

Aus dem Institut für Virologie, Arbeitsgruppe Parasitologie
Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Bioinformatische und biochemische Suche und
Identifizierung GPI-verankerter Proteine von Plasmodien,
den Erregern der Malaria unter Nutzung einer konditional
letalen Hefemutante**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrads der Medizin (Dr. med.)

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Lena Maria Sauer
aus Dielheim

Marburg 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
14.12.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

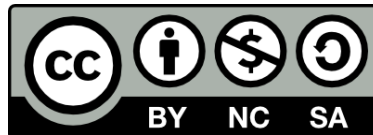
Dekan: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Ralph T. Schwarz

1. Korreferent: Prof. Dr. U. Steinhoff

2. Korreferent: Prof. Dr. M. Rust

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Nicht kommerziell
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
4.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/legalcode.de>

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Die durch die Familie der Apicomplexa übertragene Parasitose Malaria stellt auch im 21. Jahrhundert noch immer eine der weltweit bedeutendsten und gefährlichsten Infektionskrankheiten dar. Der eukaryotische Parasit wird durch die, insbesondere in den tropischen und subtropischen Regionen der Erde weit verbreitete, Anophelesmücke übertragen. Die hierdurch ausgelöste Erkrankung variiert in Hinblick auf Verlauf und Ausprägung je nach zugrunde liegender Plasmodienspezies.

Obwohl in den letzten Jahrzehnten die medikamentöse Therapie sowie eine verbesserte Transmissionsprophylaxe zu einem phasenweisen Rückgang der Infektionen und Todesfälle geführt haben, ist in den vergangenen Jahren eine deutliche Verlangsamung dieses Trends, zurückzuführen auf eine zunehmende Resistenzentwicklung gegen die gängigen Antiparasitika, zu beobachten. Insbesondere während der Covid-Pandemie kam es zu einer deutlichen Zunahme der Fallzahlen. Auch wenn mit RTS,S/AS01 (RTS,S) erstmals ein Impfstoff verfügbar zu sein scheint, ist die Suche nach neuen therapeutischen Zielen als Grundlage zur Entwicklung einer zusätzlichen Therapie weiterhin geboten.

Die Bindung von Oberflächenproteinen des Parasiten erfolgt zum überwiegenden Teil mittels eines Glycosylphosphatidylinositol-Ankers (GPI-Anker). Darüber hinaus stellen freie, nicht proteingebundene GPIs wichtige Pathogenitätsfaktoren der Malaria dar. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Suche nach weiteren, bisher noch unbekanntem GPI-verankerten Proteinen in verschiedenen Plasmodienspezies.

Unter Zuhilfenahme von bioinformatischen Analysen wurden im Zuge dieser Untersuchungen zunächst die Proteome verschiedener Plasmodienspezies im Hinblick auf mögliche GPI-verankerte Proteine durchmustert. Genutzt wurde hierfür ein strukturell-deskriptiver Ansatz, der sich auf die für die GPI-verankerten Proteine als typisch anzusehende Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Abschnitten stützt. Bei allen untersuchten Plasmodienarten konnten neue, statistisch signifikante Kandidaten identifiziert werden.

Um den Wert der bioinformatischen Analyse zu untermauern, wurde ein bisher unbekanntes GPI-Kandidatenprotein, PF3D7_1140000, von *P. falciparum* für stringente molekularbiologische und biochemische Analysen ausgewählt, um so die *in silico* Analyse modellhaft zu validieren.

Hierzu wurde eine konditional letale Hefemutante für weitere Untersuchungen hergestellt, um zu analysieren, ob das Plasmodien-Gen in der Hefe als GPI-Protein exprimiert wird.

Des Weiteren konnte durch seine Expression in Hefe mit nachfolgenden Triton-X-114-Phasentrennungsexperimenten gezeigt werden, dass es sich bei PF3D7_1140000 tatsächlich um ein bisher unbekanntes GPI-verankertes Protein handelt. Es ist das erste bisher beschriebene GPI-gebundene Enzym in Plasmodien.

Abstract

Malaria, a parasitosis transmitted by the Apicomplexa family, is still one of the world's most important and dangerous infectious diseases in the 21st century. The eukaryotic parasite is transmitted by the Anopheles mosquito, which is particularly widespread in the tropical and subtropical regions of the world.

The course and severity of the disease varies depending on the underlying plasmodial species.

Although drug therapy and improved transmission prophylaxis have led to a decline in infections and deaths in recent decades, a significant slowdown in this trend has been observed in recent years, due to the increasing development of resistance to commonly used antiparasitic drugs. In particular, there was also a significant increase in the number of cases during the Covid pandemic. Although a vaccine seems to be available for the first time with RTS,S/AS01 (RTS,S), the search for new therapeutic targets as a basis for the development of an additional therapy is still warranted.

Parasite surface proteins bind predominantly by means of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. In addition, free, non-protein-bound GPIs represent important malaria pathogenicity factors.

The present work describes the search for additional, previously unknown GPI-anchored proteins in different plasmodial species.

With the help of bioinformatic analyses, the proteomes of different plasmodia species were screened for possible GPI-anchored proteins. A structural-descriptive approach was used, based on the distribution of hydrophobic and hydrophilic segments, which is considered typical for GPI-anchored proteins. New, statistically significant candidates were identified in all plasmodial species studied.

To substantiate the value of the bioinformatic analysis, a previously unknown GPI candidate protein, PF3D7_1140000, from *P. falciparum* was selected for stringent molecular and biochemical analyses to provide model validation of the in silico analysis.

For this purpose, a conditional lethal yeast mutant was prepared for further studies to analyze whether the plasmodial gene is expressed in yeast as a GPI protein.

Furthermore, its expression in yeast with subsequent Triton-X-114 phase separation experiments demonstrated that PF3D7_1140000 is indeed a previously unknown GPI-anchored protein. It is the first GPI-linked enzyme in plasmodia described to date.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Malaria	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Lebenszyklus	1
1.1.3 Ausgewählte Strukturen der Plasmodien.....	4
1.1.4 Symptome und Krankheitsverläufe	6
1.1.5 Diagnostik	7
1.1.6 Therapie.....	8
1.1.7 Resistenzen und Entwicklung neuer Medikamente.....	10
1.1.8 Expositions- und Chemoprophylaxe	13
1.1.9 Impfstoffe	14
1.2 GPI-Anker	14
1.2.1 Allgemeines.....	14
1.2.2 Biosynthese	16
1.2.3 Transamidase Reaktion	20
1.2.4 GPI-Anheftungs-Signal	21
1.2.5 Modifikationen/Remodeling.....	22
1.2.6 Funktion.....	25
1.2.7 Medizinische Bedeutung der GPI.....	29
1.3 Zielsetzung	35
2. Material	37
2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	37
2.2 Wasser	39
2.3 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	40
2.4 Bakterien, Hefen und Parasiten	41
2.4.1 Bakterien	41
2.4.2 Hefen	42
2.4.3 Parasiten	42
2.5 Glas- und Plastikwaren.....	42
2.6 Enzyme und dazugehörige Puffer	42
2.7 Oligonukleotide (Primer)	43
2.8 Kommerziell erhältliche Reaktions-Kits	44
2.9 Plasmide	44
2.10 Rekombinante Plasmide	45

2.11	Antikörper	46
2.12	Puffer, Medien und Gele	46
2.12.1	Reaktionspuffer und -medien	46
2.12.2	Wachstumsmedien für Bakterien	48
2.12.3	Wachstumsmedien für Hefen	50
2.12.4	Wachstumsmedien für Plasmodien	52
3.	Methoden.....	54
3.1	Zellbiologische Methoden	54
3.1.1.	<i>In vitro</i> Kulturen von <i>P. falciparum</i>	54
3.1.2	<i>In vitro</i> -Kulturen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
3.2	Molekulargenetische Verfahren	57
3.2.1	Polymerasekettenreaktion.....	57
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	59
3.2.3	DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	59
3.2.4	Bestimmen der DNA-Konzentration	59
3.2.5	Restriktionsverdau	60
3.2.6	Dephosphorylierung von DNA.....	61
3.2.7	Ligation von DNA mittels T4-DNA-Ligase.....	61
3.2.8	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	62
3.2.9	Transformation von DNA in chemisch kompetente Bakterienzellen.....	62
3.2.10	Transformation von DNA in Hefezellen	62
3.2.11	Mini-Präp-Plasmidpräparation im kleinen Maßstab.....	64
3.2.12	Maxi-Präp-Plasmidpräparation im großen Maßstab.....	64
3.2.13	DNA-Sequenzierung	65
3.2.14	Entfernen der Intron-Sequenz aus dem Gen <i>PfCA</i>	65
3.2.15	Markierung der <i>PfCA</i> mittels Protein-Tag	68
3.2.16	SDS-Page-Analyse und Western Blot	69
3.2.17.	Immundetektion des mit FLAG markierten Proteins	70
3.2.18	Aufreinigung des Triton X-114	71
3.2.19	Triton X-114 Phasenseparation	71
3.3	Bioinformatische Methoden	72
3.3.1.	Einführung	72
3.3.2	PlasmoDB.....	73
3.3.3	SignalP.....	74
3.3.4	PredGPI	74
3.3.5	TMpred (Transmembrane Predictor).....	75

3.3.6 NGPhylogeny.fr	76
4. Ergebnisse	79
4.1 Analyse der bekannten GPI-Proteine	79
4.2 Definition der Suchparameter.....	83
4.3 Analyse der Sensitivität und Spezifität.....	90
4.4 Analyse der potenziellen GPI-Proteome	92
4.5 Phylogenetische Besonderheiten	94
4.6 Amplifikation des Gens PF3D7_1140000.....	94
4.7 Klonierung des Gens PF3D7	95
4.8 Entfernen der Introns.....	97
4.9 Heterologe Komplementation in Hefe.....	98
4.9.1 Die Carboanhydrase ist essenziell für das Wachstum von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98
4.9.2 Funktionale Komplementation der konditional letalen Hefenmutante durch PfCA.....	100
4.10 Die fusionierte FLAG-Sequenzen beeinflussen die Komplementation in der Hefemutante nicht	105
4.11 Detektion des FLAG-markierten Proteins PfCAmut.....	106
4.12 Die Triton X-114-Phasentrennung zeigt, dass CA ein GPI-Protein ist	108
5. Diskussion	111
5.1 Diskussion der Bioinformatischen Erkenntnisse.....	111
5.1.1 Allgemeine Betrachtungen	111
5.1.2 Betrachtung einzelner GPI-Proteine.....	113
5.1.3 Die Carboanhydrase PF3D7_1140000 ein putatives GPI-verankertes Protein	116
5.2 Diskussion der biochemischen Aufarbeitung der Carboanhydrase.....	119
5.2.1 PF3D7_1140000 komplementiert eine NCE103-defiziente Hefemutante von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	119
5.2.2 Biochemischer Nachweis der GPI-Verankerung von PfCA mittels Triton-X-114-Phasentrennung.	122
5.2.3 Mögliche Lokalisation der Carboanhydrase PfCA.....	123
5.3 Ausblick	125
6. Abbildungsverzeichnis	127
7. Tabellenverzeichnis.....	129
8. Abkürzungsverzeichnis	129
9. Anhang	133
9.1 Graphische Übersicht über die durch Gilson beschriebenen GPI-Proteine.....	133
9.2 Auflistung der Orthologen zu Tabelle 7.....	133
9.3 Potenzielle GPI-Proteine von <i>P. vivax</i>	135
10. Publikationen.....	136

11.	Verzeichnis akademischer Lehrender.....	136
12.	Danksagung	137
13.	Literaturverzeichnis.....	138

1. Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Epidemiologie

Die durch die Familie der Plasmodien vermittelte Parasitose Malaria stellt auch im 21. Jahrhundert noch immer eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit dar. Allein im Jahr 2021 verzeichnete die WHO 247 Millionen Fälle, 95 % davon in Afrika (WHO 2022b) 99,7 % der dortigen Malariafälle sind auf *Plasmodium falciparum* zurückzuführen. Etwa 61900 Erkrankungen nahmen einen tödlichen Ausgang. Nach wie vor sterben insbesondere Kinder unter fünf Jahren an den Folgen der schwerwiegenden Infektion (WHO 2022b).

Obwohl es sich WHO und UN zum Ziel gesetzt haben, Malaria auszurotten, ist die parasitäre Infektion weiterhin in 84 Ländern endemisch. Somit leben auch heute noch circa 40 % der Weltbevölkerung in einem Malariaendemiegebiet (RKI-Ratgeber 2018; WHO 2019; Weiss et al. 2019; WHO 2022b). In diesen Regionen ist die Parasitose sogar häufiger anzutreffen als z. B. die Influenza in Großbritannien (Walker et al. 2018).

Auch wenn die Malaria in Europa seit dem 2. Weltkrieg als ausgerottet gilt, darf eine mögliche Re-Etablierung in unseren Breiten im Zuge des Klimawandels nicht außer Acht gelassen werden, wie bereits Fälle auf Malta oder in Italien zu zeigen vermögen (Medialdea-Carrera et al. 2018).

Eine ständig aktualisierte Übersicht über den momentanen Ausbreitungsstand bietet die britische Website <https://malariaatlas.org/> des Malaria Atlas Project (Hay und Snow 2006; Weiss et al. 2019).

Insbesondere während der Coronapandemie konnte eine Zunahme der Fallzahlen durch Unterbrechungen in der Versorgung beobachtet werden. Zwischen 2019 und 2021 können schätzungsweise 13,4 Millionen zusätzliche Fälle darauf zurückgeführt werden (WHO 2022b).

1.1.2 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus der apicomplexen Parasiten der Gattung der Plasmodien umfasst einen obligaten Wirts- (Anopheles/Mensch) und Generationenwechsel (sexuell/asexuell) (vgl. Abb. 1.1.2a, CDC 2018). Der Mensch fungiert hierbei lediglich als Zwischenwirt, wohingegen die weibliche Anophelesmücke den eigentlichen Haupt- und Zielwirt der Parasiten darstellt (Hof und Dörries 2009).

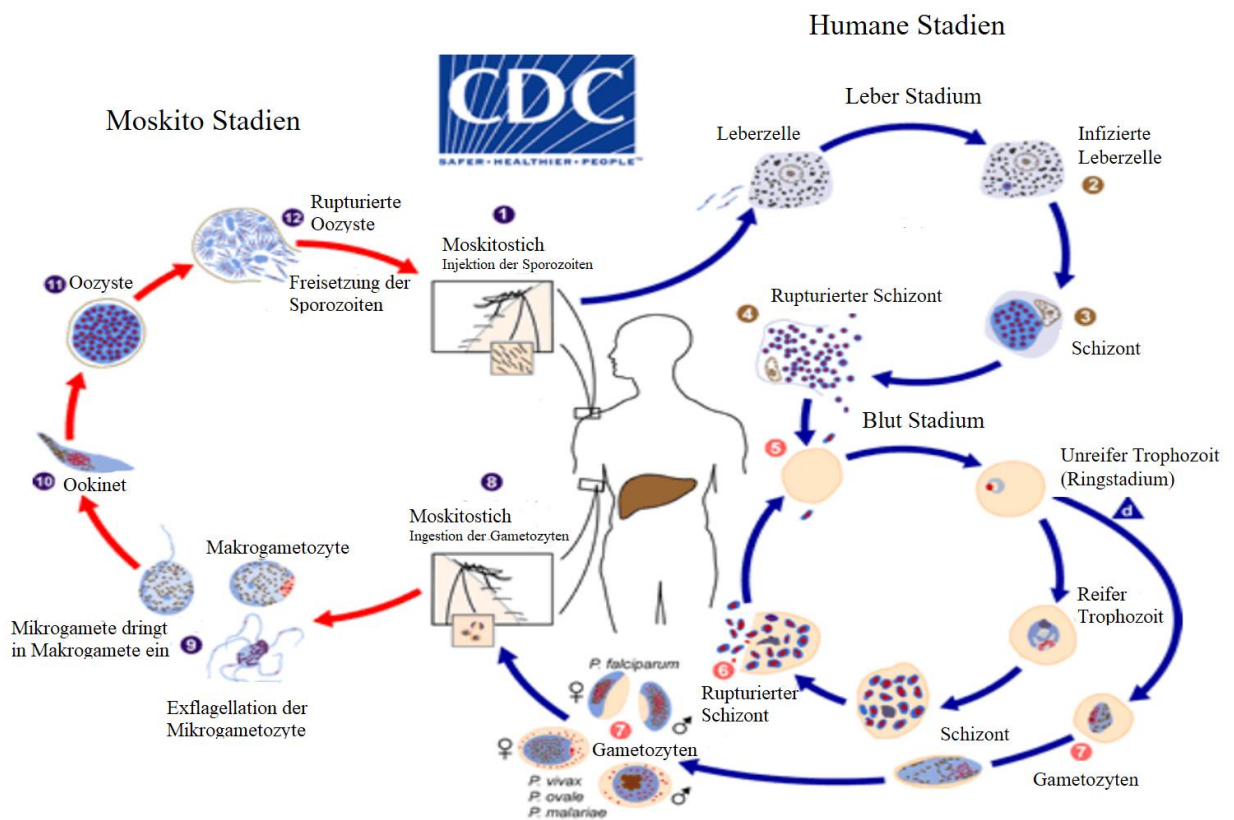


Abb.1 Lebenszyklus der Plasmodien modifiziert nach (CDC 2018)

Durch den Stich einer infizierten weiblichen Anophelesmücke gelangen **Sporozoiten** in den Blutkreislauf des humanen Zwischenwirts (Schritt 1). Der Speichel des Vektors wirkt hierbei als Antikoagulanz und begünstigt so die Aufnahme möglichst vieler Parasiten ins Blut (Madigan et al. 2013). Bereits nach ca. 30 Minuten invadieren die injizierten Parasiten Zellen des Leberparenchyms (Schritt 2) und entziehen sich auf diese Weise der Immunantwort des Körpers. Im nächsten Schritt des extra-erythrozytären Zyklus differenzieren sich die **Sporozoiten** im Zuge der hepatischen Schizogonie zu **Schizonten** (Schritt 3), aus welchen wiederum durch vielfache Zellteilung **Merozoiten** entstehen (Schritt 4) (Rogers 2007). Je nach Plasmodienspezies verlassen diese die Hepatozyten nach 1 bis 6 Wochen durch Ruptur der ins Blut abgegebenen Merozoiten und beginnen mit der Invasion der roten Blutkörperchen (Schritt 5) (Suerbaum et al. 2012; Strelkauskas et al. 2010). Eine Besonderheit stellen hierbei die Infektionen mit *P. vivax* und *P. ovale* dar. Während bei *P. falciparum* sämtliche Parasiten aus der Leber ins Blut abgegeben werden, verbleiben bei diesen Plasmodienspezies inaktive **Hypnozoiten** im Leberparenchym zurück, die auch nach Jahren der Symptomlosigkeit ein Spontanrezidiv der Erkrankung bedingen können.

Die sich aus den Merozoiten entwickelnden und über einen ringförmigen Zwischenschritt herangereiften **Trophozoiten** verbrauchen bis zu 80% des Hämoglobins des befallenen Erythrozyten durch Degradierung des selbigen in sauren lysosomalen Verdauungsvakuolen. Das freiwerdende Häm wiederum wirkt in ungebundenem Zustand toxisch auf die Plasmodien, weshalb es zum unlöslichen Pigment Hämozoin polymerisiert wird. Durch die Hemmung des Polymerisationsvorgangs beispielsweise durch den Einsatz des Antimalariamittels Chloroquin sterben die Parasiten infolge einer Häm-Vergiftung (Hof und Dörries 2009; Rosenthal 1996; Sullivan 2002).

