

Charakterisierung der biologischen Funktion der *Plasmodium falciparum* Calcium-abhängigen Protein Kinase 1

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Dominik Kugelstadt

geboren am 05.10.1979 in Wiesbaden

Mainz, 2009

Dekan:

1. Berichterstatterin:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2009

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kugelstadt, D., Winter, D., Pluckhahn, K., Lehmann, W.D. & Kappes, B.

Raf kinase inhibitor protein affects activity of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 1. *Mol Biochem Parasitol* 151, 111-7 (2007).

in Revision:

Winter D., Kugelstadt D., Kappes B., Lehmann W.D.

Phosphorylation of PfGAP45 strongly alters its properties as kinase and protease substrate.

Analytical Biochemistry

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	VI-IX
1 Einleitung	1
1.1 Die Infektionskrankheit Malaria	1
1.1.1 Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	2
1.1.2 Krankheitsverlauf der Malaria tropica	4
1.1.3 Malariatherapie.....	5
1.1.4 Invasion der Plasmodien in die Erythrozyten.....	6
1.2 Die Rolle Calcium-abhängiger Kinasen bei der Malaria im Allgemeinen.....	10
1.2.1 Calcium als intrazellulärer Botenstoff der Zelle.....	10
1.2.2 Calcium-abhängige Proteinkinasen (CDPKs) in <i>Plasmodium falciparum</i>	11
1.3 Die Rolle der <i>Plasmodium falciparum</i> Calcium-abhängigen Proteinkinase 1 im Speziellen .	12
1.3.1 Lokalisation der PfCDPK1 im befallenen Erythrozyten.....	12
1.3.2 Enzymatische Eigenschaften der PfCDPK1	14
1.4 Mögliche Interaktionspartner der PfCDPK1	15
1.4.1 Proteine mit dem „MGC-basic“-Signalmotiv.....	15
1.4.1.1 <i>Plasmodium falciparum</i> cAMP bindendes Protein (PfCAP).....	16
1.4.1.2 <i>Plasmodium falciparum</i> Armadillo repeat Protein (PfARM) / Catenin-ähnliches Protein	16
1.4.1.3 <i>Plasmodium falciparum</i> Adenylatkinase (PfADK).....	17
1.4.1.4 <i>Plasmodium falciparum</i> „gliding associated protein 45“ (PfGAP45)	18
1.4.1.5 <i>Plasmodium falciparum</i> Rab GTPase 5b (Pfrab_5b).....	19
1.4.1.6 <i>Plasmodium falciparum</i> 2C artige Proteinphosphatase (PfPP2C_like)	19
1.5 PfRKIP als weiterer Interaktionspartner der PfCDPK1	20
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Laborausstattung.....	23
2.1.1 Materialien	23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.3 Chemikalien.....	25
2.1.3.1 Radiochemikalien	27
2.1.4 Enzyme	28
2.1.5 Größenmarker für die Elektrophorese	28
2.1.6 Vektoren	28
2.1.7 Bakterienstämme.....	29
2.1.8 Plasmodien.....	30
2.1.9 Nukleinsäuren.....	30
2.1.10 Oligonukleotide.....	30
2.1.10.1 Oligonukleotide für die Expression.....	30
2.1.10.2 Oligonukleotide für die Transfektion.....	31
2.1.10.3 Oligonukleotide für die Transfektion (Fluore)	31
2.1.10.4 Oligonukleotide für die Sequenzierung.....	31
2.1.10.5 Oligonukleotide zur Amplifikation von PfRKIP.....	31

2.1.11	Genomische DNA / cDNA.....	32
2.1.12	Antikörper	32
2.2	Lösungen, Medien und Puffer	32
2.2.1	Antibiotika	32
2.2.2	Kulturmedien	32
2.2.3	Lösungen und Puffer	33
2.3	Verwendete Kits	34
2.4	Verwendete Chromatographiesäulen.....	35
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	35
2.5.1	Herstellung kompetenter Bakterien	35
2.5.2	Transformation von <i>E. coli</i>	36
2.5.3	Übernachtskulturen	36
2.5.4	<i>E. coli</i> Glycerin-Dauerkulturen	36
2.5.5	Isolation von Plasmid-DNA.....	37
2.5.6	Restriktionsverdau von DNA.....	37
2.5.7	Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	38
2.5.8	DNA-Isolation aus Agarosegelen.....	38
2.5.9	Reinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen und von PCR-Produkten.....	39
2.5.10	Ethanolpräzipitation von DNA.....	39
2.5.11	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	39
2.5.12	Ligation von DNA.....	40
2.5.13	Dephosphorylierung von DNA am 5'-Ende.....	40
2.5.14	DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion.....	40
2.5.15	PCR-Screening nach positiven Klonen.....	42
2.5.16	Austausch und Herausschneiden von Nukleotidbasen durch ortsspezifische Mutagenese	42
2.5.17	cDNA-Synthese mit Hilfe der Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	43
2.6	Biochemische Methoden	44
2.6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	44
2.6.2	Präzipitation von Proteinen durch Trichloressigsäure.....	44
2.6.3	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.6.4	Proteinnachweis mittels Coomassie-Färbung.....	46
2.6.5	Proteinnachweis mittels Silberfärbung.....	46
2.6.6	Western-Blotting	47
2.6.7	Ponceau S-Färbung von geblohteten Proteine.....	48
2.6.8	Immunologische Detektion von Proteinen	48
2.7	Proteinaufreinigung	49
2.7.1	Rekombinante Proteinexpression.....	49
2.7.2	Nickel-Affinitätschromatographie	49
2.7.3	Gelfiltrations-Chromatographie.....	50
2.7.4	Ionenaustausch-Chromatographie	51
2.7.5	Aufarbeitung des Proteineluats für Kinasereaktionen.....	52
2.8	Kinasereaktionen zur Bestimmung der Enzymaktivität der PfCDPK1	52
2.8.1	Kinasereaktionen zur Ermittlung von Inhibitorwirkungen auf PfCDPK1.....	54
2.8.2	Bestimmung der IC ₅₀ eines Inhibitors	54
2.9	Affinitätsreinigung von Antikörpern	54

2.9.1	Kopplung eines Antigens an Sepharose.....	54
2.9.2	Aufreinigung von Antikörpern aus Rohserum	55
2.10	Mikroskopie	56
2.10.1	Lichtmikroskopie.....	56
2.10.2	Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie	56
2.10.3	Fluorescence resonance energy transfer (FRET).....	57
2.10.4	Poly-L-Lysinbeschichtung von Objektträgern	58
2.11	Massenspektrometrie	58
2.11.1	Massenspektrometrische Messung	58
2.11.2	Automatisierte Proteinidentifizierung und Quantifizierung	58
2.12	Zellkultur	59
2.12.1	Aufarbeiten von humanem Serum	59
2.12.2	Aufarbeitung von humanen Erythrozyten	59
2.12.3	Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i>	59
2.12.4	Mikroskopische Darstellung von <i>P. falciparum</i> mittels Giemsa-Färbung	60
2.12.4.1	Vorbereitung der Parasiten für die Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie	60
2.12.5	Kernfärbung mit Hoechst 33342	61
2.12.6	Bestimmung der Parasitämie.....	61
2.12.7	Einfrieren von <i>P. falciparum</i>	61
2.12.8	Auftauen von <i>P. falciparum</i>	62
2.12.9	Saponinlyse infizierter Erythrozyten	62
2.12.10	Synchronisation von <i>P. falciparum</i> -Kulturen mit Sorbitol	63
2.12.10.1	Isolation spezifischer Stadien aus <i>P. falciparum</i>	63
2.12.10.2	Isolation von Merozoiten	64
2.12.11	Isolation von genomischer DNA aus <i>Plasmodium falciparum</i>	65
2.12.12	Isolation von messenger RNA (mRNA) aus <i>P. falciparum</i>	65
2.12.13	Genetische Veränderung von <i>P. falciparum</i>	66
2.12.13.1	Vorbereitung der Zellkultur	66
2.12.13.2	Vorbereitung des Transfektionsvektors	66
2.12.13.3	Transfektion von <i>P. falciparum</i>	67
2.12.14	Zellfraktionierung von <i>P. falciparum</i>	67
2.12.15	[³ H]Hypoxanthin Inkorporationsreaktion (IC ₅₀ -Bestimmung).....	68
3	Ergebnisse	71
3.1	<i>Plasmodium falciparum</i> Calcium-abhängige Protein Kinase 1 (PfCDPK1)	71
3.1.1	Rekombinante Expression und Aufreinigung.....	71
3.1.2	Bestimmung der autophosphorylierten Aminosäuren der PfCDPK1.....	72
3.1.3	Untersuchung des Einflusses der PfCDPK1 auf die Invasion von <i>P. falciparum</i> in Erythrozyten ..	74
3.1.4	Klonierung eines PfCDPK1-YFP Transfektionskonstruktes.....	76
3.2	„MGC-basic“ Proteine.....	77
3.2.1	<i>Plasmodium falciparum</i> cAMP bindendes Protein / cAMP Rezeptor Protein (PfCAP).....	77
3.2.1.1	Rekombinante Expression und Aufreinigung von PfCAP	77
3.2.1.1.1	Klonierung des Expressionskonstruktes.....	77
3.2.1.1.2	Optimierung der IPTG-Konzentration und der Expressionsdauer	78
3.2.1.1.3	Aufreinigung des PfCAP.....	79
3.2.1.2	PfCAP ist ein Substrat der PfCDPK1	84

3.2.1.2.1	Bestimmung der durch die PfCDPK1 phosphorylierten Aminosäuren in PfCAP	87
3.2.1.3	Transfektion eines PfCAP Konstruktes	88
3.2.1.3.1	Klonierung des PfCAP Konstruktes.....	88
3.2.1.3.2	Doppeltransfektion von 3D7 mit PfCDPK1-D212A und PfCAP	89
3.2.1.3.3	Doppeltransfektion mit dem Deletionskonstrukt des PfCAP und der PfCDPK1-D212A	90
3.2.2	<i>Plasmodium falciparum</i> „Armadillo repeat rich protein“ (PfARM).....	91
3.2.2.1	Rekombinante Expression und Aufreinigung des PfARM	91
3.2.2.1.1	Klonierung des Expressionskonstruktes.....	91
3.2.2.1.2	Optimierung der IPTG-Konzentration und der Expressionsdauer	92
3.2.2.1.3	Aufreinigung des PfARM	92
3.2.2.2	PfARM ist ein Substrat der PfCDPK1	94
3.2.2.2.1	Bestimmung der durch die PfCDPK1 phosphorylierten Aminosäuren in PfARM.....	95
3.2.2.3	Transfektion eines PfARM Konstruktes	96
3.2.2.3.1	Klonierung des PfARM-Konstruktes	96
3.2.2.3.2	Transfektion von 3D7 mit PfARM	96
3.2.3	<i>Plasmodium falciparum</i> Adenylatkinase (PfADK)	97
3.2.3.1	Rekombinante Expression und Aufreinigung der PfADK	97
3.2.3.1.1	Klonierung des ADK-Expressionskonstruktes	97
3.2.3.1.2	Optimierung der IPTG-Konzentration und der Expressionsdauer	98
3.2.3.1.3	Aufreinigung der NusA-PfADK	100
3.2.3.2	Bestimmung der durch die PfCDPK1 phosphorylierten Aminosäuren in PfADK	101
3.2.3.3	Transfektion eines PfADK Konstruktes	102
3.2.3.3.1	Klonierung des PfADK Konstruktes.....	102
3.2.3.3.2	Doppeltransfektion von 3D7 mit PfADK und PfCDPK1-D212A	103
3.2.3.3.3	Doppeltransfektion mit dem Deletionskonstrukt der PfADK und der PfCDPK1-D212A	104
3.2.3.3.4	„Fluorescence resonance energy transfer“ (FRET).....	104
3.2.4	<i>Plasmodium falciparum</i> GTPase (Pfrab_5b)	105
3.2.4.1	Rekombinante Expression und Aufreinigung des Pfrab_5b	105
3.2.4.1.1	Klonierung des Expressionskonstruktes.....	105
3.2.4.1.2	Optimierung der IPTG-Konzentration und der Expressionsdauer	106
3.2.4.1.3	Aufreinigung des Pfrab_5b	108
3.2.4.2	Pfrab_5b ist ein Substrat der PfCDPK1	109
3.2.4.3	Transfektion eines Pfrab_5b-Konstruktes.....	109
3.2.4.3.1	Klonierung des Transfektionskonstruktes.....	109
3.2.4.3.2	Doppeltransfektion von 3D7 mit Pfrab_5b und PfCDPK1-D212A	110
3.2.4.3.3	Doppeltransfektion von 3D7 mit Pfrab_5b_leader und PfCDPK1-D212A	111
3.2.5	<i>Plasmodium falciparum</i> Protein Phosphatase „2c_like“ (PfPP2C_like)	111
3.2.5.1	Transfektion eines PfPP2C_like-Konstruktes	111
3.2.5.1.1	Klonierung des Transfektionskonstruktes.....	111
3.2.5.1.2	Doppeltransfektion von 3D7 mit PfPP2C_like (gDNA) und PfCDPK1-D212A	112
3.2.6	<i>Plasmodium falciparum</i> „gliding associated protein 45“ (PfGAP45)	113
3.2.6.1	Rekombinante Expression und Aufreinigung des PfGAP45	113
3.2.6.1.1	Klonierung des Expressionskonstruktes.....	113
3.2.6.1.2	Expressionstests	114
3.2.6.1.3	Optimierung der IPTG-Konzentration und der Expressionsdauer	114
3.2.6.1.4	Aufreinigung des PfGAP45	116

3.2.6.2	PfGAP45 ist ein Substrat der PfCDPK1	117
3.2.6.2.1	Bestimmung der durch die PfCDPK1 phosphorylierten Aminosäuren in PfGAP45	118
3.2.6.3	Transfektion eines PfGAP45 Konstruktes	119
3.2.6.3.1	Klonierung des PfGAP45 Konstruktes	119
3.2.6.3.2	Doppeltransfektion von 3D7 mit PfGAP45 und PfCDPK1-D212A	119
3.2.6.3.3	Doppeltransfektion mit dem PfGAP45-Deletionskonstrukt und der PfCDPK1-D212A.....	120
3.3	Potentielle Regulatoren der PfCDPK1	121
3.3.1	<i>Plasmodium falciparum</i> Raf Kinase Inhibitor Protein (PfrKIP).....	121
3.3.1.1	PfrKIP wird in parasitären Blutstadien exprimiert	121
3.3.1.2	Rekombinante Expression und Aufreinigung von PfrKIP	122
3.3.1.3	PfrKIP ist ein Substrat der PfCDPK1	123
3.3.1.4	Bestimmung der durch die PfCDPK1 phosphorylierten Aminosäuren in PfrKIP	126
4	Diskussion	128
4.1	Die PfCDPK1 ist am Invasionsprozess von <i>P. falciparum</i> beteiligt.....	128
4.2	Bedeutung des „MGC-basic“-Signalmotivs für die Translokation von Proteinen.....	131
4.3	Interaktionspartner der PfCDPK1.....	135
4.3.1	Regulatoren der PfCDPK1.....	135
4.3.2	Substrate der PfCDPK1.....	138
4.4	Charakterisierung der durch die PfCDPK1 phosphorylierten Peptide	139
4.5	Inhibitoren der PfCDPK1	143
5	Zusammenfassung	145
6	Literaturverzeichnis	147
7	Anhang.....	157
7.1	Sequenzen	157
7.1.1	PfCDPK1 (cDNA)	157
7.1.2	PfPP2C_like (gDNA)	157
7.1.3	PfADK (cDNA).....	158
7.1.4	PfARM (cDNA)	159
7.1.5	PfGAP45 (CDNA).....	159
7.1.6	Pfrab_5b (cDNA)	160
7.1.7	PfCAP (cDNA).....	160
7.1.8	Citrine (cDNA)	160
7.1.9	eCFP (cDNA).....	161
7.1.10	PfrKIP (cDNA).....	161
7.2	Vektoren	162
7.2.1	PET-21a/c (+).....	162
7.2.2	pBluescript II SK (+).....	163
7.2.3	pETM-60.....	163
7.2.4	pCR-Blunt II-TOPO.....	164
Lebenslauf.....		165
Versicherung.....		166
Veröffentlichung.....		167-174

Abkürzungen

α	anti, alpha
A	Adenin, Alanin
AA	Acrylamid
AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
β -ME	beta-Mercaptoethanol
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius, Cytosin, Cystein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cam	Chloramphenicol
ca.	circa
CBD	Calcium-bindende Domäne
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CIP	“calf intestinal phosphatase”
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cys	Cystein
Δ	Delta
D	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DTL	Discovery Technologies Ltd.

DOC	Natriumdesoxycholat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eCFP	“enhanced cyan fluorescent protein”
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Farad
<i>g</i>	Vielfaches der Erdbeschleunigung
G	Glycin, Guanin
Gly	Glycin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
Hkt	Hämatokrit
H ₂ O mp.	entionisiertes Wasser (Millipore)
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
Ile	Isoleucin
IMC	„inner membrane complex“
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IRBC	infizierte rote Blutkörperchen („infected red blood cells“)
K	Lysin
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
λ	Lambda, Wellenlänge
l	Liter
LB	Luria-Broth
μ	Mikro-, 10 ⁻⁶
M	Methionin, Molar
mA	Milliampere
mM	Millimolar
Mr	relatives Molekulargewicht
MTIP	leichte Myosin Kette von <i>P. falciparum</i>
Myo-A	schwere Myosinkette
mRNA	Boten RNA („messenger RNA“)
MSP1	„merozoite surface protein 1“
n	Nano-, 10 ⁻⁹
NEB	New England Biolabs
nm	Nanometer (m ⁻⁹)

N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei $\lambda=600$ nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfADK	<i>Plasmodium falciparum</i> Adenylat kinase
PfARM	„ <i>Plasmodium falciparum</i> armadillo repeat protein“
PfCAP	<i>Plasmodium falciparum</i> cAMP bindendes Protein
PfCDPK	<i>Plasmodium falciparum</i> Calcium-abhängige Proteinkinase
PfCRT	<i>Plasmodium falciparum</i> Chloroquin-Resistenzgen
PfDHFR	<i>Plasmodium falciparum</i> Dihydrofolatreduktase
PfEMP-1	„ <i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1“
PfGAP45	„ <i>Plasmodium falciparum</i> gliding associated protein 45“
PfPPP2C_like	„ <i>Plasmodium falciparum</i> protein phosphatase“
Pfrab_5b	<i>Plasmodium falciparum</i> RBA-GTPase
PfRKIP	„ <i>Plasmodium falciparum</i> raf kinase inhibitor protein“
pH	potentia hydrogenii
PKC/A	Proteinkinase C/A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPM	Mg ²⁺ -abhängige Proteinphosphatasen
PV	parasitophore Vakuole
PVM	Membran der parasitophoren Vakuole
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	“rotations per minute“
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase/ion
S	Serin
SDS	„sodiumdodecylsulfate“
Ser	Serin
sog.	sogenannte, -r
Src	Onkogen des Rous-Sarkoma Virus
SSC	“saline sodium-citrate“
SV	Säulenvolumen
T	Threonin oder Thymin
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAP	“thrombospondin related anonymous protein”
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	biochemische Einheit für die Enzymaktivität
ü. N.	über Nacht
ÜNK	über Nacht-Kultur
UV	Ultraviolett
V	Volt, Valin
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
WT	Wildtyp
x	-mal, -fach

1 Einleitung

1.1 Die Infektionskrankheit Malaria

Malaria kann heute gemeinsam mit Tuberkulose und HIV sicherlich zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten überhaupt gezählt werden. Mehr als 250 Millionen neue Malariafälle werden jährlich registriert^{1,2}. Es leben drei Milliarden Menschen in den Malaria-Risikogebieten, die sich mittlerweile über 109 Länder erstrecken (Abb. 1.1). Jährlich fallen der Krankheit über eine Million Menschen zum Opfer³. Im Jahr 2006 war eine Infektion durch *Plasmodium falciparum*, den Erreger der Malaria tropica, der häufigste Grund für den Tod durch eine parasitäre Infektionskrankheit¹. Besonders oft sind kleine Kinder von der Infektion betroffen, die neben dem Tod schwere, dauerhafte neurologische Folgeschäden hervorrufen kann. Jedoch auch schwangere Frauen und ihre ungeborenen Babys erkranken häufig⁴.

Erste Erwähnungen der Krankheit gab es bereits vor 4000 Jahren in chinesischen Schriften. Auch im weiteren Lauf der Geschichte wurde Malaria immer wieder in Schriftstücken erwähnt. Da die Krankheit gehäuft in der Nähe von Sumpfgebieten beobachtet wurde, brachte ihr das den Namen Sumpffieber ein. Hieraus leitete sich auch der ursprünglich aus dem Italienischen stammende Name „mal'aria“ (schlechte Luft) ab, da man dachte, dass die schlechte Luft in den Sumpfgebieten der Auslöser für die Erkrankung sei⁵.

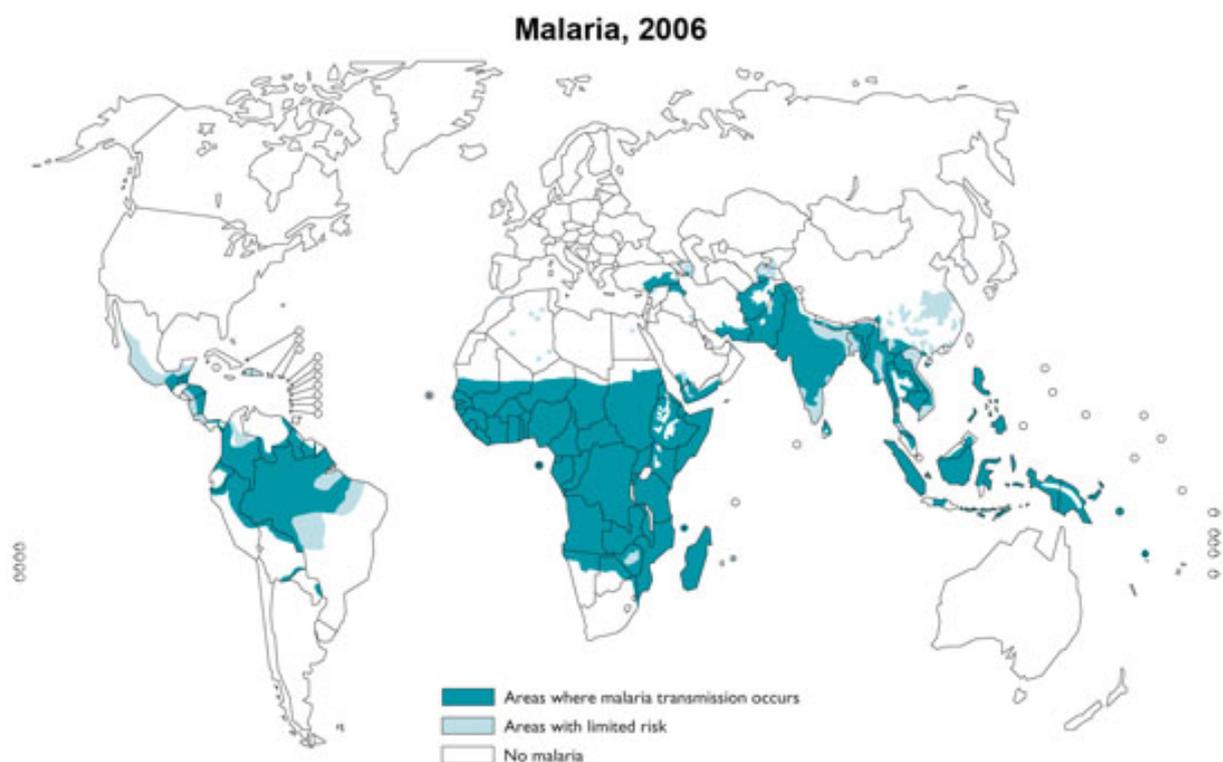


Abb. 1.1: Verbreitungsgebiet der Malaria 2006¹

Im Jahr 1880 entdeckte Charles Louis Alphonse Laveran im Blutausschrieb eines Patienten die Parasiten, die für den Ausbruch der Malaria verantwortlich sind⁶. Es gelang 1897 erstmals anhand des Erregers der Vogel malaria (*Plasmodium relictum*) die Übertragung des Parasiten durch Stechmücken nachzuweisen^{7,8}. Einige Jahre später wurde schließlich der gleiche Zyklus für einen humanpathogenen Malariaerreger in der Stechmücke *Anopheles* (Stamm *Arthropoda*, Klasse *Insecta*, Ordnung *Diptera*, Unterordnung *Nematocera*, Familie *Culicidae*) beschrieben⁹. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass der Erreger vor seinem Auftreten im Blut des Wirtes in Form präerythrozytärer Stadien in der Leber anzutreffen ist.

Die insgesamt 172 bekannten Arten des einzelligen Malariaerregers der Gattung *Plasmodium* (Stamm *Alveolata*, Unterstamm *Apicomplexa*, Klasse *Haematozoa*, Ordnung *Haemosporidia*, Familie *Plasmodiidae*) befallen Vögel, Reptilien und Säugetiere und beinhalten vier humanpathogene Spezies¹⁰. Man unterscheidet bei letzteren zwischen *Plasmodium malariae* (Erreger der Malaria quartana, Fieber in periodischen Abständen von 72 Stunden), *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax* (Erreger der Malaria tertiana, Fieber in periodischen Abständen von 48 Stunden) und dem klinisch relevantesten Erreger *Plasmodium falciparum* (Erreger der Malaria tropica, Fieber meist in unregelmäßigen Abständen)⁵.

Neben dem humanen Aspekt ist auch der durch die Krankheit verursachte wirtschaftliche Schaden enorm, der durch die Ausgaben für Medikamente sowie die Arbeits- und Produktionsausfälle entsteht. Es wird geschätzt, dass der wirtschaftliche Schaden jährlich bei etwa 12 Milliarden US-Dollar liegt¹¹ und dass das Wirtschaftswachstum der am schlimmsten betroffenen Länder jährlich um bis zu 1,3% vermindert wird¹².

1.1.1 Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

Der Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* ist durch einen Wirtswechsel zwischen dem Menschen und der Stechmücke *Anopheles* geprägt und kann in verschiedene sexuelle und asexuelle Phasen eingeteilt werden (Abb. 1.2)^{5,9}. So gibt es im menschlichen Körper zum einen den ungeschlechtlichen Vermehrungszyklus in den Leberparenchymzellen mit der Bildung von Gewebeschizonten sowie die asexuelle Vermehrung der Blutsstadien (Schizogonie)⁹. Der geschlechtliche Lebenszyklus hingegen geht mit der Bildung von Gametozyten in den Erythrozyten einher. Werden bei einer Blutmahlzeit diese Gametozyten von einer *Anopheles* aufgenommen, so setzt sich die geschlechtliche Vermehrung im Moskito mit der Gametogonie fort und findet ihren Abschluss mit der Ausbildung der Zygote^{5,13,14}.

Während der Blutmahlzeit eines weiblichen *Anopheles*-Moskitos können Speicheldrüsen-Sporozoiten in die menschliche Blutbahn gelangen. Nach kurzer Zeit (wenige Minuten) erreichen sie die Leber und dringen in die Hepatozyten ein. Während der nun folgenden exoerythrozytären Schizogonie bilden sich in den nächsten 48 Stunden vielkernige Schizonten, aus denen in den nächsten Tagen tausende Merozoiten hervorgehen, die zum Platzen der Leberzelle und damit zu

ihrer Freisetzung in die Blutbahn führen^{5,15}. Bei *P. ovale* und *P. vivax* kann es zur Bildung von Dauerstadien, sogenannten Hypnozoiten kommen, die in der Leber verbleiben und sich erst nach Monaten oder Jahren weiterentwickeln¹⁶. Die freigesetzten Merozoiten heften sich an bestimmte Rezeptormoleküle der Erythrozytenmembran an und dringen in die Zelle ein. Dies geschieht über eine Einstülpung der Erythrozytenmembran (Invagination), was die Bildung einer Vakuole um den Parasiten herum zur Folge hat. Die Membran dieser parasitophoren Vakuole setzt sich sowohl aus Teilen des Parasiten, als auch aus Teilen der Membran des roten Blutkörperchens zusammen¹⁷. Während der ca. 48-stündigen, erythrozytären Entwicklung nimmt der Parasit an Größe zu, differenziert sich vom Ringstadium zum Trophozoiten und anschließend zum mehrkernigen Schizonten, aus dem wiederum 12-32 Merozoiten hervorgehen (erythrozytäre Schizogonie). Die Ruptur der Membranen des Erythrozyten und der parasitophoren Vakuole führen zur Freisetzung der Merozoiten in die Blutbahn. Dort invadieren sie erneut Erythrozyten¹⁸ und beginnen einen neuen Schizogoniezyklus.

Das zeitgleiche Aufbrechen der befallenen Erythrozyten und die daraus resultierende Freisetzung großer Mengen an Parasiten und Fremdproteinen führen zu den für die Malaria charakteristischen Fieberschüben, die der Krankheit auch den Namen Wechselfieber eingebracht haben¹⁹. Ein geringer Teil der freigesetzten Merozoiten durchläuft nach zwei bis drei Wochen keine erneute Schizogonie, sondern differenziert sich zum männlichem Mikrogamont bzw. weiblichem Makrogamont¹³. Beide können bei *P. falciparum* bis zu 22 Tagen im Blut persistieren. Werden sie während der Blutmahlzeit von einer weiblichen *Anopheles*-Mücke aufgenommen, ist der Wirtswechsel vollzogen. Im Mitteldarm der Mücke reift der Makrogamont zum kugelförmigen Makrogameten und die Mikrogamonten differenzieren sich durch Exflagellation zu beweglichen Mikrogameten. Bei der Befruchtung eines Makrogameten durch einen Mikrogameten entsteht eine bewegliche Zygote, der sogenannte Ookinet, welcher die Darmepithelzellen durchdringt und schließlich zwischen Basalmembran und Epithelzellen eine statische Oozyste ausbildet^{13,20}. Mitotische Teilungen führen nun zur Ausbildung von Sporozoiten, was ein Platzen der Oozyste nach sich zieht. Die freigesetzten Sporozoiten gelangen über die Hämolymphe zu den Speicheldrüsenzellen der Mücke²¹. Von dort aus können sie bei der nächsten Blutmahlzeit wieder einen Wirtswechsel vollziehen und so erneut Menschen mit Malaria infizieren²⁰.

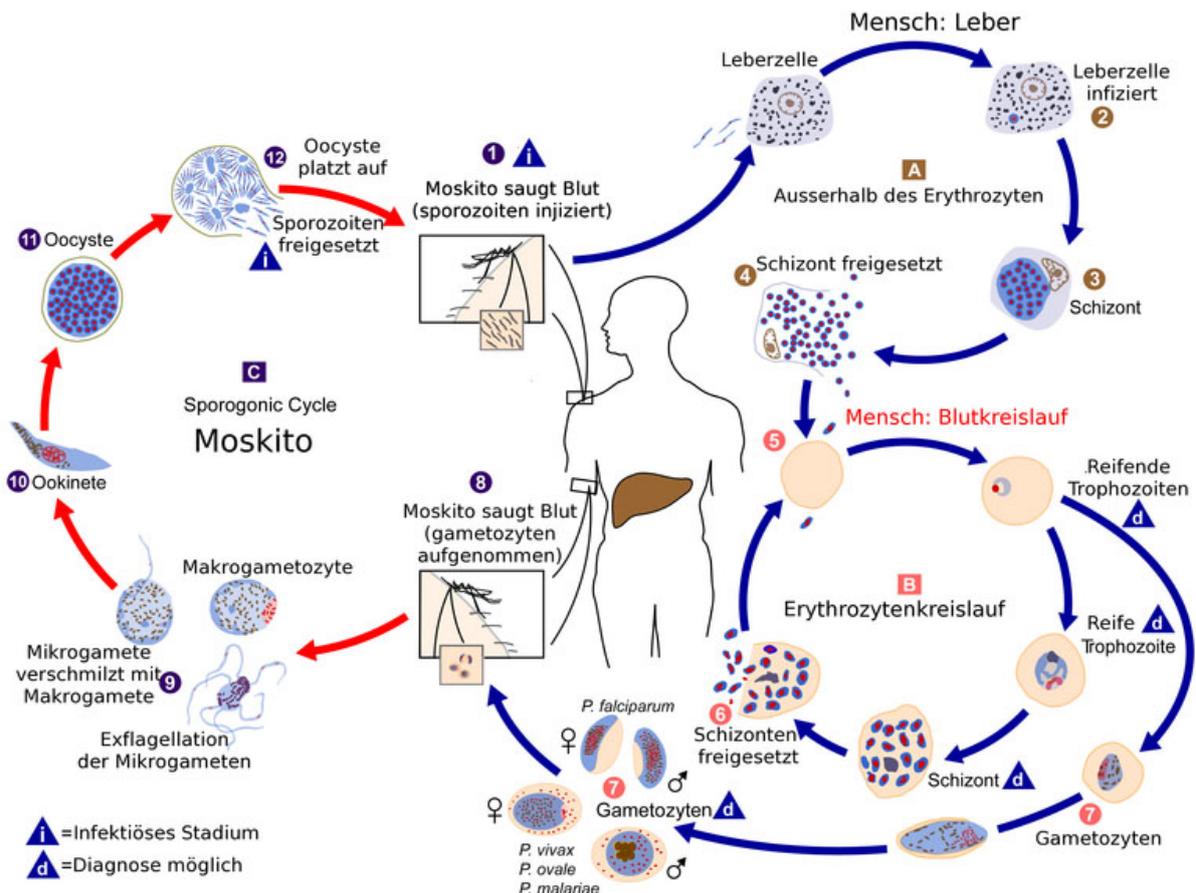


Abb. 1.2: Der Lebenszyklus von *Plasmodium* spp. (www.dpd.cdc.gov)

Die Lebenszyklen der humanpathogenen *Plasmodien* sind geprägt vom Wirtswechsel zwischen Mensch und *Anopheles*-Moskito. Während einer Blutmahlzeit injiziert die infizierte weibliche *Anopheles*-Stechmücke Sporozoiten in den menschlichen Wirt (1). Diese Sporozoiten befallen Leberzellen (2) und reifen zu Gewebsschizonten heran (3), welche schließlich aufplatzen und Merozoiten freisetzen (4). Nach dieser anfänglichen Vermehrung in der Leber (exoerythrozytärer Zyklus) (A) durchlaufen die Parasiten multiple Vermehrungszyklen in den roten Blutzellen (erythrozytärer Zyklus) (B). Merozoiten befallen Erythrozyten (5) und reifen schließlich zu Schizonten, welche bei ihrer Ruptur Merozoiten freisetzen (6). Einige Merozoiten differenzieren zu geschlechtlichen Vorläuferformen, den Gametozyten (7). Die männlichen Mikrogametozyten und die weiblichen Makrogametozyten, die während einer neuerlichen Blutmahlzeit eines Moskitos aufgenommen werden, entwickeln sich in dessen Darm zu den Geschlechtsformen, den Gameten. (8, 9). Durch einen Befruchtungsvorgang entstehen Zygoten (9), welche nach kurzer Zeit beweglich werden und eine längliche Form annehmen (10). Diese sogenannten Ookineten wandern durch das Darmepithel zur Basalmembran, wo sie sich zu Oozysten entwickeln (11). Letztere platzen schließlich und setzen Sporozoiten frei (12), welche in die Speicheldrüsen wandern. Bei einem erneuten Blutmahl kann so wiederum ein Mensch infiziert werden und der Zyklus beginnt von vorne.

1.1.2 Krankheitsverlauf der Malaria tropica

Nach der Infektion eines Menschen mit der Malaria tropica vergehen mehrere Tage bevor erste Symptome auftreten. Diese sind zunächst meist unspezifisch und gleichen mit Fieber, Schüttelfrost, Kopf- oder Gliederschmerzen, Schweißausbrüchen, allgemeiner Abgeschlagenheit und/oder gastrointestinalen Beschwerden häufig denen einer Grippe²². Da sich die Malaria tropica im Gegensatz zur Malaria tertiana und quartana nicht durch die typischen, synchronen Fiebrhythmen auszeichnet, ist bei ihr die Gefahr einer Fehldiagnose besonders groß²². Im weiteren Verlauf der Krankheit kommt es zu einer Vergrößerung der Milz und einer Blutarmut (Anämie).

Bleibt die Erkrankung unbehandelt, können bei der *Malaria tropica* innerhalb weniger Tage schwerwiegende Komplikationen auftreten, die schnell zum Tod führen können. Parasitämien von mehr als 5% (Hyperparasitämie) und andauerndes, sehr hohes Fieber (über 40°C) können ebenfalls vorkommen. Bei hohen Parasitämien kommt es zu schwersten Anämien mit einem rasch auf unter 20% fallenden Hämatokrit und einem Hämoglobinwert von weniger als 5 g/dl²³. Eine Laktazidose (Übersäuerung des Blutes) sowie Bluthochdruck bis hin zur Ausbildung der sogenannten Gehirnmalaria (zerebrale Malaria) sind weitere Komplikationen²⁴. Des Weiteren können bei der sogenannten schweren Malaria folgende Symptome auftreten: Blutgerinnungsstörungen, ein Versagen der Nieren, der Lunge und des Herzkreislaufsystems. Die Sterberate bei einer nicht behandelten schweren Malaria liegt bei nicht immunen Patienten zwischen 10 und 20 Prozent. Von der komplizierten *Malaria tropica* sind vor allem Kinder, Frauen während der ersten Schwangerschaft sowie Menschen mit einer Herkunft aus malariefreien Gebieten betroffen. In Endemiegebieten kommt es bei Jugendlichen und Erwachsenen hingegen häufig zu asymptomatischen, chronischen Verläufen, bei denen lediglich eine leichte Anämie und Splenomegalie beobachtet wird. Dies liegt in einer Teilimmunität begründet, die durch den ständigen Kontakt mit dem Erreger aufrecht erhalten wird und bei längerer Verweildauer in malariefreien Gebieten wieder verloren geht^{25,26}.

Eine Ursache für die höhere Pathogenität von *P. falciparum* gegenüber den übrigen humanpathogenen Plasmodien liegt darin begründet, dass sich die adhäsiven Eigenschaften der infizierten Erythrozyten verändern. Die Ein- bzw. Anlagerung parasiteneigener Proteine wie PfEMP1 („*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1“) und KHARP („knob associated histidin rich protein“, „knobs“) ermöglicht es infizierten Erythrozyten, sich an Endothelien der Blutgefäße (Zytoadhärenz) oder uninfizierte Erythrozyten („Rosetting“) zu heften²⁷. Die Zytoadhäsion verleiht dem Parasiten einen entscheidenden Überlebensvorteil. Zum einen können sich die Parasiten in der mikroaerophilen venösen Umgebung der Kapillaren besser entwickeln, zum anderen entgehen die adhärenzhaften infizierten Erythrozyten einer Elimination in der Milz, was vermutlich die hohen Parasitämien ermöglicht²⁸. Infolge der Zytoadhäsion findet man bei Patienten, die an den Folgen einer komplizierten Malaria verstorben sind, viele sequestrierte infizierte Erythrozyten in der Mikrovaskulatur lebenswichtiger Organe wie Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere und Plazenta (letztere bei maternaler Malaria)²⁹.

1.1.3 Malariatherapie

Im Kampf gegen eine Infektion mit Malaria kommen zum einen die Expositionsprophylaxe (Vermeidung von Stichen durch die *Anopheles*-Mücke) und zum anderen die chemische Prophylaxe/Therapie (Einnahme von Malariamedikamenten) zum Einsatz. Ein weiterer Aspekt ist die Bekämpfung der Vektorverbreitung mit Insektiziden (Vektorkontrolle). Hier ist vor allem das Insektizid Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) zu nennen, mit dem seit dem Jahre 1955 in vielen Ländern

versucht wurde, die Überträgermücken auszurotten³⁰. Neben einer schnellen Resistenzbildung trug auch die hohe Gesundheitsschädlichkeit von DDT für den Menschen dazu bei, dass das Insektizid heute in den meisten Industrieländern verboten ist³¹. Über DDT-Ablagerungen im Boden gelangt das Gift in die menschliche Nahrungskette³². Da es praktisch nicht metabolisiert werden kann, lagert es sich in Fettgeweben ein und kann damit unbegrenzt lange seine toxische Wirkung auf das Nervensystem ausüben. Dennoch wird in den meisten Entwicklungsländern heute noch DDT zur Bekämpfung der *Anopheles* eingesetzt³³.

Auf der Seite der Chemotherapeutika gehörte Chloroquin lange Zeit zu den wirksamsten Mitteln³⁴. Die kostengünstige Herstellung (<0,1 US-Dollar pro Behandlung), die hohe Effizienz bei relativ guter Verträglichkeit und die einfache Verabreichung machten es lange Zeit zum Mittel der Wahl und gleichzeitig zum erfolgreichsten Medikament, das je synthetisiert wurde³⁴. Erste chloroquinresistente *P. falciparum* Stämme traten in Lateinamerika und Südostasien bereits ab 1958 auf. Heute sind chloroquinresistente Stämme in nahezu allen Malaria-Endemiegebieten der Erde stark verbreitet³⁵. Es stehen zwar mittlerweile eine Vielzahl weiterer Chemotherapeutika gegen Malaria zur Verfügung, jedoch schreitet die Resistenzbildung auch gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin (Fansidar[®]), Amodiaquin, Atovaquon und Mefloquin (Lariam[®]) weiter fort³⁶⁻⁴⁰. Es sind also Strategien gefordert, um zum einen die Resistenzentwicklung in den Griff zu bekommen und zum anderen weiterhin geeignete Nachfolger für Chloroquin zu finden. Da Therapeutika gegen Malaria hauptsächlich in Entwicklungsländern mit hoher Armutsrate benötigt werden, stellen hier die Kosten einen entscheidenden Faktor dar. Sowohl für die Entwicklung als auch für die Herstellung neuer Therapeutika müssen die Kosten deshalb möglichst niedrig gehalten werden. So sind viele heute erhältliche Medikamente wie Malarone[®] oder die Artemisinderivate für viele Betroffene unerschwinglich³⁵. Um Gelder bei der Entwicklung einzusparen, ist auch die Optimierung bereits verfügbarer Medikamente ein gängiger Weg⁴¹. Die aktuelle Forschung orientiert sich aber auch in andere Richtungen und versucht Stoffwechselwege wie den Shikimatweg oder die Vitamin B₆ Biosynthese als Ansatzpunkte für neue Medikamente zu nutzen⁴²⁻⁴⁴. Auch die beim Menschen nicht vorkommende Calcium-abhängige, aber Calmodulin-unabhängige Proteinkinase PfCDPK1, der eine Beteiligung an der Invasion der Erythrozyten durch die Parasiten zugeschrieben wird, gilt als vielversprechender Ansatzpunkt für eine zukünftige Medikation^{45,46}. Zusätzlich gibt es in der Vakzin-Forschung aussichtsreiche Ansätze. Die mittelfristige Verfügbarkeit eines Impfstoffs ist allerdings derzeit noch nicht in Sicht⁴⁷.

1.1.4 Invasion der Plasmodien in die Erythrozyten

Eine zentrale Rolle bei der Invasion in die Wirtszellen spielt der apikale Komplex (Abb. 1.3), ein wichtiges morphologisches und namensgebendes Charakteristikum der *Apicomplexa*. Er besteht aus einer einzigartigen Ansammlung von Organellen am spitzen Ende des invadierenden Parasiten und stellt jene Struktur dar, mit welcher der Parasit stets zuerst in seine Wirtszelle eindringt.

Die Proteine des Apikalkomplexes sollen an der Erkennung, Bindung und der Invasion der Wirtszelle sowie an der Bildung der parasitophoren Vakuolen-Membran (PVM) beteiligt sein, die den intraerythrozytären Parasiten umgibt. Der Apikalkomplex besteht aus verschiedenen sekretorischen Organellen wie den Rhoptrien, Mikronemen und den „dense granules“ (Vesikel/Körnchen mit sehr hoher Dichte). Obwohl letztere überwiegend im Zytoplasma verteilt vorkommen, werden sie dennoch mit zum Apikalkomplex gezählt⁴⁸.

Damit der Parasit neue Wirtszellen befallen kann, muss es ihm auch möglich sein, infizierte Zellen wieder zu verlassen⁴⁹. Dazu muss er sowohl die Membran der parasitophoren Vakuole als auch die Erythrozytenmembran durchdringen. Diese Ereignisse hängen mit mehreren, vom Parasiten ausgehenden, biochemischen Veränderungen zusammen, die unter anderem die Stabilität des Zytoskeletts der Wirtszelle verändern, bislang aber noch nicht genau verstanden sind⁵⁰. Als gesichert erscheint lediglich, dass unterschiedliche Proteasen wie die PfSUB-1 („*Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease-1“) an der Lyse der zu durchdringenden Membranen beteiligt sind^{51,52}.

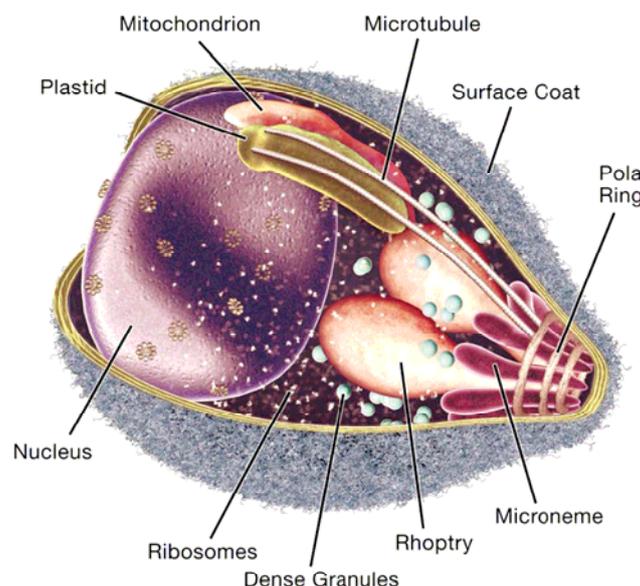


Abb.1.3: Schematische Darstellung der subzellulären Organisation eines Merozoiten von *Plasmodium falciparum* mit Apikalkomplex auf der rechten Seite¹⁸

Da die Antigene auf der Oberfläche eines Merozoiten dem Immunsystem des Wirtsorganismus ausgesetzt sind und somit schnell eine Immunantwort auslösen können, ist das Zeitfenster seines Aufenthalts außerhalb eines Erythrozyten äußerst kurz gehalten. Nur ca. 60 Sekunden benötigt der Parasit, um in eine neue Wirtszelle einzudringen⁴⁹. Zunächst erfolgt hierbei eine erste Kontaktaufnahme mit dem Erythrozyten, die auf jeder Seite des Merozoiten stattfinden kann. Im folgenden Schritt orientiert sich der Parasit um und richtet seinen apikalen Pol zur Wirtszellmembran hin aus¹⁸. Die Erkennung und die Anheftung an die Wirtszelle werden wahrscheinlich über mehrere Oberflächenproteine wie dem Merozoiten-Oberflächen-Protein 1 (MSP1) und Glykosphosphatidylinositol (GIP)-bindenden Proteinen vermittelt^{53,54}. Es entsteht eine starke Adhäsion

renz zwischen Parasit und Wirtszelle⁵⁵. Beim folgenden Invaginationsprozess kommt es zu einer irreversiblen Festlegung des Parasiten auf seine Wirtszelle, die Membranen berühren sich erstmals und es entstehen Verbindungsstellen, sogenannte „tight junctions“⁵⁶. Bei diesem Prozess wird der Merozoit in seiner Gesamtheit von der Wirtszelle umschlossen. Dies geschieht durch die aktiven Bewegungen des Merozoiten. Gleichzeitig kommt es zur Freisetzung von Substanzen aus den Rhoptrien und Mikronemen (Abb. 1.4)⁵⁷.

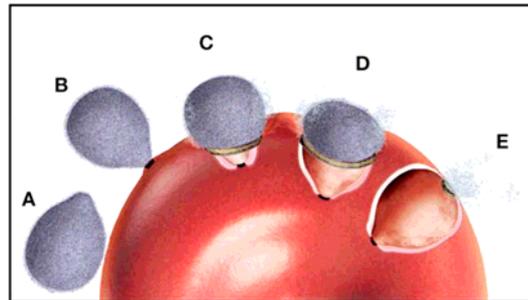


Abb. 1.4: Modell der Invasion eines Erythrozyten durch einen Merozoiten⁵⁸
 (A) Der Merozoit nimmt über Oberflächenproteine Kontakt mit der Wirtszelle auf. (B) Der Parasit richtet sich mit seinem spitzen Ende zum Erythrozyten hin aus, wobei weiterhin nur ein leichter Kontakt zur Oberfläche der Wirtszelle besteht. (C und D) Parasit und Erythrozyt gehen eine stärkere Bindung ein, der Merozoit wird eingeschlossen. (E) Eine Serinprotease löst die Oberflächenproteine des Merozoiten komplett ab.

Die Membran der beim Invasionsprozess entstehenden parasitophoren Vakuole ist wahrscheinlich ein gemeinsames Produkt der Sekrete des Parasiten und der Wirtszellmembran⁵⁹. Die Bewegungen des Parasiten hängen unmittelbar mit der Bildung der „tight junctions“ zusammen und gehen von einem Aktin-Myosin-Motorkomplex aus⁵⁶. Die Abbildung 1.5 zeigt die Organisation dieses Komplexes⁵⁸: (1) Unter Beteiligung des PfGAP50 („*Plasmodium falciparum* gliding associated protein 50“) ist das Myosin (Klasse XIV) am inneren Membrankomplex (IMC) des Parasiten verankert⁶⁰. Ob eine direkte Verbindung zum Zytoskelett des Parasiten besteht, ist bislang noch unklar. (2) Die schwere Myosin-A Kette (MyoA) wird von einer leichten Myosin Kette (MTIP) und den mit der Parasitenbewegung assoziierten Proteinen PfGAP45 und PfGAP50 gestützt^{61,62}. Die im Folgenden beschriebene Bewegung bzw. Invasion beruht auf einer Vielzahl von Ereignissen: (3) Nach einem intrazellulären Schlüsselsignal, bei dem es sich wahrscheinlich um Calcium handelt, das die Aktivierung der PfCDPK1 (*Plasmodium falciparum* calcium dependent protein kinase) bewirkt, die wiederum PfGAP45 und MTIP phosphoryliert⁴⁶, wird die Polymerisation des Aktins initiiert. Diese Polymerisation ist eine Grundvoraussetzung für die Mobilität des Parasiten und wird von den Proteinen PfFormin1 und dem kleinen Aktin-bindenden Protein Profilin vermittelt^{58,63}. (4) Die ATP-abhängige Bewegung des Myosin-A wird über (5) das Protein TRAP („thrombospondin related anonymous protein“) auf die Plasmamembran (PM) der Wirtszelle übertragen⁶⁴, wodurch die charakteristische Rutschbewegung des Parasiten zustande kommt und sich der Parasit vorwärts bewegt^{65,66}. Die Orientierung der Aktinfilamente ist bislang noch nicht völlig aufgeklärt, wird aber weitestgehend von der Bewegungsrichtung vorgegeben. (6) Löst sich nach dem Eintritt in die Wirtszelle die TRAP-vermittelte Verbindung mit der Plasmamembran wie-

der auf, so kommt es zu einer Ausschüttung verschiedener Proteasen. Diese sorgen für die Abstoßung solcher Proteine, die zuvor den Kontakt zur Wirtszelle und die Verankerung vermittelt hatten (z. B. MSP1 und GIP-bindende Proteine)⁶⁷⁻⁶⁹. (7 und 8) Zusätzlich werden die gebildeten Aktinfilamente wieder depolymerisiert und unter Beteiligung von Cofilin und CAP (Zyklase-assoziiertes-Protein) einem Recyclingprozess zugeführt⁶¹.

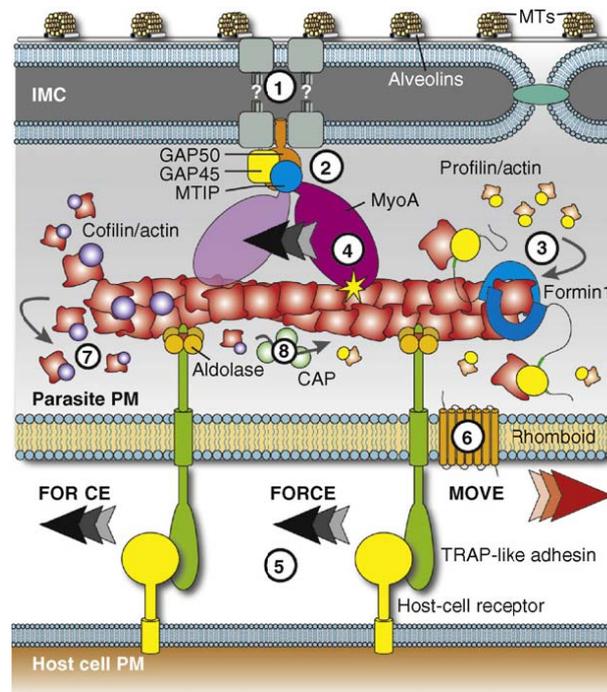


Abb. 1.5: Modell des Fortbewegungsapparates der *Apicomplexa* („gliding motor complex“)⁵⁸

Der Invasionsvorgang endet schließlich mit der Abschnürung der parasitophoren Vakuolen-Membran. Bislang ist nicht geklärt, ob es sich dabei um eine Einstülpung der Erythrozytenmembran oder um eine vom Parasiten neu gebildete Membran handelt. Vermutet wird ein Mittelweg beider Möglichkeiten⁷⁰. Die „dense granules“ schütten ihren Inhalt in den Spalt zwischen der parasitophoren Vakuolen-Membran und der Parasitenmembran aus. Dies führt zu einer weiteren Expansion der parasitophoren Vakuole ins Wirtszytosol und zur Bildung eines Transportsystems, welches als tubovesikuläres Netzwerk bezeichnet wird (Abb. 1.6)⁷¹. Zusätzlich kommt es zur Bildung sogenannter Maurer-Spalten („Maurer’s clefts“). Dabei handelt es sich um sekretorische Organellen, die sowohl mit der parasitophoren Vakuole als auch mit der Plasmamembran des Erythrozyten in Kontakt stehen^{71,72}. Die Funktion dieser Membranstapel ist noch nicht vollständig geklärt, sie scheinen aber mit der Nahrungsaufnahme des Parasiten assoziiert zu sein⁷³. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle für den Proteinaustausch zwischen dem Parasiten und der Oberfläche des Erythrozyten, was eine Modifikation der biochemischen und morphologischen Eigenschaften der Erythrozytenmembran zugunsten des Parasiten zur Folge hat^{71,72}.

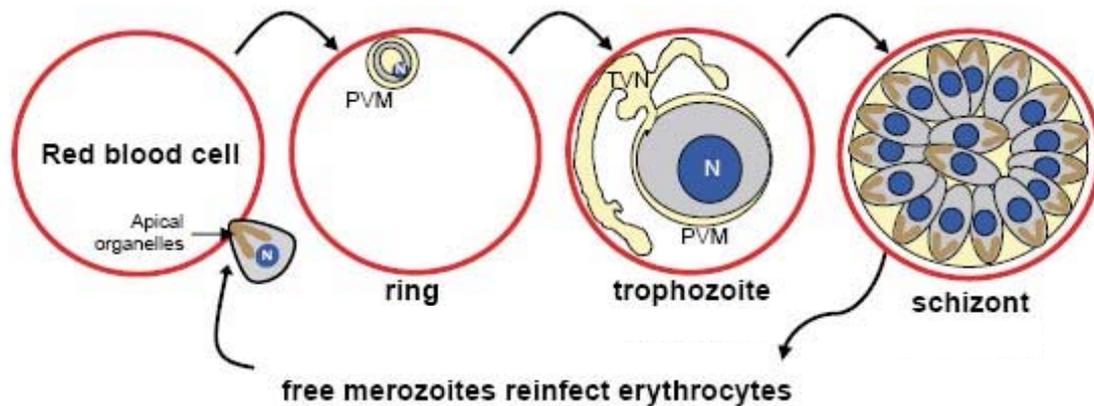


Abb. 1.6: Asexueller intraerythrozytärer Lebenszyklus von *P. falciparum*. Bildung der parasitophoren Vakuolen-Membran (PVM) und des tubovesikulären Netzwerks (TVN), stark schematisiert⁷⁴.

1.2 Die Rolle Calcium-abhängiger Kinasen bei der Malaria im Allgemeinen

1.2.1 Calcium als intrazellulärer Botenstoff der Zelle

Calcium ist das häufigste Signaltransduktionselement der Zelle und kommt von der einfachen Bakterien- bis hin zur spezialisierten Nervenzelle vor⁷⁵. Im Gegensatz zu anderen lebensnotwendigen Botenstoffen kann Calcium nicht metabolisiert werden und wirkt in hohen intrazellulären Konzentrationen zytotoxisch. Daher ist die Zelle bestrebt, die Konzentration an freiem Calcium im Zytosol mit 100-200 nM möglichst gering zu halten⁷⁵. Im extrazellulären Raum ist die Calciumkonzentration mit bis zu 2 mM dagegen 20.000 mal höher. Externe Stimuli können die kurzzeitige Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen (Antiportern, Gradienten-abhängigen Kanälen oder Ca^{2+} -Pumpen) bewirken und so einen raschen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration auf ca. 10 μM hervorrufen, was zur Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Prozessen in der Zelle führt⁷⁵.

Auch *P. falciparum* benötigt beispielsweise für die Regulation des Zellzyklusses sowie die Sicherstellung der Lebensfunktionen Calcium⁷⁶. Die Ca^{2+} -Konzentration des infizierten Erythrozyten beträgt allerdings nur etwa 100 nM⁷⁷ und ist damit für die Aufrechterhaltung der parasitären Vitalfunktionen zu niedrig. Dieses Problem umgeht der Parasit, indem er Calcium in die parasitophore Vakuole pumpt, was dort einen Anstieg der Calciumkonzentration auf bis zu 40 μM bewirkt⁷⁸. Viele der Ca^{2+} -vermittelten Prozesse laufen in Form von Phosphorylierungsreaktionen ab. Diese werden von Vertretern der Superfamilie der Calcium-abhängigen Proteinkinasen katalysiert. Hauptvertreter sind die Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (die in *Plasmodium* nicht vorkommen) sowie die Calcium-abhängigen Proteinkinasen. Die Abkürzung CDPK steht für „calcium dependent protein kinases“⁷⁹.

1.2.2 Calcium-abhängige Proteinkinasen (CDPKs) in *Plasmodium falciparum*

CDPKs zeichnen sich durch eine charakteristische Proteinstruktur aus (Abb. 1.8). N-terminal besitzen sie eine stark konservierte Serin/Threonin-Proteinkinasedomäne, die C-terminal mit einer regulatorischen Domäne verbunden ist. Ähnlich wie bei Calmodulin weist diese C-terminale Domäne vier Calciumbindungsmotive auf, die als EF-Hand bezeichnet werden und einen Helix-Turn-Helix-Aufbau haben. Diese Struktur ermöglicht der Kinase eine Calmodulin-unabhängige Aktivierung als Folge eines Ca^{2+} -Signals^{79,80}. Das Mittelstück der CDPKs kann eine autoinhibitorische Untereinheit enthalten, was bei der PfCDPK1 jedoch nicht der Fall zu sein scheint. Dieses Pseudosubstrat interagiert in Abwesenheit von Calcium mit der Kinasedomäne und inhibiert deren Aktivität, so dass nur ein gewisses Grundniveau an enzymatischer Aktivität erhalten bleibt^{79,81,82}. Der N-Terminus der CDPKs zeichnet sich außerdem durch eine hochvariable Sequenz aus, die posttranslationale Modifikationen aufweist und im Folgenden am Beispiel der PfCDPK1 genauer erläutert wird (s.1.3.1)^{83,84}.

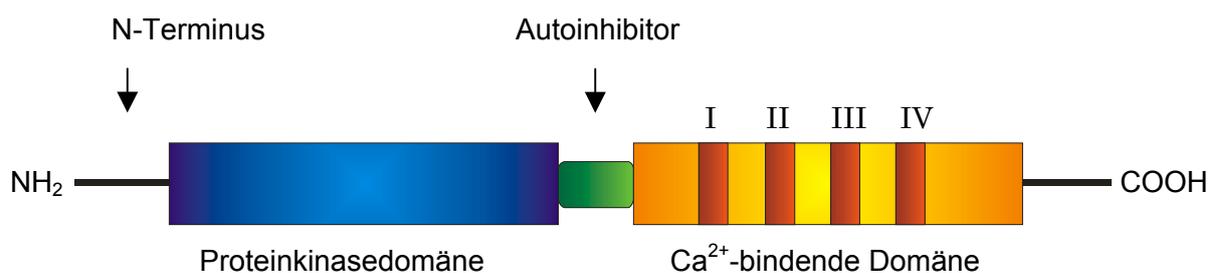


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Proteinstruktur einer Calcium-abhängigen Proteinkinase

Calcium-abhängige Proteinkinasen (CDPKs) wurden bislang lediglich für Pflanzen und einige Protozoa wie *Paramecium*, *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium spp*, nicht jedoch für Pilze, mehrzellige tierische Organismen oder gar Säuger beschrieben^{85,86}. CDPKs bilden Multigenfamilien, wobei bei *Arabidopsis thaliana* beispielsweise 34 Isoformen bekannt sind^{85,87}. In Pflanzen werden Prozesse wie Zellteilung und -differenzierung, Stressregulation oder symbiotische Interaktionen über CDPKs vermittelt, was sie sicherlich zu dem wichtigsten Calcium-regulierten Signalüberträgern macht^{79,82,88}. Für *Plasmodium* sind bislang fünf klassische CDPKs beschrieben, die in unterschiedlichen Lebensphasen des Parasiten exprimiert werden (Abb. 1.7)⁸⁹.

PfCDPK1 (siehe 1.3) ist an der Invasion des Parasiten in die Erythrozyten beteiligt⁴⁶. Des Weiteren wird der Kinase eine Rolle bei Membranbiogenese Prozessen von *Plasmodium* zugeschrieben (Kappes, unveröffentlicht). Die Funktion der PfCDPK2 ist bislang unbekannt.

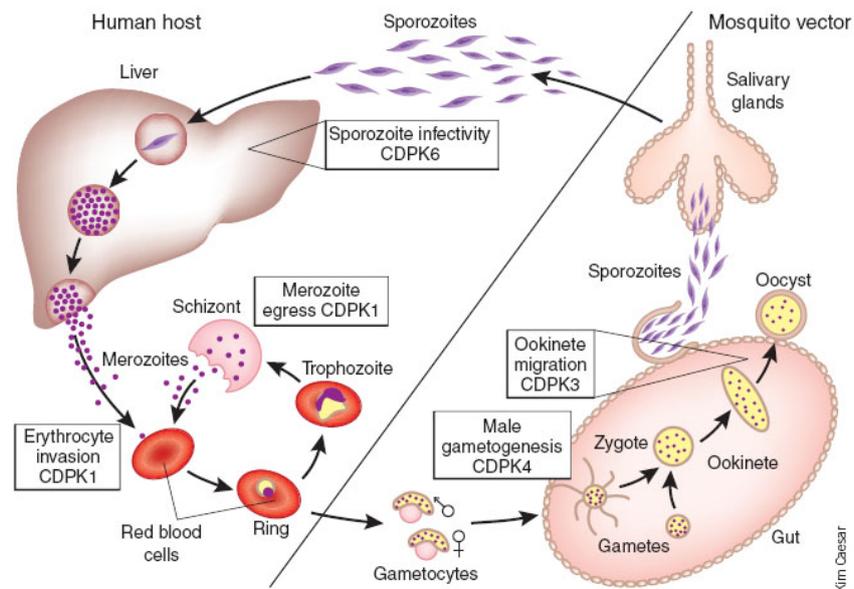


Abb. 1.7: Die Rolle der CDPKs im Lebenszyklus von *Plasmodium* spp.⁸⁹

An *Plasmodium berghei* konnte gezeigt werden, dass die PbCDPK3 an der Invasion von Ookineten durch den Mitteldarm des Moskito beteiligt ist. Die Kinase ist hier für die Regulation der Beweglichkeit von Ookineten mitverantwortlich⁹⁰. Für die PbCDPK4 konnte, ebenfalls bei *P. berghei*, nachgewiesen werden, dass diese Kinase bei der Entwicklung männlicher Gametozyten eine essentielle Rolle einnimmt, indem sie die Regulation des Zellzyklusses steuert (Arretierung in der S-Phase)⁹¹. Die PfCDPK5 könnte eine Rolle für die intraerythrozytäre Reproduktion des Parasiten spielen (Kappes, unveröffentlicht). Kürzlich wurde für *Plasmodium* eine weitere CDPK beschrieben, die von einigen Autoren zwar bisweilen als CDPK6 bezeichnet wird, jedoch nicht zu den klassischen CDPKs zu zählen ist. Ihr wird eine Bedeutung für die Infektivität der Sporozoiten im Menschen (beispielsweise während des Eindringens in Leberzellen) zugeschrieben^{92,93}.

1.3 Die Rolle der *Plasmodium falciparum* Calcium-abhängigen Proteinkinase 1 im Speziellen

1.3.1 Lokalisation der PfCDPK1 im befallenen Erythrozyten

Die PfCDPK1 wurde 1993 erstmals beschrieben und hat eine molekulare Masse von etwa 63 kD⁹⁴. Die vornehmlich in der parasitophoren Vakuole lokalisierte PfCDPK1 wird hauptsächlich in den späten Blutstadien der Parasiten exprimiert. In Segmenter-Stadien konnten dabei die höchsten Konzentrationen nachgewiesen werden^{95,96}. Die Kinase ist membranassoziiert und weist dazu drei Besonderheiten auf (Abb. 1.9), die für das Anheften der Kinase an die Membran entscheidend sind. Bei den ersten drei Aminosäuren der PfCDPK1 handelt es sich um Methionin-Glycin-

Cystein, an die, nach Abspaltung des Methionins, posttranslational zwei Fettsäurereste angehängt. Es handelt sich dabei um einen Myristatrest am Glycin und um einen Palmitatrest am Cystein. Auf diese acylierten Aminosäuren folgt die dritte Besonderheit. Ein Cluster, das hauptsächlich aus basische Aminosäuren besteht, welche ergänzend zu den beiden Fettresten für die Befestigung der Kinase an der Membran sorgen⁹⁷. Die Bindungsenergie zweier dieser drei Motive ist jedoch bereits ausreichend, um ein Protein stabil an der Membran zu verankern⁹⁸.

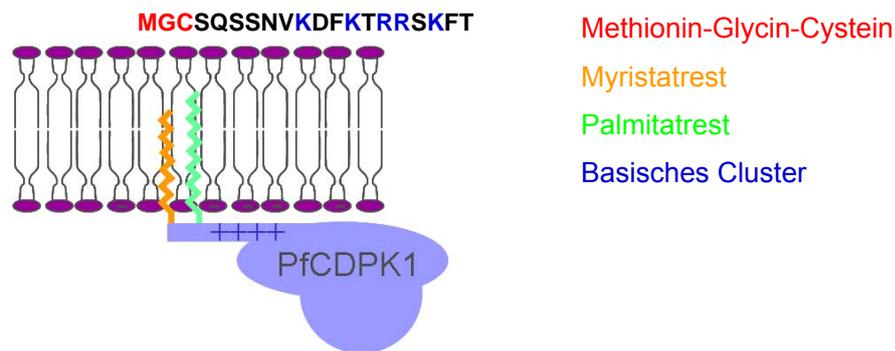


Abb.1.9: Verankerung der PfCDPK1 an der Membran über drei Motive (Myristatrest, Palmitatrest und basisches Cluster)

Da es unökonomisch wäre, nicht benötigte Bindungskräfte durch den Einsatz eines zusätzlichen Motivs zu verschwenden, war es naheliegend, dass die Kombination der drei Bindungsmotive eine weitere Aufgabe erfüllt. Diese Funktion konnte im Jahre 2004 aufgeklärt werden. Es handelt sich um ein Translokationssignal, welches dafür sorgt, dass PfCDPK1 in die parasitophore Vakuole gesteuert wird⁹⁷. Über Mutagenese konnte gezeigt werden, dass alle drei Motive für eine Zielsteuerung der PfCDPK1 in die parasitophore Vakuole erforderlich sind. Fehlt eines der Signale, wird die Kinase nicht mehr in die parasitophore Vakuole transportiert, sondern ist stattdessen im Zytosol des Parasiten zu finden. Somit scheint in *P. falciparum* neben dem klassischen Transportweg, bei dem ein Signal- bzw. Transitpeptid abgespalten wird und der Proteintransport über das endoplasmatische Reticulum vonstatten geht sowie dem Transport mittels dem *Plasmodium* Export Element (PEXEL), dass für den Transport von Proteinen in das Wirtszytosol verantwortlich ist, ein weiteres Transportsignal zu existieren, welches für den Transport in die parasitophore Vakuole und möglicherweise auch zum tubovesikulären System verantwortlich ist^{97,99-104}.

Schon lange wurde eine Beteiligung der PfCDPK1 am Invasionsprozess von *P. falciparum* diskutiert. Diese Annahme konnte kürzlich, in einer parallel zu dieser Arbeit angefertigten Studie, bestätigt werden. In dieser wurde gezeigt, dass PfCDPK1 in Schizonten, die am Invasionsprozess beteiligten Proteine der leichten Myosin Kette (MTIP, siehe 1.1.4) sowie das mit der Parasitenbewegung assoziierte Protein PfGAP45 phosphoryliert. Bei einer Inhibition der Kinase mit dem Inhibitor K252a (einem Staurosporinanaloga) findet keine Invasion statt⁴⁶. Des Weiteren ist eine Beteiligung der PfCDPK1 an sämtlichen Membranbiogenese Prozessen denkbar (Kappes, unveröffentlicht). Dafür spricht beispielsweise, dass PfCDPK1 in den Bereichen von unreifen Merozoiti-

ten gefunden wird, in denen die spätere Merozoitenmembran ausgebildet wird (Kappes, unveröffentlicht). Des Weiteren wird das Enzym während der erythrozytären Entwicklung von *P. falciparum* vor allem in der parasitophoren Vakuole (PV), an der Membran der parasitophoren Vakuole (PVM), auf der Oberfläche der Plasmamembran des Parasiten sowie in jenen Membransystemen gefunden, welche ihren Ursprung in der parasitophoren Vakuole nehmen. Dazu gehören das tubovesikuläre System (TVS), dass sich ausgehend von der parasitophoren Vakuole durch das Zytoplasma des Wirtserythroyten erstreckt, die Maurer-Spalten („Maurers clefts“, MC) sowie intraparasitäre Vakuolen⁹⁷. Die Lokalisation der Kinase ist in Abb.1.10 dargestellt.

