mit besonders intensiver *UIS4mCherry* Färbung erschien (Abbildung 4-34). Des weiteren wurde ein dünner PVM-Ausläufer beobachtet, der die typischen dynamischen Bewegungen zeigte. Besonders interessant erschien diese Struktur, da sich der Ausläufer an der Spitze verzweigte und wie ein „Y“ aussah (Abbildung 4-34). Nach der Aufnahme eines 5-minütigen Videos wurde die Probe fixiert. Durch die charakteristische Form des Ausläufers sollte die Struktur später in der EM-Messung gut wiederzufinden sein (Abbildung 4-35).

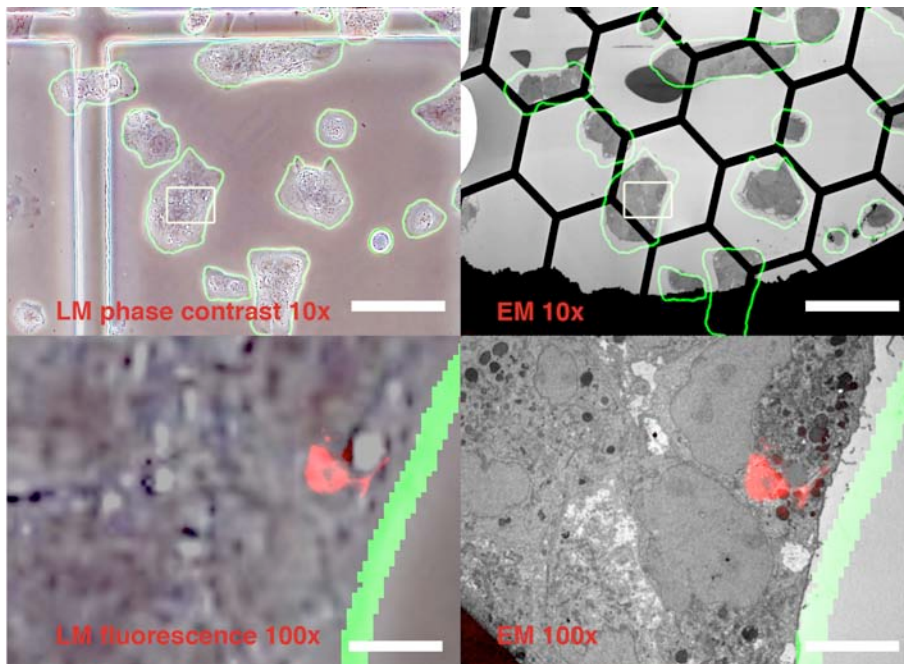


Abbildung 4-35 Der Übergang von der Fluoreszenz- zur Elektronenmikroskopie

Gezeigt sind Beispielaufnahmen der Fluoreszenz und EM-Aufnahmen des untersuchten Parasiten sowie die schematische Darstellung des durchgeführten Vorgehens zum korrelieren der Fluoreszenz- und EM-Daten. Skalierungsbalken oben 100 μ m, unten 10 μ m.

Die Aufnahme mit dem LEO 912AB Mikroskop konnte die zuvor beschriebene „Y“-Struktur in mehreren Schnittebenen bestätigen. Besonders interessant war die Tatsache, dass der Ausläufer als durchgängiger Schlauch zu erkennen war, was dafür spricht, dass die dünnen Ausläufer aus der PVM als einheitliche Struktur ausgebildet werden (Abbildung 4-36). Insofern ließen sich die bisher gewonnenen Fluoreszenzdaten auch in subzellulärer Auflösung bestätigen. In der Nähe der Spitze waren überraschenderweise mehrere Mitochondrien zu erkennen. Inwiefern diese Beobachtung jedoch eine relevante Funktion beschreibt, bleibt zu klären. Zusätzlich konnte die Region, aus der die Vesikel hervortraten, genauer beschrieben werden. Hier fiel zunächst auf, dass der besonders intensiv gefärbte PVM-Bereich als sehr elektronendicht erschien und multilamellare Strukturen darstellen könnten. Die Richtung der Vesikel-Bewegung konnte mit der Fluoreszenzmikroskopie aufgezeichnet werden. Interessanterweise, waren in diesem Bereich in der EM-Aufnahme auffallend viele Golgi-Stapel zu erkennen.

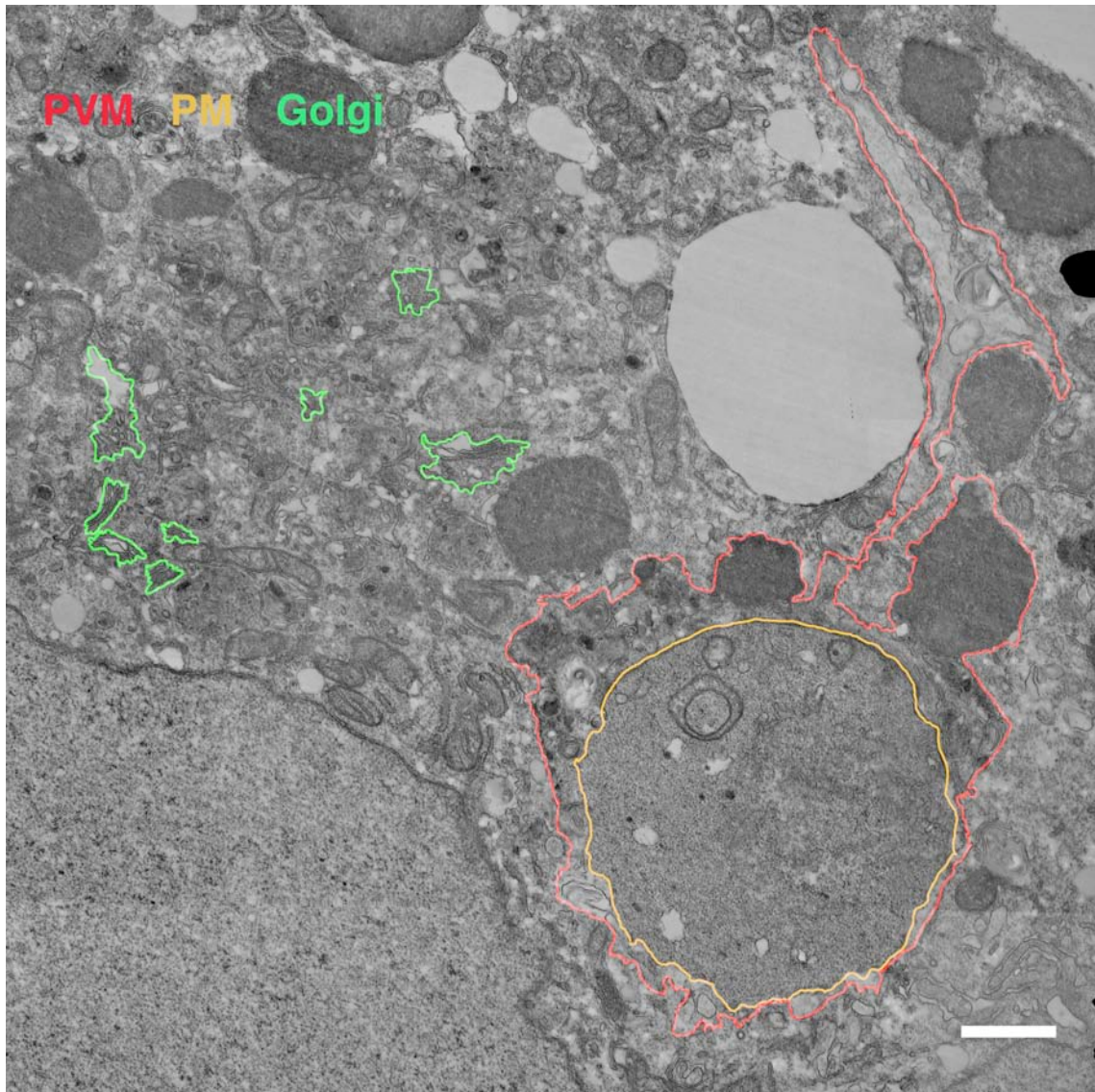


Abbildung 4-36 Die PVM-Ausläufer könnten elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden

In EM-Aufnahmen der 24h Leberstadien können die UIS4mCherry PVM (rot) und der daraus gebildeten Ausläufer (rot) nachgewiesen werden. Mehrere Golgi-Stapel (grün) sind in direkter Nähe zum Parasiten zu erkennen. Der dünne PVM-Ausläufer erscheint als durchgängige Struktur. Die Plasmamembran (PV) des Parasiten ist gelb dargestellt. Skalierungsbalken = 1µm.

4.3.10 FRAP-Analyse der PVM

Die PVM und die daraus gebildeten Ausläufer sind hoch-dynamische Strukturen, die auf einen raschen Austausch von Material hindeuten. Um diese Dynamik genauer zu erforschen wurde die FRAP (*fluorescence recovery after bleaching*) Analyse angewandt. Dabei handelt es sich um ein Verfahren zur Photomanipulation mit dem ein definierter Bereich einer fluoreszierenden Probe photo-gebleicht werden und die Wiederherstellung des Fluoreszenzsignals über die Zeit gemessen werden kann. Somit kann man einen Eindruck über die Diffusionsgeschwindigkeiten von bestimmten Proteinen oder einer bestimmten Lokalisation (z.B. in einer Membran und somit nicht frei und schnell austauschbar) erlangen.

Mit *uis4mCherry* Parasiten infizierte HuH7 Zellen wurden nach ca. 20h und 48h Inkubation für die FRAP Analyse mit dem *Spinning Disk* Mikroskop verwendet. Der Photobleich-Bereich wurde dabei wie folgt gewählt:

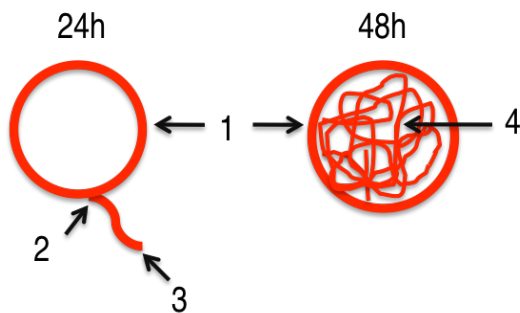


Abbildung 4-37 Schematische Darstellung der PVM-Strukturen, die mit Hilfe der FRAP Analyse untersucht wurden

1. PVM (24h, 48h)

Beim Bleichen eines Bereiches (im Nachfolgenden *region of interest* = ROI genannt) in der PVM konnte beobachtet werden, dass je nach der Größe der ROI das Fluoreszenzsignal direkt oder nach kurzer Zeit wieder zu erfassen war. Wurde eine ROI in der PVM von 24h Stadien gewählt, konnte die Wiederherstellung des Signals und somit die Diffusion innerhalb von Millisekunden gezeigt werden (Abbildung 4-38 A).

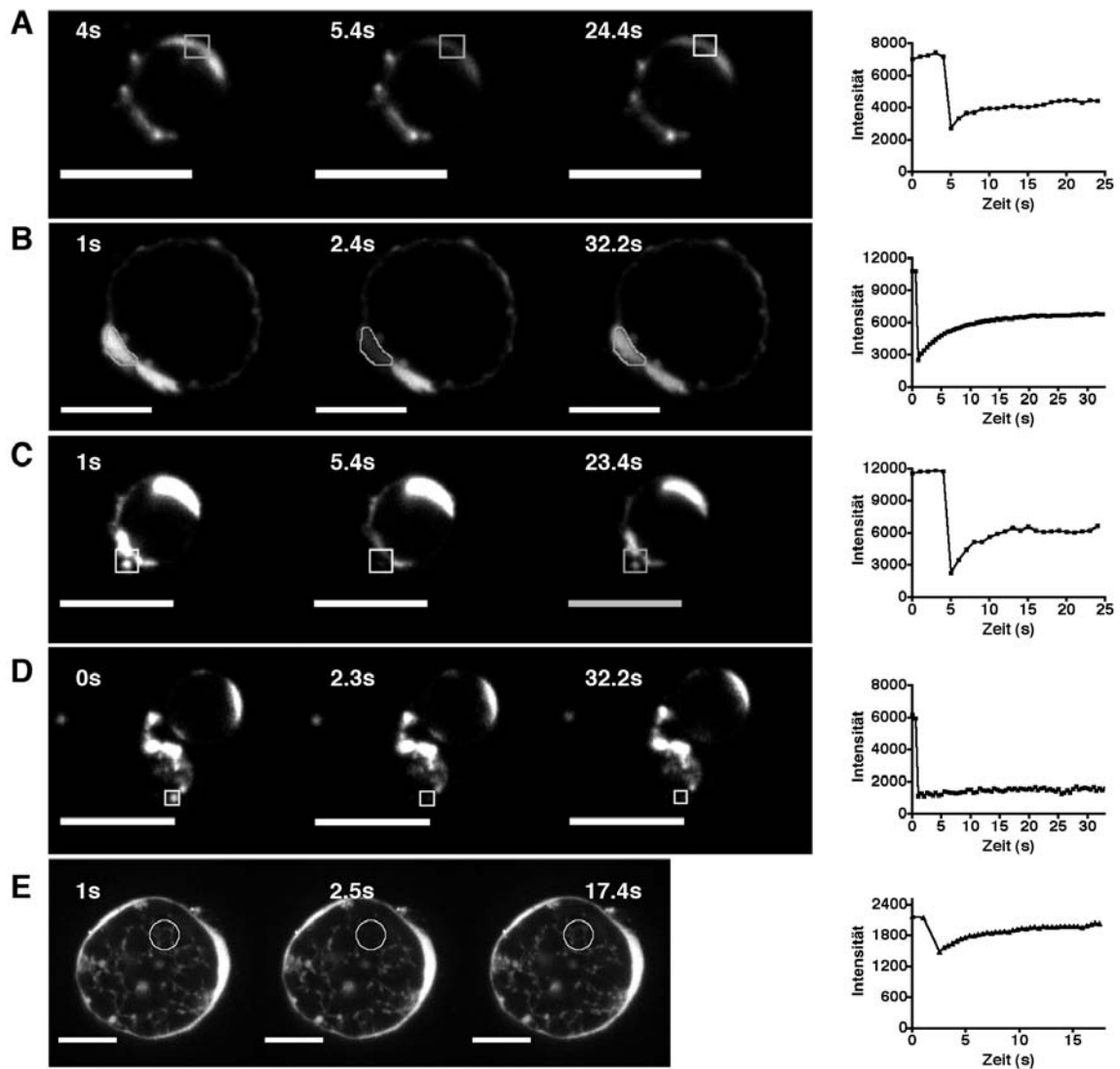


Abbildung 4-38 Der Austausch von Material in der PVM lässt sich mit der FRAP Analyse verfolgen

Die FRAP Analyse der PVM in mit *uis4mCherry* Parasiten infizierten HuH7 Zellen zeigt, dass der Austausch in der PVM nach 24h (A) und 48h (B) Entwicklung schnell stattfindet. Der Austausch in den PVM-Ausläufern kann am Ansatz (C) schnell vollzogen werden wohingegen kein Austausch an der Spitze des Ausläufers (D) erfaßt werden kann. Im UIS4mCherry Netzwerk in 48h Stadien (E) findet ein schneller Austausch statt. Die gezeigten Daten wurden mit dem *Spinning Disk* Mikroskop erzeugt. Skalierungsbalken = 10µm.

Eine schnelle *recovery* spricht für einen schnellen Austausch des UIS4 Proteins und somit wahrscheinlich auch von anderen PVM Proteinen in der parasitophoren Vakuole. In 48h Leberstadien wurde bei der Auswahl einer kleinen ROI von ca. 10µm x10µm ein ebenso schneller Austausch gezeigt (Abbildung 4-38 B). Zu diesem Zeitpunkt waren teilweise

stark vergrößerte mCherry-positive Vakuolenräume innerhalb der PVM vorhanden (siehe 4.3.4). Das komplette Bleichen einer solchen Struktur ergab erstaunlicherweise eine fast komplette Wiederherstellung des Signals innerhalb von 10 Sekunden was bedeutet dass auch große Bereiche relativ schnell wieder mit UIS4mCherry aufgefüllt werden können (Abbildung 4-38 B).

2. + 3. Ausläufer (24h)

Im nächsten Schritt wurden die dicken PVM-Ausläufer sowohl am Ansatz (wo sie aus der PVM heraustreten) sowie an der Spitze gebleicht. Interessanterweise konnte das Signal am Ansatz der Ausläufer, also in direkter Nähe zur PVM, fast komplett wiederhergestellt werden. Das würde bedeuten, dass die Ausläufer im Ansatz mit der PVM verbunden sind und so UIS4mCherry Proteine stetig nach diffundieren können. Im Gegensatz dazu konnte beim Bleichen der Spitze der Ausläufer keine Signalwiederherstellung gemessen werden was dafür spricht dass die dicken Ausläufer Strukturen nicht durchgängig mit der PVM verbunden sind sondern eher als abgeschnürte Bereiche vorliegen (Abbildung 4-38 C, D).

Aufgrund der hoch-dynamischen Natur der dünnen Ausläufer konnten sie nicht mit der FRAP-Technik analysiert werden, da die ROI durch deren schnelle Bewegung nicht eindeutig lokalisiert werden konnte.

4. Strukturen im Inneren des Parasiten (48h)

Bei den 48h Zeitpunkten wurden teilweise feine Netzwerke innerhalb des Parasiten als mCherry positiv beschrieben. Möglicherweise waren diese feinen Strukturen aus der PVM entstanden und durch Einstülpungen gebildet. Im Folgenden wurden kleine Regionen solcher Strukturen gebleicht. Auch in diesen Strukturen fand ein sehr schneller Austausch statt, da die Regionen innerhalb von ca. 4 Sekunden wieder Fluoreszenzsignale aufwiesen (Abbildung 4-38 E). Damit ist bestätigt, dass diese Netzwerke aus durchgängigen Strukturen aufgebaut sind, die einen schnellen Austausch von Material gewährleisten.

4.4 PVM Dynamik in *P.berghei* Mutanten mit einem Defekt in der Leberstadienentwicklung

Die Fusion des UIS3 oder UIS4 Proteins an das fluoreszierende mCherry Protein ermöglichte bislang das Studieren der UIS3 bzw. UIS4 Lokalisation im Parasiten und diente als Marker für die Visualisierung der PVM im WT Hintergrund. Dieses System kann man jedoch auch nutzen um Mutanten mit einem Defekt in der Leberstadien-Entwicklung näher zu charakterisieren. Dabei kann man sowohl die PVM Bildung als auch die im WT beobachtete PVM Dynamik näher betrachten.

Neben den bereits beschriebenen *uis3(-)* und *uis4(-)* sollten auch die *p36p(-)/p36(-)* Mutante in Hinblick auf diese Fragestellung analysiert werden. Um die PVM zu visualisieren wurden folgende Konstrukte kloniert und transfiziert:

Tabelle 4-4 Generierte Fusions/Knockout Parasiten

	<i>uis3mCherry</i> <i>hDHFR</i>	<i>uis4mCherry</i> <i>hDHFR</i>	<i>uis4mCherry/</i> <i>uis3(-)</i>	<i>uis3mCherry/</i> <i>uis4(-)</i>		
Transfiziert in	<i>p36p(-)/p36(-)</i>	<i>uis3(-)</i>	<i>p36p(-)/</i> <i>p36(-)</i>	WT ANKA GFP	WT	WT
Parasiten Stamm:					ANKA	ANKA
					GFP	
Integration	✗	✗	✓	✓	✗	✗
Transfektions- wiederholungen	1x	3x	1x	1x	1x	1x
mCherry Signal			✓	✓		
PVM Struktur			✗	✓		
PVM Dynamik			✗	✓		

4.4.1 PVM Visualisierung in *uis3(-)* Parasiten

4.4.1.1 Transfektion in den *UIS4* Locus in *uis3(-)* Parasiten

Aus dem *uis4mCherry* Transfektionsvektor (Abbildung 4-1) wurde ein Konstrukt generiert, welches anstelle der *TgDHFR/TS* Resistenzkassette eine *hDHFR* Kassette für die Selektion mit WR99210 beinhaltet. Dafür wurde die *DHFR/TS* Kassette aus dem *uis4mCherry/Tgdhfr/ts* Konstrukt mit der *hDHFR* Kassette ausgetauscht. Somit kann dieses Konstrukt in Parasiten eingebracht und selektioniert werden, die bereits eine

TgDHFR/TS Resistenzkassette besitzen. Von der mit dem Restriktionsenzym *HpaI* linearisierten Plasmid-DNA der *UIS4mCherry-hdhfr*-Minipräparation wurde 5 µg DNA durch Elektroporation in aufgereinigte Schizonten des *P.berghei uis3(-)* GFP-507 cl bzw. *uis3(-)* NK65 eingebracht. Die Selektion der Parasiten wurde hier mit i.p.-Injektionen von WR99210 durchgeführt.

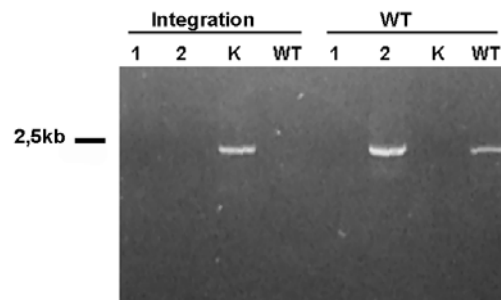


Abbildung 4-39 Integrationsspezifische PCR-Analyse der parentalen *uis3(-)/uis4mCherry* Populationen

Gezeigt ist die PCR-Analyse mit der Integrations-spezifischen Primerkombination Test1 (Integration), die keine Integration am *UIS4*-Locus in Population 1+2 zeigen konnten. In der Kontrolle K (*uis4mCherry* Klon) konnte das Integrations-spezifische Fragment amplifiziert werden. Mit der WT-spezifischen Oligonukleotidkombination kann ein Fragment in Population 2 sowie im WT amplifiziert werden.

Die Genotypisierung der isolierten Parasiten-Populationen konnte dabei allerdings keine Integration des Konstruktes bestätigen (Abbildung 4-39). Die verwendeten Primerkombinationen entsprachen Test1 und WT-Test aus Abbildung 4-1. Die Transfektionen wurden insgesamt 3x wiederholt, jedoch ohne eine Integration nachweisen zu können (Tabelle 4-4). Möglicherweise war die Selektion mit WR99210 anstelle der oralen Pyrimethamin-Gabe ein Grund für die erfolglose Transfektion. Die Generation einer Doppelmutante mit diesem Selektionsmarker stellte sich häufiger als kritisch dar. Demgemäß sollte ein Konstrukt mit dem ein Fusionsprotein und gleichzeitig ein Knockout generiert werden konnte erprobt werden.

4.4.1.2 Klonierung und Transfektion des *uis4mCherry/uis3(-)*-

Konstruktes

Für das *uis4mCherry/uis3(-)* Konstrukt wurde folgende Strategie verwendet (Abbildung 4-40). Die *UIS4mCherry* Fusionssequenz wurde von einer Sequenz aus der 5'UTR und 3'UTR des *UIS3* Proteins flankiert, so dass die *UIS4mCherry* Sequenz in den *UIS3* Locus integriert und so eine neue *uis3(-)* Linie generiert wird.

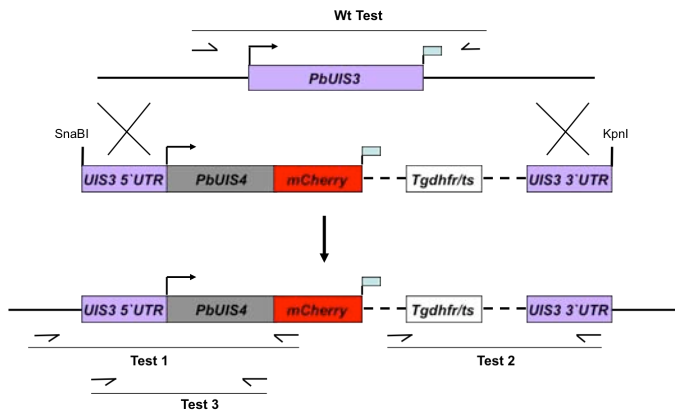


Abbildung 4-40 Schematische Darstellung der Integrationsstrategie für die *uis4mCherry/uis3(-)* Parasiten

Oben ist der Wildtyp-Locus des endogenen *UIS3*-Gens dargestellt. Der Pfeil zeigt das Startcodon und die Fahne das Stoppcodon. Die kleinen Pfeile zeigen die spezifischen Oligonukleotidkombinationen zum Nachweis der Integration Test1 (*PyUIS4PromRev/P.b.UIS3-test for 5*) und Test2 (*TgPromRev/P.b.UIS3-test Rev*) sowie des Episoms Test3 (*P.b.UIS4Rev/P.b.UIS3for*) und des Wildtyp-Locus (*UIS3forSacII/UIS3revXbaI*).