Im nachfolgenden Entwicklungsschritt bilden sich aus den **Trophozoiten** multinukleäre **Schizonten**, die sich je nach **Plasmodienart** in mehrere Merozoiten teilen (8-32 in *P. falciparum*, 12-24 in *P. vivax*, 6-12 in *P. malariae*). Nach der Ruptur des Erythrozyten befallen die freigesetzten **Merozoiten** innerhalb weniger Minuten neue Blutkörperchen (Schritt 6).

Der erythrozytäre Zyklus aus Merozoit – Trophozoit – Schizont – Merozoit verläuft bei *P. malariae* in einem synchronen 72-stündigen bzw. bei *P. knowlesi* in einem 24-stündigen sowie bei *P. vivax* und *P. ovale* in einem 48-stündigen Rhythmus, mit Fieberschüben alle 3 bzw. 4 Tage, weshalb diese Form der Erkrankung als *Malaria quartana* bzw. *Malaria tertiana* bezeichnet wird (White et al. 2014). Die Entwicklungszyklen von *P. falciparum* verlaufen asynchron, wodurch der Krankheitsverlauf der *Malaria tropica* durch unregelmäßige und persistierende Fieberanstiege gekennzeichnet ist (Suerbaum et al. 2012).

Abhängig von verschiedenen Faktoren, wie unter anderem einer hohen Parasitämie entwickeln sich parallel hierzu innerhalb von 5-23 Tagen geschlechtliche **Makro-** bzw. **Mikrogametozyten**, die für einige Tage im Blut des Wirts zirkulieren (Schritt 7). Sollten sie im Falle von *P. falciparum* nicht innerhalb von 22 Tagen in eine Anophelesmücke aufgenommen werden, sterben diese Parasitenstadien im Menschen ab (Hof und Dörries 2009; Suerbaum et al. 2012).

Die Vermehrung im insektischen Hauptwirt der Parasiten umfasst 5 Entwicklungsschritte und im Gegensatz zur Fortpflanzung im Menschen sowohl eine sexuelle als auch asexuelle Vermehrung. Während der Blutmahlzeit (Schritt 8) kann die Anophelesmücke sowohl **Schizonten** als auch **Mikro-** bzw. **Makrogametozyten** aus dem Kreislauf eines infizierten Menschen aufnehmen. Während Erstere in der Mücke nicht überleben können, reifen die Vorläufer der männlichen und weiblichen Fortpflanzungszellen zu **Makro-** (♀) und **Mikrogameten** (♂) heran. Durch chemotaktische Anziehung verschmelzen die

beiden Zellen in der Mücke zu einer **Zygote** (Schritt 9). Diese wandert als **Ookinete** in den Magen des Vektors und nistet sich in der Magenwand ein (Schritt 10). Hier entwickelt sie sich zur **Oozyste** (Schritt 11), aus welcher anschließend durch asexuelle Zellteilung mehrere Tausend **Sporozoiten** entstehen. Nach der Ruptur der Hüllstruktur breiten sich diese über die Blutzirkulation der Anophelesmücke im gesamten Insektenkörper aus (Schritt 12). Durch Infektion der Speicheldrüse können die **Sporozoiten** bei der nächsten Blutmahlzeit auf einen neuen (Zwischen-)Wirt übertragen werden (Hof und Dörries 2009; Strelkauskas et al. 2010).

Die Entwicklungsschritte im Innern des Insekts dauern etwa zwischen 4 und 15 Tagen. Sie sind darüber hinaus temperaturabhängig. So vermehren sich Plasmodien im Insekt lediglich bei Außentemperaturen zwischen 13 - 33 °C und nur unterhalb von 2000 Höhenmetern, wodurch sich das Verbreitungsmuster dieser Protozoen erklären lässt (Hof und Dörries 2009; Suerbaum et al. 2012; Rogers 2007).

1.1.3 Ausgewählte Strukturen der Plasmodien

Der Apicoplast

In den meisten apicomplexen Parasiten findet sich ein rudimentäres Plastid, der Apicoplast. Dieser spielt eine essenzielle Rolle für die Invasion in die Wirtszelle sowie für das Überleben des Protozoons (Lim und McFadden 2010; Ramya et al. 2007).

Die Funktionen dieses Plastids sind vielfältig. So ist davon auszugehen, dass der Apicoplast an der Fettsäuresynthese (Yu et al. 2008; Waller et al. 2003), der Bildung der parasitophoren Vakuole (Ralph et al. 2004), der Isoprenoidsynthese (Ralph et al. 2004; Jomaa et al. 1999), der Hämsynthese (Ramya et al. 2007; van Dooren et al. 2006) sowie an der Eisen-Schwefel-Cluster-Synthese (Seeber 2002) beteiligt ist. Auch besteht eine enge metabolische Verbindung zwischen dieser Zellorganelle und dem einzelnen Mitochondrium der apicomplexen Parasiten (van Dooren et al. 2006; Stanway et al. 2009).

Es ist zu vermuten, dass diese nicht-photosynthetisch aktive Organelle ihren Ursprung in einer sekundären Endosymbiose hat. Hierbei wurde ein Eukaryont, der zuvor im Rahmen einer primären Endosymbiose einen Cyanobakterium-artigen Prokaryoten in sich aufgenommen hatte, durch einen zweiten Eukaryonten verschlungen (Sheiner et al. 2013). Gemäß der aktuellen Studienlage ist, unter anderem nach der Auswertung zahlreicher phylogenetischer Analysen, davon auszugehen, dass es sich bei dem sekundären Endosymbionten am ehesten um eine Rotalge handelt (Fast et al. 2001; Harper und Keeling 2003).

Die Hypothese der sekundären Endosymbiose wird zusätzlich durch die vier Membranen, die den Apicoplasten umgeben, gestützt. Die äußerste Membran stellt hierbei die phagosomale Membran des aufnehmenden Organismus dar, die zweitäußerste Membran wird von der ehemaligen Plasmamembran der aufgenommenen Alge gebildet, während die beiden inneren Membranen die Hülle des Prokaryoten darstellen (Lim und McFadden 2010; Sheiner und Striepen 2013).

Es ist davon auszugehen, dass zahlreiche Gene des Ursprungsorganismus auf die Wirtszelle übertragen wurden (Kleine et al. 2009). Dieser Umstand erlaubt eine bessere, zentralisierte Kontrolle der metabolischen Funktion (Sheiner und Striepen 2013). So enthält der Apicoplast von *P. falciparum* noch ein 35 kb großes, zirkuläres Genom, welches für 32 Proteine kodiert (Foth et al. 2003). Das gesamte Apicoplasten-Proteom hingegen enthält circa 450 Proteine (Foth et al. 2003).

Die Transfermechanismen, die den Transport der nukleär kodierten Proteine in die verschiedenen Membranen bzw. das Stroma des Apicoplasten koordinieren, basieren auf verschiedenen, teilweise noch nicht abschließend geklärten Translokationsmechanismen, auf die hier im Hinblick auf ihre Komplexität nicht näher eingegangen werden soll (Sheiner und Striepen 2013). Grundlage der meisten dieser Transfers scheint jedoch eine zweiteilige *N*-terminale Signalsequenz, bestehend aus einem Signalpeptid und einem Transitpeptid, zu sein, die in verschiedenen Kompartimenten der Organelle modifiziert und letztendlich posttranslational abgespalten wird (Soll und Schleiff 2004; Sheiner und Striepen 2013; Lang et al. 1998).

Die parasitophore Vakuole

Während der asexuellen Stadien im Innern der Hepatozyten und Erythrozyten des Wirtsorganismus erfolgt die parasitäre Entwicklung innerhalb der sogenannten parasitophoren Vakuole (PV) (Lingelbach und Joiner 1998). Das Wachstum in diesem hochspezialisierten Kompartiment ermöglicht einerseits eine ausreichende Interaktion mit der infizierten Wirtszelle und bietet zugleich Schutz vor intrazellulären Abwehrmechanismen (Kumar und Valdivia 2009; van Dijk et al. 2005). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass bei einer fehlerhaften oder gar ausbleibenden Entwicklung der PV eine rasche Apoptose der infizierten Hepatozyten induziert werden kann (van Dijk et al. 2005). Zusätzlich ist anzunehmen, dass die Membran der PV (PVM) die intraerythrozytären Parasiten vor Schädigungen durch freie Radikale schützt (Cimen 2008). Weiterhin ist die parasitophore Vakuole an dem Remodelling der Wirtszelle, der

Nahrungsaufnahme sowie der Abfallbeseitigung der Parasiten beteiligt (Spielmann et al. 2012).

Gemäß dem aktuellen Forschungsstand besteht die etwa 30 - 33 μm^2 große PVM am Anfang ihrer Entwicklung nahezu vollständig aus den Phospholipiden der penetrierten Wirtsmembran und wird im Zug der parasitären Entwicklung durch plasmodieneigene Lipide gemäß den Ansprüchen der Apicoplasten ergänzt und modifiziert (Lingelbach und Joiner 1998; Ward et al. 1993; Pouvelle et al. 1994; Matz et al. 2020; Mikkelsen et al. 1988). Weiterhin ist ein selektiver Einbau von Erythrozytenproteinen zu beobachten, welche am ehesten im Zusammenhang mit speziellen Lipid rafts der Zellmembran der roten Blutkörperchen steht (Murphy et al. 2004). Zusätzlich erfolgt der Einbau parasitenspezifischer Proteine, die beispielsweise der Nahrungsaufnahme der Plasmodien dienen (Matz et al. 2020; Baumeister et al. 2006). Über die genaue Proteinzusammensetzung der PVM ist bisher nur wenig bekannt (Schnider et al. 2018).

1.1.4 Symptome und Krankheitsverläufe

Die Inkubationszeit beträgt erregerabhängig zumeist zwischen 7 und 14 Tagen, bei *P. malariae* allerdings werden die initialen Symptome oftmals erst nach 4 - 5 Wochen beschrieben. Auch andere Faktoren, wie beispielsweise eine Chemoprophylaxe, können den Ausbruch der Erkrankung verzögern (Walker et al. 2010).

Nach einem etwa einwöchigen, grippeartigen Prodromalstadium mit remittierendem aber unregelmäßigem Fieber entwickelt sich die typische Symptomatik mit rhythmischen Fieberattacken bis 40,5° C. Diese beginnen in der Regel mit einem einstündigen, starken Schüttelfrost, gefolgt von 2 - 6 h hohem Fieber. Im Anschluss an diese Episode ist der Patient bis zum erneuten Temperaturanstieg in den Frühphasen der Erkrankung subjektiv häufig beschwerdefrei. Eine Ausnahme bildet hierbei die *Malaria tropica*. Durch die asynchrone Entwicklung der Parasiten (*P. falciparum*) leiden die Patienten an einem unspezifischen, stetig hohen Fieber, weshalb die Diagnose oftmals nur verzögert oder gar nicht gestellt und so der tödliche Verlauf dieser Erkrankung begünstigt wird (Walker et al. 2018). Zusätzlich finden sich etwa in 4% der Fälle Mischinfektionen mit *P. vivax* und *P. falciparum* oder Mehrfachinfektionen mit demselben Erreger, wodurch die Synchronizität ebenfalls durchbrochen und so die Diagnostik ebenfalls erschwert wird. Obwohl die durch *P. falciparum* ausgelöste *Malaria tropica* nur etwa 15% der beschriebenen Malariafälle ausmacht, bedingt sie dennoch den größten Teil der schwerwiegenden Verläufe und Todesfälle (WHO 2022b).

Ursächlich hierfür scheinen unter anderem die Ausbildung sogenannter *Knobs* an der Oberfläche infizierter Erythrozyten (vgl. ICAM1, VCAM1 in 1.2.5), welche die Aggregation und Anlagerung der roten Blutkörperchen ans Gefäßendothel ermöglichen. Dadurch kommt es zu Mikrozirkulationsstörungen in Gehirn und Herz sowie zu massiven intravasalen Hämolyse. Letztere bedingen eine Hämoglobinurie mit akutem Nierenversagen, welche häufig zum Tod des Betroffenen führt. Des Weiteren finden sich in vielen Fällen eine ausgeprägte Splenomegalie sowie eine Entzündung der Leber mit Ausbildung eines skleralen und kutanen Ikterus. Betreffen die Mikrozirkulationsstörungen den Darm, so können durch die dadurch entstehende Schädigung der Schleimhaut Bakterien aus dem Lumen in den interstitiellen Bauchraum eindringen und so eine Peritonitis bis hin zur schweren Sepsis auslösen. Die Translokation der Darmbakterien kann in einigen Fällen auch eine gravierende Pneumonie induzieren. Unbehandelt verlaufen diese schweren Erkrankungsformen meist tödlich.

Die weniger schweren Krankheitsverläufe der *Malaria tropica* können sich über Wochen und Monate hinziehen. Eine spontane Ausheilung ist durchschnittlich nach etwa einem Jahr zu erwarten.

In Endemiegebieten konnte die Bildung zeitweiser humoraler und zellulärer Immunitätsmechanismen in Abhängigkeit von der Häufigkeit der Infektion beobachtet werden. Dieser Umstand vermag zu erklären, warum insbesondere Säuglinge nach Verlust des maternalen Nestschutzes und Kleinkinder an den schwersten Ausprägungen der Malaria leiden.

Abgesehen von diesen erworbenen Abwehrmechanismen bewirken auch bestimmte genetische Dispositionen Schutz gegenüber der Erkrankung. Einige Beispiele hierfür sind die Sichelzellanämie, die, wie auch der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel Infektionen mit *P. falciparum* verhindern kann. Das Fehlen der Duffy Blutgruppenantigene wiederum bedingt eine Resistenz gegenüber *P. vivax* (White et al. 2014).

1.1.5 Diagnostik

Besteht bei Reiserückkehrern aus Malariagebieten aufgrund rezidivierender Fieberschübe der Verdacht einer Plasmodieninfektion, sollte schnellstmöglich eine diagnostische Abklärung erfolgen (Suerbaum et al. 2012).

Laborchemisch zeigen sich lediglich unspezifische Veränderungen wie eine Leukopenie mit relativer Monozytose sowie eine Erhöhung der Entzündungs- und Leberwerte (Hof

und Dörries 2009).

Der Erregernachweis und dadurch die eindeutige Diagnosestellung gelingen am besten mithilfe einer mikroskopischen Analyse von Blutaussstrichen. Hierzu kann entweder ein, nach Giemsa gefärbter Methanol-fixierter Blutaussstrich oder ein „dicker Tropfen“ genutzt werden. Letzterer eignet sich insbesondere für den Nachweis des Erregers bei niedriger Parasitämie wie beispielsweise bei Semiimmunität oder bereits begonnener Behandlung. Anhand der unterschiedlichen Morphologie der befallenen Erythrozyten lässt sich im Zuge dieser Analyse auch die Art des zugrundeliegenden Erregers bestimmen. Die Blutuntersuchung sollte bei *Malaria tertiana* und *quartana* vor dem nächsten Fieberschub erfolgen, wohingegen der Zeitpunkt der Blutentnahme bei *Malaria tropica* aufgrund der asynchronen Entwicklung keine Rolle spielt. Zusätzlich kann Letztere über einen *P. falciparum*-Antigen-Schnelltest diagnostiziert werden. Diese Nachweismethode ist der Mikroskopie in Sensitivität und Spezifität nahezu ebenbürtig, erlaubt jedoch keine Aussage über die Parasitämie und den Erfolg der Therapie. Die Mikroskopie ist daher noch immer als Goldstandard der Malariadiagnostik anzusehen (Hof und Dörries 2009; Suerbaum et al. 2012; Neumeister et al. 2009; WHO 2019).

Zum Nachweis chronischer Infektionen, wie unter anderem dem tropischen Splenomegaliesyndrom, sind am ehesten serologischen Methoden wie beispielsweise eine indirekte Immunfluoreszenz, EIA oder DNA-Sonden geeignet. Aufgrund des langsamen Anstiegs der Antikörper können diese Analysen nicht zur Untersuchung einer akuten Infektion genutzt werden (Suerbaum et al. 2012; Neumeister et al. 2009).

1.1.6 Therapie

Ziel der Antimalaria-Therapie ist es, sowohl die Ausheilung des symptomverursachenden asexuellen Blutstadiums zu erreichen, als auch die eventuell in der Leber verbleibenden Hyponozoiten zu eliminieren. Darüber hinaus soll auch die Transmission der Plasmodien verhindert werden (Cowman et al. 2016).

Vor Beginn der medikamentösen Therapie der Malaria müssen zunächst der auslösende Erreger sowie der bestehende Schweregrad gemäß WHO eruiert werden (AWMF S1-Leitlinie 2021; WHO 2015, 2022c). Bei Vorliegen einer *Malaria tropica* sowie einer Knowlesi-Malaria ist ein stationäres Vorgehen angeraten, wohingegen komplikationslose Fälle einer *Malaria quartana* oder *tertiana* ambulant behandelt werden können (AWMF S1-Leitlinie 2021; Walker et al. 2018). Auch differiert die zu verabreichende Medikation

abhängig von Erregertypus und Erkrankungsschwere (WHO 2015; Walker et al. 2018; AWMF S1-Leitlinie 2021; WHO 2022c).

Zur Behandlung einer unkomplizierten *Malaria tropica* wie auch der Knowlesi-Malaria ist gemäß den aktuellen Empfehlungen eine orale Artemisinin-basierte Kombinationstherapie mit Artemether/Lumefantrin (Riamet®) oder Dihydroartemisinin/Piperaquin (Eurartesim®) oder aber eine Therapie mit Atovaquon/Proguanil (Malarone® oder Generika) angeraten. Die einzelnen Wirkstoffe sind hierbei als gleichwertig anzusehen (AWMF S1-Leitlinie 2021; WHO 2015; Cowman et al. 2016; Walker et al. 2010; Burns 2008; WHO 2022c). Bei relativ hoher Parasitämie (z. B. >2 % bei *P. falciparum*) sind die Artemisinin-Derivate aufgrund des rascheren Wirkeintritts vorzuziehen (AWMF S1-Leitlinie 2021). Durch diese nebenwirkungsarme Medikation können mehr als 90 % der Betroffenen geheilt werden (White et al. 2014; Adjuik et al. 2004).

Eine komplizierte *Malaria tropica* oder komplizierte Knowlesi-Malaria sollte zunächst über 72 h intravenös mit Artesunat behandelt werden (Herold 2022; WHO 2015; Walker et al. 2010; WHO 2022c). Nach Abschluss der parenteralen Therapie muss darüber hinaus eine orale Medikation analog zu der oben aufgeführten Therapie der unkomplizierten Malaria erfolgen, um ein Rezidiv zu vermeiden (Walker et al. 2010, 2018; AWMF S1-Leitlinie 2021). Sollte Artesunat nicht verfügbar sein, kann alternativ Chinin über 3 Tage intravenös verabreicht werden. Als orale Folgemedikation sollte anschließend Doxycyclin verordnet werden (AWMF S1-Leitlinie 2021). Obwohl Artesunat die Mortalität in höherem Maße zu senken vermag als Chinin, sollte die Gabe der Initialdosis nicht durch das Warten auf das Artemisinin-Derivat verzögert werden, um weitere Komplikationen zu vermeiden (White et al. 2014; Sinclair et al. 2012).