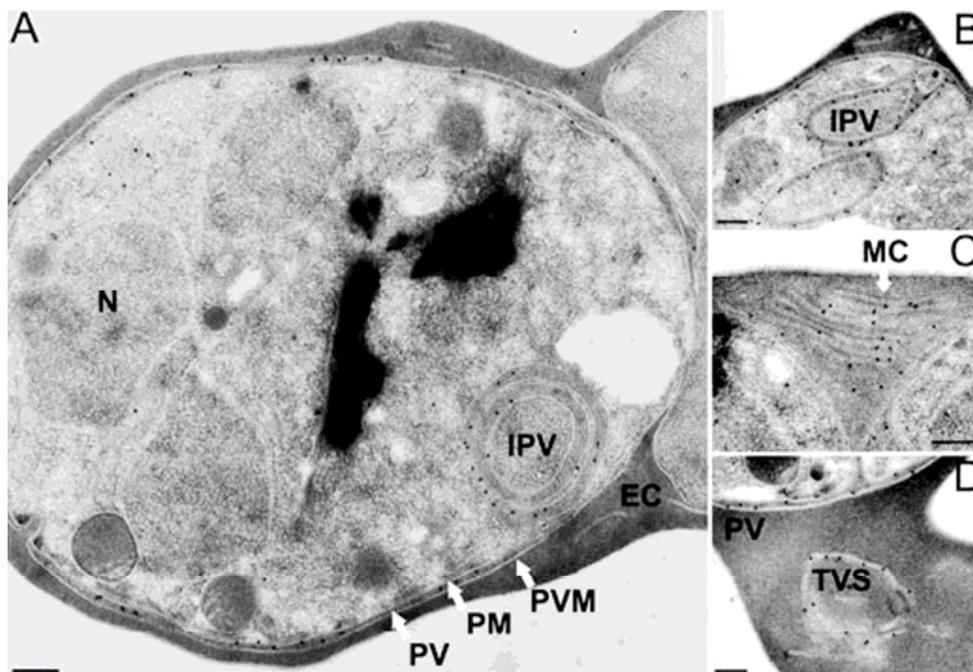


Abb. 1.10: Elektronenmikroskopische Darstellung der subzellulären Lokalisation der PfCDPK1 in *P. falciparum*⁹⁷. PfCDPK1 wurde mittels eines spezifischen Antikörpers und Gold-markiertem Protein A sichtbar gemacht (vereinzelte schwarze Punkte).

(A) PfCDPK1 ist in der parasitophoren Vakuole (PV) sowie an der Oberfläche der parasitären Plasmamembran (PM) und der Membran der parasitophoren Vakuole (PVM) detektierbar; (B) Lokalisation der PfCDPK1 in einer intraparasitären Vakuole (IPV); (C) Nachweis der PfCDPK1 in den Maurer-Spalten (MC); (D) Markierung der PfCDPK1 im tubovesikulären System (TVS) und der parasitophoren Vakuole.

1.3.2 Enzymatische Eigenschaften der PfCDPK1

Die K_m - und V_{max} -Werte der rekombinanten 524 Aminosäuren langen PfCDPK1 für Mg^{2+} /ATP betragen $26 \mu M$ bzw. $70 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ für Casein als Substrat⁹⁶. Die durchschnittliche Calcium-Dissoziationskonstante (K_d) der PfCDPK1 beträgt $80 \mu M$ und liegt damit deutlich über der durchschnittlichen K_d von Calmodulin ($4 \mu M$)¹⁰⁵. Die geringe Affinität der PfCDPK1 gegenüber Ca^{2+} scheint eine Anpassung an die hohen Ca^{2+} -Verhältnisse in der parasitophoren Vakuole zu sein^{106,107}. Für eine vollständige Aktivierung der PfCDPK1 ist die Bindung von zwei Ca^{2+} -Ionen

erforderlich. Die Aktivierung ist mit einer Konformationsänderung verbunden, welche nach der Bindung der beiden Ca^{2+} -Ionen zu 85% abgeschlossen ist¹⁰⁵.

Mutationsanalysen des rekombinanten Enzyms ergaben, dass eine intakte Ca^{2+} -Bindungsdomäne II (vgl. Abb. 1.7) essentiell für die Aktivierung des Enzyms durch Calcium ist, wohingegen eine Eliminierung der Calcium-Domäne III die Aktivierung des Enzyms kaum beeinflusst. Die Bedeutung der einzelnen Ca^{2+} -Domänen für die Ca^{2+} -induzierte Enzymaktivierung der PfCDPK1 nimmt in folgender Reihe zu: III < IV < I < II¹⁰⁵. Außerdem konnte beobachtet werden, dass das Phospholipid Phosphatidylserin die Kinaseaktivität der PfCDPK1 stimuliert⁹⁶.

1.4 Mögliche Interaktionspartner der PfCDPK1

Obwohl die Lokalisation der PfCDPK1 im befallenen Erythrozyten und die enzymatischen Eigenschaften der Kinase bereits Hinweise auf ihre biologische Bedeutung geben, sind jedoch ihre molekularen Interaktionen in den betreffenden Signaltransduktionsketten noch größtenteils ungeklärt. Verschiedene Kriterien führten zur Auswahl einiger Proteine, die als mögliche Interaktionspartner der PfCDPK1 in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollten. Diese Proteine und die Gründe für ihre Selektion werden daher im Folgenden genauer beschrieben.

1.4.1 Proteine mit dem „MGC-basic“-Signalmotiv

Alle im Folgenden beschriebenen Proteine wurden über eine „protein motif“-Suche identifiziert und zeichnen sich durch den Besitz des sogenannten „MGC-basic“-Signalmotiv aus. Genau wie bei der PfCDPK1 besteht ihre N-terminale Aminosäuresequenz aus einem Methionin, einem Glycin und einem Cystein. Das Cystein ist stets in unmittelbarer Nachbarschaft (Position zwei bis fünf nach Abspaltung des Methionins) des Glycins zu finden. Das Glycin sowie das Cystein werden wahrscheinlich wie bei der PfCDPK1 mit Fettsäureresten versehen und an der Membran verankert. Daran schließt sich eine Abfolge basischer Aminosäuren an. Das beschriebene Motiv führt vermutlich, ebenso wie für die PfCDPK1 beschrieben, zur Translokation dieser Proteine in die parasitophore Vakuole. Die dadurch möglicherweise entstehende räumliche Nähe zur PfCDPK1 macht sie zu potentiellen Interaktionspartnern der PfCDPK1. Die Untersuchung der Lokalisation dieser Proteine und der möglichen Interaktion mit der PfCDPK1 sollen dazu beitragen, das Transduktionsnetzwerk des Parasiten besser zu verstehen.

1.4.1.1 *Plasmodium falciparum* cAMP bindendes Protein (PfCAP)

Das zyklische Nukleotid cAMP gehört zu den ältesten bekannten Signalübertragungsmolekülen. Es entsteht aus ATP, welches mittels der Enzyme Adenylatzyklase und Phosphodiesterase zu cAMP katalysiert wird¹⁰⁸. In Säugern ist die Proteinkinase A, eine Serin/Threonin-Proteinkinase, der primäre Effektor des cAMP-Signals. Die Bindung von cAMP an deren regulatorische Untereinheit aktiviert die beiden katalytischen Untereinheiten der Kinase. Der cAMP Signaltransduktionsweg in der Zelle ist sehr komplex und beinhaltet das Zusammenspiel einer Vielzahl unterschiedlicher Proteinkinasen und deren Isoformen¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Reguliert wird auf diese Weise neben Metabolismus und Genexpression auch der Aufbau des Zytoskeletts sowie spezialisiertere Funktionen, beispielsweise die Muskelkontraktion oder die Entstehung des Gedächtnisses.

In *Plasmodium* scheint sich die durch cAMP gesteuerte molekulare Maschinerie ähnlich der höherer Eukaryoten darzustellen. Neben einer Proteinkinase A (PfPKA), sind auch die Adenylatzyklase und Phosphodiesterase im Genom von *Plasmodium* kodiert¹¹¹⁻¹¹³. Im Parasiten wird der cAMP-vermittelten Informationsweiterleitung eine Bedeutung für die Reifung und die Differenzierung des Parasiten zugeschrieben¹¹⁴⁻¹¹⁶. Auch bei der Regulation der Zellzyklen von *Plasmodium* spielen cAMP und Proteinkinase A eine fundamentale Rolle¹¹⁷. Dabei ist bemerkenswert, dass der cAMP-Level über die Konzentration an freiem Calcium reguliert werden kann^{117,118}. Des Weiteren ist bekannt, dass cAMP die Öffnung von Ionenkanälen in der Plasmamembran der Erythrozyten steuert¹¹⁹.

Eines jener Proteine von *P. falciparum*, die durch cAMP beeinflusst werden, ist das cAMP bindende Protein PfCAP, welches zwei cAMP-Bindedomänen besitzt. PfCAP weist darüber hinaus ein N-terminales Aminosäuremotiv auf, das dem „MGC-basic“-Signalmotiv der PfCDPK1 ähnelt (vgl. 1.3.1) und damit möglicherweise eine Translokation des PfCAP in die parasitophore Vakuole bewirken könnte. Der N-Terminus des PfCAP hat folgende die Aminosäuresequenz: **MGNVCTWRQG KEKAGDDNSQ VIKDKELQNE** (Kappes, unveröffentlicht).

1.4.1.2 *Plasmodium falciparum* Armadillo repeat Protein (PfARM) / Catenin-ähnliches Protein

Beschrieben wurde das Armadillo repeat Proteinmotiv (Arm) erstmals für das *armadillo* Gen in *Drosophila*, wo es für die Segmentpolarität verantwortlich ist^{120,121}. Es besteht aus einer unvollkommenen Wiederholung von 42 Aminosäuren, welche zusammen eine positiv geladene Furche bilden^{122,123}. Ein einzelner Arm-repeat besteht aus drei alpha-Helices¹²³. Tandem-Arm-repeats falten sich zusammen und interagieren miteinander. Dabei kommt es zur Bildung von rechts drehenden Superhelices, die eine Angriffsfläche für mögliche Protein-Protein-Interaktionen liefern^{124,125}.

Ein Arm-Ortholog in Säugern ist β -Catenin. Dieses ist an der Zell-Zell-Adhäsion sowie an der Regulation der Genexpression und -transkription während der Zellentwicklung unterschiedlicher Gewebe beteiligt^{126,127}. Die Beteiligung an diesen für die Zellentwicklung kritischen Prozessen macht das Protein auch für die aktuelle Krebsforschung interessant^{126,128}.

Die Arm-Proteinfamilie existiert nicht nur im Tierreich, auch bei Pflanzen und Hefen konnte das Arm-Motiv identifiziert werden^{129,130}. So kommen bei *Arabidopsis* ca. 80 Proteine vor, die einen Tandem-Arm-repeat aufweisen. Wegen der ubiquitären Präsenz von Arm-repeat Proteinen in Tieren und Pflanzen ist eine Entstehung des Motivs recht früh in der Evolution sehr wahrscheinlich. So sind Proteine der Arm-Familie in einer Vielzahl von Organismen an der Bildung des Zytoskeletts beteiligt¹³¹⁻¹³³. Für Nd9p, einem Arm-Protein des Einzellers *Paramecium*, konnte eine Beteiligung an Prozessen der Membranfusion gezeigt werden¹³⁴. *Paramecium* gehört, ebenso wie *Plasmodium*, zu den *Chromalveolata* und besitzt ebenfalls CDPKs¹³⁵. Aufgrund dieser taxonomischen Verwandtschaft ist eine Beteiligung des Armadillo repeat Proteinmotivs an Membranfusionsprozessen in *Plasmodium falciparum* zu vermuten. Eine Interaktion mit der PfCDPK1 läge nahe, da der Kinase ebenfalls eine Beteiligung an Membranbiogenese Prozessen zugesprochen wird (s. 1.3.1).

Der, dem der PfCDPK1 ähnelnde, N-Terminus des PfARM enthält die Aminosäuresequenz **MGNNCCAGRD** **LLYKNKLQEF** **GIEGSKTIRK** (Kappes, unveröffentlicht). Dies lässt auf eine mögliche Co-Lokalisation mit der Kinase in der parasitophoren Vakuole schließen.

1.4.1.3 *Plasmodium falciparum* Adenylatkinase (PfADK)

Es sind drei Adenylatkinasen von *P. falciparum* bekannt. Neben der PFAK1 und der PFGAK wurde mit der PFAK2 eine dritte Adenylatkinase beschrieben, die in dieser Arbeit durchgängig als PfADK bezeichnet wird^{136,137}. Die Adenylatkinase nimmt eine zentrale Rolle im Energiemetabolismus des Parasiten ein¹³⁸. Das hochaktive Enzym katalysiert die reversible Reaktion $ATP + AMP \leftrightarrow 2 ADP$ ^{139,140}. Durch diese Fähigkeit reguliert es die Homöostase der Adenin-Nukleotide. Die Adenylatkinase ist in den meisten Organismen das einzige Enzym, welches AMP zu ADP phosphorylieren kann¹⁴⁰. Der AMP-Level wird demnach über die Adenylatkinase kontrolliert, was sich zum einen auf die Energiebereitstellung auswirkt und zum anderen eine regulierende Wirkung auf katabolische Enzyme oder AMP-abhängige Kinasen hat^{141,142}. Ähnlich wie bei Tumorzellen ist im Malariaparasiten der Umsatz von ATP und die Biosyntheserate von Makromolekülen sehr hoch. Bereitgestellt wird das ATP über den Prozess der Glykolyse. Vergleicht man die Glukoseaufnahme eines infizierten Erythrozyten mit der einer normalen Zelle, so ist die Zuckeraufnahme um den Faktor 100 erhöht¹⁴³.

Die hohe Menge an Glukose ist für den Parasiten erforderlich, da sich beispielsweise der für die Invasion verantwortliche und spezifisch in reifen Merozoiten vorkommende Aktin-Myosin-Motor-komplex durch einen sehr hohen ATP-Verbrauch auszeichnet¹⁴⁴.

Neben ihrer zentralen Bedeutung für den Metabolismus weist die PfADK N-terminal ebenso wie die PfCDPK1 einen Myristat- und einen Palmitatrest¹³⁶ sowie ein basisches Cluster auf und enthält die Aminosäuresequenz **MGSCYSRKNK** VSTISLDEEE **KKKEKKKKKK** (Kappes, unveröffentlicht).

1.4.1.4 *Plasmodium falciparum* „gliding associated protein 45“ (PfGAP45)

Das „gliding associated protein 45“ (GAP45) ist im Invasionsprozess der *Apicomplexa* involviert. Bei *P. falciparum* wird es daher erst in den späten Parasitenstadien wie späten Schizonten (Segmenter) und Merozoiten exprimiert¹⁴⁵. Zusammen mit dem PfGAP50 und der leichten Myosin-Kette (MTIP) sowie der schweren Myosin-A-Kette (MyoA) bildet es an der Membran des Parasiten einen heterotetrameren Komplex, der dem sogenannten inneren Membrankomplex zugeordnet wird⁶¹. Ebenso wie die PfCDPK1 weist das PfGAP45 am N-Terminus einen Myristat- und einen Palmitatrest auf¹⁴⁶. Darauf folgt ebenso wie bei der PfCDPK1 ein basisches Cluster (**MGNKCRSRSK** **VKEPRKDIDE** **LAERENLKKQ**; Kappes, unveröffentlicht).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das PfGAP45 von der PfCDPK1 sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* phosphoryliert wird⁴⁶. Eine Inhibition der PfCDPK1 durch den Kinaseinhibitor K252a verhinderte nicht nur die Phosphorylierung des PfGAP45 *in vitro*, sondern auch die Invasion der Wirtszelle. Somit scheint PfGAP45 eine zentrale Rolle im Invasionsprozess von *P. falciparum* einzunehmen. Abb. 1.11 zeigt das neueste Modell, das veranschaulicht, auf welche Weise das PfGAP45 in diesen Prozess involviert sein könnte⁴⁶.

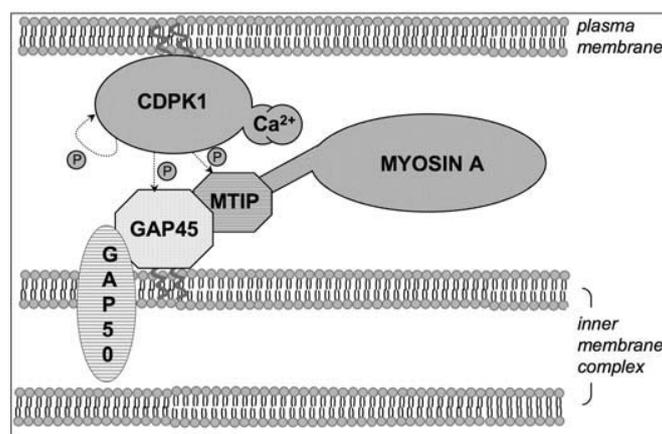


Abb.1.11: Modell der Position von PfGAP45 im inneren Motorkomplex von *P. falciparum*⁴⁶
 Nach der Aktivierung durch Calcium phosphoryliert die mit der Plasmamembran des Merozoiten assoziierte PfCDPK1 GAP45 und MTIP. GAP45 ist direkt mit der äußeren Membran des inneren Membrankomplexes (IMC) assoziiert und bildet mit MTIP, GAP50 und Myosin A einen gemeinsamen Komplex aus.

1.4.1.5 *Plasmodium falciparum* Rab GTPase 5b (Pfrab_5b)

Die Familie der Rab („Ras-related in brain“) Proteine gehört zur Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen (20 bis 30 kDa)^{147,148}. Erstmals beschrieben wurden sie im Jahre 1987, nachdem vier Rab-Gene aus dem Gehirn der Ratte isoliert werden konnten. Die in Eukaryoten stark konservierte Familie umfasst im Menschen mehr als 60 bekannte Mitglieder^{149,150}. Auch bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (11 Rab-Gene), bei *Caenorhabditis elegans* (29 Rab-Gene) oder bei *Drosophila melanogaster* (26 Rab-Gene) sind eine Vielzahl von Rab-Proteinen bekannt¹⁴⁹. Die große Anzahl ist darauf zurückzuführen, dass es sich zumeist um Isoformen handelt, deren Sequenzen eine Identität von 75 bis 95% aufweisen. Die Struktur der Rab-GTPasen gleicht jener anderer GTPasen und enthält eine katalytische Domäne sowie fünf α -Helices, sechs β -Faltblätter sowie fünf Schleifen (Loops).

Der Aktivitätszustand der Rab-GTPasen wechselt zwischen der zytosolischen, inaktiven Form (GDP-Bindung) und der aktiven membrangebundenen Form, bei welcher GTP gebunden ist. Dabei werden sowohl der GDP/GTP-Austausch, als auch die Translokation zwischen Zytosol und Membran von mindestens drei Gruppen Rab-spezifischer Regulatorproteine koordiniert. Dazu gehören Rab-GDP-Dissoziationsinhibitoren, Rab-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren sowie Rab-GTPase-aktivierenden Proteine¹⁵¹⁻¹⁵³.

Die große Bedeutung der Rab GTPasen für Eukaryoten liegt unter anderem darin, dass sie den Vesikeltransport zwischen den Zellorganellen vermitteln¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Rab-Proteine an der Wiederverwertung (Recycling) von Proteinen wie beispielsweise Integrinen (alpha ν beta3) beteiligt sind¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Auch eine Beteiligung an Prozessen der Endo- und Exozytose konnte gezeigt werden¹⁶⁰⁻¹⁶³ sowie an Fusionsprozessen von Plasmamembranen¹⁵⁰. Rab_5b ist in der Plasmamembran von Zellen lokalisiert¹⁶⁴ und essentiell für den mit Cadherinen assoziierten Vesikeltransport¹⁶⁵ von der Plasmamembran hin zu frühen Endosomen. Dabei ist Rab_5b von Bedeutung für die Anhaftung und Beweglichkeit von Vesikeln an den Mikrotubuli^{166,167}. Die hier beschriebene Beteiligung an Membranfusionsprozessen spricht dafür, dass auch in *P. falciparum* Rab-GTPasen an solchen Prozessen beteiligt sein könnten. Dies macht eine Interaktion mit der PfCDPK1 wahrscheinlich. Der N-Terminus des Pfrab_5b folgt der PfCDPK1-ähnlichen Struktur (MGCSSSTERL TSTKNINIVT SPAQQQKKNAKappes, unveröffentlicht).

1.4.1.6 *Plasmodium falciparum* 2C artige Proteinphosphatase (PfPP2C_like)

Proteinphosphatasen lassen sich in vier Hauptfamilien unterteilen¹⁶⁸. So gibt es die Familie der Phosphoproteinphosphatasen (PPP) und die Familie der Mg²⁺-abhängigen Proteinphosphatasen (PPM), die sowohl in Eukaryoten (z.B. Pflanzen, Säuger, Trypanosomen) als auch in Prokaryoten (Bakterien) nachgewiesen wurden^{169,170}. Des Weiteren spricht man von Proteintyrosinphosphatasen (PTP) und der Gruppe von Interaktionsfaktor-ähnlichen Phosphatasen (NIF)^{168,171-174}. In

Plasmodium falciparum wurde eine Unterfamilie der PPM identifiziert, zu der PfPP2C_like zu zählen ist. Dieses Protein zeichnet sich durch große Übereinstimmungen mit der katalytischen Domäne von Spolie aus, einem Enzym, das bei der Zellteilung (Wechsel von medialer zu polarer Teilung) von *Bacillus subtilis* beteiligt ist^{168,175}.

Die PPM katalysieren die Dephosphorylierung von Serinen und Threoninen, womit sie zum Gegenspieler der Serin-/Threoninproteinkinasen werden und so Anteil an der Regulation des Phosphorylierungsstatus von Proteinen haben. Die Proteinphosphatase 2C (PP2C) gehört ebenso wie die PfPP2C_like zur großen und variablen Familie der PPM und zeichnet sich im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie dadurch aus, dass sie in wesentlich geringeren Konzentrationen in der Zelle vorkommt¹⁷⁶. PP2Cs sind Monomere mit einer molekularen Masse von 40 bis 50 kDa und benötigen für ihre Aktivierung ein Mg^{2+} oder ein Mn^{2+} Ion¹⁷⁷. Die Familie der PPMs ist auch in Pflanzen sehr verbreitet. Für das Moos *Physcomitrella patens* konnte beispielsweise eine Beteiligung von Ca^{2+} /Calmodulin an der Regulation einer PP2C ähnlichen Proteinphosphatase gezeigt werden^{178,179}. Proteinphosphatasen reagieren wesentlich unspezifischer mit ihren Substraten als Proteinkinasen, dafür jedoch höchst effizient. Dies kann eine unregulierte Proteinphosphatase leicht zu einem toxischen Faktor für die Zelle werden lassen¹⁸⁰. Die N-terminale Aminosäuresequenz der PfPP2C_like entspricht **MGNCASVINH SKFKIKKKEK KNSIDDDTHSQK**appes, unveröffentlicht).

1.5 *Plasmodium falciparum* Raf Kinase Inhibitor Protein (PfRKIP) als weiterer Interaktionspartner der PfCDPK1

Das im Folgenden beschriebene PfRKIP (auch PfPE-PB1 genannt) besitzt im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen möglichen Substraten der PfCDPK1 keine dieser Kinase-ähnlichen N-terminalen Aminosäuresequenzen. Für diese Arbeit war das RKIP dennoch wegen seiner Eigenschaft, Signaltransduktionswege modulieren zu können und in seiner Aktivität selbst über den Phosphorylierungsstatus reguliert zu werden interessant. Daher wurden der Einfluss und die gegenseitige Wechselwirkungen der PfCDPK1 mit PfRKIP näher untersucht.

Das Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) wurde erstmals in den 1980er Jahren als ein 23 kDa Protein aus dem Zytosol von Rinderhirnzellen isoliert. Wegen seiner Fähigkeit, bestimmte Phospholipide zu binden, erhielt es ursprünglich den Namen Phosphatidylethanolamin-bindendes Protein (PEBP). Weitere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei RKIP um ein in der Natur weit verbreitetes und stark konserviertes Protein handelt, das in einer Vielzahl von Geweben zu finden ist. RKIP wurde in Bakterien, Pilzen, Protozoen, Pflanzen und Tieren nachgewiesen¹⁸¹. Angesichts seiner Fähigkeit Phospholipide *in vitro* zu binden, wurde dem RKIP zunächst eine Funktion in der Membranbiogenese zugeschrieben. Nachfolgende Strukturanalysen zeigten jedoch, dass

die bindende Raumstruktur des Proteins zu flach ist, um die entsprechenden Fettreste fassen zu können¹⁸². Die Untersuchung zeigte weiter, dass die Fähigkeit des RKIP Phosphatidylethanolamin zu binden nicht auf strukturelle, sondern vielmehr auf polare Eigenschaften der Proteinoberfläche zurückzuführen ist¹⁸². Im weiteren Verlauf der Forschung konnten dem Protein eine Vielzahl von Funktionen zugeschrieben werden. So konnte gezeigt werden, dass das RKIP-Ortholog in Hefen (Tfs1p) durch die Hydrolyse von GTP die Aktivität einer Ras-aktivierenden GTPase (Ira2p) inhibieren und somit steuern kann^{183,184}. In Nematoden scheint das RKIP eine Rolle beim Schutz vor der Immunantwort des Wirtes zu spielen und in *Drosophila* konnten sieben RKIP-Isoformen identifiziert werden, welche bei der Geruchserkennung relevant sind¹⁸¹. In Pflanzen wird das RKIP mit dem Wechsel von der vegetativen in die reproduktive Wachstumsphase in Verbindung gebracht¹⁸⁵. Im Falle der Säugetiere konnte gezeigt werden, dass das RKIP, obwohl es keine Homologien mit bekannten Serinprotease-Inhibitor-Familien aufweist, dennoch Serinproteasen wie Thrombin, Neuropsin oder Chemotrypsin effektiv hemmen kann¹⁸⁶. Die am besten verstandene Funktion des RKIP in Säugerzellen ist jedoch die Inhibition des MAP-Kinase Signaltransduktionswegs, in dem es die Aktivität der Raf-1 Kinase hemmt¹⁸⁷. Die Bindung von RKIP an Raf-1 hebt den Raf-1/MEK-Komplex auf und unterdrückt damit die Phosphorylierung von MEK und damit auch die Aktivierung des MEK/ERK Signaltransduktionswegs. Die Phosphorylierung des RKIP am Serin 153 durch die Proteinkinase C (PKC) führt zur Ablösung des RKIP von Raf-1. Dies ermöglicht die erneute Formation des Raf-1/MEK-Komplexes und hebt somit die Hemmung des Signaltransduktionswegs auf (s. Abb. 1.12)¹⁸⁸. Des Weiteren scheint das RKIP für die Krebsforschung interessant zu sein, da ihm eine hemmende Wirkung auf die Bildung von Metastasen zugeschrieben wird¹⁸⁹.

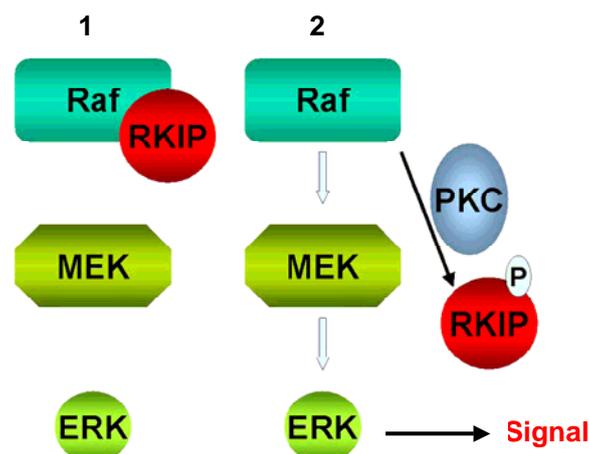


Abb.1.12: Stark schematische Darstellung der Funktion von RKIP im MEK/ERK Signaltransduktionsweg (1) RKIP ist an Raf-1 gebunden und blockiert damit den Signaltransduktionsweg. (2) Die Phosphorylierung von RKIP durch die PKC führt zur Ablösung RKIPs und gibt den Signaltransduktionsweg frei.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

PfCDPK1 (*Plasmodium falciparum* „calcium dependent protein kinase 1“) gehört zur Familie der Calcium-abhängigen Proteinkinase. Diese kommen ausschließlich in Pflanzen und einigen Protozoen wie Mitgliedern der Alveolata (z. B. dem Malariaerreger *Plasmodium*), nicht aber in Pilzen und mehrzelligen tierischen Organismen vor. Diese Tatsache macht das Enzym zu einem attraktiven Ansatzpunkt für die Entwicklung eines neuen Antimalariamedikaments.

Als biologische Funktionen der PfCDPK1 wurden sowohl eine Beteiligung am Invasionsprozess wie auch am Aufbau des tubovesikulären Systems des Parasiten postuliert. Beide Funktionen sollten in der vorliegenden Arbeit näher untersucht und erhärtet werden: (1) Um eine Beteiligung von PfCDPK1 am Invasionsprozess von *Plasmodium falciparum* nachzuweisen, sollte der Einfluss eines spezifischen Inhibitors auf invadierende Parasiten ermittelt werden. Um Aufschluss über molekulare Interaktionen zu erhalten, sollte PfGAP45, ein Protein des Motorkomplexes von *P. falciparum*, das für die Beweglichkeit des Parasiten essentiell ist und dasselbe Membranverankerungsmotiv wie PfCDPK1 trägt, als Substrat der Kinase *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. (2) Zwecks Untersuchung der Bedeutung der Kinase in „extrazellulären“ Signaltransduktionsprozessen des Parasiten im Besonderen aber ihrer postulierten Funktion beim Aufbau des tubovesikulären Systems, wurde folgende Vorgehensweise gewählt: Die Translokation von PfCDPK1 in die extrazellulären Kompartimente des Parasiten erfolgt über das N-terminale „MGC-basic“-Signalmotiv, daher wurden mit Hilfe von „protein-motif“-Suchen Proteine identifiziert, die ebenfalls ein „MGC-basic“-Signalmotiv besitzen. Von diesen wurden sechs aufgrund ihrer Homologien zu bekannten Signalübertragungsmolekülen (PfCAP, PfARM, PfADK, Pfrab_5b und PfPP2C_like) ausgewählt, da diese wie PfCDPK1 an „extrazellulären“ Signaltransduktionsprozessen des Parasiten beteiligt sein könnten. Mit GFP-Varianten (eCFP, YFP), sollte die Lokalisation im Parasiten und eine mögliche Co-Lokalisation mit PfCDPK1 untersucht werden. Der Nachweis einer unmittelbaren molekularen Nachbarschaft sollte über Fluoreszenztransfer („fluorescence resonance energy transfer“) erfolgen. Phosphorylierungsexperimente sollten zeigen, ob PfCDPK1 mit den ausgewählten Proteinen interagiert und ob es sich bei diesen um Substrate oder Regulatoren der Kinase handelt. Die für diese Untersuchungen erforderlichen hochreinen Proteine, sollten rekombinant hergestellt und ihre Aufreinigung etabliert werden. Eine Charakterisierung der Phosphorylierungsstellen der untersuchten Proteine sollte weiteren Aufschluss über das Phosphorylierungsmuster sowie mögliche Regulationsmechanismen geben.

Darüber hinaus sollte das für die Zielsteuerung verantwortliche „MGC-basic“-Signalmotiv der obigen Proteine mit Deletionsmutanten und Fusionsproteinen - letzteren sollte das „MGC-basic“-Signalmotiv vorgeschaltet werden - untersucht werden.

Des Weiteren sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss eines weiteren Proteins, des PfrKIP, auf die Substrat- und Autophosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 näher aufgeklärt werden, da vermutet wurde, dass PfrKIP die Aktivität der PfCDPK1 beeinflussen und somit einen Regulator für die Kinase darstellen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Laborausstattung

2.1.1 Materialien

Analytische Waage	Sartorius GmbH, Göttingen
Autoklav	Systec, Wettenberg
Blotapparatur Semi Dry	BioRad, München
Brutschränke	
- Cell Star Inkubator, cytoperm 2	Heraeus Instruments, Hanau
- Function Line	Heraeus Instruments, Hanau
- Hera Cell	Heraeus Instruments, Hanau
Digitalkamera Sony	Cybershot 100 5.1 mp Sony Corp., Japan
Drehrad	Snijders Scientific, NL
Dynamic light scattering DynaPro	Protein Solutions Ltd., GB
Eismaschine AF 30	Scotsman
Elektrophoreseapparaturen Sub-Cell GT	PeqLab, Erlangen
Elektrophoreseapparaturen Mini Protean II	BioRad, München
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	BioRad, München
Expositionskassette	Dr Goos Suprema, Heidelberg
Filmentwicklungsmaschine Hyperprocessor	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Gasbrenner	Teclu DVGW
Gefrierschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank –80°C, Sepratec UF85-300S	Heraeus GmbH, Hanau
Gel-Fotodokumentation digit store duo	INTAS
Geltrockner Gel Dryer 583	BioRad, München
Heizblock DB 3A	Techne Inc., USA
Konfokale Laserscan Mikroskope	
- LSM 510	Zeiss, Jena
- Leica CTR 6500	Leica Microsystems, Wetzlar
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifugen Sorvall RC 5B, RC 5C	DuPont, Bad Homburg
Leuchttisch Werkstatt	Biozentrum Basel, CH
Lichtmikroskop Axiolab	Zeiss, Jena
Magnetrührer MR 2002	Heidolph, Schwabach

Mikrowellenherd	Micromat AEG, Nürnberg
Mikrowellenherd	MDA
Netzgerät Power Supply Power Pac 300	BioRad, München
Netzgerät Power Supply Power Pac 3000	BioRad, München
PCR-Maschine Progene Thermocycler	Techne Inc., USA
pH-Meter WTW 526	WTW, Weilheim
Pipetman Gilson P2, P10, P20, P200, P1000	Gilson International, Bad Camberg
Pipettierhilfe Pipetus [®] akku	Hirschmann Labortechnik, Eberstadt
Pipettierhilfe Pipetus [®] standard	Hirschmann Labortechnik, Eberstadt
Quarzküvetten	Suprasil Hellma, Müllheim
Rotoren SS-34, GS-3, GSA, SM24	DuPont Instruments, Bad Homburg
Schüttelinkubator klein (37°C) HT	Infors AG, Bottmingen, CH
Schüttelinkubator groß (37°C)	Innova 4430 New Brunswick Scientific, USA
Sonifier [®] B-12	Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Spectrophotometer Ultrospect 1100pro	Amersham Biosciences, Freiburg
Sterile Werkbänke:	
- Herasafe	Heraeus Instruments, Hanau
- SterilGARD ClassII TypeA/B 3	The Baker Company, USA
Stickstofftank BT40	L'air Liquide, Frankreich
Szintilationszähler Counter LS 6000IC	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus GmbH, Hanau
Vortex-Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, CH
Wasserbad Thermomix 1420 B.	Braun Melsungen AG, Melsungen
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge RC5BPlus,	RC 12BP Sorvall
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Micro 22 R	Hettich, Tuttlingen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe
Chamber Slides	Nunc, Wiesbaden
Cryogefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Einmalröhrchen, Polypropylen 15 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Einmalröhrchen, Polypropylen 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Frischhaltefolie	Saran Roth, Karlsruhe
Handschuhe Peha-soft	Hartmann, Heidenheim

Immersionsöl	Zeiss, Jena
Immobilon-P PVDF Membrane (0,45 µm)	Millipore Corp., Billerica, USA
Kanülen steril, Nr. 2	Becton Dickenson, USA
Objektträger	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Parafilm	American International CanTM, Chicago, USA
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen, gestopft	Greiner Labortechnik, Nürtingen
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße, Safe lock (2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme FUJIFilm Super RX 13 x 18 cm	FUJIFilm Photo Film Europe, Düsseldorf
Säule Mobicol klein	MoBiTec GmbH, Göttingen
Säule Poly-Prep Chromatographie Columns 0,8 x 4 cm	BioRad, München
Säule Poly-Prep Chromatographie Columns 1,2 x 18 cm	BioRad, München
Spritzen steril BD Discardit II 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Becton Dickenson, USA
Sterilfilter (0,2 µm, 0,4 µm)	Schleicher&Schuell, Einbeck
Sterilfiltrationseinheiten	Corning incorporation, Bodenheim
WhatmanTM 3MM paper	Whatman Paper Company, GB

2.1.3 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel waren vom Reinheitsgrad p. A. beziehungsweise verabsolutiert. Falls nicht anders vermerkt, wurden sie von der Chemikalienausgabe des Theoretikums der medizinischen Fakultät Heidelberg bezogen.

Soweit nicht anders angegeben, wurde immer autoklaviertes Wasser (H₂O_{dd}) der höchsten Reinheitsstufe (bidestilliert über Quarz) verwendet.

Acrylamid	BioRad, München
Agarose Seakem LE	Cambrex Bio Science Inc., USA
Albumax II	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumoxalat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	BioRad, München
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
L(+)-Arabinose	Roth, Karlsruhe

Bacto-Agar	Becton Dickenson, USA
Bacto-Pepton	Becton Dickenson, USA
Benzamidin	Sigma, Taufkirchen
Blasticidin S	Invivogen, GB
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Calmodulin Beads	Stratagene, La Jolla, USA
Chloramphenicol	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliat Blue R250	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix	New England Biolabs, Schwalbach
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences, Freiburg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Eisen-(II)-sulfat	Roth, Karlsruhe
Epoxyactivated Sepharose 6LB	Amersham Biosciences, Freiburg
Ethanolamin	Fluka, Neu-Ulm
Ethidiumbromid	BioRad, München
FCS, zertifiziert	Invitrogen, USA
Formalin	Merck, Darmstadt
Gentamicin (50 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Giemsa (0,4%, w/v)	Roth, Karlsruhe
Glycerin (wasserfrei)	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Becton Dickenson, USA
HEPES	Sigma, Taufkirchen
Hypoxanthin	ccPro, Neustadt
IgG-Sepharose 6 Fast Flow	Amersham Biosciences, Freiburg
Imidazol	Fluka, Neu-Ulm
IPTG	PeqLab, Erlangen
Kaliumjodid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Sigma, Taufkirchen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

Natriumdesoxycholat	Serva, Heidelberg
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
N,N-Bisacrylamid	BioRad, München
NP40 (Nonylphenyl-polyethylenglycol)	Fluka, Neu-Ulm
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
PAA Gele, NuPAGE [®] , Novex Bis-Tris-Gels	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenol/Chloroform (RotiPhenol)	Roth, Karlsruhe
Pepstatin A	AppliChem, Darmstadt
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Saponin	Sigma, Taufkirchen
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Simply Blue Safe Stain	Invitrogen, Karlsruhe
D (+)-Sorbitol	AppliChem, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt
Tetracyclin	Sigma, Taufkirchen
N,N,N,N-Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Triethylamin	Fluka, Neu-Ulm
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Tween20	Merck, Darmstadt
WR 99210	Jakobus Pharmaceutical co. Inc., USA
D(+)-Xylose	AppliChem, Darmstadt

2.1.3.1 Radiochemikalien

[8- ³ H]Hypoxanthin	Amersham Biosciences, Freiburg
[γ- ³² P]ATP (3000 Ci/mmol)	Amersham Biosciences, Freiburg
[³ H(G)] Hypoxanthin monohydrochlorid	Perkin Elmer

2.1.4 Enzyme

Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	New England BioLabs, Schwalbach
<i>Dpn I</i> (100 U/μl)	Roche, Mannheim
<i>Pfx</i> DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, Schwalbach
	Roche, Mannheim
RNase A	Qiagen, Hilden
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (rekombinant)	New England BioLabs, Schwalbach
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
<i>TEV</i> -Protease	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin („sequencing grade“)	Roche, Mannheim

2.1.5 Größenmarker für die Elektrophorese

1 kb DNA-Ladder,	New England Biolabs, Schwalbach
100 bp DNA-Ladder,	New England Biolabs, Schwalbach
Prestained Marker, broad range,	New England Biolabs, Schwalbach
Protein Marker PeqLab Gold,	PeqLab, Erlangen

2.1.6 Vektoren

Klonierung:

pBS-SK-II (+)	Stratagene, USA
pCR Blunt-II TOPO [®]	Invitrogen, Karlsruhe
pGEM-3Z	Promega, USA

Bakterielle Expression

pET 21a (+)	Novagene, USA
pET 21d (+)	Novagene, USA
pETM-60	G. Stier, EMBL, Heidelberg

Transfektion Plasmodium:

pARL 1 (+)	Alan Cowman & Tim Gilberger, WEHI
pHH2	Reed et al. 2000

Der Vektor pARL 1 (+) leitet sich als Derivat aus dem pUC (Invitrogen) ab und verleiht eine Ampicillin-Resistenz. Als Selektionsmarker für Transfektionsexperimente dienen eine humane Dihydrofolatreduktase (hDHFR, Resistenz gegen die synthetische Droge WR 29910) oder eine bakterielle Acetyltransferase (BSD, aus *Aspergillus terreus*, Resistenz gegen das Antibiotikum Blasticidin S).

Der Vektor pHH2 leitet sich über mehrere Zwischenstufen aus dem pGEM-11 (Promega) ab und verleiht eine Ampicillin-Resistenz. Als Selektionsmarker für Transfektionsexperimente dient hier ebenfalls die humane Dihydrofolatreduktase (hDHFR).

2.1.7 Bakterienstämme

XL1 blue Stratagene, USA

supE44, hsdR17, recA, gyrA46
thi, relA1, lac⁻, F' [proAB⁺, lacIq,
 LacZ M15, Tn10(*tet*)] (Bullock
 et al., 1987)

XL 10 Gold Stratagene, USA

Tetr - (*mcrA*)183 (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)
 173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96*
relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZ- M15 Tn 10
 (Tetr) Amy Camr]

BL 21-CordonPlus-RIL Stratagene, USA

E. coli B F⁻ ompT hsdS (rB⁻ mB⁻)
dcm⁺ Tetr gal endA Hte [argU ileY
leuW Camr]

BL 21 (DE3) pLsyS Stratagene, USA

E.coliB F⁻ ompThsdS(r_B⁻m_B⁻)dcm⁺
Tet^rgalendAHte [argU proL Cam^r

2.1.8 Plasmodien

Pf3D7

Niederlande, Rosario 1980

2.1.9 Nukleinsäuren

Oligonukleotide (Primer)

Invitrogen, Karlsruhe

DNA-Sequenzierungen

GATC, Konstanz

(Bei den Sequenzierungen werden sowohl Standardprimer, als auch selbst konstruierte Oligonukleotide verwendet)

2.1.10 Oligonukleotide

2.1.10.1 Oligonukleotide für die Expression

Primername	Sequenz
Pfrab_5b.fwd	GGCGGCGGATCCCATATGGGATGTTTCATCA AGCACCGA
Pfrab_5b.rev	AATAATCTCGAGAGGATTGTTATAATATAAAAACCTCTTTAAATCGGG
PP2C_like.fwd	GGCGGCGGATCCCATATGGGTAATTGTGCTTCCGTCATAAATCATTCC
PP2C_like.rev	TAATAACTCGAGAAAATATA AAATTACCAAGGTCATATCGTCGACGG
PP2C_like_2.fwd	TAATAAGGATCCCATATGGGTAATTGTGCTTCCGTCATAAATC
PP2C_like_2.rev	TAATAACTCGAGAAAATATA AAATTACCAAGGTCATATCGTCGAC
PP2C_like_cDNA.rev	TAATAAGGATCCCATATGGGTAATTGTGCTTCCGT
PP2C_like_gDNA.rev	TAATAACTCGAGAAAATATAAAAATTACCAAGGTCATCTGAAAGAGG
PfADK.fwd	GGCGGCGGATCCCATATGGGATCATGTTATAGTAGAAAAAATAAAGTATC
PfADK_BamHI.rev	TAATAAGGATCCATTGGGGTTATCATCTATAATGGAGC
PfADK_BamHI_NcoI.fwd	TAATAAGGATCCATGGGATCATGTTATAGTAGAAAAAATAAAGTATC
PfADK_del29aa_BamHI_NdeI.fwd	ATTATTGGATCCCATATGATATATATTTTAAATGGAGCATCTGGGTCAG
PfARM.fwd	GGCGGCGAATTCCCATATGGGAAATAATTGCTGTGCAGGAAG
PfARM.rev	TAATAACTCGAGATCCGTTAGTCTCAATAAGAGAACATTGG
PfGAP45_BamHI_NdeI.fwd	GAAGAAGGATCCCATATGGGAAATAAATGTTCAAGAAGCAAAGTAAAG
PfGAP45_XhoI.rev	GAAGAACTCGAGGCTCAATAAAGGTGTATCGGATAAATC
PfCAP.fwd	GGCGGCGAATTCCCATGGGCAATGTGTGCACATGGAG
PfCAP.rev	TTATTACTCGAGATTTTCATCAATACAAGTTGTATCCAAA CCT

2.1.10.2 Oligonukleotide für die Transfektion

Primername	Sequenz
Pfrab_5b_XhoI.fwd	TAATAACTCGAGATGGGATGTTTCATCAAGCACCGA
Pfrab_5b_BamHI.rev	TAATAAGGATCCAGGATTGTTATAATATAAAAACCTCTTTAAATCGGG
Pfrab_5b_leader_BamHI.rev	TAATAAGGATCCTTTAGTATCTTGAGCATTCTTTTTTTTGTGTTG
PP2C_like_XhoI.fwd	TAATAACTCGAGATGGGTAATTGTGCTCCGTCATAAATCATTCC
PfADK_XhoI.fwd	TAATAACTCGAGATGGGATCATGTTATAGTAGAAAAATAAAGTATC
PfADK_del_29aa_XhoI.fwd	ATTATTCTCGAGATGATATATATTTTAAATGGAGCATCTGGGTCAG
PfADK_BamHI.rev	TAATAAGGATCCATTGGGGTTATCATCTATAATGGAGC
PfARM_XhoI.fwd	TAATAACTCGAGATGGGAAATAATTGCTGTGCAGGAAG
PfARM_EcoRI.rev	TAATAAGAATTCATCCGTTAGTCTCAATAAGAGAACATTG G
PfGAP45_XhoI.fwd	GAAGAACTCGAGATGGGAAATAAATGTTCAAGAAGCAAAGTAAAG
PfGAP45_BamHI.rev	GAAGAAGGATCCGCTCAATAAAGGTGTATCGGATAAATC
PfGAP45_del_20_aa_XhoI.fwd	GAAGAACTCGAGATGTTAGCTGAACGTGAAAATTTAAAAACAATCTG
PfCAP_EcoRI.rev	TTATTAGAATTCATTTTCATCAATACAAGTTGTATCCAAACCT
PfCAP_XhoI.fwd	TAATAACTCGAGATGGGCAATGTGTGCACATGGAG
PfCAP_del_107aa_XhoI.fwd	GAAGAACTCGAGATGCTTAATGACGACGGTTCAAGCG

2.1.10.3 Oligonukleotide für die Transfektion (Fluore)

Primername	Sequenz
Citrine_BamHI.fwd	TAATAAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGG
Citrine_KpnI.rev	TAATAAGGTACCTTACTTGTATAGCTCGTCCATGCC
ECFP_BamHI.fwd	TAATAAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGA
ECFP_EcoRI_BamHI.fwd	TAATAAGAATTCGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGA
ECFP_XhoI_KpnI.rev	TAATAACTCGAGGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC

2.1.10.4 Oligonukleotide für die Sequenzierung

Primername	Sequenz
PfPP2C_1489_1510.fwd	GATTGTGATAAAGATTTACCAG
PfPP2C_1342_1370.rev	GAGTTTTCTCTTCTTTGTTATTTCTGG
PfPP2C_2194_2216.fwd	CCAGGACTAGCCATGAGTAGAGC
PfPP2C_2152_2172.rev	AACTCTATATGCTACATCTCC

2.1.10.5 Oligonukleotide zur Amplifikation von PfRKIP

Primername	Sequenz
PfRKIP.fwd	TATTAAGGATCCATGACAATACCCACGATAAGTGAA
PfRKIP.rev	TTATTAGGATCCCTACCCTTCAATTTGGCACCATT
PfRKIP exp.rev	TCAGAACTCGAGCCCTTCAATTTGGCCACCA
PfRKIP XhoI.fwd	AATAACTCGAGATGACAATACCCACGATAAGTGAAC
PfRKIP BamHI.rev	TAATAAGGATCCCCCTTCAATTTGGCACCA AT

2.1.11 Genomische DNA / cDNA

Genomische DNA <i>P. falciparum</i>	aus 3D7 isoliert
cDNA <i>P. falciparum</i>	aus 3D7 gewonnen
Gametozyten cDNA-Bank PfHB3	D. C. Kaslow, Bethesda, Maryland, USA

2.1.12 Antikörper

Antigen	Art	Verdünnung	Bezugsquelle
Maus-anti-6xHis	Monoklonal	1:1000	Novagen, USA
Ziege-anti-Maus Horse red-dish peroxidase (HRP)	Polyklonal	1:2500	Dianova, NL
Ziege-anti-Kaninchen HRP	Polyklonal	1:2500	Dianova, NL
Kaninchen-anti-PfCAP (affinitätsgereinigt)	Polyklonal	1:1000	Sigma Genosys, Haverhill, GB

2.2 Lösungen, Medien und Puffer

2.2.1 Antibiotika

Alle hier genannten Stocklösungen sind 1000x konzentriert und werden bei -20°C gelagert.

Ampicillin 100 mg/ml	in Wasser
Chloramphenicol 34 mg/ml	in 100% Ethanol
Kanamycin 25 mg/ml	in Wasser
Tetracyclin 5 mg/ml	in 70% Ethanol

2.2.2 Kulturmedien

2YT-Medium	1,6% Bacto-Trypton
	1% Hefeextrakt
	0,5% NaCl

LB-Medium	1% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl
LB-Agar	LB-Medium 1,5% Bacto-Agar (w/v)

2.2.3 Lösungen und Puffer

Alle nicht hier aufgeführten Lösungen und Puffer werden direkt bei der Methode aufgeführt, in der sie eingesetzt werden.

10x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
50x TAE	2 M Tris/Acetat pH 8,0 50 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,6 1 mM EDTA
5x DNA-Probenpuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA 33% Glycerin (v/v) 0,1% Bromphenolblau (w/v)
10x SDS-Laufpuffer	250 M Tris 2,5 M Glycin 1% SDS
4x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris/HCl pH 6,8 6% SDS 40% Glycerin (v/v) 3% β-Mercaptoethanol (v/v) 0,02% Bromphenolblau (w/v)

SSC-Puffer	7,5 mM NaCl 0,25 mM Natriumcitrat pH 7,0
Ringerlösung	122,5 mM NaCl 5,4 mM KCl 1,2 mM CaCl ₂ 0,8 mM MgCl ₂ 5,5 mM D-Glucose 10 mM HEPES 1 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
RIPA	50 mM Tris/HCl pH 7,8 (4°C) 150 mM NaCl 5 mM EDTA 50 mM NaF 0,5% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS 1% Triton X-100
<i>unmittelbar vor Gebrauch addiert:</i>	1 mM DTT 1 mM PMSF 2 mM Benzamidin 1 mg/ml Leupeptin 1 mg/ml Pepstatin A

2.3 Verwendete Kits

DNA Rapid Ligation Kit	Roche, Mannheim
ECL Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences, Freiburg
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Micro-FastTrack 2.0 Kit (RNA)	Invitrogen, Karlsruhe
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
RETROscript®	Ambion, UK

2.4 Verwendete Chromatographiesäulen

Superdex 200 GL 10/300	Amersham Biosciences, Freiburg
HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade	Amersham Biosciences, Freiburg
Mono Q GL 5/50	Amersham Biosciences, Freiburg
Mono S GL 5/50	Amersham Biosciences, Freiburg
HiPrep 16/10 CM	Amersham Biosciences, Freiburg
HiPrep 16/10 DEAE	Amersham Biosciences, Freiburg

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Herstellung kompetenter Bakterien erfolgt nach der Methode von Hanahan (1983)¹⁹⁰. 5 ml LB-Medium werden mit einer Bakterienvorkultur angeimpft und im Schüttler bei 37°C und 200 rpm ü. N. inkubiert. Am nächsten Tag wird die Vorkultur 1:100 mit LB-Medium verdünnt und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0,4 kultiviert. Dabei erfolgt alle 30 Minuten eine Kontroll-OD-Messung, um ein Überwachsen der Kultur zu verhindern. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgen auf Eis bzw. in vorgekühlten Arbeitsgeräten.

Die Kultur wird 10 min bei 4°C und 1100x g abzentrifugiert. Anschließend werden jeweils 50 ml Bakterienpellet in 15 ml kaltem TBF I Puffer resuspendiert und 60 (XL1 blue) bzw. 90 (BL21) min auf Eis gestellt. Anschließend wird bei 4°C für 10 min bei 750x g zentrifugiert und das Pellet in 900 µl kaltem TBF II Puffer pro 50 ml Bakterienpellet resuspendiert. Die kompetente Bakterien-suspension wird anschließend zu 120 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und schockgefroren. Die Lagerung erfolgt für bis zu 6 Monate bei -80°C

TFB I Puffer	30 mM Kaliumacetat
	50 mM MgCl ₂
	10 mM CaCl ₂
	100 mM RbCl
	15% Glycerin (v/v)
	pH 5,8
	<i>sterilfiltriert</i>

TFB II Puffer	10 mM MOPS
	75 mM CaCl ₂
	10 mM RbCl
	15% Glycerin (v/v)
	pH 7.0
	<i>sterilfiltriert</i>

2.5.2 Transformation von *E. coli*

120 µl kompetente Bakterien werden auf Eis aufgetaut und anschließend für ein bis zwei Transformationen verwendet. Hierbei werden zu einem Ansatz 10 bis 15 ng Plasmid-DNA gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt für 45 s ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad. Nach 1 min Ruhe auf Eis wird 1 ml LB-Medium zum Ansatz gegeben und die Zellsuspension anschließend für 1 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Dann werden die Bakterienzellen abzentrifugiert (3000 rpm für 3 min, Heraeus Biofuge pico), der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wird auf einer Antibiotika-haltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und ü. N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.5.3 Übernachtskulturen

Für eine erfolgreiche Isolation von Plasmid-DNA (2.5.5) muss eine ausreichende Menge an Bakterien erzeugt werden, die das entsprechende Plasmid tragen. Hierzu wird steriles LB-Medium, welches das für die Selektion des Plasmids erforderliche Antibiotikum enthält, mit dem gewünschten Bakterienklon angeimpft. Dies geschieht meist aus Glycerin-Dauerkulturen oder von LB-Agarplatten mit Hilfe autoklavierter Zahnstocher oder steriler Pipettenspitzen. Die Kulturen werden in einem Schüttler bei 37°C und 200 rpm für 14 bis 16 h ü. N. inkubiert. Danach wird die Bakteriensuspension direkt weiter verarbeitet oder pelletiert und bei -20°C gelagert.

2.5.4 *E. coli* Glycerin-Dauerkulturen

750 µl einer Übernachtskultur werden mit 750 µl 40%igem autoklavierten Glycerin in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und sofort bei -80°C eingefroren.

2.5.5 Isolation von Plasmid-DNA

Ausgehend von 3 bis 300 ml Bakteriensuspension erfolgt die Plasmidisolierung mit Kits der Firma Qiagen. Wenn nicht anders erwähnt werden die Angaben des Herstellers befolgt.

Bei Bakterienkulturen bis zu einem Volumen von 3 ml erfolgt die DNA-Isolation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit. Grundlage der hier verwendeten Methode ist die alkalische Lyse der Bakterienzellen durch Solubilisierung der Zellmembran, Denaturierung und Präzipitation der genomischen DNA und der Proteinen sowie die anschließende Renaturierung und Reinigung der Plasmid-DNA. Letzteres geschieht mit Hilfe einer positiv geladenen DEAE-Matrix. Die Elution erfolgt mit 30 μ l H₂O. Größere DNA-Mengen aus bis zu 300 ml Bakterienkultur werden mit dem HiSpeed Maxi Prep Kit durchgeführt. Das Isolationsprinzip beruht auf den gleichen Grundlagen wie bei dem Miniprep Kit, jedoch sind hier hohe Zentrifugationsschritte wie etwa zur Präzipitation der Plasmid-DNA durch Filtrationstechniken ersetzt. Die Elution erfolgt mit 1 ml Elutionspuffer aus dem Kit.

2.5.6 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen kommen in Prokaryoten auf natürliche Weise vor. Sie werden zur Linearisierung zirkulärer DNA-Moleküle oder zum Ausschneiden spezifischer Bereiche eines DNA-Moleküls eingesetzt. Hierbei entspricht eine Enzymeinheit (1 U = 1 Unit) der Enzymmenge, die nötig ist, um 1 μ g λ -Phagen-DNA in einer Stunde vollständig zu spalten. Die Zahl, die für die enzymatische Spaltung von 1 μ g DNA benötigten Restriktionseinheiten ergibt sich aus der Division der Länge von λ -Phagen-DNA (48502 Nukleotide) durch die Länge der zu spaltenden DNA. Das Ergebnis wird durch die Anzahl der Restriktionsschnittstellen des jeweiligen Enzyms in λ -Phagen-DNA dividiert. Für die enzymatische Spaltung wird jedoch meist mindestens ein vierfacher Überschuss eingesetzt. Die gewählten Bedingungen (Puffer, Inkubationstemperatur) sind für die Enzyme unterschiedlich und richten sich nach den Herstellerangaben. Es ist darauf zu achten, dass der Glyceringehalt im Restriktionsansatz 5% nicht übersteigt, was sonst analog zu einem sehr hohen Enzymüberschuss zu einer Stern-Aktivität (unspezifische Restriktion) führen kann. Schließlich muss geprüft werden, ob die verwendeten Enzyme sensitiv für *dam*/*dcm* methylierte DNA sind. Die zu hydrolysierende Plasmid-DNA muss dann in einen *dam*⁻/*dcm*⁻Bakterienstamm eingebracht und erneut präpariert werden.

Für eine analytische Restriktion wird ein 10 μ l Ansatz verwendet. Die Vollständigkeit der enzymatischen Hydrolyse wird durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Für eine präparative Restriktion werden im allgemeinen Ansätze von 40 μ l verwendet, von denen bei Bedarf 1 μ l auf einem Agarosegel getestet werden kann. Bei Restriktionen mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen muss darauf geachtet werden, dass die enzymatische Spaltung in einem für beide Enzyme geeigneten Puffer stattfinden kann. Ist dies nicht möglich, so muss die Restriktion

sequentiell durchgeführt werden. Die DNA-Probe ist dann nach erfolgreicher erster Restriktion zu reinigen (2.5.9).

2.5.7 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Mit der Agarosegelelektrophorese ist eine Reinigung und Größenbestimmung von Nukleinsäuren möglich. DNA-Fragmente werden in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt und können durch UV-Licht (265 nm) visualisiert werden. Dies ist möglich, da Ethidiumbromid zwischen die Basen der DNA interkaliert.

Standardmäßig werden 0,8%ige Gele für die Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet. Für Fragmente, die kleiner als 500 bp sind, werden 2%ige Gele verwendet. Da zirkuläre DNA ein verändertes Laufverhalten aufweist, beziehen sich diese Angaben nur auf linearisierte DNA. Die erforderliche Agarosemenge wird abgewogen und mit 1x TAE-Puffer in einer Mikrowelle zum Sieden gebracht. Die klare Lösung wird auf ca. 50°C abgekühlt und Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Die Lösung wird dann unmittelbar auf einer ebenen Fläche in eine entsprechende Gelform gegossen und ein Kamm eingesteckt werden, um Taschen für das Probenvolumen freizuhalten. Nach Erstarren des Gels wird der Kamm entfernt, das Gel in eine Laufkammer gelegt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben werden mit der entsprechenden Menge 5x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Laufkammer wird mit einer konstanten Spannung von 120 V betrieben. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wird die Größe der einzelnen DNA-Fragmente anhand eines ebenfalls aufgetrennten Größenstandards bestimmt.

2.5.8 DNA-Isolation aus Agarosegelen

Die DNA-Isolation aus Agarosegelen erfolgt mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qia-gen. Dazu wird eine DNA-Probe mit der entsprechenden Menge DNA-Probenpuffer versetzt und über ein Agarosegel aufgetrennt (2.5.7). Die entsprechenden DNA-Fragmente werden anhand eines Größenstandards identifiziert und mit einem sauberen Skalpell unter UV-Licht (265 nm) aus dem Gel ausgeschnitten. Dann werden die Gelstücke gewogen, mit einer vorgegeben Menge OG-Puffer versetzt und nach Herstellerangaben mit dem oben beschriebenen Kit aufgereinigt. Die Elution der aufgereinigten DNA erfolgt angepasst an die ausgeschnittener Menge mit 20 bis 30 µl Wasser.

2.5.9 Reinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen und von PCR-Produkten

Für beide Aufreinigungen wird das QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Aufreinigung erfolgt genau nach den Angaben des Herstellers. Die Elution der gereinigten DNA erfolgt mit 30 µl Wasser.

2.5.10 Ethanolpräzipitation von DNA

Die Ethanolpräzipitation stellt eine Möglichkeit dar, DNA zu konzentrieren und von Salzen aufzureinigen. Dabei wird DNA aus einer ethanolischen Phase ausgefällt. Dies ist allerdings nur möglich, wenn negative Ladungen der vorhandenen Biomoleküle elektrostatisch neutralisiert werden, was typischerweise durch Zugabe von Alkalkationen (Na^+ oder Li^+) geschieht. Der entstehende DNA-Niederschlag wird durch Zentrifugation bei 18.000x g pelletiert.

Die Präzipitation einer DNA-Lösung erfolgt durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,6 und 2,5 Volumen kaltem absolutem Ethanol. Es wird invertiert, dann das Gemisch mindestens für 1 h bei -80°C aufbewahrt und anschließend für 15 min bei 18.000x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und der DNA-Niederschlag mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 18.000x g und 4°C wird der Überstand verworfen und das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend kann die DNA in einem definierten Volumen Wasser oder TE-Puffer aufgenommen werden.

2.5.11 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Bei der photometrischen Quantifizierung von Nucleinsäuren macht man sich die Absorption von DNA bei einer bestimmten Wellenlänge zunutze. Nucleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Polypeptide hingegen bei 280 nm. Um zu große Verluste der zu bestimmenden DNA zu vermeiden, wird diese mit Wasser verdünnt (meist ist 1:30 ausreichend). Die Bestimmung der Absorption erfolgt spektrophotometrisch. Der Konzentrationsbestimmung liegt zugrunde, dass $\text{OD}_{260} = 1 \text{ 50 } \mu\text{g doppelsträngiger DNA/ml}$ entspricht. Der Quotient von $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ erlaubt eine Aussage bezüglich der Reinheit der Probe. Bei reiner DNA liegt der Quotient etwa bei 1,8. Je niedriger der Wert ist, desto stärker ist die Probe mit Protein verunreinigt. Werte, die 1,8 überschreiten, können je nach Reinigungsmethode auch auf RNA-Kontaminationen hindeuten. Das Ergebnis kann grundsätzlich durch alle Stoffe verfälscht werden, die im genannten Wellenbereich absorbieren. Dies trifft besonders auf Aromate und deren Derivate zu, wobei als häufigste aromatische Kontamination Phenol zu nennen ist, welches bei der traditionellen DNA-Extraktion zum

Einsatz kommt. Die hier beschriebene Methode ist bei geringen DNA-Mengen jedoch weitaus ungenauer als die Mengenabschätzung mit Hilfe eines Agarosegels (2.5.7).

2.5.12 Ligation von DNA

Die Ligationsreaktion wird mit dem Rapid Ligation Kit der Firma Roche durchgeführt. Unter einer Ligation versteht man das kovalente Verbinden eines 5'-Endes und eines 3'-Endes von DNA-Molekülen durch eine DNA-Ligase. Die verwendete T4-Ligase stammt aus dem Bakteriophagen T4 und bildet unter ATP-Verbrauch Phosphodiesterbindungen aus. So ist es möglich, 3'- und 5'-Enden beliebiger DNA-Moleküle miteinander zu verbinden. Soll ein vorgeschchnittenes DNA-Fragment in einen ebenfalls vorgeschrittenen Vektor ligiert werden, so kann zuvor eine Mengenabschätzung mittels eines Agarosegels (2.5.7) durchgeführt werden. Vektor und Fragment werden im stöchiometrischen Verhältnis 3:1 bis 1:5 eingesetzt, wobei im Allgemeinen etwa 40 ng Vektor zum Einsatz kommen. Vektor und Fragment werden mit 2 µl 5x DNA-Verdünnungs-Puffer vermischt und ggf. mit Wasser auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht. Dann werden 10 µl 2x Ligations-Puffer und 1 µl T4-Ligase zugegeben, vorsichtig gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend werden kompetente *E. coli* Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert (2.5.2).

2.5.13 Dephosphorylierung von DNA am 5'-Ende

Die Dephosphorylierung des 5'-Endes von DNA-Fragmenten wird vorwiegend bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit einem Vektor durchgeführt (2.5.12). Besonders wichtig ist die Dephosphorylierung eines Vektors wenn er nach dem Einzelverdau für eine sogenannte ungerichtete Klonierungen verwendet wird. Das Fehlen der 5'-Phosphatgruppe verhindert eine Religation des Vektors und verringert somit die Anzahl der Religationsklone erheblich. Für die Dephosphorylierung wird „Calf Intestine Alkaline Phosphatase“ (CIP) der Firma NEB verwendet. Die Reaktion erfolgt nach Angaben des Herstellers (5 U/10 µg DNA, 30 min, 37°C). Nach Abschluss der Reaktion kann das Enzym hitzeinaktiviert werden (20 min, 65°C).

2.5.14 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion

Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird DNA mittels spezifischer Primer *in vitro* vervielfältigt¹⁹¹. Hierzu werden zwei DNA-Primer eingesetzt, deren Basenabfolge jeweils zu einem der beiden DNA-Stränge revers komplementär ist und die an entgegengesetzten Punkten der zu amplifizierenden Region gewählt sind. Diese Oligonukleotide dienen als Startpunkt der DNA-

Synthese und bestimmen gleichzeitig auch die Enden des Amplifikats. Die Synthese wird durch die *Taq*-DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* katalysiert. Für spezifische Genamplifikationen ist die *Taq*-Polymerase jedoch ungeeignet, da sie keine Korrekturfunktion (engl. „proof-reading“) besitzt und, statistisch betrachtet, in 1000 Syntheseschritten einen Fehler verursacht. Die Fehlerquote erhöht sich bei der Amplifikation sehr AT-reicher DNA-Sequenzen, wie sie beispielsweise bei *Plasmodium falciparum* auftreten. Daher wird die *Taq*-Polymerase in dieser Arbeit nur für analytische PCRs verwendet (2.5.15). Für Genamplifikationen wird eine thermostabile *Pfx*-Polymerase mit Korrekturfunktion eingesetzt, was die Fehlerrate sehr gering hält. Problematisch bleiben dennoch solche DNA-Bereiche von beispielsweise 20 oder mehr aufeinanderfolgenden A's oder T's. Hier kommt es oft zur Insertion oder Deletion eines gleichen Nukleotids. Um Mutationen auszuschließen, werden daher amplifizierte DNA-Fragmente nach der Klonierung sequenziert (GATC, Konstanz).

Standard-PCR-Ansatz:

5 µl 10 mM dNTP
 100 ng Primer fwd.
 100 ng Primer rev.
 50 ng DNA
 5 µl 10x Reaktionspuffer
 1 µl 50 mM MgSO₄ (für *Pfx*)
 0,7 µl *Pfx* (2 Units)
 H₂O_{dd} ad. 50µl

Standard-PCR, Reaktionsbedingungen:

- | | | |
|----|-------------|--|
| 1. | 94°C 5 min | Aufschmelzen der Template-DNA |
| 2. | (35 Zyklen) | |
| | 94°C 30 s | |
| | 50°C 30 s | Hybridisierung der Oligonukleotide (Standardmäßig 2-5 °C unterhalb des Schmelzpunktes gewählt) |
| | 68°C 2 min | DNA-Synthesezeit: 1 min/kb |
| 3. | 68°C 10 min | |
| 4. | 4°C ∞ | |

2.5.15 PCR-Screening nach positiven Klonen

Das PCR-Screening stellt eine schnelle Methode dar, um Bakterienkolonien im Anschluss an eine Klonierung nach positiven Klonen zu durchsuchen. Dabei wird entweder ein Oligonukleotidprimer im gesuchten Insert und ein Primer im Zielvektor verwendet oder es kommt ein Oligonukleotidpaar zum Einsatz, welches das Insert flankierend im Vektor bindet. Die Größe des Amplifikats gibt dann Aufschluss über das enthaltene Insert.

Die Bakterienkolonien werden mit sterilen Zahnstochern von einer LB-Agar-Platte gepickt, in den PCR-Ansatz getunkt und anschließend auf einer Depotplatte abgestrichen, um nach der PCR auf mögliche positive Klone zurückgreifen zu können. Das Reaktionsvolumen des PCR-Ansatzes für das Screening beträgt 25 µl.