Die so gewonnene Mini-Präparation wurde mit den Enzymen *SacII* und *KpnI* linearisiert und durch Elektroporation in aufgereinigte Schizonten des *P.berghei* GFP-507 cl Stamm eingebracht. Die Selektion konnte hier mit oraler Pyrimethamin-Gabe erzielt werden. Die selektierten Parasiten-Populationen wurden isoliert und genotypisiert. Die Integration in den *UIS3* Locus konnte dabei mit den spezifischen Primerkombinationen Test1 und Test2 gezeigt werden (Abbildung 4-41).

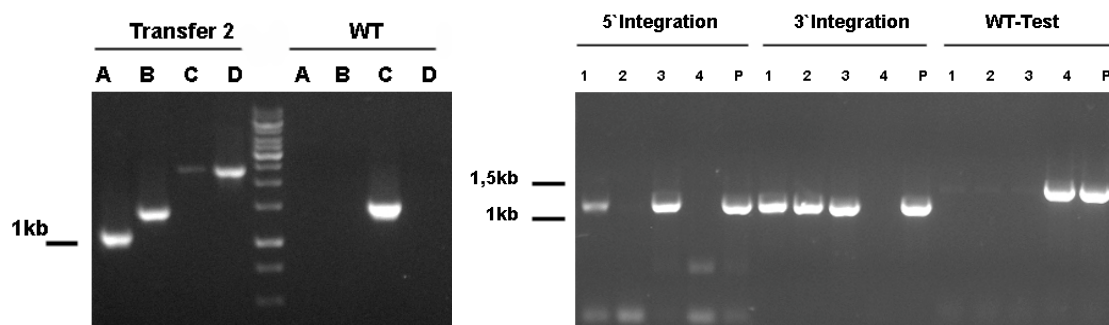


Abbildung 4-41 Integrationsspezifische PCR-Analyse der parentalen und klonalen *uis4mCherry/uis3(-)* Populationen

Die PCR-Analyse mit den Primerkombinationen Test1 (A) und Test2 (B) zeigen die erfolgreiche Integration am *UIS3*-Locus in Population Transfer. Die Primerkombination Test 3 (D) detektiert das Integrationskonstrukt, WT-spezifischen Oligonukleotidkombination (C) den Wildtyp-Locus. Nach der Klonierung (links) kann nur in der parentalen Population sowie in Population 4 ein WT-spezifisches Fragment amplifiziert werden was den klonalen Ursprung der rekombinanten *uis4mCherry/uis3(-)* Parasiten aus Population 1+3 (5`und 3`Integration gezeigt) bestätigt.

Mit der parentalen Population aus Maus # Transfer 1 ANKA-GFP wurde eine Klonierung durchgeführt, um auf eine klonale Population zu selektionieren, die nur aus *uis4mCherry/uis3(-)* Parasiten besteht. Die Genotypisierung der erhaltenen Parasiten-Populationen ergab, dass 2 klonale Parasiten-Populationen generiert werden konnten. Population # 1 wurde dabei für die folgende Charakterisierung verwendet.

4.4.1.3 Die Bildung und Dynamik der PVM in *uis4mCherry/uis3(-)*

Parasiten

Die phänotypische Analyse der *uis4mCherry/uis3(-)* Parasiten konzentrierte sich auf die Moskito- sowie Leberstadienentwicklung der Parasiten. Eine *uis4mCherry/uis3(-)* Blutstadien-positive Maus wurde bei erfolgter Exflagellation auf Moskitos transferiert und zunächst die Moskito-Entwicklung verfolgt. Wie zu erwarten war, konnten sowohl Mitteldarm als auch Speicheldrüsen-Sporozoiten vergleichbar zu WT gebildet werden, da *uis3(-)* Parasiten keinen Defekt in der Moskito-Entwicklung zeigten.

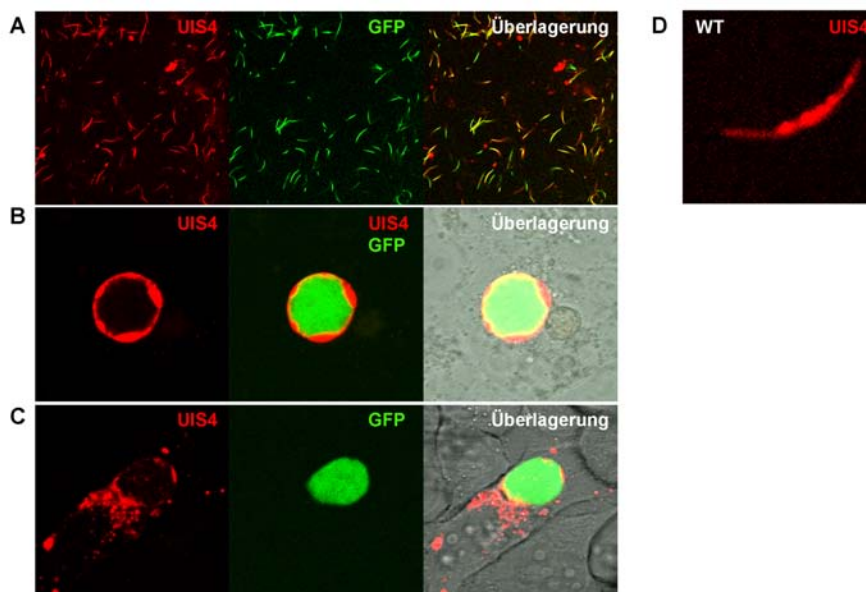


Abbildung 4-42 Die Lokalisation von UIS4 ist in *uis3(-)* Parasiten nicht beeinträchtigt

Immunfluoreszenzen von *uis4mCherry/uis3(-)*-Speicheldrüsen-Sporozoiten (A) sowie 48h EEFs in HuH7 (B) und HeLa Zellen (C) wurden mit dem konfokalen Mikroskop erzeugt. Hier kann die UIS4 Expression in allen Stadien gezeigt werden. UIS4 lokalisiert in Sporozoiten in *uis3(-)* Parasiten (A) gleichmäßig im Zytoplasma, wohingegen in WT Parasiten (D) definierte Bereiche zu erkennen sind.

Die Speicheldrüsen-Sporozoiten zeigten allerdings eine veränderte UIS4 Lokalisation. Wohingegen das mCherry Signal in WT Sporozoiten in definierten Bereichen zu finden war (Abbildung 4-42 D), lokalisierte das UIS4 Protein in *uis3(-)* Sporozoiten gleichmäßig im Zytoplasma (Abbildung 4-42 A).

Im folgenden wurden HuH7 und HeLa Zellen mit *uis4mCherry/uis3(-)* Sporozoiten infiziert und die EEF Entwicklung sowohl in fixierten Proben als auch in *live cell imaging* Analysen verfolgt. Dabei fiel zunächst in fixierten Proben auf, dass die Entwicklung bis zum 24h-Zeitpunkt nicht betroffen war. Sowohl die Größe als auch die PVM Struktur erschienen normal.

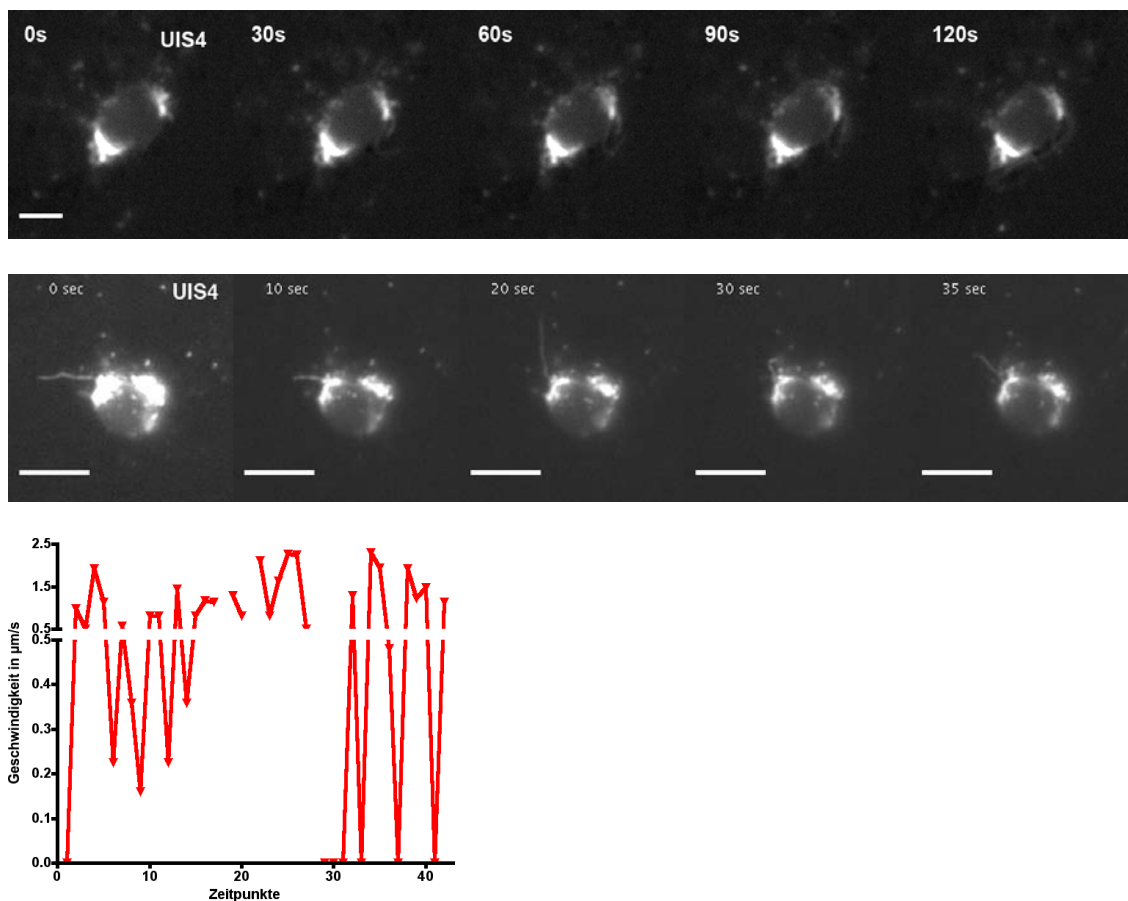


Abbildung 4-43 *uis3(-)* Parasiten können eine funktionale PVM sowie PVM-Ausläufer ausbilden

Videosequenzen von *uis4mCherry/uis3(-)* Parasiten nach 24-stündiger Entwicklung in HuH7 (oben) und HeLa Zellen (unten) zeigen die dynamischen PVM-Ausläufer. Die graphische Darstellung der Geschwindigkeiten der Ausläufer in HeLa Zellen bestätigt die hohe Dynamik dieser Strukturen. Skala = $10\mu\text{m}$.

Um auch die PVM Dynamik zu beschreiben wurden *live cell imaging* Analysen durchgeführt. Interessanterweise konnten die bisher beobachtete PVM Dynamik sowie die Ausläufer auch in dieser Mutante gezeigt werden was bedeutet, dass diese Strukturen nicht auf das UIS3 Protein angewiesen sind (Abbildung 4-43). Die PVM Strukturen konnten dabei wieder als dünne, dicke und Vesikel-artige Ausläufer beschrieben werden. Zusätzlich ergab eine Auswertung der Geschwindigkeit der dünnen Ausläufer in infizierten HeLa Zellen, dass eine maximal Geschwindigkeit von 2,9µm/sec erreicht wurde (Abbildung 4-43). Dieser Wert übertrifft sogar noch die max. Geschwindigkeit, die in *uis4mCherry* Parasiten bisher erreicht wurde.

In Bezug auf die spätere Leberstadien-Entwicklung konnte in fixierten Proben gezeigt werden, dass der Parasit sofern er zu Leberschizonten differenzieren konnte, eine „normale“ PVM in HuH7 Zellen ausbildete. Bei der Entwicklung zu späten Stadien in HeLa Zellen wurden hingegen noch immer PVM-Ausläufer gebildet, die teilweise weit ins Zytoplasma der Wirtszelle hineinragten (Abbildung 4-42 B, C).

Allerdings war nur ein kleiner Prozentsatz der Parasiten überhaupt in der Lage zu Leberschizonten zu differenzieren. Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit der Tatsache, dass ein kleiner Teil der *uis3(-)* Parasiten *in vitro* entwicklungsfähig ist, jedoch keine *in vivo* Entwicklung in der Maus vollziehen kann. Um diesen Defekt zu bestätigen wurden 3 C57BL/6 Mäuse mit 10.000, 50.000 bzw. 70.000 *uis3(-)/uis4mCherry* Sporozoiten infiziert. Wie erwartet, wurde keine der Mäuse Blutstadien-positiv was bestätigt, dass es sich bei der generierten Mutante tatsächlich um *uis3(-)* Parasiten handelt (Daten nicht gezeigt).

4.4.1.4 Der Kontakt der PVM-Ausläufer zum Golgi-Apparat kann auch in *uis4mCherry/uis3(-)* Parasiten aufgebaut werden

Da der Aufbau der PVM sowie die Ausbildung der Ausläufer unabhängig von UIS3 zu sein scheint sollte im Folgenden getestet werden ob die Parasiten/Golgi Interaktion ebenfalls ohne UIS3 etabliert werden kann. In Analogie zu den beschriebenen Experimenten (siehe 4.3.8) wurden HeLa Zellen mit *uis4mCherry/uis3(-)* Parasiten infiziert und der Golgi-Apparat mit Golgin-GFP und Mannosidase-YFP-Fusionskonstrukten visualisiert.

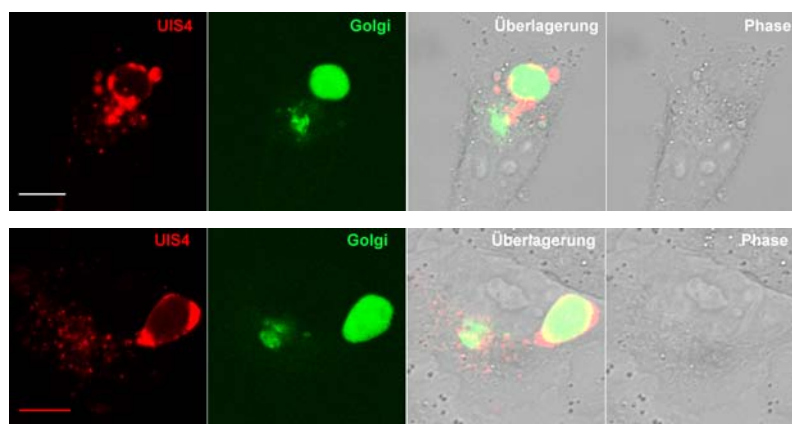


Abbildung 4-44 Der Kontakt der PVM zum Golgi-Apparat ist unabhängig von UIS3

Immunfluoreszenzen von *uis4mCherry/uis3(-)*infizierten HeLa Zellen (26h nach Infektion), in denen der Golgi-Apparat durch *Golgin84-GFP* visualisiert wurde. Sowohl die dicken PVM-Ausläufer (rot) als auch die PVM-Vesikel (rot) nehmen Kontakt zum Golgi-Apparat (grün) auf.

Die PVM-Ausläufer bzw. Vesikel der frühen Stadien (24h) konnten in direktem Kontakt mit dem Golgi-Apparat gezeigt werden (Abbildung 4-44). Zusätzlich wurde beobachtet, dass sich der Golgi-Apparat in späteren Stadien (48h) an die PVM der Parasiten anlagert (Abbildung 4-45 C, D).

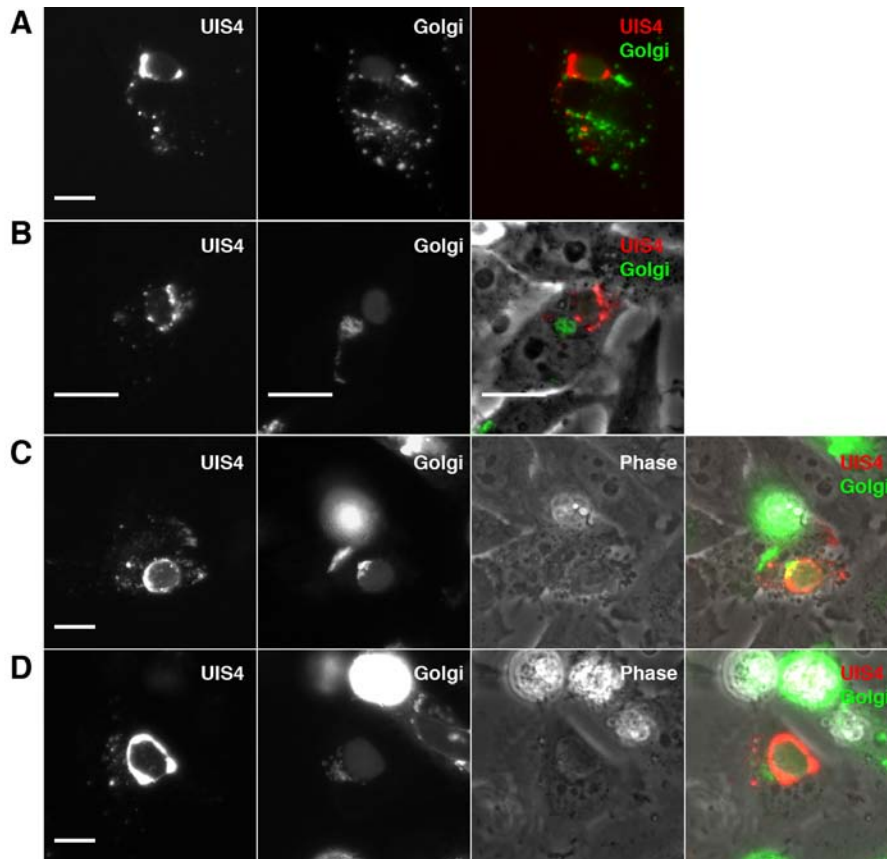


Abbildung 4-45 Der Kontakt der PVM zum Golgi-Apparat kann in frühen und späten EEFs gezeigt werden

Gezeigt sind Videosequenzen von *uis4mCherry/uis3(-)*infizierten HeLa Zellen, in denen der Golgi-Apparat durch *Golgin84-GFP* (A, B) bzw. *Mannosidase-YFP* (C, D) visualisiert wurde. Der Kontakt der PVM/PVM-Ausläufer (rot) zum Golgi-Apparat (grün) kann in 24h (A, B) und 44h Stadien (C, D) gezeigt werden. Skalierungsbalken = 10µm.

4.4.2 PVM Visualisierung in *uis4(-)* Parasiten

4.4.2.1 Klonierung des *uis3mCherry-hdhfr*-Transfektionskonstruktes

In Analogie zur Klonierung des *UIS4mCherry-hdhfr* Konstruktes wurde aus dem *UIS3mCherry* Transfektionskonstrukt (Abbildung 4-1) ein *uis3mCherry/hdhfr* Konstrukt generiert, welches die *hDHFR* Kassette für die WR99210 Selektion beinhaltet. Die Linearisierung der Plasmid-DNA des *mCherry-hDHFR*-Vektors wurde mit dem Restriktionsenzym *SnaBI* durchgeführt.

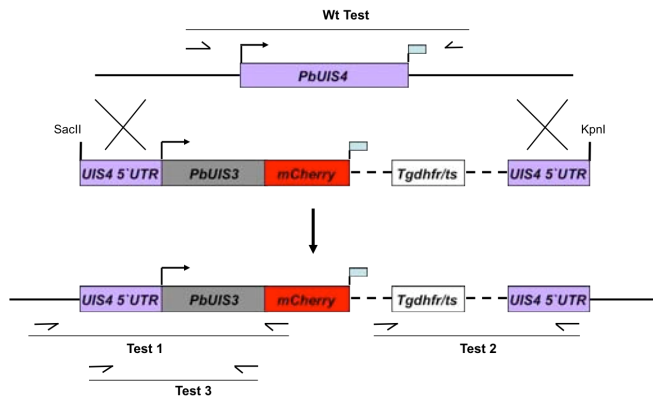


Abbildung 4-46 Schematische Darstellung der Integrationsstrategie für die *uis3mCherry/uis4(-)* Parasiten

Oben ist der Wildtyp-Locus des endogenen *UIS4*-Gens dargestellt. Der Pfeil zeigt das Startcodon und die Fahne das Stoppcodon. Die kleinen Pfeile zeigen die spezifischen Oligonukleotidkombinationen zum Nachweis der 5'Integration Test1 (*uis4Pb5`UTRtestfor/uis35`UTRNotIrev*) und (*uis4forNotI/uis35`UTRNotIrev*), der 3'Integration Test2 (*TgPromRev/uis4testPb3`UTRrev*) und die Episomtests Test3 (*uis45`UTRforSacII/uis35`UTRNotIrev*) und (*uis4_3`UTRKpnIrev/TgPromrev*) sowie des Wildtyp-Locus (*uis4ORFforSacII/uis43`UTRrev*).

4.4.2.2 Klonierung des *uis3mCherry/uis4(-)*-Konstruktes und Transfektion in den *UIS4* Locus

Für das *uis3mCherry/uis4(-)* Konstrukt wurde folgende Strategie verwendet:

Die *UIS3mCherry* Fusionssequenz wurde von einer Sequenz aus der 5'UTR und 3'UTR des *UIS4* Proteins flankiert, so dass die *UIS3mCherry* Sequenz in den *UIS4* Locus integriert und so eine *uis4(-)* Linie generiert würde. Der so gewonnene *targeting*-Vektor wurde mit den Enzymen *SacII* und *KpnI* linearisiert und durch Elektroporation in aufgereinigte Schizonten des *P.berghei* ANKA-507 cl Stamm eingebracht. Die Selektion wurde mit oraler Pyrimethamin-Gabe erzielt. Die selektierten Parasiten-Populationen wurden isoliert und genotypisiert. Die Integration in den *UIS4* Locus wurde dabei mit den spezifischen Primerkombinationen Test1 (5'Integration) und Test2 (3'Integration) getestet. Auch nach einer wiederholten Transfektion konnte keine Integrations-spezifische Bande sondern nur das unspezifische Vorliegen des Konstruktes (Episomtest) nachgewiesen werden.

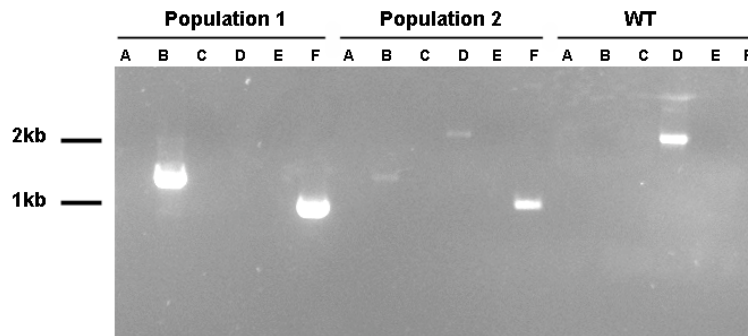


Abbildung 4-47 Integrationsspezifische PCR-Analyse der parentalen *uis3mCherry/uis4(-)* Populationen

Die PCR-Analyse mit den Primerkombinationen Test1 (A, E) und Test2 (C) konnte keine Integration am *UIS4*-Locus aufzeigen. Das WT-spezifische-PCR-Fragment (D) zeigt sich in Population 2. Das Vorliegen des Konstruktes wurde in beiden Populationen mit dem Episomtest 3 (B) und (F) bestätigt.

4.4.3 PVM Visualisierung in *p36p(-)/p36(-)* Parasiten

4.4.3.1 Transfektion der *UIS3*- und *UIS4*-Fusionskonstrukte in *p36p(-)/p36(-)* Parasiten

Die *UIS3*- und *UIS4*-Konstrukte (siehe 4.4.1.1 und 4.4.2.1) wurden durch Elektroporation in Schizonten des *P.berghei* Stammes *p36p(-)/p36(-)* ANKA GFP-507cl transfiziert. Die Selektion erfolgte dabei mit i.p.-Injektionen von WR99210. Die so selektionierten Parasiten-Populationen wurden nach der Isolierung genotypisiert und auf eine Integration in den *UIS3* bzw. *UIS4* Locus getestet (Primerkombinationen siehe Abbildung 4-1).