Während die *Malaria quartana* in den meisten Fällen noch immer erfolgreich durch die Gabe von Chloroquin (Resochin®) behandelt werden kann, wird dieser Wirkstoff aufgrund der zunehmenden Resistenzentwicklung nur noch in Ausnahmefällen zur Medikation der *Malaria tertiana* genutzt (Walker et al. 2018; Cowman et al. 2016; AWMF S1-Leitlinie 2021). Als neue First-line-Therapie der *Malaria tertiana* stehen aktuell Atovaquon/Proguanil (Malarone® oder Generika) sowie Artemether/Lumefantrin (Riamet®) zur Verfügung (Herold 2022; WHO 2015, 2022c). Bei Infektionen mit *P. vivax* oder *P. ovale* sollte eine Anschlussbehandlung mit Primaquin erfolgen, um so die in der Leber überdauernden Hypnozoiten zu eradizieren

und Rezidive zu vermeiden (WHO 2015; AWMF S1-Leitlinie 2021; WHO 2022c). Da dieses Pharmazeutikum bei Vorliegen eines Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangels schwere Hämolyisen verursachen kann, sollte dieser durch eine Enzymbestimmung vor der Verabreichung zunächst ausgeschlossen werden (AWMF S1-Leitlinie 2021; Walker et al. 2018).

Des Weiteren ist bei allen Erkrankungsverläufen auf eine adäquate Flüssigkeitssubstitution und adaptierte Blutzuckertherapie zu achten. Auch sollte die Indikation zur Hämofiltration bzw. Hämodialyse großzügig und möglichst frühzeitig gestellt werden (White et al. 2014; Walker et al. 2010; WHO 2015, 2022c).

1.1.7 Resistenzen und Entwicklung neuer Medikamente

Durch umfassende Präventionsmaßnahmen und die verbesserte Verfügbarkeit einer adäquaten Medikation konnte in den letzten Jahren ein deutlicher Rückgang der Malariafälle erreicht werden. Weiterhin zeigten sich auch die Morbidität und Mortalität tendenziell rückläufig (WHO 2019). Doch die immer häufiger auftretenden Resistenzen gegen die gängigen Antiparasitika drohen diese Entwicklung langfristig zu unterminieren oder gar umzukehren (Pradines et al. 2010). Im Nachfolgenden werden exemplarisch einige der wichtigsten Resistenzen aufgeführt.

Insbesondere der südasiatische Raum gilt als Epizentrum der Resistenzentwicklung gegenüber den wichtigsten Antimalaria-Medikamenten (Duru et al. 2016; Dwivedi et al. 2016). So wurde im Bereich der kambodschanisch-thailändischen Grenze bereits 1957 erstmals eine verminderte Wirksamkeit gegen das damals gebräuchliche Chloroquin beschrieben (EYLES et al. 1963; Harinasuta et al. 1965). Bereits wenige Jahre später wurde dort gleichfalls ein Wirksamkeitsverlust des Breitspektrum-Antiparasitikums Pyrimethimin gegenüber *P. falciparum* beobachtet (Wongsrichanalai et al. 2002; PETERS 1970). Auch die Resistenz *P.falciparums* gegen Mefloquin konnte in den 1990er Jahren erstmals in diesen Gebieten detektiert werden (Dwivedi et al. 2016).

Es ist anzunehmen, dass die unter anderem in Afrika aufgetretenen Resistenzen ursächlich auf die beschriebenen evolutionären Entwicklungen in Südostasien zurückzuführen sind (Mita et al. 2009; White et al. 2014). *P. falciparum* gilt mittlerweile nahezu weltweit als resistent gegen Chloroquin und Pyrimethamin (Walker et al. 2018). Auch *P. vivax* zeigt vermehrt Resistenzen gegen Chloroquin (WHO 2019; White et al. 2014; Douglas et al. 2010).

Als Reaktion auf die sich zunehmend ausbreitenden Resistenzen gegen die bis dato üblichen Therapieregime, sah sich die WHO im Jahr 2001 dazu veranlasst, erstmals die Medikamentengruppe der Artemisinine (ART) als First-Line-Therapie zu empfehlen (WHO 2001). Galt diese Empfehlung zunächst nur für Gebiete, in denen zunehmend Resistenzen gegen Monotherapien mit Chloroquine, Sulfadoxine-pyrimethamine sowie Amodiaquine beobachtet werden konnten, so weitete die Weltgesundheitsorganisation diese 2006 auf die gesamte Welt aus. Auch verwies letztere Veröffentlichung aus Gründen der Resistenzvermeidung darauf, ART möglichst in Kombination mit anderen Wirkstoffen zu verwenden (Duru et al. 2016; Lin et al. 2010; Trape et al. 1998; WHO 2006).

Bedauerlicherweise konnte zuletzt auch eine beginnende Resistenzentwicklung von *P. falciparum* gegen diese Wirkstoffklasse aufgezeigt werden (Dwivedi et al. 2016; WHO 2014, 2018b), welche sich ausgehend von Kambodscha über West-Thailand, Myanmar, China sowie Vietnam bis nach Afrika und Lateinamerika verbreitet zu haben scheint (Fairhurst und Dondorp 2016; WHO 2018b).

Die WHO charakterisiert eine Artemisinin-Resistenz als verzögerte Parasiten Clearance im Blut (WHO 2014, 2018b). Zu beachten ist jedoch, dass es sich hierbei lediglich um eine Partialresistenz gegenüber diesem Wirkstoff handelt und in den meisten Fällen dennoch eine Heilung der Erkrankung erreicht werden kann (WHO 2018b, 2014).

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mutationen im Bereich des Gens PF3D7_1343700, welches ein Kelch13-(K13)-Protein codiert, als ursächlich für die Widerstandsfähigkeit anzusehen sind (Cowman et al. 2016; Fairhurst und Dondorp 2016; Leelawong et al. 2019; Fairhurst 2015; Dwivedi et al. 2016).

Die verzögerte Elimination bedingt, dass die überlebende Population nahezu ausschließlich dem weniger effektiven, aber länger wirkenden zweiten Arzneimittel der Kombinationstherapie ausgesetzt ist, was wiederum das Aufkommen weiterer Immunitäten gegen Letzteren fördert (Fairhurst 2015; WHO 2018b). Die Resistenzentwicklung gegen beide Komponenten der ACT ist maßgeblich für das Versagen dieses Therapieregimes verantwortlich (White et al. 2014).

Aufgrund der zunehmend besorgniserregenden Ausbreitung resistenter Plasmodien-Stämme, gilt es, schnellstmöglich alternative Arzneimittel zur Vorbeugung und Behandlung der Malaria zu entwickeln (Cowman et al. 2016).

Durch ein Hochdurchsatz-Screening konnten initial 13533 potenzielle antiparasitär

wirkende Substanzen eruiert werden, von denen mehr als 8000 auch eine Aktivität gegen Multi-drug-resistente Erreger aufwiesen (Gamo et al. 2010). Diese, als „Tres Cantos antimalaria compound set“ bekannte Übersicht ist frei zugänglich und diente vielen Entwicklungsstudien als Ausgangspunkt (Spangenberg et al. 2013). Auf einige der neu entdeckten, möglichen Arzneistoffe soll im Nachfolgenden näher eingegangen werden.

Bei der Suche nach neuen Wirkmechanismen und eventuellen „drug targets“ wurden mehrere Stoffklassen detektiert, die eine Hemmung der membranständigen P-Typ ATPase *P. falciparum*s (PfATP4) initiieren. Während der Nutzen der so identifizierten Dihydroisochinolone ([+]-SJ733) gegen resistente Parasiten bereits widerlegt werden konnte, zeigen die Pyrazoleamide und insbesondere die Spiroindolone vielversprechende Ergebnisse (Jiménez-Díaz et al. 2014; Crawford et al. 2017; Vaidya et al.; Rottmann et al. 2010; Turner 2016). Hierbei ist unter anderem das in der klinischen Erprobung befindliche Spiroindolon Cipargamin als neuer Hoffnungsträger zu nennen (Turner 2016).

Während die im Vorangegangenen beschriebenen neuen Wirkstoffe lediglich gegen das Blutstadium des Erregers wirksam zu sein scheinen, konnte bei einigen Substanzen eine zusätzliche Aktivität gegenüber anderen Entwicklungsstufen der Parasiten detektiert werden (Cowman et al. 2016).

Hierzu gehört beispielsweise das als DDD107498 bekannte 2,6-disubstituierte Chinolon-4-Carboxamid, welches mit dem Translations-Elongations-Faktor 2 (eEF2) der Parasiten interagiert und vermutlich über einen hemmenden Effekt auf mehrere Etappen des parasitären Lebenszyklus verfügt (Baragaña et al. 2015).

In diesem Zusammenhang ist außerdem das Imidazopyrazin KAF156 zu nennen, welches zum einen gegen die im Blut zirkulierenden Plasmodien eingesetzt werden kann, sowie, darüber hinaus auch gegen das Leberstadium der Malaria Wirkung zeigt und einen Transmissionsstopp zu bedingen vermag (McNamara et al. 2013; Kuhen et al. 2014). Der Hemmer der Phosphatidylinositol-4-OH Kinase (PI4K) soll zusätzlich auch zur Chemoprophylaxe genutzt werden können (Kuchen et al. 2014; Koller et al. 2018).

Neben den bereits genannten potenziellen Arzneistoffen sind momentan noch zahlreiche weitere Substanzen wie beispielsweise Hemmer der Dihydroorotat-Dehydrogenase (Sulyok et al. 2017; Phillips et al. 2015) oder Ozonide (Phyo et al. 2016) in der Erprobung (Cowman et al. 2016).

Während sich der größte Teil der gegenwärtigen Antimalaria-Forschung auf *P. falciparum* fokussiert, sollte die Gefahr der Resistenzentwicklung bei anderen Erregerstämmen nicht außer Acht gelassen werden. Umso erfreulicher ist, dass durch die Weiterentwicklung des Primaquins mit Tafenoquin ein neuer Wirkstoff gegen die hypnozoiten Formen von *P. vivax* und *P. ovale* entwickelt und zugelassen werden konnte (Baird 2018; Llanos-Cuentas et al. 2014).

1.1.8 Expositions- und Chemoprophylaxe

Bei Reisen in Endemiegebiete mit hohem Übertragungspotential, insbesondere nach Subsahara-Afrika und in einige Gebiete Südostasiens und Südamerikas, ist eine Chemoprophylaxe angeraten, da so das Erkrankungsrisiko deutlich reduziert werden kann (DTG 2018; White et al. 2014; Steinhardt et al. 2011).

In Gebieten mit mittlerem oder geringem Malariarisiko kann von einer prophylaktischen Einnahme abgesehen werden. Hier empfiehlt sich jedoch das Mitführen einer „Stand-by“-Medikation zur „notfallmäßigen Selbstbehandlung“ bei plötzlich auftretendem hohem Fieber oder anderen malariaverdächtigen Symptomen und der fehlenden Erreichbarkeit eines Arztes innerhalb von 24 h (RKI-Ratgeber 2018).

Atovaquon/Proguanil kann sowohl zur Prophylaxe als auch zur „notfallmäßigen Selbstmedikation“ genutzt werden. Alternativ ist eine Prophylaxe mit Doxycyclin möglich. Artemether/Lumefantrin eignet sich aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit nicht zur Vorbeugung der Erkrankung, kann aber als Reservemedikation mitgeführt werden (DTG 2018; RKI-Ratgeber 2018; Herold 2022).

Mefloquin und Chloroquin werden aufgrund der bestehenden Resistenzen und des ungünstigen Nebenwirkungsprofils nur noch in Ausnahmefällen eingesetzt (Herold 2022; DTG 2018).

Informationen bezüglich des Übertragungsrisikos können auf den Internetseiten der WHO, des Robert-Koch-Instituts, der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit e. V. oder des CDCs eingeholt werden.

Darüber hinaus sollte sorgfältig auf einen Mückenschutz geachtet werden, um das Risiko einer Ansteckung zu minimieren (Herold 2022; CDC 2019).

Da die Anophelesmücke insbesondere in den Phasen der Dämmerung und nachts aktiv ist, sollte der Aufenthalt im Freien in diesen Zeitspannen nach Möglichkeit vermieden werden.

Zusätzlich sollten mit Insektenschutzmitteln imprägnierte Moskitonetze und Fliegengitter

genutzt werden (RKI-Ratgeber 2018; WHO 2018a). Auch sollte die Kleidung entsprechend gewählt werden. Insbesondere langärmelige Blusen/Hemden, lange Hosen und Socken sind zu empfehlen. Zusätzlich sollte auf den regelmäßigen Gebrauch von insektenabweisenden Repellents mit den Wirkstoffen DEET oder Icaridin geachtet werden (WHO 2018a, 2015; Herold 2022; Hof und Dörries 2009).

1.1.9 Impfstoffe

Mit dem Impfstoff RTS,S/AS01 der Firma GSK steht nun erstmals ein Impfstoff gegen *P. falciparum* zur Verfügung. Mosquirix® ist ein monovalenter rekombinanter Protein-Impfstoff, bestehend aus Regionen des *P. falciparum* Circumsporozoite protein (CPS), kovalent gebunden an ein Oberflächen-Antigen des Hepatitis-B-Virus und funktionell verstärkt durch das Adjuvants AS01 (Syed 2022; WHO 2022a). Die Impfung induziert die Aktivierung sowohl der humoralen (R-Region) als auch der zellulären Immunantwort (T-Region). Durch die so erzielte Wirkung gegen die prä-erythrozytären Sporozoite, beeinflusst der Impfstoff sowohl die Invasion als auch die Reifung und Vermehrung der Parasiten in der Leber des Menschen (Syed 2022; Laurens 2020; Kazmin et al. 2017).

Der Impfstoff zeigte sich einer saisonalen Malaria-Chemoprophylaxe (SMC) bei Kindern als nicht unterlegen (Chandramohan et al. 2021; RTS 2015). So ist das Vakzin in der Lage, Malaria Episoden um 40% zu reduzieren, die Hospitalisierung schwerer Malaria Fälle konnte um 30% gesenkt werden (Syed 2022; Chandramohan et al. 2020) .

Die WHO empfiehlt die Impfung für Kinder in Regionen mit moderatem bis hohem Transmissionsrisiko ab dem Alter von 5 Monaten (WHO 2022a).

Zwei weitere Impfstoffkandidaten befinden sich aktuell in den Spätphasen der klinischen Studien: R21/MatrixM welcher sich gegen das Pf-CSP-Protein richtet (Datoo et al. 2021) sowie ein Impfstoff aus attenuierten Sporozoiten PfSPZ (Butler 2019).

1.2 GPI-Anker

1.2.1 Allgemeines

Nach aktuellem Stand der Forschung werden ca. 1 % aller im eukaryotischen Genom codierten Proteine bzw. 10 – 20 % aller Membranproteine, die den sekretorischen Weg durchlaufen, im ER kovalent und irreversibel an einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker, kurz GPI, gebunden (Orlean und Menon 2007). Diese Art der Membran-Verankerung findet sich nahezu ubiquitär in Eukaryoten und Archeen, nicht jedoch in Bakterien. So konnten mittlerweile, nach der ursprünglichen Entdeckung der GPI

gebundene Proteine in protozoären Parasiten wie Toxoplasmen, Plasmodien und Leishmanien, diese auch in höheren Eukaryoten nachgewiesen werden. Sie finden sich sowohl in Hefen als auch in Säugetieren, Insekten und Fischen (rat-brain-Thy1, Torpedofisch, humane Erythrocytenacetylcholinesterase) (Eckert et al. 1996; Shams-Eldin et al. 2009; Mehler et al. 1993; Homans et al. 1988). Darüber hinaus können GPIs auch in Archaeobakterien (Kobayashi et al. 1997) und Pflanzen (Talos et al. 1997) sowie in Herpes-Viren und Prion-Proteinen gefunden werden (Shams-Eldin et al. 2009).

Obwohl die Existenz eines solchen Anker-Moleküls bereits in den frühen Sechzigerjahren postuliert wurde, ermöglichte erst die Entdeckung der bakteriellen PI-Phospholipase-C die eigentliche Erforschung dieser Strukturen (Shams-Eldin et al. 2009; SLEIN und LOGAN, JR 1963).

Durch die Behandlung von GPI-Proteinen mit diesem Enzym, verlieren diese ihren amphipatischen Charakter und lassen sich anschließend nach der Phasentrennung durch die Veränderung ihrer Löslichkeit und den dadurch bedingten Wechsel in der hydrophilen Phase aufspüren und durch weitere Enzym-Assays und spektrometrische Analysen untersuchen (Eckert et al. 1996; Low und Finean 1977).

In den nächsten Jahren konnten zunehmend Informationen über die einzelnen Bestandteile und die Zusammensetzung der GPIs gesammelt werden (Boothroyd et al. 1981; Holder 1985).

Eine Erstbeschreibung der kompletten Kernstruktur gelang in den späten Achtzigerjahren des vergangenen Jahrhunderts (Ferguson et al. 1988; Homans et al. 1988). Hierbei konnte gezeigt werden, dass jedes GPI-Molekül eine über die Artengrenze hinaus konservierte Kernstruktur, bestehend aus Inositol (meist myo-inositol, cis 1,2,3,5 trans 4,6 cyclohexanhexol), Ethanolamin, Mannose und einem Nicht-acylierten Glucosamin, besitzt, welche mit einem Lipidanteil zu *Ethanolamin-6Manα1-2Manα1-6Manα1-4GlcN1-6inositolphosphat-lipid* verbunden wird (Englund 1993). Der hydrophobe Rest kann hierbei aus Diacyl-glycerol, Alkyl/Acyl-glycerol, Monoacyl-glycerol und/oder Ceramiden bestehen (Eckert et al. 1996).

Im Zuge der mittlerweile jahrzehntelangen Erforschung dieser besonderen Moleküle wurde zunehmend auch ihre entscheidende Rolle für Entwicklung, Wachstum und Gesundheit ersichtlich. Eine fehlerhafte GPI-Synthese bedingt beispielsweise bei Mäusen bereits im Embryonalstadium den Tod (Nozaki et al. 1999). Auch zahlreiche Erkrankungen des Menschen können auf eine Störung des GPI-Stoffwechsels zurückgeführt werden (vgl. 1.2.6). Das Spektrum reicht hierbei von einer erhöhten

Thromboseneigung, Ikterus (Almeida et al. 2006) und paroxsymaler nächtlicher Hämoglobinurie (Inoue et al. 2003; Carothers et al. 1990) bis hin zu Alzheimer und schweren Prionenerkrankungen (Shams-Eldin et al. 2009; Cashman et al. 1990).

1.2.2 Biosynthese

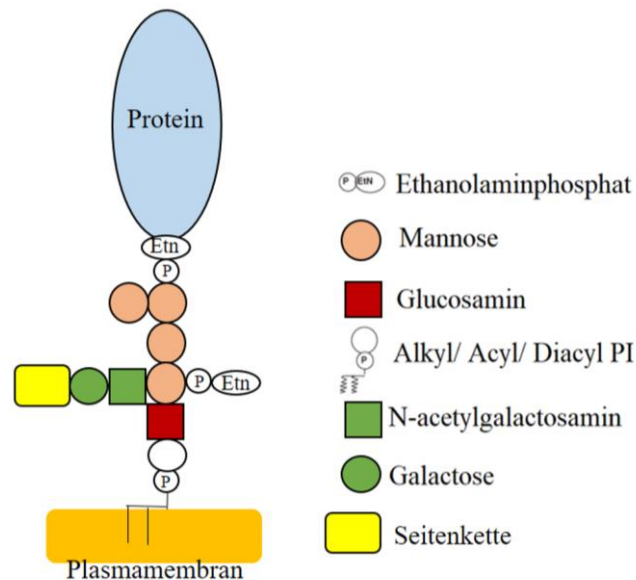


Abb. 2 Struktureller Aufbau eines GPI-verankerten Proteins modifiziert nach (Kinoshita 2014a)

Die Biosynthese der GPI-Anker umfasst 10 Schritte und 17 Gene, die im Nachfolgenden genauer betrachtet werden sollen (vgl. Tab1). Die hierbei entstehende Kernstruktur ist evolutionär konserviert und findet sich sowohl bei Eukaryoten als auch bei Protozoen (Englund 1993). Die dennoch zu beobachtenden strukturellen Unterschiede zwischen verschiedenen Lebensformen sind in den meisten Fällen durch Modifikationen der angefügten Seitenketten sowie des Lipidanteils zu erklären (Zinecker et al. 1997; McConville und Ferguson 1993; Moran 1994).