Reaktionsbedingungen:

1. 94°C 10 min
 2. (30 Zyklen)
 - 94°C 1 min
 - 45°C 30 sek
 - 68°C 2 min
 3. 68°C 10 min
 4. 4°C ∞
- DNA-Synthesezeit: 1 min/kb

2.5.16 Austausch und Herausschneiden von Nukleotidbasen durch ortsspezifische Mutagenese

Die *in vitro* ortsspezifische Mutagenese oder „site-directed mutagenesis“ ist ein Verfahren, bei dem einzelne oder mehrere Nukleotidbasen entweder gezielt ausgetauscht oder eine kurze Nukleotidsequenz aus der DNA herausgeschnitten werden können^{192,193}. Die Reaktion findet mit einer ringförmigen, doppelsträngiger DNA-Matrize und zwei zueinander komplementären synthetischen Oligonukleotiden statt, über welche die gewünschte Mutation eingeführt wird. Mit Hilfe der *Pfx*-DNA-Polymerase, welche sich durch eine sehr niedrige Fehlerrate auszeichnet, werden die Primer während der Temperaturzyklen entlang des komplementären DNA-Stranges verlängert. Das spezifische Primerdesign lässt allerdings nur eine Amplifikation des ursprünglichen Elternstranges zu. Zwar binden die Primer auch an die Tochterstränge, doch erlaubt die durch das Primerdesign vorgegebene Syntheserichtung nur eine Amplifikation der Elternstränge. Im Anschluss an die Temperaturzyklen werden die Elternstränge durch Behandlung mit der Endonuklease *DpnI* entfernt (*DpnI*: 0,5 U/µl, Inkubationszeit 2 h bei 37°C). Somit werden ausschließlich die Tochterstränge, welche die gewünschte Mutation enthalten, für die folgende Transformation in *E. coli*

verwendet. DNA, welche aus *E. coli* isoliert wird, ist in der Regel aufgrund der Aktivität des Enzyms DNA-Adenin-Methyltransferase (*dam*) methyliert und kann daher durch die Endonuklease *DpnI*, welche spezifisch methylierte und teilmethylierte DNA schneidet, verdaut werden. Die Tochterstränge enthalten keine Methylierungsmuster und werden nicht angegriffen. Das PCR-Produkt wird mit dem PCR-Purification-Kit (2.5.9) gereinigt, und in *E. coli* transformiert (2.5.2). Hierbei erfolgt der Ringschluss des Plasmids durch bakterielle Ligasen.

Reaktionsbedingungen:

1. 94°C 5 min
2. (28 Zyklen)
94°C 40 s
50°C 50 s
68°C 5 min
3. 68°C 10 min
4. 4°C ∞

2.5.17 cDNA-Synthese mit Hilfe der Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Mit Hilfe der Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) ist es möglich RNA in „complementary“ DNA (cDNA) umzuschreiben und die gewünschte spezifisch zu amplifizieren..

Bei der RT-PCR erfolgt zuerst eine cDNA-Erststrangsynthese mit der Gesamt-RNA oder der mRNA als Matritze. Darauf folgt eine PCR (2.5.14), in der die zuvor gebildete cDNA als Vorlage dient. Für diese Arbeit wird das RETROscript Kit von Ambion mit dekameren Oligonukleotiden zufälliger Sequenz („random“) oder Oligo(dT)-Primern verwendet. Die Durchführung erfolgt genau nach den Herstellerangaben. Falls erforderlich, kann ein Ansatz ohne das Enzym Reverse Transkriptase als Negativkontrolle dienen. Im Anschluss an die Synthese wird eine PCR zur Qualitätskontrolle der Synthese durchgeführt. Hierfür werden Primerpaare verwendet, die Genabschnitte mit Introns flankieren. So kann eine Kontamination mit genomischer DNA erkannt bzw. ausgeschlossen werden.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinmenge bei der Methode nach Bradford beruht auf der unspezifischen Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G 250 an basische Seitenketten von Aminosäuren. In Anwesenheit von Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 462 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm gilt als Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung¹⁹⁴. Unterschiedliche Faktoren können die Genauigkeit der Proteinbestimmung beeinflussen: Ionische Detergenzien wie SDS maskieren Protein, da sie das Anlagern des Coomassie-Farbstoffs verhindern. Nichtionische Detergenzien wie NP40 Nonidet oder Triton X-100 bilden in wässriger Lösung Micellen unterschiedlicher Größe und erhöhen so die Absorption bei 595 nm, was eine erhöhte Proteinkonzentration vortäuscht.

Die Nachweisgrenze der Bradford-Reaktion liegt bei 0,05 bis 0,5 µg Protein pro ml. Vor der Durchführung der Messung wird die Bradford-Stammlösung (BioRad Protein Assay) im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt. Die zu messende Proteinlösung (bis 10 µl) wird mit 1 ml des verdünnten Bradfordreagenz sorgfältig durchmischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm im Spektrophotometer gemessen. Die verdünnte Bradford-Lösung dient als Referenz. Anhand einer Eichgeraden, die mit Rinderserumalbumin erstellt wird, kann die Proteinkonzentration der Probe ermittelt werden.

2.6.2 Präzipitation von Proteinen durch Trichloressigsäure

Eine Aufkonzentrierung von Proteinlösungen und eine Entfernung störender Salze ist mit Hilfe der Trichloressigsäure (TCA) möglich. Die Fällung von Proteinen in verdünnter Lösung ist allerdings oftmals von geringer Effizienz. In solchen Fällen kann Desoxycholat (DOC) als Hilfsstoff verwendet werden. Als schwaches Detergenz fällt DOC beim Absenken des pH-Werts durch TCA aus und bildet so Präzipitationskeime, die vorhandenes Protein in der Lösung zum Ausfallen anregen. DOC stört die SDS-PAGE (2.6.3) nicht, da es leicht von dem starken Detergenz SDS verdrängt wird.

Zur Präzipitation wird die Proteinlösung mit 1/500 Volumen 10% (w/v) DOC (optional) sowie 1/10 Volumen 100% TCA versetzt und sorgfältig gemischt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wird die Probe 30 min bei 4°C und 14.000x *g* zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, der pH des Pellet mit Ammoniakgas neutralisiert und dieses in 10 bis 50 µl 4x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Färbt sich die Lösung gelb, wird nochmals mit Ammoniakgas neutralisiert bis sich eine blaue Färbung des Probenpuffers einstellt. Die Probe ist danach für die Auftrennung im Polyacrylamid-Gel bereit.

2.6.3 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt¹⁹⁵. Dies ist möglich, da mit Hilfe des ionischen Detergenz SDS (an ein Gramm Protein binden dabei ungefähr 1,4 g SDS) gemeinsam mit reduzierenden Agenzien Proteine vollständig entfaltet werden und eine weitestgehend gleiche, negative Oberflächenladung erhalten.

In der Regel bestehen SDS-Polyacrylamidgele aus zwei Bereichen: dem großporigen Sammelgel (5% Acrylamid, pH 6,8) und dem engporigen Trenngel (6-15% Acrylamid, pH 8,8). Durch die spezielle Komposition des Probenpuffers wandert das Proteingemisch im Sammelgel als dünner Stapel zwischen dem Leitton Chlorid und dem bei pH 6,8 schwach geladenen Folgeion Glycin. So erreicht eine konzentrierte dünne Proteinbande das Trenngel. Bei dessen hohem pH ist Glycin stärker geladen und überholt das Protein. Ohne das treibende Folgeion wird nun die Wanderungsgeschwindigkeit der SDS-beladenen Proteine, bedingt durch den Siebeffekt des Gels, allein durch deren Größe bestimmt. Die genaue Molekulargewichtsbestimmung der aufgetrennten Proteine, erfolgt durch Vergleiche mit Größenstandards.

Sollen große Probenvolumina oder stark salzhaltige Proben analysiert werden, sind diese zuvor einer TCA-Fällung (2.6.2) zu unterziehen und in 10 bis 50 µl 4x SDS-Probenpuffer aufzunehmen. Kleine Probenvolumina werden mit dem gleichen Volumen an 2x SDS-Probenpuffer versetzt. Unmittelbar vor dem Beladen des Gels werden alle Proben für 5 min bei 95°C denaturiert. Sollen die aufgetrennten Proteine später einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen werden (2.11), so wird ein 5x LDS-Probenpuffer (Invitrogen) verwendet und die Proben für 10 min bei 70°C denaturiert. Der Gellauf wird bei einer konstanten Spannung von 200 V durchgeführt. Die anschließende Detektion der Proteine kann alternativ mit Hilfe einer Silberfärbung (2.6.5), einer Coomassie-Färbung (2.6.4) oder dem Westernblotting (2.6.6) erfolgen.

Trenngellösung	375 mM Tris/HCl pH 8,8 0,1% SDS (w/v) 6-15% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 0,05% TEMED (v/v) 0,1% APS (w/v)
Sammelgellösung	125 mM Tris/HCl pH 6,8 0,1% SDS (w/v) 3,9% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 0,05% TEMED (v/v) 0,1% APS (w/v)

2.6.4 Proteinnachweis mittels Coomassie-Färbung

Proteine können in einem Polyacrylamidgel (PAA-Gel) durch eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250 sichtbar gemacht werden. Dieser blaue Farbstoff bindet unspezifisch an anionische und aromatische Seitenketten von Proteinen. Die Nachweisempfindlichkeit dieser Methode liegt bei 100 ng bis 1 µg Protein. Bei der Färbung wird das Polyacrylamidgel für mind. 30 min in der Coomassie-Färbelösung unter Schwenken inkubiert. Zum Entfärben wird das Gel anschließend mehrmals mit Entfärbelösung behandelt (schwenkend), bis die Proteinbanden deutlich erkennbar sind. Ungefähr zehnmal sensitiver ist die Färbung mit koloidalem Coomassie-Farbstoff (Invitrogen, Simply Blue Safe Stain). Das PAA-Gel wird dreimal 5 min unter Schwenken mit Wasser gewaschen und dann für 1 h unter Schwenken in der koloidalen Coomassie-Färbelösung inkubiert. Entfärbt wird für mindestens 1 h schwenkend mit Wasser.

Färbelösung	0,125% Coomassie Brilliant Blue R 250 (w/v) 30% Methanol (v/v) 10% Essigsäure (v/v)
Entfärbelösung	30% Methanol (v/v) 10% Essigsäure (v/v)

2.6.5 Proteinnachweis mittels Silberfärbung

Mit der Silberfärbung ist ein Proteinnachweis in PAA-Gelen im Subnanogramm-Bereich möglich. Es werden Silberionen an die aufgetrennten Proteine im Gel gebunden und durch Reduktion in metallisches Silber überführt. Aus den koloidal verteilten Silberatomen resultiert eine braune Färbung der Proteine. Das Polyacrylamidgel wird für mindestens 1 h in Fixierlösung geschüttelt und anschließend für 20 min in 50% (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wird das Gel für 1 min in Vorbehandlungslösung gelegt und dann dreimal für 20 s mit Wasser gewaschen. Nach 20 min Inkubation in der Färbelösung wird das Gel zweimal 20 s mit Wasser gewaschen und danach in die Entwicklerlösung gegeben. Die folgende Farbreaktion muss genau beobachtet werden und nach Erreichen der gewünschten Intensität durch Zugabe von 1%iger Essigsäure sofort gestoppt werden, um eine vollständige Schwarzfärbung des Gels zu verhindern.

Fixierlösung	50% Methanol (v/v) 12% Essigsäure (v/v) 0,0185% Formaldehyd (v/v)
Vorbehandlungslösung	0,02% Na ₂ S ₂ O ₃

Färbelösung	0,2% AgNO ₃ (w/v) 0,027% Formaldehyd (v/v)
Entwicklerlösung	6% Na ₂ CO ₃ (w/v) 0,0185% Formaldehyd (v/v) 0,0004% Na ₂ S ₂ O ₃

2.6.6 Western-Blotting

Beim Western-Blotting wurden in dieser Arbeit Proteine im Semi-Dry-Verfahren mit einer Blotapparatur (Trans-Blot SD, BioRad) aus einem PAA-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert¹⁹⁶. Dieses Verfahren ermöglicht anschließend einen immunologischen Nachweis der Proteine auf der Membran. Dem hier angewandten Verfahren liegt die Erkenntnis zu Grunde, dass Polypeptide, die durch SDS-Behandlung eine negative Nettoladung tragen, im elektrischen Feld zum Pluspol wandern. Dort treffen die Proteine auf eine positiv geladene Membran, an der sie haften bleiben. Wird zu lange geblottet, können die Proteine aber auch durch die Membran hindurchtreten und sind somit für den immunologischen Nachweis verloren. Ist die Blotzeit zu kurz, kann der Transfer unvollständig sein. In dieser Arbeit wurde standardmäßig für eine Stunde geblottet, bei besonders großen Proteinen (größer 200 kD) kann diese Zeit auch auf 75 min erhöht werden.

Es werden acht Whatman-3MM-Papiere und eine PVDF-Membran benötigt, die auf die Größe des SDS-Gels zurechtgeschnitten werden. Die Membran wird mit Methanol aktiviert und in Anodenpuffer II gegeben. Nun werden auf die Anode der Blotapparatur zuerst zwei in Anodenpuffer I getränkte Whatman-Papiere geschichtet, darauf zwei in Anodenpuffer II getränkte Whatman-Papiere, dann die Membran und darauf das PAA-Gel. Schließlich bilden vier Whatman-Papiere, die zuvor in Kathodenpuffer getränkt wurden, den Abschluss. Es ist wichtig, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten zurückbleiben. Nach Auflegen der Kathodenplatte und Schließen der Apparatur erfolgt der Proteintransfer bei Raumtemperatur für 1 h mit einer konstanten Spannung von 24 V.

Anodenpuffer I	300 mM Tris 20% Methanol (v/v)
Anodenpuffer II	25 mM Tris 20% Methanol (v/v)
Kathodenpuffer	25 mM Tris 40 mM ε-Aminocaprinsäure 20% Methanol (v/v)

2.6.7 Ponceau S-Färbung von geblotteten Proteine

Die Färbung von geblotteten Proteinen durch Ponceau S ist reversibel und dient der Erfolgskontrolle des Proteintransfers beim Blotten (2.6.6). Die Membran wird für 5 min in der Färbelösung geschwenkt und mit Wasser entfärbt, bis die Proteinbanden rot erkennbar sind.

Farbelösung	Ponceau S 0,5% (w/v)
	Trichloressigsäure 1% (v/v)

2.6.8 Immunologische Detektion von Proteinen

Die Detektion von Proteinen auf Membranen kann nach dem Western-Blotting immunologisch erfolgen. Dazu wird die Membran zuerst mit einem Primärantikörper inkubiert, der spezifisch das gesuchte Protein erkennt und daran bindet. Danach erfolgt eine Behandlung mit einem Enzymgekoppelten Sekundärantikörper (in diesem Fall Peroxidase), der den konstanten Teil des Primärantikörpers erkennt. Der Nachweis des entstandenen Antikörper-Antigen-Komplexes erfolgt hierbei durch Chemilumineszenz. Bei dieser Reaktion wird ein Substrat des Enzymes (im Fall der Peroxidase Luminol oder eines seiner Derivate) auf die Blotmembran gegeben. Es kommt zur katalytischen Oxidation des Substrats, wobei Licht emittiert wird. Diese Reaktion kann durch Auflegen eines Röntgenfilms dokumentiert werden. Die Belichtung des Films wird durch Chemilumineszenz des Substrates hervorgerufen, das durch des Sekundärantikörper-gekoppelten Enzym umgesetzt wird. Das Protein, gegen welches der Primärantikörper gerichtet ist, kann folglich als distinkte Bande auf dem entwickelten Röntgenfilm nachgewiesen werden. Treten aufgrund von Kreuzreaktionen viele Banden auf, kann dem durch eine Erhöhung der Antikörperverdünnung entgegen gewirkt werden. Ist das Ergebnis weiterhin nicht zufriedenstellend, kann die Stringenz des Waschpuffers (PBST) erhöht werden, indem die Tween 20 Konzentration sequentiell bis auf 0,2% erhöht wird.

In dem in dieser Arbeit vorkommenden Verfahren wird die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 5% (w/v) Milchpulver in PBS geschwenkt, um freie Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Danach erfolgt für mindestens 1 h die Inkubation mit einem Primärantikörper, der in 0,5% (w/v) Milchpulver/PBS (PBSM) verdünnt wird. Anschließend wird die Membran dreimal 10 min mit 0,05% Tween 20/PBS (PBST) gewaschen und dann mit dem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper für 30 min in PBSM inkubiert. Danach wird die Membran erneut dreimal 10 min mit PBST gewaschen. Anschließend wird die Membran für 1 min mit der Substratlösung der Peroxidase (ECL) inkubiert, auf eine Glasplatte gelegt und mit Frischhaltefolie abgedeckt. In einer Dunkelkammer wird ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Expositionszeit richtet sich nach der zu analysierenden Proteinmenge und der Affinität des Antikörper zu seinem Antigene. Standardmäßig werden Expositionen von 5 s, 30 s, 1 min und 5 min durchgeführt.

2.7 Proteinaufreinigung

2.7.1 Rekombinante Proteinexpression

Die Expressionskonstrukte (in pET21a+/d+ und pETM-60) werden in BL21-CodonPlus-RIL bzw. Lys transformiert (2.5.2). Mit je einem Klon werden die entsprechenden Vorkulturen (LB-Medium + Antibiotika) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Die Vorkulturen werden dann jeweils 1:20 mit vorgewärmtem LB-Medium (Amp/Cam bzw. Kan/Cam) verdünnt und bei 37°C und 160 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 erfolgt die Induktion der Expression durch Zugabe von 0,04 bis 1 mM IPTG für 1 h bis 8 h. Danach wird die Bakteriensuspension abzentrifugiert (4000x g, 4°C, 20 min) und das Pellet aus 1 L Kultur in 10 ml Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wird das Lysat in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Jetzt kann das Pellet für ca. 3 Monate ohne Qualitätsverlust bei -80°C gelagert werden.

Lysepuffer	300 mM NaCl
	50 mM Tris/HCl pH 7,6 - 8,0
	10 mM Imidazol
<i>Zugabe unmittelbar vor Gebrauch</i>	5 mM β-Mercaptoethanol
	1 µg/ml Leupeptin
	1 µg/ml Pepstatin A

2.7.2 Nickel-Affinitätschromatographie

Proteinkonstrukte, die das His-Epitop (6 aufeinander folgende Histidine) tragen, können mit Hilfe von Nickel-Nitriloessigsäure-Agarose („Ni-nitriloacetic-acid-agarose“, Ni-NTA-Agarose) aufgereinigt werden. Das Säulenmaterial besteht aus oktaedrisch koordinierten Nickel-Ionen, die durch Nickel-Nitriloessigsäure an Agarose-Körnchen gebunden sind. Zwei Ligandbindungsstellen des Nickels bleiben jedoch frei. Diese interagieren während der Aufreinigung mit den Stickstoffatomen der heterozyklischen Seitenketten der Histidine des 6xHis-Epitops. Bei der Elution werden die Histidin-Seitenketten durch ein Struktur-Analogon des Histidins, das Imidazol, verdrängt. Die Bindekapazität liegt bei bis zu 50 mg Protein pro ml Ni-NTA-Agarose. Alle in dieser Arbeit aufgereinigten Proteine tragen am C-Terminus aufgrund der Beschaffenheit der Expressionsvektoren ein His-Epitop (Mit Ausnahme von pET-M 60 Konstrukten, dort liegt das His-Epitop in der Mitte). Das Bakterienpellet aus 1 Liter Kultur in Lysepuffer (LP) wird möglichst auf Eis aufgetaut. Wenn nicht schon im Lysepuffer enthalten erfolgt dann die Zugabe der Proteaseinhibitoren Leupeptin und Pepstatin A. Der Zellaufschluss erfolgt mit Ultraschall auf Eis durch 6 Pulse („output 12“) für jeweils 15 s. Hierbei brechen die Bakterienwände auf und die löslichen Proteine werden frei ge-

setzt. Zwischen den Pulsen wird die Bakteriensuspension 1 min auf Eis abgekühlt, um ein Erhitzen und die daraus resultierende Präzipitation von Proteinen zu verhindern.

Um die bakterielle DNA ebenso wie zelluläre Bestandteile der Bakterien abzutrennen, wird das Bakterienlysat mit 21.000x g bei 4°C für 30 min zentrifugiert. Das entstehende Pellet wird verworfen und der klare Überstand, falls nötig, auf eine höhere Imidazolkonzentration eingestellt. Das Äquilibrieren und Beladen der Säule mit einer höheren Imidazolkonzentration führt dazu, dass weniger unerwünschte bakterielle Proteine an die Säule binden können. Anschließend wird das Lysat auf die vorbereitete Säule (0,5 bis 4 ml Ni-NTA-Agarose, äquilibriert mit 10 Säulenvolumen (SV) LP) gegeben und ggf. nach dem Durchlaufen nochmals aufgeladen. Das Säulenmaterial mit dem gebundenen Protein wird dann mit 30 SV Waschpuffer (WP) gewaschen. Die Elution erfolgt in fünf Schritten mit je 0,5 SV Elutionspuffer.

Waschpuffer	150 bis 750 mM NaCl 50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM bis 40 mM Imidazol
<i>Zugabe unmittelbar vor Gebrauch:</i>	5 mM β -Mercaptoethanol
Elutionspuffer	300 mM NaCl 50 mM Tris/HCl pH 8,0 150 mM Imidazol
<i>Zugabe unmittelbar vor Gebrauch:</i>	5 mM β -Mercaptoethanol

2.7.3 Gelfiltrations-Chromatographie

Die Gelfiltrations-Chromatographie (Gelfiltration) stellt ein Verfahren dar, mit dem Moleküle nach ihrer Form und Größe getrennt werden können. Die Chromatographiesäulen enthalten Kügelchen eines gelartigen, hydratisierten Materials mit relativ konstanter molekularer Porenweite (Gel-Matrix). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Superdex 200 Säulenmaterial handelt es sich um Agarose-Kügelchen, die kovalent mit Dextranmolekülen verknüpft sind. Des Weiteren zeichnet sich diese Gel-Matrix durch ihre pH-Stabilität (pH 3 bis 12) sowie ihr inertes Verhalten gegenüber Biomolekülen und vielen chemischen Agentien (z. B. 6 M Guanidiniumhydrochlorid oder 30% Acetonitril) aus. Oxidierende Bedingungen sind auszuschließen, da sie die Dextranketten der Matrix degradieren könnten. Die Auftrennung erfolgt nach dem Prinzip, dass kleinere Proteine beim Durchlaufen der Säule in die Gel-Matrix eindringen, während große relativ ungehindert zwischen den Gel-Kügelchen hindurchfließen. Große Proteine eluieren zuerst von der Säule, gefolgt von kleineren, geordnet nach absteigendem Molekulargewicht. Letzteres gilt jedoch nur für annähernd globuläre Proteine. Die molekulare Masse des größten Moleküls, das gerade nicht mehr in die Poren eines Gels eindringen kann, gilt als Ausschlussvolumen und ist eine wichtige Kenngrö-

Ausmaß des Einbaus wird über die Ermittlung der Strahlungsaktivität im Proteinsubstrat mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt.

Um eine maximale Enzymaktivität zu gewährleisten, ist es erforderlich, das Enzym bei -80°C zu lagern und aliquotierte Mengen zu verwenden, um mehrmaliges Auftauen und Einfrieren der Kinase zu vermeiden. Die einzelnen Reaktionsbestandteile werden, abzüglich des ATP-Gemisches, zunächst auf Eis vorpipettiert (30 μl Ansatz). Die Kinase-reaktion wird durch Zugabe von 5 μl eines ATP / $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Gemisches gestartet und bei 30°C in der Regel für 30 min inkubiert. Als Positivkontrolle wird stets das exogene Substrat Casein eingesetzt. Durch Zugabe von 5 μl 1,5 M H_3PO_4 (entspricht einer Endkonzentration 167 mM) oder von 8 μl 5x SDS-Probenpuffer wird die Reaktion gestoppt. Beim Arbeiten mit mehreren Proben ist auf die exakte Einhaltung der Reaktionsintervalle zu achten, so dass die Inkubationszeiten für jede einzelne Probe genau eingehalten werden. Die Reaktionen werden deshalb zeitversetzt im Abstand von 20 s gestartet bzw. abgestoppt. Die Anzahl eingebauter radioaktiver Phosphate kann mit einem Szintillationszähler bestimmt werden, der die Anzahl der Zerfälle pro Minute misst. Dafür werden zunächst 25 μl der Reaktionslösung auf runde, ausgestanzte P-81 Phosphocelluloseplättchen (Durchmesser 1,8 cm) pipettiert und 30 min an der Luft getrocknet. Dabei bindet das potentielle Substrat an die Phosphocellulosematrix. Durch dreimaliges Waschen in 150 mM H_3PO_4 für 10 min wird nicht eingebautes $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ entfernt. Nach erneutem Trocknen unter Infrarot-Bestrahlung (30 min) werden die Phosphocelluloseplättchen in 10 ml Szintillationsgefäße überführt, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit überschichtet und die Anzahl der Zerfälle pro Minute („counts per minute“, cpm) in einem Szintillationszähler bestimmt. Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität dient 1 μl des ATP-Startgemisches, dessen Aktivität parallel bestimmt wird.

Reaktionsbedingungen:

	Reaktion	Negativkontrolle
Kinasereaktions-Puffer (KAP)	1x KAP (+)	1x KAP (-)
Substrat	3 ng - 20 μg	3 ng - 20 μg
CaCl_2	1 mM	---
DTT	1 mM	1 mM
PfCDPK1	50 ng	50 ng
ATP	87,5 μM	87,5 μM
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	1 - 2 μCi	1 - 2 μCi
Reaktionsvolumen	35 μl	35 μl

Puffer:	KAP (+) 1x	20 mM Tris/HCl 20 mM 10 mM MgCl_2
	KAP (-) 1x	20 mM Tris/HCl 20 mM 10 mM MgCl_2 100 μM EGTA

2.8.1 Kinasereaktionen zur Ermittlung von Inhibitorwirkungen auf PfCDPK1

Um die Wirkung potentieller Inhibitoren auf PfCDPK1 *in vivo* testen zu können, wird deren optimale Inhibitorkonzentration auf PfCDPK1 zunächst *in vitro* bestimmt. Hierzu werden der Reaktion (2.8) die inhibierenden Substanzen in einer vorgegebenen Konzentration, meist von 10 μM , zugefügt und die Ergebnisse mit den Werten einer Positivkontrolle ohne Inhibitor verglichen. Um die Bedingungen möglichst konstant zu halten, wird die Vorinkubationszeit, also die Zeit während der das Enzym und der Inhibitor zwar schon in Kontakt sind, aber noch kein ATP für die Reaktion zur Verfügung steht, konstant bei 10 min gehalten. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit vieler Inhibitoren werden diese standardmäßig in DMSO gelöst. Um die negative Auswirkungen von DMSO auf die Kinaseaktivität zu minimieren, wird die maximale DMSO-Konzentration in der Reaktion auf 0,5% begrenzt. Bei der Positivkontrolle werden der Reaktion entsprechende DMSO-Mengen zugesetzt. Zur Berechnung der prozentualen Inhibition werden die Ergebnisse der Szintillationszählung der Reaktionen (cpml) und der Positivkontrolle (cpmK^+) unter Abzug der Negativkontrolle (cpmK^-) zueinander ins Verhältnis gesetzt:

$$\% \text{Inhibition} = [1 - (\text{cpml} - \text{cpmK}^-) / (\text{cpmK}^+ - \text{cpmK}^-)] \times 100$$

2.8.2 Bestimmung der IC_{50} eines Inhibitors

Die IC_{50} ist definiert als jene Konzentration eines Inhibitors, welche zu einer halbmaximalen Hemmung der Enzymaktivität führt. Hierzu werden Kinasereaktionen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen eines Inhibitors durchgeführt. In der Regel erfolgt dies in doppelter oder dreifacher Replikation. Zur Vereinfachung der Auswertung wird der Inhibitor in Zehnerpotenzschritten verdünnt (100 μM , 10 μM , 1 μM , 100 nM, 10 nM, 1 nM). Zur Bestimmung der IC_{50} wird die Inhibitorkonzentration in halblogarithmischem Maßstab gegen die ermittelte Aktivität aufgetragen und der IC_{50} -Wert aus der Kurve abgelesen oder mittels dem Programm Sigmaplot bestimmt.

2.9 Affinitätsreinigung von Antikörpern

2.9.1 Kopplung eines Antigens an Sepharose

Für den Erfolg einer Affinitätsreinigung ist die Reinheit des eingesetzten Proteins (Antigen) sehr wichtig, da diese entscheidend für die Qualität des später aufzureinigenden Antikörpers ist. Zunächst werden 15 mg Protein gegen Bindungspuffer (100 mM NaCl, 50 mM Na_2CO_3 , 50 mM

NaHCO₃) dialysiert. Etwa 10 mg Protein werden danach zurückgewonnen und für die Kopplung eingesetzt. Dazu wird 1 g Epoxyaktivierte Sepharose 6LB in 50 ml Wasser für 5 min gequollen, anschließend zentrifugiert (4000x g, 3 min, RT) und fünfmal mit 50 ml Wasser gewaschen. Das Protein wird in 4 ml Bindungspuffer zu der voräquilibrierten Sepharose gegeben und 16 h bei 37°C auf einem Drehrad inkubiert. Um überschüssige Epoxy-Gruppen zu inaktivieren wird die pelletierte Sepharose einmal mit 15 ml 1 M Ethanolamin pH 8 gewaschen und schließlich mit 2 ml 1 M Ethanolamin pH 8 für 4 h bei 45°C auf dem Drehrad blockiert. Anschließend wird die Sepharose-Matrix in eine Poly-Prep Chromatographie Säule 0,8 x 4 cm überführt und sequentiell gewaschen:

- 50 ml PBS
- 15 ml Waschpuffer I (500 mM NaCl, 100 mM NaHCO₃)
- 50 ml PBS
- 15 ml Waschpuffer II (500 mM NaCl, 100 mM NaAc pH 4)
- 50 ml PBS
- 15 ml Elutionspuffer A (100mM Glycin pH 2,8)
- 50 ml PBS
- 15 ml Elutionspuffer B (100 mM Triethylamin)
- 50 ml PBS

Die so gewaschene und neutralisierte Affinitätsmatrix kann in PBS mit 0,1% Natriumazid bei 4°C für mehrere Jahre aufbewahrt werden.

2.9.2 Aufreinigung von Antikörpern aus Rohserum

Die wie oben beschrieben hergestellte Affinitätsmatrix wird mit 2 ml Serum, welches die zu isolierenden Antikörper enthält, versetzt und für 16 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Danach wird die Sepharose-Matrix mit 50 ml PBS gewaschen. Anschließend wird mit je 750 µl Elutionspuffer A (100 mM Glycin pH 2,8) bzw. Elutionspuffer B (100 mM Triethylamin) in acht Fraktionen eluiert. Das Eluat tropft dabei direkt in 1,5 ml Reaktionsgefäße, die bereits 75 µl 3 M Tris/HCl pH 8,8 enthalten, wodurch der pH augenblicklich neutralisiert wird. Von jeder Fraktion werden 5 µl für eine Proteinbestimmung nach Bradford (2.6.1) verwendet. Fraktionen, die eine OD₅₉₆ von über 0,05 ergeben, werden vereinigt und durch Western-Blotting (2.6.6) getestet. Erfahrungsgemäß ist die Qualität der Antikörper aus der sauren Elution mit dem Elutionspuffer A sehr viel besser, weshalb die Fraktionen beider Elutionsdurchgänge nicht gemischt werden sollten.

2.10 Mikroskopie

Ein Mikroskop ist grundsätzlich mit zwei verschiedenen Linsensystemen ausgestattet, Objektiven und einem Okular. Je nach Qualität des verwendeten Geräts kommen sehr einfache bis hin zu extrem teuren Objektiven zum Einsatz. Letztere werden durch aufwändige Verfahren Oberflächenveredelt. Sie sind mit einer Farbkorrektur ausgestattet, die es erlaubt auch Objekte, die im Randbereich beobachtet werden, ohne die sonst übliche Farbverzerrung zu betrachten. Die Gesamtvergrößerung eines beobachteten Objekts ergibt sich aus der Vergrößerung beider Linsensysteme. Das Auflösungsvermögen wird maßgeblich durch die Wellenlänge des verwendeten Lichts begrenzt und gibt den Abstand zweier Punkte an, die gerade noch als getrennt wahrgenommen werden können. Es liegen folgende physikalische Zusammenhänge zugrunde:

$$A = 2 n \sin \alpha \quad d = \lambda / A$$

A wird als numerische Apertur bezeichnet, n ist der Brechungsindex des Mediums zwischen Objekt und Objektiv. Für Luft gilt $n = 1$, wohingegen für Glas und Immersionsöl der Wert bei 1,5 liegt. α gibt den halben Öffnungswinkel des Objektivs an, λ die Wellenlänge des verwendeten Lichts, d ist der Abstand.

2.10.1 Lichtmikroskopie

Bei der Lichtmikroskopie passiert Licht das beobachtete Objekt und wird je nach dessen Dicke und Konsistenz mehr oder weniger stark absorbiert, wodurch Strukturen erkennbar werden. Sind die zu beobachtenden Objekte jedoch von sehr feiner Beschaffenheit, so werden sie meist zur besseren Darstellung angefärbt.

2.10.2 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie

Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, bei der das gesamte Objektfeld gleichmäßig beleuchtet wird, wird bei der konfokalen Mikroskopie nur ein kleiner Teil der Probe mit dem Licht eines fokussierten Laserstrahls, der sich über die Probe bewegt, angeregt. Signale der einzelnen Punkte werden von einer Videokamera registriert und als Bild zusammengesetzt. Das Streulicht aus benachbarten und nicht in der Fokusebene liegenden Bereichen wird so unterdrückt. Durch eine Linse wird das Laserlicht in die Beleuchtungsblende gelenkt. Danach wird es über einen dichromatischen Spiegel (Hauptfarbteiler) und über weitere bewegliche Spiegel (Scanoptik) durch das Objektiv auf die Probe fokussiert. Dort trifft es auf Fluorochrome, die angeregt werden und Licht emittieren. Das abgestrahlte Fluoreszenzlicht größerer Wellenlänge wird durch die Objektivlinse wieder gebündelt, passiert den dichromatischen Spiegel und kann durch nachgeschaltete Filter in verschiedene Wellenlängen unterteilt werden. Durch eine kleine regulierbare Lochblende

(Pinhole) fällt das emittierte Licht auf einen Lichtdetektor (Photomultiplier), der das Lichtsignal in ein analoges elektrisches Signal umwandelt. Durch die Lochblende wird Licht, das außerhalb der Fokusebene emittiert wird, abgeschirmt. Betrachtet wird immer nur ein Punkt. Durch die Kombination aller beobachteten Punkte wird schließlich das vollständige Bild der Probe zusammengesetzt.

2.10.3 Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

Der „Fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) ist ein 1946 von Theodor Förster entdeckter physikalischer Prozess, bei dem Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor-Fluorophor) strahlungsfrei auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor-Fluorophor) übertragen werden kann. FRET kann zwischen zwei Farbstoffen, die zur Fluoreszenz befähigt sind, beobachtet werden. Dabei wird die Energie eines angeregten Donor-Fluorophors nicht in Form von Fluoreszenz abgegeben, sondern strahlungslos über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf einen fluoreszierenden Akzeptor übertragen (Abb. 2.1). FRET kann somit über eine Abnahme der Donor-Fluoreszenz oder eine Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz detektiert werden. Um eine strahlungsfreie Energieübertragung auf das Akzeptor-Molekül mittels FRET zu ermöglichen, müssen verschiedene Kriterien erfüllt sein:

- Emissionsspektrum des Donors und Absorptionsspektrum des Akzeptors müssen überlappen.
- Donor und Akzeptor müssen parallele elektronische Schwingungsebenen haben.
- Donor und Akzeptor sollten nur wenige Nanometer von einander entfernt sein, da die Intensität des FRET-Signals mit der 6. Potenz des Abstands beider Fluorophore abnimmt.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen FRET-Analysen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Petra Rohrbach (Hygieneinstitut, Abt. Parasitologie, Universitätsklinik Heidelberg) durchgeführt.

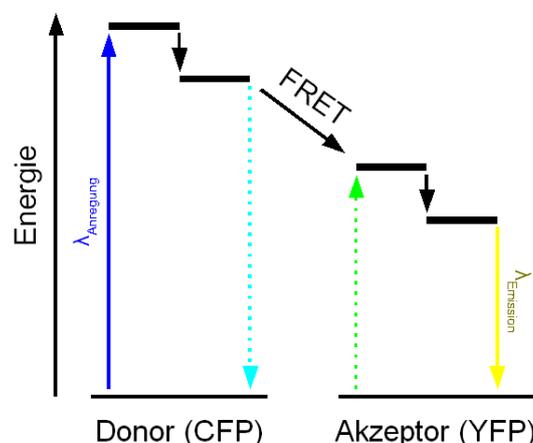


Abb. 2.1: Energiediagramm des FRET am Beispiel des Fluorophorenpaars CFP/YFP. Der Donor CFP wird durch Licht der Wellenlänge 436 nm (blau) angeregt. Der größte Teil seiner Energie wird jedoch nicht für die Emission von 480 nm (cyanblau) verwendet, sondern wird strahlungsfrei durch FRET auf den Akzeptor YFP übertragen. Als Folge wird hauptsächlich gelbes Licht (535 nm) emittiert.

2.10.4 Poly-L-Lysinbeschichtung von Objektträgern

Um zu verhindern, dass Erythrozyten sich auf dem Objektträger bewegen und aus dem Sichtfeld diffundieren, werden die Objektträger mit Poly-L-Lysin beschichtet. Hierfür werden die entsprechenden Objektträger zunächst mit Ethanol gesäubert und anschließend mit H₂O gewaschen. Die sauberen Objektträger werden für mindestens 20 Minuten in einer 0,01% Poly-L-Lysin Lösung inkubiert und anschließend wieder mit H₂O gewaschen. Danach werden die Objektträger über Nacht bei RT in einer Petrischale getrocknet.

2.11 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren zum Messen des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/q) von Teilchen. Bei bekannter Ladung q kann daraus die Masse m der Teilchen ermittelt werden. Außerdem können Aussagen über das Vorhandensein und die Menge von Teilchen mit bekanntem Masse-zu-Ladung-Verhältnisses gemacht werden. Alle in diesem Rahmen durchgeführten Messungen erfolgten in Kooperation mit Prof. Dr. W. Lehmann und Dominic Winter, Abteilung für Spektroskopie, DKFZ Heidelberg, und dienten der Identifikation von Phosphorylierungsstellen in Proteinen.

2.11.1 Massenspektrometrische Messung

Proteinbanden werden aus einem PAA-Gel ausgeschnitten und entsprechend dem Protokoll von Kinter et al. 2000 weiterverarbeitet. Alle Messungen werden mit einem Q-TOF 2 Massenpektrometer (Micromass, UK) durchgeführt. Die verwendeten NanoESI-Nadeln werden selbst von der AG Lehmann im DKFZ hergestellt.

2.11.2 Automatisierte Proteinidentifizierung und Quantifizierung

Für alle Datenbanksuchen wird eine lokale Version von MASCOT 2.2.1 verwendet. Als Datenbank wird entweder MSDB („Mass Spectrometry protein sequence DataBase“, <http://cscfserve.hh.med.ic.ac.uk/msdb.html>) oder eine selbst programmierte "Ein-Protein-Datenbanken" verwendet welche nur die Sequenz eines bestimmten Proteins enthält. Für typische nanoESI-MS/MS und LC-MS/MS Analysen werden folgende Parameter verwendet: Molekültoleranz: 1 D; Fragmentionentoleranz: 0,5 D; Enzym: AspN, Chymotrypsin, Trypsin oder keines; maximale Anzahl der nicht gespaltene Stellen pro Peptid: 3; variable Modifikationen: Carbamidomethylcystein

und Methioninoxidation. Instrument: "ESI-QUAD-TOF". Bei der Suche nach Phosphorylierungsstellen werden zusätzlich noch die variablen Modifikationen Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin zugelassen.

2.12 Zellkultur

2.12.1 Aufarbeiten von humanem Serum

Für die vorliegende Arbeit wurde ausschließlich humanes Serum der Blutgruppe A verwendet. Das humane Serum wird aus Blutspenden der Blutbank Heidelberg gewonnen. Um mögliche Qualitätsunterschiede der Seren auszugleichen, wird das Serum verschiedener Spender unter sterilen Bedingungen gemischt und anschließend in 50 ml Plastikröhrchen aliquotiert.

Zu 50 ml Serum werden noch 800 µl 1 M CaCl₂ (sterilfiltriert) gegeben. Dieses wird anschließend zunächst für 30 min bei 37°C und dann bei 4°C über Nacht inkubiert. Das über Nacht geronnene Fibrin wird durch Abklopfen an einer Tischkante von den Gefäßwänden wieder gelöst. Anschließend wird für 30 min bei 3362x g zentrifugiert und für 30 min bei 56°C inaktiviert. Das Serum wird bei -20° C gelagert und kann so auch nach mehreren Monaten noch benutzt werden.

2.12.2 Aufarbeitung von humanen Erythrozyten

Für die vorliegende Arbeit wird ausschließlich Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe A, Rh⁺ verwendet. Die Erythrozyten stammen aus der Blutbank Heidelberg und werden wöchentlich neu aufgearbeitet. Das Blut wird in 50 ml Plastikröhrchen unter sterilen Bedingungen aliquotiert und mit 10 ml RPMI 1640 überschichtet. Anschließend wird bei 1111x g für 4 min zentrifugiert. Die Lagerung erfolgt bei 4° C.

2.12.3 Kultivierung von *Plasmodium falciparum*

Die erythrozytären Parasitenstadien von *Plasmodium falciparum* können unter geeigneten Bedingungen kontinuierlich in Petrischalen gehalten werden¹⁹⁷. In der Regel werden Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm für die Gewebekultur verwendet. Bei der Kultivierung größerer Mengen Parasiten ist auch der Einsatz von Petrischalen mit 25 cm Durchmesser oder von Flaschen möglich. Pro 10 cm Schale werden 10 ml Parasitenmedium (10 ml RPMI 1640, 10% humanes Serum, 0,1 mM Hypoxanthin, 20 µg/ml Gentamycin) und 0,5 ml Erythrozyten eingesetzt.

Der daraus resultierende Hämatokrit liegt bei 5%. Die Aufzucht der Kulturen erfolgt bei 37° C, 3% CO₂ und 5% O₂.

Spätestens jeden zweiten Tag wird die Parasitämie (0) der Kultur anhand eines Giemsa-Ausstriches (2.12.4) bewertet und das Medium gewechselt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das überstehende Medium in der Petrischale nur über sedimentierten Erythrozyten abgenommen wird. Dies ist wichtig um Verluste infizierter Zellen zu vermeiden und den Hämatokrit konstant bei 5% zu halten. Die Parasitämie der Kulturen sollte unter normalen Bedingungen 5 bis 10% nicht überschreiten. Sonst kann es zur Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte kommen, die das kontinuierliche Wachstum der Parasiten hemmt oder gar deren Absterben zur Folge haben kann. Zur Verdünnung und weiteren Erhaltung der Kultur beimpft man eine neue Petrischale mit frischem Medium, Blut und der gewünschten Anzahl infizierter Erythrozyten der Ausgangskultur. Durch eine Verringerung des Hämatokrits und häufiges Wechseln des Mediums (mehrmals täglich) können kurzfristig auch Parasitämien von über 20% erreicht werden.

Parasitenmedium:	500 ml RPMI 1640
	10% humanes Serum
	0,1 mM Hypoxanthin
	20 µg/ml Gentamycin

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

Zur Unterscheidung der einzelnen Parasitenstadien und zur Bestimmung der Parasitämie (0) werden Blutausstriche angefertigt, die anschließend mit Giemsa gefärbt werden. Sedimentierte Erythrozyten werden mit einer Pipette vom Boden der Petrischale abgeschabt, auf einen Objektträger übertragen und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Der Ausstrich wird luftgetrocknet, ca. 30 s in 99% Methanol fixiert und nochmals luftgetrocknet. Anschließend werden die Objektträger für 10 bis 20 min in einer frisch bereiteten Giemsa-Lösung (1:10 in VE-Wasser) gefärbt und dann unter fließendem VE-Wasser abgespült, getrocknet und mit 100-facher Vergrößerung (Ölimmersion) mikroskopiert. Nach der Giemsa-Färbung sind die Parasiten blauviolett, deren Zellkerne blau-schwarz und die Erythrozyten rosa im Lichtmikroskop zu sehen.

2.12.4.1 Vorbereitung der Parasiten für die Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie

Es wird ca. 1 ml der zu untersuchenden Parasitenlösung in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben und in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C aufbewahrt. Für die Vorbereitung der Mikroskopiekammer, wird diese am Untergrund so mit Fett bestrichen, dass ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Deckplättchen dort haften bleibt. Nachdem das Deckplättchen aufgesetzt ist, wer-

den 500 µl 37°C warme Ringerlösung, sowie 1 bis 3 µl der Parasitenlösung in die Kammer gegeben. Nach ca. 5 min haben sich die Parasiten am Boden der Kammer auf dem Deckplättchen abgesetzt und die mikroskopische Untersuchung kann beginnen.

2.12.5 Kernfärbung mit Hoechst 33342

Hoechst 33342 ist ein Farbstoff, der an die kleine Furche der DNA bindet. Dort fluoresziert er nach Anregung mit UV-Licht im Bereich des hellblauen Spektrums. Der Farbstoff bindet bevorzugt an AT Regionen in Nukleinsäuren, was ihn für eine DNA-Färbung sehr spezifisch macht. Hoechstfarbstoffe sind wasserlöslich und zeichnen sich durch eine geringe Zytotoxizität aus.

Zu 1 ml mit PBS oder Ringer gewaschenen Erythrozyten wird Hoechst in einer Endkonzentration von 5 µM zugegeben. Die Zellen werden daraufhin 5 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert und können anschließend direkt mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Die Anregung erfolgt bei 364 nm mit dem Enterprise-UV-Laser.

2.12.6 Bestimmung der Parasitämie

Die Parasitämie gibt die prozentuale Anzahl infizierter Erythrozyten an. Zur Bestimmung der Parasitämie wird ein Giemsa-Ausstrich (2.12.4) angefertigt und ein Bereich des Objektträgers mit einer einlagigen Schicht Erythrozyten ausgewählt. In zehn nebeneinander liegenden Sichtfeldern wird die Anzahl der Erythrozyten und der Parasiten gezählt, wobei Mehrfachinfektionen einfach zu zählen sind. Die Parasitämie berechnet sich wie folgt:

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

2.12.7 Einfrieren von *P. falciparum*

Zum Einfrieren der Parasiten wird eine Parasitämie von 3 bis 5% an Ringstadien benötigt, da nur diese Parasitenformen den Einfrier-/Auftau-Prozess überleben. Die infizierten Erythrozyten einer 10 cm Petrischale werden für 2 min bei 758x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Volumen der sedimentierten Erythrozyten wird im gleichen Volumen steriler Einfrierlösung vorsichtig resuspendiert, und in ein 1,5 ml Cryoröhrchen überführt. Die Parasitenlösung wird dann sofort in einem Gemisch aus Ethanol 99% und Trockeneis schockgefroren. Anschließend erfolgt die Lagerung bei -80°C für mehrere Monate oder langfristig in flüssigem Stickstoff (-196°C).

Einfrierlösung:	28% Glycerol
	3% Sorbitol
	0,65% NaCl
	<i>sterilfiltrieren</i>

2.12.8 Auftauen von *P. falciparum*

Ein Cryoröhrchen mit den entsprechenden Parasiten wird aus dem flüssigen Stickstoff (bzw. -80°C Schrank) genommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Zu 1 ml Parasitenkultur werden 0,2 ml Auftau-Lösung 1 gegeben und in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt. Unter ständigem, leichten Schütteln werden 9 Volumen Auftau-Lösung 2 stetig dazu getropft. Anschließend erfolgt eine Inkubation bei RT für 5 Minuten. Danach wird erneut unter Schütteln das 7fache Volumen an Auftau-Lösung 3 dazugegeben. Die Suspension wird für 2 min und 758x g bei RT abzentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und das Sediment in 10 ml vorgewärmten Parasitenmedium aufgenommen. Die Parasiten werden dann in eine 10 cm Petrischale mit 0,5 ml Blut überführt und für 2 Tage im Inkubator stehen gelassen. Ab Tag 2 werden Ausstriche zur Beurteilung der Parasitämie angefertigt und das Medium im oben genannten Turnus gewechselt (2.12.3). Bei Transfektanten erfolgt die Selektion mit WR99210 bzw. Blastocidin S ebenfalls erst ab dem 2. Tag. Alle benötigten Lösungen werden sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch werden sie auf 37° C vorgewärmt.

Lösung 1	12% NaCl
Lösung 2	1,6% NaCl
Lösung 3	0,9% NaCl 0,2% Glukose <i>sterilfiltriert</i>

2.12.9 Saponinlyse infizierter Erythrozyten

Die Saponinlyse stellt ein Verfahren dar, Plasmodien aus infizierten Erythrozyten zu isolieren. Auf Grund des hohen Cholesterin-Gehalts perforiert das schwache Detergenz Saponin die Erythrozytenmembran, jedoch nicht die Membran des Parasiten. Infizierte und nicht-infizierte Erythrozyten einer 10 cm Kulturschale werden zentrifugiert (Heraeus Megafuge, 1500 rpm, 8 min, RT). Das Pellet wird in 12,5 ml Lysepuffer (0,02% Saponin/SSC) resuspendiert und für 20 min unter regelmäßigem Schütteln auf Eis lysiert. Die Lyse der Erythrozyten ist am Aufklaren der Lösung er-

kennbar. Anschließend wird erneut zentrifugiert (Heraeus Megafuge, 2800 rpm, 8 min, RT), der Überstand abgenommen und das schwarze Parasitenpellet mehrmals mit 1 ml SSC gewaschen bis der Überstand klar ist. Sollen Proteinlysate hergestellt werden, wird das Pellet in RIPA-Puffer resuspendiert, die Parasitenlösung für 30 min auf Eis lysiert und anschließend in einem entsprechenden Volumen 4x SDS-Probenpuffer (für MS-Analysen 5x LDS-Probenpuffer) aufgenommen.

2.12.10 Synchronisation von *P. falciparum*-Kulturen mit Sorbitol

Die kontinuierliche Kultivierung von *P. falciparum* führt zu einem asynchronen Wachstum der Parasiten. Für einige Versuche ist es deshalb notwendig, die Parasiten zu synchronisieren. Sorbitol kann in das tubulovesikuläre System reifer Parasiten eindringen, während dies bei jüngeren Stadien (Ringe) noch nicht möglich ist¹⁹⁸. Eine asynchrone Kultur wird abzentrifugiert (758x g, 2 min, RT) und das Medium abgenommen. Das Erythrozyten-Pellet wird in 9 Volumen 5% D-Sorbitol-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37°C im Wasserbad wird die Kultur bei 758x g für 2 min abzentrifugiert, das Pellet in vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert und in eine frische Petrischale überführt. Dabei platzen alle späten Parasitenstadien aufgrund des osmotischen Schocks, der beim Mediumwechsel von Sorbitol zu RPMI 1640 stattfindet. Um den Parasitenverlust durch die Sorbitolbehandlung gering zu halten ist es daher von Vorteil, Kulturen mit einem hohen Anteil an Ringstadien zu verwenden. Um Parasiten vollständig zu synchronisieren (beispielsweise für stadienspezifische Proteinlysate), muss die Synchronisation mehrmals in bestimmten Zeitabständen wiederholt werden, da auf diese Weise die Ringstadien, die eine Zeitspanne von 0 bis 18 h nach der Infektion umfassen, weiter eingegrenzt werden.

2.12.10.1 Isolation spezifischer Stadien aus *P. falciparum*

Um die verschiedenen Stadien von *P. falciparum* zu isolieren ist eine Synchronität der Kultur von +/-2 h erforderlich. Bei der Isolation ist darauf zu achten, dass sich die Dauer eines Vermehrungszyklusses von Blutstadien unterscheiden kann. Parasitenstamm sowie Position und Füllungsgrad des Inkubators können dafür eine Rolle spielen. Hier wird von einem 48 h Zyklus ausgegangen.

Beim Start des Versuchs sollte die Parasitämie 10 bis 20% betragen. Um eine hohe Synchronität zu gewährleisten muss die Kultur an 3 festgelegten Zeitpunkten mit 5% D-Sorbitol synchronisiert werden (2.12.10). Die Zeitpunkte sind Tag 1 15.00 Uhr, Tag 3 1.00 Uhr und Tag 4 18.00 Uhr (+/- 1,5 h). 48 h nach der letzten Sorbitolisierung wird der Zeitpunkt t = 0 festgelegt. Zwischenzeitlich wird mittels Giemsa-Ausstrich (2.12.4) die Parasitämie kontrolliert und das Medium entsprechend gewechselt.

Die unterschiedlichen Stadien werden wie folgt isoliert:

T = 12 h Isolation von Ringen (50% des gesamten Ansatzes, mind. fünf 10 cm Petrischalen)

T = 25 h Isolation von Trophozoiten (30% des Ansatzes, mind. 3 Petrischalen)

T = 35 h Isolation von Schizonten (10% des Ansatzes, mind. 2 Petrischalen)

T = 42 h Isolation von Segmenter (10% des Ansatzes, mind. 2 Petrischalen)

Die Isolation von Merozoiten wird unten beschrieben (2.12.10.2).

Der Zellaufschluß erfolgt mittels Saponinlyse (2.12.9). Aus einer 10 cm Petrischale mit einer Parasitämie von 10% können ab dem Trophozitenstadium ca. 100 µg Protein isoliert werden.

2.12.10.2 Isolation von Merozoiten

Die Isolation von Merozoiten sollte aus mind. acht 10 cm Petrischalen mit einer Parasitämie $\geq 10\%$ erfolgen. Um die Synchronität der Kultur zu gewährleisten, wird diese dreimal mit Sorbitol behandelt (2.12.10); an Tag 1 um 9.00 Uhr und 19.00 Uhr, an Tag 3 7.30 Uhr. 30 Stunden nach der dritten Synchronisation wird damit begonnen, die Kultur alle 30 Minuten mittels Giemsa-Ausstrich zu beobachten, um den Zeitpunkt der ersten Merozoitenbildungen nicht zu verpassen. Damit die Merozoitenisolation stattfinden kann, muss die Kultur drei Stunden nach der dritten Synchronisation mit sterilem Trypsin behandelt werden, um die Oberflächenproteine auf den Erythrozyten zu entfernen und so eine Invasion der Merozoiten zu verhindern. Dafür wird die Kultur abzentrifugiert (758x g für 2 min) und das Sediment mit sterilem Verdaupuffer gewaschen. Anschließend werden die Kulturen in Trypsin-haltigem Verdaupuffer (1 mg/ml) so aufgenommen, dass der Hämatokrit der Suspension auf 10% eingestellt wird. Danach wird für 60 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Kultur wird erneut abzentrifugiert (758x g für 2 min) und zweimal mit RPMI 1640 gewaschen. Danach werden die Parasiten wieder in Parasitenmedium aufgenommen, auf Kulturplatten überführt und mit einem Hämatokrit von 5% zurück in den Inkubator gestellt (2.12.3).

Ist am darauffolgenden Tag der Zeitpunkt der Merozoitenbildung erreicht, wird die Kultur abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min), der merozoitenhaltige Überstand abgenommen (ca. 2 ml werden zurückgelassen), das Erythrozytensediment mit frischem Medium versehen und auf Kulturplatten zurück in den Inkubator gestellt. Der Überstand wird in ein frisches 15 ml Röhrchen gegeben und bei 4000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Merozoitenpellet einmal mit RPMI 1640 gewaschen. Daraufhin wird das Pellet von vier 10 cm Petrischalen in 20 µl RIPA-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis gestellt. Falls nötig kann nun eine Bestimmung der Proteinmenge durchgeführt werden (2.6.1). Nach der Lyse erfolgt die Zugabe einer entsprechenden Menge 5x LDS-Probenpuffer, die Lagerung erfolgt bei -20°C. Um eine ausreichende Menge Merozoiten zu erhalten, erfolgt der Isolationsvorgang einer vorbereiteten Kultur 10 x hintereinander im Stundentakt.

Verdaupuffer:	10 mM Tris/HCl pH 7,6
	150 mM NaCl
	10 mM Glukose
	1 mM CaCl ₂
	(Trypsin 1mg/ml)
	<i>sterilfiltriert</i>

2.12.11 Isolation von genomischer DNA aus *Plasmodium falciparum*

Die Isolation genomischer DNA erfolgt aus späten Parasitenstadien, vornehmlich Schizonten. Die Parasitämie sollte bei 5-10% liegen. Zunächst werden die Parasiten durch Saponinlyse aus infizierten Erythrozyten isoliert (2.12.9), das daraus resultierende Pellet mehrmals mit PBS gewaschen und schließlich in 200 µl PBS resuspendiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgen mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kit von QIAGEN. Die Isolation der genomischen DNA erfolgt genau nach den Angaben des Herstellers. Eluiert wird, je nach eingesetzter Parasitenmenge mit 50 bis 200 µl TE-Puffer.

2.12.12 Isolation von messenger RNA (mRNA) aus *P. falciparum*

Viele Gene des Plasmodien-Genoms enthalten nichtkodierende Bereiche, sogenannte Introns. Bei der Genexpression in lebenden Zellen wird zunächst ein Primärtranskript in der vollen Länge des Gens hergestellt, aus welchem von der Splicing-Maschinerie die nicht kodierenden Bereiche entfernt werden. Die so entstandene reife mRNA dient als Matrize für PCR-Fragmente ausgesuchter Gene, die für die *de novo* Synthese entsprechender Proteine genutzt werden sollen.

Ein großes Problem bei der RNA-Isolation stellen RNasen dar. Sie gehören zu den stabilsten bekannten Enzymen. Selbst Autoklavieren zerstört sie nicht, da sie sich nach dem Abkühlen in ihre native Form zurückfalten. Bei allen Arbeiten mit RNA ist daher auf absolute Sauberkeit zu achten. Es werden für alle Pipettierschritte RNase-freie, gestopfte Spitzen verwendet.

In dieser Arbeit wurde für die Präparation von mRNA das Micro FastTrack 2.0 Kit (Invitrogen) verwendet. Die Isolation erfolgt aus den infizierten Erythrozyten zweier 10 cm Petrischalen mit einer Parasitämie von 5 bis 10%. Wichtig ist hierbei, dass für die Isolation vornehmlich Trophozoiten und Schizonten verwendet werden, da diese sich durch ein erhöhtes Vorkommen an RNA auszeichnen.

Für die Isolation wird zunächst einer Saponinlyse (2.12.9) durchgeführt, um die in den Erythrozyten enthaltenen Parasiten zu isolieren. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgen mit dem oben erwähnten Kit und richten sich genau nach den Angaben des Herstellers (Micro FastTrack 2.0 Kit Invitrogen).

2.12.13 Genetische Veränderung von *P. falciparum*

2.12.13.1 Vorbereitung der Zellkultur

Zwei Tage vor der Transfektion werden die Parasiten mit 5% D-Sorbitol synchronisiert (2.12.10) und so verdünnt, dass am Tag der Transfektion die Parasitämie 1 bis 2% beträgt. Es sollten frische Erythrozyten verwendet werden, da diese über den gesamten Zeitraum des Selektionsvorganges das Parasitenwachstum sicherstellen müssen. Pro Transfektionsansatz wird ein Erythrozytenvolumen von 200 µl benötigt.

2.12.13.2 Vorbereitung des Transfektionsvektors

Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA (2.5.5) wird photometrisch bestimmt und die Reinheit auf einem Agarosegel überprüft. Pro Transfektion werden 150 µg DNA eingesetzt. Wird statt einer einfachen, eine Doppeltransfektion durchgeführt, so werden jeweils 75 µg der entsprechenden DNA verwendet. In diesem Fall werden beide Plasmide in einem Reaktionsgefäß vereinigt und daraufhin wie die DNA bei einer einzelnen Transfektion behandelt. Die DNA wird mit 2 Volumen absolutem Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,4) für mind. 2 h (meist ü. N.) gefällt und bei 4°C, 11.000x *g* pelletiert und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird in 30 µl steilem TE-Puffer vollständig gelöst und direkt vor der Transfektion unter sterilen Bedingungen mit 370 µl Zytomix vermischt.

Zytomix:

- 120 mM KCl
- 0,15 mM CaCl₂
- 2 mM EGTA
- 5 mM MgCl₂
- 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,6
- 25 mM HEPES pH 7,6
- sterilfiltriert*

2.12.13.3 Transfektion von *P. falciparum*

Da die stabile Transfektion von *P. falciparum* ein sehr zeitaufwendiges Verfahren darstellt (Dauer ca. 6 bis 48 Monate), waren alle in dieser Arbeit vorgenommenen Transfektionen transient. Dabei wird mittels Elektroporation Plasmid-DNA in die Parasiten eingebracht. Das Plasmid enthält das zu überexprimierende Gen unter der Kontrolle eines starken Promotors sowie einen Selektionsmarker. Alle in dieser Arbeit verwendeten Gene stehen unter der Kontrolle des PfCRT-Promotors, der vor allem in frühen Parasitenstadien aktiv ist.

Für die Transfektion werden 200 µl Erythrozytenpellet (Parasitämie 1 bis 2%) zu dem DNA-Zytomix-Gemisch (2.12.13.2) gegeben und direkt in eine Elektroporationsküvette (0,2 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgt bei 950 µF und 0,310 kV bei hoher Kapazität (BioRad, Gene Pulser® II). Bei diesem Vorgang sollte die Zeitkonstante zwischen 7 und 12 ms liegen. Nach der Elektroporation wird das Gemisch sofort in eine vorbereitete 6 cm Petrischale mit 13 ml Transfektionsmedium (5% humanes Serum, 5% Albumax II, 0,2 mM Hypoxanthin, 20 µg/ml Gentamycin) und 5% Hämatokrit überführt und in den Inkubator gestellt. Nach einem Tag Ruhe erfolgt ab Tag 2 nach der Transfektion der Selektionsvorgang. Bis Tag 10 erfolgt täglich ein Mediumwechsel und die Zugabe der Selektionsmarker WR99210 und/oder Blastocidin S in einer Endkonzentration von jeweils 5nM bzw. 3 µg/ml. Die Selektion und das damit verbundene Absterben der Parasiten wird alle 2 Tage mittels eines Giemsa-Ausstrichs (2.12.4) beobachtet. Ab Tag 10 erfolgt der Mediumwechsel und die Selektion alle 2 bis 3 Tage. Selektionierte Parasiten sollten spätestens nach 4 Wochen im Giemsa-Ausstrich erkannt werden.

Sollen Transfektanten, die ein Plasmid mit CFP oder YFP enthalten, unter dem Mikroskop angeschaut werden, so werden 24 h vor der Betrachtung die Konzentrationen der Selektionsmarker um den Faktor 5 erhöht (WR99210 = 25 nM, Blastocidin S = 15 µg/ml).

2.12.14 Zellfraktionierung von *P. falciparum*

Für die Herstellung von zellulären Fraktionen werden mind. acht Petrischalen Parasitenkultur (Parasitämie mind. 10%) mit einem Durchmesser von 10 cm benötigt. Zunächst wird eine Saponinlyse (2.12.9) durchgeführt. Der rote Überstand wird abgenommen und zentrifugiert (3000x g, 15 min, RT). Nun wird der neu entstandene Überstand in Corex-Röhrchen überführt und abermals zentrifugiert (19.000x g, 20 min, 4°C). Die überstehende Lösung ist das Erythrozytenzytosol. Zur Analyse durch SDS-PAGE wird eine adäquate Menge abgenommen und präzipitiert. Das weiße Pellet enthält die Erythrozytenmembranen. Falls unter dem weißen Pellet noch ein schwarzes Pellet vorhanden ist, wird solange gewaschen, bis kein schwarzer Punkt mehr zu sehen ist. Dann werden die Membranbestandteile durch leichtes Schwenken abgelöst, entnommen und in 2 ml Storing-Puffer (S-Puffer) resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei -80°C. Das Parasi-

ten-Pellet der Saponinlyse wird mit dem vierfachen Volumen S-Puffer (für 10 Petrischalen etwa 0,5 ml) versetzt und auf Eis für drei mal 5 min mit einem Eppendorf Kunststoffhomogenisator homogenisiert. Das Pellet, welches nach einer Zentrifugation (13.000x g, 15 min, 4°C) gewonnen wird, enthält die Membranen und Organellen der Parasiten und wird zweimal mit 1 ml S-Puffer gewaschen. Nach dem Resuspendieren in 0,5 ml S-Puffer kann es bei -80°C gelagert werden. Der Überstand wird bei 100.000x g für 1 h bei 4°C ultrazentrifugiert, um etwaige verbliebene Membran- und Organellverunreinigungen zu entfernen. Der nach diesem Zentrifugationsschritt erhaltene Überstand stellt das Parasitenzytosol dar (auch hier Lagerung bei -80°C).

S-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5
	2 mM Benzamidin
	1 mM PMSF
	1 mg/ml Leupeptin
	1 mg/ml Pepstatin A

2.12.15 [³H]Hypoxanthin Inkorporationsreaktion (IC₅₀-Bestimmung)

Ein Maß für das Wachstum einer Parasitenzelle ist ihre Replikations- sowie Transkriptionstätigkeit. In beiden Fällen werden Nukleotide benötigt, welche im Falle der Purinbasen bei Plasmodien ausschließlich über den sogenannten „salvage pathway“ gewonnen werden. Die Basen Adenin, Guanin sowie Hypoxanthin werden hier wiederverwertet und in die entsprechenden Mononukleotide umgewandelt, welche zur Synthese von DNA und RNA dienen. Folglich können anhand des Einbaus von [³H]Hypoxanthin in die parasitären Nukleinsäuren Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität des Parasiten gezogen werden. Mit Hilfe einer [³H]Hypoxanthin Inkorporationsreaktion kann so die hemmende Wirkung von Substanzen auf das Wachstum von *P. falciparum* quantifiziert werden.

Dazu werden synchronisierte Kulturen mit einer Ring-Parasitämie von 0,3 bis 0,5% in fast Hypoxanthin freiem RPMI-1640 Medium (Hypoxanthin-Medium, enthält 0,2 µM Hypoxanthin) in Gegenwart von seriellen Verdünnungen der Testsubstanzen inkubiert. Nach 48 h erfolgt die Zugabe von [³H]Hypoxanthin. Anhand der Inkorporationsrate des markierten Hypoxanthins in die parasitären Nukleinsäuren kann dann die Konzentration eines Inhibitors bei der die halbmaximale Hemmung des Parasitenwachstums erfolgt (IC₅₀), bestimmt werden. Wenn es die Löslichkeit der Substanzen erlaubt, werden sie als 10 mM DMSO-Stocklösungen angesetzt und bei -20°C gelagert.

Vor Beginn einer Reaktion werden die Substanzen 1:25 in Hypoxanthin-Medium verdünnt, so dass ihre Konzentration 400 µM beträgt. Die zwei Tage zuvor synchronisierte Kultur wird auf eine Ringparasitämie von 0,3 bis 0,5% und einen Hämatokrit von 2,5% eingestellt. Dabei wird das normale Kulturmedium möglichst vollständig gegen Hypoxanthin-Medium ausgetauscht.

Dann wird eine Mikrotiterplatte (96 Kammern) bestückt. Pro Kammer werden zunächst 100 µl Hypoxanthin-Medium vorgelegt, dann 100 µl der Stocklösungen (400 µM) der Testsubstanzen in die Reihe B der Platte pipettiert, so dass die Konzentration der Substanzen dort 200 µM beträgt. Von Reihe B ausgehend wird nun eine serielle Verdünnung im Verhältnis 1:1 durchgeführt. Mit Hilfe einer Multipipette werden 100 µl aus Reihe B in Reihe C transferiert und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt. Ebenso wird mit den Reihen C bis H verfahren, so dass der Verdünnungsfaktor zur nachfolgenden Reihe jeweils 2 beträgt. Bei der letzten Verdünnung (Reihe H) werden nach dem Mischen 100 µl verworfen. Im Anschluss werden in die Kammern 100 µl der vorbereiteten Parasitenkultur pipettiert. Durch diese weitere Verdünnung im Verhältnis 1:1 beträgt die höchste Endkonzentration der Substanzen im Test 100 µM (in Reihe B). Reihe A fungiert als Kontrollreihe. Die ersten 6 Kammern dienen als Positivkontrolle für den Einbau des markierten Hypoxanthins. Ihnen wird lediglich 100 µl Parasitenkultur zugesetzt. In den letzten sechs Spalten (A7 bis A12) werden jeweils 100 µl nicht infizierte Erythrozyten (2,5% Hämatokrit) zum Hypoxanthin-Medium gegeben. Später werden A7 bis A9 mit [³H]Hypoxanthin behandelt (Erythrozyten-Kontrolle), A10 bis A12 hingegen nicht (Kaltkontrolle). Die Kaltkontrolle ist wichtig, um später bei der Auswertung das Grundrauschen berechnen zu können. Die Parasiten werden zunächst für 48 h in Gegenwart der Inhibitoren inkubiert. Dann werden vorsichtig, ohne die abgesetzten Erythrozyten aufzuwirbeln, 100 µl des Mediums aus den Kammern abgezogen und verworfen. Anschließend werden 100 µl des [³H]Hypoxanthins in Hypo-Medium dazugegeben. Die Kaltkontrollen sind hiervon ausgenommen. Zuvor wird das [³H]Hypoxanthin soweit mit Hypoxanthin-Medium verdünnt, dass die Aktivität der 100 µl 1,5 µCi entspricht (s. Abb. 2.2). Dabei muss beachtet werden, dass [³H]Hypoxanthin in wässriger Lösung durch Dekomposition monatlich 1% seiner Aktivität verliert und somit die Aktivität der Ausgangslösung schwindet. Die Platten werden für weitere 24 h inkubiert. Anschließend werden die Erythrozyten geerntet, d. h. sie werden mit Hilfe eines Packard Filtermate Cell Harvesters auf einen Glasfaser-Filter (UniFilter GF/CTM, Packard) transferiert. Dieser Filter wird zunächst in die Apparatur eingelegt und dreimal mit H₂O VE gewaschen. Anschließend werden die Erythrozyten durch Absaugen und fünfmaliges Waschen auf den Filter transferiert. Nach weiteren vier- bis fünf Waschgängen wird der Filter über Nacht bei RT getrocknet. Auf den trockenen Filter werden 25 µl Szintillationslösung je Kammer pipettiert. Der Filter wird auf der Ober- und Unterseite mit einer Folie abgeklebt und die Radioaktivität im Szintillationszähler (Szintillationszähler Counter LS 6000IC) bestimmt.

Die Auswertung der Daten erfolgt graphisch. Der Logarithmus der Inhibitorkonzentration wird gegen die Aktivität in % aufgetragen. Man erhält ein sigmoidales Schaubild, aus dem der Wert der Konzentration für einen Rückgang der Aktivität auf 50% (IC₅₀) abgelesen wird.