Weder bei den parentalen noch bei den Transfer-Populationen konnte eine Integration in den *UIS3* Locus nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise war auch hier die Selektion mit WR99210 als kritisch zu betrachten, so dass keine rekombinante Population sondern nur WT selektioniert wurde.

Der Versuch eine *p36p(-)/p36(-)/uis4mCherry* Mutante zu generieren war jedoch erfolgreich. In der Transfer-Population #3 konnte mit der Integrations-spezifischen Kombination Test1 ein Fragment amplifiziert werden (Abbildung 4-48). Mit der Population aus Maus #3 wurde 3x ein Transfer mit nachfolgender WR99210-Behandlung durchgeführt. Mit der Population Transfer3 #3 wurde eine Klonierung durchgeführt, um auf eine klonale Population zu selektionieren, die nur aus *p36p(-)/p36(-)/uis4mCherry*

Parasiten besteht. Dabei konnten insgesamt 2 Populationen in denen nur wenig WT amplifiziert werden konnte bestätigt werden. Die phänotypische Analyse wurde mit Populationen # 1 durchgeführt.

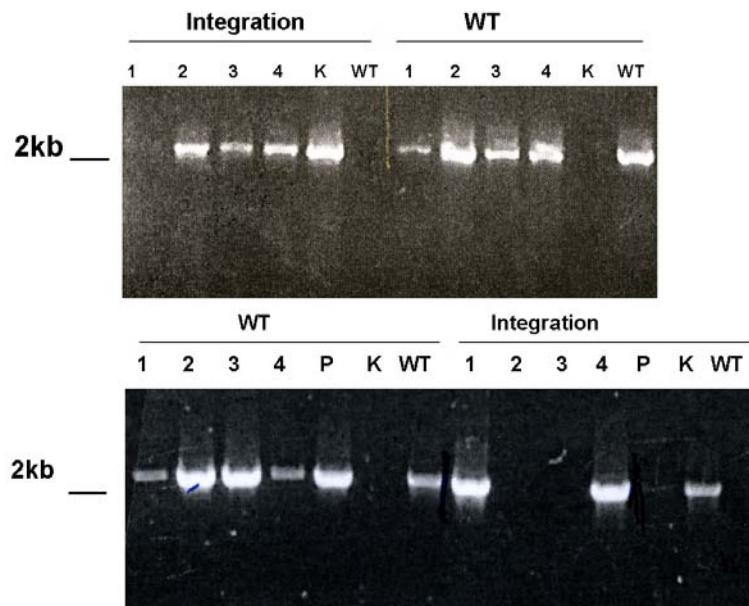


Abbildung 4-48 Integrationsspezifische PCR-Analyse der parentalen und klonalen *p36p(-)/p36(-)/uis4mCherry* Populationen

Die PCR-Analyse mit der Primerkombination Test1 kann die erfolgreiche Integration am *UIS4*-Locus in den Transfer # 3 Populationen (2-4) bestätigen (**oben**). Das WT-spezifische-PCR-Fragment zeigt sich in allen Populationen (1-4). Es ist nur ein geringer Anteil des WT-spezifischen-PCR-Fragments in den rekombinanten *p36p(-)/p36(-)/uis4mCherry* Populationen 1+4 nach der Klonierung vorhanden (**unten**), weshalb Population 1 für die weitere phänotypische Charakterisierung der Parasiten verwendet wurde. (K= *uis4mCherry* Klon)

4.4.3.2 Charakterisierung der *uis4mCherry/p36p(-)/p36(-)* Mutante

Zunächst sollte getestet werden ob die generierte Mutante im Entwicklungszyklus einen Defekt aufweist. Dafür wurde eine Blutstadien-positive Maus durch eine Blutmahlzeit auf Moskitos transferiert und daraufhin die Entwicklung im Moskito verfolgt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Mutante sowohl Mitteldarm- als auch Speicheldrüsen-Sporozoiten bilden konnte. Die absoluten Zahlen waren dabei vergleichbar mit WT Parasiten (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurde die Infektiosität der Mutante durch i.v.-Injektion von Speicheldrüsen-Sporozoiten (10.000-200.000) in C57BL/6 Mäuse überprüft. Wie erwartet (van Dijk *et al.*, 2005) konnte keine Blutstadien-Infektion etabliert

werden (Tabelle 4-5). In Bezug auf die *in vitro* Entwicklung in Hepatozyten Kulturen wurde jedoch ein abweichendes Ergebnis erzielt. In den transgenen Mutanten konnte die Leberstadien-Entwicklung vollzogen werden und sowohl Leberschizonten als auch Merozoiten gebildet werden (Tabelle 4-5). Gleichwohl konnte nur ein sehr geringer Anteil der Parasiten diese Entwicklung vollziehen (verglichen mit WT Parasiten).

Tabelle 4-5 Entwicklungsvermögen der *uis4mCherry/p36(-)/p36(-)* Parasiten

24h Leberstadien <i>in vitro</i>	48h Leberstadien <i>in vitro</i>	72h Leberstadien <i>in vitro</i>	Entwicklung in der Maus <i>in vivo</i>
✓	✓	✓	✗

4.4.3.3 Die Bildung und Dynamik der PVM in *p36p(-)/p36(-)* Parasiten

Im nächsten Schritt wurden die Parasiten hinsichtlich der UIS4 Lokalisation und daraus ersichtlich der PVM Bildung und Dynamik untersucht. Zunächst wurden Mitteldarm- sowie Speicheldrüsen-Sporozoiten mit dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. Dabei konnte in Mitteldarm-Sporozoiten kein Signal und in Speicheldrüsen-Sporozoiten ein punktiertes Lokalisations-Muster des UIS4mCherry Fusionsproteins gezeigt werden (Abbildung 4-49).

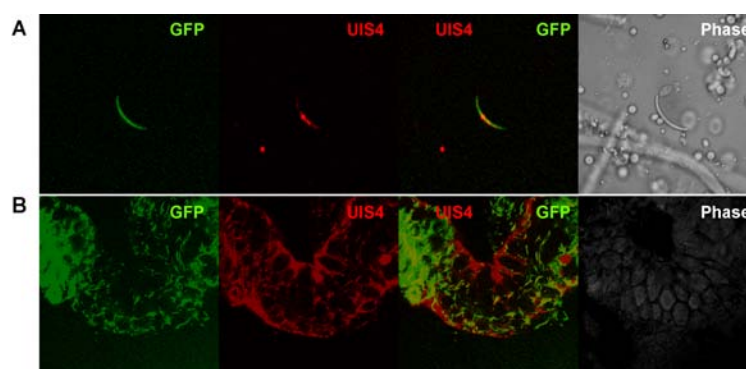


Abbildung 4-49 Immunfluoreszenzen in Mosquito-Stadien

Die Expression von UIS4 kann in *p36p(-)/p36(-)/uis4mCherry* Speicheldrüsen-Sporozoiten (A) sowie in kompletten Speicheldrüsen (B) nachgewiesen werden. Die UIS4 Lokalisation entspricht der Lokalisation in WT Sporozoiten.

Um die PVM Bildung und Dynamik zu untersuchen, wurden HuH7 Zellen mit *uis4mCherry/p36p(-)/p36(-)* Sporozoiten infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten entweder fixiert und für IFA verwendet oder *live cell imaging* Analysen durchgeführt. Die untersuchten Zeitpunkte lagen dabei zwischen 6 und 72 Stunden nach Infektion um die komplette Leberstadien-Entwicklung in Bezug auf die PVM Bildung abzudecken.

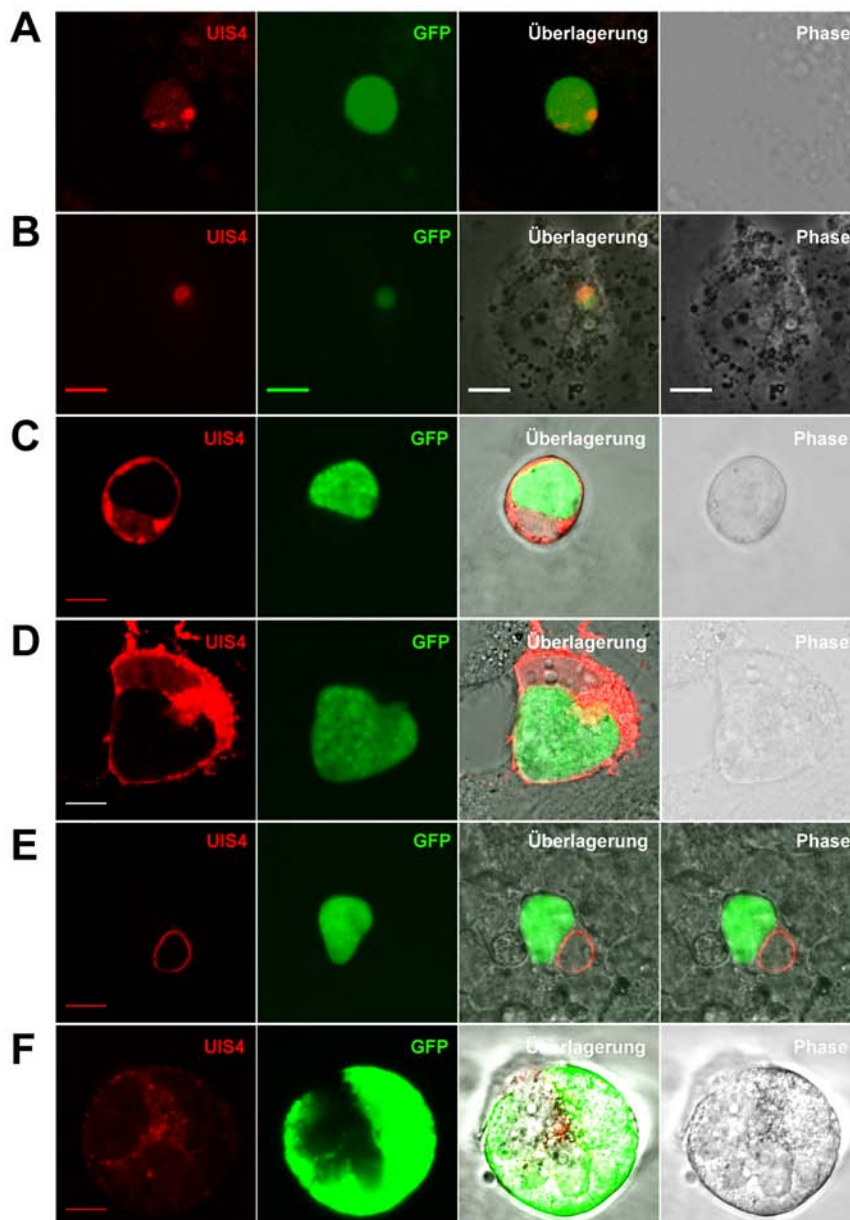


Abbildung 4-50 Die PVM der *p36p(-)/p36(-)* Parasiten wird in 24-72h Leberstadien atypisch gebildet

Immunfluoreszenzen von *p36p(-)/p36(-)/uis4mCherry* Leberstadien zeigen die PVM-Ausbildung. Die PVM-Bildung zeigt einen Defekt in 20h (A, B), 48h (C-E) und 70h (F) Leberstadien. Skala = 10µm.

Frühe Zeitpunkte

Die Phase der Sporozoiten-Transformation verlief vergleichbar zu WT Parasiten. Dabei war das UIS4mCherry Signal gleichmäßig im Zytoplasma verteilt. Bei der Beobachtung der frühen Leberstadien-Entwicklung ab 15h nach Infektion fiel auf, dass die generierte Mutante eine abweichende PVM Färbung (durch das UIS4mCherry Protein visualisiert) und somit eine veränderte PVM Struktur zeigte. Dabei konnte zwischen 5 Populationen unterschieden werden.

1. Ein Teil der Parasiten zeigte ein mCherry Signal als Ring im Inneren der Parasiten. Diese Struktur könnte einer unvollständigen ausgebildeten und im Inneren liegenden PVM in der *p36p(-)/p36(-)*-Mutante entsprechen (Abbildung 4-50 B)
2. Teilweise konnte ein mCherry Signal als Kappe, die auf den Parasiten zu liegen schien gezeigt werden (Abbildung 4-51 A).
3. Ein Teil der Parasiten zeigten lediglich ein mCherry Signal welches als Punkt am Rand des Parasiten zu finden war. Außer diesem Signal war kein UIS4 Signal zu detektieren was dafür spricht, dass die korrekte UIS4 Lokalisierung in der PVM in dieser Mutante beeinträchtigt ist (Abbildung 4-51 C).
4. Teilweise waren mehrere dieser Punkte an der Parasitenoberfläche sowie im Inneren des Parasiten zu erkennen. Das Zytoplasma des Parasiten erschien dabei als ungleichmäßig punktiert mCherry-positiv (Abbildung 4-51 D).
5. Ein kleiner Teil der Parasiten zeigte jedoch das typische den Parasiten umrundende PVM Signal, was für eine korrekte PVM Ausbildung spricht.

Bemerkenswerterweise konnte bei keinem der Parasiten die typischen PVM-Ausläufer Strukturen beobachtet werden.

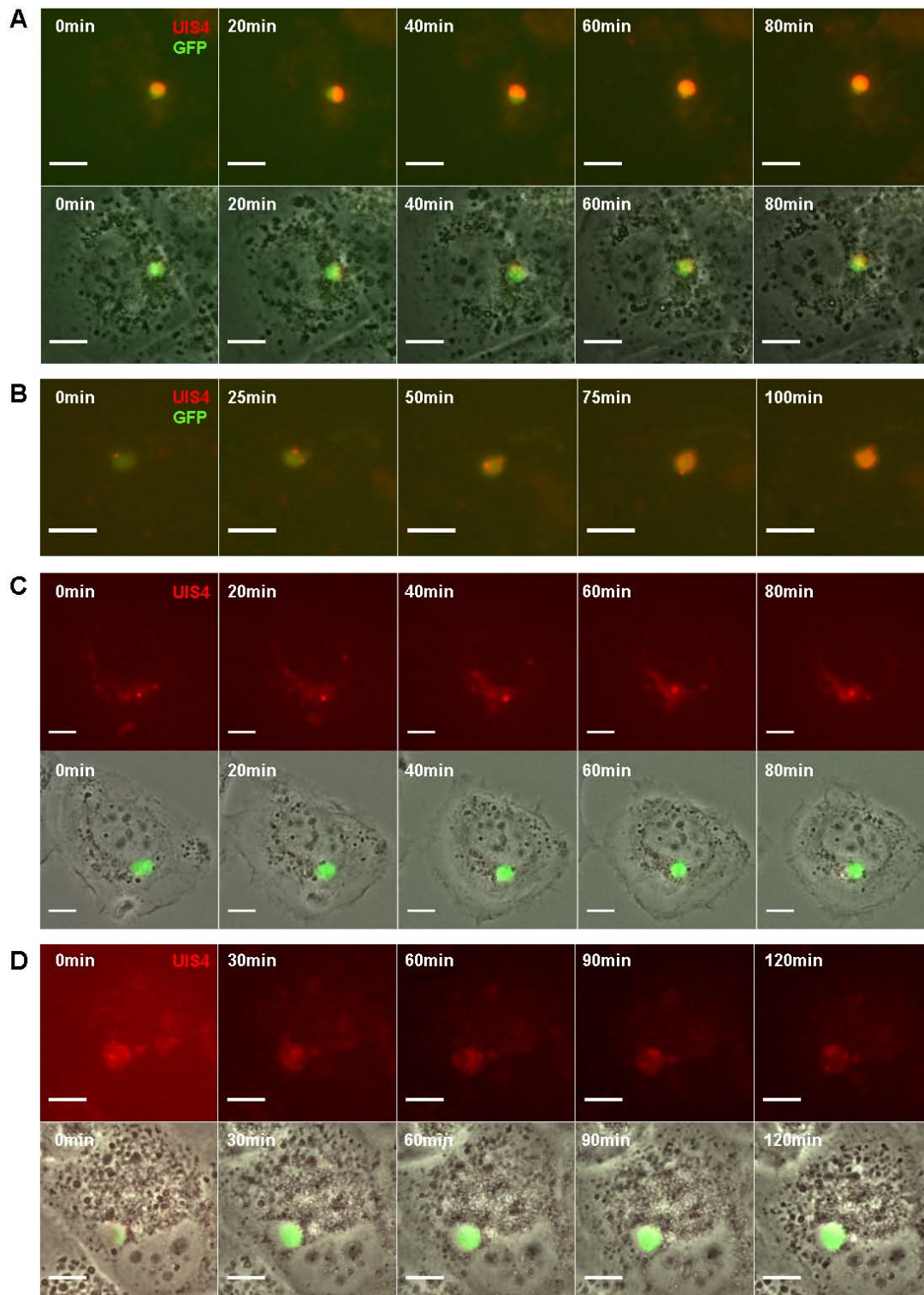


Abbildung 4-51 Die Ausbildung der PVM ist in *p36p(-)/p36(-)/uis4mCherry* Parasiten beeinträchtigt

In Videosequenzen von *p36p(-)/p36(-)/uis4mCherry* Parasiten kann die PVM-Ausbildung in der frühen Leberstadienentwicklung (15-26h) verfolgt werden. Skala = 10μm.

Späte Zeitpunkte

Der Anteil der Parasiten, der sich bis in die spätere Leberphase entwickeln konnte, zeigte ebenfalls eine atypische PVM Struktur. Bei manchen Parasiten erschien der PV-Raum als mCherry-gefüllte Blase (Abbildung 4-50 C, D), jedoch konnte keine typische PVM Färbung um den Parasiten herum gezeigt werden (Abbildung 4-50).

Demzufolge weist die *p36p(-)/p36(-)* Mutante einen eindeutigen Defekt in der PVM Ausbildung auf, was die Funktion von P36p und P36 für die PVM-Struktur vermuten lässt.

Einige der in dieser Arbeit gezeigten Videosequenzen liegen dieser Arbeit als Originalvideo auf DVD bei und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 4-6 Originalvideos der in dieser Arbeit gezeigten Videosequenzen

Abbildung	Video
4-5b	Video 1
4-5c	Video 2
4-12a	Video 3
4-12b	Video 4
4-12c	Video 5
4-13a	Video 6
4-13b	Video 7
4-13c	Video 8
4-16	Video 9
4-17	Video 10
4-22b	Video 11
4-23a	Video 12
4-23b	Video 13
4-23c	Video 14
4-26b	Video 15
4-29	Video 16
4-38a	Video 17
4-38b	Video 18
4-38c	Video 19
4-38d	Video 20
4-38e	Video 21
4-43a	Video 22
4-43b	Video 23
4-51a	Video 24
4-51b	Video 25

5 Diskussion

Die Visualisierung der PVM in *Plasmodium berghei* durch die Fusion von PVM-Proteinen mit dem fluoreszierenden mCherry Protein ermöglicht zum ersten Mal die direkte Analyse der PVM in lebenden Zellen. Durch die Fusion mit dem UIS3 und UIS4 Protein konnte die PVM während der gesamten Leberstadienentwicklung verfolgt und charakterisiert werden. Interessanterweise konnten deutliche Unterschiede in der Intensität des mCherry Signals festgestellt werden, in Abhängigkeit von dem gewählten UIS-Protein bzw. der Entwicklungsstufe der Leberstadien. Das Signal des UIS4mCherry Fusionsproteins war während der gesamten Leberphase deutlich stärker als die des UIS3mCherry Proteins, was eine stärkere UIS4 Expression und somit möglicherweise unterschiedliche Funktion implizieren könnte. Im Verlauf der Leberphase konnte eine Zunahme der Intensität des UIS3mCherry Fusionsproteins erfaßt werden. Möglicherweise zeigt dies, dass das UIS3 Protein gerade in der späteren Leberstadienentwicklung eine wichtige Rolle übernimmt.

Bisher konnten PVM-Ausläufer Strukturen, die ins Wirtszytosplasma gerichtet sind, in der frühen Leberstadienentwicklung nur in fixierten Proben beschrieben werden (Mueller *et al.*, 2005b). In dieser Arbeit konnten drei verschiedene Typen der PVM-Ausläufer gezeigt werden, die sich in ihrer Dynamik stark voneinander unterscheiden. Die beobachteten dünnen PVM-Ausläufer konnten zum ersten Mal als dynamische Strukturen beschrieben werden, die zum Teil weit ins Zytosplasma der Wirtszelle hineinreichen. Die Geschwindigkeit der dünnen PVM-Ausläufer lag mit bis zu 2,5µm/sec deutlich über dem Grenzwert von 0,3µm/sec ab dem man von einer aktiven Bewegung ausgehen kann (Trinczek *et al.*, 1999)

In den *Apicomplexa Eimeria tenella* konnte durch Expression von YFP-Fusionsproteinen, die eine PV-Signalsequenz von *Toxoplasma* oder *Plasmodium* enthielten, die PV der *Eimeria* studiert werden (Shi *et al.*, 2009). Die YFP-Fusionsproteine lokalisierten in der PV. Dabei konnten drei Subkompartimente der PV gezeigt werden, die als membranöse Ausläufer im Wirtszytosplasma, membranöse Ausläufer in das PV Lumen sowie Partikelartige Körper im PV-Lumen beschrieben wurden (Shi *et al.*, 2009). Somit konnten die in dieser Arbeit beschriebenen dünnen PVM-Ausläufer auch in anderen *Apicomplexa, Eimeria*, nachgewiesen werden, so dass man von einer essentiellen Funktion ausgehen kann und die Ausläufer kein Artefakt darstellen.

Kürzlich konnte mit EM-Daten gezeigt werden, dass die Sporozoiten Metamorphose mit der Auflösung des Membran-Zytoskeletts initiiert wird (Jayabalasingham *et al.*, 2010). Unmittelbar nach der Invasion ziehen sich die distalen Enden des Sporozoiten zusammen wodurch der Parasit eine spherische Form annimmt. Dabei werden auch Organellen, die für die Invasion involviert waren, wie z.B. Mikronemen, beseitigt. Das Membran-Zytoskelett wird im Folgenden neu organisiert, so dass dichte lamellare Strukturen im Zytoplasma entstehen. Die Mikronemen werden in exozytische Vesikel verpackt und abgegeben, so dass die Parasiten nur noch Organellen enthalten, die für die Replikation notwendig sind (Jayabalasingham *et al.*, 2010). Demzufolge wurden bisher nur EM-Analysen der Sporozoiten Metamorphose angefertigt, die EEF Entwicklung wurde aber noch nicht genauer beschrieben. Somit bietet die in dieser Arbeit gezeigte EM-Analyse der PVM in frühen Leberstadien neue Erkenntnisse über die exoerythrozytäre Entwicklung der *Plasmodium berghei* Parasiten. Besonders interessant ist hier die Tatsache, dass eine EM-Analyse der Leberstadien aufgrund der relativ niedrigen Infektionsrate im Vergleich zu z.B. Chlamydien Infektionen bislang kaum zugänglich war (Meis *et al.*, 1986). Durch die direkte Korrelation zwischen *live cell imaging* und EM-Verfahren konnten die analysierten Strukturen subzellulär beschrieben werden. In anderen Studien werden die infizierten Zellen zum Teil trypsinisiert und dann über Gefrier- und Fixierungs-Schritte für die EM-Aufnahmen vorbereitet. Strukturen wie die PVM lassen sich in einer abgerundeten Zelle kaum richtig darstellen. Unklar bleibt auch ob morphologische Unterschiede im Vergleich zu adhärenen Zellen bestehen. Die hier angewandte Methodik ermöglichte eine gute Charakterisierung der morphologischen Details der intrazellulären Leberstadienentwicklung. Parasiten-Strukturen, die in die Leberzelle reichen sind jedoch bislang nicht beschrieben worden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Leberstadien dünne PVM-Ausläufer, schlauchförmige Ausstülpungen aus der PVM, formen, die höchstwahrscheinlich PV Material enthalten. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass diese Strukturen aktiv vom Parasiten ausgebildet werden und nicht Strukturen der Wirtszelle darstellen, die etwa mit UIS4mCherry Proteinen dekoriert sind. Zusätzlich konnte ein enger Kontakt der PVM mit dem Golgi-Apparat beschrieben werden.