Gen	Funktion	Beschrieben in
PIG A	GlcNAc-PI-Transferase	(Miyata et al. 1993; Inoue et al. 1996; Kamitani et al. 1993; Watanabe et al. 1998; Kinoshita 2014a; Watanabe et al. 2000; Murakami et al. 2005)
PIG C		
PIG H		
PIG Q		
PIG P		
PIG Y		

PIG L	GlcNAc-PI Deacetylase	(Nakamura et al. 1997)
PIG W	GlcN-PI-Acyltransferase	(Murakami et al. 2003)
PIG M PIG X	GPI- α 1,4-Mannosyl- Transferase I	(Maeda et al. 2001; Ashida et al. 2005)
PIG N	Ethanolamin-P-Transferase	(Hong et al. 1999)
PIG V	GPI- α 1,6 Mannosyl- Transferase II	(Kang et al. 2005)
PIG B	GPI- α 1,6 Mannosyl- Transferase III	(Takahashi et al. 1996)
hSMP3	GPI- α 1,6 Mannosyl- Transferase IV	(Taron et al. 2004)
PIG O	Ethanolamin-P-Transferase (GPI-EtN-P-T3)	(Hong et al. 2000)
PIG F hGPI7	Ethanolamin-P-Transferase (GPI-EtN-P-T2)	(Shishioh et al. 2005; Hong et al. 2000; Inoue et al. 1993)

Tab.1 Übersicht über Gene der GPI-Biosynthese. Es werden hier nur beispielhaft die Gene der mammalen GPI-Synthese aufgezeigt (Shams-Eldin et al. 2009; Kinoshita 2014a).

Die initiale Synthese der GPI-Kernstruktur findet an der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums statt (Abeijon und Hirschberg 1992; Tiede et al. 2000). In einem ersten Schritt wird mithilfe der *GlcNAc-PI-Transferase*, bestehend aus 6 Protein-Untereinheiten, N-acetylglucosamin-phosphatidylinositol (GlcNAc-PI) aus UDP-GlcNAc und PI gebildet (Doering et al. 1989; Masterson et al. 1990; Stevens und Raetz 1991; Watanabe et al. 1998).

Durch die Modifikation der SH-Gruppen wie beispielsweise durch N-ethylmaleimid kann dieser Schritt irreversibel blockiert werden, denn durch eine Veränderung des Cystein im aktiven Zentrum verliert selbiges seine Funktionalität (Macedo et al. 2003; Milne et al. 1992)

Anschließend erfolgt die Deacetylierung des GlcNAc-PI zu GlcN-PI. Katalysiert wird diese Reaktion durch die *N-acetylglucosaminyl-PI-de-N-acetylase* (Hirose et al. 1991;

Stevens 1993). Das hierbei entstehende nicht-acetylierte Glucosamin ist spezifisch für die GPI-Biosynthese (Doering et al. 1989; Gerold et al. 1996; Stevens und Raetz 1991). In zahlreichen Versuchen konnte gezeigt werden, dass dieser Schritt durch Substratanaloga verhindert werden kann. So lässt sich unter anderem das Enzym verschiedener Plasmodienspezies gezielt durch GalNCoNH₂-PI inhibieren (Smith et al. 2002).

Im Anschluss an die De-N-Acetylierung erfolgt der Transfer des GPI-Anker-Vorläufers in das ER-Lumen. Aufgrund der hohen energetischen Anforderungen dieses Reaktionsschrittes (20 -50 kcal) ist anzunehmen, dass dieser durch eine Flippase enzymatisch katalysiert wird (Pomorski und Menon 2006). Als ein möglicher Mediator konnte die *ER-phospholipid-flippase* identifiziert werden, die sowohl GlcNAc-PI als auch GlcAc-PI bidirektional und ATP-unabhängig zu transferieren vermag (Vishwakarma und Menon 2005).

Der dritte Schritt der betrachteten Biosynthese umfasst die Acylierung des Inositols an Position 2. Diese unterscheidet sich in diversen Organismen. So dient in der Hefe *S. cerevisiae* acyl-CoA als einziges Substrat (Costello und Orlean 1992), während in Säugerzellen sowohl ein Acyl-CoA-abhängiger als auch -unabhängiger Stoffwechselweg beschrieben wurde (Doerrler et al. 1996; Shimoi et al. 2002). Auch der Zeitpunkt differiert. So wird der Acyl-Rest mithilfe der *Acyltransferase* in den meisten Fällen vor der Addition der ersten Mannose angefügt, wohingegen bei *T. brucei* zuerst die Mannosylierung stattfindet.

Auch in Bezug auf die Hemmung dieses Schrittes lassen sich Unterschiede feststellen. So kann bei *T. brucei* ein Serin-Esterase-Hemmer genutzt werden, wohingegen das Säugerenzym durch ein Sulfhydryl-alkylierendes Agens blockiert wird (Shams-Eldin et al. 2009; Macedo et al. 2003).

Die folgenden Schritte umfassen die Addition der Mannosereste und deren Modifikationen.

Zunächst wird Man₁ von einer Dolicholphosphomannose (Dol-P-Man) mittels *GPI- α 1,4-mannosyltransferase I* auf Glc-N-acly-PI transferiert (Menon et al. 1990; Smith et al. 1996; Masterson et al. 1990). Die hierzu benötigte Dol-P-Man wird aus Dolicholphosphat und GDP-Mannose durch die *Dol-P-mannose-Synthetase* gebildet (DeGasperi et al. 1990). Das Antibiotikum Amphomycin bildet in Anwesenheit von Ca²⁺ einen Komplex mit Dol-P und verhindert so dessen Interaktion mit der beschriebenen Synthetase. Diese

Methode wie auch die im Vorangegangenen aufgeführten Inhibitionsmechanismen ermöglichen es, die Biosynthese der Kernstruktur zu unterbrechen und die anfallenden Intermediate zu analysieren (Menon et al. 1990).

Im Folgenden wird das so entstandene Man-GlcN-acyl-PI um eine Phosphoethanolamin-(EtN-P)-Seitenkette ergänzt. Für die durch das Enzym *Ethanolamin-P-transferase GPI-EtN-P-T1* vermittelte Reaktion dient Phosphatidylethanolamin als Donor der EtN-P-Gruppe (Menon und Stevens 1992; Imhof et al. 2000).

Daraufhin wird die 2. Mannose (Man₂) durch die *GPI- α 1,6,mannosyltransferase II* von Dol-P-Man auf die 6. Position der Man₁ transferiert (Kang et al. 2005). Es folgt die Ergänzung des EtN-P-Man-Man-GlcN-acyl-PI um eine dritte Mannose an Position 2 von Man₂, katalysiert durch die *GPI- α 1,2,mannosyltransferase III*.

Im Unterschied zur Biosynthese der GPI-Anker-Precursoren in Säugerzellen, in denen folgender Schritt nur in seltenen Fällen zu beobachten ist, konnte unter anderem in Hefe und *P. falciparum* eine SMP3-abhängige Addition einer vierten Mannose durch die *GPI- α 1,2,mannosyltransferase IV* beschrieben werden (Grimme et al. 2001). In diesen Organismen erfolgen die anschließenden Modifikationen erst nach der Ergänzung von Man₄.

Vermittelt durch die *Ethanolamin-P-transferase-GPI-EtN-P-T3* wird zunächst der 3. Mannoserest an Position 6 um EtN-P ergänzt, bevor auch Man₂ in einem letzten Schritt durch die *Ethanolamin-P-transferase-GPI-EtN-P-T2* um ein Etn-P-Fragment erweitert wird und so die Synthese der Kernstruktur komplettiert (Gabijs 2009; Shams-Eldin et al. 2009; Menon et al. 1993).

Diese hoch konservierte Kernstruktur wird durch die Modifikation bzw. Addition von Seitenketten organismus- und stadienspezifisch verändert. Je nach Spezies und Reaktion findet dieser Prozess vor oder nach der kovalenten Proteinbindung statt (Eckert et al. 1996).

1.2.3 Transamidase Reaktion

Im Anschluss an die Biosynthese der GPI-Kernstruktur erfolgt, ebenfalls im ER, die Übertragung des Ankers *en bloc* auf ein unmittelbar zuvor ins Lumen translatiertes Protein (Wang et al. 1999).

Gen	Funktion	Beschrieben in
PIG K	Transamidase-Komplex	(Nguyen et al. 2017)
GPAA 1		(Eisenhaber et al. 2014)
PIG S		(Ohishi et al. 2001)
PIG T		(Ohishi et al. 2003)
PIG U		(Hong et al. 2003)

Tab.2 Übersicht über Gene der GPI-Transamidase-Reaktion. Es werden hier beispielhaft die Gene der mammalen GPI-Synthese aufgezeigt (Eigene Darstellung nach(Shams-Eldin et al. 2009; Kinoshita 2014a)).

Dieser Schritt wird durch ein membranständiges Enzym, bestehend aus 5 Untereinheiten in einer Transamidase-artigen Reaktion katalysiert (siehe Abb. 3) (Orlean und Menon 2007; Fraering et al. 2001).

Der Komplex ist hierbei in der Lage, spezielle Signalsequenzen im Bereich des C-Terminus des zu verankernden Proteins zu erkennen und zu binden, sodass ein Enzym-Substrat-Protein-Intermediat entsteht, dessen jeweilige Anteile über Thioester-Bindungen gekoppelt sind. Die Amino-Gruppe des terminalen Ethanolamins des Kerns attackiert daraufhin die beschriebene Thioesterbindung und bedingt so im Zuge einer Umamidierung die kovalente Bindung zwischen GPI und Protein (Udenfriend und Kodukula 1995).

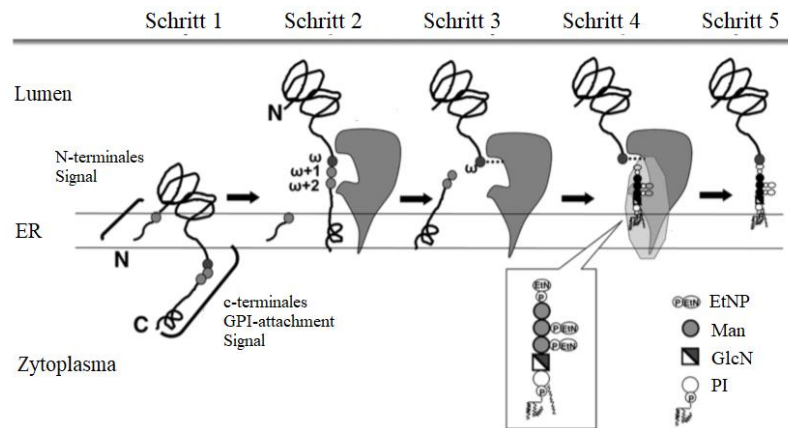


Abb. 3 Ablauf der Transamidase-Reaktion: Schritt 1: Preproprotein mit N-&C-terminalen Signalsequenzen; Schritt 2: Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz und Erkennen der GPI-Attachment-Sequenz durch das Multisubunitenzym; Schritt 3: Spaltung zwischen ω und $\omega+1$ \rightarrow Enzym-Substrat-Protein-Intermediat; Schritt 4: terminale Amino-Gruppe der GPI-Kernstruktur attackiert Thioesterbindung; Schritt 5: GPI und Protein sind kovalent verbunden. (modifiziert nach (Kinoshita 2014b))

1.2.4 GPI-Anheftungs-Signal

Proteine, die mittels GPI-Anker modifiziert werden sollen, werden als Präproprotein ins Lumen des Endoplasmatischen Retikulums translatiert.

Die für die Adressierung ins ER verantwortliche N-terminale Signalsequenz wird unmittelbar nach Eintritt ins Lumen durch eine Signalpeptidase abgespalten (Eckert et al. 1996).

Das verbleibende Propeptid weist ein C-terminales GPI-Attachment-Signal auf, welches eine essenzielle Voraussetzung für die beschriebene Transamidase-Reaktion darstellt (Kinoshita et al. 2008; Eckert et al. 1996).

Über eine hydrophobe Domäne wird das Protein vorübergehend in der ER-Membran verankert. Diese 17 - 31 Aminosäuren lange Verankerung, deren Zusammensetzung je nach Protein variiert, ist gleichfalls essenziell für die Übertragungsreaktion und spielt eine entscheidende Rolle für das Erkennen des Proteins durch den Multisubunitkomplex (Eckert et al. 1996; Cross 1990).

Ihr folgt ein hydrophiles Spacer-Segment mit einer Länge von 6 - 14 Aminosäuren (Furukawa et al. 1997).

Die eigentliche Schnittstelle wird durch die sogenannte ω -Site repräsentiert. In Studien konnte gezeigt werden, dass diese Position durch die folgenden Aminosäuren mit kurzen Seitenketten markiert wird: Glycin, Asparagin, Alanin, Serin, Zystein, Asparaginsäure

(Nuoffer et al. 1993). Es folgt die $\omega+1$ -Site, für welche alle Aminosäuren außer Prolin und Tryptophan beschrieben werden konnten. An der $\omega+2$ -Site finden sich ebenfalls Aminosäuren mit kurzen Seitenketten, insbesondere Glycin, Alanin und Serin (Udenfriend und Kodukula 1995; Gerber et al. 1992).

1.2.5 Modifikationen/Remodeling

Die im Vorangegangenen beschriebene Kernstruktur der GPI-Anker kann durch verschiedene Modifikationen sowohl des Lipid- als auch des Kohlenhydratanteils organismus- und stadienspezifisch umgeformt und angepasst werden. Aufgrund der Vielzahl möglicher Veränderungen sollen im Folgenden lediglich einige dieser Variationen exemplarisch angeführt werden. Hierbei ist nicht nur die Art des Substituenten, sondern auch der Zeitpunkt und die Lokalisation der Reaktion zu beachten.

Remodeling des Lipid-Anteils

Die Vorläufer-Moleküle sowie die reifen GPIs unterscheiden sich in der Regel deutlich in der Zusammensetzung ihrer Lipidanteile. So finden sich in den Perkursoren zumeist ungesättigte Fettsäuren, wohingegen die fertigen, proteingebundenen Anker hauptsächlich gesättigte Fettsäuren (v.a. stearic acid) aufweisen (Maeda et al. 2007). In Hefen sind die Vorläufer beispielsweise v. a. Acyl-basiert, die späteren GPIs aber besitzen häufig ein Ceramid-Inositol-Phosphat als Grundstruktur (Conzelmann et al. 1992; Reggiori et al. 1997). In reifen GPIs der Zelloberfläche konnten darüber hinaus auch Ether- und Ester-gebundene Fettsäuren nachgewiesen werden (Englund 1993).

Das sogenannte Remodeling des Lipidrests beginnt bereits im ER und setzt sich über die einzelnen Schritte des sekretorischen Weges bis an die Zelloberfläche fort. So wird in den meisten Organismen beispielsweise der Inositolring der Kernstruktur noch im ER unmittelbar nach der Transamidasereaktion durch die Entfernung des Acyl-Restes durch PGAP1 deacyliert. Eine Ausnahme bilden hierbei jedoch die humanen Erythrozyten und Plasmodien, in welchen dieser Reaktionsschritt nicht nachgewiesen werden konnte (Pittet und Conzelmann 2007; Shams-Eldin et al. 2009; Kinoshita et al. 2008; Chen et al. 1998; Tanaka et al. 2004). Plasmodien, aber auch verschiedene Säuger weisen darüber hinaus noch weitere Besonderheiten ihrer Lipidmodifikationen im ER auf. So wird unter anderem bei *P. falciparum*, aber auch bei verschiedenen Säugetieren, der Inositolring noch vor der Addition der ersten Mannose des Kernglykans durch das Hinzufügen einer Ester-gebundenen Fettsäure modifiziert (Eckert et al. 1996). Die mannosylierten Vorläufer dieser GPI-Anker werden dadurch insensitiv gegenüber der

(G)PI-PLC. Während die reifen GPI-AP zahlreicher Säuger diese Veränderung des Inositolrings auf dem Weg zur Zelloberfläche wieder zu verlieren scheinen und eine Behandlung mit genanntem Enzym wieder durchführbar wird, ist auch bei reifen Plasmodien-GPIs eine solche nicht möglich. Aufgrund der persistierenden Veränderung der Lipidreste ermöglichte erst die Entdeckung der (G)PI-Phospholipase-D, die diese GPI-APs trotz besagter Modifikation zu spalten vermag, eine weitere Erforschung der Parasiten-Moleküle (Eckert et al. 1996). Auch das Remodeling in *T. b. brucei* weist einige Besonderheiten auf. Im GPI-Stoffwechsel dieser Protozoen wird die sn2-Position bereits vor der Addition des VSG durch die Phospholipase A2 deacyliert und das so entstehende lyso-GPI um eine Myristinsäure ergänzt. An der Position sn1 findet mithilfe des Donors myristoyl-coa ebenfalls eine Myristilierung statt (Masterson et al. 1990; Morita et al. 2000)

Die im Vorangegangenen beschriebene Deacylierung scheint nach aktueller Studienlage entscheidend für den Weitertransport in den Golgi-Apparat zu sein. Darüber hinaus spielt sie eine wichtige Rolle in der Qualitätskontrolle bezüglich der korrekten Faltung der GPI-gebundenen Proteine sowie für die ER-gebundene Degradierung fehlerhafter GPI-APs (Fujita und Jigami 2008; Fujita et al. 2006a; Fujita et al. 2006b). Nach erfolgreicher Passage dieses „Gate-keeping“-Mechanismus werden die GPI-Anker in COPII-coated-Vesikeln verpackt und für das weitere Remodeling des Lipidrests in das Golgi-Netzwerk transportiert (Doering und Schekman 1996; Nguyen et al. 2017; Kinoshita et al. 2008). Sowohl in Hefe als auch beim Menschen scheinen an diesem Sortierungs- und Verpackungsvorgang insbesondere Proteine der Familie p24 (v.a. EMP24p und ERV25p) beteiligt zu sein (Muñiz et al. 2000; Mayor und Riezman 2004; Takida et al. 2008).

Es ist anzumerken, dass in Hefen zusätzlich eine Modifikation des Lipidrestes mit Ceramiden für den korrekten Weitertransport notwendig zu sein scheint (Umemura et al. 2007; Ghugtyal et al. 2007). Dies lässt vermuten, dass zahlreiche Schritte des Lipid-Remodelings, die bei Säugern aber auch bei Protozoen erst im Golgi-Netzwerk stattfinden, sich bei Hefen bereits im ER abspielen (Skrzypek et al. 1997; Orlean und Menon 2007).

So wird beispielsweise die Acyl-Kette des Diacylglycerols an der Position sn2 bereits im ER entfernt und das so entstehende lyso-GPI um ein base-labiles C_{26:0/c26:0} Diacylglycerol, ein base-stabiles Ceramide aus C_{18:0} Phytosphingosin oder eine Hydroxy-C_{26:0} Fettsäure ergänzt (Sipos et al. 1994). Diese Variationen sind neben ihrer Wichtigkeit

für den bereits angesprochenen Transport auch für die spätere Assoziation mit bestimmten Membranmikrodomänen, sogenannte Lipid rafts, von entscheidender Bedeutung (Fujita et al. 2006a; Bosson et al. 2006).