Neben der hier als Beispiel aufgeführten Inhibitorkonzentration können in Abhängigkeit der Ergebnisse auch andere Konzentrationen eingesetzt werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Einbaukontrolle						Erythrozytenkontrolle			Kaltkontrolle		
B	100 μ M	} Konzentration der Test- substanzen wird weiter verdünnt										
C	50 μ M											
D	25 μ M											
E	12,5 μ M											
F	6,25 μ M											
G	3,125 μ M											
H	1,563 μ M											

Abb. 2.2: Pipettierschema der Mikrotiterplatte

3 Ergebnisse

3.1 *Plasmodium falciparum* Calcium-abhängige Protein Kinase 1 (PfCDPK1)

3.1.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung

Für die hier durchgeführten Experimente wurde ein *XhoI/NdeI*-pET21a-Konstrukt der PfCDPK1 verwendet, welches von einem Konstrukt ausging, das von Herrn Christian Möskes bereitgestellt wurde. Bei der rekombinanten Expression und anschließenden Aufreinigung der PfCDPK1 konnte auf ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Protokoll zurückgegriffen werden.

Die Expression der PfCDPK1 in BL 21 (DE3) pLysS Bakterien erfolgte für 8 h bei 37°C. Die Induktion wurde mit 0,4 mM IPTG durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Affinitätsaufreinigung des Proteinlysats mittels Nickel-NTA-Agarose (Abb. 3.1). Die Ni-NTA-Säule wurde mit dem Proteinlysats aus den Bakterien beladen und mit je 30 Säulenvolumen Waschpuffer (20 und 30 mM Imidazol) gewaschen. Im Anschluss fand die Elution mit 100 mM Imidazol-haltigem Elutionspuffer statt. Aus einem Liter Bakterienkultur konnten 2 bis 4 mg lösliche PfCDPK1 isoliert werden. Die Aufreinigung über Nickel-NTA-Agarose führte zu einem hohen Reinheitsgrad des Proteins. Zur Vorbereitung auf die Kinasereaktionen wurde das isolierte Protein gegen Kinasereaktionspuffer dialysiert. Die gewonnene Kinase wurde bei -80°C gelagert und für die folgenden Versuche als Enzym eingesetzt.

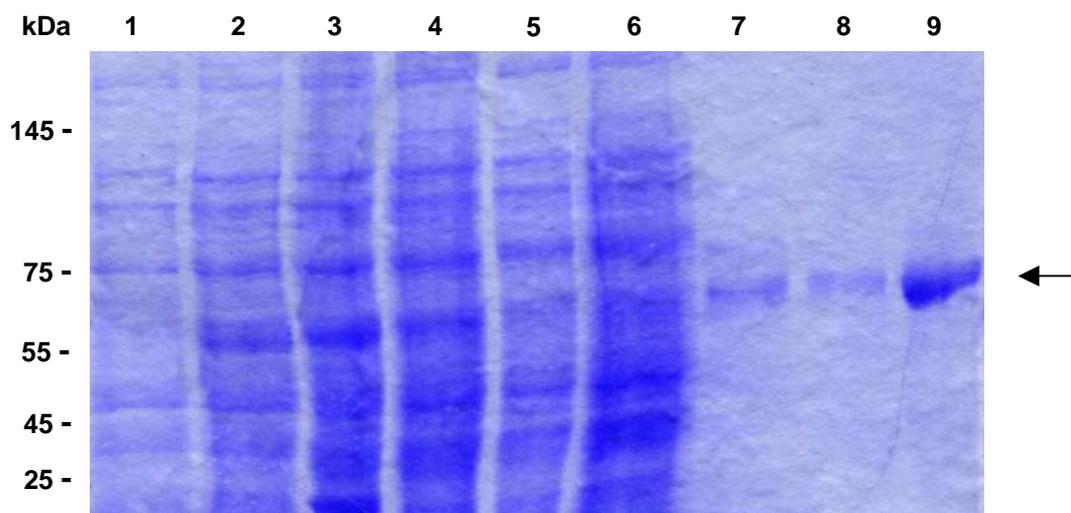


Abb. 3.1: SDS-Gel (12%) der Affinitätsaufreinigung der PfCDPK1 mittels Ni-NTA-Agarose (1) Nicht induzierte Kultur; (2) Kultur nach 8 h Induktion mit 0,4 mM IPTG; (3) unlösliche Fraktion; (4) löslicher Überstand; (5) Durchfluss nach Waschen mit 20 mM Imidazol-haltigem Waschpuffer; (6) Durchfluss nach Waschen mit 30 mM Imidazol-haltigem Waschpuffer; (7 bis 9) Elutionsfraktionen Nr. 3-5, mit 100 mM Imidazol-haltigem Puffer eluiert.

3.1.2 Bestimmung der autophosphorylierten Aminosäuren der PfCDPK1

Mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (UPLC-MS/MS) wurden die Autophosphorylierungsstellen der PfCDPK1 bestimmt. Die massenspektrometrische Messung und Auswertung übernahm Dominic Winter (DKFZ Heidelberg). Zuvor wurde eine Standardreaktion mit der PfCDPK1 als Kinase durchgeführt (s. 2.8), jedoch ohne der Reaktion ein Substrat zuzusetzen. So fand ausschließlich eine Autophosphorylierung der Kinase statt. Da für die Bestimmung der Phosphorylierungsstellen nach dieser Methode keine radioaktive Markierung notwendig ist, konnte auf den Zusatz von radioaktivem P^{32} verzichtet werden. Als Kontrolle wurde unbehandelte PfCDPK1 verwendet, die nicht in einer *in vitro* Kinasereaktion modifiziert wurde.

Das Reaktionsgemisch sowie die unbehandelte Kontrolle wurden über ein SDS-Gel (Bis-Tris, NuPAGE[®]) aufgetrennt, die PfCDPK1-Banden ausgeschnitten und im Gel mit verschiedenen Proteasen (AspN, Elastase, Chymotrypsin und Trypsin) verdaut. Die entstandenen Peptide wurden anschließend aus den Gelstücken eluiert und die Phosphopeptide mit Ga^{3+} -IMAC angereichert. Die Phosphopeptid-Elutionsfraktionen und die Durchflussfraktionen wurden mittels UPLC-MS/MS analysiert. Die Ergebnisse der UPLC-MS/MS-Analyse der Phosphopeptid-Elutionsfraktionen der PfCDPK1 nach der Behandlung mit Trypsin sind beispielhaft in Abb. 3.2 dargestellt:

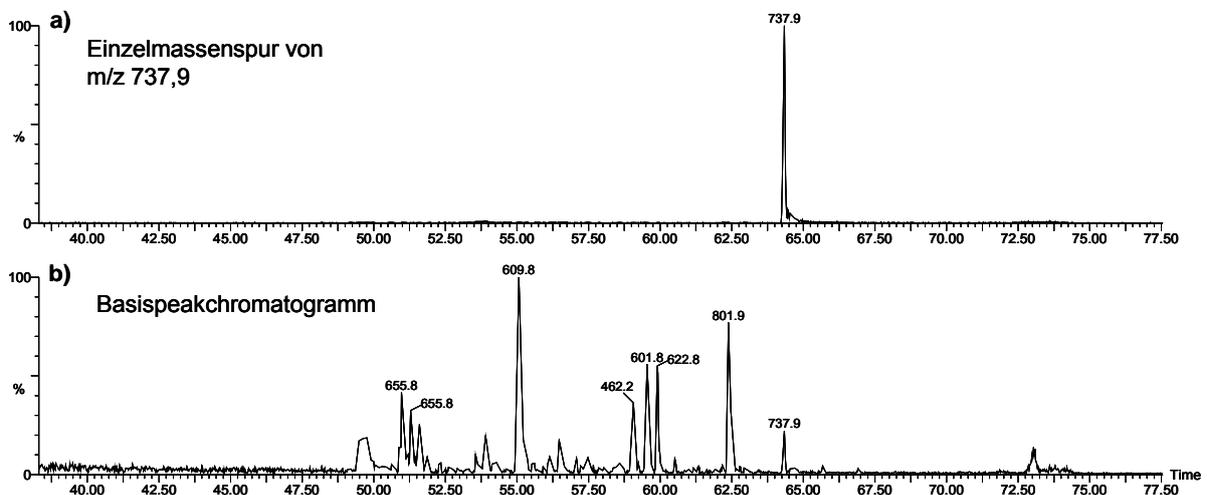


Abb. 3.2: UPLC-MS/MS-Chromatogramm der Phosphopeptid-Elutionsfraktion nach Ga^{3+} -IMAC-Anreicherung der PfCDPK1 nach Trypsin-Behandlung

(a) Einzelmassenspur des Ions (bei m/z 737,9), diese entspricht dem Phosphopeptid LGpSGAYGEVLLcamCR; (b) Basispeakchromatogramm der kompletten Phosphopeptidfraktion.

Bei der Analyse der Phosphopeptide mittels UPLC-MS/MS wurden die Peptide zuerst auf einer Umkehrphasensäule mittels eines linearen Gradienten von geringer Konzentration organischen Lösungsmittels hin zu hoher Konzentration getrennt. Dies resultierte in der zeitlich versetzten Elution der Peptide, welche anschließend „on-line“ im Massenspektrometer analysiert wurden. Da der Massenspektrometer nur ein Peptid pro Sekunde analysieren kann, darf die Komplexität der

Probe ein gewisses Maß nicht überschreiten. Dies machte die Anreicherung der Phosphopeptide erforderlich, da die Menge der unphosphorylierten Peptide im Vergleich zur Menge der Phosphopeptide deutlich größer war. Wäre keine Trennung von phosphorylierten und unmodifizierten Peptiden vor der Analyse erfolgt, so wären deutlich weniger Phosphopeptide identifiziert worden. Dies war eine Folge der Datenaufnahme im DDA-Modus („data dependend acquisition“). Dabei erfolgte die Auswahl der zu fragmentierenden Ionen automatisch aufgrund ihrer relativen Signalintensität. Es wurden jeweils nur die drei intensivsten Signale eines MS-Spektrums im MS/MS-Modus fragmentiert. Nur fragmentierte Ionen konnten identifiziert werden, da die Sequenzinformation der analysierten Peptide ausschließlich aus den Fragmentationen stammte. Dies ist exemplarisch in Abb. 3.3 dargestellt.

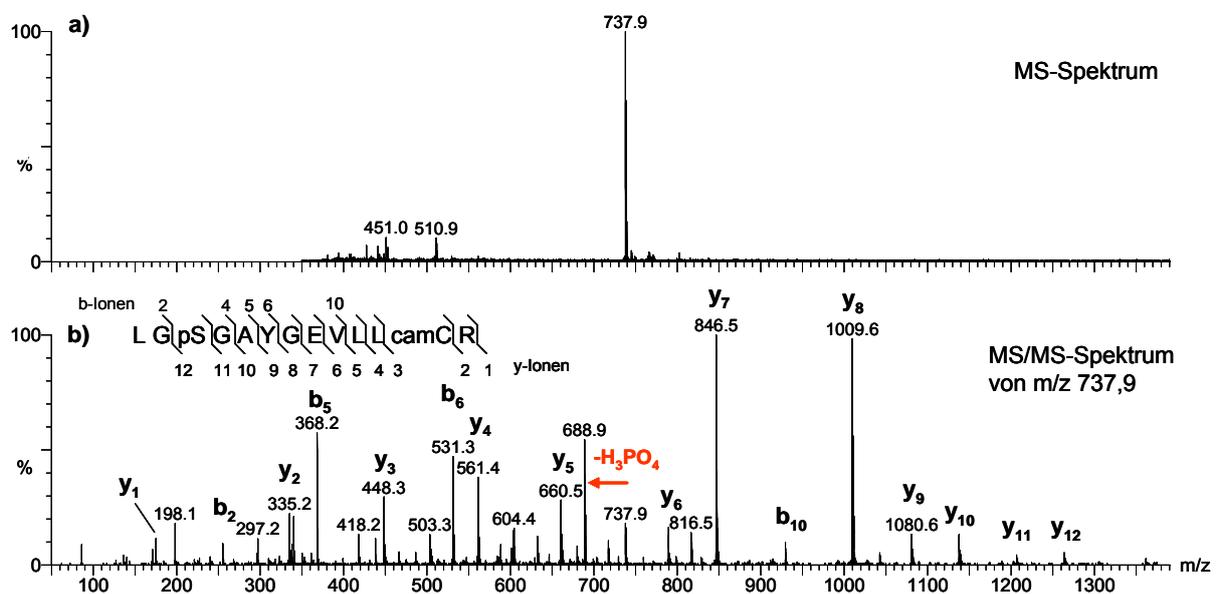


Abb. 3.3: Spektren des in Abb. 3.2a dargestellten Peptids bei 64,5 min

(a) MS-Spektrum des intakten Moleküliions bei m/z 737,9; (b) MS/MS-Spektrum des in Spektrum a intensivsten Ions. Die Fragmentationen, die zur Identifikation des Peptids und zur Bestimmung der Phosphorylierungsstelle (S64) verwendet wurden sowie die ermittelte Peptidsequenz mit der Position der Phosphorylierung sind indiziert.

Aufgrund der Ionen, die bei der Fragmentierung des Peptids im MS/MS-Modus entstehen, konnte dessen Sequenz sowie die Position der Phosphorylierungsstelle bestimmt werden (s. Abb. 3.3b). Hierbei erfolgte eine Sequenzierung ausgehend von Bruchstücken, die den intakten C-Terminus des Peptids enthielten (y-Ionen) und von solchen, die den intakten N-Terminus enthielten (b-Ionen). Die Massendifferenzen zwischen diesen Bruchstücken entsprechen der Aminosäuresequenz, wodurch eine Sequenzierung des Peptids möglich wird. Eine zusätzliche manuelle Analyse mit nanoESI (ohne vorherige chromatographische Trennung der Peptide) wurde teilweise dann durchgeführt, wenn die Signalintensitäten der Ionen in der durchgeführten UPLC-MS/MS-Messung zu gering waren. Dann wurden im nanoESI-MS/MS-Modus die Signale so lange manuell fragmentiert bis ein Spektrum ausreichender Qualität zustande kam. Die resultierenden MS/MS-Spektren der UPLC-MS/MS- und nanoESI-MS/MS-Messungen wurden mit MASCOT interpretiert, die Phosphopeptid-Eluatfraktionen außerdem manuell untersucht und identifizierte Phosphopeptide evaluiert.

Bei der MS-Untersuchung gelang es, insgesamt 24 phosphorylierte Aminosäuren zu identifizieren. Von diesen sind 19 auf eine Autophosphorylierung *in vitro* zurückzuführen. Diese Aminosäuren sind in Abb. 3.4 rot markiert und unterstrichen dargestellt. Auffällig hierbei ist, dass mit Tyr⁴⁴ auch ein Tyrosin eine Phosphatgruppe trug, da ansonsten ausschließlich Serine und Threonine phosphoryliert wurden. Neben den *in vitro* autophosphorylierten Aminosäuren konnten bei der PfCDPK1 weitere fünf Autophosphorylierungsstellen identifiziert werden, die bereits bei der unbehandelten Probe nachweisbar waren. Diese Phosphorylierungen scheinen schon während der Expression der Kinase im *E. coli*-System aufgetreten zu sein und sind blau und unterstrichen dargestellt.

```

1  MGCSQSSNVK  DFKTRRSKFT  NGNNYKSGN  NKNSEDLAIN  PGMYVRKKEG
51  KIGESYFKVR  KLGSGAYGEV  LLCREKHGHG  EKAIKVIKKS  QFDKMKYSIT
101 NKIECDDKIH  EEIYNEISLL  KSLDHPNIIK  LFDVFEDKKY  FYLVTEFYEG
151 GELFEQIINR  HKFDECDAA  IMKQILSGIC  YLHKHNIVHR  DIKPENILLE
201 NKHSLLNIKI  VDFGLSSFFS  KDNKLRDRLG  TAYYIAPPEVL  RKKYNEKCDV
251 WSCGVILYIL  LCGYPPFGGQ  NDQDIKKVE  KGKYYFDFND  WKNISEEAKE
301 LIKLMLTYDY  NKRITAKEAL  NSKWIKKYAN  NINKSDQKTL  CGALSNMRKF
351 EGSQKLAQAA  ILFIGSKLTT  LEERKELTDI  FKKLDKNGDG  QLDKKELIEG
401 YNILRSFKNE  LGELKNVEEE  VDNILKEVDF  DKNGYIEYSE  FISVCMDKQI
451 LFSEERLRDA  FNLFDTDKSG  KITKEELANL  FGLTSSISEQM  WNEVLGEADK
501 NKDNMIDFDE  FVNMMHKICD  NKSSHHHHHH

```

Abb. 3.4: Aminosäuresequenz der rekombinanten PfCDPK1 mit den identifizierten Autophosphorylierungsstellen. Mit einer massenspektrometrischen Messung konnten 19 *in vitro*-Autophosphorylierungsstellen der PfCDPK1 identifiziert werden. Diese sind rot markiert und unterstrichen. Außerdem konnten fünf weitere Autophosphorylierungsstellen identifiziert werden, die bereits während der rekombinanten Expression phosphoryliert wurden. Diese Stellen sind blau markiert und unterstrichen.

3.1.3 Untersuchung des Einflusses der PfCDPK1 auf die Invasion von *P. falciparum* in Erythrozyten

Um eine mögliche Beteiligung der PfCDPK1 an der Invasion von Erythrozyten durch *P. falciparum* nachzuweisen, sollte die Aktivität der Kinase inhibiert werden. Dies geschah mit dem Kinaseinhibitor PPI. Dieser, eigentlich für die Src-Kinase entwickelte Inhibitor, wurde von Christian Möskes im Rahmen seiner Dissertation als ein guter Inhibitor der PfCDPK1 identifiziert, der die Kinase in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie die Mitglieder der Src-Familie inhibiert. Da die Parasiten nicht über Tyrosinkinase verfügen, kann PPI zur Hemmung der PfCDPK1 Aktivität spezifisch verwendet werden. Damit in den späteren Experimenten die optimale Menge PPI eingesetzt werden konnte, wurde zunächst die IC₅₀ bestimmt, also jene Konzentration des Inhibitors,

bei welcher die Hälfte der Parasiten abgetötet wurde. Dies wurde genau nach dem unter 2.12.15 beschriebenen Protokoll mit 3D7 Parasiten durchgeführt. Getestet wurden Konzentrationen des Inhibitors von 0,095 μM bis 200 μM . Abb. 3.5 zeigt die resultierenden Überlebensraten der Parasiten. Die daraus bestimmte IC_{50} betrug 5,2 μM .

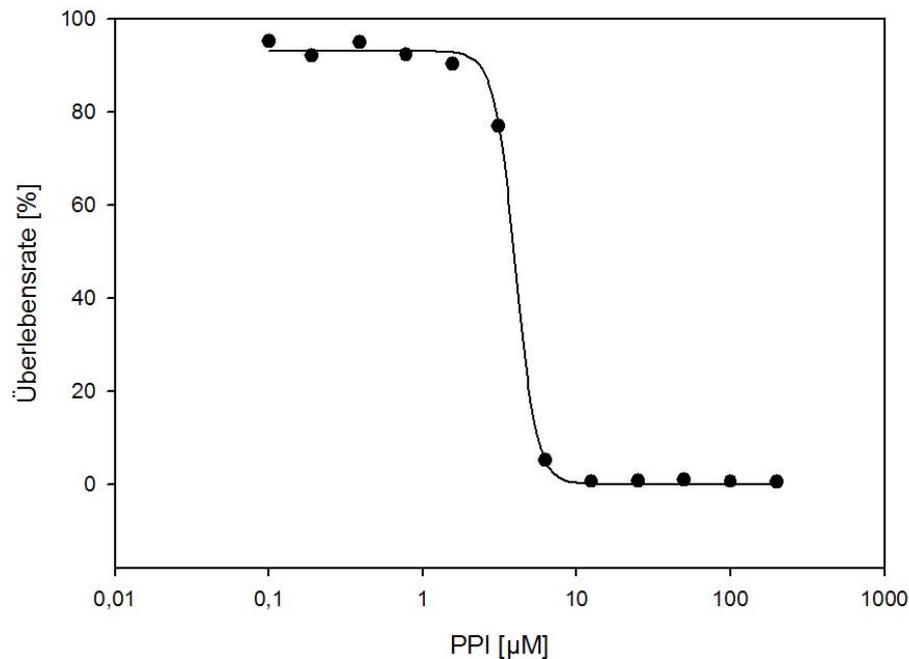


Abb 3.5: Überlebensrate der Parasiten in Prozent als Funktion der Konzentration des Inhibitors PPI. Diese IC_{50} (mittlere inhibitorische Konzentration) lag bei 5,2 μM .

Ausgehend von der ermittelten IC_{50} wurde mit 50 μM etwa die zehnfache Konzentration des ermittelten IC_{50} Wertes an PPI eingesetzt. Damit zu Versuchsbeginn eine hochsynchrone Kultur der Parasiten im Segmenter Stadium vorlag, wurden die Parasiten zuvor entsprechend synchronisiert (s. 2.12.10). Um spätere Interpretationsfehler zu vermeiden, wurde außerdem darauf geachtet, dass die Kultur vor Versuchsbeginn keine Parasiten im Ringstadium enthielt. Die ausschließlich aus Parasiten im Schizonten- bzw. im Segmenter Stadium bestehende Kultur (Durchmesser der Kulturschale 25 cm) wurde jeweils auf zwei 6-Well Kulturplatten verteilt. Die Hälfte der Wells diente als Kontrolle, der anderen Hälfte wurden jeweils 50 μM PPI zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wurde die Ringparasitämie der mit PPI behandelten Kultur und der Kontrollen bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.6 dargestellt. Dabei wurde die Ringparasitämie der Kontrollen als 100% definiert. Eine Hemmung der PfCDPK1 durch PPI inhibiert die Invasionsfähigkeit der Parasiten. Die Parasitämie der behandelten Kultur war nach Inhibitorzugabe um 92,5% reduziert und lag im Vergleich zum Kontrollwert bei 7,5%.

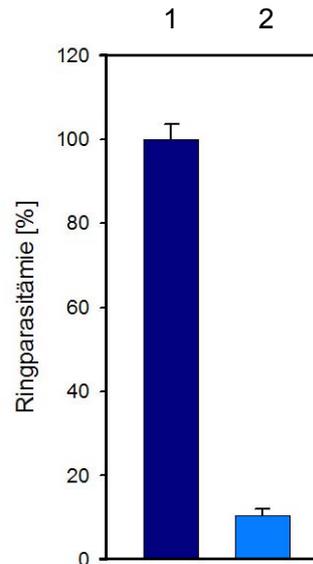


Abb. 3.6: Die Inhibition der PfCDPK1 hemmt die Neuinvasion von Erythrozyten (1) Ringparasitämie der Kontrollkultur ohne PPI-Behandlung; (2) Ringparasitämie der für 18 h mit PPI behandelten Kultur. Diese lag im Vergleich zur Kontrolle bei 7,5%. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.1.4 Klonierung eines PfCDPK1-YFP Transfektionskonstruktes

Zum Einsatz kam eine katalytisch inaktive Mutante der PfCDPK1, die PfCDPK1-D212A, da eine Überexpression des aktiven Proteins für den Parasiten toxisch ist (C. Möskes, persönliche Mitteilung). Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde ein PfCDPK1-D212A-YFP Konstrukt für die Transfektion von 3D7 Parasiten generiert. Dafür wurde an die, in der Arbeitsgruppe bereits vorhandene, cDNA der PfCDPK1-D212A die DNA-Sequenz des gelben Fluors Citrine („yellow fluorescent protein“, YFP) angehängt und beides in den Transfektionsvektor pARL1+ überführt. Die Klonierungsstrategie ist in Abb. 3.7 schematisch dargestellt. Dieses Konstrukt wurde für alle später folgenden Co-Transfektionsexperimente verwendet.

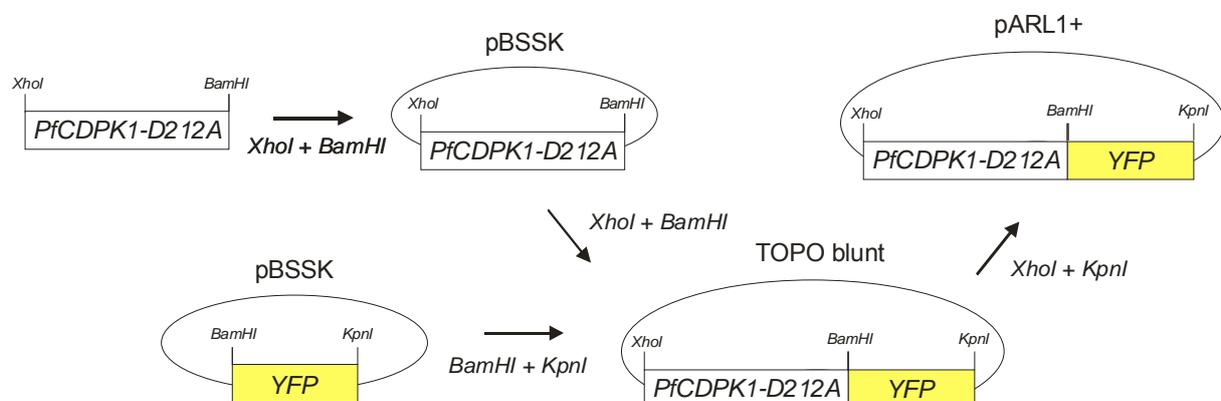


Abb. 3.7: Klonierungsstrategie des Transfektionskonstruktes der PfCDPK1-D212A

3.2 „MGC-basic“ Proteine

Im Folgenden werden Ergebnisse von Experimenten mit Proteinen beschrieben, deren Aminosäuresequenz darauf hindeutet, dass sie vermutlich wie die PfCDPK1 das „MGC-basic“-Signalmotiv tragen (s. 1.3). Dies könnte für eine Lokalisation dieser Proteine in der parasitophoren Vakuole sprechen und demnach eine Interaktion mit der PfCDPK1 ermöglichen.

3.2.1 *Plasmodium falciparum* cAMP bindendes Protein / cAMP Rezeptor Protein (PfCAP)

3.2.1.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung von PfCAP

In der vorliegenden Arbeit wurde reines PfCAP benötigt, um zu untersuchen, ob es sich bei PfCAP um ein potentielles Substrat der PfCDPK1 handelt. Um ausreichende Mengen des Proteins zu erhalten wurde PfCAP rekombinant in Bakterien hergestellt. Für rekombinante Proteine wurde ein Aufreinigungsprotokoll etabliert, das zu hochreinen Proteinfractionen führte, die in Kinasereaktionen eingesetzt wurden.

3.2.1.1.1 Klonierung des Expressionskonstruktes

Ausgehend von der aus mRNA erzeugten cDNA des Stammes 3D7 wurde mit Hilfe der Oligonukleotide PfCAP.fwd (enthielt eine *Bam*HI-Schnittstelle für die Klonierung in den Plasmidvektor pBSSK sowie eine *Nco*I-Schnittstelle für die anschließende Umsetzung in den Expressionsvektor pET21d) und PfCAP.rev (enthielt eine *Xho*I-Schnittstelle) ein 1326 bp langes PCR-Produkt (Abb. 3.8) amplifiziert und zunächst in den Plasmidvektor pBSSK eingefügt. Nach der Bestätigung der Identität des Fragmentes durch Sequenzierung wurde es unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Nco*I und *Xho*I in den Expressionsvektor pET21d mit C-terminalem His-Tag überführt. Diese Klonierungsstrategie ist in Abb. 3.9 bildlich veranschaulicht.

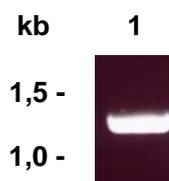


Abb. 3.8: PCR PfCAP
(1) 1326 bp langes PCR-Produkt der PfCAP-cDNA, aufgetrennt in einem 0,8%igen Agarosegel.

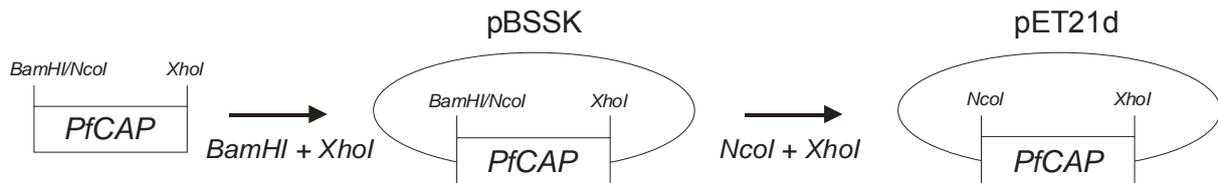


Abb. 3.9: Klonierungsstrategie des Expressionskonstrukts PfCAP

3.2.1.1.2 Optimierung der IPTG-Konzentration und der Expressionsdauer

Für die Expression des PfCAP wurde der Bakterienstamm BL21-CodonPlus-RIL verwendet. Über die Zugabe von IPTG zum Kulturmedium kann die Expression rekombinanter Proteine im bakteriellen pET21-System gesteuert werden. Ist die Induktion des rekombinanten Proteins zu stark, so entstehen meist große Mengen an unlöslichem Produkt, welches in Einschlusskörpern („inclusion bodies“) abgelagert wird. Die Aufreinigung des gewünschten Proteins ist dann mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden oder sogar unmöglich. Daher ist eine Optimierung der verwendeten IPTG-Konzentration und der Expressionsdauer unumgänglich. Es wurden drei verschiedene IPTG-Konzentrationen (0,1 mM, 0,5 mM und 1,0 mM) bei jeweils 1 h, 3 h und 6 h Induktionsdauer getestet. Dafür wurden jeweils 50 ml LB-Medium mit Bakterien angeimpft, die das Expressionskonstrukt trugen. Die Induktion der Expression begann, sobald die Bakterienkulturen eine OD_{600} von 0,6 erreicht hatten. Die Proben dieses Experiments wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (Abb. 3.10).

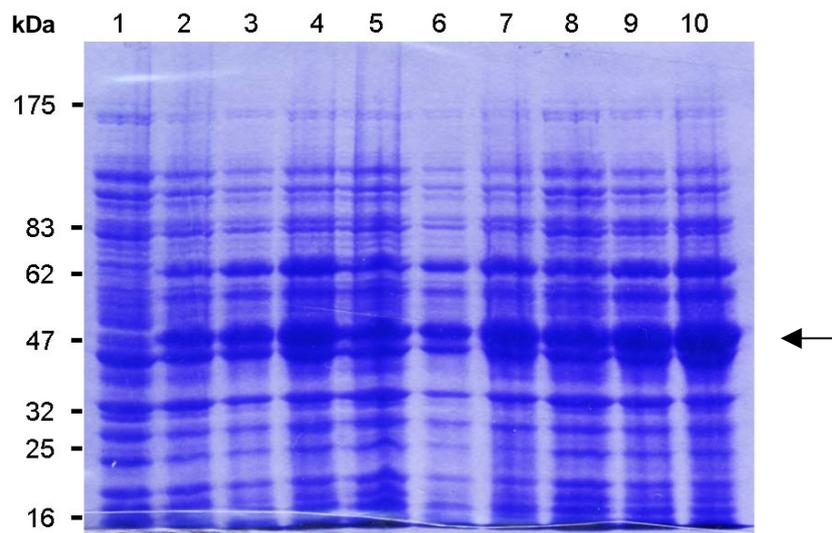


Abb. 3.10: Testexpression von PfCAP (46 kDa) zur Optimierung der IPTG-Konzentration und der Expressionsdauer

(1) Nicht induzierte Kultur; (2) 1 h Induktion mit 0,1 mM IPTG; (3) 1 h Induktion mit 0,5 mM IPTG; (4) 1 h Induktion mit 1,0 mM IPTG; (5) 3 h Induktion mit 0,1 mM IPTG; (6) 3 h Induktion mit 0,5 mM IPTG; (7) 3 h Induktion mit 1,0 mM IPTG; (8) 6 h Induktion mit 0,1 mM IPTG; (9) 6 h Induktion mit 0,5 mM IPTG; (10) 6 h Induktion mit 1,0 mM IPTG. Es wurden jeweils gleiche Probenvolumina auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen.

Der Expressionstest zeigte, dass sowohl die Steigerung der IPTG-Konzentration als auch die Verlängerung der Induktionszeit zu einer Erhöhung der Expression des rekombinanten PfCAP

fürte (Abb. 3.10). Die größten Proteinmengen waren nach 6 h Induktion zu erkennen. Daher wurden diese Fraktionen auf den Anteil an löslichem PfCAP untersucht. Es wurden jeweils 10 ml dieser Fraktionen mit Proteaseinhibitoren versetzt und 5x für 10 s sonifiziert. Anschließend wurden die Fraktionen zentrifugiert und der lösliche sowie der pelletierte Anteil in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Anteil des unlöslichen Proteins zwar in jeder Fraktion höher ist als der lösliche Anteil, dennoch die Menge an löslichem Protein im Verhältnis zu unlöslichem recht hoch ist (Abb. 3.11). Da die größte Menge an löslichem PfCAP in der für 6 h mit 1 mM IPTG induzierten Kultur vorkam, wurden alle weiteren Experimente unter diesen Bedingungen durchgeführt.

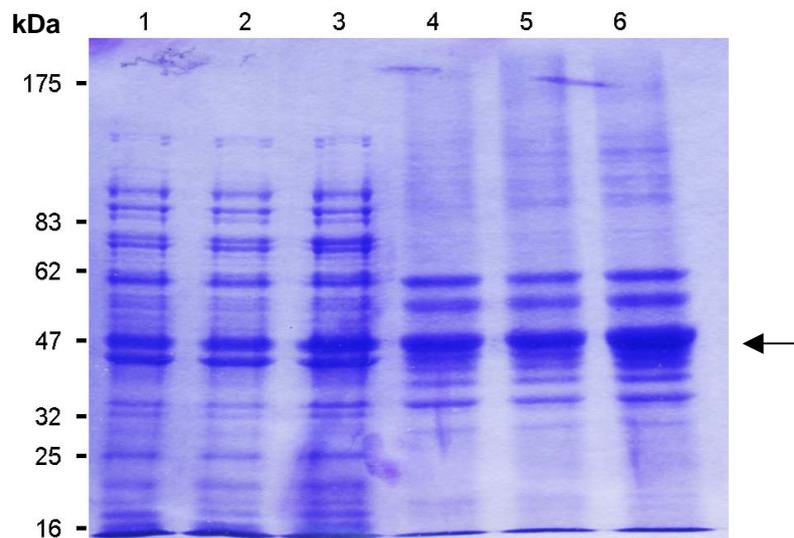


Abb. 3.11: Löslichkeitstest des rekombinanten PfCAP nach sechsständiger Induktion (1) Lösliche Fraktion 6 h induziert mit 0,1 mM IPTG; (2) lösliche Fraktion 6 h induziert mit 0,5 mM IPTG; (3) lösliche Fraktion 6 h induziert mit 1,0 mM IPTG; (4) unlösliche Fraktion 6 h induziert mit 0,1 mM IPTG; (5) unlösliche Fraktion 6 h induziert mit 0,5 mM IPTG; (6) unlösliche Fraktion 6 h induziert mit 1,0 mM IPTG. Es wurden jeweils gleiche Probenvolumina auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen.

3.2.1.1.3 Aufreinigung des PfCAP

Zunächst wurde die Aufreinigung des PfCAP mit der Ni-NTA-Säule etabliert. Es wurde die optimale Imidazolkonzentration für das Beladen der Säule ausgetestet (10 bzw. 20 mM Imidazol). Außerdem wurden die optimalen Imidazol- und NaCl-Konzentrationen für den Waschpuffer bestimmt. Um dies auszutesten, wurde die Säule jeweils mit 10 Säulenvolumen 10 bis 100 mM Imidazol-haltigem Waschpuffer gewaschen. Die NaCl-Konzentration im Waschpuffer bewegte sich in den Tests zwischen 300 und 1000 mM. Die Konzentrationen beider Substanzen wurden so eingestellt, dass möglichst viel Fremdprotein von der Säule verdrängt wurde, die damit einhergehenden Verluste des Zielproteins PfCAP aber möglichst gering blieben. Nach mehreren Tests stellte es sich als effektivste Methode heraus, das Protein in einem Puffer mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl und 10 mM Imidazol auf die Säule zu laden. Gewaschen wurde die Säule mit je 30 Säulenvolumen 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 750 mM NaCl und 20 sowie 25 mM Imidazol. Dar-

auf folgte die Elution mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 750 mM NaCl und 150 mM Imidazol. Die Größe der Elutionsfraktionen betrug jeweils $\frac{1}{2}$ Säulenvolumen.

Wie in Abbildung 3.12 (Spuren 8 bis 10) zu erkennen, war es jedoch durch diese Aufreinigung nicht möglich, das Protein in reiner Form zu erhalten. Daher mussten zusätzliche Reinigungsschritte erfolgen, um möglichst alle verunreinigenden Proteine von PfCAP abzutrennen.

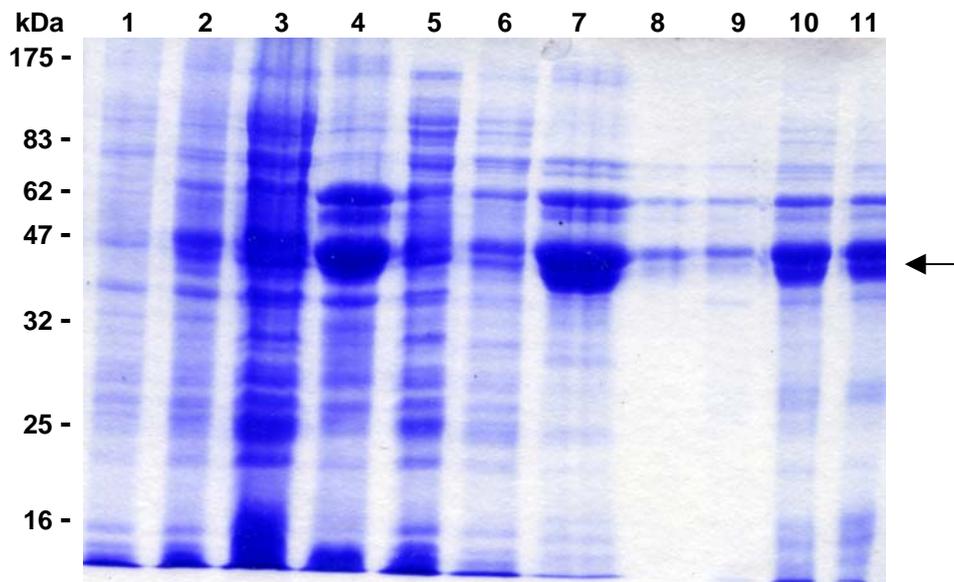


Abb. 3.12: SDS-Gel (12%) der Affinitätsaufreinigung des PfCAP mittels Ni-NTA-Agarose (1) Nicht induzierte Kultur; (2) Kultur nach 6 h Induktion mit 1,0 mM IPTG; (3) unlösliche Fraktion; (4) löslicher Überstand; (5) Durchfluss durch die Ni-NTA-Säule; (6) Durchfluss nach Waschen mit 20 mM Imidazol-haltigem Waschpuffer; (7) Durchfluss nach Waschen mit 25 mM Imidazol-haltigem Waschpuffer; (8 bis 11) Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol-haltigem Elutionspuffer.

Bevor weitere Reinigungsschritte unternommen wurden, wurde mittels eines Westernblots die Identität des mit der Ni-NTA-Säule aufgereinigten Proteins bestimmt um sicherzugehen, dass es sich wirklich um das rekombinante PfCAP handelte. Als primärer Antikörper diente ein monoklonaler Maus-anti-6xHis Antikörper und als Sekundärintikörper ein polyklonaler Ziege-anti-Maus Antikörper. Der Blot (Abb. 3.13) bestätigte, dass die von der Ni-NTA-Säule eluierten Fraktionen das rekombinante PfCAP enthielten.

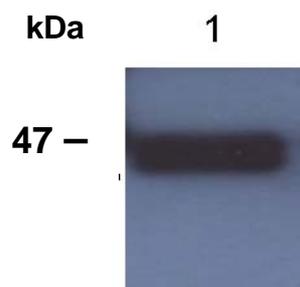


Abb. 3.13: Ausschnitt eines Westernblots nach der Affinitätsreinigung von PfCAP mittels Ni-NTA-Agarose (1) Die aufgereinigte PfCAP Bande wurde von dem Maus-anti-6xHis Antikörper detektiert.

Als nächster Reinigungsschritt wurde die Ionenaustauschchromatographie gewählt. Eingesetzt wurden die drei proteinreichsten Elutionsfraktionen nach der Ni-NTA-Säule. Um zu vermeiden, dass ein zu hoher Salzgehalt der Probe die Bindung an die Säule behinderte, wurden die Proben zuvor 1:10 mit H₂O verdünnt und anschließend auf ein Volumen von maximal 12 ml eingengt. Aufgrund des isoelektrischen Punktes des PfCAP, der bei 7,4 liegt, wurde für dieses Verfahren ein Puffer mit einem pH-Wert von 8,4 gewählt und auf einen starken Anionenaustauscher, die MonoQ-Säule, zurückgegriffen (s. 2.7.4). Die Flussrate betrug 0,5 ml/min bei einer aufgefangenen Fraktionsgröße von 0,5 ml. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten von 20 mM bis 1000 mM NaCl. Im Laufpuffer waren zusätzlich 1 mM DTT und 20 mM Tris/HCl pH 8,4 enthalten. Eluiert wurde das PfCAP bereits bei einer Salzkonzentration von 170 mM NaCl (Abb 3.14a), wohingegen einige der verunreinigenden Proteine erst mit einem Anstieg der NaCl-Konzentration auf 350 mM von der Säule verdrängt wurden (Abb. 3.14b, Spuren 7 bis 11).

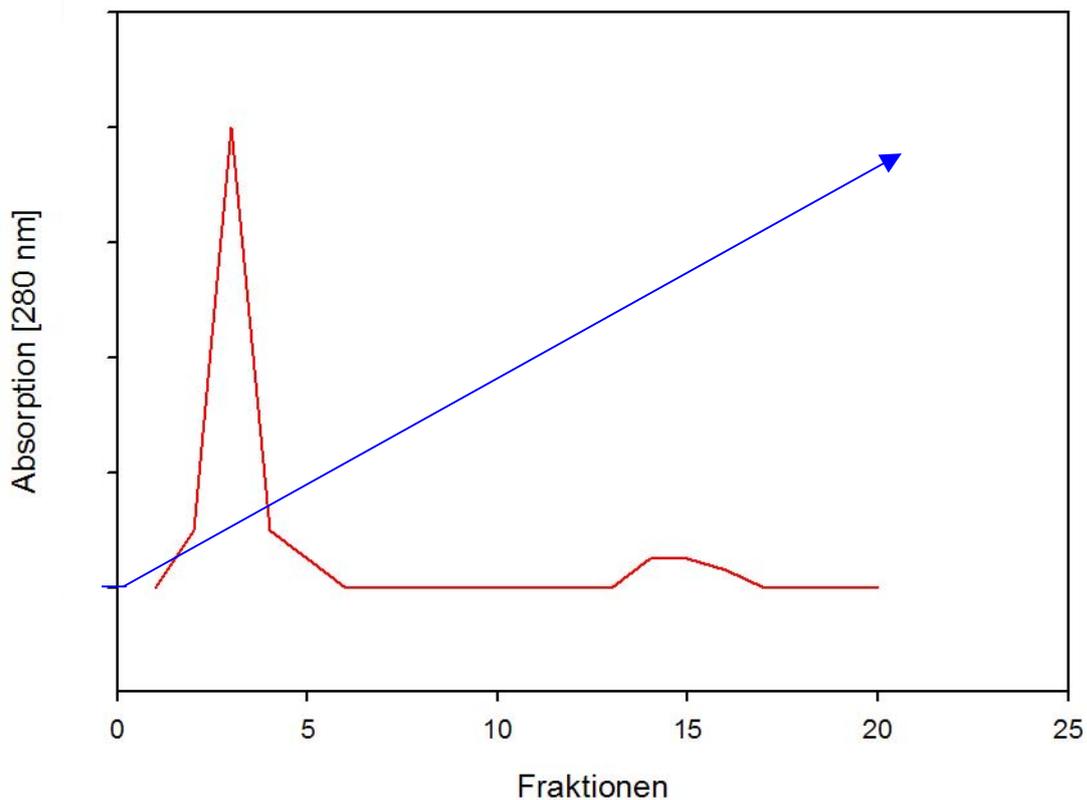


Abb 3.14a: Aufreinigung des PfCAP mit der Anionenaustauschsäule MonoQ, Schema des Elutionschromatogramms

Rot dargestellt ist das Elutionsdiagramm der Proteine des Ionenaustauscherlaufs. Blau dargestellt ist der NaCl-Gradient. Das Schema zeigt nicht den gesamten Lauf, sondern lediglich die ersten 20 von 35 Fraktionen. Der Salzgradient konnte wegen eines technischen Defekts nicht auf der Y-Achse abgebildet werden.

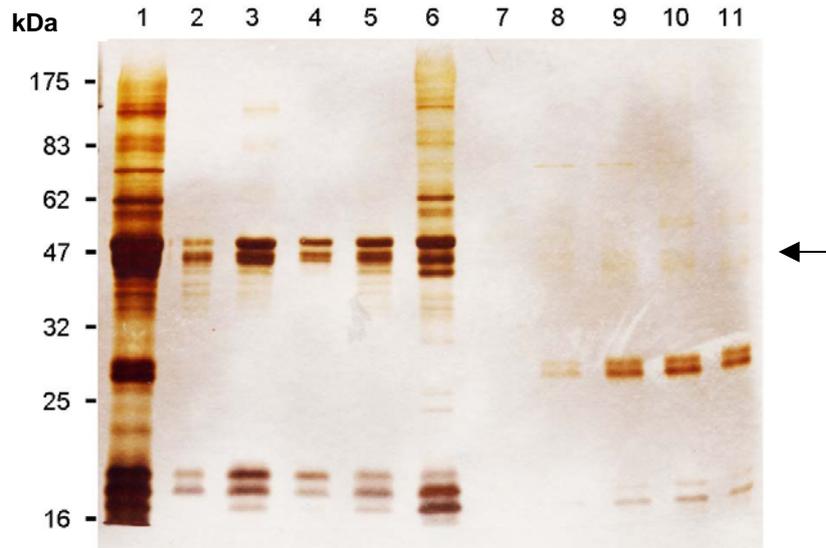


Abb. 3.14b: Silbergel der Aufreinigung des PfCAP mit der Anionenaustauschersäule MonoQ (1) Pool-Fraktion der Ni-NTA-Säulen-Elutionsfraktionen; (2-5) PfCAP-haltige Elutionsfraktionen, eluiert bei 170-200 mM NaCl; (6-11) Abgetrennte Verunreinigungen, eluiert mit ≥ 350 mM NaCl.

Abb. 3.14b zeigt ein SDS-Gel der beim Ionenaustausch mit 170 bis 200 mM NaCl eluierten PfCAP-Fraktionen, die allerdings noch Verunreinigungen im Bereich von ca. 20 kDa enthielten. Um auch die verbliebenen Verunreinigungen aus dem Eluat zu entfernen, wurde ein dritter Reinigungsschritt durchgeführt, eine Gelfiltrations-Chromatographie (s. 2.7.3). Hierzu wurde eine SuperdexTM 200 26/69 Säule verwendet und als Puffer 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT gewählt. Da, um die Trennschärfe nicht zu verzerren, nur ein begrenztes Volumen auf diese Säule geladen werden konnte, wurden die aus dem Ionenaustauscher gewonnenen Elutionsfraktionen auf ein Volumen von 2 ml eingeeengt und komplett auf die Säule geladen. Der Lauf wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Wie in Abb. 3.15b zu erkennen, gelang es, die restlichen, in einem Größenbereich oberhalb von 50 kDa verbliebenen Proteine sowie die Verunreinigungen im Bereich unterhalb von 20 kDa abzutrennen. PfCAP wurde mit einem Peak als Monomer separiert (Abb. 3.15a), der zweite Peak ab Fraktion 20 zeigt die abgetrennten Verunreinigungen.

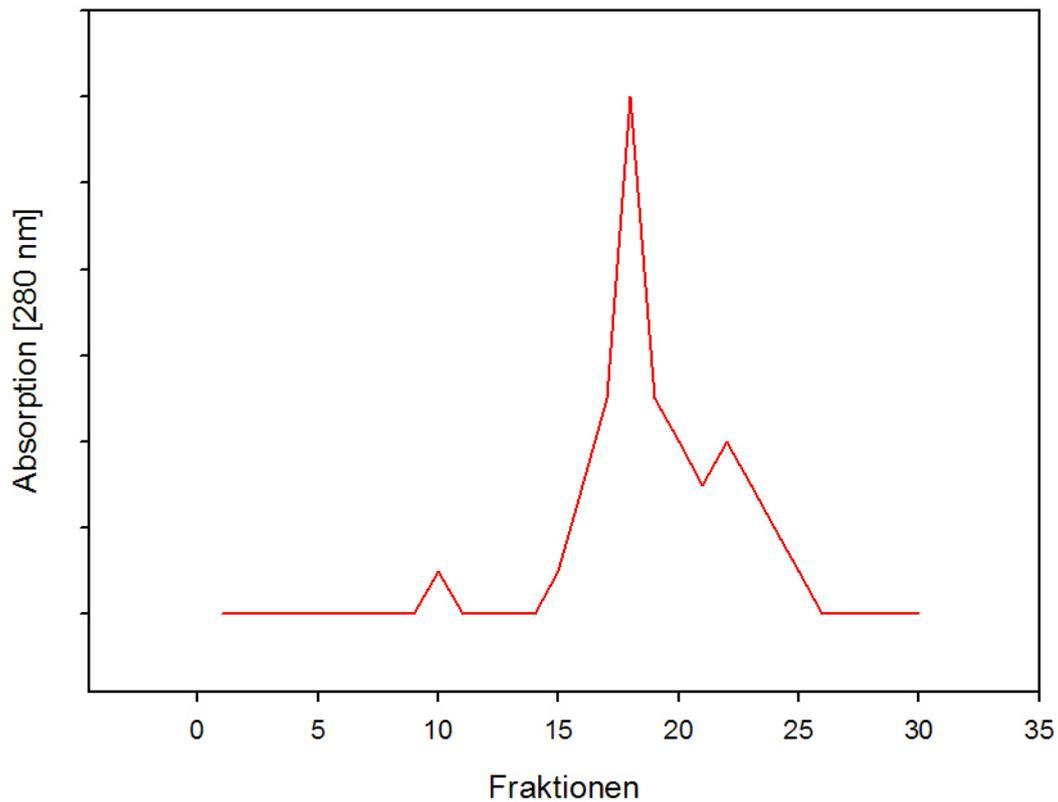


Abb 3.15a: Schematisches Chromatogramm des PfCAP Gelfiltrationslaufs (Superdex™ 200 26/69 Säule) In rot ist der Verlauf der Gelfiltration dargestellt. Die Peaks zeigen die proteinhaltigen Fraktionen. Das Schema zeigt nicht den gesamten Reinigungslauf, sondern lediglich die ersten 30 von 45 Fraktionen (entspricht den Fraktionen mit Proteinanteil). Das Originalchromatogramm konnte aufgrund eines technischen Defektes nicht abgebildet werden.

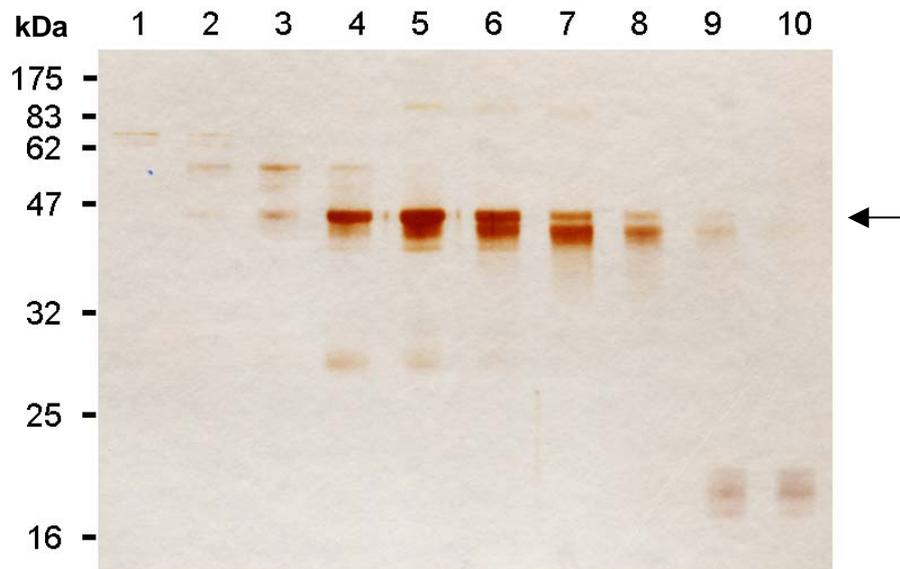


Abb. 3.15b: 12%iges Silbergel der Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex™ 200 26/69 Säule) von PfCAP (1-3) Verunreinigungen oberhalb des Zielproteins wurden abgetrennt, entspricht den Fraktionen 15 bis 18; (4-8) Fraktionen von PfCAP mit leichten Verunreinigungen zwischen 25 und 32 kDa, zu sehen sind die Fraktionen 15 bis 19; (9-10) Abgetrennte Verunreinigungen zwischen 16 und 25 kDa, Fraktionen 20 und 21.

Durch eine Kombination von Ni-NTA-, Ionenaustausch- und Gelfiltrations-Chromatographie war es letztendlich möglich, die Fremdproteine weitestgehend zu entfernen und reines PfCAP zu erhalten. Abb. 3.16 veranschaulicht den erfolgreichen Verlauf der Aufreinigung.

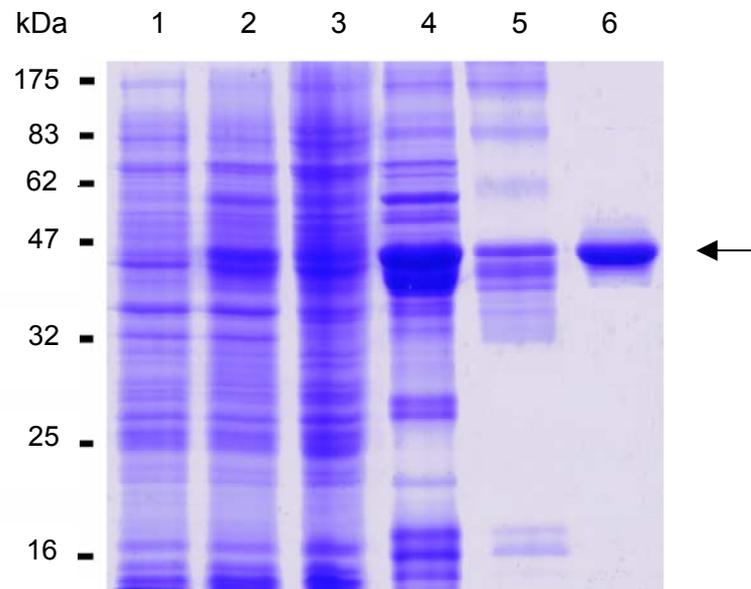


Abb. 3.16: Übersicht der Proteinaufreinigung des rekombinanten PfCAP, aufgetrennt in einem 12%igen SDS-Gel (1) Nicht induzierte Kultur; (2) Kultur nach 6 h Induktion mit 1 mM IPTG; (3) Löslicher Überstand nach der Ultraschallbehandlung; (4) Elution nach der Ni-NTA-Säule (gewaschen mit 750 mM NaCl/25 mM Imidazol, eluiert mit 750 mM NaCl/200 mM Imidazol); (5) PfCAP-haltige Fraktion nach der Aufreinigung mit dem Ionenaustauscher MonoQ (eluiert bei 170mM NaCl); (6) Aufgereinigtes PfCAP nach der Gelfiltrationssäule (SuperdexTM 200 26/69).

Für die Aufreinigung größerer Mengen von PfCAP wurde ein Ansatz von 12 Litern Bakterienkultur verwendet, aus dem letztendlich 24 mg des reinen Zielproteins gewonnen werden konnten. Um ein Degradieren des Proteins zu vermeiden, wurde die gesamte Reinigungsprozedur ohne Unterbrechung unmittelbar aufeinanderfolgend durchgeführt.

3.2.1.2 PfCAP ist ein Substrat der PfCDPK1

Um zu überprüfen, ob es sich bei PfCAP um ein Substrat der PfCDPK1 handelt, wurden Phosphorylierungsreaktionen durchgeführt, bei welchen das rekombinante PfCAP und die rekombinante PfCDPK1 (s. 3.1.1) verwendet wurden. Zunächst erfolgte eine Reaktion mit 10 µg PfCAP und 62 ng PfCDPK1. Als Positivkontrolle diente eine Kinasereaktion mit 10 µg Casein. Die Phosphorylierung des Caseins wurde als 100% Phosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 definiert. Abb. 3.17 zeigt die Phosphorylierung von Casein und von PfCAP. Die Phosphorylierung von PfCAP ist deutlich schwächer als die des Caseins und beträgt knapp 10%. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Kinase ergab für Casein einen Wert von 275 nMol/min/mg und für PfCAP einen Wert von 19,7 nMol/min/mg.

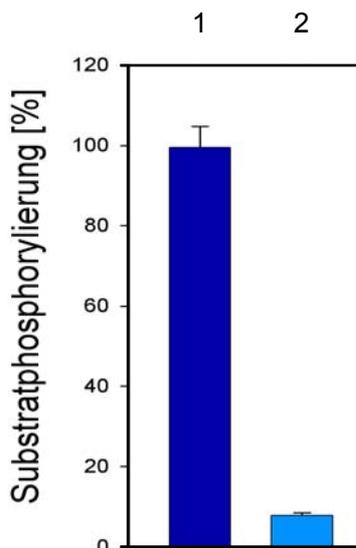


Abb. 3.17: Phosphorylierung des PfCAP durch die PfCDPK1

(1) Phosphorylierung von Casein (Positivkontrolle) durch die PfCDPK1; (2) Phosphorylierung von PfCAP durch die PfCDPK1. Die Phosphorylierung des exogenen Substrats Casein wurde bei diesen Messungen als 100% definiert. Die Phosphorylierung des PfCAP durch die PfCDPK1 ist um etwa 90% geringer als die des Caseins. Die angegebenen Werte gingen aus vier voneinander unabhängigen Messungen hervor. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Da es sich bei PfCAP um ein cAMP-bindendes Protein handelt, wurde der Einfluss von cAMP auf die Phosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 untersucht (Abb. 3.18). Zu diesem Zweck wurden den Kinasereaktionen in Gegenwart von PfCAP in einem weiteren Experiment jeweils 100 μM cAMP zu gesetzt. Als 100% wurde die Phosphorylierung des PfCAP ohne cAMP-Zugabe definiert. In Gegenwart von 100 μM cAMP sank die Phosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 auf 80%. Die Phosphorylierung des PfCAP war demnach um 20% vermindert im Vergleich zur Phosphorylierung in Abwesenheit von cAMP.

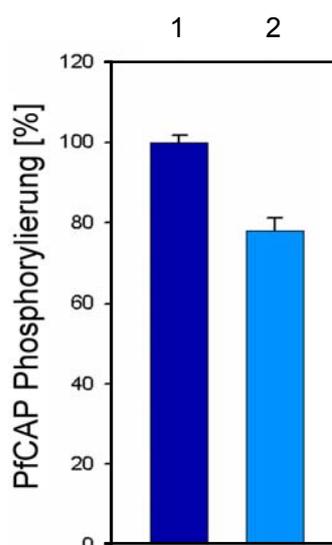


Abb. 3.18: Einfluss von cAMP auf die PfCAP Phosphorylierung

(1) Phosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 gegenüber PfCAP in Abwesenheit von cAMP. Dieser Wert wurde als 100% definiert; (2) Die Phosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 ist in Gegenwart von 100 μM cAMP gegenüber PfCAP um etwa 20% geringer im Vergleich zur Messung ohne cAMP. Die Werte stammen aus vier voneinander unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Auch die Autophosphorylierungsaktivität der PfCDPK1, die etwa um den Faktor 60 unter der Substratphosphorylierungsaktivität liegt, wurde durch die Zugabe von cAMP zur Reaktion beeinflusst (Abb. 3.19). Um dieses zu quantifizieren, wurde die Reaktion wie oben beschrieben durchgeführt, über ein 12%iges SDS-Gel aufgetrennt und anschließend die Banden der autophosphorylierten PfCDPK1 aus dem Gel ausgeschnitten. Die Banden wurden in Szintillationsgefäße überführt, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt. Dabei wurde die Autophosphorylierung der PfCDPK1 ohne Substrat als 100%ige Autophosphorylierung definiert. PfCAP verringerte die Autophosphorylierungsaktivität der PfCDK1 um 92% auf 8% im Vergleich zur Autophosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 in Abwesenheit von PfCAP. Die Zugabe von PfCAP in Gegenwart von cAMP verringerte die Abnahme der Autophosphorylierungsaktivität um etwa 75% auf 25% der Kontrollaktivität.

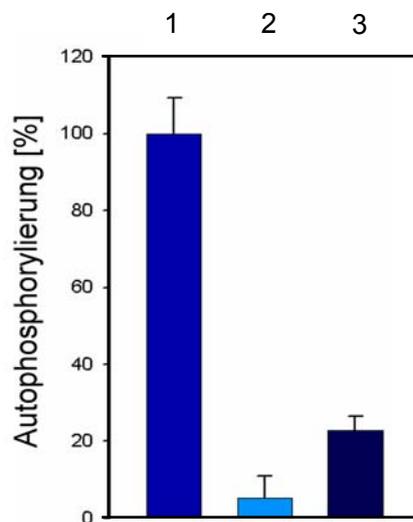


Abb. 3.19: Einfluss von cAMP auf die Autophosphorylierung der PfCDPK1

(1) Die Autophosphorylierung der PfCDPK1 ohne Substrat wurde als 100% definiert; (2) Autophosphorylierung der PfCDPK1 in Gegenwart von PfCAP als Substrat, jedoch ohne eine Zugabe von cAMP; (3) Autophosphorylierung der PfCDPK1 in Anwesenheit von PfCAP sowie cAMP. Alle Werte stammten aus vier voneinander unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Neben der cAMP vermittelten Änderung der Autophosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 sowie deren verminderten Phosphorylierungsaktivität gegenüber dem Substrat PfCAP schien es möglich, dass sich die Anwesenheit von PfCAP/cAMP auch regulatorisch auf die Phosphorylierung weiterer Substrate wirken könnte. Daher wurde eine Reaktion mit PfCAP und cAMP durchgeführt (Abb. 3.20). Die Ansätze wurden in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt, um die Auswirkung auf das Casein isoliert betrachten zu können. Die Casein-Bande wurde ausgeschnitten, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und anschließend die eingebaute Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt. Die Phosphorylierung des Caseins in Abwesenheit von PfCAP bzw. PfCAP und cAMP wurde hierbei als 100%ige Phosphorylierung definiert. In Gegenwart des PfCAP zeigte sich bereits ein Rückgang der Phosphorylierung des Caseins um 40% auf 60%. Durch die Zugabe von cAMP zu diesen Versuchsbedingungen wurde die Substratphosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 gegenüber dem Casein um weitere 16% auf 44% des Ausgangswertes reduziert.

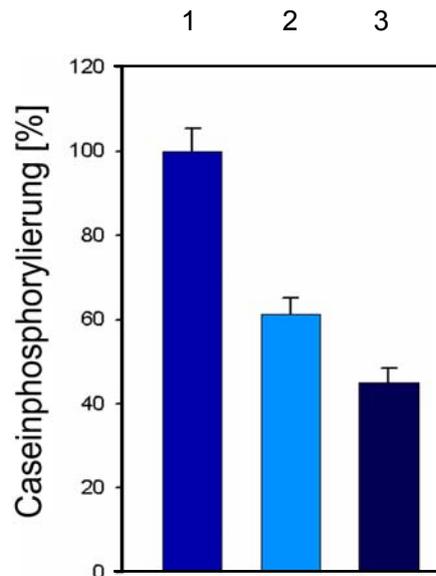


Abb. 3.20: Auswirkung von cAMP und PfCAP auf die Phosphorylierung weiterer Substrate der PfCDPK1 am Beispiel von Casein

(1) Die Phosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 gegenüber Casein als alleinigem Substrat in der Reaktion wurde als 100% definiert; (2) Phosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 gegenüber Casein in Gegenwart von PfCAP; (3) Phosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 gegenüber Casein in Gegenwart von PfCAP und cAMP. Alle Werte stammen aus vier voneinander unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

3.2.1.2.1 Bestimmung der durch die PfCDPK1 phosphorylierten Aminosäuren in PfCAP

Die Untersuchung wurde genau wie unter 3.1.2 beschrieben durchgeführt. Bei dieser Analyse gelang es, zwei durch die PfCDPK1 phosphorylierte Aminosäuren zu identifizieren. Phosphoryliert wurden die Serine an den Aminosäurepositionen 139 und 149. Dies entsprach für das Serin 149 dem Phosphorylierungsmotiv R/KXS/T der PfCDPK1. Für das Serin 139 konnte mit R/KXXXXXS/T ein neues Phosphorylierungsmotiv der PfCDPK1 identifiziert werden.

```

1  MGNVCTWRQG KEKAGDDNSQ VIKDKELQNE FKTFEQKMRS NKKNAHEGDM
51  NNDGEDDRYK FSRGFSLSKK PSKTKIPITK TDSEILDGLD YSEMSKQVLM
101 TLNKKNILND DGSSDGNDTD VHSMFDRKEI ERKVLDLESI HFIQKKRLSV
151 SAEAYGDWNK KIDNFIPKVY KKDEKEKAKI REALNESFLF NHLNKKEFEI
201 IVNAFFDKNV EKGVNIINEG DYGDLLYVID QGEVEIYKTK ENNKKEVLTV
251 LKSKDVFGEAL ALLYNSKRAA TATALTKCHL WALDRESFTY IIKDMVAKKR
301 KMYEDILSHV NILKMDPYE RCKVADCLKS KSYNDGEIII KEGEEGDTFF
351 ILIDGNAVAS KDNKVIKTYT KGDYFGELAL LKNKPRAATI KAQNFCQVVY
401 LDRKSFKRLG GPIEDILHRN VENYKKVLNE LGLDTTCIDE N

```

Abb. 3.21: Aminosäuresequenz des PfCAP mit den identifizierten Phosphorylierungsstellen. Mit Hilfe einer massenspektrometrischen Messung konnte gezeigt werden, dass PfCDPK1 das Serin 139 und 149 in PfCAP phosphoryliert. Die phosphorylierten Serine sind rot markiert und unterstrichen.

3.2.1.3 Transfektion eines PfCAP Konstruktes

Durch die Transfektion eines PfCAP Konstruktes in *P. falciparum* (3D7) sollte untersucht werden, ob PfCAP ebenso wie PfCDPK1 aufgrund des „MGC-basic“-Signalmotivs in die parasitophore Vakuole gelangt. Um eine eindeutige Aussage über eine mögliche Co-Lokalisation machen zu können, wurde das PfCAP Konstrukt zusammen mit der katalytisch inaktiven Mutante PfCDPK1-D212A (s. 3.1.4) in 3D7 eingebracht. Aufgrund der N-terminalen „MGC-basic“-Signalmotivsequenz wurden grundsätzlich alle Konstrukte so zusammengestellt, dass die verwendeten Fluorochrome C-terminal in den Fusionsproteinen lagen.

3.2.1.3.1 Klonierung des PfCAP Konstruktes

Wie schon für die Klonierung des Expressionskonstruktes beschrieben (vgl. 3.2.1.1.1) wurde an einem cDNA-Klon des Stammes 3D7 ein 1326 bp langes PCR-Produkt amplifiziert. Diesmal wurden jedoch die Oligonukleotide PfCAP_XhoI.fwd und PfCAP_EcoRI.rev verwendet und das Fragment dann zur Sequenzierung erneut in den Vektor pBSSK eingebracht. Anschließend wurde das PfCAP Fragment mittels einer Doppelligation gemeinsam mit dem Gen des Fluorochroms eCFP in den Vektor pCR Blunt-II TOPO® eingefügt. Danach wurde das PfCAP-eCFP-Konstrukt in den pARL1(+) Vektor umgesetzt. Der verwendete Vektor verlieh den Transfektanten eine Resistenz gegen WR99210. Abb. 3.22 veranschaulicht die Klonierungsstrategie. Das gleichzeitig in die Parasiten einzuführende PfCDPK1-D212A Konstrukt lag ebenfalls in einem pARL1(+) Vektor vor. In diesem Fall trug der Vektor jedoch eine Resistenz gegen Blasticidin S. Das aus diesem Konstrukt resultierende Protein besaß außerdem C-terminal ein Citrine (YFP) als Fluorochrom (vgl. 3.2.1.1.1).

Zusätzlich wurde ein Deletionskonstrukt von PfCAP erstellt, bei dem die ersten 107 Aminosäuren und somit das „MGC-basic“-Signalmotiv fehlte. Es dienten PfCAP_del_107aa_XhoI.fwd und PfCAP_EcoRI.rev als Primer. Die Klonierungsstrategie war mit der oben bereits beschriebenen identisch.