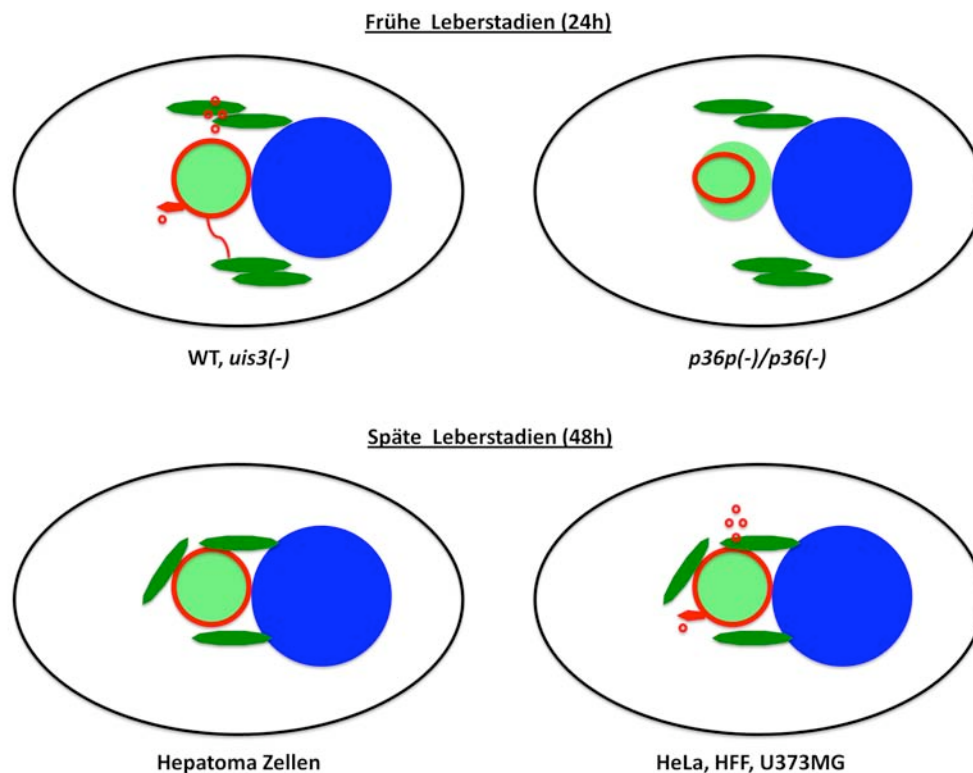


Abbildung 5-1 Schematische Übersicht der PVM in verschiedenen Parasiten und Zelllinien

In WT sowie *uis3(-)* Parasiten werden in frühen Leberstadien verschiedene PVM-Ausläufer (rot) gebildet, die mit dem Golgi-Apparat (grün) interagieren. Die PVM umgibt den Parasiten. In *p36p(-)/p36(-)* Parasiten werden die PVM-Strukturen nicht ausgebildet und die PVM liegt häufig im Inneren des Parasiten vor. In späten Leberstadien bildet der Parasit in Hepatoma Zellen keine Ausläufer aus und ist von Golgi-Stapeln umgeben, wohingegen in non-Hepatoma Zellen noch immer PVM-Ausläufer ausgebildet werden.

Um die dynamischen Prozesse mit einer erfolgreichen Leberstadien-Entwicklung zu korrelieren, wurden unterschiedliche Zelllinien infiziert und die EEF Entwicklung dokumentiert. Die Analyse der PVM-Ausbildung in verschiedene Zelllinien ergab, daß *P.berghei* prinzipiell in allen getesteten Zellen eine PVM um den Parasiten herum ausbilden konnte. Dies spiegelt erneut das breite Wirtszell-Spektrum von *P.berghei* im Vergleich zu anderen *Plasmodia* wieder (Silvie *et al.*, 2007). Allerdings konnten deutliche Unterschiede in der Ausbildung der PVM-Ausläufer Strukturen festgestellt werden. In Hinblick auf die Ausbildung der Ausläufer während der frühen EEF-Entwicklung konnten wesentliche Unterschiede in der Art und Häufigkeit der Ausläufer in den verschiedenen Zelllinien beobachtet werden. Zwischen HuH7 und Hepa-1-6 konnten, wie erwartet, keine

Unterschiede detektiert werden, da beide Linien Hepatoma-Linien darstellen und sich nur in der Herkunft human bzw. murin unterscheiden. Die humane Karzinoma Zelllinie HeLa zeigte eine ähnliche Verteilung und Entwicklung wie HuH7 Zellen. In dieser Linie konnte der Parasit alle drei Ausläufer-Typen ausbilden wobei der Anteil der dünnen Ausläufer in HeLa Zellen deutlich erhöht war. Interessanterweise lag auch die max. Geschwindigkeit der Ausbildung und des Einziehens der dünnen Ausläufer deutlich über der in HuH7 Zellen. Möglicherweise kann dies mit den Zelleigenschaften der HeLa Zellen zusammenhängen, die generell als eher kompakte Zellen gelten und keine so aufgelockerte Struktur haben wie Hepatozyten (Scherer *et al.*, 1953). Die Analyse der infizierten U373MG Zellen ergab, dass in ihnen hauptsächlich dicke Ausläufer gebildet wurden. Allerdings wurden U373MG Zellen im Gegensatz zu den anderen Zelllinien mit *uis3mCherry* Parasiten infiziert. Mit diesen Reporterparasiten konnten auch bei einer Leberzell-Infektion kaum dünne Ausläufer beobachtet werden, was womöglich mit dem schwachen UIS3mCherry Signal während der frühen EEF Entwicklung erläutert werden kann. In infizierten HFF Zellen konnten hauptsächlich Vesikel-Strukturen und teilweise dicke Ausläufer der Parasiten erfaßt werden. Generell erschien das mCherry Signal in der PVM auch eher punktiert, was nahe legt, dass die korrekte PVM-Ausbildung in diesen Zellen beeinträchtigt ist.

Besonders auffällig war die Ausprägung der PVM-Ausläufer zu den späten Zeitpunkten (48h) in den als eher nicht permissiv angesehenen Zelllinien, HeLa, HFF und U373MG Zellen im Vergleich zu den Hepatomazellen HuH7 und Hepa1-6 in denen keine Ausläufer zu diesem späten Stadium ausgebildet werden (Abbildung 5-1). Demzufolge befinden sich die Parasiten während der Entwicklung in HeLa, HFF und U373MG Zellen wahrscheinlich noch in einer früheren Entwicklungsphase und sind so womöglich länger auf die Ausbildung der Strukturen angewiesen um z.B. Lipide oder andere Nährstoffe zu erlangen. Diese These wird durch einen Größenvergleich der 48h Stadien unterstützt, da die Parasiten deutlich kleiner als die entsprechenden Stadien in Leberzellen waren. Am kleinsten waren die Parasiten in den HFF Zellen, was bedeutet, dass diese Zelllinie am wenigstens für eine *P.berghei* Entwicklung geeignet ist. Möglicherweise kann der Parasit in diesen Zelllinien weniger gut mit der Wirtszelle interagieren bzw. in Wirtseigene Stoffwechselwege eingreifen um sich mit Nährstoffen zu versorgen.

Interessanterweise waren die Ausläufer in dieser späten Phase nicht mehr dynamisch und zeigten kaum Bewegung. Dies könnte daraufhin deuten, dass der Parasit nur in seiner

frühen Entwicklungsstufe dynamische Ausläufer ausbilden kann, bzw. dass Faktoren, die diese Dynamik initiieren während der späteren Entwicklung nicht mehr exprimiert werden. Die Nähe der frühen EEFs (24h) zum Zellkern nimmt mit der Eignung der Zelle für eine *Plasmodium* Entwicklung ab. In Hepatomazellen konnte der Großteil der Parasiten als Kern-anglagert beschrieben werden, wohingegen in Fibroblasten oder Glioblastomzellen nur etwa die Hälfte bzw. weniger als die Hälfte der Parasiten eine Kern-Anlagerung aufwiesen. Gleichzeitig konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Parasiten in HeLa-, HFF- und U373MG-Zellen einen Größendefekt in der späten EEF-Entwicklung aufweisen. Dementsprechend könnte eine fehlende Assoziation mit dem Nukleus und somit auch mit Zellkern-assoziierten Wirtsorganellen zu einer unzureichenden Versorgung des Parasiten und so zu einem Wachstumsdefekt führen. Hier käme eine Unterversorgung mit Nährstoffen (über den ER/Golgi Weg) in Frage. Zusätzlich entbehrt der Parasit durch die Distanz zum Nukleus eine eventuelle Interaktionsmöglichkeit auf die Genregulation der Wirtszelle. Dabei könnten z.B. Synthesewege der Wirtszelle, die für den Parasiten essentiell sind, induziert werden.

Im Hinblick auf eine Assoziation von Wirtsorganellen an der PVM des Parasiten war bisher nur bekannt, dass sich das ER während der Leberstadien-Entwicklung an den Parasiten anlagert (Bano *et al.*, 2007). Diese Beobachtung konnte in der hier vorgelegten Arbeit bestätigt werden. Der verwandte Parasit *Toxoplasma gondii* ist für seine Entwicklung auf eine Lysosomen-Interaktion angewiesen und rekrutiert Lysosomen zu seiner PVM (Coppens *et al.*, 2006). Eine solche Rekrutierung konnte bei *P.berghei* nicht eindeutig gezeigt werden, wobei teilweise eine Assoziation mit Lysosomen beobachtet werden konnte. Hinsichtlich einer Interaktion von Parasiten mit Wirtsmikrotubuli ist aus *Toxoplasma gondii* bekannt, daß dieser Parasit gamma-Tubulin rekrutiert und so das Mikrotubuli Netzwerk der Wirtszelle verändert (Walker *et al.*, 2008). In *P.berghei* konnte teilweise eine Anlagerung der Mikrotubuli an die PVM beobachtet werden, wobei diese Anlagerung nur teilweise gezeigt werden konnte. Eine Rekrutierung der Mitochondrien durch *Toxoplasma gondii* konnte auf das Rhoptrien Protein Rop2 zurückgeführt werden (Sinai *et al.*, 2001). Eine ähnliche Rekrutierung durch *Plasmodium* konnte bisher noch nicht erfaßt werden und konnte auch in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, wobei teilweise eine Anlagerung am Parasiten zu beobachten war. Die beschriebene Anlagerung des Parasiten an den Wirtszellkern (Bano *et al.*, 2007) konnte in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden, wobei teilweise sogar eine Anreicherung von Kernhüllenproteinen um die PVM von späten Leberstadien (48h) erfaßt wurde.

Die Analyse einer möglichen Interaktion der PVM-Ausläufer mit Strukturen der Wirtszelle wurde mit ER-, Mitochondrien-, Lysosomen-, Mikrotubuli-, Kernhüllen- und Golgi-Markern durchgeführt. Dabei konnte eine partielle Interaktion mit den Lysosomen beobachtet werden, die sich insbesondere um dicke PVM-Ausläufer herum anlagerten. Möglicherweise könnte diese Interaktion einem Stoff-Austausch dienen. Von *T.gondii* ist bekannt, daß Lysosomen entlang der Mikrotubuli zur PVM transportiert werden und dann in den PV-Raum eingebracht werden (Coppens *et al.*, 2006). Möglicherweise wird diese Interaktion in *P.berghei* über die dicken PVM-Ausläufer erzielt. Ob diese Interaktion für den Parasiten wie *T.gondii* essentiell ist, bleibt offen. Assoziationen der PVM-Ausläufer mit Mitochondrien, ER, Kernhülle oder Mikrotubuli konnten nicht beobachtet werden. Allerdings konnte eine transiente Interaktion mit dem Golgi-Apparat gezeigt werden. Dabei nahmen sowohl dünne PVM-Ausläufer als auch dicke Ausläufer bzw. Vesikel-Strukturen Kontakt mit dem Golgi-Kompartiment auf. Von Chlamydien ist bekannt, daß eine Golgi-Fragmentierung essentiell für die Replikation der Bakterien ist (Heuer *et al.*, 2009). Diese Fragmentierung wird dabei durch eine vom Bakterium induzierte Golgi84-Spaltung hervorgerufen. Möglicherweise ist diese Fragmentierung und Umlagerung der Einschlüsse mit Golgi-Mini-Stapeln ein Weg, um an die Wirts-eigenen Lipide zu kommen, auf welche die Bakterien angewiesen sind (Heuer *et al.*, 2009). In Analogie wäre es möglich, daß *Plasmodium* ebenfalls Lipide über die Interaktion mit dem Golgi-Apparat erlangt.

Durch die Visualisierung des UIS3 bzw. UIS4 Proteins im Lebenszyklus konnte in dieser Arbeit die PVM-Lokalisation sowie die Dynamik der PVM beschrieben werden. Im nächsten Schritt wären funktionelle Daten wichtig. Bisher ist über die Funktion von UIS3 und UIS4 recht wenig bekannt. Durch einen *yeast-two-hybrid-Screen* konnte gezeigt werden, daß UIS3 mit L-FABP interagiert (Mueller *et al.*, nicht publiziert). L-FABP ist für die Parasiten-Entwicklung essentiell, da eine Herunterregulierung das Parasiten Wachstum stark beeinflusst (Mikolajczak *et al.*, 2007). L-FABPs sind kleine zytoplasmatische Proteine, die an gesättigte und ungesättigte Fettsäuren binden, wodurch womöglich Aufnahme, Transport und Nutzung der Fettsäuren in Hepatozyten erleichtert wird.

Für UIS4 konnte durch einen *yeast-two-hybrid-Screen* eine Interaktion mit ApoA1 gezeigt werden (Mueller *et al.*, nicht publiziert). ApoA1 ist ein Transport-Protein, das HDL-Partikel (*high-density lipoprotein*) aus Fettsäuren und Cholesterin zusammenhält und zur Leber transportiert. Diese Interaktionsdaten sind bereits erste Hinweise auf die Rollen von UIS3 und UIS4 und somit womöglich auch der PVM in der Aufnahme von wichtigen

Nährstoffen. Da die Dynamik der PVM-Ausläufer über die Reporterproteine UIS3 und UIS4 beschrieben wurden, ist es plausibel, dass über diese Strukturen eine Kontaktaufnahme mit Bereichen in der Wirtszelle aufgenommen wird, die als Lipid-Ressourcen dienen, beispielsweise dem Golgi. Um genauere Einblicke in die Funktion der PVM und der PVM-Ausläufer zu erlangen könnte man sich vorstellen, die Ausläufer-Strukturen aus den infizierten Leberzellen zu isolieren und biochemisch zu analysieren. Möglicherweise lassen sich so weitere Erkenntnisse über die Funktion dieser hoch dynamischen Strukturen gewinnen.

Im Vergleich zu den Leberstadien sind die Blutstadien sehr gut charakterisiert. Allerdings ist hinsichtlich der Architektur und der molekularen Komponenten der PVM noch wenig aufgeklärt. Interessanterweise konnte auch in den Blutstadien gezeigt werden, daß ein tubovesikulares Netzwerk aus der PVM in das Zytosol der Erythrozyten reicht (Elmendorf und Halder 1994). Mitglieder einer Familie von hoch-kationischen Proteinen, die als *early transcribed membrane proteins* (ETRAMPs) bezeichnet wurde, konnten in der PVM lokalisiert werden (Spielmann *et al.*, 2003). Zusätzlich konnten sie immunoelektronisch auch in der PVM und dem tubovesikularen Netzwerk gezeigt werden. Insgesamt konnten 13 Mitglieder dieser Familie identifiziert werden, wovon sechs nur im Ringstadium gebildet werden (Spielmann *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß die Verteilung der ETRAM-Proteine und des EXP-1 Proteins in der PVM nicht zufällig ist, sondern dass die einzelnen Proteine getrennte Bereiche definieren. Somit könnte es sein, dass die PVM aus verschiedenen Mikrodomänen (gebildet von den einzelnen Membran Proteinen) besteht (Spielmann *et al.*, 2006). Ein ähnliches Szenario ist für die PVM der Leberstadien denkbar, wo z.B. UIS3 und UIS4 in unterschiedlichen Bereichen angeordnet sind. In einer Studie von Adisa *et al.*, 2003 konnten PVM-Ausläufer, die ins Zytosol der Erythrozyten reichen gezeigt werden. Durch *Photobleaching* Experimente wurde ersichtlich, dass die PV Subkompartimente enthält, die nur zum Teil miteinander verbunden sind. Weiterhin wurden Membran-gebundene Ausläufer entdeckt, die sich von der PV abschnüren und so mobile Vesikel-Kompartments bilden, die PV Material enthalten (Adisa *et al.*, 2003). Demzufolge könnten die hier beschriebenen dicken Ausläufer und Vesikel-Strukturen analog auch in Blutstadien ausgebildet werden. Um diese Hypothese experimentell zu testen, könnten Blutstadien-spezifische Reporterlinien, beispielsweise durch mCherry-Fusionen mit ETRAMPs generiert und charakterisiert werden.

Durch eine FRAP-Analyse (*fluorescence recovery after photobleaching*) wird untersucht, ob ein freier Stoffaustausch in einem bestimmten Kompartiment vorhanden ist oder ein solches Kompartiment vom Rest der Struktur separiert ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Austausch innerhalb der PV in frühen und späten Leberstadien vollständig und zugleich schnell erfolgen kann. Dies spricht für eine hohe Diffusionsrate der Proteine innerhalb des PV-Raumes. Im Hinblick auf eine mögliche Verbindung zwischen dicken PVM-Ausläufern mit der PVM konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass beim Photobleichen von Ausläufer-Bereichen, die nah an der PVM lokalisiert waren, ein fast kompletter Protein-Austausch stattfinden kann. Somit scheint eine Verbindung zwischen den Ausläufern und der PVM im Ansatz vorhanden zu sein. Deshalb könnten dicke Ausläufer womöglich als Ausstülpung aus der PVM gebildet werden. Beim Photobleichen von Ausläufer-Bereichen, die weiter entfernt von der PVM vorlagen, konnte kein Austausch erfaßt werden, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass diese Bereiche von der PV separiert vorlagen, also als eher abgeschnürte Vesikel-Strukturen betrachtet werden können. Möglicherweise läßt sich daraus die Herkunft der PVM-gebildeten Vesikel erklären, die als Abschnürungen der dicken Ausläufer gebildet werden und dann frei im Zytoplasma der Wirtszelle zu finden sind. Die feinen UIS4mCherry-positiven-Strukturen im Inneren der späten Leberstadien konnten ebenfalls komplett wieder aufgefüllt werden, was die zuvor geäußerte Vermutung eines Zusammenhängenden PVM-Netzwerkes im Inneren des Parasiten bestätigt.

Interessanterweise konnten in FRAP-Analysen der PV in Blutstadien ähnliche Ergebnisse erzielt werden (Adisa *et al.*, 2003). Auch hier konnten Bereiche in der PV schnell wieder aufgefüllt werden und auch Ausläufer-Strukturen, die ins Wirtszytoplasma ragten und anscheinend noch mit der PV verbunden waren. Teilweise konnten jedoch solche Strukturen entdeckt werden, in denen keine freie Diffusion beobachtet werden konnten was dafür spricht, dass diese Bereiche von der PV separiert sind (Adisa *et al.*, 2003). Demzufolge teilen die PV sowie die beschriebenen PVM-Ausläufer in Blut- sowie Leberstadien ähnliche Eigenschaften, was erneut eine ähnliche Funktion vermuten läßt.

Die Visualisierung der PVM in Mutanten, die einen Defekt in der Leberstadien-Entwicklung aufweisen, sollte Aufschluß über den Einfluß einer funktional ausgebildeten PVM in Leberstadien-Entwicklungsdefekten geben. Interessanterweise konnte in *uis3(-)*-Mutanten eine funktionale PVM ausgebildet werden. Sowohl die PVM an sich als auch die PVM-Ausläufer könnten vergleichbar zu WT Parasiten ausgebildet werden (Abbildung 5-1). Dementsprechend ist das UIS3 Protein nicht für die PVM-Ausbildung erforderlich.

Offensichtlich können die verbleibenden PVM-Struktur Proteine, die Funktion von UIS3 übernehmen. Allerdings war auch keine Reduzierung des UIS4mCherry Signals zu beobachten, was bedeutet, dass UIS3 als strukturelle Komponente komplett austauschbar ist. Im Hinblick auf die PVM Dynamik konnte ebenfalls kein Unterschied zu WT Parasiten festgestellt werden, was bedeutet, dass die Dynamik der PVM und die Ausbildung der Ausläufer unabhängig von UIS3 zu sein scheint.

Die Assoziation der PVM-Ausläufer zum Golgi-Apparat konnte ebenfalls in *uis3(-)* Parasiten etabliert werden, was bedeutet, dass diese Verbindung nicht auf UIS3 angewiesen ist, sondern von der PVM ausgebildet wird und nicht auf eine spezielle Protein/Protein Interaktion zurückzuführen ist. Demzufolge erfüllen die beiden UIS-Proteine UIS3 und UIS4 möglicherweise unterschiedliche Funktionen, obwohl aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten vermutet werden konnte, dass sie vergleichbare Funktionen besitzen. Außerdem zeigen sie den gleichen Entwicklungsdefekt in der Leberstadienentwicklung, wodurch man auf eine ähnliche Funktion schließen könnte.

Die Visualisierung der PVM in *uis4(-)*-Parasiten mit einer UIS3mCherry Fusion konnte bisher noch nicht etabliert werden. Möglicherweise sind technische Probleme dafür verantwortlich, die in zukünftigen Projekten gelöst werden könnten. Prinzipiell könnten natürlichen auch Immunfluoreszenzen mit UIS3-Antikörpern auf *uis4(-)*-Parasiten durchgeführt werden, um die PVM zu beschreiben. Allerdings entbehrt diese Methode der PVM Dynamik, wodurch man also weder die Ausbildung der PVM noch die PVM-Ausläufer beschreiben könnte. Nichtsdestotrotz könnte ein IFA mit den UIS3 Antikörpern erste Hinweise auf die PVM-Bildung in *uis4(-)*-Parasiten geben.

Die *p36p(-)/p36(-)*-Mutante zeigt einen Defekt in der sehr frühen Leberstadien-Entwicklung, noch vor dem Arrest der *uis3(-)* oder *uis4(-)*-Mutanten (van Dijk *et al.*, 2005). Bisher konnte nicht geklärt werden welche Funktion p36p und p36 erfüllen. Durch die Protein-Struktur mit zwei Transmembran-Regionen kann davon ausgegangen werden, daß sie in der PVM lokalisieren. In zwei Studien der *Pb p36p(-)* Parasiten sowie der *Py p52(-)/p36(-)* Mutante konnte mit Hilfe einer anti-UIS4 Färbung keine normale PVM Bildung gezeigt werden (Labaied *et al.*, 2007; van Dijk *et al.*, 2005). Demzufolge sollte die Bildung der PVM in *p36p(-)/p36(-)*-Parasiten ebenfalls untersucht werden, um zu klären, ob diese beiden Proteine für die PVM als strukturelle Komponenten wichtig sind. In frühen EEFs konnten deutliche Unterschiede zur PVM in WT Parasiten erfaßt werden. Die PVM war teilweise im Inneren des Parasiten als Ring zu sehen, was einer unvollständigen ausgebildeten PVM in der *p36p(-)/p36(-)*-Mutante entsprechen könnte

(Abbildung 5-1). Dieser Ring war in einigen Parasiten als Kappe, die auf den Parasiten drauf zu liegen schien, zu sehen. Insofern konnten die bisher generierten IFA Daten von Labaied *et al.*, und van Dijk *et al.*, bestätigt werden. Ein am Rand des Parasiten zu findender mCherry-positiver Punkt bzw. mehrere Punkte auch im Inneren des Parasiten könnte auf eine unzureichende Verteilung des UIS4 Proteins in der *p36p(-)/p36(-)*-Mutante hin deuten.

Der kleine Anteil der Parasiten, die das typische den Parasiten umrundende PVM Signal aufwiesen spricht dafür, daß manche Parasiten in der Lage sind eine korrekte PVM-Bildung zu erreichen. In späteren EEF Entwicklungsstadien konnten einige Parasiten entdeckt werden, die eine normale PVM ausbilden konnten. Andere Parasiten zeigten jedoch nur Strukturen, die als mCherry-positiver Ring in der Wirtszelle vorlagen, wohingegen der Parasit als solche daran angelagert war. Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass die Verbindung zwischen dem Parasiten und der PVM in der *p36p(-)/p36(-)*-Mutante stark beeinträchtigt ist.