Der Acyl-Rest der PI-Position sn2 anderer Organismen wird nach Erreichen des Golgi-Netzwerks gleichfalls durch längere, gesättigte Fettsäuren ersetzt. Während sich in Hefen in dieser Position nach Abschluss der Modifikationen meist C_{26:0}-Fettsäuren finden lassen, handelt es sich bei Säugern insbesondere um Stearyl-C_{18:0} bzw. eine Mischung aus C_{16:0}-C_{24:0} Fettsäuren (Fujita und Jigami 2008; Bosson et al. 2006).

Viele der aufgeführten Variationen der Ursprungsstruktur spielen eine wichtige Rolle für den intrazellulären Transport und die spätere Lokalisation des GPI-APs in der Zellmembran (Tanaka et al. 2004).

So sind GPIs in der Membran häufig mit den bereits erwähnten Lipid-Mikrodomänen (Lipid rafts) assoziiert. Hierbei handelt es sich um circa 10 - 20 nm große, dynamische Areale, die vor allem aus selektiven Lipiden wie Sphingolipiden und Cholesterin bestehen. Zusätzlich zu den GPIs im äußeren Membranblatt finden sich in diesen Bereichen in der inneren Membran doppelt-acylierte Tyrosinkinasen der scr-Familie sowie einige wenige, beide Schichten durchspannende Transmembranproteine (Simons und Ikonen 1997).

Die im Vorangegangenen beschriebenen gesättigten Fettsäurereste des Ankers interagieren hierzu mit dem Ceramidanteil der Sphingolipide und bilden auf diese Weise vielfach die Basis der raft-Assoziation.

Abhängig von der Lokalisation des Lipidremodelings lassen sich erste Hinweise auf eine solche Sortierung bzw. eine Organisation der GPI-APs in Sphingolipid und Cholesterol reichen Arealen in Hefen bereits im ER nachweisen, während in Säugern eine solche Sortierung erst im trans-Golgi-Netzwerk festzustellen ist (Simons und van Meer 1988; Brown und London 1998; Bagnat et al. 2000).

Modifikation der Kohlenhydratseitenketten

Auch die Kohlenhydratseitenketten der GPI-Ankermoleküle können modifiziert und adaptiert werden. So kann beispielsweise das evolutionär konservierte Grundgerüst des trypanosomen-spezifischen Proteins VSG durch eine verzweigte α -Galactose substituiert werden (Ferguson et al. 1988), die Seitenketten des trypanosomen Proteins PARP hingegen durch N-Acetylglucosamin-, Galactose- und Sialinsäurereste (Ferguson et al.

1993).

Nicht nur die Art der Modifikation, auch ihr Zeitpunkt variiert zwischen den verschiedenen Organismen. Während die Zuckerketten der GPI-Vorläufer in *P. falciparum* und *T. gondii* noch vor der Übertragung des GPI auf das Protein modifiziert werden, erfolgt dies in anderen Spezies wie unter anderem bei *T. b. brucei* oder *T. congolense* auf dem weiteren Weg zur Zelloberfläche nach der Anheftung des Ankers an das entsprechende Protein (Eckert et al. 1996; McConville und Ferguson 1993).

Des Weiteren erhalten 20 - 30 % der GPI-AP eine 5. Mannose die entweder im *cis*-Golgi-Netzwerk über eine α -1,3Mannosyltransferase oder im *trans*-Golgi-Netzwerk über eine α -1,2Mannosyltransferase ergänzt wird (Sipos et al. 1995; Fankhauser et al. 1993).

Modifikationen in der Zellmembran

Auch nach Erreichen der Zelloberfläche lassen sich weitere Modifikationen der GPI-Proteine nachweisen. So werden diese in Pilzen unter anderem zur Quervernetzung der Zellwandbestandteile genutzt. Hierfür wird das Ankermolekül innerhalb des Glykans zwischen GlcN und der ersten Mannose gespalten und verliert auf diese Weise den Inositol-haltigen Lipid-Anteil. Das so entstandene lösliche Intermediat wird auf ein β 1,6-Glucan der Zellwand transferiert. Das so entstehende β 1,6Glucan-GPI-Zellwand-Protein (CWP) wird im nächsten Schritt kovalent an β 1,3-Glucane und Chitin der Zellwand gebunden (Lu et al. 1994; van der Vaart et al. 1996; Lu et al. 1995; Kollár et al. 1997).

1.2.6 Funktion

Die Funktion der GPI-Moleküle und der an sie gebundenen Proteine ist vielfältig und reicht von universellen Schutzfunktionen bis hin zur Beteiligung an komplexen Endozytosemechanismen. Während sie in Einzellern und niedrigen Eukaryoten vielfältig eingesetzt werden, übernehmen diese Moleküle insbesondere in höheren Eukaryoten spezialisierte Aufgaben (Anderson 1994; Anderson et al. 1992).

Ihre zumeist niedrige Turnover-Rate und ihr dadurch relativ beständiger Verbleib an der Zelloberfläche begünstigen die Ausbildung der unterschiedlichsten Funktionen zusätzlich (Bülow et al. 1989; Lemansky et al. 1990). So sind GPIs unter anderem an der korrekten Adressierung von Proteinen in das äußere Blatt des Membranbilayers beteiligt (Sampaio et al. 1999), sind wichtig für die Stabilität der Membranen, wirken als Rezeptoren für Viren und verschiedene Toxine (Ikezawa 2002), sind Teil der Interaktion zwischen Wirt und Parasit (McConville und Ferguson 1993) und ermöglichen in höher entwickelten Organismen darüber hinaus eine Clathrin-unabhängige Aufnahme kleiner Partikel wie

unter anderem Folate und Ca^{2+} ins Zellinnere (Podozytose) (Rothberg et al. 1992; Rothberg et al. 1990; Anderson et al. 1992), um nur einige Beispiele ihrer Wirkungsweisen zu nennen.

Aufgrund der großen Variationsbreite ihrer Funktionen soll im Nachfolgenden lediglich eine begrenzte Auswahl genauer betrachtet werden.

Schutzhülle

Eine der wichtigsten und universellsten Funktionen der GPI-Moleküle ist die Bildung einer Schutzschicht an der Zelloberfläche. Dabei erweist sich die Integration der GPI-Moleküle nur in die äußere Membran der Doppelschicht als entscheidender Vorteil, denn so kann eine komplette Trennung zwischen Extrazellulärraum und Zytoplasma erreicht werden, wodurch die Zelle weniger anfällig für die sie umgebenden Bedingungen wird. Darüber hinaus ermöglicht diese weniger feste Integration in die Membran auch eine flexible Bewegung der GPI-APs und bietet so die Möglichkeit, die Schutzschicht bei Bedarf an bestimmten Stellen zu verstärken.

Exemplarisch hierfür sind das *Variant surface protein* VSG (Blutstadium) sowie das *Procyclic acidic repetitive protein* PARP (Insektenstadium) des Parasits *T. b. brucei*, welches mit einer Gesamtzahl von rund 10^7 gleichartigen Molekülen je Zelle das häufigste GPI-AP dieser Protozoen darstellt (Eckert et al. 1996).

Auch lassen sich, im Vergleich zu Transmembranproteinen, mehr GPI-verankerte Proteine auf engstem Raum zusammenballen, sodass eine undurchlässigere Isolation gegenüber der Außenwelt erreicht werden kann (Homans et al. 1989). Durch die darüber hinaus vorhandenen Kohlenhydratseitenketten, insbesondere durch den im Golgi-Apparat angefügten Alpha-Galaktose-Rest, entsteht zusätzlich eine dichte Glykokalix, die als makromolekulare Diffusionsbarriere fungiert (Ferguson et al. 1994; Bangs et al. 1988).

Eine ähnliche Barriere lässt sich auch bei verschiedenen Plasmodienarten nachweisen. So werden unter anderem die durch die Anophelesmücke ins Blut injizierten Sporoziten durch eine einheitliche Hülle aus dicht beieinanderliegenden GPI-verankerten Circumsporoziten Proteine geschützt. Die GPI-APs der Merozoiten hingegen sind weniger gleichförmig und dienen, abgesehen vom Schutz der Zelloberfläche aller Wahrscheinlichkeit nach auch der Invasion in die Blutzellen, der Membranstabilität und dem intrazellulären Überleben (Eckert et al. 1996).

Die Wichtigkeit dieser Schutzhülle konnte unter anderem anhand verschiedener Hefe-Konstrukte nachgewiesen werden. Ein fehlerhafter GPI-Stoffwechsel, welcher eine

instabile Schutzschicht bedingt, ist in den meisten Fällen letal für diese Organismen (Leidich et al. 1994).

In polarisierten (Epithel-)Zellen höherer Eukaryoten finden sich GPI-verankerte Proteine fast ausschließlich in den apikalen Bereichen (Anderson 1994; Brown et al. 1989). Es ist anzunehmen, dass sie auch in diesen Lebewesen als Schutzschicht gegenüber den härteren Bedingungen der extrazellulären bzw. luminalen Umwelt genutzt werden. Eine ähnliche Aufteilung konnte auch in bestimmten Membranarealen von Neuronen gefunden werden. So wird beispielsweise Thy1 nur in der axonalen Membran exprimiert (Anderson 1994).

Eine mögliche Erklärung für diese gezielte Insertion bzw. Sekretion und die dadurch bedingte inhomogene Verteilung dieser Moleküle insbesondere in mehrzelligen Organismen könnten spezielle Transportvesikel darstellen, in welche die GPI-APs im Golgi-Netzwerk verpackt werden. Sie bestehen in der Regel aus GPI-APs, Glykosphingolipiden und akzessorischen Proteinen (Brown und Rose 1992; Simons und Wandinger-Ness 1990).

Transmembransignale

Nach aktuellem Kenntnisstand können GPI-Moleküle sowohl direkt an der transmembranen Weitergabe von Signalen beteiligt sein als auch als second messenger fungieren. Die genauen Mechanismen, die diese Funktionen ermöglichen, sind noch nicht abschließend verstanden (Robinson 1991b).

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass GPI-APs für die Mitogenese von Lymphozyten essenziell sind, da sie über die Aktivierung einer intrazellulären Tyrosinkinase und/oder den Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} Levels die Aktivierung dieser Zellen initiieren und so einen wichtigen Teil der Immunantwort darstellen (Robinson 1991a; Gaulton und Pratt 1994). Dennoch konnte bisher der „missing link“ zwischen den GPI-Ankern im äußeren Membranblatt und den Kinasen im Inneren der Zelle noch nicht eindeutig identifiziert werden.

Darüber hinaus können ungebundene (Free-GPI) und seltener auch Protein-assoziierte (GPI-AP) GPI-Anker die Funktion von second messengern übernehmen bzw. die Funktion von Hormon-like-Peptides wie IL-2 oder Nervenwachstumsfaktor nachahmen. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu anderen sekundären Botenstoffen, wie unter anderem Inositolphosphat, Diacylglycerol, Phosphatidsäuren und Ceramiden, können GPIs und ihre Spaltprodukte zum Beispiel Rezeptoren hydrolysieren und dadurch die

Bindung von Liganden beeinflussen und spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle in der inter- und intrazellulären Signalübertragung. Auch können sie die Aktivität verschiedener Hormone beeinflussen bzw. deren Wirkung verstärken oder hemmen (Saltiel et al. 1988; Saltiel 1991). Eine hohe Insulinkonzentration kann beispielsweise durch die Induktion der (G)PI-PLC und -PLD die hydrolytische Abspaltung von GPI-Fragmenten in Myozyten (Saltiel et al. 1986), Fettzellen (Mato et al. 1987) und T-Lymphozyten (Gaulton et al. 1988) bedingen. Diese Fragmente wiederum sind in der Lage, die Glukoseoxidation und Lipogenese zu fördern und zugleich die Lipolyse zu inhibieren (Kilgour 1993).

Pathogene Wirkung

Protozoenparasiten wie *P. falciparum* und *T. b. brucei* induzieren im infizierten Organismus die Freisetzung großer Mengen des Tumornekrosefaktors α (TNF α), welcher schwere Entzündungsreaktionen im Körper bedingt (Taverne et al. 1990). Ursächlich hierfür ist die (synchrone) Ruptur befallener Erythrozyten und die dadurch bedingte Ausschüttung einer hohen Konzentration an Toxinen. Bei selbigen handelt es sich in vielen Fällen um GPI-Moleküle, die eine Hochregulation verschiedener intra- und interzellulärer Mechanismen bedingen.

In Plasmodien konnte eine Bindung dieser Toxine an Toll-like-Rezeptoren TLR-2 nachgewiesen werden, wodurch die Phosphorylierung verschiedener zytoplasmatischer Kinasen induziert und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (NF κ B) bedingt wird, die wiederum an Promotoren binden und so die Zellen aktivieren (Gowda 2007). In Toxoplasmen fanden sich ähnliche Mechanismen sowohl über die Bindung an TLR-2 als auch an TLR-4 (Debierre-Grockiego et al. 2007). So werden dadurch unter anderem verschiedene Endotheloberflächenmarker und Rezeptoren (für Malaria-infizierte Erythrozyten) vermehrt exprimiert, Makrophagen aktiviert und der Umsatz diverser Enzyme gesteigert. Letzteres bedingt beispielsweise eine vermehrte Freisetzung der Produkte der NO-Synthase, welche wiederum durch eine Induktion verschiedener weiterer Mediatoren zu einer verstärkten Zellaktivierung und Ausbildung der Adhensionsmoleküle ICAM1 und VCAM1 führen, welche an der Entstehung der cerebralen Malaria beteiligt sind (Schofield et al. 1994; Schofield et al. 1996; Schofield et al. 1993; Tachado et al. 1997; Shams-Eldin et al. 2009).

Außerdem können die GPI-Toxine der Plasmodien Apoptosen in Herz, Milz und Leber von Mäusen induzieren und stehen diesbezüglich auch im Verdacht, verantwortlich für

die myokardialen Funktionseinschränkungen bei Patienten mit schweren Verläufen der Malaria zu sein (Wichmann et al. 2007).

1.2.7 Medizinische Bedeutung der GPI

Die intensive Sequenzierung humaner Exome und Genome der letzten Jahre war in der Lage, eine Vielzahl bis dato unbekannter Mutationen und Polymorphismen zu entdecken, die entscheidend zum Verständnis von Ursprung und Pathomechanismus verschiedener Krankheiten beitrugen (Ng und Freeze 2015). So konnte beispielsweise allein im Jahr 2013 alle 17 Tage eine neue Glykosylierungsstörung inklusive zahlreicher Defekte des GPI-Stoffwechsels beschrieben und definiert werden (Freeze et al. 2014; Ng und Freeze 2015).

Neben den bereits bekannten Erkrankungen, unter anderem die Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie, Prion-Erkrankungen oder das Mabry-Syndrom, auf welche im Nachfolgenden näher eingegangen werden soll, konnte die Ursache zahlreicher weiterer bisher unzureichend untersuchter Krankheiten in Mutationen der für die GPI-Biosynthese codierenden Gene gefunden werden (Ng und Freeze 2015; Nguyen et al. 2017; Jaeken 2011).

So führen Mutationen im für die GlcNAc-PI de-N-acetylase codierenden PIG L zum Zurich-Kaye-Syndrom bzw. CHIME-Syndrom, welches mit Kolobomen, Herzfehlern, Ichthyose-artiger Dermatitis, mentaler Retardierung und Epilepsie einhergeht (Ng et al. 2012), während Mutationen in PIG M eine Neigung zu Thrombosen und Absenzen bedingen (Almeida et al. 2006), um nur einige wenige Beispiele zu nennen.

Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH)/Marchiafava-Anämie

Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie ist eine seltene, erworbene monoklonale Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen aller Zellreihen (Hämatopoese, Granulozytopoese, Thrombopoese), die sich als intravasale Hämolyse mit einer ausgeprägten Thromboseneigung und zunehmender Knochenmarkinsuffizienz manifestiert (Moyo et al. 2004). Die Erkrankung kann sich sowohl spontan als auch auf Basis einer erworbenen aplastischen Anämie entwickeln (Nagarajan et al. 1995). Ursächlich hierfür ist eine somatische Mutation des x-chromosomalen Gens PIG-A, welches für den ersten Schritt der GPI-Biosynthese essenziell ist (Miyata et al. 1994; Brodsky 2006; Miyata et al. 1993). Die zugrunde liegende Veränderung der Basenfolge ist dabei in den meisten Fällen auf eine Punktmutation, insbesondere auf eine Insertion oder Deletion zurückzuführen, wodurch ein Frame-shift oder eine Nonsense-Mutation

entsteht, die den vorzeitigen Abbruch der Transkription bedingen. Aktuell sind bereits über 100 verschiedene Mutationen bekannt, die nahezu jeden Abschnitt des besagten Gens betreffen können (Nafa et al. 1995; Taylor und Hooper 2011; Johnson 2002).

Das dadurch verursachte komplette Fehlen der GPI-Anker und ihrer gebundenen Proteine an der Membranoberfläche der betroffenen Zellen spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie dieser hämatologischen Erkrankung (Taylor und Hooper 2011; Herold 2022; Brodsky 2006).

Durch den Mangel der GPI-verankerten komplementregulierenden Proteine CD55 (DAF=decay accelerating factor) und CD59 (MIRL=membran inhibitor of reactive hemolysis) sind die Blutzellen anfälliger gegenüber einer vorzeitigen Lyse durch den terminalen Membranangriffskomplex C5b-9 des Komplementsystems (Moyo et al. 2004).

Das durch den verstärkten Zerfall der Erythrozyten intravasal frei werdende Hämoglobin ist einerseits in der Lage, den Botenstoff NO zu binden und andererseits dessen weitere Produktion zu hemmen (Rother et al. 2005). Durch die zunehmende NO-Depletion kommt es vermehrt zu Kontraktionen der glatten Muskulatur und dadurch unter anderem zu abdominellen Schmerzen und Ösophagusspasmen (Taylor und Hooper 2011; Brodsky 2006). Darüber hinaus fördert die abnehmende Bioverfügbarkeit des Transmitters die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten. In Kombination mit der gesteigerten Thrombozytenaktivierung durch Moleküle der inneren Erythrozytenmembran entsteht ein deutlich erhöhtes Thromboserisiko. Es ist anzumerken, dass diese Komplikation die Morbidität und Mortalität der betroffenen Patienten deutlich erhöht und noch immer die häufigste Todesursache im Zuge der PNH darstellt (Fu et al. 2016; Hill et al. 2013).

Die Komplementaktivierung und die dadurch bedingte Hämolyse können unter anderem durch einen nächtlichen pH-Abfall im Zuge einer respiratorischen Azidose aufgrund rezidivierender Apnoephasen, durch Infekte, Hormonumstellungen und zahlreiche andere Triggerfaktoren ausgelöst werden (Herold 2022).

Zu den klassischen Symptomen dieser Erkrankung zählen neben den bereits erwähnten abdominellen Schmerzen und Ösophaguskrämpfen vor allem Müdigkeit und Schwäche in Folge der chronischen Anämie. Auch Kopfschmerzen, erektile Dysfunktion, pulmonale sowie arterielle Hypertonien und neurologische Symptome sind beschrieben (Taylor und Hooper 2011; Herold 2022; Moyo et al. 2004). Im Zuge einer schweren hämolytischen Krise kann es zusätzlich zu einem akuten Nierenversagen aufgrund der massiven Hämoglobinurie kommen (Herold 2022). Außerdem steigen durch die

krankheitsbedingt zunehmende Knochenmarkinsuffizienz das Infektionsrisiko bei Neutropenie sowie die Blutungsneigung bei Thrombozytopenie. Der Übergang in ein myelodysplastisches Syndrom oder eine akute myeloische Leukämie ist möglich (Herold 2022).