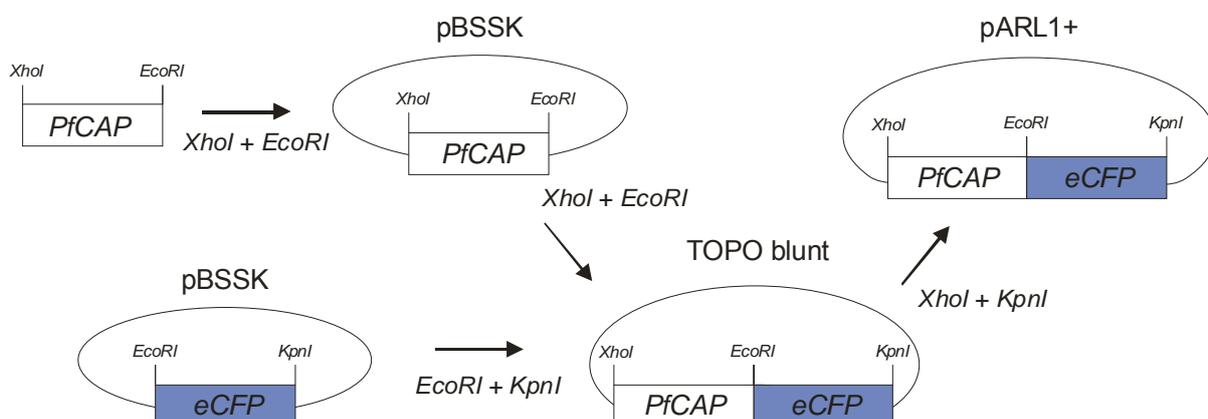


Abb. 3.22: Klonierungsstrategie des PfCAP-Transfektionskonstrukts

3.2.1.3.2 Doppeltransfektion von 3D7 mit PfCDPK1-D212A und PfCAP

Parasiten des Stammes 3D7 wurden mit jeweils 75 µg der beiden Vektorkonstrukte transfiziert. Nach der erfolgreichen Selektion mit WR99210 und Blasticidin S wurden erste Transfektanten nach 21 Tagen im Giemsa-Ausstrich identifiziert. Nachdem eine Parasitämie von ca. 8 bis 10% erreicht war, wurden die Parasiten für die konfokale Mikroskopie vorbereitet.

Die zeitgleiche Anregung mit einem Argonlaser bei 458 nm und 488 nm ergab ein Fluoreszenzsignal beider Proteine. In Abb. 3.23 ist die Fluoreszenz von PfCAP-eCFP in grün und von PfCDPK1-D212A-YFP in rot dargestellt. Die PfCDPK1-D212A-YFP war wie erwartet in der parasitophoren Vakuole lokalisiert. Auch die Fluoreszenz von PfCAP-eCFP war in der parasitophoren Vakuole zu finden. Werden beide Fluoreszenzbilder übereinandergelegt, so erscheint das Bild aufgrund der Co-Lokalisation gelb. An einigen Stellen kam es zu starken Akkumulationen der Proteine, vermutlich in Bereichen, in denen das tubovesikuläre System aufgebaut wurde. Die Überlagerung zeigte, dass auch diese Bereiche für beide Proteine übereinstimmten. Leichte Verschiebungen der Grün-Rot-Überlappung sind auf Bewegungen des Parasiten während der Aufnahme zurückzuführen.

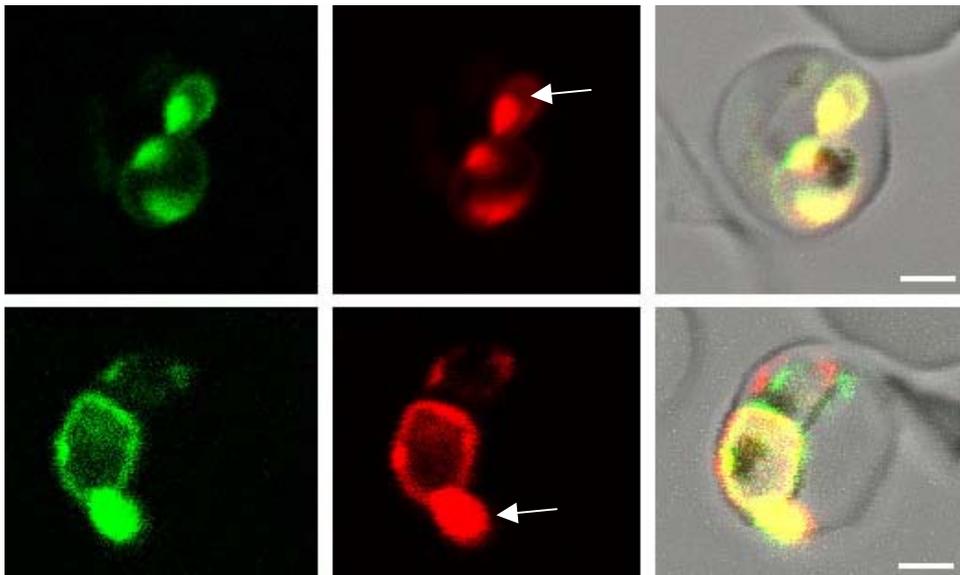


Abb. 3.23: *In vivo* imaging der Co-Transfektanten, die das PfCAP-eCFP und das PfCDPK1-D212A-YFP Konstrukt enthielten. Dargestellt sind zwei exemplarisch ausgewählte infizierte Erythrozyten. Grün gefärbt ist die Fluoreszenz des PfCAP-eCFP. Die Fluoreszenz der PfCDPK1-D212A-YFP ist in rot dargestellt.

(Links) PfCAP-eCFP ist in der parasitophoren Vakuole lokalisiert. An einigen Stellen kam es zu Akkumulationen des Proteins; (Mitte) PfCDPK1-D212A-YFP ist ebenfalls in der parasitophoren Vakuole lokalisiert. Auch hier kam es an einigen Stellen es zu Akkumulationen, die besonders stark in solchen Bereichen auftreten, in denen das tubovesikuläre System aufgebaut wird (weißer Pfeil); (Rechts) Die Überlagerung der Signale (in gelb) zeigt, dass beide Proteine co-lokalisiert sind. Der Größenmarker entspricht 2 µm.

3.2.1.3.3 Doppeltransfektion von 3D7 mit dem Deletionskonstrukt des PfCAP und der PfCDPK1-D212A

Die Transfektion und mikroskopische Untersuchung der Deletionsmutante PfCAP_del_107aa-eCFP wurde wie oben beschrieben durchgeführt (3.2.1.3.2).

Wie in Abb. 3.24 zu sehen, ist das grün dargestellte Fluoreszenzsignal der Deletionsmutante des PfCAP, welcher das postulierte Translokationssignal fehlt, im Zytoplasma des Parasiten zu finden. Das Fluoreszenzsignal der PfCDPK1-D212A-YFP (rot) entspricht wie oben beschrieben (3.2.1.3.2) einer Lokalisation in der parasitophoren Vakuole und dem sich von der parasitophoren Vakuole aufbauenden tubovesikulären System. Die Überlagerung beider Signale deutet nicht auf eine Co-Lokalisation hin. Zwar sind Bereiche in gelb zu erkennen, diese sind jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach auf eine Überlagerung des starken Grünsignals zurückzuführen. Im Gegensatz zum vollständigen PfCAP gelangt dessen Deletionsmutante demnach nicht in die parasitophore Vakuole des Parasiten.

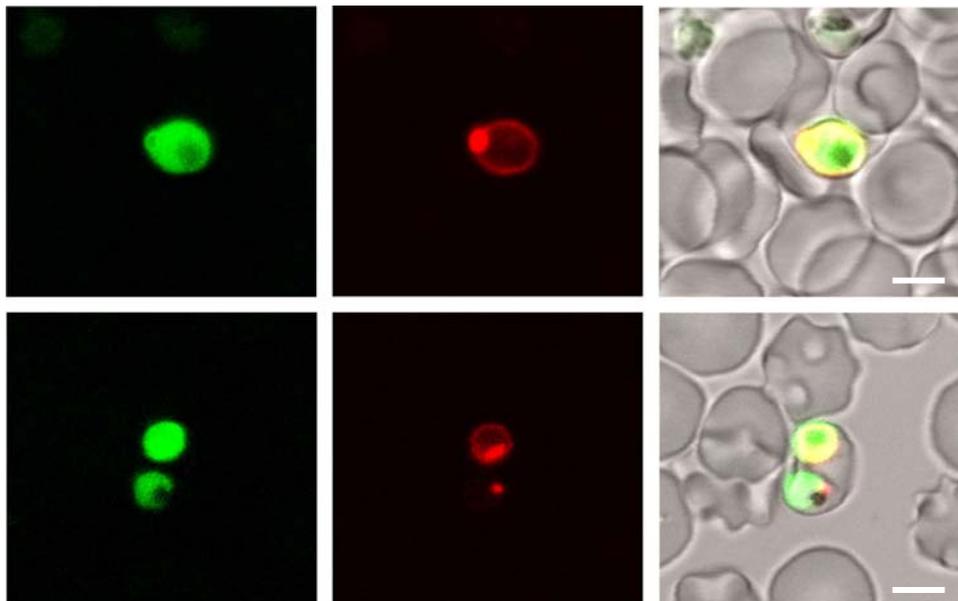


Abb. 3.24: *In vivo* imaging der Co-Transfektanten, die das Deletionskonstrukt des PfCAP sowie das PfCDPK1-D212A-YFP Konstrukt enthielten. Dargestellt sind zwei exemplarisch ausgewählte infizierte Erythrozyten. Die Fluoreszenz der PfCAP-eCFP Deletionsmutante ist in grün, die Fluoreszenz der PfCDPK1-D212A-YFP in rot abgebildet.

(Links) Die PfCAP-eCFP Deletionsmutante ist unter Ausschluss der Nahrungsvakuole (schwarzer Fleck) im gesamten Parasiten verteilt; (Mitte) PfCDPK1-D212A-YFP ist in der parasitophoren Vakuole lokalisiert; (Rechts) Überlagerung beider Fluoreszenzen. Anmerkung: In der unteren Bilderfolge ist unter dem fokussierten Parasit ein zweiter Parasit zu sehen, der jedoch nicht im Fokus lag, so dass die Lokalisation der zu untersuchenden Proteine nicht in derselben Aufnahme bestimmt werden konnte. Der Größenmarker entspricht 4 μm .

3.2.2 *Plasmodium falciparum* „Armadillo repeat rich protein“ (PfARM)

3.2.2.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung des PfARM

In der vorliegenden Arbeit sollte auch für das Protein PfARM untersucht werden, ob es ein Substrat der PfCDPK1 sein könnte.

3.2.2.1.1 Klonierung des Expressionskonstruktes

Ausgehend von 3D7-cDNA wurde ein 840 bp langes PCR-Fragment mit den Oligonukleotiden PfARM.fwd (enthielt eine *Bam*HI-Schnittstelle für die Klonierung in des pBSSK Vektor sowie eine *Nde*I-Schnittstelle für die anschließende Umsetzung in den Vektor pET21a) und PfARM.rev (enthielt eine *Xho*I-Schnittstelle) amplifiziert (Abb. 3.25) und in pBSSK kloniert. Nach erfolgreicher Bestätigung der Identität des Fragments durch Sequenzierung, wurde das Fragment unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Nde*I und *Xho*I in den Expressionsvektor pET21a überführt. Die Klonierungsstrategie ist in Abb. 3.26 bildlich veranschaulicht.

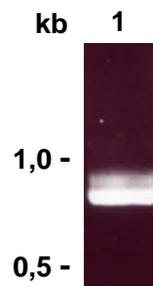


Abb. 3.25: PCR PfARM

(1) 840 bp langes PCR-Produkt der PfARM cDNA, aufgetrennt in einem 0,8%igen Agarosegel.

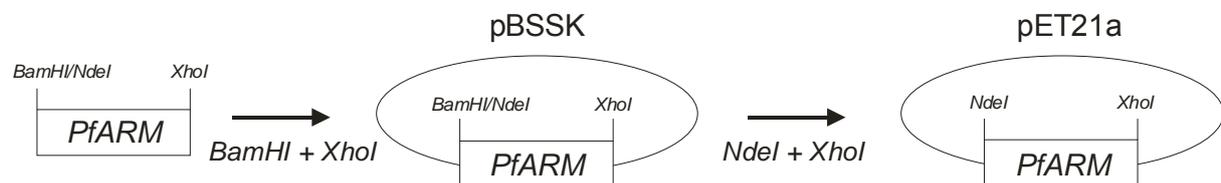


Abb. 3.26: Klonierungsstrategie des PfARM-Expressionskonstrukts

3.2.2.1.2 Optimierung der IPTG-Konzentration und der Expressionsdauer

Die Untersuchung wurde wie bereits unter 3.2.1.1.2 für PfCAP beschrieben durchgeführt. Da sich die Expression nach 6 h als am stärksten herausstellte, sind die Ergebnisse dieses Ansatzes in Abb. 3.27 dargestellt (0,1 mM, 0,5 mM und 1,0 mM IPTG, Spuren 1 bis 3). Eine starke Expression des 36 kDa Proteins PfARM ist in allen drei Spuren zu erkennen. Aufgrund der scheinbar prominentesten Bande in Spur 2 wurden zukünftig alle weiteren Versuchen unter diesen Bedingungen (6 h Induktion mit 0,5 mM IPTG) durchgeführt.

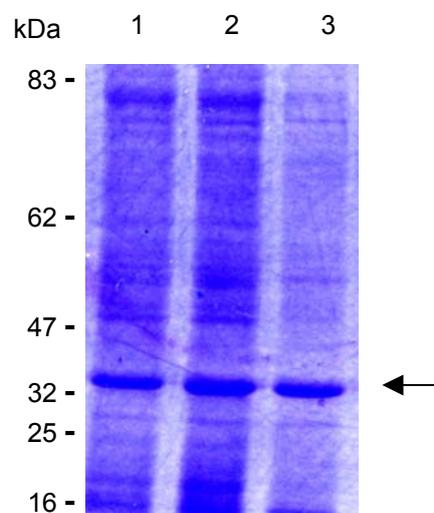


Abb. 3.27: Testexpression des PfARM (36 kDa) zur Optimierung der IPTG Konzentration und der Induktionsdauer (1) 6 h Induktion mit 0,1 mM IPTG; (2) 6 h Induktion mit 0,5 mM IPTG; (3) 6 h Induktion mit 1,0 mM IPTG. Es wurden gleiche Probenvolumina aufgetragen und in einem 10%igen SDS-Gel getrennt.

3.2.2.1.3 Aufreinigung des PfARM

Die Aufreinigung des PfARM wurde mit der Ni-NTA-Säule etabliert. Es wurde die optimale Imidazolkonzentration für das Beladen der Säule ausgetestet (10 bis 30 mM Imidazol). Außerdem wurden die optimalen Imidazol- und NaCl-Konzentrationen für den Waschpuffer bestimmt (s. 3.2.1.1.2). Nach mehreren Tests stellte es sich als effektivste Methode heraus, das Protein in einem Puffer mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 300 mM NaCl und 20 mM Imidazol auf die Säule zu laden. Gewaschen wurde die Säule mit 30 Säulenvolumen 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl und 20 mM Imidazol. Darauf folgte die Elution mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl und 200 mM Imidazol. Die Größe der Elutionsfraktionen betrug jeweils $\frac{1}{2}$ Säulenvolumen. Aus einem Liter induzierter Bakterienkultur konnten ca. 20-25 mg rekombinantes Protein gewonnen werden.

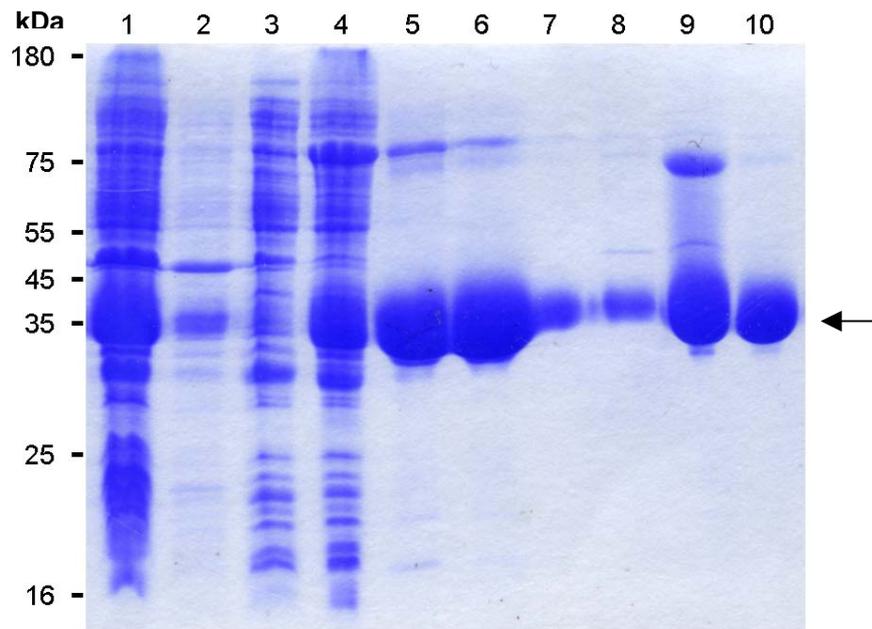


Abb. 3.28: SDS-Gel (12%) der Affinitätsaufreinigung des PfARM mittels Ni-NTA-Agarose (1) Unlösliche Fraktion; (2) löslicher Überstand; (3) Durchfluss durch die Ni-NTA-Säule; (4) Durchfluss nach Waschen mit 20 mM Imidazol-haltigem Waschpuffer; (5 bis 10) Elutionsfraktionen 3 bis 8 mit 200 mM Imidazol-haltigem Elutionspuffer.

Um sicherzugehen, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein wirklich um PfARM handelte, wurde wie bei PfCAP (s. 3.2.1.1.3) eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Der Blot (Abb. 3.29) zeigt, dass das Protein, das in den Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Säule enthalten war, einen His-Tag besaß, also das gewünschte PfARM war.

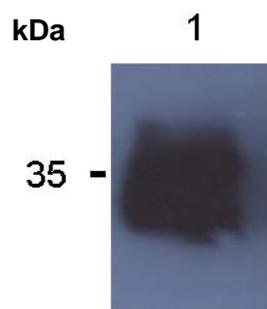


Abb. 3.29: Ausschnitt eines Westernblots nach der Affinitätsaufreinigung von PfARM mittels Ni-NTA-Agarose (1) Verwendet wurde die Elutionsfraktion der Ni-NTA-Säule mit 200 mM Imidazol-haltigem Elutionspuffer. Die Expositionsdauer betrug 30 s. Der Primärantikörper erkannte den His-Tag des rekombinanten PfARM, wodurch dessen Identität bestätigt wurde.

3.2.2.2 PfARM ist ein Substrat der PfCDPK1

Um zu überprüfen, ob es sich bei PfARM um ein Substrat der PfCDPK1 handelt, wurden Phosphorylierungsreaktionen mit 10 µg PfARM und 62 ng PfCDPK1 durchgeführt. Als Positivkontrolle diente erneut eine Kinasereaktion mit 10 µg Casein als Substrat.

Abb. 3.30 zeigt sowohl die Phosphorylierung von Casein als auch von PfARM durch PfCDPK1. Die Phosphorylierung von Casein wurde als 100% Phosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 definiert. PfARM wurde stärker phosphoryliert als das Casein. Der Wert lag im Vergleich zu Casein bei 118%. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Kinase ergab für Casein einen Wert 275 nMol/min/mg und für PfARM einen Wert von 320 nMol/min/mg.

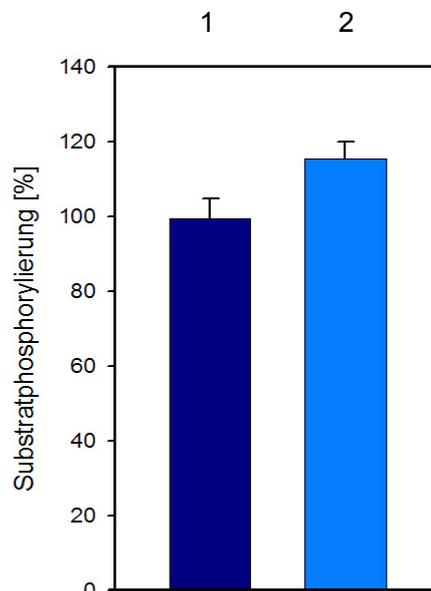


Abb. 3.30: Phosphorylierung des PfARM durch die PfCDPK1

(1) Phosphorylierung der Positivkontrolle (Casein) durch die PfCDPK1: die Phosphorylierung des exogenen Substrats Casein wurde in diesen Messungen als 100% definiert; (2) Phosphorylierung des PfARM durch die PfCDPK1: die Phosphorylierung des PfARM ist auf 118% erhöht im Vergleich zur Phosphorylierung des Caseins. Die angegebenen Werte gingen aus vier voneinander unabhängigen Messungen hervor. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Da am Beispiel von Casein (s. 3.2.1.2) bereits gezeigt werden konnte, dass PfCAP und cAMP einen Einfluss auf die Substratphosphorylierung ausüben können, wurde ein möglicher regulierender Einfluss auch auf die Phosphorylierung des PfARM untersucht (Abb. 3.31). Zu diesem Zweck wurde den Kinasereaktionen mit PfARM entweder PfCAP oder PfCAP und cAMP (100 µM) zugesetzt. Als 100% wurde die Phosphorylierung des PfARM in Abwesenheit von PfCAP bzw. PfCAP und cAMP definiert. Die Zugabe von PfCAP ergab eine Steigerung der Phosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 gegenüber PfARM auf 130% im Vergleich zum Kontrollwert. Wurde der Reaktion neben PfARM sowohl PfCAP als auch cAMP zugesetzt, so verringerte sich die

Phosphorylierung auf 78% im Vergleich zur Phosphorylierung des PfARM in Abwesenheit von PfCAP und cAMP.

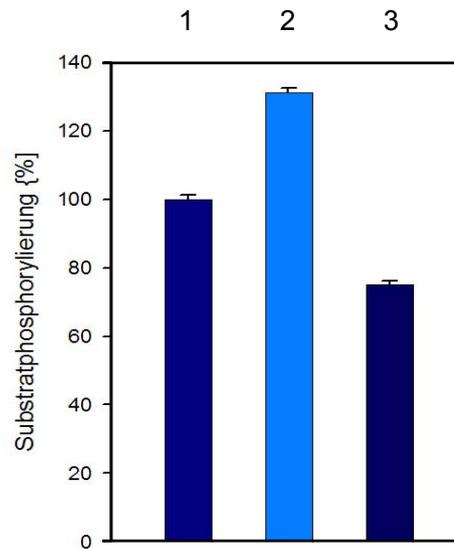


Abb. 3.31: Auswirkung von cAMP und PfCAP auf die Phosphorylierung des PfARM durch die PfCDPK1
 (1) Die Phosphorylierung des PfARM als alleinigem Substrat in der Reaktion durch die PfCDPK1 wurde als 100% definiert; (2) PfARM-Phosphorylierung durch die PfCDPK1 in Gegenwart von PfCAP; (3) PfARM-Phosphorylierung durch die PfCDPK1 in Gegenwart des PfCAP und cAMP. Alle Werte stammen aus vier voneinander unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

3.2.2.2.1 Bestimmung der durch die PfCDPK1 phosphorylierten Aminosäuren in PfARM

Die Untersuchung der Phosphorylierungsstellen in PfARM wurde genau wie unter 3.1.2 beschrieben durchgeführt und ergab, dass die Serine an den Aminosäurepositionen 33 und 36 sowie das Threonin an der Position 27 phosphoryliert wurden. Dies entsprach für das Serin 33 dem Phosphorylierungsmotiv R/KXXS/T der PfCDPK1. Für das Serin 36 konnte das Phosphorylierungsmotiv R/KXS/T identifiziert werden. Bezüglich des Threonins an der Position 27 gelang es mit R/KXXXXXS/T (s. 3.2.1.2.1) ein bis zu dieser Arbeit unbekanntes Phosphorylierungsmotiv der PfCDPK1 zu identifizieren.

```

1  MGNNCCAGRD  LLYKNKLQEF  GIEGSKTIRK  LLSFTSNDIL  RFDKAYDEND
51  VQEFVNLCSS  TCEIEKLEDR  MHPWAADPKT  IGALSATQLA  ILASKENEPH
101 YKDAIREANG  IAVFINLLKS  HELDRVHAAV  VALSFLSVDN  VKNCICMFES
151 GALPYLISGM  KSNIDGMKAA  CAQTCRNIFV  LDKKYKKEFL  KLGGITQLVN
201 LLELPSNYDD  SQPLYTQLEA  IYHLEDFILN  DGDEIPEFLE  AVKNSNSIKN
251 LKTLQQCPEQ  DLAEASNVL  LRLTDHHHHH  H
  
```

Abb. 3.32: Aminosäuresequenz des PfARM mit den identifizierten Phosphorylierungsstellen
 Mit einer massenspektrometrischen Messung konnte gezeigt werden, dass die PfCDPK1 das Serin 33, das Serin 36 sowie das Threonin 27 in PfARM phosphoryliert. Diese phosphorylierten Aminosäuren sind rot markiert und unterstrichen.

3.2.2.3 Transfektion eines PfARM Konstruktes

Durch die Transfektion von *Plasmodium falciparum* mit einem PfARM Konstrukt sollte untersucht werden, ob PfARM über das N-terminale „MGC-basic“-Signalmotiv in die parasitophore Vakuole gelangt.

3.2.2.3.1 Klonierung des PfARM-Konstruktes

Zunächst wurde ausgehend von einem 3D7 cDNA-Klon ein 840 bp langes PCR-Fragment mittels der Primer PfARM.rev und PfARM_XhoI.fwd amplifiziert und für die Sequenzierung in den Vektor pBSSK kloniert. Anschließend wurde das PfARM Fragment über eine Doppelligation zusammen mit dem Gen des Fluorochroms eCFP in den Vektor pCR Blunt-II TOPO[®] eingefügt. Danach wurde das PfARM-eCFP-Konstrukt in den pARL1(+) Vektor umgesetzt. Der verwendete Vektor verlieh eine Resistenz gegen WR99210. Abb. 3.33 verdeutlicht die Klonierungsstrategie.

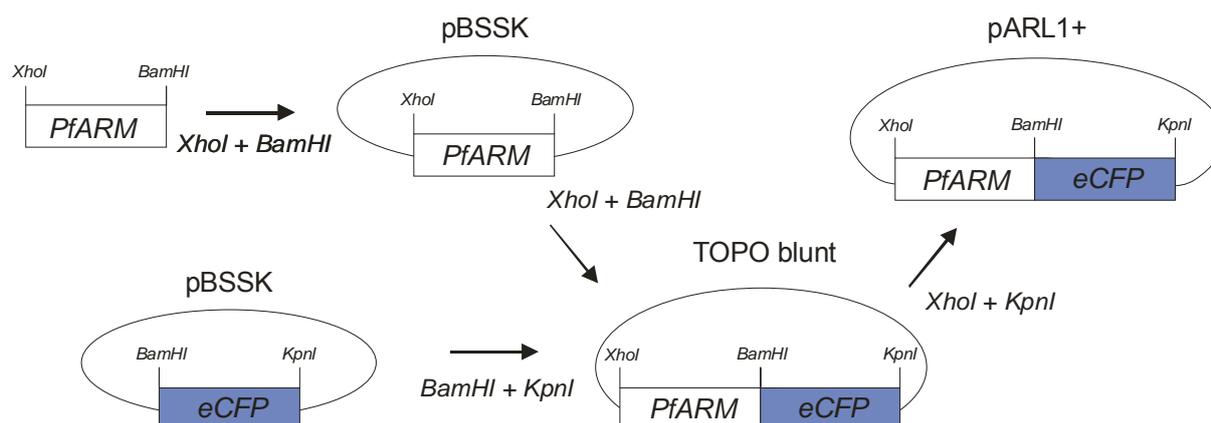


Abb. 3.33: Klonierungsstrategie des PfARM-Transfektionskonstruktes

3.2.2.3.2 Transfektion von 3D7 mit PfARM

Es wurden 3D7 Parasiten mit 150 µg des Vektorkonstruktes transfiziert. Nach einer erfolgreichen Selektion mit WR99210 wurden erste transfizierte Parasiten nach 21 Tagen im Giemsa-Ausstrich positiv identifiziert. Nachdem eine Parasitämie von ca. 8% erreicht war, wurden die Parasiten für die konfokale Mikroskopie vorbereitet. Die zeitgleiche Anregung mit einem Argonlaser bei 458 nm und dem Entertiselaser bei 364 nm ergab ein Fluoreszenzsignal des Konstruktes sowie der mit Höchst 33342 gefärbten DNA des Parasiten. In Abb. 3.34 ist die Fluoreszenz von PfARM-eCFP in grün zu erkennen. Der Zellkern erscheint blau. PfARM-eCFP ist nicht in der parasitophoren Vakuole, sondern im Zytosol des Parasiten lokalisiert.

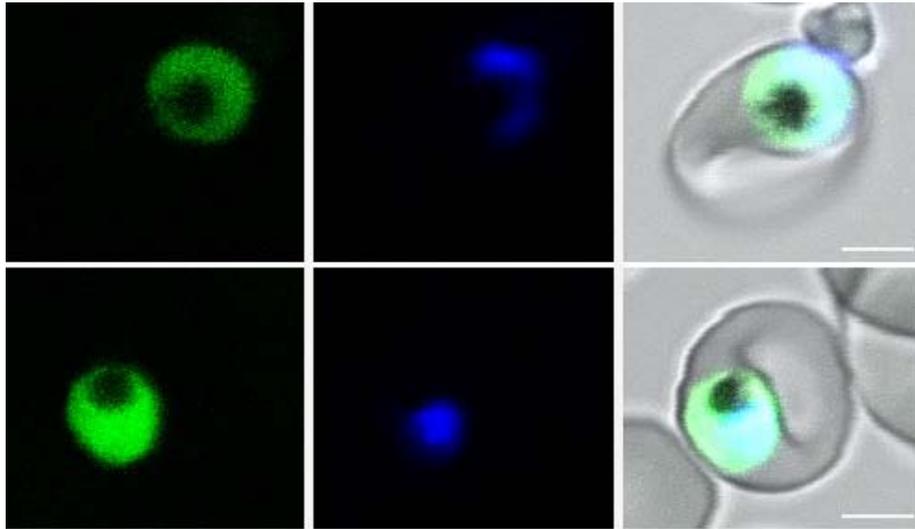


Abb. 3.34: *In vivo* imaging der Transfektanten, die das PfARM-eCFP Konstrukt enthielten. Abgebildet sind zwei exemplarisch ausgewählte infizierte Erythrozyten. Grün dargestellt ist die Fluoreszenz von PfARM-eCFP. (Links) PfARM-eCFP ist im Zytosol der Parasiten lokalisiert; (Mitte) Die DNA des Parasiten ist blau eingefärbt; (Rechts) Überlagerung beider Signale. Der Größenmarker entspricht 2 μ m.

3.2.3 *Plasmodium falciparum* Adenylatkinase (PfADK)

3.2.3.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung der PfADK

Trotz zahlreicher Expressionstests unter verschiedensten Bedingungen (variiert wurden Temperatur, IPTG-Konzentration, Induktionsdauer, Bakterienstamm) gelang es nicht, mit einem pET21a-PfADK Konstrukt lösliche PfADK in einer verwertbaren Form zu erhalten. Daher wurde auf den Expressionsvektor pETM-60 zurückgegriffen, der eine Expression mit einem N-terminalen NusA ermöglicht. NusA besitzt ein hohes Löslichkeitspotential und vermag daher auch die Löslichkeit vieler Fusionspartner zu erhöhen.

3.2.3.1.1 Klonierung des ADK-Expressionskonstruktes

Es wurde, ausgehend von dem bereits für die pET21a Klonierung vorhandenen PfADK cDNA-Klon ein 820 bp langes PCR-Fragment mit den Primern PfADK_BamHI_NcoI.fwd und PfADK_BamHI.rev (2.1.10.1) amplifiziert und über die Schnittstelle des Restriktionsenzym *Bam*HI in den Vektor pBSSK eingefügt (siehe Abb. 3.35). Nachdem die Sequenz verifiziert worden war, konnte die cDNA mit Hilfe des Enzyme *Nco*I und *Bam*HI in den Expressionsvektor pETM-60 überführt werden. Die Klonierungsstrategie ist in Abb. 3.36 zu sehen.

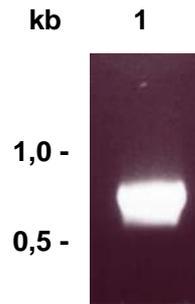


Abb. 3.35: PCR PfADK

(1) 820 bp langes PCR-Produkt des PfADK Fragments im Vektor pBSSK, aufgetrennt in einem 1%igen Agarosegel

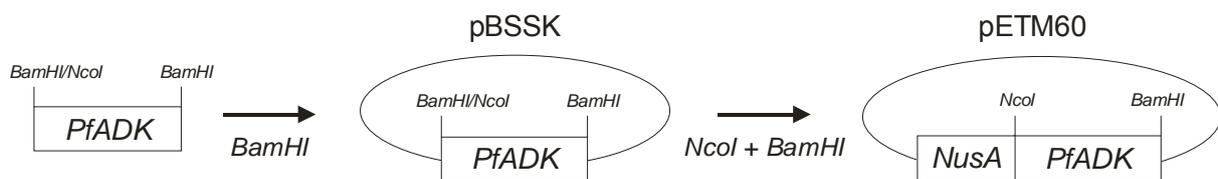


Abb. 3.36: Klonierungsstrategie des Expressionskonstrukts der PfADK

3.2.3.1.2 Optimierung der IPTG-Konzentration und der Expressionsdauer

Die Expressionstests erfolgten wie bereits unter 3.2.1.1.2 beschrieben und führten zu einem rekombinanten NusA-PfADK Fusionsprotein mit einer Größe von etwa 89 kD, wobei die PfADK 30,8 kDa und das NusA 58,4 kDa ausmachte (Abb. 3.37). Es war deutlich erkennbar, dass sowohl durch eine zunehmende IPTG-Konzentration als auch durch eine gesteigerte Expressionsdauer, die Menge an rekombinantem Protein erhöht werden konnte. Die höchste Proteinmenge konnte demnach nach sechsstündiger Induktionsdauer mit 1 mM IPTG erreicht werden.

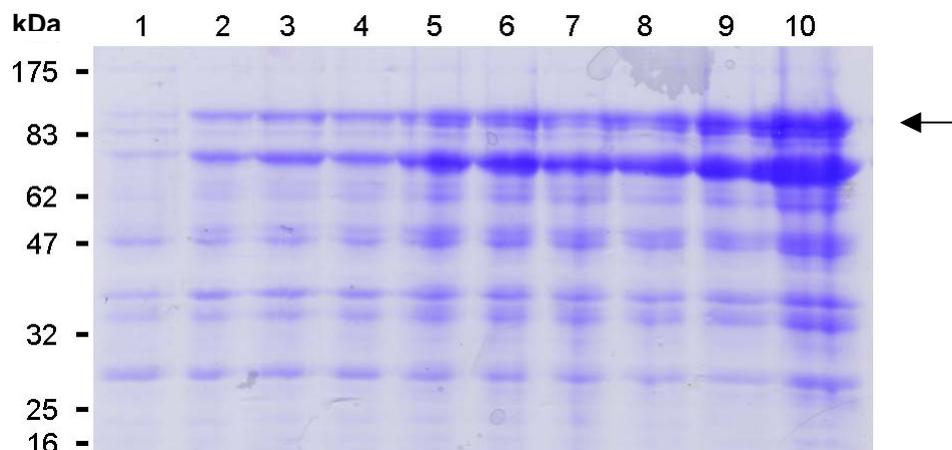


Abb. 3.37: SDS-Gel (12%) der Testexpression der NusA-PfADK

(1) Nicht induzierte Kultur; (2) 1 h Induktion mit 0,1 mM IPTG; (3) 1 h Induktion mit 0,5 mM IPTG; (4) 1 h Induktion mit 1,0 mM IPTG; (5) 3 h Induktion mit 0,1 mM IPTG; (6) 3 h Induktion mit 0,5 mM IPTG; (7) 3 h Induktion mit 1,0 mM IPTG; (8) 6 h Induktion mit 0,1 mM IPTG; (9) 6 h Induktion mit 0,5 mM IPTG; (10) 6 h Induktion mit 1,0 mM IPTG. Um die einzelnen Veränderungen der Testparameter in ihrer Effektivität vergleichen zu können, wurden jeweils gleiche Probenvolumina aufgetragen.

Da die erhaltenen Mengen der NusA-PfADK in Abb. 3.37 noch keine Rückschlüsse auf den tatsächlichen Gehalt an löslichem und somit verfügbarem Protein zuließen, wurden die löslichen und unlöslichen Proteinbestandteile der Testexpression wie unter 3.2.1.1.2 beschrieben analysiert. Die daraus folgenden Proteinverteilungen sind in Abb. 3.38a und Abb. 3.38b dargestellt.

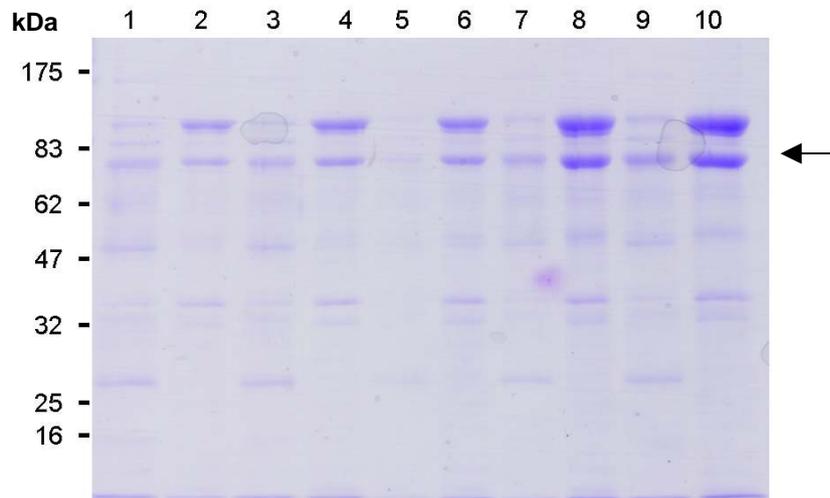


Abb 3.38a: erster Teil des Löslichkeitstests der NusA-PfADK

(1) Lösliche Fraktion nach 1 h und 0,1 mM IPTG-Induktion; (2) unlösliche Fraktion nach 1 h und 0,1 mM IPTG-Induktion; (3) lösliche Fraktion nach 1 h und 0,5 mM IPTG-Induktion; (4) unlösliche Fraktion nach 1 h und 0,5 mM IPTG-Induktion; (5) lösliche Fraktion nach 1 h und 1,0 mM IPTG-Induktion; (6) unlösliche Fraktion nach 1 h und 1,0 mM IPTG-Induktion; (7) lösliche Fraktion nach 3 h und 0,1 mM IPTG-Induktion; (8) unlösliche Fraktion nach 3 h und 0,1 mM IPTG-Induktion; (9) lösliche Fraktion nach 3 h und 0,5 mM IPTG-Induktion; (10) unlösliche Fraktion nach 3 h und 0,5 mM IPTG-Induktion. Auf einem 12%igen SDS-Gel wurden gleiche Volumina der löslichen und unlöslichen Fraktionen aufgetragen.

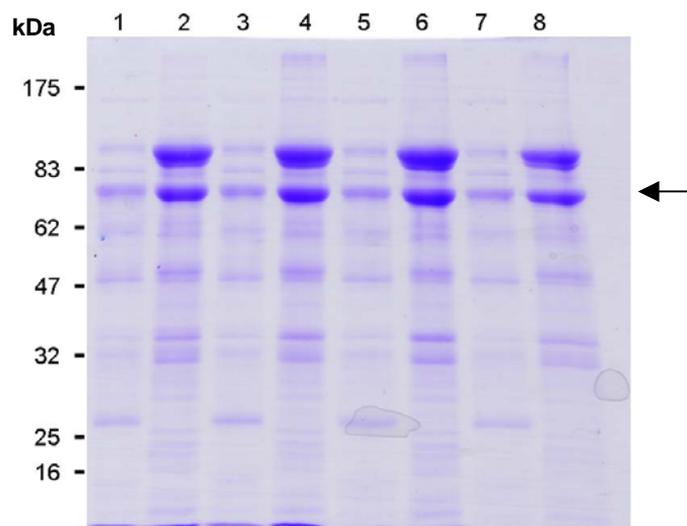


Abb 3.38b: zweiter Teil des Löslichkeitstests von NusA-PfADK

(1) Lösliche Fraktion nach 3 h und 1,0 mM IPTG-Induktion; (2) unlösliche Fraktion nach 3 h und 1,0 mM IPTG-Induktion; (3) lösliche Fraktion nach 6 h und 0,1 mM IPTG-Induktion; (4) unlösliche Fraktion nach 6 h und 0,1 mM IPTG-Induktion; (5) lösliche Fraktion nach 6 h und 0,5 mM IPTG-Induktion; (6) unlösliche Fraktion nach 6 h und 0,5 mM IPTG-Induktion; (7) lösliche Fraktion nach 6 h und 1,0 mM IPTG-Induktion; (8) unlösliche Fraktion nach 6 h und 1,0 mM IPTG-Induktion. Auf einem 12%igen SDS-Gel wurden gleiche Volumina der löslichen und unlöslichen Fraktionen aufgetragen.

Es war auch beim Löslichkeitstest deutlich zu erkennen, dass sowohl die Steigerung der IPTG-Konzentration als auch die Verlängerung der Induktionszeit zu einer Erhöhung der Menge an löslichem Protein führte. Die höchsten Mengen an löslichem Protein wurden nach sechsständiger Induktion mit 0,5 und 1,0 mM IPTG erzielt. Da sich die beiden Proben bezüglich ihres Gehalts an löslichem Protein kaum unterschieden, wurden alle weiteren Experimente mit einer IPTG-Konzentration von 0,5 mM und einer Induktionszeit von sechs Stunden durchgeführt.

Der größte Anteil der rekombinanten NusA-PfADK befand sich weiterhin in der unlöslichen Fraktion. Die Anwesenheit des NusA konnte also die Löslichkeit des Fusionsproteins nur bedingt verbessern. Dies bestätigte die unter 3.2.3.1 für das pET21-System beschriebenen Probleme und erschwerte die Gewinnung größerer Mengen löslicher rekombinanter PfADK.

3.2.3.1.3 Aufreinigung der NusA-PfADK

Zur Aufreinigung der NusA-PfADK diente eine Säule mit Ni-NTA-Agarose. Bei der Etablierung der Aufreinigung zeigte sich, dass das Protein bereits ab einer Imidazolkonzentration von 20 mM von der Säule verdrängt wurde. Daraus ergaben sich für die Aufreinigung folgende Parameter: Das Protein wurde mit einer Imidazolkonzentration von 10 mM Imidazol auf die Säule geladen. Als Waschpuffer wurden 30 Säulenvolumen mit 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl und 50 mM Tris/HCl pH 8,0 verwendet. Eluiert wurde mit einem Puffer, der mit 150 mM Imidazol, 300 mM NaCl und 50 mM Tris/HCl pH 8,0 versetzt war. Für einen Expressionsansatz von einem Liter Bakterienkultur diente zur Aufreinigung ein Säulenvolumen von 1 ml Ni-NTA-Agarose. Es konnten ca. 40 µg lösliches, rekombinantes NusA-PfADK aus einem Liter Bakterienkultur gewonnen werden. Abb. 3.39 zeigt den Verlauf der Expression von der nicht induzierten Kultur (Spur 1) bis hin zur Elution von der Ni-NTA-Säule (Spuren 6 bis 8). Deutlich zu erkennen ist die Induktion der Proteinexpression in Spur 2 (im Vergleich zu Spur 1). Auffällig ist die stark gefärbte und scheinbar nicht ausreichend aufgetrennte unlösliche Fraktion der NusA-PfADK in Spur 4. Dieses Phänomen ist vermutlich durch zu große Proteinmengen bzw. einen zu hohen Salzgehalt der Probe zu erklären. Die Aufreinigung über die Ni-NTA-Säule führte zu einem hohen Reinheitsgrad der NusA-PfADK. Abgesehen von leichten Verunreinigungen durch Fremdproteine im Bereich von ca. 28 kD, die besonders in Spur 8 erkennbar sind, konnten sämtliche anderen unerwünschten Proteine mit der Waschfraktion abgeschieden werden (Spur 5).

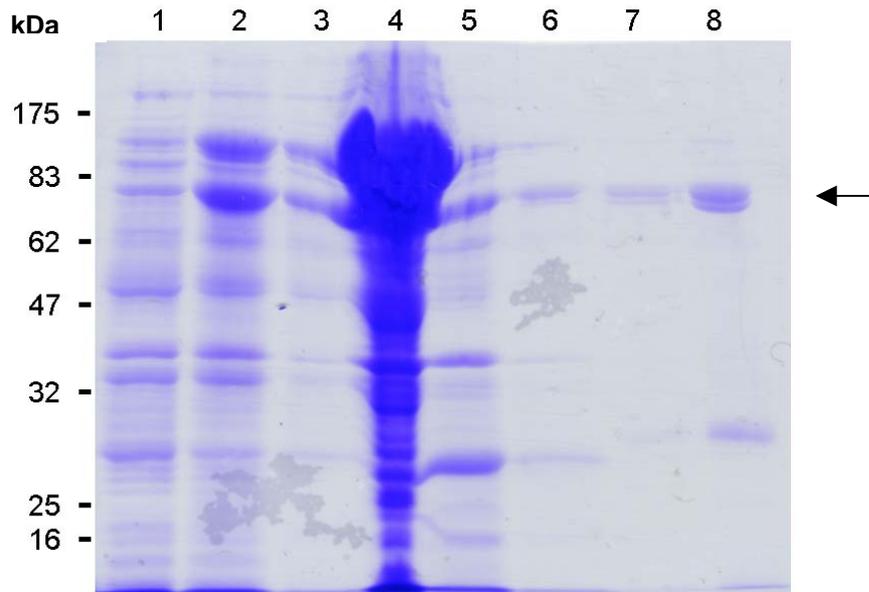


Abb. 3.39: SDS-Gel (12%) der Affinitätsaufreinigung der NusA-PfADK mittels Ni-NTA-Agarose (1) Nicht induzierte Kultur; (2) Kultur nach 6 h Induktion mit 0,5 mM IPTG; (3) löslicher Überstand; (4) unlösliche, pelletierte Phase; (5) Durchfluss nach Waschen mit 20 mM Imidazol-haltigem Waschpuffer; (6-8) Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol-haltigem Elutionspuffer. Es wurden gleiche Probenvolumina in den einzelnen Spuren aufgetragen. Dies erklärt die zu hohe Proteinmenge in Spur 4.

Auch die Identität der NusA-PfADK wurde wie beschrieben (s. 3.2.1.1.3) mittels eines Westernblots überprüft. Die über die Ni-NTA-Säule aufgereinigte rekombinante NusA-PfADK wurde dabei von dem Primärantikörper anhand des C-terminalen His-Tags detektiert und somit verifiziert, dass es sich um das gewünschte Protein handelte (Abb. 3.40).

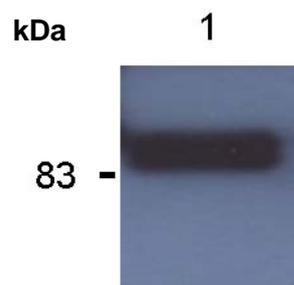


Abb. 3.40: Ausschnitt eines Westernblots nach der Affinitätsreinigung der NusA -PfADK mittels Ni-NTA-Agarose (1) Bei dem isolierten Protein handelte es sich tatsächlich um die NusA-PfADK, wie durch die positive Reaktion des anti-His-Tag Antikörpers gezeigt werden konnte.

3.2.3.2 Bestimmung der durch die PfCDPK1 phosphorylierten Aminosäuren in PfADK

Da geklärt werden musste, ob die PfCDPK1 auch Aminosäuren in NusA phosphoryliert, wurden vor der Durchführung radioaktiver Phosphorylierungsreaktionen zunächst die Phosphorylierungsstellen im Fusionsprotein NusA-PfADK bestimmt. Hierzu wurde mit dem aufgereinigten

NusA-PfADK eine Standardkinasereaktion mit PfCDPK1 durchgeführt (vgl. 3.1.2). Bei dieser Analyse gelang es, in der PfADK zwei durch die PfCDPK1 phosphorylierte Aminosäuren zu identifizieren. Phosphoryliert wurden das Serin an Aminosäureposition 12 sowie das Threonin an Position 13. Dies entsprach für das Serin 12 dem Phosphorylierungsmotiv R/KXS/T der PfCDPK1. Für das Threonin 13 konnte R/KXXS/T als Phosphorylierungsmotiv der PfCDPK1 identifiziert werden. Die Analyse ergab außerdem, dass 17 Aminosäuren im NusA Protein phosphoryliert wurden. Dies machte direkte quantitative Phosphorylierungsreaktionen mit dem Fusionsprotein NusA-PfADK unmöglich, da der große Anteil an phosphorylierten Aminosäuren in NusA das Ergebnis zu stark verfälscht hätte.

```

1  MGSCYSRKNK VSTISLDEEE KKKEKKKKKK IYILNGASGS GKDTQCRLLE
51  KKYNYKIICI SKLLKEYKEE YNKENVLNEE ENYFDEIEKC MIDGSLVNDQ
101 IVIEIFHKQL NKYINDDKYN GIIINGFPRN YEQALLIIQN NISITKFINI
151 QVGKDTLWTR INNRIIDPIT NISYNENIIQ IIKKKREGQE LSDKEQKQLI
201 IDNHLYNNLS NDILERLTRK KDDEEQVFNK RFQLYIESEQ KINSLFKNIC
251 KNVDGEKSIN DIFDQICSII DDNPN

```

Abb. 3.41: Aminosäuresequenz der PfADK (ohne NusA)

Mit einer massenspektrometrischen Messung konnte gezeigt werden, dass die PfCDPK1 das Serin 12 und das Threonin 13 in der PfADK phosphorylierte. Diese phosphorylierten Aminosäuren sind rot markiert und unterstrichen.

3.2.3.3 Transfektion eines PfADK Konstruktes

Da sich auch die PfADK durch den Besitz eines N-terminalen „MGC-basic“-Signalmotivs auszeichnet, sollte gezeigt werden, ob die PfADK ebenfalls in die parasitophore Vakuole gelangt.

3.2.3.3.1 Klonierung des PfADK Konstruktes

Wie oben bereits für das Expressionskonstrukt beschrieben (s. 3.2.3.3.1), wurde ein 820 bp langes PCR-Fragment, jedoch diesmal mittels der Primer PfADK_XhoI.fwd und PfADK_BamHI.rev, amplifiziert und für die Sequenzierung in den Vektor pBSSK kloniert. Anschließend wurde das PfADK Fragment über eine Doppelligation zusammen mit dem Gen des Fluorochroms eCFP in den Vektor pCR Blunt-II TOPO[®] eingefügt. Danach wurde das PfADK-eCFP-Konstrukt in den pARL1(+) Vektor umgesetzt. Abb. 3.42 veranschaulicht den Klonierungsweg.

Zusätzlich wurde ein Deletionskonstrukt der PfADK erstellt, bei dem die ersten 29 Aminosäuren und somit das „MGC-basic“-Signalmotiv fehlte. Als Primer dienten PfADK_del_29aa_XhoI.fwd und PfADK_BamHI.rev. Die Klonierungsstrategie war mit der oben beschriebenen identisch.

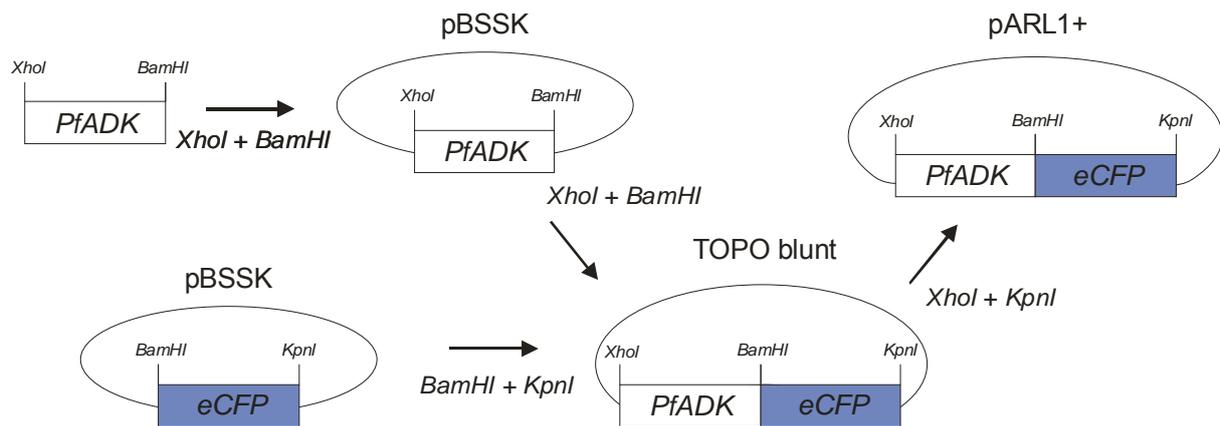


Abb 4.42: Klonierungsstrategie des PfADK-Transfektionskonstrukts

3.2.3.3.2 Doppeltransfektion von 3D7 mit PfADK und PfCDPK1-D212A

Es wurden 3D7 Parasiten mit jeweils 75 µg der Vektorkonstrukte PfADK-eCFP und PfCDPK1-D212A-YFP transfiziert. Nach der Selektion mit WR99210 und Blasticidin S wurden nach 26 Tagen erste transfizierte Parasiten im Giemsa-Ausstrich nachgewiesen. Nach dem Erreichen einer Parasitämie von 7%, wurde eine mikroskopische Untersuchung der Transfektanten durchgeführt (vgl. 3.2.1.3.2). In Abb. 3.43 ist die Fluoreszenz der PfADK-eCFP in grün zu erkennen, die Fluoreszenz der PfCDPK1-D212A-YFP ist rot dargestellt. Beide Proteine sind in der parasitophoren Vakuole co-lokalisiert.

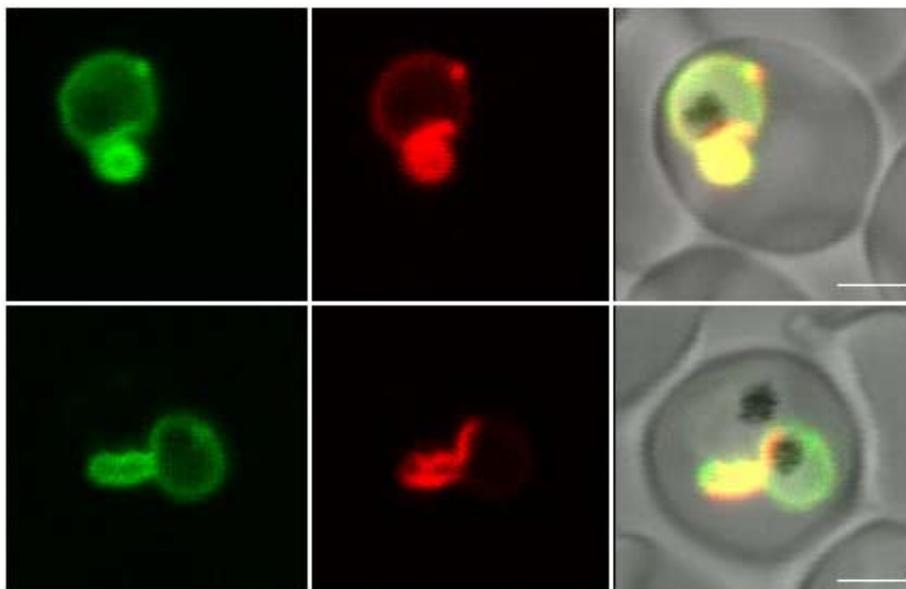


Abb. 3.43: *In vivo* imaging der Co-Transfektanten, die das PfADK-eCFP und PfCDPK1-D212A-YFP Konstrukt enthielten. Gezeigt an zwei exemplarisch ausgewählten infizierten Erythrozyten. Grün dargestellt ist die Fluoreszenz der PfADK-eCFP, rot dargestellt ist die Fluoreszenz der PfCDPK1-D212A-YFP (Links) PfADK-eCFP ist in der parasitophoren Vakuole lokalisiert. An einigen Stellen kam es zu Akkumulationen; (Mitte) PfCDPK1-D212A-YFP ist ebenfalls in der parasitophoren Vakuole lokalisiert. Auch hier kam es zu starken Akkumulationen im Bereich des tubovesikulären Systems; (Rechts) Die Überlagerung der Signale (in gelb) zeigt, dass beide Proteine co-lokalisiert sind. Der Größenmarker entspricht 2 µm.

3.2.3.3.3 Doppeltransfektion von 3D7 mit dem Deletionskonstrukt der PfADK und der PfCDPK1-D212A

Die Transfektion und die mikroskopische Untersuchung der Deletionsmutante der PfADK PfADK_del_27aa-eCFP wurde wie oben beschrieben durchgeführt (3.2.3.3.2).

Wie für die Deletionsmutante des PfCAP (vgl. 3.2.1.3.3) bereits gezeigt, führte das Fehlen des „MGC-basic“-Signalmotiv auch bei der PfADK dazu, dass das Protein nicht mehr in die parasitophore Vakuole gelangte, sondern im Zytoplasma verteilt aufzufinden war. Auch hier konnte daher keine Co-Lokalisation mit der PfCDPK1-D212A-YFP festgestellt werden (Abb. 3.44).

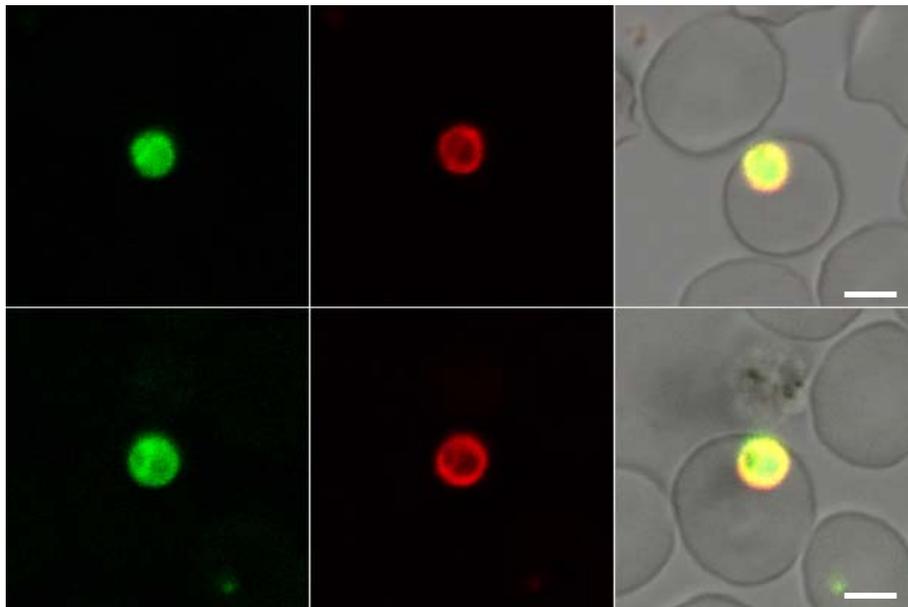


Abb. 3.44: *In vivo* imaging der Co-Transfektanten, die das Deletionskonstrukt PfADK_del_27aa-eCFP sowie das PfCDPK1-D212A-YFP Konstrukt enthielten. Gezeigt an zwei exemplarisch ausgewählten infizierten Erythrozyten. Grün dargestellt ist die Fluoreszenz des PfADK_del_27aa-eCFP. Rot dargestellt ist die Fluoreszenz der PfCDPK1-D212A-YFP.

(Links) Die PfADK_del_27aa-eCFP ist im gesamten Zytoplasma des Parasiten verteilt; (Mitte) Die PfCDPK1-D212A-YFP ist in der parasitophoren Vakuole lokalisiert; (Rechts) Überlagerung beider Fluoreszenzen. Der Größenmarker entspricht 2 μm .

3.2.3.3.4 „Fluorescence resonance energy transfer“ (FRET)

Aufgrund der Co-Lokalisation der PfADK-eCFP und der PfCDPK1-D212A-YFP in der parasitophoren Vakuole (vgl. 3.2.3.3.2) wurde mit den Doppeltransfektanten eine FRET-Analyse durchgeführt, um Aufschluss über die räumliche Nähe der beiden Proteine zu erhalten.

Bei dieser FRET-Analyse wurde die Energie des Donor-Fluors eCFP auf das Akzeptor-Fluor YFP übertragen (Abb. 3.45). Der Donor eCFP wurde durch Licht der Wellenlänge 456 nm (blau) angeregt. Der größte Teil seiner Energie wurde jedoch nicht für die Emission von >480 nm (cyanblau) verwendet, sondern durch FRET auf den Akzeptor YFP übertragen, der ausschließlich durch

diesen Energietransfer des eCFP angeregt wurde. Als Folge erschien das eigene eCFP Signal sehr schwach, da hauptsächlich gelbes Licht (>525 nm) emittiert wurde. Dies zeigte, dass die beiden rekombinanten Proteine PfADK-eCFP und PfCDPK1-D212A-YFP nicht nur auf mikroskopischer Ebene co-lokalisiert waren, sondern auch in unmittelbarer molekularer Nachbarschaft zueinander lagen. Der Abstand beider Proteine betrug demnach nur wenige Nanometer. Der FRET-Wert lag bei der oberen Bilderfolge bei 1,69, bei der unteren Bilderfolge bei 1,2. Ein Wert von >1 wird als FRET bezeichnet.

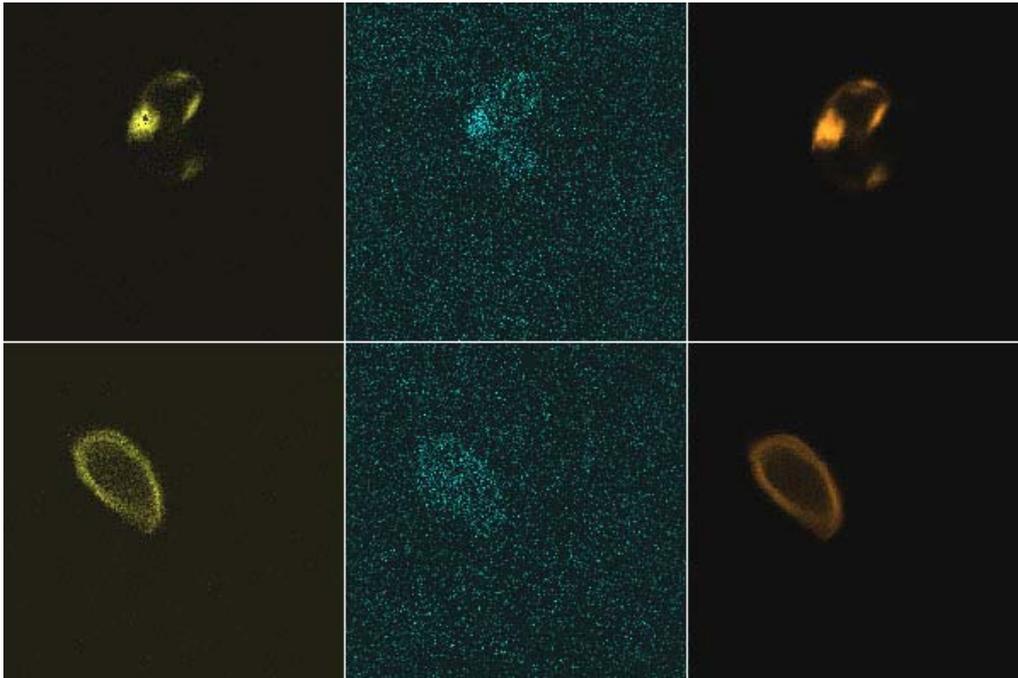


Abb.3.45: FRET-Analyse der PfADK-eCFP und der PfCDPK1-D212A-YFP (Links) Signal des Akzeptors YFP; (Mitte) Signal des Donors eCFP; (Rechts) FRET-Signal.

3.2.4 Plasmodium falciparum GTPase (Pfrab_5b)

3.2.4.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung des Pfrab_5b

3.2.4.1.1 Klonierung des Expressionskonstruktes

Es wurde ausgehend von 3D7 cDNA ein 624 bp langes PCR-Produkt (Abb. 3.46) mit den Oligonukleotiden Pfrab_5b.fwd (enthielt eine *Bam*HI-Schnittstelle für die Klonierung in den Vektor pBSSK sowie eine *Nde*I-Schnittstelle für die anschließende Umsetzung in den Vektor pET21a) und Pfrab_5b.rev (enthielt eine *Xho*I-Schnittstelle) amplifiziert und zunächst in den Vektor pBSSK

eingesetzt. Nach erfolgreicher Bestätigung der Identität des Fragments durch Sequenzierung wurde es unter Verwendung der Restriktionsenzyme *XhoI* und *NdeI* in den Expressionsvektor pET21a überführt. Die Klonierungsstrategie ist in Abb. 3.47 bildlich veranschaulicht.

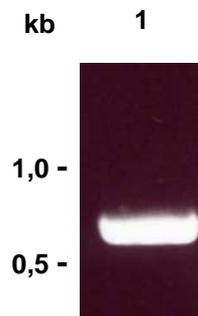


Abb. 3.46: PCR Pfrab_5b

(1) Das 624 bp lange PCR-Produkt der Pfrab_5b cDNA wurde aufgetrennt in einem 0,8%igen Agarosegel.

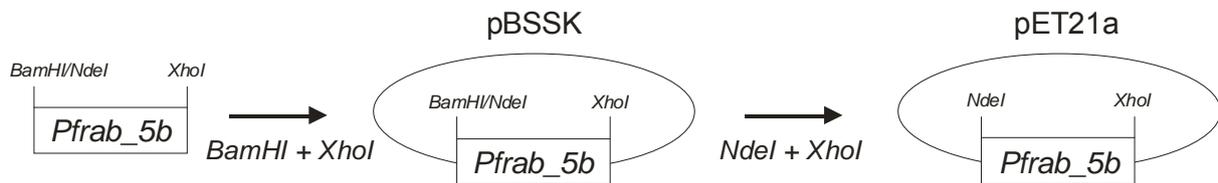


Abb. 3.47: Klonierungsstrategie des Pfrab_5b Expressionskonstrukts

3.2.4.1.2 Optimierung der IPTG-Konzentration und der Expressionsdauer

Der Expressionstest wurde wie unter 3.2.1.1.2 beschrieben durchgeführt. Die berechnete Molekülmasse von Pfrab_5b betrug 28 kDa. Die Proteinmenge steigerte sich leicht mit zunehmender Expressionsdauer (Abb. 3.48). Daher wurde nach sechsstündiger Induktion mit 0,1 mM, 0,5 mM und 1,0 mM IPTG ein Proteingel hergestellt und das Protein in seine löslichen und unlöslichen Anteile aufgetrennt.

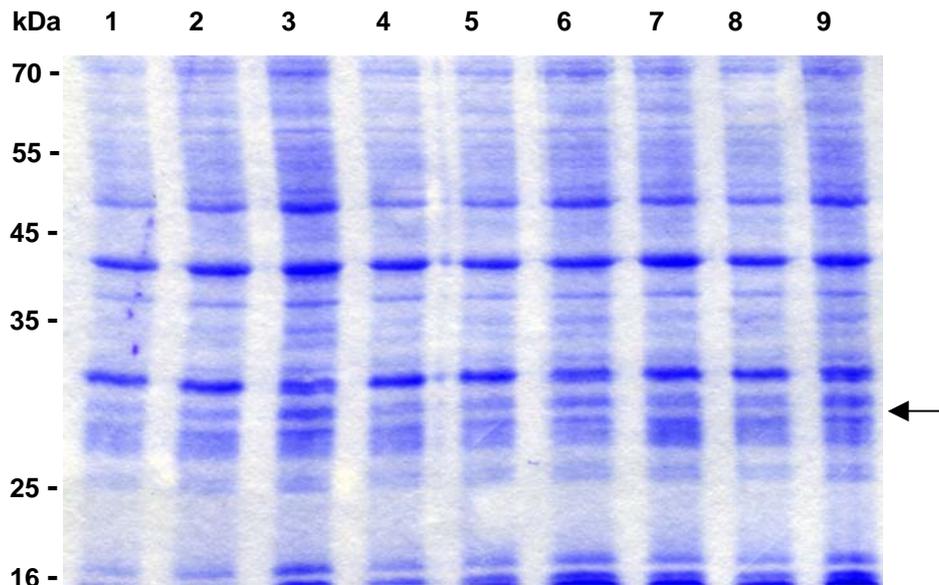


Abb. 3.48: Testexpression des Pfrab_5b (28 kDa)

(1) 1 h Induktion mit 0,1 mM IPTG; (2) 1 h Induktion mit 0,5 mM IPTG; (3) 1 h Induktion mit 1,0 mM IPTG; (4) 3 h Induktion mit 0,1 mM IPTG; (5) 3 h Induktion mit 0,5 mM IPTG; (6) 3 h Induktion mit 1,0 mM IPTG; (7) 6 h Induktion mit 0,1 mM IPTG; (8) 6 h Induktion mit 0,5 mM IPTG; (9) 6 h Induktion mit 1,0 mM IPTG. Es wurden jeweils gleiche Probenvolumina auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen.

Die Untersuchung der löslichen und unlöslichen Bestandteile erfolge wie beschrieben (3.2.1.1.2). Dabei waren größere Proteinmengen in den pelletierten Anteilen zu erkennen. Die Menge nahm mit steigender IPTG-Konzentration leicht zu (Abb. 3.49). Der Proteinanteil im löslichen Überstand war erheblich geringer, dennoch ist auch hier rekombinantes Protein zu erkennen. Da die Ausbeute bei sechsstündiger Induktion mit 1,0 mM IPTG am größten zu sein schien, wurden alle weiteren Schritte unter diesen Bedingungen durchgeführt.

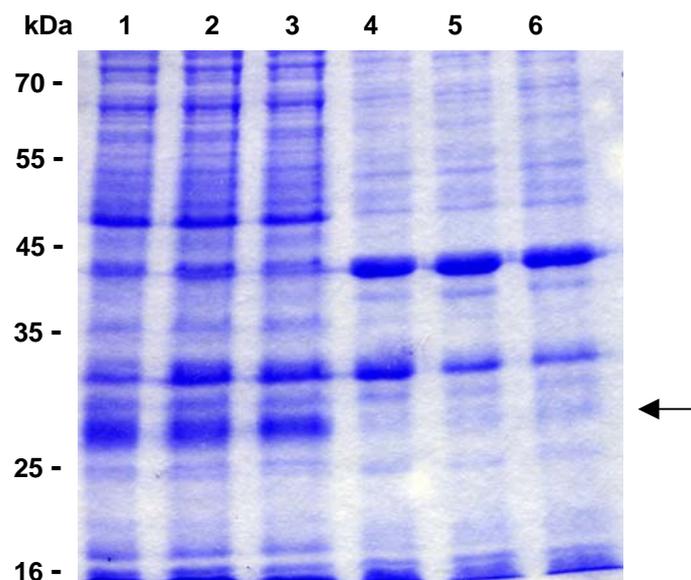


Abb. 3.49: Löslichkeitstest des Pfrab_5b nach sechsstündiger Induktion

(1) lösliche Fraktion 6 h induziert mit 0,1 mM IPTG; (2) lösliche Fraktion 6 h induziert mit 0,5 mM IPTG; (3) lösliche Fraktion 6 h induziert mit 1,0 mM IPTG; (4) unlösliche Fraktion 6 h induziert mit 0,1 mM IPTG; (5) unlösliche Fraktion 6 h induziert mit 0,5 mM IPTG; (6) unlösliche Fraktion 6 h induziert mit 1,0 mM IPTG. Es wurden jeweils gleiche Probenvolumina auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen.