Insgesamt könnten diese Befunde darauf hinweisen, dass p36p und oder p36 wichtige Komponenten für die PVM-Struktur darstellen, ohne die kein funktionelles Grundgerüst für die PVM vorhanden ist. Alternativ könnte die Funktion der Proteine bereits für die Invasion wichtig sein. Ohne die Ausbildung der *tight junctions* wird ein Transmigrations-Phänotyp erreicht und damit keine PV ausgebildet.

Durch die erfolgreiche Etablierung der UIS4mCherry Fusion zur Visualisierung der PVM in Leberstadien-Mutanten wie *uis3(-)* oder *p36p(-)/p36(-)* ist es vorstellbar noch weitere Parasiten mit einem Defekt in der Leberstadien-Entwicklung gezielt auf die PVM-Bildung zu analysieren. Durch diese Anwendung ließen sich womöglich Komponenten finden, die für die spezifische Ausbildung der PVM-Ausläufer verantwortlich sind. Womöglich könnte man wichtige Aussagen über Faktoren für die PVM-Dynamik machen, hier im speziellen: welche Proteine sind für die Ausbildung und Dynamik der dünnen Ausläufer essentiell? Oder welche Proteine initiieren den Kontakt zum Golgi-Apparat? Durch die Identifizierung solcher Proteine könnte man dann mit anderen Methoden wie z.B. dem *yeast-two-hybrid Screening* nach Interaktionspartnern in der Wirtszelle suchen und so die Interaktion des Parasiten mit der Wirtszelle näher zu beschreiben. Beispielsweise, wie wird der Kontakt des Parasiten zum Golgi-Apparat etabliert? Damit könnten dann zugleich Angriffspunkte für Antimalaria-Medikamente identifiziert werden, mit denen der Kontakt des Parasiten zum Golgi-Apparat blockiert wird und so die Leberstadien-Entwicklung

gestört wird. Damit könnte man womöglich die Etablierung der symptomatischen Blutstadien-Infektion gezielt verhindern.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich eine bislang unbekannte Dynamik von Parasiten-Prozessen, die hervorgehend aus der PV, weit in die Wirtszelle hineinragen beschreiben. Eine wesentliche Voraussetzung für die Charakterisierung mit Hilfe von *in vivo* Bildgebungsverfahren und der korrelativen Mikroskopie war die Visualisierung der PVM in transgenen *Plasmodium* Linien. Ähnliche Verfahren können nun zum Studium der Parasit/ Wirts-Schnittstelle in anderen *Plasmodium* Stadien bzw. verwandten *Apicomplexa*-Parasiten eingesetzt werden.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Geräte

Außer den Laborüblichen Geräten wurden folgende Instrumente verwendet:

Amixa-Elektroporator	Amixa, Köln
Eismaschine	Scotsman, AF30
Elektroporationsgerät	BioRad, München
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100M	Zeiss, Jena
Gel-Apparaturen	Whatman, Biometra; Hoefer, HE33
Inkubatoren: Hera Cell	Heraeus , Hanau
Transfektions-Inkubator	Mytron, Heiligenstadt
Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 510	Zeiss, Jena
Perkin Elmer Spinning Disk auf Nikon	Perkin Elmer, USA
TE2000 Fluoreszenz-Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
Nikon BioStation IM Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
Fluoreszenz-Mikroskop TE-2000 U (invers)	Nikon, Düsseldorf
Biozero 8000 Digital Mikroskop	Keyence, Neu Isenburg
LEO 912AB	Zeiss, Oberkochen
Zählkammer	Neubauer Labotec, Göttingen
Zellkulturzentrifuge	Megafuge 2.0R, Heraeus (Zellkultur) Megafuge 1.0R, Heraeus

6.1.2 Verbrauchsmaterial

15/50ml Plastik-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
1-mal Pipetten (10ml /25ml)	Costar
1,5ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
Chamberslides	Nunc/ Wiesbaden

Cryogefäße	Cellstar
Deckgläschen	Knittel
Elektroporationsküvette 0,4cm	Biorad, München
Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Wiesbaden
Handschuhe	VZM, Heidelberg
µ-Dish (35mm Petrischale)	Ibidi, Martinsried
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Kanülen	BD Microlance, Sterican
Objektträger	Marienfeld
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
PCR-Gefäße	Greiner Bio-one
Pasteurpipetten	WU Mainz
Petrischalen	Greiner Bio-one
Pipettenspitzen	Greiner Bio-one
Sterilfilter BD	Nalgene
Schraubdeckel-Reaktionsgefäße	NeoLab, Heidelberg
Spritzen	Diskardit, Becton Dickinson
Whatman™ 3MM paper	Firma Whatman Paper Company
Zellkultur Multiwell Platten (24x, 6x)	Greiner Bio-one
Zellkulturflaschen 25cm ² , 75cm ²	Renner, Darmstadt-Schauernheim

6.1.3 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen Sigma, Roth oder Merck bezogen.

β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Alsevers Lösung	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	BD Diskardit, Becton Dickinson
Bacto-Tryptone	BD Diskardit, Becton Dickinson
Bacto-Peptone	BD Diskardit, Becton Dickinson
Bacto-Yeast extract	BD Diskardit, Becton Dickinson

BSA (Bovine Serum Albumin)	Roth, Karlsruhe
Chemielumineszenz Substrat	Amersham, Freiburg
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Diethylether	Riedel-de Haen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DMEM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol	ZVM
Ethidiumbromid (500 µg/ml)	Sigma, Taufkirchen
FCS (Fetal Kälber Serum)	Invitrogen, Karlsruhe
FCS, zertifiziert (USA)	Invitrogen, Karlsruhe
Fibrose Zellulose Puder	Whatman, UK
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Giemsa	BDH Laboratory Supplies
Glass Beads (unwashed)	Sigma, Taufkirchen
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HBSS	Invitrogen, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Augsburg
Heparin	Braun, Melsungen
IMDM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Ketamin (10%)	VFW
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Meersalz	Alnatura
Milchpulver	Alnatura
Nycodenz	Axis Shield, Oslo, Norwegen
Opti-MEM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
para-Aminobenzoessäure	Sigma, Taufkirchen
PBS, Tabletten	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	Fluka, Buchs, Schweiz
Phenol	Roth, Karlsruhe
Pyrimethamin	Sigma, Taufkirchen

RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Saponin	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
WR99210	Jacobus Pharmaceutical, USA
Xylazinhydrochlorid (2% Xylazin)	Rompun®, Bayer

6.1.4 Medien und Lösungen

10% Sucrose-Lösung	10g Sucrose, 20 µg pABA ad 100 ml ddH ₂ O
3M NaAc-Lösung	24,06 g ad 100 ml ddH ₂ O; pH 4,8
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml Ampicillin in ddH ₂ O (1/1000 in LB verdünnt)
Freezing-Solution	Glycerin: Alsever's Solution (1:9)
Giemsa Lösung	10% Giemsa Solution in VE-H ₂ O
Heparin für Transfektion	0,25 ml 200 I.U./ml Stammlösung auf 10 ml Transfektions-Kulturmedium (s.u.)
Hepatozyten-Freezing-Solution	8ml DMEM-Medium, 1ml DMSO, 1ml FCS
Hepatozyten-Kulturmedium	DMEM-Medium: 450 ml DMEM, 50ml FCS, 5ml Penicillin/ Streptomycin
Kulturmedium für U373MG Zellen	450 ml IMDM ,50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin
Kulturmedium für HeLa und HFF Zellen	450 ml DMEM ,50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin
Luria Broth-(LB-) Medium	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl, in ddH ₂ O pH 7,5; autoklaviert
Moskito-Präparations-Medium	3% BSA in RPMI 1640
Moskito-Aufzuchtwasser	1 ‰ Meersalz in ddH ₂ O
PBS	1,370 M NaCl, 27 mM KCl, 15 mM KH ₂ PO ₄ , 81 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
Round-Up 100x	60mg Penicillin, 100mg Kanamycin, 50mg Fluocytosin, 10mg Chloramphenicol, steril filtriert

TAE-Puffer 50x	2 M Tris, 250 mM Natriumacetat, 0,5 mM EDTA; pH 7,8
Transfektions-Kulturmedium	160 ml RPMI-Medium1640, 40 ml FCS-USA (Hitzeinaktiviert 30 min bei 56°C), 50-60 µl Gentamycin
WR99210-Stammlösung	200mg WR99210 in 70% DMSO; 7,8µl aus diesem Ansatz in 1,5ml PBS

6.1.5 Molekularbiologische Kits

Human T Cell Nucleofactor Kit; Cat. No. VPA-10002	Amaza, Köln
QIAprep Spin Miniprep Kit (250); Cat. No. 27106	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit (250); cat. No. 28106	QIAGEN, Hilden
QIAamp DNA-Blood Mini Kit (250); Cat. No. 51106	QIAGEN, Hilden

6.1.6 Größenmarker und Ladepuffer

Größenmarker 1 kb-DNA ladder	Fermentas
6x Ladepuffer	Fermentas

6.1.7 Enzyme

Die Enzyme *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I, *Hind*III, *Hpa*I, *Pst*I, *Nde*I, *Not*I, *Sac*II, *Sca*I, *Sna*BI, *Spe*I sowie *Xba*I wurden von NEB, Frankfurt bezogen. Die Rapid-Ligation-Ligase wurde von Roche, Mannheim und die Taq DNA Polymerase wurde von Fermentas, St. Leon-Rot bezogen.

6.1.8 Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Verdünnung</i> <i>IFA</i>	<i>Verdünnung</i> <i>Western Blot</i>	<i>Lieferant</i>
Maus-anti-HSP70 (<i>P.berghei</i>)	1:1000	-	M.Tsuji, New York
Maus-anti-CSP (<i>P.berghei</i>)	1:1000	-	RS Nussenzweig, New York

Hase-anti-snapin (full length) Cat No. 148002	1:100	1:1000	SYSY, Göttingen
Hase-anti-snapin (c-terminale Domäne) Cat No. 148102	1:100	-	SYSY, Göttingen
Hase-anti-uis1 (Peptid EP100789)	1:100	1:1000	Eurogentec, Belgien
Hase-anti-uis1 (Peptid EP100790)	1:100		Eurogentec, Belgien
Anti-Myc-Tag	1:100		Cell Signaling, Danvers
Maus-anti- β -Tubulin	1:200		Sigma, Taufkirchen
Maus-anti- α -Tubulin	1:500		Sigma, Taufkirchen
Anti- α - β -Tubulin	1:50		Cell Signaling, Danvers

2.AK

Ziege-Anti-Maus IgG Alexa 488	1:300	-	Molecular Probes, NL
Anti-Hase IgG Alexa 546	1:300	-	Molecular Probes, NL
Anti-Maus IgG Alexa 546	1:300		Molecular Probes, NL
Anti-Hase IgG Alexa 488	1:300		Molecular Probes, NL
Anti-Kaninchen IgG-HRP	-	1:2000	Sigma, Taufkirchen

Organellen-Tracker:

<i>Tubulin-Tracker Green</i>	250nM		Molecular Probes, NL
<i>Organelle Lights Nesprin-GFP</i>			Molecular Probes, NL
<i>Lyso-Tracker Blue</i>	50nM		Molecular Probes, NL
<i>Mito-Tracker Green</i>	100nM		Molecular Probes, NL
<i>ER-Tracker Green</i>	1 μ M		Molecular Probes, NL

6.1.9 Oligonukleotide

TgProm rev	5`- CGCATTATATGAGTTCATTTTACACAATCC -3`
T7	5`- GTAATACGACTCACTATAGGGC -3`
UIS3forSacII	5`- <u>TCCCCGCGGGG</u> ATTAAAAGCTAGCATTAGCATA ACATC -3`
UIS3revXbaI	5`- <u>TGCTCTAGAGCAT</u> ATTAATTTTTGTTGATATTG TTCTTTAAG -3`

UIS7rev <i>Xba</i> I	5`- <u>TGCTCTAGAGCACATCGTATACAAATTTTTGTATT</u> ACAC -3`
UIS7 <i>Sac</i> IIfor	5`- <u>TCCCCGCGGGGAGTCTATTCCCCTTTTGTG</u> GACCAC -3`
UIS4 <i>Spe</i> Irev	5`- <u>CGGACTAGTCCGTATGTATGGGCCGAATG</u> -3`
UIS4 <i>Sac</i> IIfor	5`- <u>TCCCCGCGGGGACCACGAAATATGCCAT</u> AAATAGAC -3`
UIS7testrev	5`- GATAAATGAGTGGCCTCGAGTTTTCTC -3`
UIS7testfor	5`- CATATTCTGAGTTATATGTAATTAGCAG -3`
uis3test5`UTRfor	5`- TCAGTGATAAAATATATTGAACCATATGGC -3`
uis3test3`UTRrev	5`- TCTTAGAATGTAAAAACCCCAAATGTAGGC -3`
Tg for	5`- CCCGCACGGACGAATCCAGATGG -3`
mCherryRev	5`- GATCCTTACTTGTACAGC -3`
uis4test5`UTRfor	5`- TATTTACTATTAAATATAATGGATTCA -3`
uis4Pb3`UTRrev	5`- TTGGTACCAATAATATATCTGGAACACCAAC -3`
<u>Uis4-uis3mch Primer:</u>	
uis3for5`UTR <i>Not</i> I	5`- <u>GCGGCCGCGTGCTATAAAGCGTATTATGAA</u> -3`
uis45`UTRrev <i>Not</i> I	5`- <u>GCGGCCGCGGTGGTGTATGTAGTGTATATCTC</u> -3`
uis43`UTR <i>Hnd</i> III	5`- <u>CCCAAGCTTTTCATTATGAGTAGTGTAATTCAG</u> -3`
uis43`UTRrev <i>Kpn</i> I	5`- <u>GGGGTACCGTTCAAATAATACGTTATGAAG</u> -3`
<u>Uis3-uis4mch Primer</u>	
uis45`UTRfor <i>Not</i> I	5`- <u>GCGGCCGCGGATTCATTTTTTGATGCATGC</u> -3`
uis3rep5`UTRrev <i>Not</i> I	5`- <u>GCGGCCGCGCATGCAACCACAACATAAAC</u> -3`
uis3rep3`UTRfor <i>Hnd</i> III	5`- <u>CCCAAGCTTCATCATTTATAGCATAGTATATAG</u> ATGCCTG -3`
UIS3rep3`UTRrev <i>Kpn</i> I	5`- <u>GGGGTACCGGATAATCATATTGATCTTAAGC</u> -3`

6.1.10 Stämme und Vektoren

6.1.10.1 *E.coli* Stämme

XL-1 Blue Stratagene

6.1.10.2 Nagerwirte

Folgende Kleinnager dienten als Wirt für *Plasmodium berghei*:

Art	Stamm	Lieferant
Mäuse (<i>Mus musculus</i>)	Narval Medical Research Institute (NMRI); Auszucht- Mäuse	Charles River Laboratory, Sulzfeld
Mäuse (<i>Mus musculus</i>)	C57BL/6; Inzucht-Mäuse	Charles River Laboratory, Sulzfeld,

Haltung:

Mäuse wurden in Makrolon-Käfigen gehalten. Die Besatzungsdichte lag in der Regel bei 5 Mäusen pro Käfig. In den Haltungsräumen herrschten eine konstante Raumtemperatur von 22°C und eine relative Luftfeuchte von 50-60%.

Der Hell-/Dunkel Rhythmus lag unabhängig von der Jahreszeit bei 12 Stunden. Es wurde mit Standard Trockenpellets von SSNIFF gefüttert.

6.1.10.3 Zelllinien

HuH7 (humane Hepatoma Zelllinie)

Hepa 1-6 (murine Hepatoma Zelllinie)

HeLa (humane Zervixkarzinom Zelllinie)

HFF (humane Vorhautfibroblasten Zelllinie)

U373MG (Glioblastom Zelllinie)

HeLa Golgi-Knockdown Zelllinien:

Zelllinie	Zielgen
DHE002	Luciferase (Kontrolle)
DHE005	Golgin84
DHE006	Arf1
DHE007	Giantin3
DHE011	Rab1A
DHE015	Rab33b
DHE019	Giantin
DHE020	p115

6.1.10.4 Moskito-Stämme

Anopheles stephensi Moskitos (Nijmegen, Niederlande) dienen als Insektenvektoren für *Plasmodium berghei*.

6.1.10.5 Parasiten Stämme

Plasmodium berghei-NK65

Plasmodium berghei GFP-507cl (ANKA)

Plasmodium berghei 507cl (ANKA) (Janse *et al.*, 2006)

6.1.10.6 *Plasmodium berghei* Vektoren

Die stabile Transfektion wird angewendet, um die Funktion eines Proteins durch Unterbrechung oder Austausch eines Gens zu untersuchen oder ein heterologes Gen zu exprimieren. Dazu wurden verschiedene Plasmide als Vektoren entwickelt (Waters *et al.*, 1997). Der Plasmid-Vektor b3D.DT^ΔH.^ΔD (Andy Waters, LUMC, Leiden, Niederlande) stammt vom pBlueskript-Plasmid ab, das das β -Lactamase Gen als Ampicillin-Resistenzmarker für die Selektion transformierter Bakterien enthält. Für die Anwendung in *P.berghei* wurde ein mutiertes *DHFR/TS*-Gen von *T.gondii* hinzugefügt. Diese Dihydrofolat-Reduktase-Mutante verleiht Resistenz gegen das Anti-Folat Pyrimethamin. Die Expression dieses Selektionsmarkers steht unter der Kontrolle der 5' nicht-translatierten Region (5'UTR) von *P.berghei*, die auch den Promotor des *Plasmodium berghei* *DHFR/TS*-Gens enthält. Die 3' UTR und die Poly-Adenylierungsstelle des *DHFR/TS*-Gens stammen ebenfalls von *Plasmodium berghei* Homolog. Um die Auswahlmöglichkeiten für Restriktionsenzyme bei der Klonierung zu erhöhen, wurden die *KpnI* und *EcoRI* Erkennungsstellen im *Toxoplasma gondii* *DHFR/TS* Gen mutiert (Waters *et al.*, 1997).

Das Plasmid *Pbb3D+* baut auf dem Plasmid b3D auf. Jedoch enthält es eine zusätzliche *PbDHFR/TS* 3'UTR, die die Expression von heterologen Genen vereinfacht. Das Plasmid *Pbb3D+mCherry* enthält zusätzlich eine mCherry Sequenz, gefolgt von der *PbDHFR/TS* 3'UTR. Durch entsprechende Klonierungsschritte kann eine Gensequenz mit der mCherry Sequenz verbunden werden. Als Folge kann ein carboxyterminal fusioniertes mCherry Protein generiert werden.

Das Plasmid *PbhDHFR* (Andy Waters, LUMC, Leiden, Niederlande) wurde von pUC19 abgeleitet. Zur Selektion enthält es das Ampicillin-Resistenzgen. Des Weiteren enthält es

das humane *DHFR*-Gen, welches Resistenz sowohl gegen Pyrimethamin als auch gegen das Antifolat WR99210 verleiht.

Die DHFR ist ein Schlüsselenzym der Tetrahydrofolat-Synthese. Tetrahydrofolat wird für die Herstellung von DNA und Proteinen benötigt. Eine Punktmutation im *DHFR/TS*-Gen an Position 110 (Ser → Asn) ist für die Resistenz gegenüber Pyrimethamin verantwortlich. Durch diese wird das aktive Zentrum des Enzyms verändert. Dies führt zu einer reduzierten Affinität des Enzyms für Pyrimethamin und somit zur Resistenz (Waters *et al.*, 1997; Ouellette und Ward, 2003).

In Laufe dieser Arbeit wurden folgende Plasmide kloniert:

Name des Vektors	Ausgangsplasmid	Insert	Integrationsstelle
<i>UIS3</i> b3D+mCherry	b3D+mCherry	<i>UIS3</i> 5`UTR + ORF	<i>UIS3</i> Locus
<i>UIS4</i> b3D+mCherry	b3D+mCherry	<i>UIS4</i> 5`UTR + ORF	<i>UIS4</i> Locus
<i>UIS7</i> b3D+mCherry	b3D+mCherry	<i>UIS7</i> 5`UTR + ORF	<i>UIS7</i> Locus
<i>uis3(-)/UIS4</i> b3D+mCherry	b3D+mCherry	<i>UIS4</i> 5`UTR + ORF, <i>UIS3</i> 5`UTR+ 3`UTR	<i>UIS3</i> Locus
<i>uis4(-)/UIS3</i> b3D+mCherry	b3D+mCherry	<i>UIS3</i> 5`UTR + ORF, <i>UIS4</i> 5`UTR+ 3`UTR	<i>UIS4</i> Locus
<i>UIS4</i> <i>hdhfr</i> mCherry	<i>Pb hdhfr</i>	<i>UIS4</i> 5`UTR + ORF,	<i>UIS4</i> Locus
<i>UIS3</i> <i>hdhfr</i> mCherry	<i>Pb hdhfr</i>	<i>UIS3</i> 5`UTR + ORF,	<i>UIS3</i> Locus

6.1.10.7 Wirtszell-Transfektions-Vektoren

Die Vektoren für die Golgi-Fusionsproteine Golgin84-GFP und Mannosidase-YFP wurden von Dr. Dagmar Heuer, MPI Berlin zur Verfügung gestellt.

6.2 Methoden

6.2.1 Mikrobiologische Methoden

6.2.1.1 *E.coli* Flüssigkulturen

Um Bakterien in großer Menge wachsen zu lassen, impft man Bakterienzellen in 5ml (Vorkultur) bzw. 150ml Nährmedium an und inkubiert sie über Nacht bei 37°C auf dem

Schüttler bei 250rpm. Das Nährmedium enthielt das Antibiotikum Ampicillin, um auf die aufgenommenen Plasmide, welche die Antibiotikaresistenz vermitteln, zu selektionieren. Die Bakterien, die man zum Animpfen verwendet, sind entweder von einer Vorkultur oder direkt auf Agarplatten gewachsene Kolonien.

6.2.1.2 Plattenkulturen

Um einzelne Bakterienkolonien anzuzüchten verwendet man Plattenkulturen.

Mit Hilfe einer sterilen Impföse kann man Bakterien auf einer LB-Platte, die ein Antibiotikum enthielt, ausstreichen. Die Platte wird über Nacht bei 37°C inkubiert und kann danach bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert werden.

6.2.1.3 Herstellung einer Bakterien-Stammkultur

Für die langfristige Aufbewahrung von Bakterienkulturen kann man sie als Glycerinstammkulturen bei -80°C lagern. Dafür impft man eine Bakterienkultur in Flüssigmedium an und inkubiert sie Übernacht bei 37°C auf dem Schüttler. Zu 625µl dieser Kultur gibt man 375µl 80% Glycerin und lagert die Stammkultur bei -80°C.

6.2.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.2.1 Agarose-Gel-Elektrophorese

Um doppelsträngige DNA zu charakterisieren und aufzutrennen nutzt man die horizontale Gel-Elektrophorese (Sambrook, 1989).

Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen im DNA-Rückgrat wandern DNA-Moleküle im elektrischen Feld durch die Poren des Agarosegels zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Größe und der Struktur der Moleküle ab. Je kürzer ein Fragment ist, desto schneller kann es durch die Poren des Agarosegels wandern. Mit Hilfe des Farbstoffes Ethidiumbromid, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert und durch UV-Licht (302nm) angeregt werden kann, kann man die DNA sichtbar machen. Für die Auftrennung wurden 1% Agarosegele in 1x TAE-Puffer angesetzt. Nach Aufkochen der Agarose in TAE-Puffer und Abkühlen wurde Ethidiumbromid (5µg/100ml) zugesetzt und das Gel gegossen. Die Proben wurden mit 6x

Ladepuffer (Fermentas) versetzt und als Größenkontrolle der 1kB Molekulargewichtsmarker (Fermentas) geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 90V für 60min.

6.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht die Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Fragmentes. Dabei kann es sich um ein Gen, einen Teil eines Gens oder einen nicht kodierenden Bereich handeln.

Dazu wurden Oligonukleotide (Primer) genutzt, welche zu den gewählten Ausgangs-DNA-Strängen („Template“) komplementär sind, und das zur Amplifikation gewählte DNA-Stück flankieren. Durch die Verwendung einer thermoresistenten DNA-Polymerase, des in heißen Quellen lebenden Bakteriums *Thermophilus aquaticus*, kann die DNA bei 94°C denaturiert werden, während das Enzym für die folgenden Schritte und Zyklen der Reaktion hinweg stabil und funktionstüchtig bleibt. Die Spezifität einer jeden Amplifikation hängt hauptsächlich von der Wahl der richtigen Oligonukleotid-Sequenzen ab. Die Länge eines Oligonukleotids sollte zwischen 20 und 40 Basen liegen und einen GC-Gehalt (dieser beeinflusst die Schmelztemperatur = T_m) von mehr als 30% haben, um spezifische Anlagerung zu ermöglichen. Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des zu erwarteten DNA-Fragments, wobei man 1min für 1kb berechnet.