Eine allogene Stammzelltransplantation stellt die einzige kurative Therapiemöglichkeit dieser Erkrankung dar (Herold 2022; Storb et al. 2001). Darüber hinaus finden sich symptomatische Behandlungsansätze mit hochdosiertem Cyclophosphamid (Brodsky et al. 2001) oder Antithymocyten Globulinen und Cyclosporin (Rosenfeld et al. 2003). Die Entwicklung des humanisierten monoklonalen Antikörpers Eculizumab gegen den Komplementfaktor C5 vermag mittlerweile eine Alternative zur Stammzelltransplantation darzustellen (Rother et al. 2007). Er hemmt die Endstrecke der Komplementaktivierung und ist dadurch in der Lage, das intravasale Hämoglobinlevel zu stabilisieren und langfristig zu senken. Hierdurch konnte die Zahl der notwendigen Bluttransfusionen signifikant gesenkt und das Auftreten der meisten genannten Symptome reduziert werden (Rother et al. 2007; Brodsky 2006). Auch die erhöhte Thromboseneigung konnte nachweislich vermindert und die Lebenserwartung dadurch nahezu normalisiert werden (Sicre de Fontbrune und Peffault de Latour 2018).

Mabry-Syndrom (HPMRS)

Bei dem erstmals 1970 durch den US-amerikanischen Arzt Charlton Mabry beschriebene Krankheitsbild des Hyperphosphatasie-Intelligenzminderung-Syndroms handelt es sich um eine am ehesten autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung des GPI-Stoffwechsels (Mabry et al. 1970; Krawitz et al. 2010). Durch detaillierte Analysen der Genome und Proteome der Betroffenen konnten Mutationen in den Genen PIGV, PIGW, PIGO sowie PIGY nachgewiesen werden, die allesamt Enzyme der GPI-Biosynthese codieren (Krawitz et al. 2012; Chiyonobu et al. 2014; Krawitz et al. 2010; Ilkovski et al. 2015). Des Weiteren wurden Veränderungen der Gene PGAP2 und PGAP3 detektiert, die für das Lipid-Remodelling der GPI-Anker mitverantwortlich sind (Krawitz et al. 2013; Hansen et al. 2013; Howard et al. 2014).

In den meisten Fällen zeigten sich homozygote bzw. compound heterozygote miss-sense-Mutationen im Bereich der Chromosome 1 und 14, die einen partiellen Funktionsverlust des betroffenen Enzyms zu bedingen scheinen (Marcelis et al. 2007; Krawitz et al. 2010; Horn et al. 2011; Krawitz et al. 2013). Weiterhin konnten in einigen Fällen loss of function-Mutationen nachgewiesen werden, wohingegen sich bei keinem der Erkrankten biallelische non-sense oder frameshift Mutationen fanden (Knaus et al. 2016).

Durch die Veränderungen des GPI-Stoffwechsels, die bei 4 der Krankheitssubtypen mit einer fehlerhaften Anheftung der potenziellen GPI-Proteine an den vorgesehenen Anker einhergehen, kann eines der Hauptsymptome des Mabry-Syndroms erklärt werden. So ist davon auszugehen, dass die gestörte GPI-Verankerung der Alkalischen Phosphatase vom Lebertyp die Hypophosphatasie im Blut der Erkrankten bedingt, da diese weder durch nachweisbare Leber- oder Knochenveränderungen anderweitig erklärbar ist (Krawitz et al. 2013; Thompson et al. 2010; Mabry et al. 1970). Im Falle der Mutationen von PGAP2 oder PGAP3 können sich die GPI-verankerten Proteine nicht in den Bereichen der Lipid rafts anreichern, wodurch die Symptome möglicherweise erklärt werden können (Knaus et al. 2016).

Es ist anzumerken, dass zwischen der Höhe der Alkalischen Phosphatase im Serum und der Schwere der Erkrankung keinerlei Korrelation zu bestehen scheint. Auch der Zusammenhang zwischen den biochemischen Veränderungen und den bestehenden Symptomen konnte bisher nicht abschließend geklärt werden (Knaus et al. 2018; Horn et al. 2010).

Zu den Hauptsymptomen zählen neben der bereits erwähnten unterschiedlich stark ausgeprägten Erhöhung des Leber-Isoenzym der Alkalischen Phosphatase verschiedene faciale Dysmorphien, wie unter anderem ein Hypertelorismus, lange Lidspalten, nach unten weisende Mundwinkel sowie eine verbreiterte Nasenwurzel und –spitze (Horn et al. 2010; Thompson et al. 2010). Darüber hinaus findet sich bei einem Großteil der Patienten eine Brachytelephalangie. Die Verkürzung der Fingerendglieder geht häufig mit ungleichen Hypoplasien einher und ist nicht auf bestimmte Finger beschränkt (Horn et al. 2010; Horn et al. 2011; Thompson et al. 2010).

Ein weiteres Hauptsymptom des Mabry-Syndrom ist eine schwere geistige Retardierung. Nur wenige der erkrankten Kinder erlernen ein Sprachverständnis bzw. lernen zu sprechen. Auch die Fähigkeit zu gehen oder die Kontinenzkontrolle ist sehr häufig nicht vorhanden (Mabry et al. 1970; Horn et al. 2011). Zusätzlich entwickeln die meisten der Betroffenen zwischen dem 4. Lebensmonat und dem 2. - 3. Lebensjahr eine muskuläre Hypotonie sowie eine Neigung zu schweren generalisierten Krampfanfällen (Mabry et al. 1970; Horn et al. 2011; Horn et al. 2010; Thompson et al. 2010).

Das klinische Spektrum der möglichen Nebensymptome ist sehr weit gestreut. So fanden sich bei einigen Erkrankten anorektale Veränderungen beispielsweise in Gestalt einer Analatresie, anorektalen Fisteln oder auch in Form eines M. Hirschsprungs (Horn et al.

2011; Horn et al. 2010; Krawitz et al. 2013).

Darüber hinaus wurden Lippen-Kieferspalten, kardiale Veränderungen sowie ein vermindertes Hörvermögen beschrieben (Horn et al. 2010; Horn et al. 2011; Krawitz et al. 2013)

Prionenerkrankungen

Das pathologische Prionprotein PrP-res bzw. PrP^{Sc} ist nach heutigem Kenntnisstand als ursächlich für sogenannte Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) anzusehen. Zu den bekanntesten Erkrankungen dieses Spektrums gehören die Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD) des Menschen, die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) des Rinds sowie die Traberkrankheit bzw. Scrapie von Schafen und Ziegen (Prusiner 1998; Taylor und Hooper 2006).

Es handelt sich hierbei um schwerwiegende, stets tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankungen, die sowohl sporadisch, erblich als auch durch Infektion auftreten können (Prusiner 1998; Liu et al. 2002). Das klinische Bild der Krankheiten differiert dabei stark und ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie unter anderem dem Genotyp des betroffenen Individuums sowie bei den erblichen und sporadischen Formen der Lokalisation der Mutation im Prpn-Gen (Gambetti et al. 2003). Insbesondere eine rasch fortschreitende Demenz sowie Ataxien finden sich bei einer Vielzahl der Betroffenen (Gambetti et al. 2003; Prusiner 1998; Wells et al. 1987; Paterson et al. 2012). Histopathologisch zeigen sich eine ausgeprägte spongiforme Degeneration der Hirnsubstanz mit Neuronenverlusten sowie eine astrozytische Gliose, die in ihrer Schwere und Topographie ebenfalls stark variieren können (Gambetti et al. 2003; Prusiner 1998).

PrP-res stellt hierbei eine Isoform des zellulären PrP^c bzw. PrP-sen dar, welches durch postrtranslationale Modifikationen in die pathologische Form überführt werden kann (Prusiner 1991, 1998).

PrP-sen ist ein GPI-verankertes, Protease-sensitives, lösliches Oberflächenprotein, das in den Membranen von neuronalen und nicht-neuronalen Zelltypen sowie Leukozyten nachgewiesen werden kann (Taylor und Hooper 2006; Campana et al. 2005; Aguzzi 2005; Aguzzi und Polymenidou 2004).

Die genaue Funktion dieses Proteins konnte zum Zeitpunkt der Erarbeitung dieser Dissertation noch nicht abschließend geklärt werden. Gemäß der aktuellen Kenntnislage ist jedoch davon auszugehen, dass es an zahlreichen Prozessen wie unter anderem dem Schutz vor oxidativem Stress (Milhavet und Lehmann 2002), dem Metabolismus von

Kupfer und/oder Zink (Pauly und Harris 1998; Watt und Hooper 2003), Signaltransduktion (Mouillet-Richard et al. 2000) sowie synaptischer Übertragung (Collinge et al. 1994) beteiligt ist (Taylor und Hooper 2006; Campana et al. 2005).

Der exakte Mechanismus der posttranslationalen Modifikation von PrP-sen durch PrP-res ist in vielen Punkten noch unklar (Priola und McNally 2009).

Gemäß der durch Prusiner postulierten „Nur-Protein“-Hypothese genügt der Kontakt des zellulären Prions mit dem pathologische PrP-res, um eine Konformationsänderung auszulösen (Prusiner 1998, 1991; Taylor und Hooper 2006; Liu et al. 2002). Die die Sekundärstruktur von PrP-sen dominierenden α -Helices können durch den Kontakt mit den β -Faltblatt-Strukturen PrP-res durch Induktion einer Fehlfaltung in das krankhafte Protein überführt werden (Campana et al. 2005; Prusiner 1998; Zahn et al. 2000). PrP-res wiederum ist Protease-resistent und unlöslich, wodurch es zur Aggregation und Ausfall von neurotoxischen Fibrillen kommt, die die bereits beschriebenen histopathologischen Veränderungen bedingen (Campana et al. 2005; Stahl et al. 1990).

Die GPI-Verankerung beider Isoformen scheint eine nicht unwichtige Rolle in der Pathogenese der Erkrankung zu spielen. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass transgene Mäuse, die zu keiner GPI-Verankerung der Prione in der Lage waren, nur minimale Symptome entwickelten (Taylor und Hooper 2006; Chesebro et al. 2005).

Über die tatsächliche Funktion der GPI-Proteine liegen zahlreiche Theorien vor, wie im Nachfolgenden beschrieben.

So besteht unter anderem die Möglichkeit, dass die Assoziation der GPI-Anker mit den sogenannten „Lipid rafts“, sehr lipid- und cholesterin-reichen Membrandomänen, die Fehlfaltung der Prione begünstigt (Taylor und Hooper 2006; Campana et al. 2005). Ob sich hier jedoch bestimmte Enzyme befinden, die die Konversion erleichtern, oder ob es sich lediglich um einen „meeting place“ (Zahn 2003) handelt, konnte noch nicht abschließend geklärt werden (Taylor und Hooper 2006; Campana et al. 2005).

Darüber hinaus scheint die GPI-Verankerung entscheidend für die Persistenz und interzelluläre Ausbreitung der Erkrankung zu sein (Priola und McNally 2009; Vorberg et al. 2004; McNally et al. 2009).

Es wird vermutet, dass die GPI-Anker der PrP-res Teil einer Signaltransduktionskette sind, die in den betroffenen Zellen eine neurotoxische Wirkung entfalten und aufrecht erhalten (Aguzzi 2005; Taylor und Hooper 2006). Hierdurch ließe sich auch die geringe

Symptomausprägung in den ankerlosen, transgenen Mäusen herleiten (Chesebro et al. 2005).

Auch ist davon auszugehen, dass die innerhalb der Membran flexibel beweglichen GPI-Moleküle den Austausch der pathologischen Prione zwischen den Zellen erleichtern. So konnte demonstriert werden, dass GPI-APs in der Lage sind, sich spontan in eine bestehende Zellmembran zu integrieren (Liu et al. 2002; Baron et al. 2002; Hoessli und Robinson 1998). Der als „painting“ bezeichnete Vorgang könnte die interzelluläre Ausbreitung der PrP-res erklären. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass sich GPI-verankerte Proteine spontan loslösen und an anderer Stelle wieder an ein Ankermolekül binden und auf diese Weise von Zelle zu Zelle gelangen können (Liu et al. 2002; Anderson et al. 1996). Der genaue Mechanismus der Infektion gesunder Zellen ist in vielen Punkten jedoch noch immer unklar und weist teilweise widersprüchliche Ergebnisse auf, sodass die weitere Entwicklung der diesbezüglichen Forschung abzuwarten bleibt (Priola und McNally 2009).

1.3 Zielsetzung

Im Hinblick auf die zunehmende Resistenzentwicklung von Plasmodien gegenüber den gängigen antiparasitär wirksamen Substanzen, erscheint eine ständige Erweiterung des Grundverständnisses dieser Lebewesen als wichtige Aufgabe der gegenwärtigen Forschung.

Durch ihr ubiquitäres Vorkommen und ihre vielfältigen und bedeutsamen Funktionen stellen die GPI-Anker ein wichtiges und lohnenswertes Forschungsobjekt dar. Zahlreiche Arbeiten zu diesen Proteinen bei verschiedenen protozoischen Parasiten gaben Aufschluss auf deren Funktion und zeigten auch Möglichkeiten zur Inhibition des Parasitenwachstums. Insbesondere Letzteres könnte langfristig neue Ansatzpunkte für die mögliche Entwicklung von Hemmstoffen eröffnen. Diese Arbeit sollte sich vor allem auf Erreger der Malaria erstrecken und den Schwerpunkt auf die Suche von bisher unerkannten *P. falciparum* GPI-Proteinen legen.

In der vorliegenden Arbeit sollen zunächst anhand bereits bekannter GPI-verankerter Proteine von *P. falciparum* deskriptive Suchparameter definiert und auf die zu diesem Zeitpunkt auf PlasmoDB verfügbaren Proteome acht verschiedener Plasmodienarten angewandt werden. Anschließend soll eine manuelle Kontrolle der so gewonnenen Daten erfolgen, um Falsch-negative bzw. Falsch-positive Moleküle zu erkennen, hinzuzufügen oder zu entfernen und ggf. die Suchkriterien zu optimieren.

In den nächsten Schritten soll eines der auf diese Weise gefundenen neuen GPI-Proteine *P. falciparums* stellvertretend zur Bestätigung der korrekten Erkennungsfähigkeit unseres bioinformatischen Ansatzes ausgewählt und mittels molekularbiologischer und biochemischer Versuche bestätigt werden.

Da die Untersuchung der Biosynthese und Modifikation von Proteinen in Plasmodien sehr komplex und aufwändig sowie langwierig ist, sollen die grundlegenden molekularbiologischen und biochemischen Versuche in einer herzustellenden synthetisch lethalen Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* erfolgen.

Nach der heterologen Expression des gewählten FLAG-getaggten Plasmodienproteins in Hefe soll es einer Triton X-114 Phasentrennung unterzogen werden, um die bioinformatisch postulierte GPI-Verankerung zu bestätigen oder zu widerlegen.

2. Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Name	Firma
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid(XGal)	peqlab
Acrylamid	Bio-Rad
Acetat (Essigsäure)	Merck
Acetoxyssäure (Eisessig)	Merck
Adenin	Carl Roth
Agar	Carl Roth
Agarose	GibcoBRL
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
Ammoniumsulfat (NH ₄)SO ₄	Sigma
Ampicillin	Sigma
Bacto-Agar	BD
Blutkonserve Mensch A ⁺	Blutbank der Universitätsklinik Marburg
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
Coomassie-R250	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	MC Biomedicals
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Carl Roth
Ethanol, 70 %	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Carl Roth
Galaktose	Merck
Gefrierplasma, Mensch (FFP)	Blutbank der Universitätsklinik Marburg

Gibco® RPMI-1640 Pulver	Thermo Fisher scientific
Giemsa-Lösung	Merck
Glukose	Carl Roth
Glutamin	Merck
Glycerol	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Glycogen	Carl Roth
Hefeextrakt	Carl Roth
Hefe-Lyse-Reagenz (Y-PER)	Pierce
Hefe-Stickstoff-Basismedium ohne AS (YNB)	BD
Hydrogenchlorid (HCl)	Merck
Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure (HEPES)	Merck
Hypoxanthin	Sigma
Isobutanol	Merck
Isopropanol	Carl Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Lachssperma	Stratagene
Lithiumacetat 1M	Sigma
L-Leucin	Sigma
L-Lysin	Sigma
Loading dye Purple (6x)	NEB
L-Tryptophan	Sigma
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
6-Mercaptopurin	Sigma

β-Mercaptoethanol	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
Neomycin	Sigma
Page ruler plus 26619	Thermo Fisher scientific
Pepton	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphat-gepufferte Salzsäure	Life Technologies
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma
Raffinose	Carl Roth
Saponin	Merck
Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) running buffer, 10x	Carl Roth
Terralin Liquid	Schülke
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Carl Roth
Tris	Carl Roth
Tris-HCl	Carl Roth
Triton X-114	Volker
Trypton	Merck
Tween-20	Carl Roth
Zinkchlorid ZnCl ₂	Thermo Fisher Scientific

2.2 Wasser

Soweit nicht anderweitig beschrieben, wurde zur Herstellung aller Puffer, Lösungen und nicht kommerziell erworbene Medien „doppelt-destilliertes“ Wasser (ddH₂O/*Aqua bidest*) verwendet, welches mithilfe des Millipak® 40 Gammabeständiger Goldfilter (Merck) hergestellt wurde. Das Wasser hat einen spezifischen Widerstand von 18,2 MΩcm.

2.3 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
37 °C-/CO ₂ -Zellkulturschrank	Heraeus
Analysewaage	Sartorius
Brutschrank	Thermo Fisher scientific
Blotkammer	Von Keutz, Reiskirchen
ChemiDoc™ XRS+ Molecular Imager®	BioRad
Deckgläschen	Langenbrinck
Elektrophoresesystem	Minigel-Twin, Biometra
Elektrophoresekammer für SDS-Gele	BioRad
Eppendorf-Zentrifugen	Heraeus
Glas-und Keramikperlen	MP Biomedical
Heizblock	Roth
Horizontalschüttler	Werkstatt der Universität Marburg
Inkubator, gasdicht (Modular Incubator Chamber)	Billups-Rothenberg, Del Mar, CA, USA
Magnetrührer	IKA
Megafuge 1.0 R	Heraeus
MF 75 Filter mit Supor mach membran	Nalgene
Mikroskop	Leitz
Mikrowelle	Sharp
Mixer Mille MM301	Retsch
Nanodrop 3300 (Spectrophotometer)	Thermo Scientific
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH
Parafilm®M Verschlussfolie	Parafilm
PCR-Maschine	Biometra
Petrischale 10 cm Durchmesser für Agar (unbeschichtet)	Greiner und Sarstedt

Petrischale mit Noppen für Plasmodienzucht	Greiner und Sarstedt
pH-Papier 1 - 12	Macherey-Nagel
Pipetten (P1000, P200, P100, P20, P10, P2)	Eppendorf und Gilson
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra
Reaktionsgefäße/Zentrifugenröhrchen (50 ml, 15 ml, 2 ml, 1,5 ml, 1 ml, 0,5 ml, 0,2 ml)	Eppendorf und Greiner
Schüttelinkubator	IKA
Schüttelplatte	Infors AG
Schweinchen	Quiagen
Sicherheitswerkbank (Laminaflow)	Heraeus
Spritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 60 ml)	BD
Standard Power Pack P25	Biometra
Sterilfilter (0,22 µm)	Sarstedt
Stromquelle (Power supply) + Kabel	Von Keutz
Transfusionsbesteck für Blutkonserven und FFP	Sarstedt
Vortex	Heiddph Reax 2000
Wasserbad GFL	Schuett biotec, Göttingen, Deutschland
Wasserbad klein	B. Braun
3M Whatmann Nitrocellulose 0,45 µm	GE Healthcare
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus
Zentrifuge 5417R	Eppendorf

2.4 Bakterien, Hefen und Parasiten

2.4.1 Bakterien

Bezeichnung	Herkunft
<i>E. coli</i> XL10-Gold Ultracompetent Cells	Aligent Technologies, Santa Clara, USA
<i>E. coli</i> XL1-Blue Supercompetent Cells	Aligent Technologies, Santa Clara, USA

2.4.2 Hefen

Bezeichnung	Herkunft
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Stamm YPH 499 (Wildtyp)	AG Parasitologie Dr. H. Shams-Eldin
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Stamm YPH 499 (rekombinante konditional letale Mutante, defizient für CA)	Eigene Herstellung im Zuge dieser Promotionsarbeit

2.4.3 Parasiten

Bezeichnung	Herkunft
<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	AG Parasitologie

2.5 Glas- und Plastikwaren

Glaswaren wie unter anderem Bechergläser, Messkolben und Messzylinder in verschiedenen Größen wurden den institutseigenen Beständen entnommen und vor Gebrauch sterilisiert.