3.2.4.1.3 Aufreinigung des Pfrab_5b

Die Aufreinigung des Pfrab_5b wurde mit der Ni-NTA-Säule wie unter 3.2.1.1.3 für PfCAP beschrieben etabliert. Nach mehreren Tests wurden die folgenden Bedingungen für die Aufreinigung bestimmt. Das Protein wurde in einem Puffer mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 300 mM NaCl und 20 mM Imidazol auf die Säule geladen. Gewaschen wurde die Säule mit 30 Säulenvolumen 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl und 35 mM Imidazol. Darauf folgte die Elution mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl und 200 mM Imidazol. Die Größe der Elutionsfraktionen betrug jeweils $\frac{1}{2}$ Säulenvolumen. Aus einem Liter induzierter Kultur konnten lediglich 0,5 mg rekombinantes Protein gewonnen werden, siehe Abb. 3.50

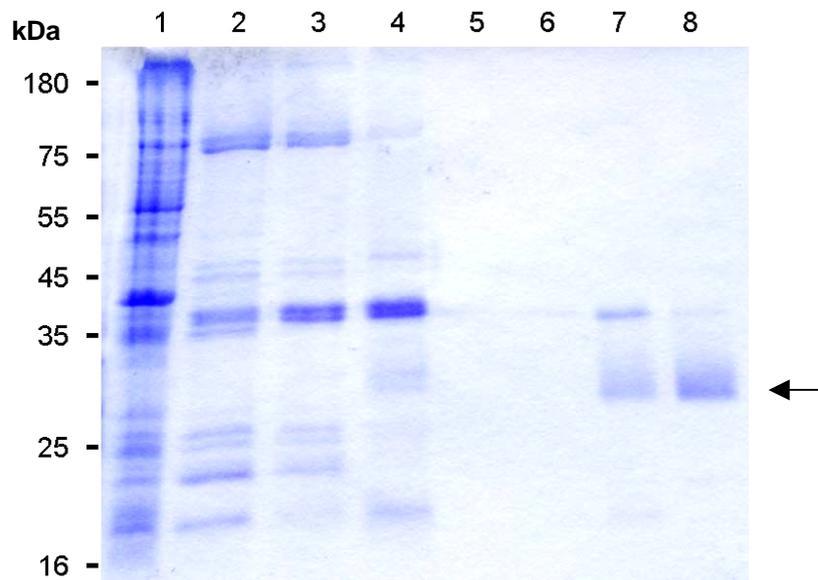


Abb. 3.50: SDS-Gel (12%) der Affinitätsaufreinigung von Pfrab_5b mittels Ni-NTA-Agarose (1) Unlösliche Fraktion; (2) löslicher Überstand; (3) Durchfluss durch die Ni-NTA-Säule; (4) Durchfluss nach Waschen mit 35 mM Imidazol-haltigem Waschpuffer; (5 bis 8) Elutionsfraktionen mit 200 mM Imidazol-haltigem Elutionspuffer.

Die Identität des aufgereinigten Pfrab_5b wurde mittels Westernblot-Analyse (Abb. 3.51) mit einem Antikörper gegen den His-Tag des rekombinanten Proteins bestätigt (vgl. 3.2.1.1.3).

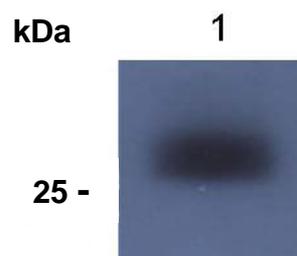


Abb. 3.51: Ausschnitt eines Westernblot nach der Affinitätsreinigung von Pfrab_5b mittels Ni-NTA-Agarose (1) Die aufgereinigte Pfrab_5b Bande wird von dem Maus-anti-6xHis Antikörper detektiert.

3.2.4.2 Pfrab_5b ist ein Substrat der PfCDPK1

Wie für die vorherigen Proteine beschrieben, wurde in Kinasereaktionen untersucht, ob Pfrab_5b ein Substrat der PfCDPK1 ist (vgl. 3.2.1.2). In die eine Reaktion wurden 10 µg Pfrab_5b und 62 ng PfCDPK1 eingesetzt. Als Positivkontrolle diente eine Kinasereaktion mit 10 µg Casein. Abb. 3.52 zeigt sowohl die Phosphorylierung des Caseins als auch des Pfrab_5b durch die PfCDPK1. Die Phosphorylierung des Caseins wurde standardmäßig als 100% Phosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 definiert. Die Phosphorylierung von Pfrab_5b durch PfCDPK1 lag bei 1,8%. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Kinase ergab für Casein einen Wert 275 nMol/min/mg und für Pfrab_5b einen Wert von 5,3 nMol/min/mg,

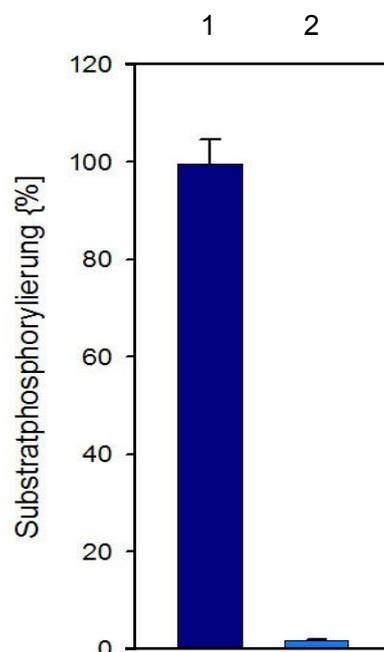


Abb. 3.52: Phosphorylierung des Pfrab_5b durch die PfCDPK1
(1) Phosphorylierung von Casein (Positivkontrolle) durch die PfCDPK1 (2) Phosphorylierung von Pfrab_5b durch die PfCDPK1. Die Phosphorylierung des exogenen Substrats Casein durch die PfCDPK1 wurde bei diesen Messungen als 100% definiert. Die Phosphorylierung von Pfrab_5b durch die PfCDPK1 ist um 98,2% geringer als die Phosphorylierung von Casein. Die angegebenen Werte gingen aus vier voneinander unabhängigen Messungen hervor. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

3.2.4.3 Transfektion eines Pfrab_5b-Konstruktes

3.2.4.3.1 Klonierung des Transfektionskonstruktes

Zunächst wurde von einem 3D7 cDNA-Klon ausgehend ein 624 bp langes PCR-Fragment mittels der Primer Pfrab_5b_XhoI.fwd und Pfrab_5b_BamHI.rev amplifiziert und für die Sequenzierung in den Vektor pBSSK kloniert. Anschließend wurde das Pfrab_5b Fragment mittels einer Doppelli-

gation zusammen mit dem Gen des Fluorochroms eCFP in den Vektor pCR Blunt-II TOPO® eingefügt. Danach wurde das Pfrab_5b-eCFP-Konstrukt in den pARL1(+) Vektor umgesetzt. Abb. 3.53 veranschaulicht den Klonierungsweg bildlich.

Zusätzlich wurde ein Konstrukt von Pfrab_5b erstellt, dessen Aminosäuresequenz lediglich aus dem „MGC-basic“-Signalmotiv bestand. Als Primer dienten Pfrab_5b_XhoI.fwd und Pfrab_5b_leader_BamHI.rev. Die Klonierungsstrategie war mit der oben beschriebenen identisch.

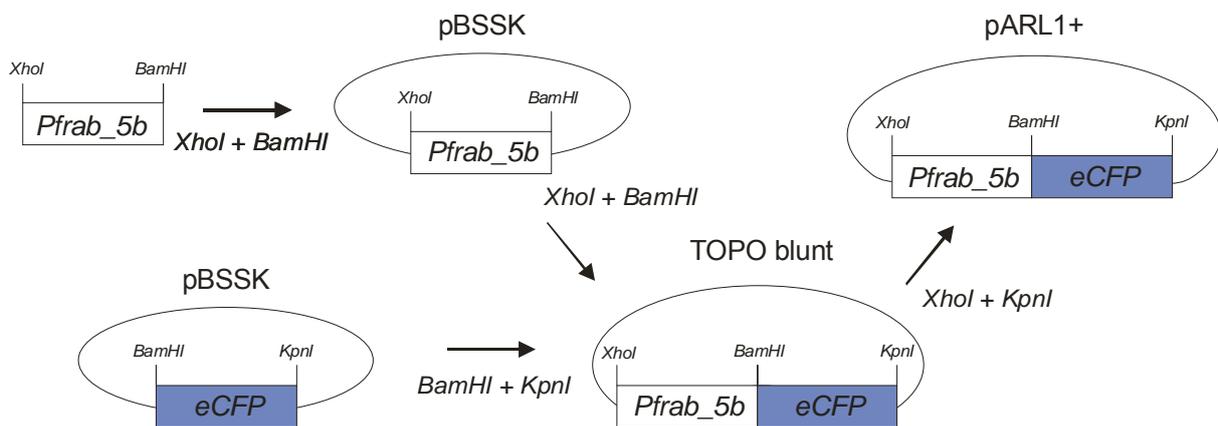


Abb. 3.53: Klonierungsstrategie des Pfrab_5b-Transfektionskonstrukts

3.2.4.3.2 Doppeltransfektion von 3D7 mit Pfrab_5b und PfCDPK1-D212A

Die Doppeltransfektion und anschließende mikroskopische Analyse wurde genau wie unter 3.2.1.3.2 beschrieben durchgeführt. Aus Abb. 3.54 geht hervor, dass Pfrab_5b (grün) ebenso wie die PfCDPK1-D212A-YFP (rot) in der parasitophoren Vakuole lokalisiert zu sein scheint (Überlagerung gelb). Erneut ist eine deutliche Akkumulation beider Proteine zu beobachten.

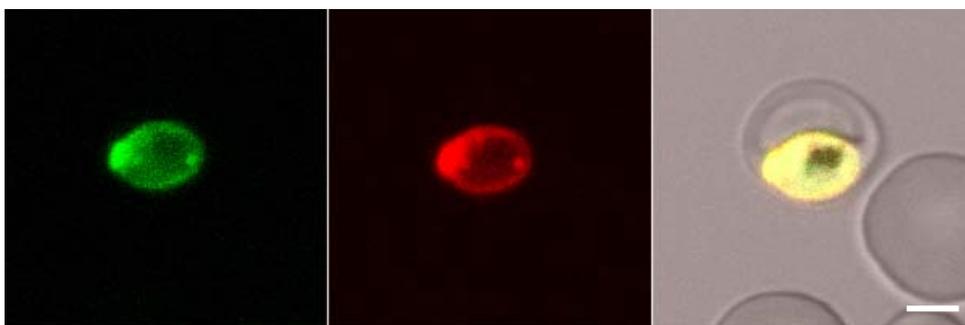


Abb. 3.54: *In vivo* imaging der Co-Transfektanten, die das Pfrab_5b-eCFP und das PfCDPK1-D212A-YFP Konstrukt enthielten. Gezeigt an einem exemplarisch ausgewählten infizierten Parasiten. Grün dargestellt ist die Fluoreszenz von Pfrab_5b-eCFP, rot die Fluoreszenz von PfCDPK1-D212A-YFP.

(Links) Pfrab_5b-eCFP ist in der parasitophoren Vakuole lokalisiert; (Mitte) PfCDPK1-D212A-YFP ist ebenfalls in der parasitophoren Vakuole lokalisiert; (Rechts) Die Überlagerung der Signale (in gelb) zeigt, dass beide Proteine co-lokalisiert sind. Die Akkumulationen traten bei beiden Proteinen an den gleichen Stellen im Parasiten, auf und stellen vermutlich das sich bildende tuvovesikuläre System dar. Der Größenmarker entspricht 2 µm.

3.2.4.3.3 Doppeltransfektion von 3D7 mit Pfrab_5b_leader und PfCDPK1-D212A

Abb. 3.55 zeigt die Fluoreszenz des „MGC-basic-Leader“ Konstrukts von Pfrab_5b-eCFP in grün. Dieses verkürzte Protein, das lediglich das „MGC-basic“-Signalmotiv des Pfrab_5b enthielt, gelangte wie das vollständige Pfrab_5b in die parasitophore Vakuole. Während für andere Proteine (PfCAP, PfADK, PfGAP45) durch Deletionskonstrukte, denen das „MGC-basic“-Signalmotiv fehlte, gezeigt werden konnte, dass diese nicht in die parasitophore Vakuole gelangten, sondern im Zytosol des Parasiten verblieben, ergab sich für Pfrab_5b, dass das „MGC-basic“-Signalmotiv alleine ausreichte, um das verkürzte Protein in die parasitophore Vakuole zu transportieren.

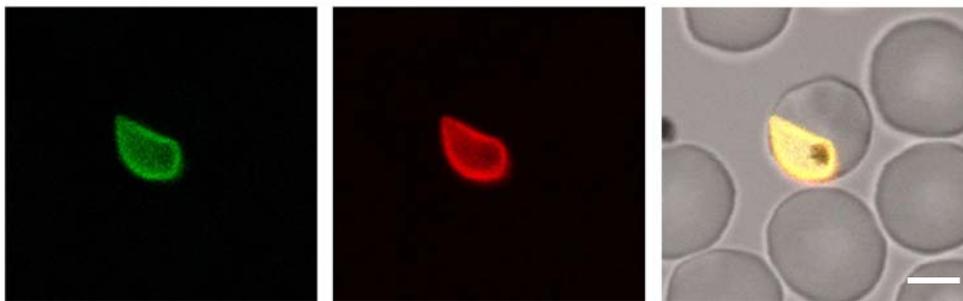


Abb. 3.55: *In vivo* imaging der Co-Transfektanten, die das Pfrab_5b_leader-eCFP Konstrukt und das PfCDPK1-D212A-YFP Konstrukt enthielten. Gezeigt an einem exemplarisch ausgewählten infizierten Parasiten. Grün dargestellt ist die Fluoreszenz des Pfrab_5b_leader-eCFP, rot die Fluoreszenz der PfCDPK1-D212A-YFP. (Links) Pfrab_5b_leader-eCFP ist in der parasitophoren Vakuole lokalisiert; (Mitte) PfCDPK1-D212A-YFP ist ebenfalls in der parasitophoren Vakuole lokalisiert; (Rechts) Die Überlagerung der Signale (in gelb) zeigt, dass beide Proteine co-lokalisiert sind. Der Größenmarker entspricht 2 μ m.

3.2.5 *Plasmodium falciparum* Protein Phosphatase „2c_like“ (PfPP2C_like)

3.2.5.1 Transfektion eines PfPP2C_like-Konstruktes

Da die Amplifikation von PfPP2C_like cDNA nicht erfolgreich war, wurde die Transfektion mit einem gDNA-Konstrukt durchgeführt.

3.2.5.1.1 Klonierung des Transfektionskonstruktes

Es wurde ausgehend von genomischer 3D7 DNA ein 2804 bp langes PCR-Fragment mit den Oligonukleotiden PP2C_like_XhoI.fwd und PP2C_like_2.rev (2.1.10) amplifiziert (Abb. 3.56) und zur Sequenzierung in den Vektor pBSSK kloniert (eingefügt über die Restriktionsstellen *XhoI* und *BamHI*).

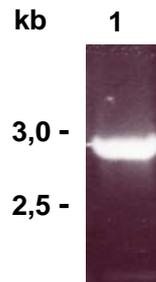


Abb. 3.56: PCR PfPP2C_like gDNA
(1) 2804 bp PCR-Produkt von PfPP2C_like, aufgetrennt in einem 0,8%igen Agarosegel.

Anschließend wurde das PfPP2C_like Fragment mittels einer Doppelligation zusammen mit dem Gen des Fluorochroms eCFP in den Vektor pCR Blunt-II TOPO® eingefügt (über die Restriktionsenzyme *XhoI*–*Bam*HI–*Kpn*I). Darauf wurde das PfPP2C_like-eCFP-Konstrukt in den Vektor pARL1(+) umgesetzt (über die Restriktionsenzyme *Xho*I und *Kpn*I). Abb. 3.57 veranschaulicht die Klonierungsstrategie.

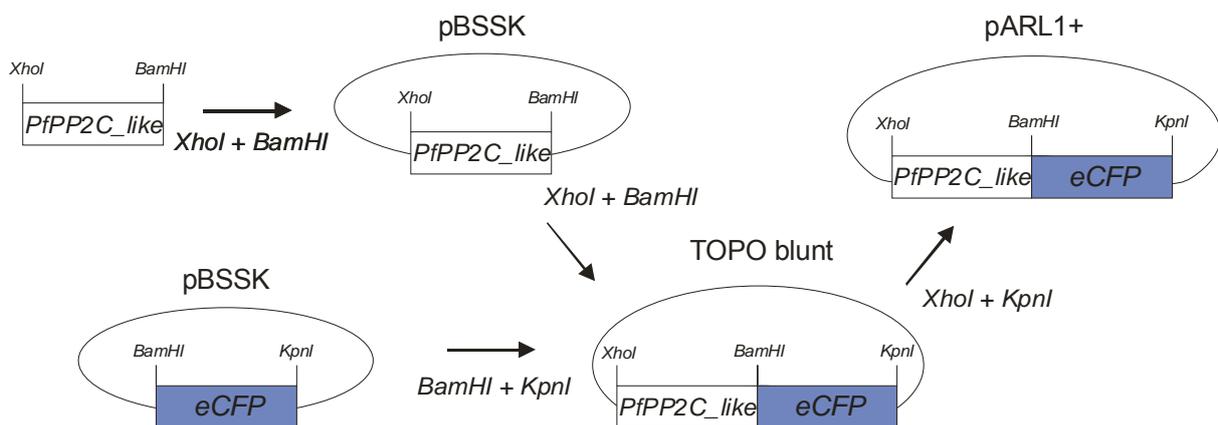


Abb. 3.57: Klonierungsstrategie des PfPP2C_like-Transfektionskonstrukts

3.2.5.1.2 Doppeltransfektion von 3D7 mit PfPP2C_like (gDNA) und PfCDPK1-D212A

Abb. 3.58 zeigt das Ergebnis der Doppeltransfektion von PfPP2C_like-eCFP (grün) und PfCDPK1-D212A-YFP (rot), die beide in der parasitophoren Vakuole lokalisiert sind (Überlagerung gelb).

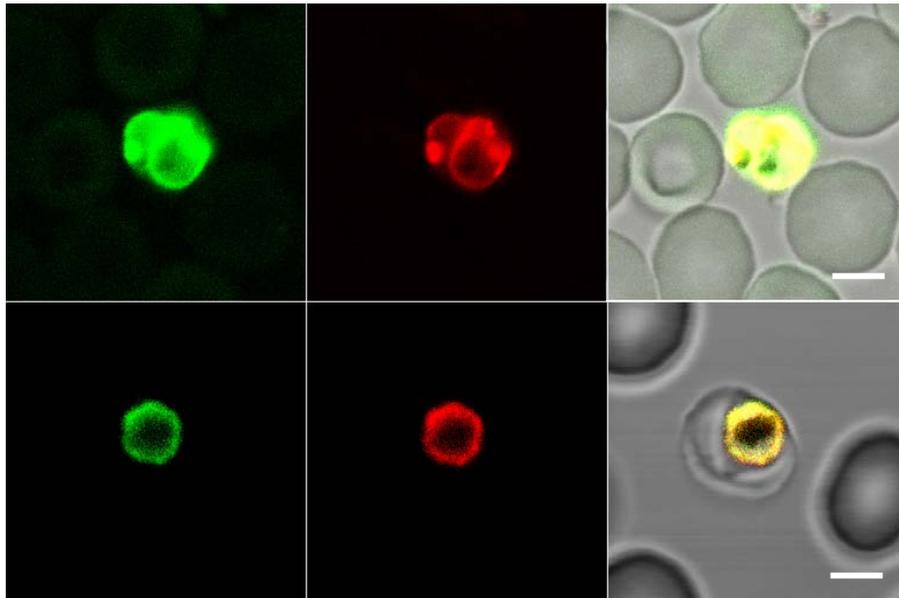


Abb. 3.58: *In vivo* imaging der Co-Transfektanten, die das PfPPP2C_like-eCFP und das PfCDPK1-D212A-YFP Konstrukt enthielten. Gezeigt an zwei exemplarisch ausgewählten infizierten Erythrozyten. Grün dargestellt ist die Fluoreszenz von PfPPP2C_like-eCFP, rot die Fluoreszenz der PfCDPK1-D212A-YFP. (Links) PfPPP2C_like-eCFP ist in der parasitophoren Vakuole lokalisiert; (Mitte) PfCDPK1-D212A-YFP ist ebenfalls in der parasitophoren Vakuole lokalisiert; (Rechts) Die Überlagerung der Signale (in gelb) zeigt, dass beide Proteine co-lokalisiert sind. Das starke Signal bei der oberen Aufnahme ist auf die starke Akkumulation der beiden Proteine zurückzuführen. Der Größenmarker entspricht 2 μ m.

3.2.6 *Plasmodium falciparum* „gliding associated protein 45” (PfGAP45)

PfGAP45 ist ein Protein des Motorkomplexes von *P. falciparum*, das in späten Parasitenstadien exprimiert wird, in denen keine parasitophore Vakuole mehr existiert. Da sich das Protein durch den Besitz des „MGC-basic“-Signalmotivs auszeichnet, soll untersucht werden, ob es unter der Kontrolle des PfCRT-Promotors in frühen Stadien ebenfalls in der parasitophoren Vakuole lokalisiert ist.

3.2.6.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung des PfGAP45

3.2.6.1.1 Klonierung des Expressionskonstruktes

Wie in Abb. 3.59 zu sehen, wurde ausgehend von 3D7 cDNA ein 650 bp langes PCR-Produkt mit den Oligonukleotiden PfGAP45_BamHI_NdeI.fwd (enthielt eine *Bam*HI-Schnittstelle für die Klonierung in den Vektor pBSSK, sowie eine *Nde*I-Schnittstelle für die anschließende Umsetzung in pET21a) und PfGAP45_XhoI.rev (enthielt eine *Xho*I-Schnittstelle) amplifiziert und zunächst in den Vektor pBSSK kloniert. Nachdem die Identität des Fragmentes durch Sequenzie-

ung bestätigt wurde, erfolgte die Überführung des Fragments unter Verwendung der Restriktionsenzyme *NdeI* und *XhoI* in den Expressionsvektor pET21a. Die Klonierungsstrategie ist in Abb. 3.60 veranschaulicht.

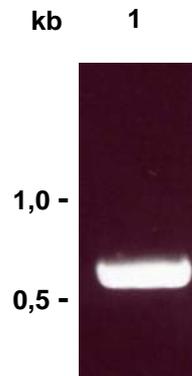


Abb. 3.59: PCR PfGAP45

(1) 616 bp langes PCR-Produkt der PfGAP45 cDNA, aufgetrennt in einem 0,8%igen Agarosegel.

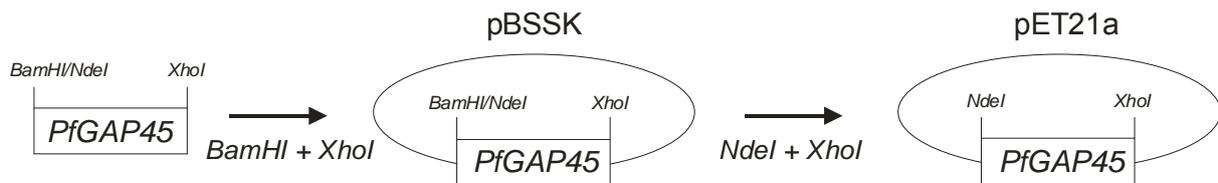


Abb. 3.60: Klonierungsstrategie des PfGAP45-Expressionskonstrukts

3.2.6.1.2 Expressionstests

3.2.6.1.3 Optimierung der IPTG-Konzentration und der Expressionsdauer

Auch der Expression von PfGAP45 gingen die bereits beschriebenen Expressionstests voraus (s. 3.2.1.1.2). Im Verlauf zeigte sich, dass mit einer errechneten Molekülmasse von 23,8 kDa PfGAP45 nach der Auftrennung in einem 12%igen SDS-Gel auf Höhe der 32 kDa-Markerbande, also deutlich oberhalb der erwarteten Größe zu finden ist.

Es stellte sich heraus, dass bei einer Induktion mit 1,0 mM IPTG die besten Resultate erzielt werden konnten. Da sich die erzeugte Menge an rekombinantem Protein durch eine Verlängerung der Expressionsdauer von 3 auf 6 h kaum erhöhte (s. Abb. 3.61), wurde eine Expressionsdauer von 3 h als optimal angesehen und ausgehend von dieser Bedingung die löslichen und unlöslichen Anteile des PfGAP45 bei Induktionen mit 0,1 mM, 0,5 mM und 1,0 mM IPTG bestimmt.

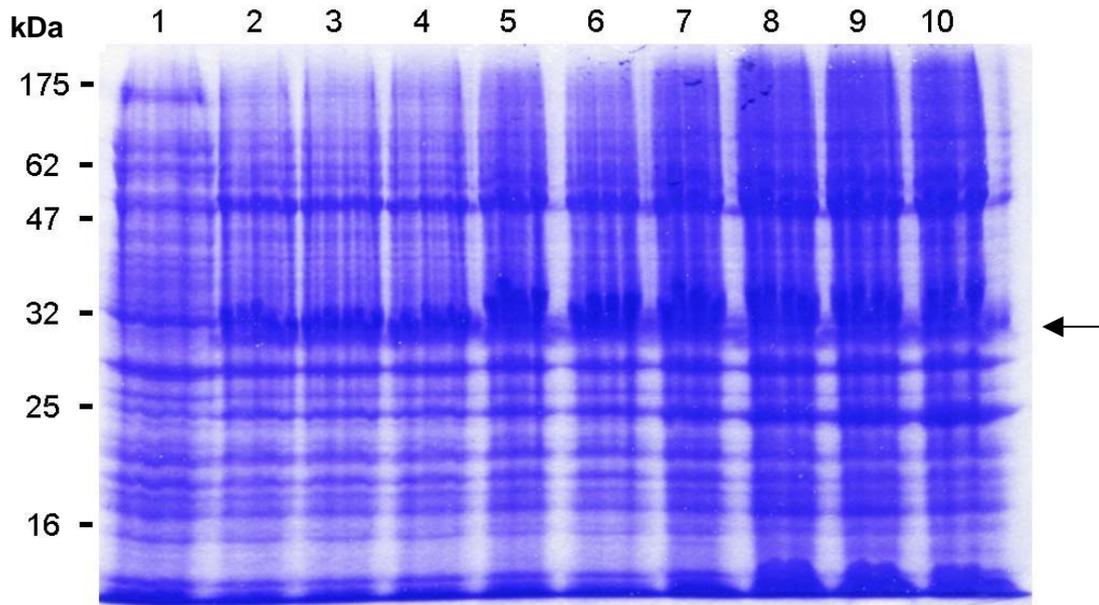


Abb. 3.61: Testexpression des Proteins PfGAP45 (30 kDa) in Bakterien zur Optimierung der IPTG-Konzentration und der Expressionsdauer

(1) Nicht induzierte Kultur; (2) 1 h Induktion mit 0,1 mM IPTG; (3) 1 h Induktion mit 0,5 mM IPTG; (4) 1 h Induktion mit 1,0 mM IPTG; (5) 3 h Induktion mit 0,1 mM IPTG; (6) 3 h Induktion mit 0,5 mM IPTG; (7) 3 h Induktion mit 1,0 mM IPTG; (8) 6 h Induktion mit 0,1 mM IPTG; (9) 6 h Induktion mit 0,5 mM IPTG; (10) 6 h Induktion mit 1,0 mM IPTG. Es wurden jeweils gleiche Probenvolumina auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen.

In Abb. 3.62 ist deutlich zu erkennen, dass mit zunehmender IPTG-Konzentration die Menge an verfügbarem löslichem PfGAP45 zunahm. Der größte Anteil war nach dreistündiger Induktion mit 1,0 mM IPTG zu erkennen. Daher wurden diese Bedingungen bei den weiteren Experimenten beibehalten.

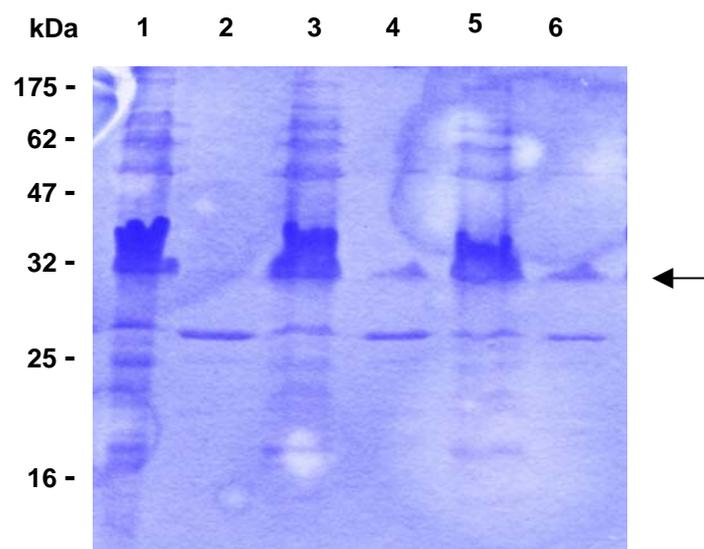


Abb. 3.62: Löslichkeitstest des PfGAP45 nach dreistündiger Induktion

(1) Unlösliche Fraktion 3 h induziert mit 0,1 mM IPTG; (2) lösliche Fraktion 3 h induziert mit 0,1 mM IPTG; (3) unlösliche Fraktion 3 h induziert mit 0,5 mM IPTG; (4) lösliche Fraktion 3 h induziert mit 0,5 mM IPTG; (5) unlösliche Fraktion 3 h induziert mit 1,0 mM IPTG; (6) lösliche Fraktion 3 h induziert mit 1,0 mM IPTG. Es wurden jeweils gleiche Probenvolumina auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen.

3.2.6.1.4 Aufreinigung des PfGAP45

Die Aufreinigung des PfGAP45 wurde mit der Ni-NTA-Säule etabliert. Es stellte sich als effektivste Methode heraus, das Protein in einem Puffer mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 300 mM NaCl und 10 mM Imidazol auf die Säule zu laden. Gewaschen wurde die Säule mit 30 Säulenvolumen 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl und 30 mM Imidazol. Darauf folgte die Elution mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl und 200 mM Imidazol. Die Größe der Elutionsfraktionen betrug jeweils $\frac{1}{2}$ Säulenvolumen. Aus einem Liter induzierter Kultur konnten ca. 20 mg rekombinantes Protein gewonnen werden. Der Verlauf der Aufreinigung ist in Abb. 3.63 dargestellt. Es zeigte sich, dass bei der Elution (Spuren 7 bis 11) sehr große Mengen an PfGAP45 gewonnen werden konnten. Zwar konnten einige kontaminierende Fremdproteine, insbesondere in den Bereichen zwischen 25 und 32 kDa sowie auf einer Höhe von ca. 62 kDa, nicht völlig entfernt werden. Aufgrund der ausreichenden Menge an PfGAP45, wurde mit diesen Fraktionen direkt eine Phosphorylierungsreaktion durchgeführt.

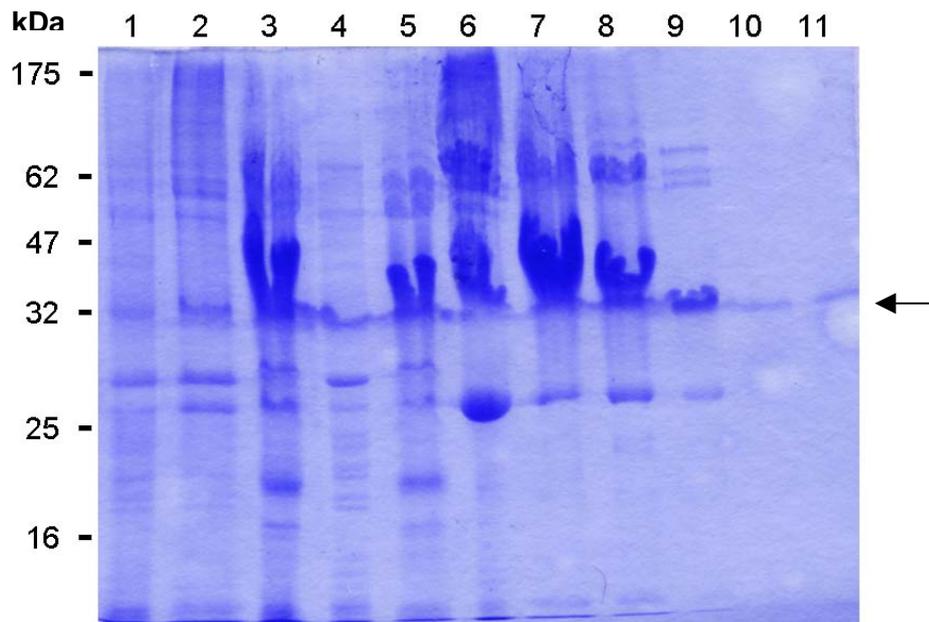


Abb. 3.63: SDS-Gel (12%) der Affinitätsaufreinigung des PfGAP45 mittels Ni-NTA-Agarose (1) Nicht induzierte Kultur; (2) Kultur nach 3 h Induktion mit 1,0 mM IPTG; (3) unlösliche Fraktion; (4) löslicher Überstand; (5) Durchfluss durch die Ni-NTA-Säule; (6) Durchfluss nach Waschen mit 30 mM Imidazol-haltigem Waschpuffer; (7 bis 11) Elutionsfraktionen mit 200 mM Imidazol-haltigem Elutionspuffer.

Auch die Identität des PfGAP45 wurde wie zuvor beschrieben (3.2.2.1.3) mit Hilfe eines His-Tag spezifischen Antikörpers im Westernblot bestätigt (Abb. 3.64).

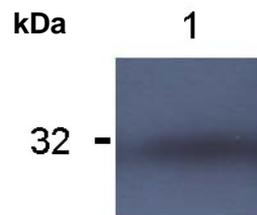


Abb. 3.64: Ausschnitt eines Westernblot nach der Affinitätsreinigung von PfGAP45 mittels Ni-NTA-Agarose (1) Das aufgereinigte PfGAP45 wurde von dem Maus-anti-6xHis Antikörper detektiert. Allerdings nicht im erwarteten Größenbereich von ca. 24 kDa, sondern bei etwa 32 kDa

3.2.6.2 PfGAP45 ist ein Substrat der PfCDPK1

Um zu überprüfen, ob es sich bei PfGAP45 um ein Substrat der PfCDPK1 handelte, wurden 10 µg PfGAP45 und 62 ng PfCDPK1 in Kinasereaktionen eingesetzt. Als Positivkontrolle diente erneut eine Kinasereaktion mit 10 µg Casein. Um auszuschließen, dass die noch in geringen Mengen der Proteinpräparation vorhandenen kontaminierenden Fremdproteine ebenfalls durch die PfCDPK1 phosphoryliert werden könnten, wurde zunächst ein Autoradiogramm angefertigt. Dieses bestätigte zum einen, dass das PfGAP45 als Substrat der PfCDPK1 erkannt wurde, und zum anderen, dass die kontaminierenden Proteine nicht phosphoryliert wurden (Abb. 3.65). Für die Phosphorylierungsuntersuchungen waren weitere Reinigungsschritte daher nicht erforderlich.

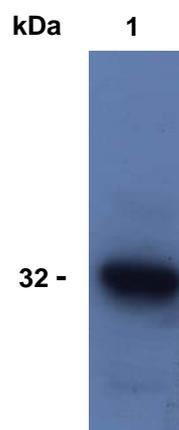


Abb. 3.65: Autoradiogramm des PfGAP45 (1) Signal des durch die PfCDPK1 phosphorylierten PfGAP45 nach 12 h Expositionszeit, aufgetrennt in einem 12%igen SDS-Gel.

Abb. 3.66 zeigt sowohl die Phosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 mit Caseins sowie PfGAP45 als Substrat. Die Caseinphosphorylierung wurde als 100% Phosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 definiert. Die Phosphorylierung des PfGAP45 durch die PfCDPK1 lag über der von Casein und betrug im Vergleich zur Caseinphosphorylierung 110%. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Kinase ergab für Casein einen Wert von 275 nMol/min/mg und für PfGAP45 einen Wert von 301 nMol/min/mg.

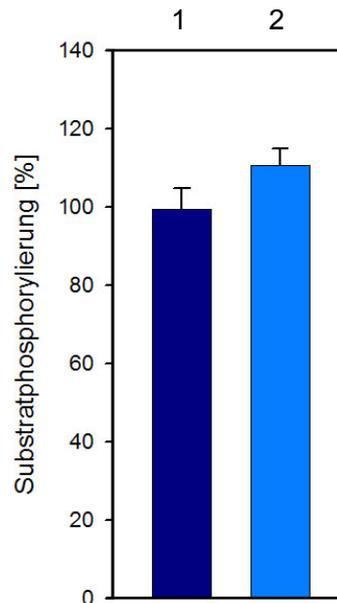


Abb. 3.66: Phosphorylierung des PfGAP45 durch die PfCDPK1

(1) Phosphorylierung von Casein (Positivkontrolle) durch die PfCDPK1 und (2) Phosphorylierung des PfGAP45 durch die PfCDPK1. Die Phosphorylierung des exogenen Substrats Casein wurde bei diesen Messungen als 100% definiert. Die Aktivität der PfCDPK1 bezogen auf das Substrat PfGAP45 lag 10% höher als bei der Kontrolle, die Phosphorylierung des PfGAP45 lag bei 110% im Vergleich zum Casein. Die angegebenen Werte gingen aus vier voneinander unabhängigen Messungen hervor. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung

3.2.6.2.1 Bestimmung der durch die PfCDPK1 phosphorylierten Aminosäuren in PfGAP45

Die massenspektrometrische Untersuchung wurde wie unter 3.1.2 beschrieben durchgeführt. Bei dieser Analyse gelang es, fünf durch die PfCDPK1 phosphorylierte Aminosäuren zu identifizieren (Abb. 3.67). Phosphoryliert wurden die Serine an den Aminosäurepositionen 89, 103, 156 und 173 sowie das Threonin an der Position 158. Bei der Analyse fiel auf, dass entweder das Serin 156 oder aber das Threonin 158 phosphoryliert wurde jedoch beide Phosphorylierungen nie gleichzeitig auftraten. Als Phosphorylierungsmotive konnten für das Serin 89 R/KXS/T, für das Serin 103 R/KXXS/T, für das Serin 156 R/KXS/T und für das Serin 173 S/TXR/K identifiziert werden. Das Threonin 158 folgte dem Motiv R/KXXS/T.

```

1  MGKNCRSKV  KEPKRKDIDE  LAERENLKKQ  SEEIIEEKPE  EVVEQVEETH
51  EEPLEQEQL  DEQKIEEEEE  EPEQVPKEEI  DYATQENKSF  EEKHLEDLER
101  SNSDIYSESQ  KFDNASDKLE  TGTQLTLSTE  ATGAVQQITK  LSEPAHEESI
151  YFTYRSVTPC  DMNKLDDETAK  VFSRRRCGCDL  GERHDENACK  ICRKIDLSDT
201  PLLS

```

Abb. 3.67: Aminosäuresequenz des PfGAP45 mit den identifizierten Phosphorylierungsstellen

Mittels einer massenspektrometrischen Messung konnte gezeigt werden, dass die PfCDPK1 fünf Aminosäuren in PfGAP45 phosphorylierte. Diese Aminosäuren sind rot markiert und unterstrichen.

3.2.6.3 Transfektion eines PfGAP45 Konstruktes

3.2.6.3.1 Klonierung des PfGAP45 Konstruktes

Es wurde von einem 3D7 cDNA-Klon ausgehend ein 650 bp langes PCR-Fragment mittels der Primer PfGAP45_XhoI.fwd und PfGAP45_BamHI.rev amplifiziert und für die Sequenzierung in den Vektor pBSSK kloniert. Anschließend wurde das PfGAP45 Fragment mittels einer Doppelligation zusammen mit dem Gen des Fluorochroms eCFP in den Vektor pCR Blunt-II TOPO® eingefügt. Danach wurde das PfGAP45-eCFP-Konstrukt in den pARL1(+) Vektor umgesetzt. Abb. 3.68 veranschaulicht den Klonierungsweg bildlich.

Zusätzlich wurde ein Deletionskonstrukt des PfGAP45 erstellt, dem die ersten 20 Aminosäuren und somit das „MGC-basic“-Signalmotiv fehlte. Als Primer dienen PfGAP45_del_20aa_XhoI.fwd und PfGAP45_BamHI.rev Die Klonierungsstrategie war mit der oben bereits beschriebenen identisch.

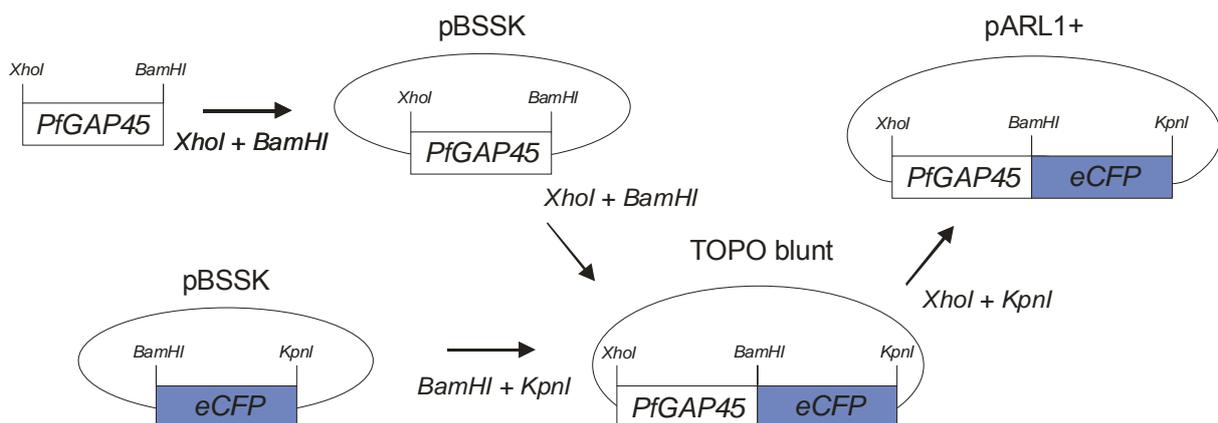


Abb.3.68: Klonierungsstrategie des PfGAP45-Transfektionskonstrukts

3.2.6.3.2 Doppeltransfektion von 3D7 mit PfGAP45 und PfCDPK1-D212A

Die Transfektion und mikroskopische Analyse wurde genau wie unter 3.2.1.3.2 für PfCAP beschrieben durchgeführt. Wie aus Abb. 3.69 hervorgeht, war das Signal des PfCAP45-eCFP (grün dargestellt) ebenso wie das der PfCDPK1-D212A-YFP (rot dargestellt) in der parasitophoren Vakuole lokalisiert. Erneut wird dies bei der Überlagerung der Einzelbilder deutlich (gelbes Signal). Wie schon zuvor kam es zu Akkumulationen, die zumindest zum Teil ebenfalls co-lokalisiert waren.

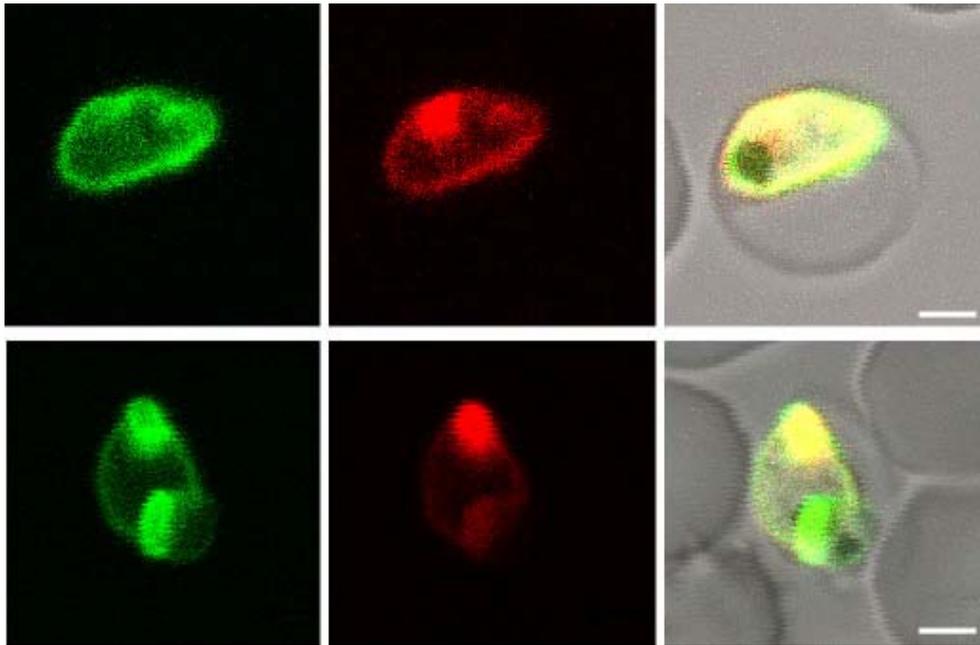


Abb. 3.69: *In vivo* imaging der Co-Transfektanten, die das PfGAP45-eCFP Konstrukt sowie das PfCDPK1-D212A-YFP Konstrukt enthielten. Gezeigt sind zwei exemplarisch ausgewählte infizierte Parasiten. Grün dargestellt ist die Fluoreszenz des PfGAP45-eCFP, rot die Fluoreszenz der PfCDPK1-D212A-YFP (Links) PfGAP45-eCFP ist in der parasitophoren Vakuole lokalisiert; (Mitte) Die PfCDPK1-D212A-YFP ist ebenfalls in der parasitophoren Vakuole lokalisiert; (Rechts) Die gelbe Überlagerung der Signale zeigt, dass beide Proteine co-lokalisiert sind. Der Größenmarker entspricht 2 μ m.

3.2.6.3.3 Doppeltransfektion von 3D7 mit dem PfGAP45-Deletionskonstrukt und der PfCDPK1-D212A

Wie in Abb. 3.70 zu sehen, ist die grün dargestellte Fluoreszenz der Deletionsmutante von PfGAP45-eCFP im Zytosol des Parasiten zu finden, das rot dargestellte Signal der PfCDPK1-D212A-YFP ist hingegen in der parasitophoren Vakuole lokalisiert. Ein Vergleich der überlagerten Signale deutet nicht auf eine Co-Lokalisation beider Proteine hin. Wie bereits für die Deletionsmutante der PfCAP beschrieben (3.2.1.3.3), sind die gelben Signale bei der Überlagerung wahrscheinlich auf das überstrahlende Grünsignal zurückzuführen, das in diesem Fall vom PfGAP45_del_20aa-eCFP stammt. In der unteren Bilderfolge der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass bei der zytosolischen Verteilung des PfGAP45_del_20aa-eCFP die Nahrungsvakuole des Parasiten ausgespart bleibt (schwarzer Fleck).

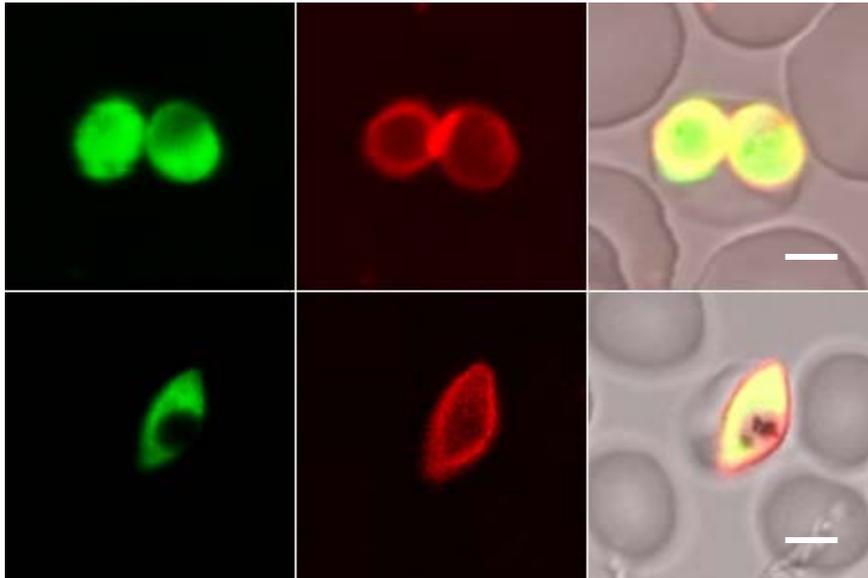


Abb. 3.70: *In vivo* imaging der Co-Transfektanten, die das Deletionskonstrukt von PfGAP45-eCFP und das Konstrukt der PfCDPK1-D212A-YFP enthielten. Gezeigt an zwei exemplarisch ausgewählten infizierten Erythrozyten. Grün dargestellt ist die Fluoreszenz der PfGAP45-eCFP Deletionsmutante, rot die Fluoreszenz der PfCDPK1-D212A-YFP.

(Links) Die Deletionsmutante des PfGAP45-eCFP ist im Zytoplasma des Parasiten verteilt; (Mitte) die PfCDPK1-D212A-YFP ist in der parasitophoren Vakuole lokalisiert; (Rechts) Überlagerung beider Fluoreszenzen. Die Proteine scheinen nicht co-lokalisiert zu sein. Der Größenmarker entspricht 2 μm .

3.3 Potentielle Regulatoren der PfCDPK1

3.3.1 *Plasmodium falciparum* Raf Kinase Inhibitor Protein (PfrKIP)

3.3.1.1 PfrKIP wird in parasitären Blutstadien exprimiert

Mikroarrayuntersuchungen von Le Roche und Bozdech^{95,199} ließen vermuten, dass geringe Mengen von PfrKIP in parasitären Blutstadien exprimiert werden. Um die Expression von PfrKIP in diesen Stadien sicherzustellen, wurde aus synchronisierten Blutstadien von *P. falciparum* (3D7) mRNA isoliert und mittels RT-PCR auf das Vorhandensein einer RKIP spezifischen mRNA untersucht (Primer PfrKIP.fwd und PfrKIP.rev, s. 2.1.10.5). Das PCR-Produkt der cDNA zeigte die erwartete Größe von 573 bp (Abb. 3.71, Spur 1). In der zweiten Spur ist das PCR-Produkt der genomischen DNA von PfrKIP zu sehen. Es hat die gleiche Größe wie das cDNA-Fragment (573 bp), da das PfrKIP-Gen keine Introns besitzt. Um Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen, wurde aus diesem Grund mit derselben cDNA eine Kontroll-PCR durchgeführt. Hierzu wurde mit PfARM ein Gen mit Introns gewählt und die PCR mit den Primern PfARM.fwd

und PfARM.rev durchgeführt (s. 2.1.10.1). In Spur drei ist nur eine einzige Bande in der erwarteten Länge der cDNA von 840 bp zu sehen, so dass eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte. Zum Vergleich ist in Spur vier das entsprechende PCR-Produkt der genomischen DNA von PfARM gezeigt (2175 bp).

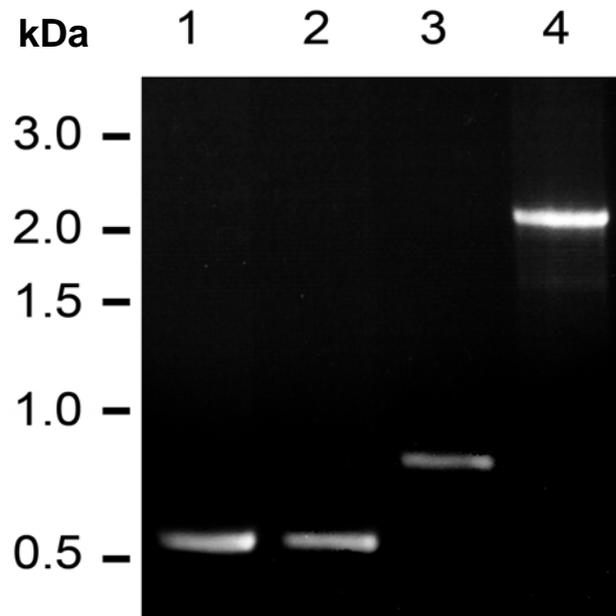


Abb.3.71: Nachweis eines PfrKIP-Transkriptes in parasitären Blutstadien von 3D7, 0,8%iges Agarosegel (1) PCR-Produkt des PfrKIP ausgehend von cDNA, 573bp; (2) PCR-Produkt des PfrKIP ausgehend von genomischer DNA, 573 bp; (3) Kontrolle, PCR-Produkt von PfARM ausgehend von cDNA, 840 bp; (4) Kontrolle, PCR-Produkt von PfARM ausgehend von genomischer DNA, 2175 bp.

3.3.1.2 Rekombinante Expression und Aufreinigung von PfrKIP

Es konnte auf ein *XhoI/BamHI*-pET21a Konstrukt von PfrKIP zurückgegriffen werden, welches von Frau Kirsten Plückhan bereitgestellt wurde. Bei der rekombinanten Expression und anschließenden Aufreinigung des PfrKIP fand ein in der Arbeitsgruppe bereits etabliertes Protokoll Verwendung. Nach der Klonierung in pET21a erfolgte die Expression von PfrKIP in einem 3 Liter umfassenden Ansatz für 3 h bei 37°C in BL21-CodonPlus-RIL Bakterien. Die Induktion wurde mit 40 µM IPTG durchgeführt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des Proteinlysats mittels Ni-NTA-Agarose. Das Lysat der 3 Liter Bakterienkultur wurde auf die Säule, die ein Säulenvolumen von 0,5 ml besaß, geladen. Nachdem die Säule mit 30 Säulenvolumen Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 750 mM NaCl) mit 50 mM Imidazol gewaschen wurde, erfolgte die Elution mit 200 mM IPTG. Aus einem Liter Bakterienkultur konnten ca. 40 bis 70 µg lösliches PfrKIP isoliert werden. Die Aufreinigung über die Ni-NTA-Agarose führte zu einer hohen Reinheit des Proteins (Abb. 3.72, Spuren 7-9). Zur Vorbereitung auf die Kinasereaktionen wurde das isolierte PfrKIP

gegen Kinasereaktionspuffer dialysiert. Um ein Präzipitieren des Proteins zu verhindern, wurden dem Kinasereaktionspuffer 150 mM NaCl zugesetzt.

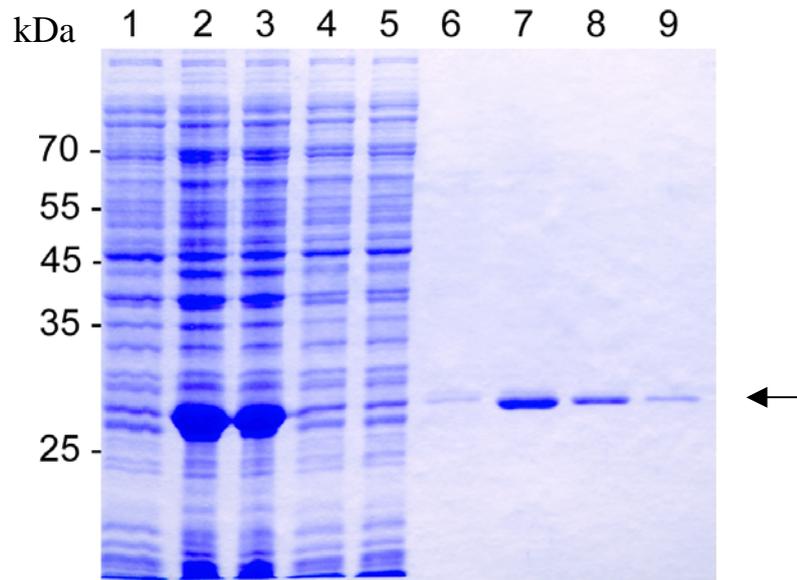


Abb. 3.72 SDS-Gel (12%) einer Affinitätsaufreinigung des PfRKIP mittels Ni-NTA-Agarose (1) Nicht induzierte Kultur; (2) Kultur nach 3 h Induktion mit 40 µM IPTG; (3) Lysat nach Behandlung mit Ultraschall; (4) löslicher Überstand; (5) Durchfluss durch die Ni-NTA-Säule; (6) Durchfluss nach Waschen mit 50 mM Imidazol-haltigem Waschpuffer; (7-9) Die Elution erfolgte mit 200 mM Imidazol-haltigem Elutionspuffer.

3.3.1.3 PfRKIP ist ein Substrat der PfCDPK1

Es wurden Kinasereaktionen mit PfRKIP als Substrat durchgeführt. Da PfRKIP in Abwesenheit von Salz präzipitiert, erfolgten alle Reaktionen mit einer Endkonzentration von 28,3 mM NaCl. Nach Ablauf der Kinasereaktionen wurden die Proben mittels eines 12%igen SDS-Gels aufgetrennt, die entsprechenden Proteinbanden ausgeschnitten und anschließend über Autoradiographie analysiert.

Die Analyse der ausgeschnittenen PfRKIP-Banden ergab eine stetige Steigerung der Substratphosphorylierung durch die PfCDPK1 (Abb. 3.72). Je mehr PfRKIP der Kinase angeboten wurde, desto mehr Substrat wurde phosphoryliert. Die Messungen wurden mit Substratkonzentrationen von 3 bis 2100 ng durchgeführt. Die 2100 ng PfRKIP-Bande entsprach der höchsten eingesetzten Konzentration und wurde daher als 100% PfRKIP-Phosphorylierung festgelegt. Bei einer Substratmenge von 3 ng lag der Anteil der Phosphorylierung nur noch bei 3,4%. Ab einer PfRKIP-Konzentration von 900 ng (entspricht 1,6 µM und somit einem 50fachen Überschuss im Vergleich zur Kinase) wird das Substrat in einem solchen Überschuss angeboten, dass ein Plateau erreicht wird.

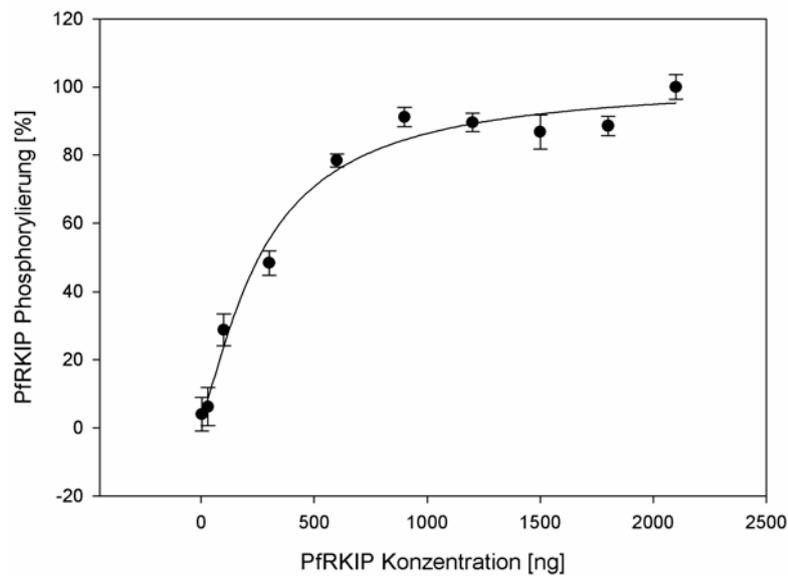


Abb. 3.72: Substratphosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 als Funktion der PfRKIP-Konzentration
PfRKIP wird von PfCDPK1 als Substrat erkannt. Eingesetzt wurden Substratkonzentrationen von 3 bis 2100 ng. Die Werte stammen aus sechs voneinander unabhängigen Messungen.

In Anwesenheit des PfRKIP erhöht sich die Autophosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 deutlich. Abb. 3.73 zeigt, dass sowohl ohne Zugabe Ca^{2+} (Spur 2) als auch nach Zugabe von Ca^{2+} (Spur 4), die Autophosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 in Gegenwart von 1 μg PfRKIP wesentlich höher ist als in Abwesenheit des Substrates. Um den Effekt der erhöhten Autophosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 zu quantifizieren, wurden der Reaktion in sechs unabhängigen Messungen steigende PfRKIP-Konzentrationen von 3 bis 2100 ng zugesetzt (Abb. 3.74).

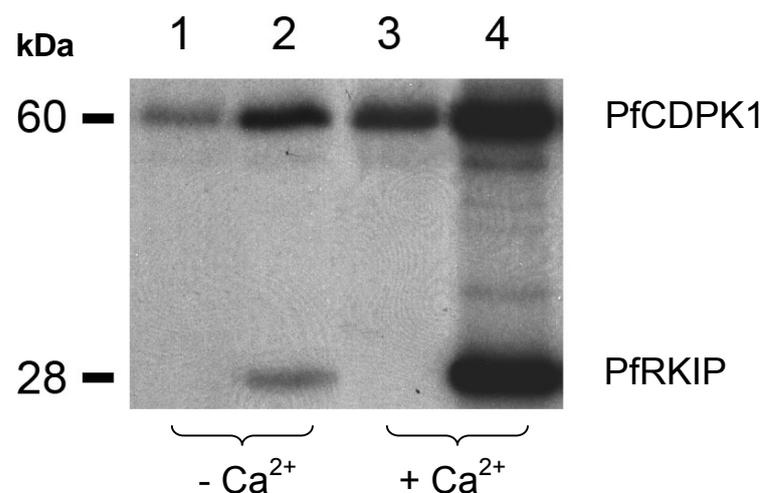


Abb. 3.73: PfRKIP erhöht die Autophosphorylierungsaktivität der PfCDPK1, dargestellt anhand eines Autoradiogramms

(1) Autophosphorylierung der PfCDPK1 ohne Ca^{2+} und PfRKIP; (2) Autophosphorylierung der PfCDPK1 ohne Ca^{2+} und mit PfRKIP als Substrat; (3) Autophosphorylierung der PfCDPK1 mit Ca^{2+} und ohne Substrat; (4) Autophosphorylierung der PfCDPK1 mit Ca^{2+} und mit PfRKIP als Substrat.

Abb. 3.74 zeigt die Autophosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 als Funktion der PfrKIP Konzentration. Als 100% wurde die Autophosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 in Abwesenheit von PfrKIP festgelegt. In Gegenwart von PfrKIP nimmt die Autophosphorylierung der PfCDPK1 mit steigender Substratkonzentration zunächst zu. Ab einer PfrKIP-Konzentration von 900 ng wird ihr Plateau erreicht. Die maximal eingesetzte PfrKIP Konzentration betrug 2100 ng. In Gegenwart von PfrKIP nahm die Autophosphorylierung der PfCDPK1 um das 5,5-fache im Vergleich zur Aktivität der PfCDPK1 zu.

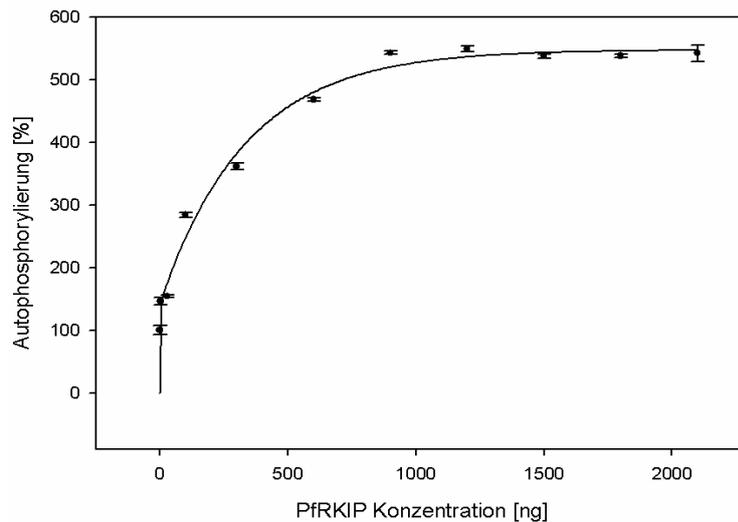


Abb. 3.74: Autophosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 als Funktion der PfrKIP-Konzentration
Die PfrKIP-Konzentration beeinflusste die Autophosphorylierungsaktivität der PfCDPK1. Mit steigender Substratkonzentration nahm die Autophosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 zu, bis sie bei einer Substratkonzentration von ca. 900 ng ihr Plateau erreichte. Die Werte stammen aus sechs voneinander unabhängigen Messungen.

Um den Einfluss der veränderten Autophosphorylierung auf die Substratphosphorylierung zu untersuchen, wurden Kinasereaktionen durchgeführt die neben 3 bis 2100 ng PfrKIP auch 10 µg Casein als zweites Substrat enthielten. Damit der Einfluss auf die Caseinphosphorylierung quantifiziert werden konnte, wurden die Reaktionen aus sechs von einander unabhängigen Kinasereaktionen jeweils mit einem 12%igen SDS-Gel separiert, die jeweiligen Caseinbanden ausgeschnitten und über die inkorporierte Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt. Abb. 3.75 zeigt, dass mit zunehmender PfrKIP-Konzentration die Caseinphosphorylierung abnahm. Als 100%ige Caseinphosphorylierung wurde der Wert in Abwesenheit von PfrKIP definiert. Bei der höchsten PfrKIP-Konzentration (2100 ng) wurde eine Inhibition der Phosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 gegenüber Casein um etwa 80% erreicht.

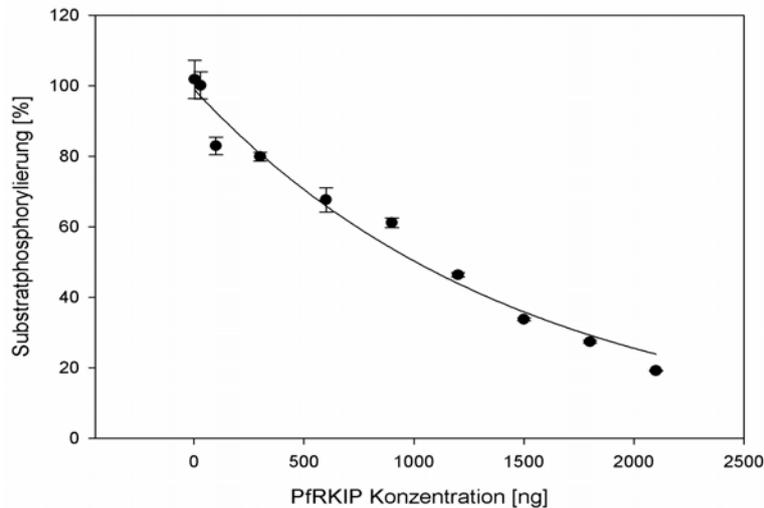


Abb. 3.75: Caseinphosphorylierung durch die PfCDPK1 als Funktion der PfrKIP-Konzentration
Mit steigender PfrKIP-Konzentration in der Reaktion (3 bis 2100 ng) nahm die Phosphorylierung von Casein ab. Die Werte stammen aus sechs voneinander unabhängigen Messungen.

Eine kompetitive Hemmung der Caseinphosphorylierung durch die steigende PfrKIP Konzentration konnte ausgeschlossen werden. Wie Abb. 3.76 zeigt, nahm die Phosphorylierung des Caseins in einer gemeinsamen Phosphorylierungsreaktion mit PfrKIP zwar ab (Spur 3 im Vergleich zu Spur 1), die Phosphorylierung des PfrKIP wurde jedoch gleichzeitig um den Faktor 1,6 erhöht (Spur 3 im Vergleich zu Spur 2). Läge eine kompetitive Hemmung vor, hätte auch die Phosphorylierung von PfrKIP abnehmen müssen.

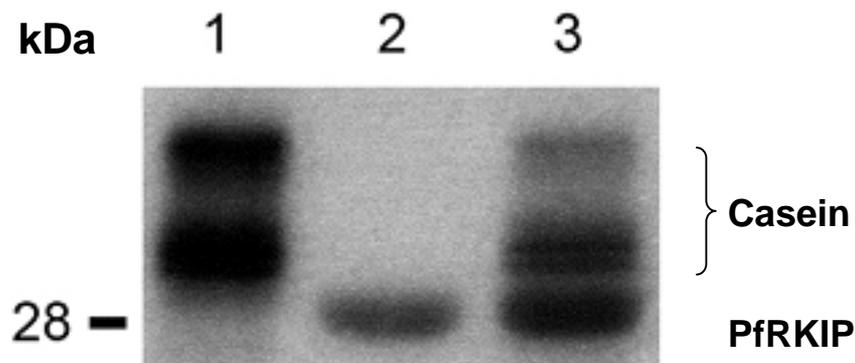


Abb. 3.76: Autoradiogramm der Casein- und PfrKIP-Phosphorylierung durch die PfCDPK1
(1) Phosphorylierung von Casein durch die PfCDPK1; (2) Phosphorylierung von PfrKIP durch die PfCDPK1; (3) Phosphorylierung von Casein und PfrKIP durch die PfCDPK1 derselben Kinasereaktion. Während es zu einer Abnahme der Casein-Phosphorylierung kam, nahm die Phosphorylierung von PfrKIP zu⁴⁵.