Ein PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

Schritt 1: Denaturierung der DNA Doppelstränge: 94°C, 5 Minuten

Schritt 2: Denaturierung der DNA Doppelstränge: 94°C, 30 Sekunden

Schritt 3: Anlagerung der Oligonukleotide („Annealing“): 55°C, 30 Sekunden

Schritt 4: Neusynthese der DNA Stränge („Extension“): 60°C, 3-10 Minuten

Schritt 5: Elongation: 60°C, 10 min

Schritt 6: Lagerung: 4°C, ∞

Die Schritte 2-4 werden in 30-35 Zyklen wiederholt.

Die Standard Reaktionskomponenten wurden in folgenden Mengen eingesetzt:

0,5-2 µl DNA-*Template* (gDNA oder cDNA)

0,5 µl *Primer forward* (100 µM)

0,5 µl *Primer reverse* (100 µM)

5 µl 10x PCR-Reaktionspuffer (-MgCl₂)

3 µl MgCl₂ (1,5mM)

0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/ml)

Mit Wasser wurde auf ein Endvolumen von 50µl aufgefüllt.

Die PCR-Reaktion konnte danach in einem Agarosegel analysiert werden. Wurde das amplifizierte Fragment anschliessend für eine Klonierung genutzt, so wurde die PCR Reaktion mit dem „Quiagen PCR-Purifikation Kit“ nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

6.2.2.3 Restriktions-Endonukleasen

Der erste Schritt beim Klonieren eines Plasmid-Vektors ist der Verdau des mit der PCR-amplifizierten Inserts und des Vektors mit Restriktionsendonukleasen. Die in den Experimenten verwendeten Fragmente sind die flankierenden DNA Sequenzen der Gene, die durch die Transfektion ersetzt werden sollten.

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische ca. 4-8 lange Basenpaare, meist palindromische Sequenzen in doppelsträngiger DNA und spalten diese durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen. Somit können zirkuläre DNA-Moleküle linearisiert werden oder definierte Bereiche der DNA ausgeschnitten werden. Die Aktivität der Enzyme wird in *Units* (U) angegeben. Typischerweise ist eine *Unit* eines Enzyms ausreichend um 1µg Phage λ DNA unter optimalen Bedingungen in einer Stunde zu schneiden. Dies wurde in den Experimenten bei Wahl der Enzymmenge berücksichtigt. Der 10-fach konzentrierter Puffer und das 10-fach konzentrierte BSA wurden entsprechend des Reaktionsendvolumens hinzu gegeben und mit ddH₂O aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei 37°C für 2-4 Stunden oder über Nacht geschnitten. Wenn die spezifischen Puffer es ermöglichen, konnte mit 2 Enzymen gleichzeitig geschnitten werden. Doch war zu beachten, dass der Volumenanteil der Enzyme nicht 10% des Gesamtreaktionsvolumens überschreitet. Sonst kann das Glycerin, in welchem die Enzyme gelagert sind, unspezifisches Schneiden verursachen. Für die Klonierung wurden Vektor und Insert mit je zwei Enzymen, gleichzeitig oder nacheinander, geschnitten. Das garantiert zum einen die richtige Orientierung des Fragments im Vektor und zum anderen wird bei der anschließenden Ligation die Chance, dass der Vektor sich ohne Insert wieder verschließt, verringert.

Nach dem Restriktionsverdau wurden die Proben zur Weiterverarbeitung mit dem „QIAGEN PCR Purification Kit“ aufgereinigt. Ein Restriktionsverdau mit anschließendem Agarosegel kann auch zur Analyse verwendet werden.

6.2.2.4 Ligation

Die linearisierten Vektoren und die Fragmente können mit Hilfe der T4 Ligase (Fermentas) verbunden werden. Dieses Enzym katalysiert Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3' Hydroxyl- und 5' Phosphatenden doppelsträngiger DNA.

Ein Ligationsansatz besteht dabei aus:

7µl Insert

1µl lin. Vektor

1µl Puffer

1µl T4Ligase

Der Überschuss an Insert ist wichtig, um zu verhindern dass sich der Vektor ohne Aufnahme des Inserts wieder verschliesst. Der Ligationsansatz wird für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und kann danach sofort für die Bakterientransformation eingesetzt werden.

6.2.2.5 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Die Übertragung von Fremd-DNA in Bakterien nennt man Transformation. Die eingebrachten Plasmide vermitteln eine Antibiotikaresistenz, so dass mit dem Ausplattieren auf Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum auf Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben selektioniert werden kann.

Als Bakterienstamm wurde der Stamm *E.coli* XL-1 Blu (Stratagene) verwendet.

Zunächst überführt man die Zellen von -80°C auf Eis und lässt sie auftauen. Im nächsten Schritt werden sie mit 0,68 µl β-Mercaptoethanol 10min auf Eis permeabilisiert. Nach der Zugabe von 2µl Ligationsansatz inkubiert man für 30min auf Eis und unterzieht die Zellen dann einem Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden bevor man die Zellen erneut 2min auf Eis kühlt. Es folgt die Zugabe von 900µl LB Medium und die Inkubation auf dem Schüttler bei 37°C für eine Stunde. Nach dieser Inkubation werden 200µl auf den LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag sollten sich mehrere Bakterienkolonien auf der Platte befinden.

6.2.2.6 Plasmid-Reinigung

Um Bakterienkolonien auf rekombinante Plasmide testen zu können, wurde ein Teil der jeweiligen Kolonie mit einer Pipettenspitze gepickt und in 4 ml Ampicillin haltiges LB-Medium gegeben. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend konnten die Plasmide mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ isoliert werden. Das Prinzip besteht aus alkalischer Lyse der Plasmamembran und Essigsäure-Präzipitation der Proteine, der genomischen DNA und der Lipide. Die zirkulären Plasmide präzipitieren nicht und können nach einer Zentrifugation im Überstand isoliert werden. Eine detaillierte Beschreibung des Plasmid-Isolations-Protokolls ist im QIAprep Handbuch zu finden. Aliquots der isolierten Plasmide wurden zur Analyse mit den für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzymen linearisiert. Als Ergebnis der Restriktion sind ein linearisiertes Plasmid und das jeweilige Fragment zu erwarten. Dies konnte mit Hilfe eines Agarosegels überprüft werden. Es ist auch möglich eine Plasmid-Minipräparation, die das gewünschte DNA-Fragment enthält, als Ausgangsmaterial für einen weiteren Klonierungsschritt einzusetzen.

6.2.2.7 Plasmid-Aufreinigung

Für die *Plasmodium* Transfektion sind große Mengen von Plasmiden in hoher Konzentration (ca.1µg/µl) und besonders reiner Qualität nötig. Mit Hilfe der Plasmid Maxi-Präparation ist dies möglich.

Zunächst wurde hierfür eine 200 ml LB-Ampicillin Maxikultur des gewünschten Bakterienklons angeimpft. Diese wurde über Nacht bei 37°C im Schüttler (250 rpm) inkubiert. Das Aufreinigungs-Prinzip ist dasselbe wie bei der Mini-Präparation. Das Protokoll und die Materialien des Kits (siehe HiSpeed Plasmid Maxi Kit Handbuch) sind aufgrund der Menge des Templates etc. aber anders. Das Plasmid wurde in 1ml TE Puffer eluiert und anschließend der DNA-Gehalt photometrisch bestimmt. Ob die Plasmid-Präparation auch das gewünschte Plasmid enthielt, wurde nach einem Restriktionsverdau auf einem Agarosegel getestet.

6.2.2.8 DNA-Sequenzierung

Bevor ein Konstrukt für eine Transfektion verwendet wird sollte man eine DNA-Sequenzierung durchführen, um auf die Richtigkeit des klonierten Konstruktes zu testen.

Dies ist besonders bei der Generierung von Fluoreszenz-Fusionsproteinen (z.B. mCherry oder GFP fusionierte Parasitenproteine) wichtig, da hier eine Sequenzierung Aufschluß über einen möglichen *Frame-Shift* oder Basenaustausch geben kann. Bei einem Fusionsprotein ist es besonders wichtig, dass der Übergang zwischen dem Parasitenprotein und dem Fluoreszenzmarker korrekt ist, da sonst kein Fusionsprotein generiert werden kann. Für die Sequenzierung wird 30-100ng DNA sowie ein 10µM Primer Aliquot (um eine spezielle Passage im Konstrukt zu amplifizieren) an die Firma GATC, Konstanz geschickt. Die ermittelte Sequenz kann dann mit Hilfe der Programme Enzyme X, 4Peaks und Serial Cloner analysiert werden. Sofern die Sequenz korrekt ist kann sie im Folgenden präperativ verdaut und für eine Transfektion eingesetzt werden.

6.2.2.9 DNA-Fällung

Die DNA-Fällung mit Alkohol ist eine häufig angewandte Methode zur Konzentration oder Reinigung von DNA, die in wässriger Lösung vorliegt. Präzipitiert wird durch Aussalzen der DNA mit hohen Salzkonzentrationen und Ethanol. Zur Fällung von DNA aus einer wässrigen Lösung wird die Probe zunächst mit einem 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (Endkonzentration 0,3 M) und dann mit 2,5 Volumina kaltem Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgt bei -80°C für 30min. Die ausgefällte DNA wird bei 13000rpm 4°C 15min sedimentiert und das DNA-Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und 10min bei Raumtemperatur getrocknet. Danach kann das Pellet in dem benötigten Volumen Puffer aufgenommen werden.

6.2.2.10 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA kann mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden. Die Adsorption der ultravioletten Strahlung ist direkt proportional zum Gehalt an DNA. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260nm.

Die Konzentration berechnet sich wie folgt:

$(OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnung}) / 1000 = \text{Konzentration } \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Eine übliche Verdünnung war 1:100. Um den Reinheitsgrad der Probe zu bestimmen betrachtet man den Quotienten $(OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}})$. Für eine reine Probe sollte er idealerweise bei 1,8-2,0 liegen.

6.2.3 Zellkulturmethoden

6.2.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Um Zellen längere Zeit in Kultur zu halten bedarf es eines regelmäßigen Medium-Wechsels sowie der Subkultivierung der Zellen in neuen Kulturgefäßen. Für den Medium-Wechsel wird nach dem Waschen mit HBSS (Gibco Invitrogen) frisches Medium zugegeben. Um adhärent wachsende Zellen zu passagieren müssen sie mit Trypsin vom Boden der Kulturflaschen gelöst werden. Nach dem Waschen mit HBSS bedeckt man die Zellen mit einer dünnen Schicht Trypsin/EDTA (Gibco Invitrogen) und inkubiert sie für ein paar Minuten bei 37°C. Sobald sich die Zellen abgelöst haben kann man sie in Medium resuspendieren und nach einem Zentrifugationsschritt in der gewünschten Menge Medium aufnehmen und in eine neue Kulturflasche überführen. Die Zellen werden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

6.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Um definierte Zellzahlen ausplattieren zu können ist eine genaue Bestimmung der Zellzahl nötig. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer können Zellsuspensionen in geeigneter Verdünnung ausgezählt werden.

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

6.2.3.3 DNA-Transfektion in humane Zelllinien

Für die DNA Transfektion werden HuH7 oder HeLa Zellen im exponentiellen Wachstumsstadium genutzt. Die Zellen werden trypsinisiert und in 10ml DMEM compl. resuspendiert. Dann werden sie 5min bei 1000rpm, Raumtemperatur abzentrifugiert und in 10ml DMEM compl. resuspendiert. Ein Aliquot von 50µl wird für die Zählung der Zellen abgenommen und die Zellen erneut bei 1000rpm, 5min, Raumtemperatur, zentrifugiert. Die Zellen werden in 24-well Platten ausgesät (pro Kammer 100.000 Zellen). Nach 4 stündiger Inkubation bei 37°C 5% CO₂ werden die Zellen transfiziert.

Transfektion

Ein Transfektionsansatz besteht dabei aus:

Lösung A: 1,6µg Lipofectamine2000 in 100µl Opti-MEM

Lösung B: 0,8µg Plasmid-DNA in 100µl Opti-MEM

Lösung A wird zunächst 5min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Lösung B gemischt und 20min bei Raumtemperatur weiter inkubiert. Anschliessend wird das Kulturmedium der Zellen abgenommen und 500µl DMEM compl. sowie der Transfektionsansatz zugegeben und die Zellen bei 37°C 5% CO₂ für 4 Stunden inkubiert. Nach dieser Inkubation nimmt man das Medium von den Zellen ab und fügt neues Kulturmedium hinzu.

Für eine anschließend *P.berghei* Infektion werden die Zellen am folgenden Tag in den 24-well Platten mit 100.000 Sporozoiten pro Kammer infiziert und wie in 6.2.7.2 beschrieben nach 2h stündiger Inkubation bei 37°C trypsinisiert und auf μ -Dish Ibidi Schalen ausgesät. Um die Zellen zunächst mit *P.berghei* Sporozoiten zu infizieren und erst anschliessend zu transfizieren werden die Zellen wie in 6.2.7.2 infiziert und trypsinisiert und dann, wie oben beschrieben, transfiziert.

6.2.4 *P.berghei* Methoden

6.2.4.1 Transfektion von *Plasmodium berghei*

Für vier *Plasmodium*-Arten besteht die Möglichkeit der stabilen Transfektion: *P. berghei*, *P. falciparum*, *P. knowlesi* und *P. cynomolgi* (De Konig-Ward *et al.*, 2000).

Mit dem *P. berghei*-Transfektionssystem ist es möglich, die endogene Kopie eines Gens durch eine stabile Transfektion auszuschalten und dadurch die Funktion des Gens *in vivo* zu untersuchen. Da die Parasiten den größten Teil ihres Lebenszyklus haploid sind, muss nur eine Kopie des Gens ausgeschaltet werden, was die Arbeit sehr erleichtert (van Dijk *et al.*, 1995). Die Transfektion findet in den Blutstadien statt. Das bedeutet, dass alle in den Blutstadien essentiellen Gene nicht mit Hilfe dieser Methode untersucht werden können.

Es bestehen zwei verschiedene Möglichkeiten der stabilen Transfektion. Zum einem gibt es die Insertions-Methode, für welche nur ein einziges *Crossover*-Ereignis notwendig ist und zum anderen die Austausch-Methode, für welche zwei *Crossover*-Ereignisse nötig sind (De Konig-Ward *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Insertions- und die Austauschstrategie angewandt. Bei der Insertionsstrategie wird das Ziel-Gen mit Hilfe der homologen Rekombination durch ein DNA-Insertionskonstrukt, welches eine Resistenz gegen das Antifolat Pyrimethamin bzw. WR99210 vermittelt, ausgetauscht bzw. ergänzt. Damit kann ein Gen entweder ausgeschaltet werden oder ein Zusatz ein an Gen (z.B. ein mCherry „tag“)

angefügt werden, so dass dieses als funktionelle zweite Kopie erhalten bleibt. Die Parasiten, welche den Resistenzmarker tragen, können selektioniert werden. Zur Herstellung des Insertionskonstrukts wird ein Fragment aus der 5' UTR (*untranslated region*) sowie der ORF (*Open-reading-frame*) des untersuchten Gens in den b3D+mCherry-Vektor kloniert, so dass er *in-frame* mit der mCherry Sequenz ist. Für die Transfektion in *P. berghei* wird das Plasmid in der *targeting* Sequenz (5'UTR oder ORF) linearisiert. Durch die Restriktion entstehen freie homologe Enden, die durch ein einfaches *Crossover*-Ereignis in das Genom zu integrieren können.

Bei der Austauschstrategie wird das Ziel-Gen mit Hilfe der homologen Rekombination durch ein DNA-Austauschkonstrukt, welches Resistenz gegen die Antifolate Pyrimethamin bzw. WR99210 vermittelt, komplett und stabil ersetzt. Damit ist das Gen ausgeschaltet und die Parasiten, welche den Resistenzmarker tragen, können selektioniert werden. Zur Herstellung des Austauschkonstrukts werden zwei kurze Fragmente aus den 5' und 3' UTRs der Ziel-Gene in den b3D.DT^ΔH^ΔD-Vektor bzw. den hDHFR-Vektor kloniert, so dass sie das *DHFR/TS*-Selektionsgen bzw. das *hDHFR*-Selektionsgen des Vektors beidseitig flankieren. Für die Transfektion in *P. berghei* wird das Rückgrat des Plasmids entfernt, so dass nur der Resistenzmarker und die flankierenden Sequenzen übrig bleiben. Durch die Restriktion entstehen freie homologe Enden, die durch ein doppeltes *Crossover*-Ereignis in das Genom integriert werden können.

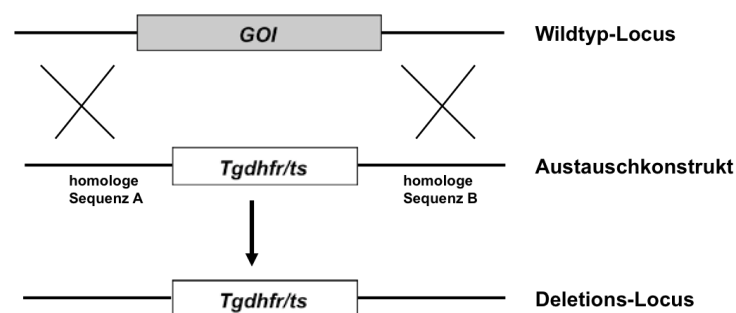


Abbildung 6-1 Schematische Übersicht über die Transfektion mittels der Austauschstrategie.

Methode zur Herstellung von Knockout-Mutanten. Der genomische *GOI* (*Gene of interest*) Locus (Oben) wird mittels doppeltem *Crossover* durch ein linearisiertes Replacement-Plasmid (Mitte), das flankierende Bereiche der 5' und 3' UTR des Gens und das *DHFR/TS* Resistenzgen enthält, stabil ersetzt. Unten ist der *goi*(-)-Deletions-Locus nach erfolgreichem Genaustausch skizziert. Die Kreuze stellen *Crossover* dar.

Bei einem *Crossover* werden, in einer komplizierten Reaktion, die Doppelhelices des endogenen Locus und des Transfektionskonstrukts gebrochen und die Enden der einen

Doppelhelix mit den Enden der jeweils anderen vereint, so dass zwei neue intakte Doppelhelices entstehen, beide aus je einem Teil des endogenen Locus und einem Teil des Transfektionskonstrukts. Diese Form der homologen Rekombination hat den Austausch des endogenen Allels mit dem Transfektionskonstrukt zur Folge.

6.2.4.1.1 Vorbereitung der Transfektionsvektoren

Für eine *P.berghei* Transfektion werden 5µg Plasmid benötigt. Zunächst werden 50µg des entsprechenden Plasmids, welches aus einer Maxi-Präp gewonnen wurde, präparativ verdaut und somit linearisiert. Dazu wird mit den entsprechenden Enzymen 50µg Plasmid geschnitten und anschliessend mit Ethanol präzipitiert. Der DNA-Niederschlag wird in 100µl ddH₂O aufgenommen - dieser Ansatz beinhaltet eine Konzentration von 50µg DNA. Für die Transfektion werden 10µl (entspricht 5µg) aus diesem Ansatz entnommen.

6.2.4.1.2 Präparation und *in vitro*-Kultur der Erythrozyten-Stadien

Für die Transfektion wurden *Plasmodium* Blutstadien für die Länge eines Entwicklungszyklus *in vitro* kultiviert.

Zunächst wurden Parasiten des Pyrimethamin-sensitiven Stammes NK65 bzw. GFP-507cl (ANKA) intraperitoneal in NMRI-Mäuse injiziert. Die Parasitämie wird nach 3 Tagen überprüft und sollte bei 2-3 % liegen. Das durch Herzpunktion mit einer heparinisierten Spritze entnommene Blut der Mäuse wird zu 10ml Transfektionsmedium + 250µl Heparin gegeben und 8 Minuten bei 1000rpm Raumtemperatur zentrifugiert.

Der Erythrozyten-Niederschlag wurde in 50ml vorgewärmten Transfektionsmedium aufgenommen und zu 100ml vorgewärmten Transfektionsmedium in eine sterile Kulturflasche gegeben. Es folgte eine Inkubation von 16-18 Stunden bei 77-80 rpm in einem Inkubator bei 37°C mit 10% O₂, 5% CO₂ und 85% N₂. Die Parasiten reifen in dieser Zeit zu Schizonten heran. Am folgenden Tag sollte mittels eines Giemsa-gefärbten-Ausstrichs der Übernacht-Kultur ein hohes Schizonten/Gametozyten Verhältnis zu sehen sein.

6.2.4.1.3 Isolation der Schizonten und Elektroporation

Die Trennung der reifen Schizonten von den nicht-infizierten Erythrozyten wird durch Dichtegradienten-Zentrifugation erreicht. Je 35ml der Übernachtkultur wurde auf 4 Falcon-Röhrchen verteilt und mit 10ml 55% Nycodenz/PBS-Lösung vorsichtig unterschichtet. Es folgte ein 25 minütiger Zentrifugationsschritt bei 1000rpm und

Raumtemperatur ohne Bremse. Dieser Schritt führt zu Bildung eines Ringes aus Schizonten welcher sich zwischen dem Nycodenz/PBS Gradienten und dem Überstand aus Medium befindet. Dieser Ring wird mit Hilfe einer Pastuer-Pipette abgenommen und in ein neues Falcon-Röhrchen gegeben, wobei die Ringe von zwei Falcon-Röhrchen auf ein neues verteilt werden und auf 30ml mit dem Überstand an Medium aufgefüllt. Es folgt ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt bei 1000rpm und Raumtemperatur ohne Bremse. Die Schizonten-Niederschläge werden in 10ml Transfektionsmedium resuspendiert und je 1ml auf Eppendorfgefäße verteilt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt von 5sec bei 13200rpm. Die Elektroporation findet mit Hilfe des Amaxa-Elektroporators (Nukleofector) und des dazugehörenden Amaxa „*Human T-Cell Nucleofactor Kit*“ statt. Das Pellet wird in 100 µl „*Human T-Cell Solution*“ + 10µl DNA (Transfektionsvektor, entspricht Konzentration von 5µg) resuspendiert. Die Mischung wird in eine Küvette gegeben und auf dem „Programm 33“ des „*Amaxa Gene Pulsers*“ elektroporiert. Nun wurden 50 µl Transfektionsmedium in die Küvette gegeben. Der Inhalt der Küvette, der die elektroporierten Parasiten enthielt, wird in eine Spritze aufgenommen und je 50 µl werden intravenös in 2 naive NMRI-Mäuse injiziert.

6.2.4.1.4 Selektion

Am Tag 1, dem ersten Tag nach der Elektroporation, hatten die injizierten Parasiten die Zeit einen Blutstadienzyklus komplett und ohne Selektionsdruck zu durchlaufen. Sowohl die Parasiten, die durch die Elektroporation die DNA mit dem *DHFR*-Resistenzmarker aufgenommen haben, als auch die verbliebenen Wildtyp-Parasiten konnten sich vermehren. In einem Giemsa gefärbten Blutaussstrich sollten einige Parasiten zu sehen sein. Diese Mischpopulation wurde anschließend für die *Knockout*-Population selektioniert. Die Tiere wurden mit Pyrimethamin (70 ng/ml; pH 3,5-5,0), welches mit dem Trinkwasser über eine Periode von 7 bis 10 Tagen verabreicht wurde, bzw. mit WR99210 (i.p.-Injektion von 5µl/g Körpergewicht von WR99210 Stammlösung) behandelt. In den folgenden Tagen sollte die Wildtyp-Population sehr stark dezimiert sein und somit keine Parasiten mehr auf den täglich angefertigten Blutaussstrichen (Methode 6.2.4.2) zu sehen sein. Erst ab Tag 6-8 hat sich eine parentale, Pyrimethamin-resistente Population so stark vermehrt, dass sie auf einem Blutaussstrich nachweisbar ist. In dieser parental Population befinden sich trotz Selektion nicht ausschließlich *Knockout*-Parasiten, sondern auch immer noch ein gewisser Anteil an Wildtyp, der wahrscheinlich durch Mutation resistent geworden ist. Bei einer Parasitämie von >1,5% wurde das Blut der Tiere mittels Herzpunktion entnommen. Es

wurde mit dem Blut auf dreierlei Wegen verfahren: 1. Es wurden Aliquots als Blutstabilate zur Langzeit-Aufbewahrung angefertigt. 2. ca. 150-200 µl Blut wurden *intra-peritoneal* in eine naive NMRI-Maus transferiert. 3. Aus dem restlichen Blut wurde die genomische DNA der parentalen Population für die anschließende Genotypisierung isoliert.