Plastikwaren, soweit im vorangegangenen Abschnitt nicht näher bezeichnet, wurden von den Firmen Costar (Cambridge), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen) sowie Saarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.6 Enzyme und dazugehörige Puffer

Enzyme und Puffer	Firma
Antarctic Alkalische Phosphatase; 10x AntarcticPhosphatase-Puffer	NEB
ATL Buffer	Qiagen
CutSmart®Puffer	NEB
EcoRI-HF-Endonuklease	NEB
HINDIII-HF-Endonuklease	NEB
Leupeptin	Sigma

Pfu-Ultra® II Fusion HS Polymerase	Startogene
5x Phusion® GC Puffer	NEB
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase;	NEB
5x Phusion® High-Fidelity Puffer	
Proteinase K	Fermentas
Taq-Polymerase	Qiagen
XhoI-HF-Endonuklease	NEB

2.7 Oligonukleotide (Primer)

Alle Oligonukleotide wurden in DNase-, RNase- und proteinase-freiem Wasser gelöst bzw. verdünnt.

Bezeichnung	Sequenz	Herkunft
M13 reverse	5´d[CAGGAAACAGCTATGAC]3´	Thermo Fisher Scientific
Met	(5´): 5´CCTTCGTGTAATACAGGG3´	MWG Biotech AG
PfcaS	ATGAAGCTTTTATATTTACTATATC	Biomers
PfcaAS	AAATAAGAACAATACAATGTTATAAAAG	Biomers
PfcaDelIntS	GTATCAAGTGCAGTTCACGTCGGCTCAGATCCAACCT TGGTGGAATTAAGG	Biomers
PfcaDelIntAS	CCTTTAATTCCACCAAGGTTGGATCTGAGCCGACGTG AACTGCACTTGATAC	Biomers
PfCAFlagmut S	gggctgcaggaattcgcccttATGGACTACAAGGACGACGATGA CAAGaagctttatattactatatatccca	Biomers
PfCAFlagmut AS	tgggatagtaaataaaagcttCTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGT CCATaaggcggaattcctgcagccc	Biomers
ScCAS-EcoR	GGGgaattcATGAGCGCTACCGAATCTTC	Biomers
ScCAXhoiAs	gggCTCGAGttttgggtaactttgtgaagtgtaactgt	Biomers
ScCAHisGalS	ATTCCTTCCTCCCCCTCTCTCGATGAGTAATTTTGAAA TGAACAAGTAGGgggcgaattggagctccac	Biomers

ScCAHisGalA S	TTTGAGTTGTGACTCAATGTGAATATAGATGAAGATT CGGTAGCGCTCATggggatccactagttctag	Biomers
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	MWG
Term	5`CGTGACATAACTAATTAC3`	BiotechAG

2.8 Kommerziell erhältliche Reaktions-Kits

Bezeichnung	Firma
E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit (Spin protocol)	Omega Bio-tek
E.Z.N.A.® Fastfilter Plasmid Maxi Kit (Vacuum Protocol)	Omega Bio-tek
E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Spin protocol)	Omega Bio-tek
PCR Purification Kits	Omega Bio-tek
QuickChange® II site-directed mutagenesis kit	Agilent technologies?
Super Signal® West Fento Maximum Sensitivity Substate	Thermo Fisher Scientific
Topo® TA Cloning® kit	Thermo Fisher Scientific

2.9 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
a) p426 MET 25	Shuttel-Expressionsvektor	Dr. H. Shams-Eldin, Marburg (Mumberg et al. 1994)
b) pRS17 (25) His3/Gal1	Templet für His/Gal-Kassette	(Mumberg und Sikroki)

a) Das bakterielle Plasmid pRS426Met fungiert als ein *E. coli*/*S. cerevisiae* Shuttlevektor (von Dr. Martin Funk, IMT Marburg, zur Verfügung gestellt). Der Expressionsvektor verfügt unter anderem über das für das Enzym Orotidin-5`-Phosphat-Decarboxylase codierende URA3-Gen als Selektionsmarker in Hefe sowie ein Amp^r-Gen als

Selektionsmarker in *E. coli*. Des Weiteren verfügt das Plasmid über einen Methionin-Promotor vor dem „Polylinker“. Mithilfe der 2-micron Sequenz wird die autonome Replikation in Hefe gewährleistet (Mumberg et al., 1995).

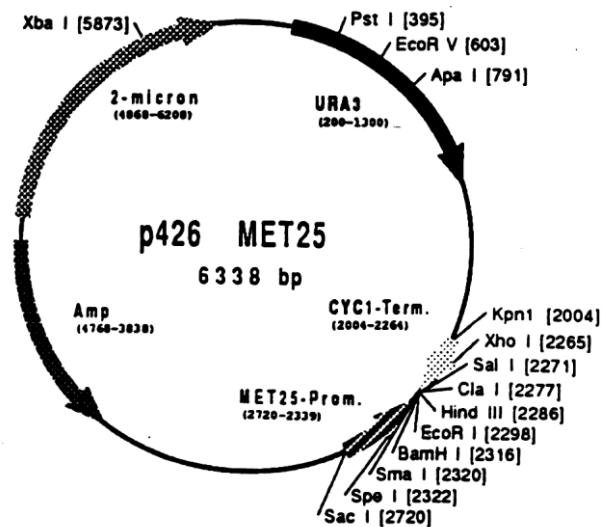


Abb. 4 Plasmidkarte von pRS426Met: Das *E. coli/S. cerevisiae* Shuttleplasmid (6338 bp) verfügt u. a. über das URA3-Gen als Selektionsmarker für Hefe sowie ein Amp^r-Gen als Selektionsmarker in *E. coli* als auch einen Methionin-Promotor (Mumberg et al. 1994).

b) Das Plasmid pRS17 Gal1/His3 verfügt über das HIS3-Gen als Selektionsmarker in Hefe sowie über den GAL1-Promotor, welche in einer Kassetten zusammengefasst wurden. Das HIS3-Gen codiert das Enzym Imidazol-Glycerinphosphat-Dehydrogenase.

2.10 Rekombinante Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
p426 MET 25 - PfCA	Kodiert für das Enzym CA von <i>P. falciparum</i>	Eigene Herstellung im Zuge dieser Promotionsarbeit (Mumberg et al. 1994; Mazhari-Tabrizi et al. 2004)
P426 MET 25 - PfFlagCA	Kodiert für das mit FLAG-taq markierte Enzym CA von <i>P. falciparum</i>	Eigene Herstellung im Zuge dieser Promotionsarbeit

P426 MET 25 ScCA	Kodiert für das Enzym CA von <i>S. cerevisiae</i>	Eigene Herstellung im Zuge dieser Promotionsarbeit
------------------	---	--

2.11 Antikörper

Bezeichnung	Herkunft
AntiFLAG M2 monoclonal produced in mouse	F3165 Sigma
AntiGAS1	freundliche Überlassung durch Prof. Dr. Howard Riezman, Genf
Anti-Maus Sekundärantikörper aus Ziege kombiniert mit HRP	Dakko

2.12 Puffer, Medien und Gele

2.12.1 Reaktionspuffer und -medien

Puffer/Medium	Zusammensetzung
DNA-Extraktionslösung Hefe	ATL-Puffer 2 ml Proteinase K 500 µl
SDS-PAGE.-Entfärberlösung 1	Ethanol 350 ml Essigsäure 100 ml H ₂ O _{dest} 550 ml
SDS-PAGE.-Entfärberlösung 2	Ethanol 100 ml Eisessig 100 ml H ₂ O _{dest} 800 ml
1x TAE-Puffer	10x TAE 1:10 verdünnen
10x TAE-Puffer	Tris-Base 54 g 27,5 ml Essigsäure EDTA 0,5 M (pH8,0) 20 ml ad 1000 ml H ₂ O _{dest}
TBS-Puffer	Tris-Base 10 mM, pH 7,4 NaCl 150 mM
TE-Lösung	Tris/HCl 10 mM, pH 8,0 EDTA 1 mM

Coomassie	Coomassie-R250 0,6 g Eisessig 100 ml Ethanol 250 ml H ₂ O _{dest} 250 ml
Färbelösung für Plasmodienkulturen	1/10 mit Giemsa-Puffer verdünnte Giemsa-Lösung (Merck)
Hefetransformation: Puffer 1	LiAc 1M 1 ml TE Puffer 10x 1 ml H ₂ O _{dest} 8 ml
Hefetransformation: Puffer 2	LiAc 1M 1 ml TE Puffer 10x 1 ml PEG 4000 ad 10 ml
Kryokonservierungslösung für Plasmodien	DMSO 30 % 30 ml RPMI complete 70 ml
Lämmli-SDS-Proben-Puffer	Tris 1M, pH 6,8 30 ml SDS 10 % 24 ml Glycerol 60 ml Mercaptoethanol 30 ml Bromphenolblau 3,6 mg H ₂ O _{dest} 56 ml
Lysepuffer für Hefe	Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 NaCl 150 mM TX-114 2 % PMSF 1 mM
„Milch“ 10 %	Magermilchpulver 10 g PBS-Tween 0,05 % 90 g
PBS-Tween 0,05 %	PBS 500 ml Tween 250 µl
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	KH ₂ PO ₄ 0,20 g/l Na ₂ HPO ₄ 1,15 g/l KCl 0,20 g/l NaCl 8,00 g/l Ad 1000ml H ₂ O _{dest}

Saccharose-Puffer	Saccharose 6 % Tris 10mM, pH 7,4 NaCl 150 mM Triton X-114 0,06 %
Saponin-Lysepuffer	Saponin 0,015 % (150 mg/l) SSC 1 x
SSC (Saline Sodium Citrat Puffer, 20x), pH7,0	NaCl 3 M Natriumcitrat 0,3 M
Transferpuffer für Westernblot	Tris 6 g Glycin 3 g SDS 10 % 3,75 ml Methanol 200 ml Ad 100 ml H ₂ O _{dest}

2.12.2 Wachstumsmedien für Bakterien

LB-Flüssigmedium

Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	5 g/l
NaCl	5 g/l
MgSO ₄ /MgCl ₂ 1M	2 ml/l
NaOH 10M	400 µl

Adjustieren des pH-Wertes bei 7,5 und anschließend autoklavieren. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums erfolgt die Zugabe des Antibiotikums / der Antibiotika (Ampicillin 1:1000 ~1 ml Medium + 1 µl AB, Stock 100 mg/ml).

LB-Agarplatten

Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	5 g/l
NaCl	5 g/l

MgSO₄/MgCl₂ 1M 2 ml/l

NaOH 10M 400 µl

Adjustieren des pH-Wertes bei 7,5 und anschließend hinzufügen von 20 gr Agar/l. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums erfolgt die Zugabe des Antibiotikums/der Antibiotika (Ampicillin 1:1000 ~1 ml Medium +1 µl AB, Stock 100 mg/ml).

LBG-Flüssigmedium

Hefeextrakt 5 g/l

Trypton 5 g/l

NaCl 5 g/l

Glukose 5 gr/l

MgSO₄/MgCl₂ 1M 2 ml/l

NaOH 10M 400 µl

Adjustieren des pH-Wertes bei 7,5 und anschließend autoklavieren. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums erfolgt die Zugabe des Antibiotikums/der Antibiotika (Ampicillin 1:1000 ~1 ml Medium +1 µl AB, Stock 100 mg/ml).

LBG-Agarplatten

Hefeextrakt 5 g/l

Trypton 5 g/l

NaCl 5 g/l

Glukose 2 g/l

MgSO₄/MgCl₂ 1M 2 ml/l

NaOH 10M 400 µl

Adjustieren des pH-Wertes bei 7,5 und anschließend hinzufügen von 20 g Agar/l. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums erfolgt die Zugabe des Antibiotikums/der Antibiotika (Ampicillin 1:1000 ~1 ml Medium +1 µl AB, Stock 100 mg/ml).

2.12.3 Wachstumsmedien für Hefen

YPGR

- | | |
|----------------|------|
| a) Hefeextrakt | 10 g |
| (Vollmedium) | |
| Pepton | 20 g |

Mit *Aqua bidest* ad 500 ml auffüllen und anschließend autoklavieren.

- | | |
|--------------|------|
| b) Galaktose | 40 g |
| Raffinose | 20 g |

Mit *Aqua bidest* ad 500 ml auffüllen und anschließend autoklavieren.
Im Folgenden werden die autoklavierten Lösungen (a) und (b) unter sterilen Bedingungen zusammengeführt.

SD (-His/+Ura)

- | | |
|------------|------|
| a) Glukose | 20 g |
| Agar | 20 g |

Mit *Aqua bidest* ad 900 ml auffüllen und anschließend autoklavieren.

- | | |
|---|-------|
| b) YNB | 1,7 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 5 g |
| Adenin (2 mg/ml) | 2 ml |
| Lysin (10 mg/ml) | 6 ml |
| Leucin (10 mg/ml) | 6 ml |
| Tryptophan (10 mg/ml) | 4 ml |
| Uracil (10 mg/ml) | 10 ml |

Mit *Aqua bidest* ad 100 ml auffüllen und steril filtrieren.

Nach Abkühlen der Lösung (a) hinzufügen von Lösung (b) unter sterilen Bedingungen.

SD (-His/-Ura)

a) Glukose	20 g
Agar	20 g

Mit *Aqua bidest* ad 900 ml auffüllen und anschließend autoklavieren.

b) YNB	1,7 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
Adenin (2 mg/ml)	2 ml
Lysin (10 mg/ml)	6 ml
Leucin (10 mg/ml)	6 ml
Tryptophan (10 mg/ml)	4 ml

Mit *Aqua bidest* ad 100ml auffüllen und steril filtrieren

Nach Abkühlen der Lösung (a) hinzufügen von Lösung (b) unter sterilen Bedingungen.

SGR (-His/+Ura)

a) Galaktose	40 g
Raffinose	20 g
Agar	20 g

Mit *Aqua bidest* ad 900 ml auffüllen und anschließend autoklavieren.

b) YNB	1,7 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
Adenin (2 mg/ml)	2 ml
Lysin (10 mg/ml)	6 ml
Leucin (10 mg/ml)	6 ml
Tryptophan (10 mg/ml)	4 ml
Uracil (10 mg/ml)	10 ml

Mit *Aqua bidest* ad 100ml auffüllen und steril filtrieren

Nach Abkühlen der Lösung (a), Hinzufügen von Lösung (b) unter sterilen Bedingungen.

SGR (-His/-Ura)

a) Galaktose	40 g
Raffinose	20 g
Agar	20 g

Mit *Aqua bidest* ad 900ml auffüllen und anschließend autoklavieren.

b) YNB	1,7 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
Adenin (2mg/ml)	2 ml
Lysin (10mg/ml)	6 ml
Leucin (10mg/ml)	6 ml
Tryptophan (10mg/ml)	4 ml

Mit *Aqua bidest* ad 100ml auffüllen und steril filtrieren.

Nach Abkühlen der Lösung (a) Hinzufügen von Lösung (b) unter sterilen Bedingungen.

2.12.4 Wachstumsmedien für Plasmodien

RPMI-1640 Grundmedium

RPMI-1640 Pulver	9,66 g
HEPES (free acid)	5,53 g
Hypoxantin	46,5 mg

Mit *Aqua bidest* ad 1000 ml auffüllen und steril filtrieren

RPMI-1640 Kulturmedium

Pro 500 ml RPMI-1640 Grundmedium Zugabe von je	NaHCO ₃	20 ml
	Neomycin	5 ml
	Glutamin	5 ml
	FFP	25 ml

Erythrozyten

Die für die Kultivierung von *P. falciparum* verwendeten sterilen, Leukozyten-armen Erythrozytenkonzentrate der Blutgruppe A⁺ wurden von der Blutbank des Universitätsklinikums Marburg zur Verfügung gestellt und waren zum Zeitpunkt der Weiterverarbeitung nicht älter als 10 Tage.

Mithilfe eines Bluttransfusionssystems wurden die Erythrozyten unter sterilen Bedingungen in 50 ml Eppendorf- Rörchen aliquotiert und zentrifugiert (800 x g, 5 min, 4 °C), in steriles PBS überführt und wiederum zentrifugiert. Dieses im Folgenden als „Waschen“ bezeichnete Vorgehen wurde nochmals wiederholt und das Sediment anschließend im Verhältnis 1:1 mit dem *RPIM-1640 Nährmedium* verdünnt (Hämatokrit 50 %).

Die gereinigten Aliquots werden daraufhin im Kühlschrank bei 4 °C gelagert und sind in diesem Zustand bis zu 7 Tage nutzbar.

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1. *In vitro* Kulturen von *P. falciparum*

3.1.1.1 Züchtungsbedingungen

Unter Einsatz eines gasdichten Inkubators (Modular Incubator Chamber; Billups-Rothenberg, Del Mar, CA, USA) wurden die Parasiten mit einem aus 5 % O₂, 5 % CO₂ sowie 90 % N₂ bestehenden Gasmisch inkubiert und bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

Das Medium wurde in einem ein- bis maximal zweitägigen Abstand ausgetauscht und vollständig erneuert. Hierzu wurde die Petrischale in eine leichte Kippung verbracht, wodurch das Medium unter Zuhilfenahme einer sterilen Pipette abgesaugt werden konnte, ohne die am Boden der Schale befindlichen Erythrozyten zu schädigen oder zu entfernen. Anschließend wurden die Kulturen mit je 10 - 15 ml 37 °C warmem Medium aufgefüllt. Um ein Hämatokrit von circa 5 % aufrechtzuerhalten, wurden bei Bedarf einige Microliter der vorbehandelten Erythrozyten beigefügt.

3.1.1.2 Reaktivierung der Kryostabilate

Nach dem Auftauen der Kryostabilate im 37°C warmen Wasserbad wurde der Inhalt in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen transferiert und unverzüglich mit der tropfenweisen Zugabe von 5 ml Medium begonnen. Dieser Vorgang wurde über einen Zeitraum von 10 - 15 min ausgeführt. Anschließend wurde das Röhrchen über 5 min mit 500 G bei 24 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde daraufhin dreimal mit 37 °C warmem Medium gewaschen, um das DMSO möglichst vollständig zu entfernen. Abschließend wurden die so reaktivierten Parasiten in eine Petrischale verbracht und mit 700 µl der 50 % Erythrozyten Lösung sowie 10 ml Kulturmedium versorgt.