3.3.1.4 Bestimmung der durch die PfCDPK1 phosphorylierten Aminosäuren in PfrKIP

In Säugetieren inhibiert RKIP die MAP-Kinase Kaskade, indem es an die Raf-1 Kinase bindet und deren Aktivität unterdrückt. Eine Phosphorylierung von RKIP durch die Proteinkinase C führt zur Abtrennung RKIPs von Raf-1 und somit zur Freigabe des MAP-Kinase Signalwegs²⁰⁰. Phospho-

ryliert wird dabei ein Serin an der Position 153 (Ser 153). Da dieses Ser 153 in *Plasmodium* nicht konserviert ist, wurde mittels Q-TOF nanoESI Tandemmassenspektrometrie (MS) nach möglichen Phosphorylierungsstellen in PfrKIP gesucht (Abb. 3.77). Dafür wurde eine Standardreaktion mit PfrKIP als Substrat und PfCDPK1 als Kinase durchgeführt, jedoch ohne radioaktives P^{32} einzusetzen. Die Reaktion wurde in einem SDS-Gel (Bis-Tris, NuPAGE[®]) aufgetrennt, die PfrKIP-Bande ausgeschnitten und mittels MS analysiert.

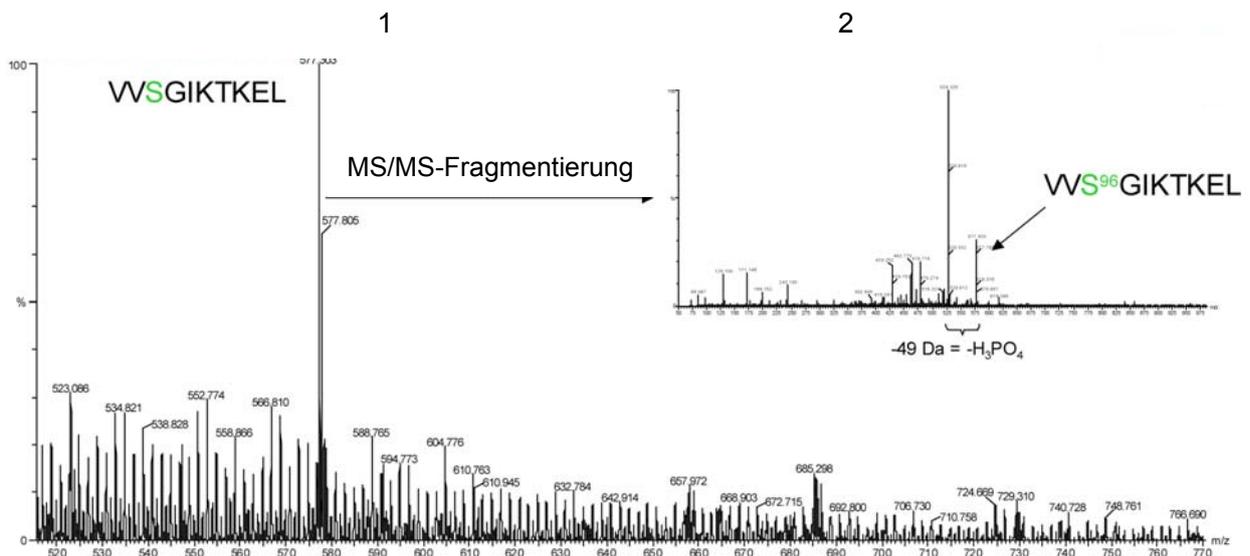


Abb. 3.77: NanoESI Massenspektrum der Peptide VVpSGIKTKEL, das aus phosphoryliertem PfrKIP isoliert wurde

(1) Ausschnitt aus der mit Phosphat angereicherten Peptidfraktion; (2) Tandem Massenspektrometrie des Ions m/z 577.3. Das Serin 96 (grün) konnte als phosphoryliert identifiziert werden. Die Messung und Auswertung wurde von Dominic Winter, DKFZ Heidelberg, durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass in RKIP aus *P. falciparum* ein Serin an der Position 96 (Ser 96) phosphoryliert wird (Abb. 3.78). Es ist hervorzuheben, dass es sich bei dem hier vorliegenden Phosphorylierungsmotiv S/TXXK/R um ein zuvor noch unbekanntes Motiv der PfCDPK1 handelt.

```

1  MTIPTISELK KDRIIPHVFP NDKIDLNVDL FISFKAGKEV NHGNVLDIAG
51  TGSVPRNIKF SEPPDGYCF VLFMVDPDYP SRLRPDGKEY IHWVVSGIKT
101 KELIKGTQKN CVAILPYVGP SIKKGTGLHR ISFIISLIKE EDKDNIAGLP
151 HYKGEKYITR VKFNYESVH NIAQINNMKI VGYNWCQIEG

```

Abb. 3.78: Aminosäuresequenz von PfrKIP mit den identifizierten Phosphorylierungsstellen

Mit einer massenspektrometrischen Messung konnte gezeigt werden, dass die PfCDPK1 in PfrKIP das Serin an der Position 96 phosphoryliert (in rot und unterstrichen dargestellt).

4 Diskussion

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten Daten gewonnen werden, welche die Funktion der PfCDPK1 in *P. falciparum* näher charakterisieren. Diese Daten legen nahe, dass die PfCDPK1 eine zentrale Rolle in verschiedenen Signaltransduktionsprozessen des Parasiten einnimmt. Es konnten mehrere Proteine als mögliche Regulatoren bzw. Substrate der Kinase identifiziert werden, deren Relevanz im Folgenden diskutiert wird.

Auch die Rolle des „MGC-basic“-Signalmotivs konnte weiter aufgeklärt und dessen Bedeutung für die Translokation von Proteinen in die parasitophore Vakuole bzw. zum tubovesikulären Netzwerk bestätigt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die PfCDPK1 eine wichtige Rolle bei der Bildung des tubovesikulären Systems einnimmt.

Die zentrale Bedeutung der PfCDPK1 für den Invasionsprozess des Parasiten in die Wirtszelle wird durch die erhaltenen Erkenntnisse gestützt.

4.1 Die PfCDPK1 ist am Invasionsprozess von *P. falciparum* beteiligt

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Aktivität der PfCDPK1 für die Invasion des Parasiten in seine Wirtszelle unerlässlich ist. Zeitgleich mit dieser Arbeit wurde die Beteiligung der PfCDPK1 an der Invasion ebenfalls von Green et al. untersucht und die entsprechende Studie kürzlich veröffentlicht⁴⁶. Deren Ergebnisse konnten mit dieser Arbeit bestätigt und teilweise ergänzt werden.

In der von Green et al. vorgelegten Studie wurde gezeigt, dass die Zugabe der etwa achtfachen IC_{50} Konzentration (348 nM) des Kinaseinhibitors K252a zu späten Parasitenstadien Merozoiten an der Neuinfektion von Erythrozyten hindert^{46,201}. Allerdings handelt es sich bei K252a nicht um einen spezifischen Inhibitor der PfCDPK1, sondern vielmehr um einen sehr unspezifischen Kinaseinhibitor (s. 4.5)²⁰²⁻²⁰⁵. Somit könnte der Einsatz von K252a neben der Hemmung der PfCDPK1 zu der Inhibition einer Vielzahl weiterer Kinasen des Parasiten führen. Daher können anhand der von Green et al. durchgeführten Versuche keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Bedeutung einzelner, inhibierter Kinasen auf die verminderte Neuinfektion von Erythrozyten gezogen werden. Eine Beteiligung der PfCDPK1 am Invasionsprozess kann damit durch die veröffentlichte Studie nicht zweifelsfrei belegt werden, da den Autoren keine selektive Hemmung der PfCDPK1 möglich war.

Eine Verringerung der Invasionsaktivität der Parasiten durch den Einsatz eines Kinaseinhibitors wurde ebenfalls während dieser Arbeit beobachtet. Jedoch erfolgte die Inhibition der PfCDPK1

wesentlich spezifischer als bei Green et al. Es kam PPI (4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(*n*-butyl)-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine) als Kinaseinhibitor zum Einsatz. Bei PPI handelt es sich ursprünglich um einen selektiven Inhibitor der Src-Tyrosinkinase-Familie²⁰⁶. Untersuchungen in dieser Arbeit sowie von Dr. Christian Möskes, einem früheren Mitglied der AG Kappes, zeigen jedoch, dass PPI eine ähnlich hemmende Wirkung auf die PfCDPK1 ausübt (s. auch 4.5). Da es sich bei PPI um einen Tyrosinkinaseinhibitor handelt und *P. falciparum* keine Tyrosinkinasen besitzt, ist eine selektive Wirkung des Inhibitors auf die PfCDPK1 *in vivo* gegeben.

Die Inhibition der PfCDPK1 durch die Zugabe des Kinaseinhibitors PPI in seiner ca. zehnfachen IC₅₀-Konzentration (50 µm) zu späten Parasitenstadien führte zu einer deutlichen Abnahme der Invasion. Die Neuinfektion von Erythrozyten war um mehr als den Faktor zehn geringer als in der Kontrollkultur. Dieses Ergebnis spricht eindeutig für eine Beteiligung der PfCDPK1 am Invasionsprozess der Merozoiten.

Die PfCDPK1 wird in späten Parasitenstadien wie Segmentern, bei denen es keine parasitophore Vakuole mehr gibt, gemeinsam mit MSP1 (Merozoiten-Oberflächen-Protein 1) im Bereich der Plasmamembran von Merozoiten nachgewiesen^{46,97}. Nach der Freisetzung der Merozoiten wird die PfCDPK1 sowohl gemeinsam mit MTIP (leichte Myosinkette des Motorkomplexes) in der Peripherie des Parasiten als auch in Teilen des restlichen Parasiten detektiert⁴⁶. Auch GAP45, ein weiteres Protein aus der Invasionsmaschinerie des Parasiten, das ebenfalls wie die PfCDPK1 das „MGC-basic“-Signalmotiv besitzt, ist im Bereich der Plasmamembran der Merozoiten zu finden. Es ist mit dem IMC („inner membrane complex“) assoziiert^{61,207}. Green et al. haben gezeigt, dass PfCDPK1 mit MTIP und PfGAP45 zwei Komponenten des Motorkomplexes von *P. falciparum* phosphoryliert⁴⁶. Für die Phosphorylierung von PfGAP45 wurde eine spezifische Aktivität von 200-500 nmol/min/mg ermittelt. Die Phosphorylierung von PfGAP45 wurde in dieser Arbeit bestätigt. Die spezifische Aktivität liegt mit 301 nmol/min/mg in einem ähnlich hohen Bereich wie die des exogenen Substrats Casein (275 nmol/min/mg).

Aufgrund der gemeinsamen Lokalisation des PfGAP45 und der Kinase, die wegen ihrer ähnlichen N-terminalen Translokationssequenz („MGC-basic“) zu vermuten war (wahrscheinlich im Bereich des IMC) sowie der hohen spezifischen Aktivität der Kinase gegenüber PfGAP45 ist ein direkter Zusammenhang dieser Phosphorylierungsreaktion mit dem Invasionsprozess des Parasiten wahrscheinlich. Massenspektrometrischen Untersuchungen von Green et al. zeigten, dass die PfCDPK1 das Serin an der Aminosäureposition 89 (Ser 89) des PfGAP45 phosphoryliert. Weitere Phosphorylierungen im Bereich der Aminosäuren 97-112 sowie 141-155 des PfGAP45 konnten von Green et al. zwar erkannt, aber nicht näher beschrieben werden⁴⁶.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Phosphorylierung von Ser 89 in PfGAP45 bestätigt werden. Des Weiteren wurde mit Ser 103 ein phosphoryliertes Peptid in dem von Green et al. nicht näher beschriebenen Bereich der Aminosäuren 97-112 genau identifiziert. Mit Ser 156, Thr 158 und Ser 173 (s.3.2.6.2.1) wurden drei weitere phosphorylierte Aminosäuren in PfGAP45 identifiziert. Eine besondere Bedeutung kann dabei sicherlich der Feststellung zugeschrieben werden, dass entweder das Serin 156 oder aber das Threonin 158 phosphoryliert wurden. Vermutlich hängt dies

mit regulatorischen Mechanismen zusammen, die sich auf die Aktivität des Motorkomplexes von *P. falciparum* auswirken. Ob beide Aminosäuren von der PfCDPK1 auch *in vivo* phosphoryliert werden, bleibt jedoch noch zu beweisen. Entsprechende Untersuchungen des *in vivo* Phosphorylierungsstatus von Merozoitenproteinen aus *P. falciparum* wurden im Rahmen dieser Arbeit unternommen, jedoch liegen die Ergebnisse zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vor.

Mit der PfPKB (*P. falciparum* Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase B) ist vor wenigen Jahren ein weiteres Enzym identifiziert worden, das ebenfalls GAP45 als ein Substrat *in vitro* erkennt und auch eine Rolle im Invasionsprozess zu spielen scheint^{208,209}. Die Korrektheit der Einordnung der PfPKB zur Familie der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen B, wie sie für dieses Enzym von den Autoren vorgernommen wurde, ist jedoch zu bezweifeln. So haben Vahid et al. bei der Untersuchung der Calcium-abhängigen Kinaseaktivität der PfPKB keine entsprechenden Kontrollen mit Calcium-freiem Calmodulin durchgeführt. Es könnte daher sein, dass es sich bei der PfPKB um ein Calcium-abhängiges Enzym handelt, das den Proteinkinasen C zugeordnet werden sollte („conserved domain“ Suche). Die Identifikation dieser Kinase spricht dafür, dass es Wechselwirkungen zwischen den am Invasionsprozess beteiligten Kinasen gibt, die sich im Phosphorylierungsstatus von PfGAP45 widerspiegeln könnten. Welchen Einfluss diese Regulationsmechanismen ausüben und ob sie weitere Proteine des Motorkomplexes betreffen ist derzeit noch ungeklärt.

Während des Bewegungsvorgangs des Parasiten werden Aktinfilamente und der IMC gegeneinander verschoben und lösen sich anschließend wieder voneinander, um in ihre ursprüngliche Stellung zurückzukehren¹⁴⁵. Möglicherweise spielt die Phosphorylierung von PfGAP45 dabei eine entscheidende Rolle. Das Protein ist mit Hilfe des „MGC-basic“-Signalmotivs fest an der Membran des IMC verankert. Abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus kann es Kontakt zu den Aktin/Myosinelementen aufnehmen bzw. löst sich wieder ab, was die Bewegung des Komplexes verursachen könnte. Auch eine phosphorylierungsbedingte An- und Ablösung des Proteins von der Membran könnte für die Bewegung verantwortlich sein. Eine entsprechende Regulation dieser Bewegung, z. B. der Geschwindigkeit oder Intensität, könnte über die Positionen der Phosphorylierung von PfGAP45 (und/oder auch von MTIP) reguliert werden. Möglicherweise spielt hier die exklusive Phosphorylierung von Ser 156 bzw. Thr 158 eine Rolle.

Um die Bedeutung der Phosphorylierung von PfGAP45 für den Invasionsprozess genauer aufzuschlüsseln sind weitere Experimente notwendig. Beispielsweise eine Deletion der Phosphorylierungsstellen mittels einer *knock in* Strategie.

4.2 Bedeutung des „MGC-basic“-Signalmotivs für die Translokation von Proteinen in *P. falciparum*

Das „MGC-basic“-Signalmotiv wurde erstmals 2004 im Rahmen von Translokationsuntersuchungen der PfCDPK1 beschrieben⁹⁷. Die N-terminale Sequenz der Kinase zeichnet sich durch eine Abfolge von Methionin, Glycin und Cystein aus, welche für die Verankerung der Kinase mittels eines Myristat- und eines Palmitatrestes sowie eines basischen Clusters an der Membran verantwortlich sind. Die Kombination dieser drei Membrananker ist für die Zielsteuerung der PfCDPK1 zur parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) verantwortlich. Mit dieser Arbeit wurde die Bedeutung dieses „MGC-basic“-Signalmotivs für die Translokation von Proteinen in *P. falciparum* näher untersucht. Im Gegensatz zur klassischen Signalsequenz, die beim Eintritt in das endoplasmatische Reticulum verloren geht, wird das „MGC-basic“-Signalmotiv während der Translokation des Proteins nicht abgespalten^{97,210-213}. In *Plasmodium* erfolgt die Zielsteuerung einer Vielzahl von Proteinen (z. B. „knob associated histidin rich protein“ oder „export protein 1“, insgesamt ca. 300 Proteine²¹⁴) über eine besondere Form des klassischen Transportweges, das „Plasmodium Export Element“ (PEXEL) eine stark konservierte, N-terminale Sequenz (RxLxE/Q/D)²¹⁵⁻²¹⁷. Proteine, die anhand des PEXEL transportiert werden, gelangen ebenso wie „MGC-basic“ Proteine in die Peripherie des Parasiten, von wo aus sie anschließend in das Wirtszytosol übertreten²¹⁸⁻²²⁰. Im Gegensatz dazu sorgt das „MGC-basic“-Signalmotiv nach erfolgter Translokation für die Verankerung des Proteins an der Membran der parasitophoren Vakuole⁹⁷. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Zielsteuerung von Proteinen mit dem „MGC-basic“-Signalmotivs sollten zur Aufklärung beitragen, ob das Motiv als generelles Translokationsmotiv für Proteine zur parasitophoren Vakuole benutzt wird.

Für Eukaryoten ist beschrieben, dass zweifach acylierte Proteine, meist Proteine die an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind, zu bestimmten, subzellulären Membranregionen transportiert werden²²¹⁻²²³. Diese sind aufgrund ihres hohen Cholesteringehalts resistent gegen die Behandlung mit Detergenzien und werden daher als „Detergenz-Resistenten-Membranen“ bezeichnet. Weitere Namen sind auch „rafts“ bzw. „caveolae“⁷⁴. Daraus lässt sich für dies Arbeit, auf *P. falciparum* bezogen, die Hypothese ableiten, dass Signaltransduktionsmoleküle, die ihre Aufgabe in der parasitophoren Vakuole des Parasiten haben, dasselbe Translokationssignal verwenden²²⁴. In diesem Zusammenhang steht das „MGC-basic“-Signalmotiv und seine genaue Zusammensetzung, die letztendlich erst den korrekten Transport zur parasitophoren Vakuole ermöglicht, im Fokus dieser Arbeit. Hierfür wurden zu Zielsteuerungsexperimenten sechs Signaltransduktionsproteine ausgewählt, die N-terminal mit einem Palmitat und einem Myristat zweifach acyliert sind und bei denen sich daran eine Folge basischer Aminosäuren anschließt. Es wurden also Proteine ausgewählt, die ein potentiell „MGC-basic“-Signalmotiv besitzen.

Die Untersuchung der Lokalisation der Proteine PfCAP, PfADK, Pfrab_5b und PfPP2C_like sollte zeigen, ob es sich bei dem „MGC-basic“-Signalmotiv tatsächlich um ein Translokationssignal zur

parasitophoren Vakuole und damit verwandten Strukturen wie dem tubovesikulären Netzwerk handelt.

Um eine Co-Lokalisation mit der PfCDPK1 zu untersuchen, wurde neben dem entsprechenden Protein, eine inaktive Mutante der PfCDPK1 (PfCDPK1-D212A, da eine Überexpression der aktiven Kinase für den Parasiten tödlich ist⁹⁷) co-transfiziert. Es konnte gezeigt werden, dass PfCAP, PfADK, Pfrab_5b und PfPP2C_like und somit alle vier untersuchten Proteine mit der PfCDPK1 in der parasitophoren Vakuole co-lokalisiert waren. Auffällig war, dass die untersuchten Proteine häufig nicht gleichmäßig in der parasitophoren Vakuole verteilt waren sondern an bestimmten Stellen konzentriert auftraten. Von diesen Stellen gingen oftmals Ausstülpungen des tubovesikulären Systems aus, die der Parasit aufbaut, um mit der Wirtszelle in Kontakt zu treten⁷⁴. Ähnliche Ansammlungen wurden anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen für die PfCDPK1 bereits beschrieben⁹⁷. Solche Akkumulationen der Proteine deuten auf eine erhöhte Aktivität hin, wie sie beispielsweise während des Neuaufbaus des tubovesikulären Systems benötigt werden könnte.

Für die PfADK konnte mit einer FRET-Analyse die unmittelbare molekulare Nachbarschaft dieses Proteins zur PfCDPK1 gezeigt werden und gleichzeitig eine der ersten erfolgreichen Untersuchungen mit dieser Methode für Plasmodienproteine überhaupt etabliert werden. Weitere FRET-Untersuchungen mit den Proteinen PfCAP und PfPP2C_like verliefen bislang vielversprechend, ließen sich jedoch aufgrund des sehr schnell ausbleichenden eCFP-Signals bislang nicht dokumentieren.

Um zu zeigen, dass es sich bei dem „MGC-basic“-Signalmotiv um ein generelles Translokationssignal handelt, wurde die Lokalisation von PfGAP45 untersucht. PfGAP45 ist ein Protein des IMC, gehört zum Motorkomplex von *P. falciparum* und weist ebenfalls das „MGC-basic“-Signalmotiv auf⁶¹. Aufgrund seiner Funktion im Parasiten wird es erst in späten Parasitenstadien (Segmenter) exprimiert^{46,61}. Da in diesen Stadien keine Plasmamembran mehr existiert, kann keine Translokation zur parasitophoren Vakuole mehr erfolgen und PfGAP45 unter natürlichen Bedingungen dort nicht vorkommen^{71,92}. Für die Untersuchung der Zielsteuerung dieses Proteins wurde das Gen von PfGAP45 unter die Kontrolle des exogenen Promotors PfCRT („chloroquine resistance transporter“), einem Promotor der vornehmlich in frühen Parasitenstadien aktiv ist, gestellt. So war es möglich das Protein auch in frühen Parasitenstadien zu exprimieren²²⁵. PfGAP45 ist in der parasitophoren Vakuole lokalisiert und konnte in der selben Region wie die PfCDPK1-D212A nachgewiesen werden. Somit scheint das „MGC-basic“-Signalmotiv ein Standardbefehl für die Zielsteuerung von Proteinen zu sein. Ist das Motiv bei einem Protein vorhanden und wird dieses Protein in entsprechenden Stadien des Parasiten exprimiert, so ist eine Translokation des Proteins in die parasitophore Vakuole verpflichtend. Man spricht auch von einem „default motif“.

Um zu zeigen, dass die Translokation der Proteine von der Präsenz des „MGC-basic“-Signalmotivs abhängt, wurden von PfCAP, der PfADK und PfGAP45 Deletionskonstrukte erstellt. Diesen Konstrukten fehlte das N-terminale „MGC-basic“-Signalmotiv. Transfektionsexperimente mit diesen N-terminal deletierten Proteine ergaben, dass diese Proteine nicht mehr in der parasitophoren Vakuole, sondern im Zytosol des Parasiten zu finden waren. Dies bestätigte Beobachtungen, die bereits mit N-terminal veränderten Konstrukten der PfCDPK1 durchgeführt wurden. Hierbei wurde von Moeskes et al. bereits für die Translokation der Kinase gezeigt, dass der Verlust eines der drei „MGC-basic“-Signal motive die korrekte Zielsteuerung der PfCDPK1 zur parasitophoren Vakuole verhindert⁹⁷. Somit scheint das Vorhandensein des „MGC-basic“-Signalmotivs für die korrekte Zielsteuerung der Proteine unbedingt notwendig zu sein.

Um die Bedeutung weiterer Faktoren in der Proteinsequenz für die Translokation zu parasitophoren Vakuole auszuschließen, wurde lediglich der N-terminale Bereich, in dem das „MGC-basic“-Signalmotiv zu finden ist, für Translokationsexperimente genutzt. Dies wurde bislang in dieser Form nur für die „Leader“-Sequenz von Pfrab_5b durchgeführt. Das Konstrukt mit der potentielle Zielsteuerungssequenz war genau wie das vollständige Protein in der parasitophoren Vakuole zu finden und mit der PfCDPK1-D212A co-lokalisiert. Vergleichbares wurde bereits für ein etwas längeres Konstrukt mit der „MGC-basic“-Signalmotivsequenz der PfCDPK1 gezeigt⁹⁷. Damit scheint die Translokation vom Vorhandensein des „MGC-basic“-Signalmotivs und keinen weiteren Faktoren abzuhängen.

Die Untersuchung von PfARM, ebenfalls einem „MGC-basic“ Protein, erbrachte allerdings ein anderes Ergebnis als erwartet. Das Protein war nicht in der parasitophoren Vakuole, sondern im Zytosol des Parasiten lokalisiert. Weshalb das Protein im Zytosol und nicht zur parasitophoren Vakuole gefunden wird, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht klar. Möglicherweise hängt dies mit Faktoren zusammen, welche die Funktionalität des basischen Clusters beeinflussen können. Bei PfARM könnte dies mit dem Armadillo-repeat Motiven zusammen hängen, die aufgrund einer bislang nicht näher bekannten Interaktion das Protein im Zytosol zurück halten. Um dies näher aufzuklären, sollten in weiteren Versuchen Konstrukte erstellt werden, bei denen das Armadillo-repeat Motiv an Proteine angefügt wird, von denen ein Transport zur PV bekannt ist (z.B. PfCDPK1, PfADK, PfCAP, PfGAP45). Auch der Phosphorylierungsstatus des Proteins könnte hier eine Rolle spielen. Die Analyse der Phosphorylierungsstellen bei PfARM ergab, dass drei Aminosäuren im unmittelbaren Bereich des basischen Clusters phosphoryliert wurden (Thr 27, Ser 33 und Ser 36, s. auch 4.4). Dies führt zu Veränderungen der Ladung und die Anziehung des basischen Bereiches zur Membran kann aufgehoben werden^{226,227}. In diesem Zusammenhang sollte in weiteren Versuchen gezeigt werden, in welchen Stadien des Parasiten das Protein exprimiert wird, um Vergleiche zwischen Aktivität und Lokalisation des Proteins ziehen zu können. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass bei der Zusammensetzung des basischen Clusters eine Voraussetzung nicht erfüllt ist. Welche Voraussetzungen die Zusammensetzung des basischen Cluster haben muss, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Vergleiche der basischen

Bereiche der untersuchten Proteine sowie der Ladung in diesem Bereich geben bislang keine Anhaltspunkte auf mögliche Zusammenhänge (s. Tab. 4.1). Naheliegender ist, dass die Anzahl der basischen Aminosäuren eine Rolle spielt. Ein Vergleich der in Tab. 4.1 ausgewählten Bereiche gibt darüber bislang keinen genauen Aufschluss. Die Ladung von PfARM liegt ebenso wie die Ladung des in der parasitophoren Vakuole lokalisierten Pfrab_5b und der dazugehörigen 34 Aminosäuren umfassenden „Leader“-Sequenz Pfrab_5b_leader bei +3. Möglicherweise ist der Bereich, der für das Zielsignal verantwortlich ist, länger als die für diese Arbeit zugrunde gelegten ersten 30 Aminosäuren im N-terminalen Bereich der Proteine. Ein Vergleich der ersten 40 Aminosäuren brachte bislang keinen weiteren Aufschluss, bei PfCAP veränderte sich die Ladung von -1 auf +1, bei den restlichen Proteinen fanden keine Ladungsveränderungen statt.

Protein (PV +/-)	Sequenz des N-Terminus	Ladung des N-Terminus
PfCDPK1	MGCSQSSNV K DF KTRRSK F T NGNNY GK SGN	+5
PfPP2C_like	MGNCASVINH SKFKIKKKEK KNSIDDTHSQ	+4
PfADK	MGSCYSR KNK VSTISLDEEE KKKEKKKKKK	+7
PfCAP	MGNVCTW RQG KEKAGDDNSQ VIK DK ELQNE	-1
Pfrab_5b/_leader	MGCSSTERL TST KN INIVT SPAQQQ KKNA	+3
PfGAP45	MGN KCRSRK VKEPRKDIDE LAER ENLKKQ	+4
PfARM	MGN NCCAGR D LLY KNKLQEF GIEGS KTIRK	+3

Tab. 4.1: Vergleich der basischen Cluster der „MGC-basic“ Proteine

In der linken Spalte sind jene Proteine, die bei den Transfektionsexperimenten in die parasitophore Vakuole gelangten, in grün dargestellt. PfARM ist als einziges untersuchtes Protein, das im Zytosol des Parasiten verblieb, rot markiert. In der mittleren Spalte sind jene Aminosäuren, welche die basischen Cluster ausmachen, blau gekennzeichnet.

Um einen genaueren Aufschluss über die Zusammensetzung des basischen Cluster und die Bedeutung der Kombination der basischen Aminosäuren zu erlangen, wird es notwendig sein, einzelne basische Aminosäuren und unterschiedliche Kombinationen mittels Mutationsexperimenten zu deletieren. Translokationsexperimente mit solchen deletierten und mutierten basischen Clustern würden zur Aufklärung der genauen Zusammensetzung des „MGC-basic“-Signalmotivs beitragen. Des Weiteren müssen in zukünftigen Experimenten die noch ausstehenden Untersuchungen der „MGC-basic“ Deletionsmutanten sowie der „Leader“-Sequenzen mit den noch fehlenden Proteinen abgeschlossen werden.

Die Ergänzung der Liste der zu untersuchenden Proteine durch weitere „MGC-basic“ Kandidaten wie beispielsweise der PfScramblase (einem Protein, das möglicherweise am Aufbau von Membranen beteiligt ist²²⁸) ist bereits in Arbeit und soll die bereits gesammelten Ergebnisse untermauern und möglicherweise vervollständigen.

4.3 Interaktionspartner der PfCDPK1

Im Folgenden werden mit PfrKIP und PfCAP zunächst die Ergebnisse der Untersuchungen zweier Proteine diskutiert, die einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität der PfCDPK1 haben. Im Anschluss werden erhaltene Ergebnisse der Untersuchungen von Proteinen diskutiert, die reine Substrate der PfCDPK1 darstellen (PfARM, Pfrab_5b, PfADK). Die Bedeutung von PfGAP45 als Substrat der PfCDPK1 wurde bereits unter 4.1 beschrieben.

4.3.1 Regulatoren der PfCDPK1

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass PfrKIP eine regulatorische Funktion auf die Aktivität der PfCDPK1 ausübt. Die Anwesenheit von PfrKIP steigerte die Ca^{2+} -abhängige sowie die Ca^{2+} -unabhängige Autophosphorylierungsaktivität der PfCDPK1. Eine ähnliche Funktion übt RKIP in Säugerzellen aus, indem es die Autophosphorylierung von Raf-1 und der Proteinkinase C beeinflusst. Allerdings fungiert RKIP in Säugerzellen nicht als Substrat von Raf-1, sondern lediglich von der Proteinkinase C^{187,200}. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PfrKIP ein Substrat der PfCDPK1 ist. Des Weiteren übt PfrKIP einen Effekt auf die Substratphosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 aus. Die durch PfrKIP induzierte Steigerung der Autophosphorylierung der PfCDPK1 geht mit einer Verminderung der Substratphosphorylierung einher, was in dieser Arbeit am Beispiel des exogenen Substrats Casein demonstriert wurde⁹⁶. Anhand dieses Versuchs konnte gezeigt werden, dass mit einer zunehmendem PfrKIP-Konzentration von 3 ng bis 2,1 μg die Substratphosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 kontinuierlich abnahm, bis die Caseinphosphorylierung schließlich um 80% inhibiert wurde. Die Phosphorylierung des PfrKIP nahm allerdings trotz Abnahme der Caseinphosphorylierung um das 1,6-fache zu. Daher kann die Inhibition der Caseinphosphorylierung nicht mit einer kompetitiven Hemmung (ausgelöst durch zwei Substrate) erklärt werden, da dies zu einer Verminderung der Phosphorylierung beider Substrate führen müsste^{229,230}. Ein Einfluss auf die Substratphosphorylierungsaktivität von Raf-1 gegenüber dem basischen Myelin-Protein wird durch die Bindung von RKIP nicht ausgeübt^{187,231}. Ob die Substratphosphorylierungsaktivität der Proteinkinase C gegenüber exogenen Substraten durch RKIP beeinflusst wird, ist bislang nicht bekannt.

In Säugern phosphoryliert die Proteinkinase C ein Serin an der Aminosäureposition 153 in RKIP²⁰⁰. Dieses Serin ist im RKIP-Ortholog von *Plasmodium* nicht konserviert, daher wurden die Aminosäuren in PfrKIP bestimmt, die durch die PfCDPK1 phosphoryliert werden. Die massenspektrometrische Analyse zeigte, dass in PfrKIP ein Serin an der Stelle 96 phosphoryliert wurde. Diese Phosphorylierung folgte mit S/TXXK/R einem für die PfCDPK1 bis zu dieser Arbeit unbekanntem Phosphorylierungsmotiv^{45,85}.

Wie zuvor beschrieben wird die PfCDPK1 während der gesamten intraerythrozytären Phase des Parasiten exprimiert⁹⁶. Hauptsächlich wird die Kinase in extrazellulären Kompartimenten von *P. falciparum* gefunden, in denen dynamische Veränderungen der Membran vollzogen werden wie in der wachsenden parasitophoren Vakuole sowie dem sich ausbildenden tubovesikulären Netzwerk⁹⁷. Im Gegensatz dazu wurde RKIP ursprünglich als ein zytosolisches Protein beschrieben²³². Bindungsstudien haben allerdings die Affinität von RKIP zu Phosphatidylethanolamin belegt, einem Phospholipid, das an der inneren Plasmamembran vorkommt, wodurch ein Vorkommen von RKIP in diesem Bereich der Zelle wahrscheinlich wird²³³. Des Weiteren konnte RKIP, obwohl es kein ersichtliches Sekretionssignal besitzt, immunologisch auf der Oberfläche von Rattenfibroblasten nachgewiesen werden¹⁸⁶. Ist die Situation in *P. falciparum* ähnlich, dann wäre eine Interaktion von PfCDPK1 und PfrKIP *in vivo* möglich, da beide Proteine während der Blutstadien exprimiert werden^{45,96}.

In *P. falciparum* gibt es den klassischen, aus drei Komponenten bestehenden MAP-Kinase Signaltransduktionsweg nicht²³⁴. Mit *pfmap-1* und *pfmap-2* sind zwar zwei homologe Gene der Mitogen-aktivierten-Map-Kinase bekannt, aber der genaue Weg der Aktivierung oder ein Ortholog zur MAPKK sind bislang unbekannt (s. Abb. 4.1)²³⁵. RKIP ist allerdings in *P. falciparum* ebenso ein Substrat der PfCDPK1, wie es RKIP in Säugerzellen für die Proteinkinase C ist. Somit könnte die PfCDPK1 im Parasiten eine ähnliche Funktion einnehmen wie sie die Proteinkinase C in der MAPKKK-Kaskade einnimmt (s. Abb. 4.2).

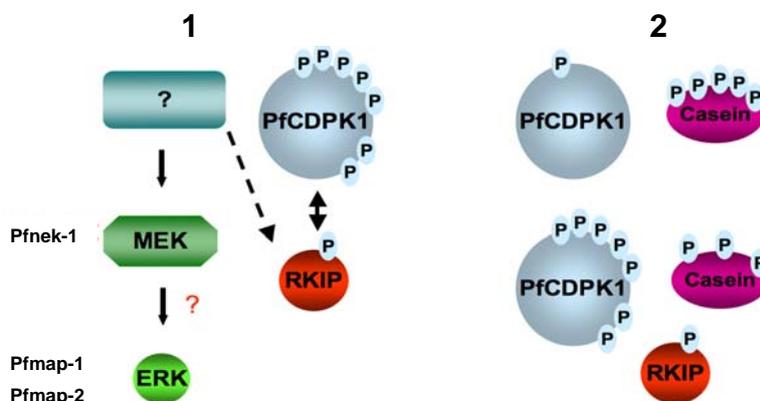


Abb. 4.1: Modell der Funktion von PfrKIP in *P. falciparum*

(1) Mögliche Aktivierung einer MAPKKK-ähnlichen Kaskade in *P. falciparum*. Die Phosphorylierung von PfrKIP durch PfCDPK1 gibt einen bislang unbekanntes Effektor frei, dies führt zur Aktivierung der Kaskade; (2) Die Phosphorylierung von PfrKIP durch die PfCDPK1 reduziert die Substratphosphorylierung und erhöht gleichzeitig die Autophosphorylierung der Kinase.

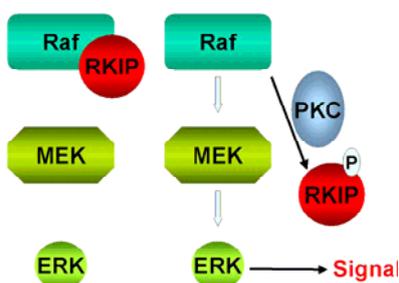


Abb.4.2: Stark schematische Darstellung der MAPKKK-Kaskade bei Säugern (s. auch 1.5)

Auch die im Rahmen dieser Arbeit unternommenen Untersuchungen des cAMP-bindenden Proteins PfCAP deuten auf ein regulatorisches System mit Einfluss auf die Aktivität der PfCDPK1 hin. In *P. falciparum* sind bereits andere regulatorische Systeme, die im Zusammenhang mit cAMP vermittelten Reaktionen stehen, bekannt^{117,236}. So existiert mit der *P. falciparum* Protein Kinase A (PfPKA) eine Proteinkinase, die als primärer Effektor eines cAMP-Signals gilt¹¹¹. Neben einer Bedeutung für die Reifung und Differenzierung von Merozoiten steht cAMP in *P. falciparum* auch in einem Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklusses¹¹⁷.

Es konnte gezeigt werden, dass PfCAP ein Substrat der PfCDPK1 ist. Die Phosphorylierungsaktivität der Kinase lag bei PfCAP allerdings nur etwa bei 1/10 im Vergleich zur Phosphorylierung des exogenen Referenzsubstrates Casein (s.3.2.1.2). Die Zugabe von cAMP zur Phosphorylierungsreaktion bestätigte, dass cAMP einen Einfluss auf die Phosphorylierung des cAMP bindenden Proteins PfCAP hatte. Die Phosphorylierung des potentiellen Regulators nahm um 1/5 ab.

PfCAP beeinflusst auch die Autophosphorylierung der PfCDPK1 (s. 3.2.1.2). Nach Zugabe von PfCAP sank die Autophosphorylierungsaktivität der Kinase um 92%. In Gegenwart von cAMP stieg die Autophosphorylierungsaktivität der PCDPK1 im Vergleich zur Kontrolle ohne cAMP Zusatz um den Faktor 3 auf ca. 25% wieder an. Des Weiteren konnte ein Einfluss von cAMP und PfCAP auf die Phosphorylierung von Substraten gezeigt werden. Die Phosphorylierung von Casein nahm in Gegenwart von PfCAP ab um ca. 40%, nach cAMP-Zugabe um weitere 16%, auf 44% des Ausgangswertes. Bei PfARM stellt sich die Situation etwas anders da (s. 3.2.2.2). Nach PfCAP Zugabe steigt die Phosphorylierungsaktivität der PfCDPK1 um ca. 30% an. Eine zusätzliche Addition von cAMP (Kinasereaktion mit PfARM, PfCAP und cAMP) verringert die Phosphorylierung auf 78% im Vergleich zu PfARM alleine. Diese unterschiedlichen regulatorischen Einflüsse von PfCAP und cAMP sind vermutlich auf interne Phosphorylierungsstellen der Substrate zurückzuführen. Um dies näher zu beschreiben, muss in weiteren Versuchen der Phosphorylierungsstatus der verwendeten Substrate sowohl mit als auch ohne cAMP nach einer Kinasereaktion bestimmt werden.

Mit den Resultaten dieser Arbeit wird deutlich, dass das cAMP-bindende Protein PfCAP gemeinsam mit cAMP einen Einfluss auf die Regulation der PfCDPK1 nimmt, da es sowohl ihre Autophosphorylierungsaktivität wie auch ihre Substratphosphorylierungsaktivität veränderte. Inwieweit dieses Resultat eine Relevanz *in vivo* haben und welchen Einfluss diese Regulation auf die Entwicklung des Parasiten nimmt, bleibt in weiteren Experimenten zu klären. Da für cAMP bereits ein Einfluss auf die Entwicklung des Parasiten nachgewiesen ist, wäre eine Regulation bei der Neubildung des tubovesikulären Systems denkbar. Erste Hinweise für die Bedeutung dieses Regulationssystems könnte ein *knock out* von PfCAP liefern, um die Bedeutung des Proteins für die Entwicklung des Parasiten näher zu bestimmen. Sicher ist jedoch, dass mit cAMP neben Calcium ein weiterer Regulator für die Aktivität der PfCDPK1 identifiziert wurde.

4.3.2 Substrate der PfCDPK1

Weitere Phosphorylierungsexperimente zeigten, dass alle untersuchten Proteine (PfGAP45, PfCAP, PfADK, PfARM, Pfrab_5b sowie PfrKIP) *in vitro* Substrate der PfCDPK1 sind. Eine quantitative Untersuchung der Phosphorylierung von PfADK war bislang nicht möglich, da es nur als Fusionsprotein mit NusA exprimiert werden konnte. Massenspektrometrische Untersuchungen zeigten, dass in NusA 17 Aminosäuren von der PfCDPK1 phosphoryliert wurden, so dass eine Bestimmung der spezifischen Aktivität der PfCDPK1 für PfADK unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich war. Somit muss zunächst, um ein verwertbares Ergebnis zu erhalten, die Abspaltung von NusA erfolgen. Dies wird in zukünftigen Versuchen mittels einer Behandlung mit einer TEV-Protease erfolgen.

Bei der Untersuchung der Phosphorylierung von PfARM zeigte sich, dass es sich bei diesem Protein um das bisher beste Substrat der PfCDPK1 handelte. Das Protein wurde stärker phosphoryliert als das Referenzsubstrat Casein. Die PfCDPK1 zeigte (ähnlich wie auch für PfGAP45, s. 4.1) ihre höchste spezifische Aktivität für die während dieser Arbeit untersuchten Proteine. Die starke Phosphorylierung von PfARM deutet darauf hin, dass dieser Phosphorylierungsprozess durch die PfCDPK1 auch *in vivo* eine Rolle spielen könnte. Das Protein ist nicht in der parasitophoren Vakuole des Parasiten lokalisiert (s. 4.2). Damit ist eine Beteiligung von PfARM am Aufbau des tubovesikulären Systems auszuschließen. Eine Beteiligung des Proteins bei der Ausbildung der Merozoitenmembran wäre jedoch möglich. Der Parasit bildet während des Schizontenstadiums zunächst ein Synzytium, darauf folgt die Abtrennung der einzelnen Kerne durch Membraneinschnürungen, die von der Plasmamembran des Parasiten ausgehen²³⁷. PfARM könnte hierbei während des Bildungs- bzw. Fusionsprozesses von Membranen der entstehenden Merozoiten eine Rolle spielen.

Auch für Pfrab_5b konnte *in vitro* eine Interaktion mit der PfCDPK1 nachgewiesen werden. Die Phosphorylierungsintensität beträgt allerdings nur ca. 2% der Intensität der Caseinphosphorylierung. Dieser geringe Wert stellt zunächst eine *in vivo* Relevanz in Frage. Lokalisationsexperimente dieser Arbeit zeigten jedoch, dass Pfrab_5b ebenso wie PfCDPK1 in die parasitophoren Vakuole gelangt. Eine Co-Lokalisation dieser beiden Proteine macht eine Bedeutung der Pfrab_5b Phosphorylierung für den Parasiten sehr wahrscheinlich. In Eukaryoten sind rab-Proteine membranassoziiert^{147,151}. Ihre Phosphorylierung führt zur Aktivierung, die sich beispielsweise auf den Vesikeltransport auswirkt¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Ähnliches könnte für Pfrab_5b auch in *Plasmodium* gelten. So könnte das Protein beispielsweise durch Vesikelbildungen am Stoffaustausch mit dem Erythrozyten beteiligt sein²¹². Demnach handelt es sich bei den in Abb. 3.54 und 3.55 (s. 3.2.4.3.2 und 3.2.4.3.3) dargestellten Akkumulationen möglicherweise um solche Vesikelbildungen. Die Phosphorylierung von Pfrab_5b durch die PfCDPK1 könnte einen regulatorischen Einfluss auf den Vesikeltransport ausüben.

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine (PfGAP45, PfRKIP, PfCAP, PfARM und Pfrab_5b) von der PfCDPK1 *in vitro* phosphoryliert wurden. Bei den ausgewählten Proteinen wurde bewusst darauf geachtet, dass es sich um Proteine handelte, die neben dem „MGC-basic“-Signalmotiv (mit Ausnahme von PfRKIP) alle im weiteren Sinne eine Funktion in Signaltransduktionsprozessen des Parasiten haben könnten. Die spezifischen Aktivitäten der PfCDPK1 gegenüber diesen Proteinen machen deutlich, dass die Kinase eine entscheidende Rolle in der Regulation der Signaltransduktion des Parasiten zu spielen scheint. Die Ergebnisse stützen die Vermutung, dass die PfCDPK1 am Aufbau des tubovesikulären Systems beteiligt ist. Dies belegen nicht nur die unter diesem Punkt diskutierten Phosphorylierungsexperimente mit den oben genannten Proteinen, sondern vor allem die während der Lokalisationsexperimenten beobachteten Akkumulationen. Diese Anhäufungen der PfCDPK1 treten an den gleichen Stellen wie das parallel untersuchte „MGC-basic“ Protein auf (s. 4.2) und könnten auf eine starke Aktivität im Bereich des sich entwickelnden tubovesikulären Netzwerks hindeuten. Um die Regulationsmechanismen besser zu verstehen ist es notwendig, in zusätzlichen Versuchen weitere Interaktionspartner der untersuchten Proteine zu bestimmen. Hierzu steht mit dem yeast-two-hybrid System eine vielversprechende Methode zur Verfügung^{238,239}.

Von großer Relevanz für zukünftige Experimente, ist die Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse *in vivo*. Hierzu steht ein System zur Verfügung, mit dem es möglich ist, natürliche Substrate der PfCDPK1 zu identifizieren^{240,241}. Das Prinzip beruht darauf, dass eine im katalytischen Zentrum veränderte PfCDPK1 in den Parasiten eingebracht wird. Das katalytische Zentrum dieser Kinase ist so modifiziert, dass es eine höhere Affinität zu einem modifizierten, radioaktiv markierten ATP-Analogon gegenüber dem Wildtyp aufweist^{242,243}. Dies ermöglicht es in einem Zelllysat, natürliche Substrate der PfCDPK1 mit einem radioaktiven ATP-Phosphat zu kennzeichnen. Die Identifikation der Substrate erfolgt anschließend mittels 2D Gelelektrophorese und Massenspektrometrie.

4.4 Charakterisierung der durch die PfCDPK1 phosphorylierten Peptide

Da bislang keine Informationen über Phosphorylierungsstellen in den „MGC-basic“ Proteinen vorlagen, sollten diese im Zuge dieser Arbeit näher charakterisiert werden. Dabei wurden mittels massenspektrometrischen Messungen die Phosphorylierungsstellen von PfARM, PfADK, PfCAP sowie PfGAP45 und PfRKIP (s. 4.1 bzw. 4.3) bestimmt. Die Aufklärung der phosphorylierten Bereiche sollte neue Erkenntnisse über die Phosphorylierungsmuster der PfCDPK1 liefern und neue Einblicke über mögliche Regulationsprozesse im Wechselspiel von Kinase und Substrat geben.

Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung von Armadillo repeat Proteinen (bzw. Catenin ähnlichen Proteinen) eine Regulation ihrer Aktivität zur Folge hat²⁴⁴. So konnte beispielsweise kürzlich gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Ser 561 sowie Ser 688 in Armadillo bei *Drosophila* durch die Kinase Mtb einen Einfluss auf die Aktivität des Proteins und somit die dadurch bedingte Vermittlung der Zelladhäsion ausübt²⁴⁵. Die Interaktion dieses Armadilloproteins mit einem Cadherin wird destabilisiert, was zu einem Abfall der durch das Cadherin vermittelten Adhäsion führt. Zwar sind diese Phosphorylierungsstellen in *Plasmodium* nicht konserviert (Thr 27, Ser 33 und Ser 36, s. 3.2.2.2.1), dennoch ist auch hier eine Regulation der Proteinaktivität nicht auszuschließen. So liegen die phosphorylierten Aminosäuren bei PfARM im Bereich des basischen Clusters (MGNNCCAGRD LLYKNKLQEF GIEGSKTIRK LLSFTSNDIL). Die Phosphorylierung der Aminosäuren in diesen Bereich beeinflusst die Ladungsverhältnisse, negative Ladungen nehmen dabei in einer positiv geladenen Region zu. Dies reduziert die elektrostatische Anziehung der N-terminalen Region an die sauren Phospholipide der Membran, was zu einer Ablösung des Proteins von der Membran führen könnte. Für MARCKS-Proteine, Substrate der Proteinkinase C, die über ein Myristat an der Membran verankert sind, wurde ein solcher Regulationsmechanismus beschrieben^{221,226,227}. Eine Phosphorylierung von PfARM durch die PfCDPK1 und damit verbunden eine Ablösung des Proteins von der Membran könnte zur Inaktivierung des Proteins führen und somit einen An/Aus-Regulationsmechanismus für die Aktivität von PfARM darstellen. Des Weiteren könnte anhand der Phosphorylierung durch eine weitere, bislang nicht bekannte, Kinase, die Funktionalität des „MGC-basic“-Signalmotivs beeinflusst werden (s. auch 4.2). Da der N-terminale Bereich des Proteins aufgrund seiner Ladung nicht mehr an der Membran bindet, wäre das „MGC-basic“-Signalmotiv nicht mehr aktiv und das Protein würde nicht zur parasitophoren Vakuole transportiert. Aufgrund der zytosolischen Lokalisation von PfARM (s. 4.2) sind weitere Phosphorylierungen durch zytosolisch vorkommende Kinasen denkbar. Dies könnte ebenfalls sowohl die Funktionalität des „MGC-basic“-Signalmotivs beeinflussen als auch die Aktivität des Proteins selbst.

Auch bei der PfADK wurden mit Ser 12 und Thr 13 Phosphorylierungsstellen im basischen Cluster des Proteins gefunden (MGSCYSRKNK VSTISLDEEE KKKEKKKKKK). Auch in diesem Fall könnte die Phosphorylierung die Membranbindung des basischen Clusters beeinflussen. Allerdings sind im Gegensatz zu PfARM lediglich zwei statt drei Aminosäuren im basischen Bereich phosphoryliert und der Grundladungszustand ist mit +7 (im Vergleich zu +3 bei PfARM) wesentlich höher. Dies macht eine Beeinflussung der Membranbindungseigenschaften eher unwahrscheinlich, schließt sie jedoch nicht aus. Denkbar ist auch, dass die Phosphorylierung sich aufgrund der Ladungsveränderung auf die dreidimensionale Struktur des Proteins und damit auf seine Funktionalität auswirkt. Wie sich eine Deletion der Phosphorylierungsstellen *in vivo* auf die Entwicklung des Parasiten auswirkt müssen weitere Versuche zeigen.

Bei PfCAP konnten zwei durch die PfCDPK1 phosphorylierte Aminosäuren (Ser 139 und Ser 149) bestimmt werden. Auch für Proteine, die mit cAMP interagieren, sind Regulationen über deren Phosphorylierungszustand beschrieben^{119,246}. Für einige Enzyme ist bekannt, dass ihre Affinität zu einem „second messenger“ durch ihren Phosphorylierungsstatus beeinflusst wird²⁴⁶. Die Phosphodiesterase 5 wird unmittelbar vor ihrer cGMP-Bindedomäne phosphoryliert, was zum einen zur Aktivierung des Enzyms führt und zusätzlich die Affinität zur cGMP-Bindung um das zehnfache erhöht²⁴⁷⁻²⁴⁹. Vergleichbar könnte auch die Situation bei PfCAP sein. Die beiden Phosphorylierungsstellen liegen unmittelbar vor der cAMP-Bindungsdomäne, eine Phosphorylierung könnte die Affinität zu cAMP erhöhen und eine Aktivierung des Proteins zur Folge haben.

Des Weiteren wurden die Autophosphorylierungsstellen der PfCDPK1 bestimmt. Nicht nur in *Plasmodium* sondern auch in einer Vielzahl anderer bekannter Organismen zeichnen sich CDPKs durch eine sehr hohe Autophosphorylierungsaktivität aus²⁵⁰. So wurden mit Ser 204, Ser 216, Ser 217 und Thr 231 bereits vier Autophosphorylierungsstellen von CDPKs beschrieben, die sich auch in PfCDPK1 wiederfinden lassen²⁵⁰. Neben den bereits bekannten vier phosphorylierten Aminosäuren konnten mit dieser Arbeit insgesamt 24 weitere Autophosphorylierungsstellen der PfCDPK1 identifiziert werden. Fünf davon sind dabei auf *in vivo* Phosphorylierungsprozesse zurückzuführen, die bereits während der rekombinanten Expression in *E. coli* auftreten. Hier sind Thr 14, Ser 34, Thr 315, Thr 339 sowie Ser 453 zu nennen. Die restlichen 19 (s. 3.1.2) sind auf *in vitro* Phosphorylierungen zurückzuführen.

Auffällig bei den Ergebnissen ist, dass neben den 23 Serinen bzw. Threoninen mit dem Tyrosin 44 eine für diese Kinase untypische Aminosäure phosphoryliert wurde. Ser/Thr-Proteinkinasen zeichnen sich durch eine sehr hohe Spezifität aus, obwohl sie sich hauptsächlich nur in der Tiefe des katalytischen Zentrums von Tyrosinkinase unterscheiden²⁵¹. Versuche in früheren Studien Ser/Thr-Kinasen zu einer Tyrosinkinaseaktivität zu bewegen scheiterten^{252,253}. Lediglich für eine Casein-Kinase, einem Enzym, das zu den Ser/Thr-Proteinkinasen gezählt wird, zeigte sich vereinzelt eine schwache Tyrosinkinaseaktivität²⁵⁴. Für die Calcium/Calmodulin-abhängige Ser/Thr-Kinase II konnte allerdings ebenfalls eine Tyrosinkinaseaktivität im Zuge der Autophosphorylierungsaktivität beobachtet werden²⁵⁵. Ähnlich wie bei der PfCDPK1 befindet sich dieses Tyrosin mit der Position 40 im N-terminalen Bereich der Kinase. Genau wie für die PfCDPK1 sind auch für diese Kinase keine Tyrosinphosphorylierungen gegenüber entsprechenden Substraten bekannt. Wahrscheinlich hängt die Tyrosinphosphorylierung mit intramolekularen Gegebenheiten zusammen, die unter bestimmten Voraussetzungen nur innerhalb des Enzyms auftreten können und daher nicht gegenüber Substraten beobachtet werden. Auch Entropieeffekte, sind als mögliche Erklärung für die Tyrosinphosphorylierung denkbar. Vermutlich hängt diese Tyrosinphosphorylierung, ebenso wie die restlichen 23 Autophosphorylierungen der Serine und Threonine mit Regulationsmechanismen zusammen, die sich auf die Aktivität der Kinase auswirken können. Erste Anzeichen dafür liefern die oben beschriebenen Ergebnisse mit PfRKIP (s. 4.3), die zeigen, dass eine veränderte Autophosphorylierungsaktivität sich auch auf den Phosphorylierungsstatus

von Substraten auswirken kann⁴⁵. Die genaue Steuerung und Auswirkungen dieses Regulationsmechanismus müssen jedoch noch geklärt werden, was sicherlich Vergleiche mit konservierten Autophosphorylierungsstellen von CDPKs anderer Organismen nötig macht.

Die Autophosphorylierungsstellen der PfCDPK1 erstrecken sich über das gesamte Enzym. Neben dem Tyrosin konnten drei phosphorylierte Serine im basischen Cluster der Kinase identifiziert werden. Dies könnte, wie oben bereits beschrieben, mit einem Ablösemechanismus von der Membran zusammen hängen. Auch im Bereich der Kinasedomäne wurden Phosphorylierungsstellen gefunden. Es ist bekannt, dass Phosphorylierungen im Bereich des katalytischen Zentrums die Aktivität eines Enzyms verändern können²⁵⁰. Im Bereich der katalytischen Domäne der PfCDPK1 wurden acht Phosphorylierungsstellen (Ser 90, Ser 98, Thr 100, Ser 122, Ser 204, Ser 217, Ser 231 und Thr 315) identifiziert. Dies spricht für eine Autoregulation der katalytischen Aktivität der PfCDPK1, die über den Phosphorylierungsstatus der Kinase gesteuert werden kann. Mit Thr 371, Ser 406, und Ser 453 wurden drei Autophosphorylierungsstellen in der Calciumbindenden Domäne gefunden. Eine Phosphorylierung in diesem Bereich beeinflusst die Calcium-Affinität und kann damit regulatorische auf die Aktivität der Kinase einwirken.

Durch die Aufklärung der oben beschriebenen Phosphorylierungsstellen, konnten neben den bereits beschriebenen sieben Motiven (s. Tab 4.2)^{250,256,257}, vier weitere Phosphorylierungsmotive der PfCDPK1 charakterisiert werden (s. Tab. 4.3). Mit der Beschreibung des phosphorylierten Tyrosins wurde ein fünftes neues Motiv identifiziert.

Name	Motiv
Simple 1	B X X S/T
Simple 2	S X B
Motiv 1 minimal	Φ X B X X S X X X Φ
Motiv 1 optimal	B Φ X B X X S X X X Φ B
Motiv 2	B B X B Φ X X X S/T X B
Motiv 3	Φ S/T Φ X B B
Motiv 4	A/L X R X X S X R Z R

Tab. 4.2: Bislang bekannte Phosphorylierungsmotive der PfCDPK1

X = beliebige Aminosäure; B = basische Aminosäure (R oder K); Φ = hydrophober Rest; A = Alanin; L = Leucin; S = Serin; T = Threonin

Name	Motiv
Simpel 3	BXS/T
Simpel 4	S/TXXB
Motiv 5	BXXXXXS/T
Motiv Y	BXXX ^Y

Tab. 4.3: Neu identifizierte Phosphorylierungsmotive der PfCDPK1

X = beliebige Aminosäure; B = basische Aminosäure (R oder K); Y = Tyrosin; S = Serin; T = Threonin

4.5 Inhibitoren der PfCDPK1

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse bezüglich der Bedeutung der PfCDPK1 für den Parasiten unterstreichen die essentielle Rolle der Kinase im Lebenszyklus von *P. falciparum*. So spielt die Kinase wahrscheinlich eine Rolle für die Ausbildung des tubovesikulären Netzwerks, das der Parasit nutzt, um mit seiner Wirtszelle in Kontakt zu treten und seine Versorgung sicherzustellen (s. 4.2)^{71,74}. Die PfCDPK1 nimmt eine zentrale Rolle in Signaltransduktionsprozessen des Parasiten ein, indem sie mit einer Vielzahl von Proteinen, die für die extrazelluläre Signalübertragung eine Rolle spielen, interagiert (s. 4.3). Diese Proteine sind entweder Substrate der PfCDPK1 (PfADK, Pfrab_5b, PfARM, PfGAP45) oder fungieren als Regulatoren (PfCAP, PfRKIP)⁴⁵. Auch die Bedeutung der Kinase für den Invasionsprozess des Parasiten konnte durch diese Arbeit gefestigt werden und die Rolle von PfGAP45, einem Proteine des IMC („inner membrane complex“), als Substrat der PfCDPK1 bestätigt werden^{46,61}. Bei der PfCDPK1 handelt es sich um ein für den Parasiten essentielles Enzym, das daher nicht ausgeschaltet werden kann, ohne ein Absterben des Parasiten zur Folge zu haben. Demnach machen diese Ergebnisse deutlich, dass es sich bei dieser Calcium-abhängigen Proteinkinase, die nicht im Menschen vorkommt, um eine ideale Ansatzstelle für die Entwicklung eines neuen Antimalaria-Medikaments handelt.

Im Laufe dieser Arbeit wurde rekombinant hergestellte PfCDPK1 der Firma Merck/Serono zur Verfügung gestellt. Im Rahmen eines von der WHO geförderten Projekts wurde nach für den Menschen verträglichen Substanzen gesucht, welche die Aktivität der PfCDPK1 hemmen. Diese Substanzen sollten der AG Kappes für weiterführende Experimente zur Verfügung gestellt werden, was aus patentrechtlichen Gründen bislang nicht möglich war.

Die bereit gestellte Kinase lag einem umfangreichen Screening zu Grunde, bei dem über 10.000 sogenannte „kleine Moleküle“ auf ihre Fähigkeit untersucht wurden, die Aktivität der PfCDPK1 zu hemmen²⁵⁸. Dabei wurden bislang mehrere namentlich nicht näher beschriebene inhibitorische Substanzen identifiziert, die als mögliche physiologische Substrate der PfCDPK1 in Frage kommen. Um näheren Aufschluss über die Anforderungen eines effektiven physiologischen Inhibitors der PfCDPK1 zu bekommen, wurden die Strukturen aller erkannter Substanzen mit inhibitorischem Effekt als Grundlage für das Design neuer potentieller Inhibitoren („3D Drug design“) untersucht. Somit scheint die Identifikation eines optimalen Kinaseinhibitors, der als Grundlage für ein neues Antimalariamedikament dient, nur noch eine Frage der Zeit, wobei diese Strategie mittelfristig wahrscheinlich zum Erfolg führen wird.

Zunächst schien mit Purfalcamin ein vielversprechender Wirkstoff gegen die Aktivität der PfCDPK1 gefunden zu sein^{46,201}. Dieses 2,6,9-trisubstituierte Purin zeichnet sich durch seine Affinität zu CDPKs sowie durch seine kostengünstige Herstellung aus. Aus pharmakokinetischen Gründen musste diese Substanz als Grundlage für die Entwicklung eines Medikaments jedoch verworfen werden (persönliche Mitteilung).

Auch für die wissenschaftliche Grundlagenforschung ist die Wahl des optimalen Kinaseinhibitors von entscheidender Bedeutung, beispielweise für die Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse. Green et al. wählten für die Hemmung der PfCDPK1 den Kinaseinhibitor K252a⁴⁶. Die Inhibition der Invasion von Merozoiten in neue Wirtszellen führten sie auf die Zugabe von 348 nM K252a zu späten Parasitenstadien und die damit verbundene Hemmung der PfCDPK1 zurück. Bei K252a handelt es sich um einen sehr unspezifischen Kinaseinhibitor²⁰². Zwar ist er in der Lage mit einem IC_{50} von 45 nm die Aktivität der PfCDPK1 *in vitro* zu hemmen, doch wirkt er auf eine Vielzahl weiterer Kinasen inhibierend^{46,202-205}. Mit IC_{50} -Werten von 18-25 nm werden zusätzlich Proteinkinasen (PK) wie PKA und PKC gehemmt^{202,203}. Damit könnte K252a neben PfCDPK1 auf weitere essentielle Enzyme des Parasiten inhibierend wirken. Beispielsweise ist die Proteinkinase A der primäre Effektor für cAMP Signale in *P. falciparum* und nimmt eine entscheidende Rolle im Entwicklungs- und Differenzierungsprozess des Parasiten ein^{114,116,117}. Die Proteinkinase A ist ein zentraler Regulator des parasitären Zellzyklus¹¹⁶. Wird K252a beispielsweise in einer zu frühen Entwicklungsphase des Parasiten zugegeben, so wäre dies ebenfalls eine Erklärung für die nicht erfolgte Neuinfektion weiterer Wirtszellen, da der Teilungsprozess inhibiert wurde. Dies ist bei Green et al. zwar nicht der Fall, jedoch wurde die Inhibition der Invasion erst 48 Stunden und damit nach einem kompletten Lebenszyklus von *P. falciparum* beobachtet⁴⁶. So ist die von Green et al. aufgestellte Schlussfolgerung, dass eine Inhibition der PfCDPK1 durch K252a sich negativ auf die Neuinfektion von Wirtszellen auswirkt zwar möglich, anhand der Durchführung des Experiments aber nicht ausreichend belegt⁴⁶.

Die in dieser Arbeit gewählte Methode zum Nachweis einer Beteiligung der PfCDPK1 am Invasionsprozess lässt eindeutigeren Rückschlüsse auf die Bedeutung dieser Kinase zu. Mit PPI (4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(*n*-butyl)pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine) wurde ein selektiver Inhibitor der Src-Tyrosinkinase-Familie für die durchgeführten Experimente gewählt (s. auch 4.1)^{206,259}. Der IC_{50} für die Hemmung der Src-Kinase liegt bei 170 nM²⁵⁹. Untersuchungen der AG Kappes zeigten, dass PPI ebenfalls eine stark inhibitorische Wirkung auf die PfCDPK1 ausübt. Der IC_{50} für die Hemmung der PfCDPK1 *in vivo* liegt bei 5,2 μ M (s. 3.1). In *P. falciparum* kommen keine Tyrosinkinasen vor, die ebenfalls von PPI inhibiert werden könnten und damit das Ergebnis verzerren würden. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte zu reifen Schizonten, unmittelbar vor der Ruptur der Erythrozyten. Der Rückgang der Invasion um über 90% konnte bereits 18 h nach Inhibitorzugabe beobachtet werden. Damit stellt das in dieser Arbeit verwendete System, die PfCDPK1 selektiv mittels PPI zu inhibieren, eine effektive und aussagekräftige Methode dar, die zentrale Bedeutung der PfCDPK1 für den Invasionsprozess des Parasiten zu belegen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden biologische Funktionen einer Calcium-abhängigen Proteinkinase des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*, der PfCDPK1 (*Plasmodium falciparum* „calcium dependent protein kinase“1), in der erythrozytären Wachstumsphase des Parasiten untersucht. Hierbei lag der Fokus auf dem Nachweis einer Beteiligung der Kinase am Invasionsprozess des intrazellulären Erregers und auf der Aufklärung der Funktion, die der Kinase in Signaltransduktionsprozessen in den extrazellulären Kompartimenten des Parasiten zukommt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PfCDPK1 eine entscheidende Rolle beim Invasionsprozess von *P. falciparum* spielt. Ihre spezifische Hemmung mit PPI (4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(*n*-butyl)pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine) reduzierte die Invasion von Erythrozyten um 90%. Mit der Phosphorylierung von PfGAP45 konnte ein Protein des Motorkomplexes von *P. falciparum* als Substrat der PfCDPK1 nachgewiesen und somit erste Hinweise auf die molekulare Ebene gewonnen werden, über welche PfCDPK1 in den Invasionsprozess eingereift. Von PfGAP45 konnten fünf *in vitro* Phosphorylierungsstellen bestimmt werden. Die Phosphorylierungen von Ser 156 und Thr 158 schließen sich gegenseitig aus, da immer nur eine Phosphorylierung in dem entsprechenden Phosphopeptid nachgewiesen werden konnte. Dieser Phosphorylierung könnte eine besondere Funktion in der Regulation des Invasionsprozesses zufallen.

Um Einblicke in die Funktion der Kinase zu erhalten, die sie in den extrazellulären Kompartimenten des Parasiten übernimmt, wurden Proteine des Parasiten untersucht, die wie PfCDPK1 das „MGC-basic“-Signalmotiv für die Translokation in extrazelluläre Kompartimente enthalten und gleichzeitig Homologien zu bekannten Signaltransduktionsproteinen aufweisen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden PfCAP, PfARM, PfADK, Pfrab_5b und PfPP2C_like ausgesucht. Von ihnen wurden Fusionsproteine mit einer GFP-Variante hergestellt, um ihre Lokalisation im Parasiten zu untersuchen. Mit Ausnahme von PfARM wurden alle Proteine in extrazellulären Kompartimenten des Parasiten nachgewiesen und zeigten eine Co-Lokalisation mit PfCDPK1. Für PfADK und PfCDPK1 konnte *in vivo* eine unmittelbare molekulare Nachbarschaft mittels Fluoreszenzresonanzenergietransfer-Messungen nachgewiesen werden. Fluoreszenzuntersuchungen zeigten außerdem, dass die untersuchten Proteine nicht gleichmäßig verteilt in den extrazellulären Kompartimenten auftraten, sondern häufig in bestimmten Bereichen akkumulierten, von denen oftmals Membranausstülpungen in das Wirtszytosol ausgingen. Diese Lokalisationen deuten auf eine Beteiligung der untersuchten Proteine an der Bildung des tubovesikulären Systems hin. Um festzustellen, ob es sich bei den genannten Proteinen um Substrate der PfCDPK1 handelt, wurden diese – bis auf PfPP2C_like, deren cDNA nicht gewonnen werden konnte – rekombinant exprimiert und ihre Aufreinigung etabliert. Phosphorylierungsexperimente zeigten, dass alle untersuchten Proteine von PfCDPK1 phosphoryliert werden. PfCAP führte darüber hinaus zu einer Änderung der Autophosphorylierungsaktivität der Kinase. Mit Ausnahme von Pfrab_5b wurden von allen untersuchten Proteinen sowie von der autophosphorylierten PfCDPK1 die Phosphorylierungsstellen bestimmt. In der autophosphorylierten

PfCDPK1 konnte mit Tyr44 – unerwartet für eine Serin/Threoninkinase – ein phosphoryliertes Tyrosin nachgewiesen werden.

Mit PfCAP und PfrKIP („*Plasmodium falciparum* raf kinase inhibitor protein“) konnten zwei Regulatoren der PfCDPK1-Aktivität beschrieben werden. Während PfrKIP die Autophosphorylierungsaktivität der Kinase steigerte und ihre Substratphosphorylierungsaktivität verringerte, inhibierte PfCAP in Gegenwart von cAMP beide Aktivitäten. Mit PfCAP/cAMP wurde erstmalig ein Regulationssystem des Parasiten gezeigt, das cAMP-vermittelte Signalübertragung mit Calcium-vermittelter koppeln könnte.

In einem weiteren Projekt wurde die Funktion des „MGC-basic“-Signalmotivs für die Translokation von Proteinen in die extrazellulären Kompartimente weiter analysiert. Die Untersuchungen in dieser Arbeit ergaben erstmals, dass es sich bei dem Motiv um ein generelles Translokationssignal zur parasitophoren Vakuole zu handeln scheint. Wird PfGAP45, welches unter natürlichen Bedingungen in späten Parasitenstadien vorkommt, in denen die parasitophore Vakuole nicht mehr vorhanden ist, unter der Kontrolle eines entsprechenden Promotors in frühen Parasitenstadien exprimiert, so wird PfGAP45 in die parasitophoren Vakuole transloziert. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem „MGC-basic“-Signalmotiv um ein „default motif“ handelt. Von drei der ausgewählten Proteine wurden Deletionsmutanten hergestellt, denen das „MGC-basic“-Signalmotiv fehlte. Diese waren ausschließlich im Zytosol des Parasiten lokalisiert. Ein Peptid, welches lediglich aus dem „MGC-basic“-Signalmotiv bestand, reichte aus, um das fusionierte eCFP in die parasitophore Vakuole zu translozieren. Von allen untersuchten Proteinen war PfARM das einzige, das trotz „MGC-basic“-Signalmotiv im Zytosol lokalisiert war. Die Ursachen hierfür sind unbekannt, könnten jedoch in der Plastizität des basischen Clusters oder in „Rückhaltefaktoren“ begründet liegen.