Auch von den sog. Transfer-Tieren wurden täglich Blutausstriche angefertigt und die Parasitämie dokumentiert. Es wurde weiterhin durch Behandlung mit Pyrimethamin im Trinkwasser selektioniert. Bei einer Parasitämie von >1,5% wurden auch diesen Tieren das Blut entnommen und wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

6.2.4.2 Giemsa-Färbung

Mit Hilfe eines Giemsa-gefärbten Blutausstriches kann die Parasitämie (prozentuale Anzahl *Plasmodium* infizierter Erythrozyten) bestimmt werden sowie die verschiedenen Blutstadien analysiert werden.

Zunächst wird der Maus durch eine Schwanzpunktion mit einer Kanüle ein Tropfen Blut entnommen. Dieser wird auf einem Objektträger mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Nach der Lufttrocknung wird der Ausstrich für ca. 30 Sekunden im Methanolbad fixiert und anschliessend in Giemsa-Färbelösung (10% Giemsa-Lösung in VE-Wasser) 10 Minuten gefärbt. Als nächstes wird der Ausstrich mit VE-Wasser abgespült und getrocknet bevor man ihn mittels eines Öl-Immersionsobjektiv bei 100-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop analysieren kann. Zur Bestimmung der Parasitämie wurde zunächst die Erythrozytenzahl eines durchschnittlichen Gesichtsfeldes bestimmt und im Folgenden die Zahl der infizierten Erythrozyten in ca. 10 Feldern bestimmt. Die Parasitämie ergibt sich aus: Zahl der Parasiten / (Zahl der Erythrozyten pro Feld x Zahl der Felder)

6.2.4.3 Untersuchung der Exflagellation von *P.berghei*-Gametozyten

Unter Exflagellation versteht man die Differenzierung des Mikrogamonten in acht Mikrogameten, welche normalerweise im Darm des Moskitos stattfindet.

Um die Moskitos mit *P.berghei* zu infizieren, müssen die männlichen Gametozyten im Blut einer infizierten Maus ausreichend exflagellieren. Durch das Herabkühlen der Parasiten aus dem Blut (37°C) auf Raumtemperatur wird die Exflagellation simuliert. Zunächst gewinnt man durch Schwanzpunktion einen Tropfen Blut der Maus, welcher auf

einem Objekträger gegeben und mit einem Deckglas bedeckt wird. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur kann mit 40x Vergrößerung unter dem Mikroskop Exflagellation beobachtet werden. Sind pro Gesichtsfeld mindestens 3 exflagellierende Mikrogamonten zu sehen kann die Maus für eine Blutmahlzeit verwendet werden. Dazu wird sie mit Ketamin/Xylazinhydrochlorid narkotisiert und für ca. 30 Minuten auf einen Moskito-Käfig gelegt damit die weiblichen Moskitos ihre Blutmahlzeit und mit ihr auch die Parasiten aufnehmen.

6.2.4.4 Herstellung von Blutstabilaten

Für die langfristige Lagerung von Blutstadien der Parasiten werden Stabilate angesetzt. Ein Teil Blut wird mit zwei Teilen *Freezing-Solution* gemischt und in ein 2ml Kryo-Röhrchen gegeben welches sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren wird.

6.2.4.5 Isolierung genomischer DNA

Mit Hilfe der Isolierung der genomischen DNA und folgender PCR kann eine Parasitenpopulation von *Plasmodium* hinsichtlich des Genotyps charakterisiert werden. Zunächst müssen die Parasiten-enthaltenden Erythrozyten von den Leukozyten und Thrombozyten getrennt werden. Dies erreicht man durch die Verwendung selbst hergestellter Säulen. Diese Säulen bestehen aus 5ml Spritzen die ganz unten mit Watte, in der mittleren Schicht mit Zellulosepulver (da Leukozyten stark an Zellulose binden) und abschliessend mit Glasperlen (daran binden Thrombozyten) gefüllt sind. Die Erythrozyten binden nicht und können so mit 1xPBS durchgespült werden. Das Mäuseblut wurde in insgesamt 14ml 1xPBS aufgenommen. Es folgt ein 8minütiger Zentrifugationsschritt bei 1500rpm, um die Erythrozyten zu sedimentieren. Der Niederschlag wird in 0,2% Saponin/PBS gelöst, um die Erythrozytenmembran zu lysieren. Die anschliessende Zentrifugation bei 2800rpm für 8min sedimentiert die Parasiten. Diese werden mit 1ml 1xPBS gewaschen und anschliessend in 200µl 1xPBS gelöst. Die Isolation der genomischen DNA wird mit Hilfe des QIAamp DNA-Blood Mini Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Lagerung der isolierten genomischen DNA erfolgt bei -20°C.

6.2.4.6 Parasiten-Klonierung

Um einen Klon aus einem rekombinanten Parasiten zu isolieren wird das Blut mit der entsprechenden Parasiten-Population so verdünnt, dass nur ein Parasit pro Maus injiziert wird. Zunächst wird ein Blutaussstrich der Maus angefertigt, (die Parasitämie sollte zwischen 0,1 und 1% liegen) und mindestens 50 Felder ausgezählt (Methode 6.2.4.2) um ein möglichst genaues Bestimmen der Parasitämie zu gewährleisten. Mit der ausgezählten Parasitämie wird folgende Rechnung durchgeführt, um die Anzahl der infizierten Erythrozyten zu bestimmen:

$$7 \times 10^6 \text{ (Erythrozyten/}\mu\text{l Blut)} \times \text{Parasitämie} \times 10^{-2} \text{ Parasiten/}\mu\text{l} = \text{Parasiten/}\mu\text{l}$$

Das Blut der Maus wird mittels Herzpunktion entnommen und mit RPMI so verdünnt, dass sich nur ein Parasit in 100 μ l befindet. Diese Verdünnung wird dann in 15 NMRI Mäuse intravenös injiziert. 8 bis 10 Tage später wird die Parasitämie bestimmt. Die Mäuse werden bei einer Parasitämie von ca. 1% geblutet, ein Blutstabilat angefertigt und der Rest wird verwendet, um genomische DNA zu isolieren. Diese kann im folgenden mittels PCR analysiert werden, um zu testen ob ein rekombinanter Klon isoliert werden konnte. Nur wenn maximal 40% der Mäuse positiv werden kann davon ausgegangen werden, dass nur 1 Parasit pro Maus injiziert wurde und die Klonierung erfolgreich war.

6.2.5 Tierexperimentelle Methoden

6.2.5.1 Anästhesie und Blutentnahme

Für die Isolierung der Parasiten aus dem Blut der Mäuse bzw. Ratten mussten die Tiere zunächst betäubt werden. Dazu setzt man das Tier in einen Glasbehälter, der mit Diethyläther getränkte Tücher enthält. Nach 1-2 Minuten sind die Tiere betäubt und schmerzfrei und das Blut kann mittels Herzpunktion mit einer heparinisierten Spritze entnommen werden. Das Blut kann dann für die Isolierung genomischer DNA (Methode 6.2.4.5), für die Herstellung von Blutstabilaten (Methode 6.2.4.4), oder die IP-Injektion in naive Tiere genutzt werden.

6.2.5.2 Applikationsmethoden

Für die Infektion der Mäuse mit den Parasiten stehen verschiedene Applikationsmethoden zur Verfügung. Für die intraperitoneale (i.p.) Injektion wird das Tier entsprechend fixiert während unter die Bauchdecke injiziert wird. Für eine intravenöse Injektion wird das Tier in eine Glasröhre gesetzt und der Schwanz in warmes Wasser getaucht damit die Venen besser sichtbar sind. Dann findet die Injektion in eine der Schwanzvenen statt.

6.2.6 Moskito Methoden

6.2.6.1 Bestimmung der Oocysten-Zahl

Die Infektivität im *Anopheles*-Mitteldarm ist die erste direkte *in vivo* Indikation über die Effektivität und den Erfolg der sexuellen Reproduktion und des Übergangs zum Invertebraten-Wirt. Zehn bis zwölf Tage nach dem Blutmahl haben sich in den Mitteldärmen Oozysten entwickelt, die entweder Sporoblasten oder Sporozoiten in sich tragen. Zur Bestimmung der Infektivität mussten mindestens 10 Mitteldärme überprüft werden. Dazu wurden weibliche Moskitos aus dem Käfig entnommen und auf Eis leicht betäubt. Anschließend wurde jedem Moskito unter dem Binokular in PBS oder RPMI/BSA das Abdomen vorsichtig vom Thorax getrennt und der Mitteldarm isoliert. Die Mitteldärme wurden auf ein mit PBS oder RPMI/BSA angefeuchteten Objektträger gegeben und mit einem Deckglas gesichert. Die Mitteldärme wurden unter dem Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung mikroskopiert. Die Oozysten-Zahl jedes Mitteldarms wurde analysiert und die durchschnittliche Infektivität aller Mitteldärme in Prozent angegeben.

6.2.6.2 Bestimmung der Zahl der Mitteldarm-Sporozoiten

Für eine qualitative und quantitative Analyse der abgeschlossenen Oozysten-Entwicklung wurde die Zahl der Oozysten-assoziierten Sporozoiten an Tag 14 nach Fütterung bestimmt. Die Mitteldärme (mindestens 10) wurden aus den Moskitos präpariert und in ein mit ca. 200 µl PBS oder RPMI/BSA gefülltes Eppendorf-Gefäß gegeben. Dann wurden sie mit einem kleinen Mörser mechanisch geöffnet und so die Sporozoiten ins Medium entlassen. Die Überreste der Mitteldärme wurden in zwei Zentrifugationsschritten (3 min., 4°C, 1000 rpm) mit Medium gewaschen. Der Überstand, in dem sich die Sporozoiten befinden, wurde

transferiert und auf 1/10 verdünnt. Die Sporozoiten wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Die Sporozoiten-Zahl pro Mitteldarm wird folgendermaßen bestimmt: [(Zahl der Sporozoiten in 4 Großquadraten/ 4)x10x10x Xµl Medium]/Zahl der Mitteldärme.

6.2.6.3 Bestimmung der Zahl der Speicheldrüsen-Sporozoiten

Ab dem Tag 17 nach der Infektion kann die Zahl der Speicheldrüsen-Sporozoiten weiblicher Moskitos bestimmt werden. Dies informiert über die Infektivität und die Fähigkeit der Sporozoiten die Speicheldrüsen zu invadieren. Dazu wurden mindestens 15 weibliche Moskitos eines Käfigs entnommen und unter dem Binokular der Kopf vom Thorax getrennt. Dabei wurden Speicheldrüsen freigesetzt. Diese wurden in einem mit 200 µl PBS oder RPMI/BSA gefülltem Eppendorf-Gefäß gesammelt. Die Sporozoiten wurden aus den Speicheldrüsen nach dem gleichen Prinzip wie aus den Mitteldärmen entfernt, gesäubert und gezählt. Die Sporozoiten konnten nach Bestimmung ihrer Menge in Mäuse intravenös injiziert werden oder zur Infektion von Leberzellen genutzt werden.

6.2.7 Zellbiologische Methoden

6.2.7.1 *Gliding Assay*

Die Gleitbewegung der reifen Speicheldrüsen-Sporozoiten kann mit dieser Methode untersucht werden. Während sich die Sporozoiten in dieser Gleitbewegung auf dem Substrat fortbewegen, hinterlassen sie eine Spur von Oberflächenproteinen wie dem CS-Protein und TRAP (Steward und Vanderberg, 1988). Durch immunhistochemische Färbung wird die Spur des CS-Proteins sichtbar gemacht. Zunächst wird ein *8-well-Labtecs* mit 30µl mit 3%BSA/RPMI 15 Minuten bei 37°C inkubiert um die Oberfläche mit BSA zu bedecken. Danach wird das Medium abgenommen, die Sporozoiten auf den Objektträger gegeben und diese für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, damit sie in dieser Zeit gleiten können. Nach dieser Inkubation werden die Sporozoiten mit 4% Paraformaldehyd 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, 3x mit 1%FCS/PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 10%FCS/PBS blockiert. Nach 3 x Waschen mit 1% FCS/PBS folgt die Inkubation mit dem 1.AK (α -P.b.CS 1:500 in 10%FCS/PBS) für 45 Minuten bei 37°C. Es folgt 3x Waschen mit 1%FCS/PBS sowie die Inkubation mit dem sekundären Antikörper

α -Maus-Alexa-Fluor488 (1:300 in 10%FCS/PBS) 45 Minuten bei 37°C. Nach 3x letzten Waschschritten mit 1%FCS/PBS wird der Objektträger mit 50% Glycerol/PBS und einem Deckglas eingedeckelt sowie mit Nagellack versiegelt. Anschliessend können die Objektträger mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden oder bei 4°C gelagert werden.

6.2.7.2 Leberstadien-Entwicklungsstudien

Um die Entwicklung des Parasiten in den Leberstadien als EEf (exo-erythrozytäre Form) zu verfolgen kann man die Parasiten-infizierten-Zellen (HuH7, Hepa1-6, HeLa, HFF, U-373MG) zu verschiedenen Zeitpunkten analysieren.

Die Zelllinien werden vor dem Versuchstag geteilt und in benötigter Menge in die 24-well-Platten gegeben (je Zelllinie 80.000 pro Kammer).

Am nächsten Tag wird das Medium abgenommen und die Zellen werden mit den isolierten Sporozoiten (100.000 pro Kammer in einem Volumen von 200 μ l DMEM complete Medium) infiziert. Es folgt eine Inkubation von 2 Stunden bei 37°C in welcher die Sporozoiten in die Zellen eindringen können. Danach wird 3 x mit HBSS gewaschen und die Zellen mit 200 μ l pro Kammer trypsinisiert, in 1ml Medium aufgenommen und in einem Gesamtvolumen von 10ml 2 Minuten bei 1200rpm abzentrifugiert. Dieser Schritt ist wichtig, um im Folgenden nur die Sporozoiten zu analysieren, die die Invasion in die Zellen vollzogen haben, und nicht solche, die noch im Medium oder zwischen den Zellen sind. Die Zellen werden in 2ml Medium resuspendiert und in 8-well-Labtecs oder μ -Dish Ibidi Schalen gegeben. Die Zellen einer Kammer der 24-well-Platte können auf ca. 6 Kammern der 8-well-Labtecs oder 3 μ -Dish Ibidi Schalen verteilt werden. Die verschiedenen Schalen können im Folgenden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion fixiert und somit die Entwicklung des Parasiten gestoppt werden oder für eine *live cell imaging* Analyse verwendet werden.

Zum Fixieren wird pro Kammer 400 μ l kaltes Methanol zugeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3x waschen mit 1% FCS/PBS wird 1 Stunde bei 37°C mit 10%FCS/PBS blockiert. Die Inkubation mit dem 1.AK (Maus- α -HSP70, 1:300 Verdünnung in 10%FCS/PBS) erfolgt 45 Minuten bei 37°C. Es folgen 3 Waschschriffe sowie die Inkubation mit dem 2.AK (α -Maus-IgG-Alexa 488, 1:300 Verdünnung in 10%FCS/PBS) für 45 Minuten bei 37°C. Abschliessend wird noch 3x gewaschen und der Objektträger mit *Mounting Solution* und einem Deckgläschen sowie Nagellack verschlossen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann die Entwicklung des Parasiten zu

den verschiedenen Zeitpunkten verfolgt werden was evtl. Aussagen über den Phänotyp eines rekombinanten Parasiten erlaubt.

6.2.7.3 Lokalisationsanalysen von mit *P.berghei* infizierten eukaryotischen Zelllinien

Um Aussagen über eine mögliche Lokalisierung eines Wirtsproteins in Parasiten-infizierten Zellen treffen zu können werden HuH7 bzw. HeLa Zellen mit Sporozoiten infiziert und dann mit Antikörpern gegen das Wirtsprotein und den Parasiten angefärbt. Die Zelllinien werden wie in 6.2.7.2 beschrieben vorbereitet, mit den Sporozoiten infiziert und auf *8-well-Labtechs* oder *μ -Dish Ibidi* Schalen aufgeteilt. Die Zellen können zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert werden, um eine Aussage über eine mögliche Ko-Lokalisation zwischen dem Wirtsprotein und dem Parasiten machen zu können. Die Fixierung und Färbung erfolgt wie folgt:

Zunächst werden die Zellen mit 400 μ l kaltem Methanol 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach 3x waschen mit 1% FCS/PBS wird 1 Stunde bei 37°C mit 10%FCS/PBS blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (AK) gegen das untersuchte Protein (Kaninchen-anti-Wirtsprotein) und den Parasiten (Maus- α -*P.b.*HSP70 bzw. Maus- α -*P.b.*CS bei Fixierung nach 6 Stunden) erfolgt in geeigneter Verdünnung in 10%FCS/PBS 45 Minuten bei 37°C. Es folgen drei Waschschritte sowie die Inkubation mit den beiden sekundären Antikörpern, α -Maus IgG Alexa 488 und α -Kaninchen IgG Alexa 546 (1:300 Verdünnung) für 45 Minuten bei 37°C. Abschliessend wird noch 3x gewaschen und der Objektträger mit *Mounting Solution* und einem Deckgläschen sowie Nagellack verschlossen. Die Analyse mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop kann dann Aufschluss über die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle sowie eine mögliche Ko-Lokalisierung mit dem Parasiten geben.

6.2.7.4 Wirtsorganellen Lokalisationsanalysen von mit *P.berghei* infizierten eukaryotischen Zelllinien

Um verschiedene Wirts-Organellen auf eine mögliche Ko-Lokalisierung mit dem Parasiten oder Parasiten-Proteinen zu testen, werden die Proben wie in 6.2.7.2 beschrieben vorbereitet. Anschliessend kann man die angefertigten Proben nach der gewünschten

Entwicklungsdauer (z.B. nach 24, 48, 72h) vor der mikroskopischen Analyse mit speziellen Reagenzien anfärben. Die Durchführung ist im Folgenden dargestellt:

Wirts- organellen	ER-Marker (<i>ER-Tracker</i> <i>Green</i>)	Mitochondrien- Marker (<i>Mito-Tracker</i> <i>Red</i>)	Lysosomen- Marker (<i>Lyso-Tracker</i> <i>Blue</i>)	Kernhüllen- Marker (Nesprin- <i>Organelle</i> <i>Lights</i>)	Tubulin-Marker (<i>Tubulin-Tracker</i> <i>Green</i>)
Verdünnung	1µM in HBSS	200nM in DMEM compl.	50nM in DMEM compl.	Protokoll Invitrogen, Inkubation der Zellen mit Sporozoiten 24h später	250nM in HBSS
Inkubation	30min 37°C	30min 37°C	1h 37°C		30min 37°C
Anschließend 3 x waschen und mit dem entsprechenden Mikroskop analysieren					

6.2.7.5 *live cell imaging*

Die wie in 6.2.7.2 bzw. 6.2.7.4 beschrieben vorbereiteten Proben können zu verschiedenen Zeitpunkten für *live cell imaging* Analysen verwendet werden. Geeignete Zeitpunkte sind 6, 24, 48 und 72 Stunden. Dafür werden die Proben in den *µ-Dish Ibidi Schalen* direkt mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dafür wird die Nikon Biostation, das *Spinning Disk* Mikroskop oder das Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop verwendet. Für die FRAP-Analysen wurde das *Spinning Disk* Mikroskop verwendet.

Die Bildbearbeitung wurde mit der ImageJ Software durchgeführt. Die einzelnen Videos wurden dabei zu Bildsequenzen aufgesplittet. Die FRAP-Daten wurden mit dem Programm Volocity analysiert. Die weitere Bildbearbeitung wurde mit Photoshop Software durchgeführt.

7 Danksagung

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Kai Matuschewski für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Gruppe anzufertigen. Ich möchte mich besonders für sein Vertrauen und die Chance meine Arbeit in Heidelberg abzuschließen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael Lanzer danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Erst-Gutachtens und die Bereitschaft mich weiter in seiner Abteilung arbeiten zu lassen obwohl die AG Matuschewski nach Berlin zog.

Ein besonders großes Dankeschön gilt Ann-Kristin Müller für die Bereitschaft mich in ihrem Labor aufzunehmen und mir so die Möglichkeit zu geben meine Arbeit in Heidelberg abzuschließen. Ich danke ihr ganz herzlich für die vielen Diskussion, Anregungen und guten Tips bezüglich meiner Projekte ohne die ich manchmal nicht voran gekommen wäre.

Vielen Dank an Dr. Alexander Weber, der spontan bereit war als vierter Prüfer in meiner Prüfungskommission dabei zu sein!

Der gesamten Arbeitsgruppe Matuschewski danke ich für die schöne Zeit im ersten Jahr meiner Doktorarbeit hier in Heidelberg. Besonderen Dank an Caro für die Hilfe bei dem ein oder anderen Tierexperiment. Und natürlich vielen Dank an Caro und Manuel für die vielen Stunden in der Zellkultur wenn ihr vor meinen Berlin-Besuchen eingespannt wurdet!

Bei den vielen Stunden, die ich vor dem Mikroskop verbracht habe, muß ich mehreren Leuten danken.

-Christian Goosmann und Volker Brinkmann von der Mikroskopie Einheit am MPI Berlin danke ich ganz herzlich für die aufwendige Anfertigung der EM-Daten. Besonders Du Christian hast mit sehr viel Fleiß tolle Daten zu meiner Arbeit beigetragen.

-Dem Nikon Imaging Center Heidelberg danke ich für die Bereitstellung der Mikroskope und die Beantwortung all meiner Fragen bei technischen Problemen.

-Bei Toffi und der AG Rosenhahn bedanke ich mich ganz herzlich, dass ich hin und wieder auf ihre *live cell imaging* Aufbauten zurückgreifen konnte wenn die Parasiten „so weit waren“...

Dagmar Heuer danke ich für den regen Gedankenaustausch bei den Golgi-Experimenten und die Bereitstellung der Golgi-Plasmide und Zelllinien.

Vielen lieben Dank möchte ich der Müller-Gruppe sagen. Danke, dass ihr mich bereitwillig in die Gruppe aufgenommen habt und mir das Gefühl gegeben habt ein Teil der „Müllers“ zu sein. Vielen Dank an Jenny, die immer bereitwillig eingesprungen ist wenn ich mal Hilfe bei Experimenten brauchte.

Was wäre ein Tag ohne Kaffee und „gutes Essen“? In diesem Sinne ganz herzlichen Dank an meine Kaffee- und VZM-Crew: Flo, Jenny, Roland und Matt. Vielen Dank für die schöne Zeit, auch außerhalb des Labors!

Ein ganz großes Dankeschön gilt Julia und Flo. Dafür, dass ihr immer ein offenes Ohr hattet, egal wie oft ihr mein „Gejammer“ schon ertragen müßtet!

Vielen Dank an meine Freunde! Hier besonders an Stephie, Carolin und Sebastian die mich trotz großer Entfernungen immer begleitet haben.

Zum Schluß danke ich den wichtigsten Menschen, meiner Familie. Danke an meine Oma, meine Mutter, Kati + Michi und das Hotel am Schoppenrain Jörg+Melli+Marla. Danke, dass ihr mich unterstützt habt und an mich geglaubt habt. Danke, dass ihr für mich da seid!

Zuletzt möchte ich mich bei Toffi bedanken. Wenn jemand weiß was Geduld ist, dann bist Du es. Du hast mich immer unterstützt und mir Kraft gegeben auch wenn das nicht immer ganz leicht war. Danke, dass Du da bist!

8 Literatur

Adisa, A., Rug, M., Klonis, N., Foley, M., Cowman, A. F., Tilley, L. (2003). "The Signal Sequence of Exported Protein-1 Directs the Green Fluorescent Protein to the Parasitophorous Vacuole of Transfected Malaria Parasites." *Journal of Biological Chemistry* **278**(8): 6532-6542.

Alberts, B. (2008). "Molecular Biology." Taylor & Francis.

Amino, R., Thiberge, S., Shorte, S., Frischknecht, F., Menard, R. (2006). "Quantitative Imaging of Plasmodium Sporozoites in the Mammalian Host." *Comptes Rendus Biologies* **329**(11): 858-862.