6 Literaturverzeichnis

1. World malaria report 2008. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data* (2008).
2. Gulmezoglu, A.M., Say, L., Betran, A.P., Villar, J. & Piaggio, G. WHO systematic review of maternal mortality and morbidity: methodological issues and challenges. *BMC Med Res Methodol* **4**, 16 (2004).
3. Brown, G.V. & Reeder, J.C. Malaria vaccines. *Med J Aust* **177**, 230-1 (2002).
4. Shulman, C.E. et al. Malaria in pregnancy: adverse effects on haemoglobin levels and birth-weight in primigravidae and multigravidae. *Trop Med Int Health* **6**, 770-8 (2001).
5. P. Wenk, A.R. Parasitologie, Biologie der Humanparasiten. *Thieme Verlag* (2003).
6. Mollaret, P. [Discovery, by Alphonse Laveran, of the malaria agent. Constantine, 6 November 1880]. *Nouv Presse Med* **9**, 3055-63 (1980).
7. Jong, E.C. Review of Ross malaria paper--a commentary. *Wilderness Environ Med* **10**, 27-8 (1999).
8. Ross, R. & Smyth, J. On some peculiar pigmented cells found in two mosquitos fed on malarial blood. 1897. *Wilderness Environ Med* **10**, 29-33 (1999).
9. Shortt, H.E. Life-cycle of the mammalian malaria parasite. *Br Med Bull* **8**, 7-9 (1951).
10. Warrell, D.A.a.G., H.M. Essential Malariology. *Arnold Publication, London.* (2002).
11. Sachs, J. & Malaney, P. The economic and social burden of malaria. *Nature* **415**, 680-5 (2002).
12. Gallup, J.L. & Sachs, J.D. The economic burden of malaria. *Am J Trop Med Hyg* **64**, 85-96 (2001).
13. Beier, J.C. Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu Rev Entomol* **43**, 519-43 (1998).
14. Pouniotis, D.S., Proudfoot, O., Minigo, G., Hanley, J.L. & Plebanski, M. Malaria parasite interactions with the human host. *J Postgrad Med* **50**, 30-4 (2004).
15. Mueller, A.K. et al. Plasmodium liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite-host interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3022-7 (2005).
16. Krotoski, W.A. et al. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted Plasmodium vivax infection. *Am J Trop Med Hyg* **31**, 1291-3 (1982).
17. Dvorak, J.A., Miller, L.H., Whitehouse, W.C. & Shiroishi, T. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science* **187**, 748-50 (1975).
18. Cowman, A.F. & Crabb, B.S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* **124**, 755-66 (2006).
19. Dimopoulos, G., Kafatos, F.C., Waters, A.P. & Sinden, R.E. Malaria parasites and the anopheles mosquito. *Chem Immunol* **80**, 27-49 (2002).
20. Hommel, M. [Morphology, biology and life-cycle of Plasmodium parasites]. *Bull Acad Natl Med* **191**, 1235-45; discussion 1245-6 (2007).
21. Matuschewski, K. Getting infectious: formation and maturation of Plasmodium sporozoites in the Anopheles vector. *Cell Microbiol* **8**, 1547-56 (2006).
22. Kwiatkowski, D. & Greenwood, B.M. Why is malaria fever periodic? A hypothesis. *Parasitol Today* **5**, 264-6 (1989).
23. Casals-Pascual, C. & Roberts, D.J. Severe malarial anaemia. *Curr Mol Med* **6**, 155-68 (2006).
24. Strickland, G.T., Fox, E. & Hadi, H. Malaria and splenomegaly in the Punjab. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **82**, 667-70 (1988).
25. Bottius, E. et al. Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **90**, 15-9 (1996).
26. May, J. et al. High rate of mixed and subpatent malarial infections in southwest Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* **61**, 339-43 (1999).
27. Barragan, A., Spillmann, D., Kremsner, P.G., Wahlgren, M. & Carlson, J. Plasmodium falciparum: molecular background to strain-specific rosette disruption by glycosaminoglycans and sulfated glycoconjugates. *Exp Parasitol* **91**, 133-43 (1999).
28. Treutiger, C.J. et al. Rouleaux-forming serum proteins are involved in the rosetting of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Exp Parasitol* **93**, 215-24 (1999).
29. Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K. & Doumbo, O.K. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **415**, 673-9 (2002).

30. Killeen, G.F., Fillinger, U., Kiche, I., Gouagna, L.C. & Knols, B.G. Eradication of *Anopheles gambiae* from Brazil: lessons for malaria control in Africa? *Lancet Infect Dis* **2**, 618-27 (2002).
31. Kedra, E. [Resistance in the hematophagous arthropods--problem on the rise. I. Resistance mechanisms to insecticides]. *Wiad Parazytol* **49**, 351-6 (2003).
32. Sachs, J.D. A new global effort to control malaria. *Science* **298**, 122-4 (2002).
33. Sadasivaiah, S., Tozan, Y. & Breman, J.G. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) for indoor residual spraying in Africa: how can it be used for malaria control? *Am J Trop Med Hyg* **77**, 249-63 (2007).
34. Schlitzer, M. Malaria chemotherapeutics part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. *ChemMedChem* **2**, 944-86 (2007).
35. Ringwald, P. [Current antimalarial drugs: resistance and new strategies]. *Bull Acad Natl Med* **191**, 1273-84; discussion 1284 (2007).
36. Kachur, S.P. et al. Re.: Complex, and large, trials of pragmatic malaria interventions. *Trop Med Int Health* **6**, 324-5 (2001).
37. Mert, A. et al. Malaria in Turkey: a review of 33 cases. *Eur J Epidemiol* **18**, 579-82 (2003).
38. Burchard, G. [Malaria]. *Internist (Berl)* **47**, 818, 820-4 (2006).
39. Massaga, J.J. et al. Biological and haematological safety profile of oral amodiaquine and chloroquine in healthy volunteers with or without *Plasmodium falciparum* infection in northeast Tanzania. *Tanzan J Health Res* **10**, 144-50 (2008).
40. Intermittent preventive antimalarial treatment in infancy. *Lancet* **372**, 1383-4 (2008).
41. Laufer, M.K., Djimde, A.A. & Plowe, C.V. Monitoring and deterring drug-resistant malaria in the era of combination therapy. *Am J Trop Med Hyg* **77**, 160-9 (2007).
42. Gengenbacher, M. et al. Vitamin B6 biosynthesis by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: biochemical and structural insights. *J Biol Chem* **281**, 3633-41 (2006).
43. McRobert, L., Jiang, S., Stead, A. & McConkey, G.A. *Plasmodium falciparum*: interaction of shikimate analogues with antimalarial drugs. *Exp Parasitol* **111**, 178-81 (2005).
44. Fitzpatrick, T.B. et al. Two independent routes of de novo vitamin B6 biosynthesis: not that different after all. *Biochem J* **407**, 1-13 (2007).
45. Kugelstadt, D., Winter, D., Pluckhahn, K., Lehmann, W.D. & Kappes, B. Raf kinase inhibitor protein affects activity of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 1. *Mol Biochem Parasitol* **151**, 111-7 (2007).
46. Green, J.L. et al. The motor complex of *Plasmodium falciparum*: phosphorylation by a calcium-dependent protein kinase. *J Biol Chem* (2008).
47. Matuschewski, K. & Mueller, A.K. Vaccines against malaria - an update. *Febs J* **274**, 4680-7 (2007).
48. Sam-Yellowe, T.Y. Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol Today* **12**, 308-16 (1996).
49. Winograd, E., Clavijo, C.A., Bustamante, L.Y. & Jaramillo, M. Release of merozoites from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes could be mediated by a non-explosive event. *Parasitol Res* **85**, 621-4 (1999).
50. Glushakova, S., Yin, D., Li, T. & Zimmerberg, J. Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. *Curr Biol* **15**, 1645-50 (2005).
51. Yeoh, S. et al. Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes. *Cell* **131**, 1072-83 (2007).
52. Aly, A.S. & Matuschewski, K. A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium* sporozoite egress from oocysts. *J Exp Med* **202**, 225-30 (2005).
53. Sanders, P.R. et al. Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in Raft-like membranes of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **280**, 40169-76 (2005).
54. Drew, D.R., O'Donnell, R.A., Smith, B.J. & Crabb, B.S. A common cross-species function for the double epidermal growth factor-like modules of the highly divergent plasmodium surface proteins MSP-1 and MSP-8. *J Biol Chem* **279**, 20147-53 (2004).
55. Bannister, L.H. & Dluzewski, A.R. The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells* **16**, 257-92; discussion 293-7 (1990).
56. Keeley, A. & Soldati, D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol* **14**, 528-32 (2004).
57. Dowse, T.J., Pascall, J.C., Brown, K.D. & Soldati, D. Apicomplexan rhomboids have a potential role in microneme protein cleavage during host cell invasion. *Int J Parasitol* **35**, 747-56 (2005).
58. Baum, J., Gilberger, T.W., Frischknecht, F. & Meissner, M. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Trends Parasitol* (2008).

59. Lingelbach, K. & Joiner, K.A. The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* **111** (Pt 11), 1467-75 (1998).
60. Johnson, T.M., Rajfur, Z., Jacobson, K. & Beckers, C.J. Immobilization of the type XIV myosin complex in Toxoplasma gondii. *Mol Biol Cell* **18**, 3039-46 (2007).
61. Baum, J. et al. A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. *J Biol Chem* **281**, 5197-208 (2006).
62. Bergman, L.W. et al. Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of Plasmodium sporozoites. *J Cell Sci* **116**, 39-49 (2003).
63. Plattner, F. et al. Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe* **3**, 77-87 (2008).
64. Herm-Gotz, A. et al. Toxoplasma gondii myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor. *Embo J* **21**, 2149-58 (2002).
65. Moreira, C.K. et al. The Plasmodium TRAP/MIC2 family member, TRAP-Like Protein (TLP), is involved in tissue traversal by sporozoites. *Cell Microbiol* **10**, 1505-16 (2008).
66. Lacroix, C. & Menard, R. TRAP-like protein of Plasmodium sporozoites: linking gliding motility to host-cell traversal. *Trends Parasitol* **24**, 431-4 (2008).
67. Harris, P.K. et al. Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. *PLoS Pathog* **1**, 241-51 (2005).
68. Baker, R.P., Wijetilaka, R. & Urban, S. Two Plasmodium rhomboid proteases preferentially cleave different adhesins implicated in all invasive stages of malaria. *PLoS Pathog* **2**, e113 (2006).
69. O'Donnell, R.A. et al. Intramembrane proteolysis mediates shedding of a key adhesin during erythrocyte invasion by the malaria parasite. *J Cell Biol* **174**, 1023-33 (2006).
70. Dluzewski, A.R., Zicha, D., Dunn, G.A. & Gratzer, W.B. Origins of the parasitophorous vacuole membrane of the malaria parasite: surface area of the parasitized red cell. *Eur J Cell Biol* **68**, 446-9 (1995).
71. Tilley, L. & Hanssen, E. A 3D view of the host cell compartment in P. falciparum-infected erythrocytes. *Transfus Clin Biol* **15**, 72-81 (2008).
72. Frischknecht, F. & Lanzer, M. The Plasmodium falciparum Maurer's clefts in 3D. *Mol Microbiol* **67**, 687-91 (2008).
73. Lanzer, M., Wickert, H., Krohne, G., Vincensini, L. & Braun Breton, C. Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Int J Parasitol* **36**, 23-36 (2006).
74. Murphy, S.C. et al. Lipid rafts and malaria parasite infection of erythrocytes. *Mol Membr Biol* **23**, 81-8 (2006).
75. Clapham, D.E. Calcium signaling. *Cell* **80**, 259-68 (1995).
76. Garcia, C.R. Calcium homeostasis and signaling in the blood-stage malaria parasite. *Parasitol Today* **15**, 488-91 (1999).
77. Rohrbach, P. et al. Quantitative calcium measurements in subcellular compartments of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Biol Chem* **280**, 27960-9 (2005).
78. Gazarini, M.L., Thomas, A.P., Pozzan, T. & Garcia, C.R. Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. *J Cell Biol* **161**, 103-10 (2003).
79. Harmon, A.C., Gribskov, M. & Harper, J.F. CDPKs - a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci* **5**, 154-9 (2000).
80. Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C. & Sheen, J. Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol* **129**, 469-85 (2002).
81. Harper, J.F., Huang, J.F. & Lloyd, S.J. Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* **33**, 7267-77 (1994).
82. Ludwig, A.A., Romeis, T. & Jones, J.D. CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *J Exp Bot* **55**, 181-8 (2004).
83. Busconi, L., Boutin, P.M. & Denker, B.M. N-terminal binding domain of Galphao in membrane attachment. *Biochem J* **323** (Pt 1), 239-44 (1997).
84. Rutschmann, F., Stalder, U., Piotrowski, M., Oecking, C. & Schaller, A. LeCPK1, a calcium-dependent protein kinase from tomato. Plasma membrane targeting and biochemical characterization. *Plant Physiol* **129**, 156-68 (2002).
85. Harper, J.F. & Harmon, A. Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 555-66 (2005).

86. Binder, B.M., Harper, J.F. & Sussman, M.R. Characterization of an Arabidopsis calmodulin-like domain protein kinase purified from Escherichia coli using an affinity sandwich technique. *Biochemistry* **33**, 2033-41 (1994).
87. Klimecka, M. & Muszynska, G. Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochim Pol* **54**, 219-33 (2007).
88. Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R. & Jones, J.D. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *Embo J* **20**, 5556-67 (2001).
89. Doerig, C.D. Stopping malaria parasites dead in their tracks. *Nat Chem Biol* **4**, 334-5 (2008).
90. Ishino, T., Orito, Y., Chinzei, Y. & Yuda, M. A calcium-dependent protein kinase regulates Plasmodium ookinete access to the midgut epithelial cell. *Mol Microbiol* **59**, 1175-84 (2006).
91. Billker, O. et al. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* **117**, 503-14 (2004).
92. Prudencio, M. & Mota, M.M. To migrate or to invade: those are the options. *Cell Host Microbe* **2**, 286-8 (2007).
93. Coppi, A. et al. Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to Plasmodium sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell Host Microbe* **2**, 316-27 (2007).
94. Zhao, Y., Kappes, B. & Franklin, R.M. Gene structure and expression of an unusual protein kinase from Plasmodium falciparum homologous at its carboxyl terminus with the EF hand calcium-binding proteins. *J Biol Chem* **268**, 4347-54 (1993).
95. Bozdech, Z. et al. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of Plasmodium falciparum. *PLoS Biol* **1**, E5 (2003).
96. Zhao, Y., Franklin, R.M. & Kappes, B. Plasmodium falciparum calcium-dependent protein kinase phosphorylates proteins of the host erythrocytic membrane. *Mol Biochem Parasitol* **66**, 329-43 (1994).
97. Moskes, C. et al. Export of Plasmodium falciparum calcium-dependent protein kinase 1 to the parasitophorous vacuole is dependent on three N-terminal membrane anchor motifs. *Mol Microbiol* **54**, 676-91 (2004).
98. Peitzsch, R.M. & McLaughlin, S. Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* **32**, 10436-43 (1993).
99. DeRocher, A., Gilbert, B., Feagin, J.E. & Parsons, M. Dissection of brefeldin A-sensitive and -insensitive steps in apicoplast protein targeting. *J Cell Sci* **118**, 565-74 (2005).
100. Sato, S. & Wilson, R.J. The use of DsRED in single- and dual-color fluorescence labeling of mitochondrial and plastid organelles in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **134**, 175-9 (2004).
101. Tonkin, C.J., Struck, N.S., Mullin, K.A., Stimmler, L.M. & McFadden, G.I. Evidence for Golgi-independent transport from the early secretory pathway to the plastid in malaria parasites. *Mol Microbiol* **61**, 614-30 (2006).
102. van Dooren, G.G. et al. Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol* **57**, 405-19 (2005).
103. Boddey, J.A., Moritz, R.L., Simpson, R.J. & Cowman, A.F. Role of the Plasmodium Export Element in trafficking parasite proteins to the infected erythrocyte. *Traffic* (2008).
104. Lingelbach, K. & Przyborski, J.M. The long and winding road: protein trafficking mechanisms in the Plasmodium falciparum infected erythrocyte. *Mol Biochem Parasitol* **147**, 1-8 (2006).
105. Zhao, Y. et al. Calcium-binding properties of a calcium-dependent protein kinase from Plasmodium falciparum and the significance of individual calcium-binding sites for kinase activation. *Biochemistry* **33**, 3714-21 (1994).
106. Kramer, R. & Ginsburg, H. Calcium transport and compartment analysis of free and exchangeable calcium in Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *J Protozool* **38**, 594-601 (1991).
107. Tanabe, K., Mikkelsen, R.B. & Wallach, D.F. Calcium transport of Plasmodium chabaudi-infected erythrocytes. *J Cell Biol* **93**, 680-4 (1982).
108. Sunahara, R.K. & Taussig, R. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* **2**, 168-84 (2002).
109. Houslay, M.D. & Adams, D.R. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J* **370**, 1-18 (2003).
110. Wong, W. & Scott, J.D. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 959-70 (2004).
111. Ward, P., Equinet, L., Packer, J. & Doerig, C. Protein kinases of the human malaria parasite Plasmodium falciparum: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* **5**, 79 (2004).

112. Baker, D.A. Adenylyl and guanylyl cyclases from the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *IUBMB Life* **56**, 535-40 (2004).
113. Yuasa, K. et al. PfPDE1, a novel cGMP-specific phosphodiesterase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* **392**, 221-9 (2005).
114. Dyer, M. & Day, K. Expression of *Plasmodium falciparum* trimeric G proteins and their involvement in switching to sexual development. *Mol Biochem Parasitol* **110**, 437-48 (2000).
115. Read, L.K. & Mikkelsen, R.B. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes contain an adenylate cyclase with properties which differ from those of the host enzyme. *Mol Biochem Parasitol* **45**, 109-19 (1991).
116. Read, L.K. & Mikkelsen, R.B. Comparison of adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase in gametocytogenic and nongametocytogenic clones of *Plasmodium falciparum*. *J Parasitol* **77**, 346-52 (1991).
117. Beraldo, F.H., Almeida, F.M., da Silva, A.M. & Garcia, C.R. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J Cell Biol* **170**, 551-7 (2005).
118. Hotta, C.T. et al. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol* **2**, 466-8 (2000).
119. Merckx, A. et al. *Plasmodium falciparum* regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance. *PLoS Pathog* **4**, e19 (2008).
120. Nusslein-Volhard, C. & Wieschaus, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801 (1980).
121. Wieschaus, E. & Riggleman, R. Autonomous requirements for the segment polarity gene *armadillo* during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* **49**, 177-84 (1987).
122. Peifer, M., Berg, S. & Reynolds, A.B. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* **76**, 789-91 (1994).
123. Huber, A.H., Nelson, W.J. & Weis, W.I. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* **90**, 871-82 (1997).
124. Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. & Kuriyan, J. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* **94**, 193-204 (1998).
125. Conti, E. & Kuriyan, J. Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure* **8**, 329-38 (2000).
126. Harris, T.J. & Peifer, M. Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription. *Trends Cell Biol* **15**, 234-7 (2005).
127. Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J. & Ben-Ze'ev, A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* **109**, 987-91 (2002).
128. Brembeck, F.H., Rosario, M. & Birchmeier, W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 51-9 (2006).
129. Pan, X. & Goldfarb, D.S. YEB3/VAC8 encodes a myristylated armadillo protein of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane that functions in vacuole fusion and inheritance. *J Cell Sci* **111 (Pt 15)**, 2137-47 (1998).
130. Wang, Y.X., Catlett, N.L. & Weisman, L.S. Vac8p, a vacuolar protein with armadillo repeats, functions in both vacuole inheritance and protein targeting from the cytoplasm to vacuole. *J Cell Biol* **140**, 1063-74 (1998).
131. Gorlich, D. Nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 412-9 (1997).
132. Conti, E. & Izaurralde, E. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 310-9 (2001).
133. Malik, H.S., Eickbush, T.H. & Goldfarb, D.S. Evolutionary specialization of the nuclear targeting apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13738-42 (1997).
134. Froissard, M., Keller, A.M. & Cohen, J. ND9P, a novel protein with armadillo-like repeats involved in exocytosis: physiological studies using allelic mutants in *paramecium*. *Genetics* **157**, 611-20 (2001).
135. Kim, K., Messinger, L.A. & Nelson, D.L. Ca²⁺-dependent protein kinases of *Paramecium*--cloning provides evidence of a multigene family. *Eur J Biochem* **251**, 605-12 (1998).
136. Rahlfs, S. et al. Myristoylated adenylate kinase-2 of *Plasmodium falciparum* forms a heterodimer with myristoyltransferase. *Mol Biochem Parasitol* (2008).
137. Ulschmid, J.K., Rahlfs, S., Schirmer, R.H. & Becker, K. Adenylate kinase and GTP:AMP phosphotransferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Central players in cellular energy metabolism. *Mol Biochem Parasitol* **136**, 211-20 (2004).
138. Kanaani, J. & Ginsburg, H. Metabolic interconnection between the human malarial parasite *Plasmodium falciparum* and its host erythrocyte. Regulation of ATP levels by means of an adenylate translocator and adenylate kinase. *J Biol Chem* **264**, 3194-9 (1989).

139. Dzeja, P.P., Zeleznikar, R.J. & Goldberg, N.D. Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Mol Cell Biochem* **184**, 169-82 (1998).
140. Lipmann, F. The ATP-phosphate cycle. *Curr Top Cell Regul* **18**, 301-11 (1981).
141. Carling, T. et al. A histone methyltransferase is required for maximal response to female sex hormones. *Mol Cell Biol* **24**, 7032-42 (2004).
142. Hardie, D.G. & Hawley, S.A. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* **23**, 1112-9 (2001).
143. Roth, E., Jr. Plasmodium falciparum carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite. *Blood Cells* **16**, 453-60; discussion 461-6 (1990).
144. Pinder, J.C. et al. Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, Plasmodium falciparum: implications for red cell invasion. *J Cell Sci* **111 (Pt 13)**, 1831-9 (1998).
145. Jones, M.L., Kitson, E.L. & Rayner, J.C. Plasmodium falciparum erythrocyte invasion: a conserved myosin associated complex. *Mol Biochem Parasitol* **147**, 74-84 (2006).
146. Rees-Channer, R.R. et al. Dual acylation of the 45 kDa gliding-associated protein (GAP45) in Plasmodium falciparum merozoites. *Mol Biochem Parasitol* **149**, 113-6 (2006).
147. Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208 (2001).
148. Touchot, N., Chardin, P. & Tavitian, A. Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8210-4 (1987).
149. Bock, J.B., Matern, H.T., Peden, A.A. & Scheller, R.H. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* **409**, 839-41 (2001).
150. Stenmark, H. & Olkkonen, V.M. The Rab GTPase family. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3007 (2001).
151. Mruk, D.D., Lau, A.S. & Conway, A.M. Crosstalk between Rab GTPases and cell junctions. *Contraception* **72**, 280-90 (2005).
152. Hall, A. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 31-54 (1994).
153. Takai, Y., Sasaki, T., Shirataki, H. & Nakanishi, H. Rab3A small GTP-binding protein in Ca(2+)-dependent exocytosis. *Genes Cells* **1**, 615-32 (1996).
154. Olkkonen, V.M. & Stenmark, H. Role of Rab GTPases in membrane traffic. *Int Rev Cytol* **176**, 1-85 (1997).
155. Schimmoller, F., Simon, I. & Pfeffer, S.R. Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J Biol Chem* **273**, 22161-4 (1998).
156. Deneka, M., Neeft, M. & van der Sluijs, P. Regulation of membrane transport by rab GTPases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **38**, 121-42 (2003).
157. Dunn, W.A. & Hubbard, A.L. Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by hepatocytes in the perfused rat liver: ligand and receptor dynamics. *J Cell Biol* **98**, 2148-59 (1984).
158. Le, T.L., Yap, A.S. & Stow, J.L. Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol* **146**, 219-32 (1999).
159. Roberts, M., Barry, S., Woods, A., van der Sluijs, P. & Norman, J. PDGF-regulated rab4-dependent recycling of alphavbeta3 integrin from early endosomes is necessary for cell adhesion and spreading. *Curr Biol* **11**, 1392-402 (2001).
160. Aledo, J.C., Darakhshan, F. & Hundal, H.S. Rab4, but not the transferrin receptor, is colocalized with GLUT4 in an insulin-sensitive intracellular compartment in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **215**, 321-8 (1995).
161. Sherman, L.A., Hirshman, M.F., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y. & Goodyear, L.J. Differential effects of insulin and exercise on Rab4 distribution in rat skeletal muscle. *Endocrinology* **137**, 266-73 (1996).
162. Li, L. & Chin, L.S. The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cell Mol Life Sci* **60**, 942-60 (2003).
163. Darchen, F. & Goud, B. Multiple aspects of Rab protein action in the secretory pathway: focus on Rab3 and Rab6. *Biochimie* **82**, 375-84 (2000).
164. Wilson, D.B. & Wilson, M.P. Identification and subcellular localization of human rab5b, a new member of the ras-related superfamily of GTPases. *J Clin Invest* **89**, 996-1005 (1992).
165. ANDRIUS BASKYS, I.B., ERCHENG ZHU, LIWEI FANG AND RONG WANG. Rab-Mediated Endocytosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1122**, 313-329 (2007).
166. Somsel Rodman, J. & Wandinger-Ness, A. Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci* **113 Pt 2**, 183-92 (2000).

167. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 107-17 (2001).
168. Doerig, J.M.W.a.C. The protein-phosphatome of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics* **15**(2008).
169. Mumby, M.C. & Walter, G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev* **73**, 673-99 (1993).
170. Wera, S. & Hemmings, B.A. Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* **311 (Pt 1)**, 17-29 (1995).
171. Owens, D.M. & Keyse, S.M. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* **26**, 3203-13 (2007).
172. Trinkle-Mulcahy, L. & Lamond, A.I. Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 623-31 (2006).
173. Raugei, G., Ramponi, G. & Chiarugi, P. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. *Cell Mol Life Sci* **59**, 941-9 (2002).
174. Kobor, M.S. & Greenblatt, J. Regulation of transcription elongation by phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1577**, 261-275 (2002).
175. Carniol, K., Ben-Yehuda, S., King, N. & Losick, R. Genetic dissection of the sporulation protein SpolIE and its role in asymmetric division in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **187**, 3511-20 (2005).
176. Ingebritsen, T.S. & Cohen, P. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* **221**, 331-8 (1983).
177. Cohen, P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* **58**, 453-508 (1989).
178. Takezawa, D. Characterization of a novel plant PP2C-like protein Ser/Thr phosphatase as a calmodulin-binding protein. *J Biol Chem* **278**, 38076-83 (2003).
179. Schweighofer, A., Hirt, H. & Meskiene, I. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci* **9**, 236-43 (2004).
180. Gallego, M. & Virshup, D.M. Protein serine/threonine phosphatases: life, death, and sleeping. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 197-202 (2005).
181. Frayne, J., Ingram, C., Love, S. & Hall, L. Localisation of phosphatidylethanolamine-binding protein in the brain and other tissues of the rat. *Cell Tissue Res* **298**, 415-23 (1999).
182. Serre, L., Vallee, B., Bureaud, N., Schoentgen, F. & Zelwer, C. Crystal structure of the phosphatidylethanolamine-binding protein from bovine brain: a novel structural class of phospholipid-binding proteins. *Structure* **6**, 1255-65 (1998).
183. Bruun, A.W., Svendsen, I., Sorensen, S.O., Kielland-Brandt, M.C. & Winther, J.R. A high-affinity inhibitor of yeast carboxypeptidase Y is encoded by TFS1 and shows homology to a family of lipid binding proteins. *Biochemistry* **37**, 3351-7 (1998).
184. Chautard, H., Jacquet, M., Schoentgen, F., Bureaud, N. & Benedetti, H. Tfs1p, a member of the PEBP family, inhibits the Ira2p but not the Ira1p Ras GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **3**, 459-70 (2004).
185. Pnueli, L. et al. Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell* **13**, 2687-702 (2001).
186. Hengst, U., Albrecht, H., Hess, D. & Monard, D. The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *J Biol Chem* **276**, 535-40 (2001).
187. Yeung, K. et al. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* **401**, 173-7 (1999).
188. Keller, E.T., Fu, Z. & Brennan, M. The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease. *Biochem Pharmacol* **68**, 1049-53 (2004).
189. Granovsky, A.E. & Rosner, M.R. Raf kinase inhibitory protein: a signal transduction modulator and metastasis suppressor. *Cell Res* **18**, 452-7 (2008).
190. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80 (1983).
191. Saiki, R.K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4 (1985).
192. Gilberger, T.W., Walter, R.D. & Muller, S. Identification and characterization of the functional amino acids at the active site of the large thioredoxin reductase from *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **272**, 29584-9 (1997).
193. Braman, J., Papworth, C. & Greener, A. Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol Biol* **57**, 31-44 (1996).
194. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).

195. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).
196. Burnette, W.N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203 (1981).
197. Trager, W. & Jensen, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**, 673-5 (1976).
198. Lambros, C. & Vanderberg, J.P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* **65**, 418-20 (1979).
199. Le Roch, K.G. et al. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* **301**, 1503-8 (2003).
200. Corbit, K.C. et al. Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem* **278**, 13061-8 (2003).
201. Kato, N. et al. Gene expression signatures and small-molecule compounds link a protein kinase to *Plasmodium falciparum* motility. *Nat Chem Biol* **4**, 347-56 (2008).
202. Kase, H. et al. K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* **142**, 436-40 (1987).
203. Hashimoto, Y. et al. Potent and preferential inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by K252a and its derivative, KT5926. *Biochem Biophys Res Commun* **181**, 423-9 (1991).
204. Elliott, L.H. et al. K252a is a potent and selective inhibitor of phosphorylase kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **171**, 148-54 (1990).
205. Berg, M.M., Sternberg, D.W., Parada, L.F. & Chao, M.V. K-252a inhibits nerve growth factor-induced trk proto-oncogene tyrosine phosphorylation and kinase activity. *J Biol Chem* **267**, 13-6 (1992).
206. Shah, O.J., Kimball, S.R. & Jefferson, L.S. The Src-family tyrosine kinase inhibitor PP1 interferes with the activation of ribosomal protein S6 kinases. *Biochem J* **366**, 57-62 (2002).
207. Gaskins, E. et al. Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol* **165**, 383-93 (2004).
208. Vaid, A., Thomas, D.C. & Sharma, P. Role of Ca²⁺/calmodulin-PfPKB signaling pathway in erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **283**, 5589-97 (2008).
209. Vaid, A. & Sharma, P. PfPKB, a protein kinase B-like enzyme from *Plasmodium falciparum*: II. Identification of calcium/calmodulin as its upstream activator and dissection of a novel signaling pathway. *J Biol Chem* **281**, 27126-33 (2006).
210. Wickham, M.E. et al. Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Embo J* **20**, 5636-49 (2001).
211. Burghaus, P.A. & Lingelbach, K. Luciferase, when fused to an N-terminal signal peptide, is secreted from transfected *Plasmodium falciparum* and transported to the cytosol of infected erythrocytes. *J Biol Chem* **276**, 26838-45 (2001).
212. Tonkin, C.J., Pearce, J.A., McFadden, G.I. & Cowman, A.F. Protein targeting to destinations of the secretory pathway in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Curr Opin Microbiol* **9**, 381-7 (2006).
213. Saridaki, T., Sanchez, C.P., Pfahler, J. & Lanzer, M. A conditional export system provides new insights into protein export in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell Microbiol* (2008).
214. Crabb, B.S. et al. Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell* **89**, 287-96 (1997).
215. Sargeant, T.J. et al. Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. *Genome Biol* **7**, R12 (2006).
216. Marti, M., Good, R.T., Rug, M., Knuepfer, E. & Cowman, A.F. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* **306**, 1930-3 (2004).
217. Hiller, N.L. et al. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* **306**, 1934-7 (2004).
218. Maier, A.G. et al. Skeleton-binding protein 1 functions at the parasitophorous vacuole membrane to traffic PfEMP1 to the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte surface. *Blood* **109**, 1289-97 (2007).
219. Maier, A.G. et al. Exported proteins required for virulence and rigidity of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Cell* **134**, 48-61 (2008).
220. Glenister, F.K., Coppel, R.L., Cowman, A.F., Mohandas, N. & Cooke, B.M. Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. *Blood* **99**, 1060-3 (2002).

221. Resh, M.D. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* **1451**, 1-16 (1999).
222. Pike, L.J. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* **44**, 655-67 (2003).
223. van't Hof, W. & Resh, M.D. Targeting proteins to plasma membrane and membrane microdomains by N-terminal myristoylation and palmitoylation. *Methods Enzymol* **327**, 317-30 (2000).
224. Lauer, S. et al. Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *Embo J* **19**, 3556-64 (2000).
225. Bray, P.G. et al. Defining the role of PfCRT in Plasmodium falciparum chloroquine resistance. *Mol Microbiol* **56**, 323-33 (2005).
226. McLaughlin, S. & Aderem, A. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci* **20**, 272-6 (1995).
227. Thelen, M., Rosen, A., Nairn, A.C. & Aderem, A. Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* **351**, 320-2 (1991).
228. Ben-Efraim, I., Zhou, Q., Wiedmer, T., Gerace, L. & Sims, P.J. Phospholipid scramblase 1 is imported into the nucleus by a receptor-mediated pathway and interacts with DNA. *Biochemistry* **43**, 3518-26 (2004).
229. Hathaway, G.M., Lubben, T.H. & Traugh, J.A. Inhibition of casein kinase II by heparin. *J Biol Chem* **255**, 8038-41 (1980).
230. Yeung, K. et al. Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol* **20**, 3079-85 (2000).
231. Odabaei, G. et al. Raf-1 kinase inhibitor protein: structure, function, regulation of cell signaling, and pivotal role in apoptosis. *Adv Cancer Res* **91**, 169-200 (2004).
232. Bernier, I., Tresca, J.P. & Jolles, P. Ligand-binding studies with a 23 kDa protein purified from bovine brain cytosol. *Biochim Biophys Acta* **871**, 19-23 (1986).
233. Bucquoy, S., Jolles, P. & Schoentgen, F. Relationships between molecular interactions (nucleotides, lipids and proteins) and structural features of the bovine brain 21-kDa protein. *Eur J Biochem* **225**, 1203-10 (1994).
234. Dorin, D. et al. PfPK7, an atypical MEK-related protein kinase, reflects the absence of classical three-component MAPK pathways in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol* **55**, 184-96 (2005).
235. Dorin-Semlat, D. et al. Functional characterization of both MAP kinases of the human malaria parasite Plasmodium falciparum by reverse genetics. *Mol Microbiol* **65**, 1170-80 (2007).
236. Ono, T. et al. Adenylyl cyclase alpha and cAMP signaling mediate Plasmodium sporozoite apical regulated exocytosis and hepatocyte infection. *PLoS Pathog* **4**, e1000008 (2008).
237. Nanda, N. Ultrastructural study on the erythrocytic schizogony of Plasmodium vivax. *Indian J Malariol* **27**, 15-23 (1990).
238. Young, K.H. Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time. *Biol Reprod* **58**, 302-11 (1998).
239. Gietz, R.D., Triggs-Raine, B., Robbins, A., Graham, K.C. & Woods, R.A. Identification of proteins that interact with a protein of interest: applications of the yeast two-hybrid system. *Mol Cell Biochem* **172**, 67-79 (1997).
240. Shah, K., Liu, Y., Deirmengian, C. & Shokat, K.M. Engineering unnatural nucleotide specificity for Rous sarcoma virus tyrosine kinase to uniquely label its direct substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3565-70 (1997).
241. Liu, Y., Shah, K., Yang, F., Witucki, L. & Shokat, K.M. Engineering Src family protein kinases with unnatural nucleotide specificity. *Chem Biol* **5**, 91-101 (1998).
242. Liu, Y., Shah, K., Yang, F., Witucki, L. & Shokat, K.M. A molecular gate which controls unnatural ATP analogue recognition by the tyrosine kinase v-Src. *Bioorg Med Chem* **6**, 1219-26 (1998).
243. Habelhah, H. et al. Identification of new JNK substrate using ATP pocket mutant JNK and a corresponding ATP analogue. *J Biol Chem* **276**, 18090-5 (2001).
244. Rhee, J., Buchan, T., Zukerberg, L., Lilien, J. & Balsamo, J. Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nat Cell Biol* **9**, 883-92 (2007).
245. Menzel, N. et al. The Drosophila p21-activated kinase Mbt modulates DE-cadherin-mediated cell adhesion by phosphorylation of Armadillo. *Biochem J* **416**, 231-41 (2008).
246. Omori, K. & Kotera, J. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* **100**, 309-27 (2007).
247. Corbin, J.D., Turko, I.V., Beasley, A. & Francis, S.H. Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur J Biochem* **267**, 2760-7 (2000).

248. Zoraghi, R., Bessay, E.P., Corbin, J.D. & Francis, S.H. Structural and functional features in human PDE5A1 regulatory domain that provide for allosteric cGMP binding, dimerization, and regulation. *J Biol Chem* **280**, 12051-63 (2005).
249. Francis, S.H. et al. Phosphorylation of isolated human phosphodiesterase-5 regulatory domain induces an apparent conformational change and increases cGMP binding affinity. *J Biol Chem* **277**, 47581-7 (2002).
250. Hegeman, A.D. et al. A phyloproteomic characterization of in vitro autophosphorylation in calcium-dependent protein kinases. *Proteomics* **6**, 3649-64 (2006).
251. Ubersax, J.A. & Ferrell, J.E., Jr. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 530-41 (2007).
252. Leconte, I. & Clauser, E. Two sequences flanking the major autophosphorylation site of the insulin receptor are essential for tyrosine kinase activation. *Biochem J* **306** (Pt 2), 465-72 (1995).
253. Carrera, A.C., Borlado, L.R., Roberts, T.M. & Martinez, C. Tyrosine kinase specific motif at subdomain VIII does not confer specificity for tyrosine. *Biochem Biophys Res Commun* **205**, 1114-20 (1994).
254. Litchfield, D.W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* **369**, 1-15 (2003).
255. Sugiyama, Y., Ishida, A., Sueyoshi, N. & Kameshita, I. Tyrosine kinase activity of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II catalytic fragment. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 648-52 (2008).
256. Huang, J.Z., Hardin, S.C. & Huber, S.C. Identification of a novel phosphorylation motif for CDPKs: phosphorylation of synthetic peptides lacking basic residues at P-3/P-4. *Arch Biochem Biophys* **393**, 61-6 (2001).
257. Loog, M. et al. Peptide phosphorylation by calcium-dependent protein kinase from maize seedlings. *Eur J Biochem* **267**, 337-43 (2000).
258. Lemerrier, G. & al, e. Identification and characterization of novel small molecules as potent inhibitors of the Plasmodial Calcium-Dependent Protein Kinase 1. *in revision* (2009).
259. Hanke, J.H. et al. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* **271**, 695-701 (1996).

7 Anhang

7.1 Sequenzen

7.1.1 PfCDPK1 (cDNA)

```

1   ATGGGGTGTT CACAAAGTTC AAACGTGAAA GATTTTAAAA CGAGGAGAAG
51  TAAATTTACG AATGGAAATA ATTATGGGAA AAGTGGTAAT AATAAAAAAT
101 CGGAGGACCT AGCGATAAAC CCAGGTATGT ATGTTAGAAA AAAAGAAGGG
151 AAGATAGGGG AGTCCTATTT CAAAGTTCGC AAATTAGGTA GCGGTGCGTA
201 CGGAGAAGTA TTATTGTGTA GAGAAAAACA TGGACATGGT GAGAAAGGCTA
251 TTAAGGTTAT AAAGAAGTCC CAATTTGATA AGATGAAATA TTCGATAACA
301 AATAAGATCG AATGTGATGA TAAAATACAT GAAGAAATAT ATAATGAGAT
351 ATCATTATTA AAATCATTAG ATCATCCTAA TATAATAAAA TTGTTTGATG
401 TTTTTGAAGA TAAGAAATAT TTTTATTTAG TAACCGAATT TTATGAAGGT
451 GGGGAATTAT TTGAACAAAT TATTAATCGT CATAAATTTG ATGAATGTGA
501 TGCTGCTAAT ATAATGAAAC AAATATTAAG TGGCATATGT TATTTACATA
551 AACATAATAT TGTACATCGA GATATTA AACAGAAAATAT TTTATTAGAA
601 AATAAACATA GTTTATTAAA TATAAAAAAT GTCGATTTTG GTTTATCTTC
651 CTTTTTCTCA AAAGATAATA AGTTAAGAGA TAGATTAGGT ACAGCATATT
701 ATATTGCACC TGAAGTTTTG AGGAAAAAAT ATAATGAAAA ATGTGATGTC
751 TGGTCATGTG GAGTTATTCT ATATATCTTA TTATGTGGTT ATCCTCCTTT
801 CGGGGGTCAG AATGATCAAG ATATTATAAA AAAGGTGGAG AAAGGAAAAAT
851 ATTACTTTGA TTTTAATGAC TGGAAAAATA TAAGTGAAGA GGCAAAAGAA
901 TTAATCAAAC TTATGTTGAC ATATGATTAT AATAAAAGAA TAACAGCAAA
951 GGAAGCTCTA AATAGTAAAT GGATAAAAAA ATATGCAAAC AATATTAATA
1001 AAAGTGATCA AAAAACTTTA TGTGGCGCTT TATCAAATAT GAGGAAATTT
1051 GAGGGCAGTC AGAAATTAGC TCAAGCAGCC ATATTATTTA TTGGAAAGTAA
1101 ATTAACAACA TTAGAGGAAC GTAAAGAGCT TACTGACATT TTTAAAAAGT
1151 TGGATAAAAA TGGCGATGGC CAGCTTGATA AGAAGGAATT GATTGAGGGA
1201 TACAACATAC TTAGGAGCTT TAAGAATGAG TTAGGAGAAC TTAATAATGT
1251 CGAGGAAGAA GTAGACAATA TATTGAAGGA GGTTGATTTT GATAAAAAATG
1301 GATACATAGA ATATTCAGAG TTTATTTCTG TATGTATGGA TAAGCAAATC
1351 CTTTTCAGTG AGGAGAGATT AAGAGATGCA TTCAATTTGT TTGATACTGA
1401 TAAAAGTGGA AAAATAACGA AGGAAGAATT AGCAAATTTA TTTGGTTTGA
1451 CATCCATAAG TGAACAAATG TGAATGAAG TTCTCGGAGA AGCAGATAAAA
1501 AATAAGATA ACATGATTGA CTTTGATGAA TTCGTTAACA TGATGCACAA
1551 AATTTGTGAT AATAAATCTT CATAA

```

7.1.2 PfPP2C_like (gDNA)

```

1   ATGGGTAATT GTGCTTCCGT CATAAATCAT TCCAAGTTTA AGATTAAAAA
51  AAAAGAAAAA AAAAACAGCA TTGATGATAC ACATTCTCAG AAGAATAAAT
101 ATAGAGATGC CATAAATAAA TATGCACAAG AAAATAATTC AAGAGGAGAA
151 TGTGAAAATT ATTGTGATGA ATATTATTCA AGACGAAGCA ATAACACGAA
201 TATTAAATTA AATAGAGGAA TGAAATATTC TCATAATAAT AATGGATTAA
251 AAAAGAACGA CCATTTCAAT TGTAATAATA GTAACATTTT ATCAGATGAA
301 AATGAAAATA ATATGAATGA TGGTATTTCC ATAAATAATA TAAAGCAAAA
351 TAATTTAGAT AATGTAAATA ATGTTGATTA TGATAACTTA AATATAAAAAG

```

```

401  AAAAAAAGA AGAAAGTGCA TTTGATAAAT GGAAGAAAA AAAAAAAAAA
451  AAAAAATTCTG ACCAGTTCAG TGAGCTAGCT AAAAAATAATA ATAGTGATCA
501  TGTAATTAT AAAAAAGAAA AAAGGGAATA TGACAACAAC AATAATAATA
551  ACAATAATA TAATAACAAT AATAATAATA TTTTITAGTAA TAATAATTGT
601  AATAATAGTT CCATTATATA TGACAATAAT GTTTTTTCGG ATAATTACAA
651  ATATTATAAT GATAAATGTG ATCTTTGTAA TGGTCAGGAA AAATGTGTGC
701  ATAGACTGGG GGGTTTAAAT TGCACACATG ATGAAGATGA TAAAAACAAGA
751  AAATGTACAG ATGAAAATAT AAACAAAAAA TTATTAATAA AGAATGATGA
801  GGATAGTATT GATTATAGTG TAGACGATAT TAATGATGAA TATGAAAAA
851  ATAATATTAT AAATAATGAA AGTCATATTA TTAATAACGG AAGTCATGTT
901  ATTAATAACG GAAGTCATGT TATTAATAAC GGAAGTCATA TTATTAATAA
951  CGGAAGTCAT ATTATTAATA ACGGAAGTCA TATTATTAAT AATAATATTA
1001 TGCTTAAAAA AAATAAACAT GAGAATTTAT TAAGCATTAA ATATAGTAAT
1051 ATGATATTAA ACGATATTCG AGATGTTGAT ATAATTGTGG TATTTTTATT
1101 TAGCTTATTT TTATATTTTA ACGCAAACAA TATTGTTGAT ATGTTAGATC
1151 GTAATAAAAA GGACAGATAT TTTTAAATAA ATTCTTTAAA TATTAATCAT
1201 GATGTTATAA AGTTTCCAAC GTTTCACAAA GAAATAGTAG AGAGTTTTTT
1251 AAAAAATGAT TTTAGTTTAT TAAAAAATA TATAAAAAAT AAATGTAATA
1301 AATTAAAAAA AAAGTATAAA AATGTGTATT TAAAAAAGTA TCCAGAAAAAT
1351 AACAAAGAAG AGAAAAACTC TAAGAAAAAA AATTTCAAAT ATGAATTAAA
1401 GAAAAAGAAA AAAGAGAAAT GTTCTTTTTC GACAATAGTT GAATCACTTG
1451 AACGTGATGA ATTAATTTAT AGAGATATAA CGGAAATAGA TTGTGATAAA
1501 GATTTACCAG ATTTGAAAAA AAATTTTATA GTGATGGGTG CTTATTGTTT
1551 TTATCAAAAAG GATATGAAAC CATTTCAAGA TAAAAATACT TTTTTTTATA
1601 AATCTCCATC ATATATATGT GATTCTGAAA TATCTGTAGC ATGTAAAAAA
1651 GGGAAAAAAG TAGATTTTCC AAACCAGGAT GATTTTACAA TAATACAAAC
1701 AAATGATTGG ATATTAATTA TGGTTTTTGA TGGACATGGT CCATCAGGTC
1751 ATGACATAAG TAATTTTGTA CATGTAGTGC TTCCATTATT ATTTTCTTAT
1801 AATATAGAAA AAATTTATGA AAATCCTGTA CGAACTATGA AAACCTTATT
1851 TTATATGATA AATTGTTATT TGGTTAATTA TTCATATTGT ATTAATAATA
1901 ATATTAATCC TATTAATATT AATTTTATTG ACTATAATTT AAGTGGAAAC
1951 ACCTGTACCA TAATCTTTTA TAATTTTATT AAAAAAAAAA TTTATTCAGC
2001 ACATACAGGT GATAGTAGAG CAGTCATGGG AAAACAAAAT CCACAAACCA
2051 ACAAATTCTC AGCTTATAAT ATAACGGAAG ATCATAAGCC ATCTTTAAAA
2101 TTAGAAAAAG ATAGAATTCT TGCCTTTGGA GGAGAAGTCA AAAAATCCA
2151 TGGAGATGTA GCATATAGAG TTTTTGTTAA AGATGAAATG TATCCAGGAC
2201 TAGCCATGAG TAGAGCAATC GGTGATATAA CTTCTTCTTT TATAGGAGTT
2251 ACATGTGAAC CTACCATAAA AATTTTAGAC AAATTGGAAG AAGACAAATT
2301 TATAATTGTA GCTACAGATG GAATTTGGGA ATTCATAAGT AGCGAGGAGT
2351 GTGTGCAAAT GGTTTCCAAA AAAAAAAAAA AAAAAGTTCA CATTGCTATG
2401 GGTAAAATAT AAAAAAATAA AATAACAACA TATATATATA TATATATATA
2451 TATATATGTT ACATTTTGTG TTATGTATAT ATTTGATCTA TATATATATA
2501 TATATATTTT TTGTTTTTTA GAGGAAATAA TTAAGGAATC CTGGAGAAGA
2551 TGGGCAAGAA TAGATACCGT CGACGATGTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
2601 AAAAAAAAAA AAAAAATACA TATATATATA TGTATATATA TATATATATA
2651 TATATTTATC TATTTGTTTA TTATTTTTTTA ATTTATTACA CATATGCATA
2701 ATGTATACAA AATATATGCA CCTTTTTTCT TATTCCTAAT ATTTTTTTTTA
2751 TTTTCCTTTC CCTTTTTTACC TCTTTCAGAT GACCTTGGTA ATTTTATATT
2801 TTTAA

```

7.1.3 PfADK (cDNA)

```

1  ATGGGATCAT GTTATAGTAG AAAAAATAAA GTATCAACAA TATCATTAGA
51  TGAAGAGGAA AAAAAAAAAAAG AAAAAAAGAA GAAAAAAAAA ATATATATTT
101  TAAATGGAGC ATCTGGGTCA GAAAAAGATA CACAATGTAG ATTATTAGAA
151  AAAAAATACA ATTATAAAAT AATTTGTATA AGTAAATTAT TAAAAAGAATA
201  TAAAGAAGAA TATAATAAAG AAAATGTATT AAATGAAGAA GAAAATTATT
251  TTGATGAAAT AGAAAAATGT ATGATAGATG GATCTTTAGT TAATGATCAA

```

```

301 ATTGTTATAG AGATATTTCA TAAACAATTG AACAAATATA TAAATGATGA
351 TAAATATAAT GGTATTATAA TAAATGGTTT TCCTAGAAAT TATGAACAAG
401 CTTTATTAAT TATACAAAAC AATATAAGTA TAACGAAATT TATAAATATA
451 CAAGTAGGAA AAGATACTCT ATGGACAAGA ATAAATAATA GAATTATCGA
501 TCCAATTACA AATATAAGTT ATAATGAAAA TATAATACAA ATAATTAAAA
551 AAAAAAGAGA AGGACAAGAA CTATCAGACA AAGAACAAAA ACAATTGATC
601 ATAGACAATC ATTTATATAA TAATTTAAGT AATGATATTT TAGAAAAGATT
651 AACAAAAAGA AAAGATGACG AAGAACAGGT TTTCAATAAA AGGTTTCAAT
701 TATATATAGA AAGCGAACAA AAAATTAATT CTCTATTTAA AAATATTTGT
751 AAAAATGTTG ATGGAGAAAA ATCGATAAAT GATATATTTG ATCAAATATG
801 CTCCATTATA GATGATAACC CCAATTAA

```

7.1.4 PfARM (cDNA)

```

1 ATGGGAAATA ATTGCTGTGC AGGAAGAGAT TTACTIONTATA AAAATAAACT
51 ACAAGAGTTT GGTATAGAAG GATCCAAGAC AATAAGAAAAG TTGTTATCCT
101 TCACAAGTAA TGATATTCTC AGATTTGATA AAGCGTATGA TGAAAAATGAT
151 GTTCAAGAGT TTGTAAACTT ATGTTCTTCA ACATGCGAAG TAGCAAAAAA
201 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA TACATATATA TATATATATA TATATATATG
251 TATATATATA TATATATATA GAAAAATTAG AAGATAGAAT GCATCCTTGG
301 GCTGCTGACC CAAAACCTAT TGGTGCATTA TCCGCAACTC AATTGGCAAT
351 TTTAGCTAGC AAAGAAAAGTA AGATGGAAAA CAGGAAAAAT AAAAAAATTA
401 TTTTTTTTTT TCTAAATACT AAAATATATA TATATATATA CGAGCCACAT
451 TATAAAGATG CAATACGTGA GGCAAATGGA ATAGCCGTTT TTATAAAATTT
501 ATTAAAATCA CACGAATTAG ATAGAGTACA TGCTGCTGTT GTTGCTTTAT
551 CATTTTTATC CGTTGACAGT AAGAAAACCA AAATACATAA TAAAAAAAAA
601 ATATATATGC ATATATTTTT CGAAGATGTT AAAAATTGTA TTTGCATGTT
651 TGAATCTGGT GCTTTGCCAT ATTTAATAAG TGGAATGAAG TCAAATATAG
701 ACGGAATGAA AGCTGCTTGT GCTCAAACCT GTAGAAATAT TTTTGTCTTA
751 GATAAAAAAT ATAAGAAGGA ATTTTTAAAA CTAGGAGGAA TCACTCAACT
801 AGTGAATTTA CTAGAATTAC CATCAAATTA TGATGATAGT CAACCCCTTAT
851 ATACACAATT AGAAGCTATT TATCACTTGG AAGATTTTCAT ACTGAATGAT
901 GGAGATGAAA TCCCCGAATT TTTGGAAGCA GTTAAAAACT CCAATTCGAT
951 AAAAAATTTA AAAACCCTAC AACAGTGCCC TGAGCAAGAC TTAGCAGAAG
1001 CCTCCAATGT TCTCTTATTG AGACTAACGG ATTA

```

7.1.5 PfGAP45 (CDNA)

```

1 ATGGGAAATA AATGTTCAAG AAGCAAAGTA AAGGAACCCA AACGTAAAGA
51 TATTGATGAA TTAGCTGAAC GTGAAAATTT AAAAAACAA TCTGAAGAAA
101 TAATTGAAGA AAAACCAGAA GAAGTTGTTG AGCAAGTAGA AGAAACACAT
151 GAAGAACCTC TTGAACAAGA ACAGGAACTG GATGAACAGA AAATAGAAGA
201 AGAAGAAGAA GAACCTGAAC AAGTACCAAA AGAAGAAAATA GATTATGCAA
251 CTCAAGAAAA TAAATCATTG GAAGAAAAAC ATTTAGAAAGA TTTAGAAAAGA
301 TCTAATTGAG ATATTTATTC AGAATCTCAA AAATTTGATA ATGCTAGTGA
351 TAAATTAGAA ACAGGAACTC AATTAACCTT ATCTACTGAA GCCACTGGTG
401 CCGTACAACA AATAACTAAA TTAAGTGAAC CCGCCATGA AGAAAGTATA
451 TATTTTACTT ATAGATCTGT AACACCTTGT GATATGAATA AACTCGATGA
501 AACCGCTAAA GTTTTTTCAA GAAGATGTGG ATGTGATCTT GGTGAACGTC
551 ATGATGAAAA TGCATGTAAA ATTTGTAGAA AAATTGATTT ATCCGATACA
601 CCTTTATTGA GCTAA

```

7.1.6 Pfrab_5b (cDNA)

```

1   ATGGGATGTT CATCAAGCAC CGAAAGGTTA ACATCTACCA AAAATATTAA
51  TATTGTTACA TCTCCTGCAC AACAAACAAAA AAAAAATGCT CAAGATACTA
101 AAGTGAAAAT AGTTTTATTA GGTGACAGTG GTGTTGGAAA ATCAAGTATT
151 GCTTTGTATT TATGTCATGG TCGCTTTTCT GAAAAACATC AAGTTACTAT
201 AGGTGCAGCA TTTTACATC ATAATATTGA ATTAATAAAT GGTGCAACAA
251 TGAAATTACA TATTTGGGAT ACTGGAGGGC AAGAAAGATT TCGTTCATG
301 GCTCCTTTAT ATTATCGTGA CGCATATGGA GCAGTTGTCG TTTATGACTC
351 AAATAATGTC GAATCCTTTG ATTCTTTAAA ATACTGGATA AACGAAATAA
401 AATCAAATGG TCCAAGAAAT TGTTGTATCA TGGTAGTTGC CAATAAAAAG
451 GACTTACCCC AAAAAGTAA TTCAGAGATG GTCATGAAGT TTTGTGAACA
501 AGAAAATGTA TCATTTATTG AATGCTCAGC TAAGACAGGA GAGAATATTA
551 CTAATTTTAT TGAAAAATTA GCTAGTCGCA TTTATTCCCC ATTTAAAGAA
601 GTTTTATATT ATAACAATCC TTGA

```

7.1.7 PfCAP (cDNA)

```

1   ATGGGCAATG TGTGCACATG GAGACAAGGG AAAGAAAAAG CAGGTGACGA
51  TAATTCACAA GTAATAAAAAG ATAAAGAATT ACAAACGAG TTTAAAACAT
101 TCGAACAAAA AATGAGAAGT AATAAAAAAA ATGCTCATGA AGGAGATATG
151 AATAATGATG GTGAAGATGA TAGATATAAA TTTTCCAGAG GTTTTTCATT
201 AAGTAAAAAA CCAAGTAAAA CTAAAATACC GATTACCAA ACGGATAGTG
251 AAATATTAGA TGGATTGGAT TATTCTGAAA TGAGTAAACA AGTTCTTATG
301 ACTTTAAATA AAAAAAATAT ACTTAATGAC GACGGTTCAA GCGACGGTAA
351 CGACACAGAT GTTCACAGCA TGTTTCGATG GAAAGAAATA GAGAGAAAAG
401 TATTGGATTT AGAAAGTATA CATTTTCATC AGAAGAAAAG ATTATCTGTG
451 AGTGCCGAAG CATATGGTGA CTGGAATAAA AAGATTGATA ATTTTATTC
501 TAAAGTTTAT AAGAAAGATG AAAAAGAAAA GGCCAAGATA AGAGAAGCAT
551 TGAATGAATC CTTTTTGTTT AATCATTTAA ATAAGAAAGA ATTTGAAATT
601 ATTGTAAATG CTTTTTTTGA TAAAAATGTA GAAAAAGGGG TTAATATTAT
651 AAATGAAGGA GATTATGGAG ATTTATTATA TGTTATAGAT CAAGGTGAAG
701 TTGAAATATA TAAAACAAAA GAAAATAATA AAAAAAGAGT ATTAACAGTA
751 TTAATATCTA AAGATGTTTT TGGAGAATTA GCCTTATTAT ATAATTCTAA
801 AAGAGCTGCA ACAGCTACAG CCTTAACCAA ATGCCATTTA TGGGCCTTAG
851 ATAGAGAATC TTTTACATAT ATAATAAAG ATATGGTTGC TAAGAAAAGA
901 AAAATGTATG AAGATATTCT TAGTCATGTA AATATTTTAA AAGACATGGA
951 TCCATATGAA AGATGTAAAG TTGCTGATTG CTTAAAATCT AAAAGTTATA
1001 ATGATGGAGA AATTATTATT AAAGAAGGAG AAGAAGGAGA TACATTTTTT
1051 ATCCTTATAG ATGGAAATGC TGTAGCTTCT AAAGATAATA AAGTCATCAA
1101 AACTTATACA AAGGGAGATT ACTTTGGAGA ATTAGCTCTT CTCAAAAATA
1151 AACCAAGAGC TGCTACCATA AAAGCACAAA ATTTTTGTCA AGTCGTCTAT
1201 TTAGATAGAA AAAGTTTCAA AAGATTATTA GGACCTATTG AGGATATATT
1251 ACATAGAAAT GTTGAAAATT ACAAAAAAGT TCTGAACGAA TTAGGTTTGG
1301 ATACAACCTG TATTGATGAA AATTAA

```

7.1.8 Citrine (cDNA)

```

1   ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTCCACC GGGGTGGTGC CCATCCTGGT
51  CGAGCTGGAC GGCGACGTAA ACGGCCACAA GTTCAGCGTG TCCGGCGAGG
101 GCGAGGGCGA TGCCACCTAC GGCAAGCTGA CCCTGAAGTT CATCTGCACC

```

```

151 ACCGGCAAGC TGCCCGTGCC CTGGCCCACC CTCGTGACCA CCTTCGGCTA
201 CGGCCTGATG TGCTTCGCCC GCTACCCCGA CCACATGAAG CAGCACGACT
251 TCTTCAAGTC CGCCATGCCC GAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCTTC
301 TTCAAGGACG ACGGCAACTA CAAGACCCGC GCCGAGGTGA AGTTTCGAGGG
351 CGACACCCTG GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG
401 ACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACTACAA CAGCCACAAC
451 GTCTATATCA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC GGCATCAAGG TGAACTTCAA
501 GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGCAGCGT GCAGCTCGCC GACCACTACC
551 AGCAGAACAC CCCCATCGGC GACGGCCCCG TGCTGCTGCC CGACAACCAC
601 TACCTGAGCT ACCAGTCCGC CCTGAGCAAA GACCCCAACG AGAAGCGCGA
651 TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCGC CGCCGGGATC ACTCTCGGCA
701 TGGACGAGCT ATACAAGTAA

```

7.1.9 eCFP (cDNA)

```

1 ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTTACC GGGGTGGTGC CCATCCTGGT
51 CGAGCTGGAC GCGGACGTAA ACGGCCACAA GTTCAGCGTG TCCGGCGAGG
101 GCGAGGGCGA TGCCACCTAC GGCAAGCTGA CCCTGAAGTT CATCTGCACC
151 ACCGGCAAGC TGCCCGTGCC CTGGCCCACC CTCGTGACCA CCCTGACCTG
201 GGGCGTGCAG TGCTTCAGCC GCTACCCCGA CCACATGAAG CAGCACGACT
251 TCTTCAAGTC CGCCATGCCC GAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCTTC
301 TTCAAGGACG ACGGCAACTA CAAGACCCGC GCCGAGGTGA AGTTTCGAGGG
351 CGACACCCTG GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG
401 ACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACTACAT CAGCCACAAC
451 GTCTATATCA CCGCCGACAA GCAGAAGAAC GGCATCAAGG CCAACTTCAA
501 GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGCAGCGT GCAGCTCGCC GACCACTACC
551 AGCAGAACAC CCCCATCGGC GACGGCCCCG TGCTGCTGCC CGACAACCAC
601 TACCTGAGCA CCCAGTCCGC CCTGAGCAAA GACCCCAACG AGAAGCGCGA
651 TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCGC CGCCGGGATC ACTCTCGGCA
701 TGGACGAGCT GTACAAGTAA

```

7.1.10 PfRKIP (cDNA)

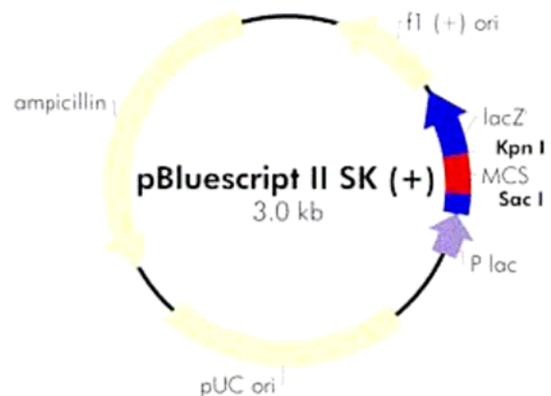
```

1 ATGACAATAC CCACGATAAG TGAACTTAAA AAGGATAGAA TTATACCTCA
51 CGTTTTTCCA AATGATAAAA TTGATTTGAA CGTTGACCTT TTTATAAGTT
101 TTAAAGCAGG AAAAGAAGTG AATCACGGAA ATGTTTTTGA TATTGCTGGA
151 ACGGGGAGTG TACCAAGAAA TATAAAATTT TCAGAAGAAC CTCCAGATGG
201 TTATTGTTTT GTTTTATTCA TGGTAGATCC TGATTATCCT TCAAGATTAC
251 GACCAGATGG TAAGGAATAT ATACATTGGG TGGTATCAGG TATAAAAAACG
301 AAAGAATTAA TAAAAGGAAC TCAAAAAAAT TGTGTAAC TAATTGCCATA
351 TGTAGGTCCA TCTATTAAGA AAGGTACTGG TTTACATAGA ATTAGTTTTTA
401 TTATTTCTTT AATAAAAGAA GAAGATAAAG ATAACATTAC AGGATTACCT
451 CATTATAAAG GAGAAAAATA TATTACTAGA GTAAAATTTA ACAATTATGA
501 ATCAGTTCAT AATATTGCTC AAATTAATAA TATGAAAATT GTAGGTTATA
551 ATTGGTGCCA AATTGAAGGG TAG

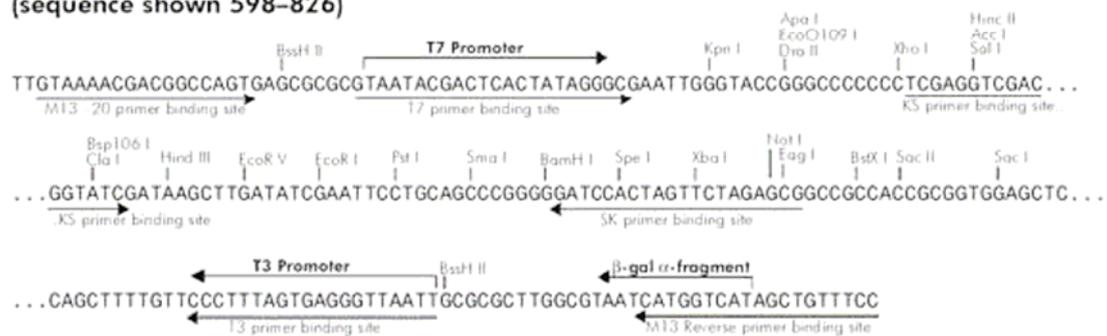
```


7.2.2 pBluescript II SK (+)

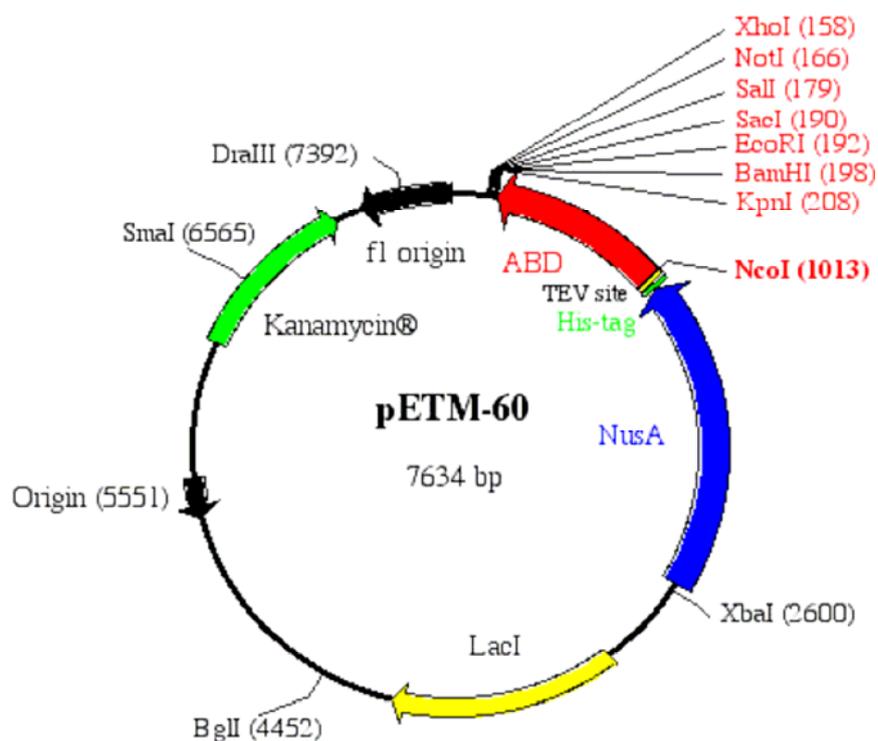
f1 (+) origin 135–441
 β-galactosidase α-fragment 460–816
 multiple cloning site 653–760
 lac promoter 817–938
 pUC origin 1158–1825
 ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976–2833



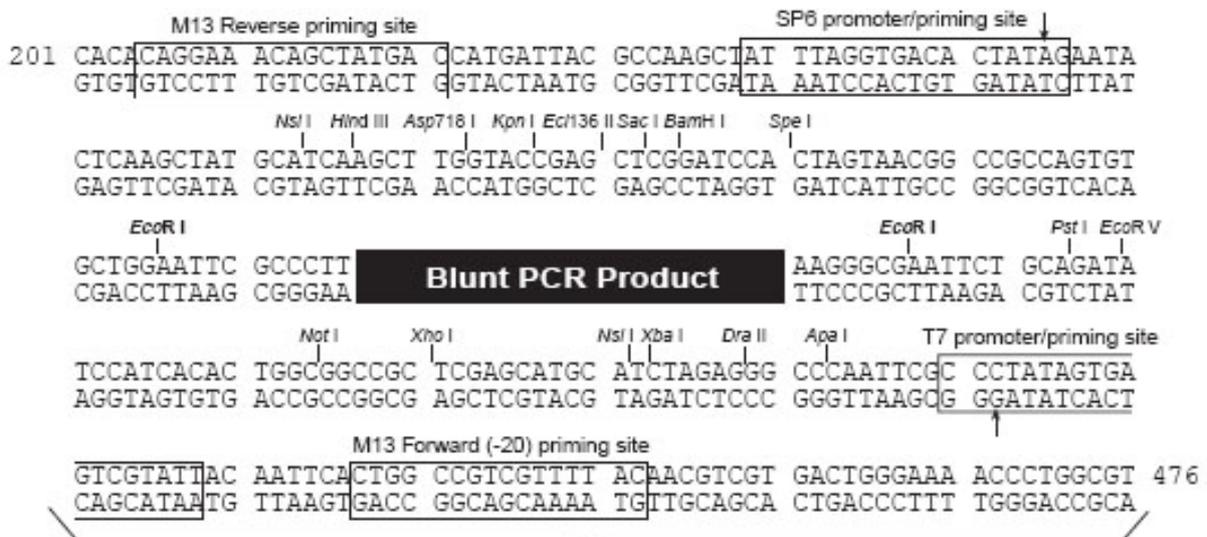
pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)



7.2.3 pETM-60



7.2.4 pCR-Blunt II-TOPO



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

Mainz, den

Dominik Kugelstadt