Andrade, L. O., Andrews, N. W. (2005). "The Trypanosoma Cruzi-Host-Cell Interplay: Location, Invasion, Retention." *Nature Reviews Microbiology* **3**(10): 819-823.

Bano, N., Romano, J. D., Jayabalasingham, B., Coppens, I. (2007). "Cellular Interactions of Plasmodium Liver Stage with Its Host Mammalian Cell." *International Journal for Parasitology* **37**(12): 1329-1341.

Beatty, W. L. (2006). "Trafficking from Cd63-Positive Late Endocytic Multivesicular Bodies Is Essential for Intracellular Development of Chlamydia Trachomatis." *Journal of Cell Science* **119**(2): 350-359.

Bermudes, D., Dubremetz, J. F., Achbarou, A., Joiner, K. A. (1994). "Cloning of a Cdna- Encoding the Dense Granule Protein Gra3 from Toxoplasma-Gondii." *Molecular and Biochemical Parasitology* **68**(2): 247-257.

Beyer, T. V., Svezhova, N. V., Radchenko, A. I., Sidorenko, N. V. (2002). "Parasitophorous Vacuole: Morphofunctional Diversity in Different Coccidian Genera (a Short Insight into the Problem)." *Cell Biology International* **26**(10): 861-871.

Calvocalle, J. M., Moreno, A., Eling, W. M. C., Nardin, E. H. (1994). "In-Vitro Development of Infectious Liver Stages of P-Yoelii and P-Berghei Malaria in Human Cell-Lines." *Experimental Parasitology* **79**(3): 362-373.

Casares, S., Brumeanu, T. D., Richie, T. L. (2010). "The Rts,S Malaria Vaccine." *Vaccine* **28**(31): 4880-4894.

Cerami, C., Frevert, U., Sinnis, P., Takacs, B., Clavijo, P., Santos, M. J., Nussenzweig, V. (1992). "The Basolateral Domain of the Hepatocyte Plasma-Membrane Bears Receptors for the Circumsporozoite Protein of Plasmodium-Falciparum Sporozoites." *Cell* **70**(6): 1021-1033.

Cogswell, F. B. (1992). "The Hypnozoite and Relapse in Primate Malaria." *Clinical Microbiology Reviews* **5**(1): 26-35.

- Coppens, I., Dunn, J. D., Romano, J. D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J. C., Joiner, K. A. (2006). "Toxoplasma Gondii Sequesters Lysosomes from Mammalian Hosts in the Vacuolar Space." *Cell* **125**(2): 261-274.
- Coppens, I., Sinai, A. P., Joiner, K. A. (2000). "Toxoplasma Gondii Exploits Host Low-Density Lipoprotein Receptor-Mediated Endocytosis for Cholesterol Acquisition." *Journal of Cell Biology* **149**(1): 167-180.
- de Koning-Ward, T. F., Janse, C. J., Waters, A. P. (2000). "The Development of Genetic Tools for Dissecting the Biology of Malaria Parasites." *Annual Review of Microbiology* **54**: 157-185.
- De Matteis, M. A., Luini, A. (2008). "Exiting the Golgi Complex." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**(4): 273-284.
- Dobbelaere, D. A. E., Kuenzi, P. (2004). "The Strategies of the Theileria Parasite: A New Twist in Host-Pathogen Interactions." *Current Opinion in Immunology* **16**(4): 524-530.
- Elliott, D. A., Clark, D. P. (2000). "Cryptosporidium Parvum Induces Host Cell Actin Accumulation at the Host-Parasite Interface." *Infection and Immunity* **68**(4): 2315-2322.
- Elmendorf, H. G., Haldar, K. (1994). "Plasmodium-Falciparum Exports the Golgi Marker Sphingomyelin Synthase into a Tubovesicular Network in the Cytoplasm of Mature Erythrocytes." *Journal of Cell Biology* **124**(4): 449-462.
- Foth, B. J., McFadden, G. I. (2003). The Apicoplast: A Plastid in Plasmodium Falciparum and Other Apicomplexan Parasites. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol 224. San Diego, Academic Press Inc. **224**: 57-110.
- Frevert, U., Engelmann, S., Zougbede, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski, K., Liebes, L. (2005). "Intravital Observation of Plasmodium Berghei Sporozoite Infection of the Liver." *Plos Biology* **3**(6): 1034-1046.
- Goldszmid, R. S., Coppens, I., Lev, A., Caspar, P., Mellman, I., Sher, A. (2009). "Host Er-Parasitophorous Vacuole Interaction Provides a Route of Entry for Antigen Cross-Presentation in Toxoplasma Gondii-Infected Dendritic Cells." *Journal of Experimental Medicine* **206**(2): 399-410.
- Heinzen, R. A., Scidmore, M. A., Rockey, D. D., Hackstadt, T. (1996). "Differential Interaction with Endocytic and Exocytic Pathways Distinguish Parasitophorous Vacuoles of Coxiella Burnetii and Chlamydia Trachomatis." *Infection and Immunity* **64**(3): 796-809.
- Heuer, D., Lipinski, A. R., Machuy, N., Karlas, A., Wehrens, A., Siedler, F., Brinkmann, V., Meyer, T. F. (2009). "Chlamydia Causes Fragmentation of the Golgi Compartment to Ensure Reproduction." *Nature* **457**(7230): 731-U8.
- Heussler, V., Rennenberg, A., Stanway, R. (2010). "Host Cell Death Induced by the Egress of Intracellular Plasmodium Parasites." *Apoptosis* **15**(3): 376-385.

- Heussler, V. T., Stanway, R. R. (2008). "Cellular and Molecular Interactions between the Apicomplexan Parasites Plasmodium and Theileria and Their Host Cells." *Parasite-Journal De La Societe Francaise De Parasitologie* **15**(3): 211-218.
- Hollingdale, M. R., Leef, J. L., McCullough, M., Beaudoin, R. L. (1981). "In Vitro Cultivation of the Exoerythrocytic Stage of Plasmodium Berghei from Sporozoites." *Science* **213**(4511): 1021-1022.
- Janse, C. J., Franke-Fayard, B., Mair, G. R., Ramesar, J., Thiel, C., Engelmann, S., Matuschewski, K., van Gemert, G. J., Sauerwein, R. W., Waters, A. P. (2006). "High Efficiency Transfection of Plasmodium Berghei Facilitates Novel Selection Procedures." *Molecular and Biochemical Parasitology* **145**(1): 60-70.
- Jayabalasingham, B., Bano, N., Coppens, I. (2010). "Metamorphosis of the Malaria Parasite in the Liver Is Associated with Organelle Clearance." *Cell Research* **20**(9): 1043-1059.
- Jobe, O., Lumsden, J., Mueller, A. K., Williams, J., Silva-Rivera, H., Kappe, S. H. I., Schwenk, R. J., Matuschewski, K., Krzych, U. (2007). "Genetically Attenuated Plasmodium Berghei Liver Stages Induce Sterile Protracted Protection That Is Mediated by Major Histocompatibility Complex Class I-Dependent Interferon-Gamma-Producing Cd8(+) T Cells." *Journal of Infectious Diseases* **196**(4): 599-607.
- Kaiser, K., Camargo, N., Kappe, S. H. I. (2003). "Transformation of Sporozoites into Early Exoerythrocytic Malaria Parasites Does Not Require Host Cells." *Journal of Experimental Medicine* **197**(8): 1045-1050.
- Kappe, S. H. I., Buscaglia, C. A., Nussenzweig, V. (2004). "Plasmodium Sporozoite Molecular Cell Biology." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20**: 29-59.
- Kumar, K. A., Baxter, P., Tarun, A. S., Kappe, S. H. I., Nussenzweig, V. (2009). "Conserved Protective Mechanisms in Radiation and Genetically Attenuated Uis3(-) and Uis4(-) Plasmodium Sporozoites." *Plos One* **4**(2): 5.
- Kumar, Y., Cocchiaro, J., Valdivia, R. H. (2006). "The Obligate Intracellular Pathogen Chlamydia Trachomatis Targets Host Lipid Droplets." *Current Biology* **16**(16): 1646-1651.
- Kumar, Y., Valdivia, R. H. (2009). "Leading a Sheltered Life: Intracellular Pathogens and Maintenance of Vacuolar Compartments." *Cell Host & Microbe* **5**(6): 593-601.
- Labaied, M., Harupa, A., Dumpit, R. F., Coppens, I., Mikolajczak, S. A., Kappe, S. H. I. (2007). "Plasmodium Yoelii Sporozoites with Simultaneous Deletion of P52 and P36 Are Completely Attenuated and Confer Sterile Immunity against Infection." *Infection and Immunity* **75**(8): 3758-3768.
- Lingelbach, K., Joiner, K. A. (1998). "The Parasitophorous Vacuole Membrane Surrounding Plasmodium and Toxoplasma: An Unusual Compartment in Infected Cells." *Journal of Cell Science* **111**: 1467-1475.

- MacKellar, D. C., O'Neill, M. T., Aly, A. S. I., Sacchi, J. B., Cowman, A. F., Kappe, S. H. I. (2010). "Plasmodium Falciparum Pf10_0164 (Etramp10.3) Is an Essential Parasitophorous Vacuole and Exported Protein in Blood Stages." *Eukaryotic Cell* **9**(5): 784-794.
- Mackintosh, C. L., Beeson, J. G., Marsh, K. (2004). "Clinical Features and Pathogenesis of Severe Malaria." *Trends in Parasitology* **20**(12): 597-603.
- Matuschewski, K. (2006). "Getting Infectious: Formation and Maturation of Plasmodium Sporozoites in the Anopheles Vector." *Cellular Microbiology* **8**(10): 1547-1556.
- Matuschewski, K., Ross, J., Brown, S. M., Kaiser, K., Nussenzweig, V., Kappe, S. H. I. (2002). "Infectivity-Associated Changes in the Transcriptional Repertoire of the Malaria Parasite Sporozoite Stage." *Journal of Biological Chemistry* **277**(44): 41948-41953.
- Medica, D. L., Sinnis, P. (2005). "Quantitative Dynamics of Plasmodium Yoelii Sporozoite Transmission by Infected Anopheline Mosquitoes." *Infection and Immunity* **73**(7): 4363-4369.
- Meis, J. F., Verhave, J. P., Jap, P. H., Hollingdale, M. R., Meuwissen, J. H. (1986). "Organization of the Exoerythrocytic Stage of the Rodent Malaria Parasite Plasmodium Berghei. A Cytochemical Study." *J Submicrosc Cytol.* **18**(4): 755-60.
- Meresse, S., Steele-Mortimer, O., Moreno, E., Desjardins, M., Finlay, B., Gorvel, J. P. (1999). "Controlling the Maturation of Pathogen-Containing Vacuoles: A Matter of Life and Death." *Nature Cell Biology* **1**(7): E183-E188.
- Mikolajczak, S. A., Jacobs-Lorena, V., MacKellar, D. C., Camargo, N., Kappe, S. H. I. (2007). "L-Fabp Is a Critical Host Factor for Successful Malaria Liver Stage Development." *International Journal for Parasitology* **37**(5): 483-489.
- Morrisette, N. S., Sibley, L. D. (2002). "Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**(1): 21-+.
- Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C. R., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., Rodriguez, A. (2001). "Migration of Plasmodium Sporozoites through Cells before Infection." *Science* **291**(5501): 141-144.
- Mueller, A. K., Labaied, M., Kappe, S. H. I., Matuschewski, K. (2005a). "Genetically Modified Plasmodium Parasites as a Protective Experimental Malaria Vaccine." *Nature* **433**(7022): 164-167.
- Mueller, A. K., Camargo, N., Kaiser, K., Andorfer, C., Frevert, U., Matuschewski, K., Kappe, S. H. I. (2005b). "Plasmodium Liver Stage Developmental Arrest by Depletion of a Protein at the Parasite-Host Interface." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(8): 3022-3027.
- Mueller, A. K., Deckert, M., Heiss, K., Goetz, K., Matuschewski, K., Schuster, D. (2007). "Genetically Attenuated Plasmodium Berghei Liver Stages Persist and Elicit Sterile Protection Primarily Via Cd8 T Cells." *American Journal of Pathology* **171**(1): 107-115.

- Perlmann, P., Troye-Blomberg, M. (2002). *Malaria and the Immune System in Humans. Malaria Immunology*, 2nd Edition. Basel, Karger. **80**: 229-242.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R. G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E., Gorvel, J. P. (1998). "Brucella Abortus Transits through the Autophagic Pathway and Replicates in the Endoplasmic Reticulum of Nonprofessional Phagocytes." *Infection and Immunity* **66**(12): 5711-5724.
- Plattner, F., Soldati-Favre, D. (2008). "Hijacking of Host Cellular Functions by the Apicomplexa." *Annual Review of Microbiology* **62**: 471-487.
- Poh, J., Odendall, C., Spanos, A., Boyle, C., Liu, M., Freemont, P., Holden, D. W. (2008). "SteC Is a Salmonella Kinase Required for Spi-2-Dependent F-Actin Remodelling." *Cellular Microbiology* **10**(1): 20-30.
- Pradel, G., Frevert, U. (2001). "Malaria Sporozoites Actively Enter and Pass through Rat Kupffer Cells Prior to Hepatocyte Invasion." *Hepatology* **33**(5): 1154-1165.
- Prudencio, M., Rodriguez, A., Mota, M. M. (2006). "The Silent Path to Thousands of Merozoites: The Plasmodium Liver Stage." *Nature Reviews Microbiology* **4**(11): 849-856.
- Rejmann Lipinski, A. R., Heymann, J., Meissner, C., Karlas, A., Brinkmann, V., Meyer, T. F., Heuer, D. (2009). "Rab6 and Rab11 Regulate Chlamydia Trachomatis Development and Golgi-84-Dependent Golgi Fragmentation." *Plos Pathogens* **5**(10): 12.
- Romano, J. D., Bano, N., Coppens, I. (2008). "New Host Nuclear Functions Are Not Required for the Modifications of the Parasitophorous Vacuole of Toxoplasma." *Cellular Microbiology* **10**(2): 465-476.
- Russell, D. G. (1995). "Mycobacterium and Leishmania - Stowaways in the Endosomal Network." *Trends in Cell Biology* **5**(3): 125-128.
- Rzomp, K. A., Scholtes, L. D., Briggs, B. J., Whittaker, G. R., Scidmore, M. A. (2003). "Rab Gtpases Are Recruited to Chlamydial Inclusions in Both a Species-Dependent and Species-Independent Manner." *Infection and Immunity* **71**(10): 5855-5870.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T., Gey, G. O. (1953). "Studies on the Propagation in Vitro of Poliomyelitis Viruses. Iv. Viral Multiplication in a Stable Strain of Human Malignant Epithelial Cells (Strain Hela) Derived from an Epidermoid Carcinoma of the Cervix." *J Exp Med* **97**(5): 695-710.
- Schneider, I., Haller, D., Kullmann, B., Beyer, D., Ahmed, J. S., Seitzer, U. (2007). "Identification, Molecular Characterization and Subcellular Localization of a Theileria Annulata Parasite Protein Secreted into the Host Cell Cytoplasm." *Parasitology Research* **101**(6): 1471-1482.
- Schwab, J. C., Beckers, C. J. M., Joiner, K. A. (1994). "The Parasitophorous Vacuole Membrane Surrounding Intracellular Toxoplasma-Gondii Functions as a Molecular-Sieve." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(2): 509-513.

- Scidmore, M. A., Fischer, E. R., Hackstadt, T. (2003). "Restricted Fusion of Chlamydia Trachomatis Vesicles with Endocytic Compartments During the Initial Stages of Infection." *Infection and Immunity* **71**(2): 973-984.
- Sharma, A., Yogavel, M., Akhouri, R. R., Gill, J. (2008). "Crystal Structure of Soluble Domain of Malaria Sporozoite Protein Uis3 in Complex with Lipid." *Journal of Biological Chemistry* **283**(35): 24077-24088.
- Shi, T. Y., Yan, W. C., Ren, H. B., Liu, X. Y., Suo, X. (2009). "Dynamic Development of Parasitophorous Vacuole of Eimeria Tenella Transfected with the Yellow Fluorescent Protein Gene Fused to Different Signal Sequences from Apicomplexan Parasites." *Parasitology Research* **104**(2): 315-320.
- Shortt, H. E., Garnham, P. C. C. (2000). "Demonstration of a Persisting Exo-Erythrocytic Cycle in Plasmodium Cynomolgi and Its Bearing on the Production of Relapses." *Bulletin of the World Health Organization* **78**(12): 1447-1449.
- Sibley, L. D., Niesman, I. R., Parmley, S. F., Cesbrondelauw, M. F. (1995). "Regulated Secretion of Multi-Lamellar Vesicles Leads to Formation of a Tubulovesicular Network in Host-Cell Vacuoles Occupied by Toxoplasma-Gondii." *Journal of Cell Science* **108**: 1669-1677.
- Silvie, O., Franetich, J. F., Boucheix, C., Rubinstein, E., Mazier, D. (2007). "Alternative Invasion Pathways for Plasmodium Berghei Sporozoites." *International Journal for Parasitology* **37**(2): 173-182.
- Silvie, O., Goetz, K., Matuschewski, K. (2008). "A Sporozoite Asparagine-Rich Protein Controls Initiation of Plasmodium Liver Stage Development." *Plos Pathogens* **4**(6): 12.
- Silvie, O., Greco, C., Franetich, J. F., Dubart-Kupperschmitt, A., Hannoun, L., van Gemert, G. J., Sauerwein, R. W., Levy, S., Boucheix, C., Rubinstein, E., Mazier, D. (2006). "Expression of Human Cd81 Differently Affects Host Cell Susceptibility to Malaria Sporozoites Depending on the Plasmodium Species." *Cellular Microbiology* **8**(7): 1134-1146.
- Simmons, D., Woollett, G., Bergincartwright, M., Kay, D., Scaife, J. (1987). "A Malaria Protein Exported into a New Compartment within the Host Erythrocyte." *Embo Journal* **6**(2): 485-491.
- Sinai, A. P., Joiner, K. A. (1997). "Safe Haven: The Cell Biology of Nonfusogenic Pathogen Vacuoles." *Annual Review of Microbiology* **51**: 415-462.
- Sinai, A. P., Joiner, K. A. (2001). "The Toxoplasma Gondii Protein Rop2 Mediates Host Organelle Association with the Parasitophorous Vacuole Membrane." *Journal of Cell Biology* **154**(1): 95-108.
- Snow, R. W., Guerra, C. A., Noor, A. M., Myint, H. Y., Hay, S. I. (2005). "The Global Distribution of Clinical Episodes of Plasmodium Falciparum Malaria." *Nature* **434**(7030): 214-217.

- Spielmann, T., Fergusen, D. J. P., Beck, H. P. (2003). "Etramps, a New Plasmodium Falciparum Gene Family Coding for Developmentally Regulated and Highly Charged Membrane Proteins Located at the Parasite-Host Cell Interface." *Molecular Biology of the Cell* **14**(4): 1529-1544.
- Spielmann, T., Gardiner, D. L., Beck, H. P., Trenholme, K. R., Kemp, D. J. (2006). "Organization of Etramps and Exp-1 at the Parasite-Host Cell Interface of Malaria Parasites." *Molecular Microbiology* **59**(3): 779-794.
- Stewart, M. J., Vanderberg, J. P. (1988). "Malaria Sporozoites Leave Behind Trails of Circumsporozoite Protein During Gliding Motility." *Journal of Protozoology* **35**(3): 389-393.
- Stoute, J. A., Slaoui, M., Heppner, D. G., Momin, P., Kester, K. E., Desmons, P., Welde, B. T., Garcon, N., Krzych, U., Marchand, M., Ballou, W. R., Cohen, J. D. (1997). "A Preliminary Evaluation of a Recombinant Circumsporozoite Protein Vaccine against Plasmodium Falciparum Malaria." *New England Journal of Medicine* **336**(2): 86-91.
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J. M., Menard, R., Heussler, V. T. (2006). "Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids." *Science* **313**(5791): 1287-1290.
- Subtil, A., Blocker, A., Dautry-Varsat, A. (2000). "Type Iii Secretion System in Chlamydia Species: Identified Members and Candidates." *Microbes and Infection* **2**(4): 367-369.
- Subtil, A., Parsot, C., Dautry-Varsat, A. (2001). "Secretion of Predicted Inc Proteins of Chlamydia Pneumoniae by a Heterologous Type Iii Machinery." *Molecular Microbiology* **39**(3): 792-800.
- SussToby, E., Zimmerberg, J., Ward, G. E. (1996). "Toxoplasma Invasion: The Parasitophorous Vacuole Is Formed from Host Cell Plasma Membrane and Pinches Off Via a Fission Pore." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(16): 8413-8418.
- Swanson, M. S., Isberg, R. R. (1995). "Association of Legionella-Pneumophila with the Macrophage Endoplasmic-Reticulum." *Infection and Immunity* **63**(9): 3609-3620.
- Tarun, A. S., Dumpit, R. F., Camargo, N., Labaied, M., Liu, P., Takagi, A., Wang, R., Kappe, S. H. I. (2007). "Protracted Sterile Protection with Plasmodium Yoelii Pre-Erythrocytic Genetically Attenuated Parasite Malaria Vaccines Is Independent of Significant Liver-Stage Persistence and Is Mediated by Cd8(+) T Cells." *Journal of Infectious Diseases* **196**(4): 608-616.
- Touray, M. G., Warburg, A., Laughinghouse, A., Krettli, A. U., Miller, L. H. (1992). "Developmentally Regulated Infectivity of Malaria Sporozoites for Mosquito Salivary-Glands and the Vertebrate Host." *Journal of Experimental Medicine* **175**(6): 1607-1612.
- Trinczek, B., Ebner, A., Mandelkow, E. (1999). "Tau Regulates the Attachment/Detachment but Not the Speed of Motors in Microtubule-Dependent Transport of Single Vesicles and Organelles." *Journal of Cell Science* **112**(14): 2355-2367.

van Dijk, M. R., Douradinha, B., Franke-Fayard, B., Heussler, V., van Dooren, M. W., van Schaijk, B., van Gemert, G. J., Sauerwein, R. W., Mota, M. M., Waters, A. P., Janse, C. J. (2005). "Genetically Attenuated, P36p-Deficient Malarial Sporozoites Induce Protective Immunity and Apoptosis of Infected Liver Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(34): 12194-12199.

van Dijk, M. R., Waters, A. P., Janse, C. J. (1995). "Stable Transfection of Malaria Parasite Blood Stages." *Science* **268**(5215): 1358-1362.

van Ooij, C., Kalman, L., van Ijzendoorn, S., Nishijima, M., Hanada, K., Mostov, K., Engel, J. N. (2000). "Host Cell-Derived Sphingolipids Are Required for the Intracellular Growth of Chlamydia Trachomatis." *Cellular Microbiology* **2**(6): 627-637.

van Schaijk, B. C. L., Janse, C. J., van Gemert, G. J., van Dijk, M. R., Gego, A., Franetich, J. F., van de Vegte-Bolmer, M., Yalaoui, S., Silvie, O., Hoffman, S. L., Waters, A. P., Mazier, D., Sauerwein, R. W., Khan, S. M. (2008). "Gene Disruption of Plasmodium Falciparum P52 Results in Attenuation of Malaria Liver Stage Development in Cultured Primary Human Hepatocytes." *Plos One* **3**(10): 10.

Vanderberg, J. P. (1974). "Studies on the Motility of Plasmodium Sporozoites." *J Protozool* **21**(4): 527-37.

Walker, M. E., Hjort, E. E., Smith, S. S., Tripathi, A., Hornick, J. E., Hinchcliffe, E. H., Archer, W., Hager, K. M. (2008). "Toxoplasma Gondii Actively Remodels the Microtubule Network in Host Cells." *Microbes and Infection* **10**(14-15): 1440-1449.

Waters, A. P., Thomas, A. W., vanDijk, M. R., Janse, C. J. (1997). "Transfection of Malaria Parasites." *Methods* **13**(2): 134-147.

Wilson, J., Huynh, C., Kennedy, K. A., Ward, D. M., Kaplan, J., Aderem, A., Andrews, N. W. (2008). "Control of Parasitophorous Vacuole Expansion by Lyst/Beige Restricts the Intracellular Growth of Leishmania Amazonensis." *Plos Pathogens* **4**(10): 9.

Zeng, B., Zhu, G. (2006). "Two Distinct Oxysterol Binding Protein-Related Proteins in the Parasitic Protist Cryptosporidium Parvum (Apicomplexa)." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **346**(2): 591-599.

www.map.ox.ac.uk

www.who.int/topics/malaria/en