3.1.1.3 Kontrolle der Parasitämie und des Wachstums der Kulturen

Wachstum und Zustand der Plasmodien wurde regelmäßig mittels Parasitenkulturausstrichen überprüft. Hierzu wurde der Ausstrich in Methanol fixiert und getrocknet. Danach wurden die luftgetrockneten Präparate für 5 bis 15 min mit einer Variation der Giemsa-Färbung angefärbt (*Färbelösung für Plasmodienkulturen*) und anschließend mit Leitungswasser abgespült und erneut an der Luft getrocknet. Abschließend wurde mikroskopisch die aktuelle Parasitenkonzentration der Kulturen

bestimmt. Hierbei sollte die Parasitämie die Grenzwerte 0,2 % bzw. 15 % nicht unter- bzw. überschreiten.

3.1.1.4 Isolation der Plasmodien aus der in-vitro-Kultur

(modifiziert nach Goman et al., 1982)

Zunächst wurden die Kulturen in Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt, abzentrifugiert (500 G, 4 °C, 7 min) und zweimal mit eisgekühltem PBS gewaschen. Das verbleibende Pellet wurde in 40 ml Saponinlösung aufgenommen und unverzüglich geschüttelt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Während der nachfolgenden Zentrifugation der lysierten Kultur (4000 rpm, 4 °C, 15 min) sedimentieren zuerst die freigesetzten Plasmodien. Das darüber befindliche milchig-weiße Sediment aus Erythrozytenmembranen („Ghosts“) sowie der restliche Überstand wurden verworfen.

Anschließend wurden die Parasiten nochmals zweimal mit PBS gewaschen. Das zurückbleibende Sediment aus Parasiten, welche noch innerhalb der parasitophoren Vakuolen befindlichen waren, konnte nun unter Zugabe geringer Mengen PBS bei -80°C eingefroren werden. Eine geringgradige Verunreinigung mit Erythrozytenmembranen wurde toleriert.

Alle aufgeführten Schritte wurden auf Eis ausgeführt.

3.1.1.5 DNA-Extraktion aus Plasmodien

Zur Extraktion der DNA wurden entweder frisch isolierte Plasmodien verwendet oder solche, die als Pellet bei -80 °C gelagert wurden. Das Pellet wurde zunächst mit 5 ml 0,1 M EDTA resuspendiert.

Anschließend wurden der Lösung 400 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 5 ml Lysepuffer zugesetzt, mittels Vortex gemischt und für 1 - 2 h bei 55 °C inkubiert.

Danach wurden erneut 200 µl Proteinase K sowie 5 ml Lysinpuffer hinzugegeben und die Probe leicht geschüttelt. Nach einer erneuten Inkubation für 1 h bei 55 °C erfolgte eine Phenolextraktion, um die DNA von den Proteinen zu trennen.

3.1.2 In vitro-Kulturen von *Saccharomyces cerevisiae*

3.1.2.1 Züchtungsbedingungen

Der Stamm YPH 499 (Stratagene) konnte den Beständen der AG Schwarz entnommen werden. Etwa 50 µl des bei -80 °C aufbewahrten Kryostabilats wurden in 10 ml YPGR-Medium inokuliert und bei 26 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Der verwendete Hefestamm von *S. cerevisiae* hat eine Verdopplungszeit von etwa 2 - 3 h. Nach 2 Tagen wurde das Wachstum von *S. cerevisiae* mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim) beurteilt sowie die Morphologie der Zellen mikroskopisch überprüft. Nachdem auf diese Weise ein ausreichendes Wachstum des Stammes nachgewiesen werden konnte, wurden je 2 ml der Flüssigkultur in 50 ml YPGR überführt und wiederum für 1 - 2 Tage bei 26 °C auf dem Schüttler inkubiert.

3.1.2.2 Herstellen von Kryostabilaten

Sowohl vom Wildtyp YPH 499 als auch von der im Zuge der Dissertation hergestellten Mutante wurden Kryostabilate angelegt.

Hierzu wurde mittels Bestimmung der OD bei 600 nm zunächst die Zellzahl der entsprechenden Flüssigkulturen bestimmt. Eine OD_{600nm} von 1,5 entspricht etwa 1×10^8 Zellen pro ml.

Im Folgenden wurden 50 ml YPGR mit 4×10^6 Zellen beimpft und für 4 - 6 h bei 26 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Die Flüssigkultur wurde nach Ablauf der Inkubationszeit zentrifugiert (10 min, 1800 x g, 4 °C) und das Pellet anschließend in 4 ml 4 x YPD/87 % Glycerin (1:1; v/v) resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert.

Das Stabilat wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und abschließend bei -80 °C verwahrt.

3.1.2.3 DNA-Extraktion aus Hefezellen

Nachdem 1 - 2 ml einer Dauerkultur des Hefestammes YPH 499 in je 50 ml frisches YPGR-Medium inokuliert und für 2 - 3 Tage bei 26 °C auf dem Schüttelinkubator reaktiviert worden waren, folgte eine Zentrifugation der Selbigen für 5 min bei 700 g und 4 °C. Das nach dem Verwerfen des Überstands verbleibende Hefezellenpellet wurde in 1 ml H_2O_{dest} resuspendiert und mit je 200 µl der DNA-Extraktionslösung versetzt. Nach Zugabe von Glas- und Keramik-Bits wurden die Ansätze für 5 min in der Mixer Mill inkubiert, um so die Zellwände der Hefen aufzubrechen. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 56 °C inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden den Hefe-Lösungen je 200 µl Ethanol zugefügt, diese anschließend bei 8000 rpm zentrifugiert und der Überstand in Silica-Filtersäulen (entnommen aus dem MiniPräp Kit) überführt.

Es wurden 500 μl des ebenfalls dem MiniPräp Kit entnommenen Wasch-Puffers AW1 hinzugefügt und das Ganze für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und die Silica-Säule in ein neues „collection tube“ verbracht. Es wurden 500 μl des Wasch-Puffers AW2 hinzugegeben und der Ansatz für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Erneut wurde das Zentrifugat verworfen und die Säule in ein neues „collection tube“ überführt.

Anschließend wurde die Säule durch eine Zentrifugation für 2 min bei 13000 rpm getrocknet und danach in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt.

Abschließend wurde die Hefe-DNA mit 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ eluiert. Hierbei ist zu beachten, dass der Zentrifugation der Säule für 1 min bei 8000 rpm eine 1-minütige Inkubationszeit vorausgehen muss, um möglichst viel DNA aus dem Filter der Silica-Säule zu lösen.

3.1.2.4 Lyse der Hefezellen

Die auf SD-Platten kultivierten Hefe-Klone wurden mithilfe eines Plastikschabers geerntet und in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ überführt. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 8000 rpm bei 4 °C.

Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet mit 500 μl Y-PER versetzt, durch starkes Schütteln mittels Vortex resuspendiert und anschließend für 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden dem Ansatz 150 μl Lämmli-SDS-Proben-Puffer hinzugefügt und die Lösung bei 100 °C für 10 min aufgeköcht.

Abschließend wurde die Probe erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Hefezelllysate konnte nun für andere Versuche genutzt werden.

3.2 Molekulargenetische Verfahren

3.2.1 Polymerasekettenreaktion

Die Mitte der 80er-Jahre entwickelte Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona 1987; Saiki et al. 1985) ermöglicht eine selektive Amplifikation von DNA-Sequenzen.

Durch Erhitzen der Probe werden in einem ersten Schritt die Wasserstoffbrückenbindungen der Doppelstränge denaturiert und so die beiden gegengleichen DNA-Matrizen separiert.

Anschließend wird die Temperatur gesenkt, um eine Anlagerung der spezifischen DNA-Primer zu ermöglichen. Die benötigte Hybridisierungstemperatur ergibt sich hierbei aus der Zusammensetzung der Oligonukleotid-Primer und kann mithilfe folgender Formel

berechnet werden: $Temp_{Hybr} = 4 \times \Sigma[C + G]^{\circ}C + 2 \times \Sigma[A + T]^{\circ}C - 5^{\circ}C$. Die verwendeten Oligonukleotide sind jeweils zu einem bestimmten Abschnitt der beiden ssDNA-Stränge komplementär und bestimmen somit die zu amplifizierende Sequenz (Sense/Vorwärts- bzw. Antisense/Rückwärts-Primer).

Im Zuge der Elongation ergänzt eine DNA-Polymerase, beginnend am 3'-Terminus der Stränge, die jeweils fehlenden Nukleotide.

Der Zyklus aus thermischer Denaturierung, Primerhybridisierung und Amplifikation wird mehrfach wiederholt und ermöglicht so eine exponentielle Zunahme des zwischen den Primern gelegenen DNA-Abschnitts.

Voraussetzung für die schnelle und einfache Durchführbarkeit dieser Methode ist der Einsatz hitzestabiler Enzyme. Die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte Taq-DNA-Polymerase übersteht die für die Denaturierung notwendigen Temperaturen von 95 bis 98 °C nahezu ohne Aktivitätsverluste. Eine weitere Besonderheit der verwendeten Taq-DNA-Polymerase ist die Fähigkeit, während der PCR ein einzelnes Desoxyadenin an den Enden der PCR-Produkte zu ergänzen, welches für die nachfolgende Klonierung in den Vektor, welcher am 3'-Terminus ein überhängendes Desoxythymidin aufweist, essenziell ist.

Im Nachfolgenden ist beispielhaft ein PCR-Ansatz aufgeführt:

Phusion®	1 µl (1 u/µl)
Phusion® 5x High Fidelity Puffer / Phusion® 5x GC Puffer	10 µl
Senes Primer (10 µM)	2,5 µl
Antisense Primer (10 µM)	2,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,5 µl
DNA	variabel (10 ng-1µg)
dH ₂ O	add 50 µl

PCR-Zyklus-Parameter

Denaturierung vor dem 1. Zyklus	98 °C	2 min
---------------------------------	-------	-------

Denaturierung	98 °C	30 s	35x
Hybridisierung	41 °C – 55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Unter Anlage eines elektrischen Feldes ist es möglich, DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufzutrennen und so den Erfolg vorangegangener Versuche wie unter anderem die PCR, Plasmidisolierung oder Restriktionsverdau zu überprüfen.

Das verwendete Horizontalgel weist eine Agarosekonzentration von circa 1% (w/v) in 1x TAE-Puffer auf. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet.

Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 6x konzentriertem DNA-Probenpuffer versetzt. Ergänzend wurde eine Geltasche mit einem, mit der erwarteten Fragmentgröße korrelierenden DNA-Marker beladen, welcher die Auswertung des Agarosegels vereinfacht.

Es wurde eine Spannung von 5 V/cm angelegt und die Proben so über 90 min aufgetrennt. Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel für circa 10 - 15 min in Ethidiumbromid (2,5ng/ml) geschwenkt und anschließend für weitere 10 - 15 min Wasser entfärbt. Der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid ermöglicht es, die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen.

3.2.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um die DNA-Isolation aus Agarosegelen zu bewerkstelligen, wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Fa. Qiagen) verwendet.

Hierzu wurden zunächst die elektrophoretisch separierten DNA-Fragmente bei 360 nm UV-Licht sichtbar gemacht und die entsprechenden Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten.

Anschließend wurde das Präparat gemäß den Angaben des Herstellers eluiert und gereinigt.

Eine Probe der gewonnenen DNA wurde abschließend erneut auf eine Agarosegel aufgetragen, um den Erfolg der Extraktion hierdurch zu verifizieren.

3.2.4 Bestimmen der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mithilfe des Absorptionsspektrometers Nanodrop (Software: ND-1000-V3.3.0) photometrisch bei 260 nm bestimmt. Bei DNA-haltigen

Lösungen entspricht ein Extinktions-Koeffizient von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm einer Konzentration von etwa 50 ng/μl, bei RNA-haltigen Lösungen entspricht ein Extinktions-Koeffizient von 1 bei 260 nm etwa 40 ng/μl. Für einzelsträngige Nukleinsäuren, wie z.B. Oligonukleotide, entspricht ein Extinktions-Koeffizient von 1 etwa 33 ng/μl (Sambrook et al., 1989).

3.2.5 Restriktionsverdau

Damit die gewünschten DNA-Sequenzen (Insert) im Zuge der Ligation in das bereitgestellte Plasmid integriert werden können, war zunächst ein Verdau sowohl der DNA-Probe als auch des verwendeten Vektors mittels einer sequenzspezifischen Restriktionsendonuklease notwendig. Diese ist in der Lage, die Proben in Fragmente definierter Größe zu zerlegen.

Hierbei wurden vorrangig Enzyme verwendet, die durch das Auftrennen der Doppelstrang-DNA überhängende 3`-Enden («sticky ends») erzeugen. Die so erhaltenen komplementären Überhänge erleichtern die korrekte Insertion des DNA-Fragments.

Nachstehend ist beispielhaft ein Reaktionsansatz aufgeführt:

a) PCR-Fragment

Restriktionsendonuklease z. B. EcoRI	10 U
Reaktionspuffer z.B. Cutsmart 10x	6 μl
PCR-Fragment	2 μg
H ₂ O _{dest}	<i>ad</i> 60 μl

b) Vektor-DNA

Restriktionsendonuklease z. B. EcoRI	10 U
Reaktionspuffer z.B. Cutsmart 10x	4 μl
PCR-Fragment	1 μg
H ₂ O _{dest}	<i>ad</i> 40 μl

Die Inkubationszeiten und -temperaturen orientierten sich an den Herstellerangaben. In der Regel wurden die Reaktionsansätze über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Um die verwendeten Enzyme und Puffer zu inaktivieren bzw. zu entfernen, wurden die

Proben im Anschluss an den Verdau unter Zuhilfenahme des «PCR Purification Kits» der Firma Qiagen entsprechend der Protokolle gereinigt.

3.2.6 Dephosphorylierung von DNA

Der unter 3.2.5 beschriebene Restriktionsverdau bedingt die Bildung freier Phosphatgruppen am 5'-Terminus der behandelten vektorischen DNA (Plasmid-DNA). Vor der Integration der ebenfalls mittels Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente gilt es, diese Gruppen zu inaktivieren bzw. abzuspalten, um einer Selbstligation der linearisierten Plasmide vorzubeugen.

Hierzu wurde den vorbehandelten Expressionsvektoren nach folgendem Schema das Enzym „Alkalische Phosphatase“ (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIAP), 20 U/μl), zugesetzt:

Plasmid-Probe + 0,5-5 μl AP	→ Inkubation für 30 min bei 37 °C
Plasmid-AP-Probe + 0,5-5 μl AP	→ Inkubation für 30 min bei 37 °C

Nach Ablauf des 2. Inkubationszyklus wurde das Enzym mithilfe des „PCR Purification Kit“ entfernt und das dephospholylierte Reaktionsprodukt hierdurch erneut aufgereinigt.

3.2.7 Ligation von DNA mittels T4-DNA-Ligase

Im Anschluss an die unter 3.2.5 und 3.2.6 beschriebene Vorbehandlung der DNA-Fragmente und Expressionsvektoren galt es nun, die beiden Komponenten zu verknüpfen. Hierzu wurde das bakterielle Enzym T4-Ligase verwendet, welches die DNA-Doppelstränge unter Ausbildung von Phosphodiesterbindungen kovalent verbindet.

Mithilfe der Absorptionsspektrometrie (Nanodrop) wurden zunächst die Konzentrationen von Vektor und Insert bestimmt und anschließend die Ligation gemäß dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt und über Nacht bei 16 °C im PCR-Cycler inkubiert. Im Nachfolgenden ist beispielhaft ein Reaktionsansatz aufgeführt:

T4-Ligase	2 μl (1U/μl)
T4-Ligationspuffer (10x)	2 μl
Insert-DNA (100 ng/μl)	5 μl
Vektor-DNA (20 ng/μl)	11 μl

Abschließend erfolgte die Transformation der ligierten Konstrukte in chemisch kompetente XL1-blue *E. coli*-Bakterien. Hierzu wurden 5 μl des Ligationsansatzes in *E.*

coli transformiert und diese auf Ampicillin-haltigen (Selektionsmedium) Agar-Platten ausplattiert.

3.2.8 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Aus dem *E. coli* Stamm XL1-blue wurden unter Zuhilfenahme des „Z-kompetenten *E. coli* Transform Kits“ (Zymo Research) chemisch kompetente Bakterien hergestellt. Zunächst wurden die Bakterien hierfür in 3 ml LB-Medium ohne Selektionsantibiotika überführt und bei 37 °C über Nacht auf dem Schüttler bei 225 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Morgen wurden 100 ml LB-Medium ohne Selektionsantibiotika mit 0,5 ml der Übernacht-Kulturen inokuliert und bei 24 °C auf dem Schüttler bei 225 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 - 0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gemäß den Herstellerangaben behandelt und die so gewonnenen kompetenten Zellen in 50 µl-Aliquot bei -80 °C gelagert.

3.2.9 Transformation von DNA in chemisch kompetente Bakterienzellen

Um Plasmid-DNA oder Ligationsprodukte in Bakterien zu transformieren, wurden zunächst 50 µl chemisch kompetente XL1-blue *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. In einem nächsten Schritt wurde(n) 1 - 10 µl der DNA-Konstrukte hinzugegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert.

Gemäß den Protokollen der Hitzeschock-Methode (Cohen, Chang, and Hsu 1972) wurde die Lösung nach Ablauf der Inkubationszeit für 30 s in einem Wasserbad mit 42 °C erhitzt und anschließend sofort für 2 min auf Eis abgekühlt, bevor 400 µl LBG-Medium hinzugefügt wurden.

Der Ansatz wurde in ein 15 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für 30 min im Brutraum bei 37 °C auf dem Schüttler bei 225 rpm inkubiert.

Abschließend wurden zwischen 10 µl und 200 µl der Lösung auf einer LB-Amp-Selektivplatte ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.2.10 Transformation von DNA in Hefezellen

Als Vorbereitung für die Transformation wurden zuvor gezüchtete Hefezellen des Stamms YPH 499 in einen Erlmeyerkolben überführt und nach Zugabe von 50 ml frischem YPGR-Flüssigmedium über Nacht bei 26 °C im Schüttelinkubator reaktiviert. Am nächsten Morgen wurde die Lösung in ein 50 ml Falcon-Röhrchen verbracht und für 30 min bei 4000 G und 4 °C zentrifugiert und anschließend auf Eis gelagert.

Mithilfe einer Pipette wurde der Überstand vorsichtig aufgenommen und verworfen. Das verbleibende Pellet wurde anschließend mit 2 ml H₂O_{dest} resuspendiert, in ein 2-ml-Eppendorf-Zentrifugationsgefäß pipettiert und bei 13000 rpm für 2 min bei 4 °C zentrifugiert (Pico). Dieser Schritt dient dem möglichst vollständigen Entfernen etwaig verbliebener Medium-Rückstände.

Anschließend erfolgte die Transformation der Hefezellen gemäß dem Protokoll der Lithium-Acetat-(LiAc)-Methode (Ito et al. 1983). Hierbei werden die Hefezellen durch die Inkubation in Lithiumacetat kompetent und sind somit in der Lage, fremde DNA aufzunehmen. Im Durchschnitt kann die Transformationsrate dieser Methode mit ca. 1 - 5 x 10⁴ Zellen pro µg eingesetztem Plasmid angegeben werden.

Nach dem Waschen des Pellets mit H₂O_{dest} wurde der Überstand wiederum entfernt, das Pellet mit 1 ml Hefetransformations-Puffer 1 (2.12.1) versetzt und erneut für 2 min bei 13000 rpm bei 4 °C zentrifugiert.

Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 400 µl Hefetransformations-Puffer 1 resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert.

Zur selben Zeit wurden die Plasmide als auch das Lachs-Sperma aufgetaut und Letzteres für 10 min bei 100 °C gekocht. Die denaturierte Lachs-DNA dient als „Helfer-DNA“ für die Transformation.

Ein repräsentativer Transformationsansatz ist im Folgenden aufgeführt:

Lachs-Sperma DNA (1 µg/µl)	10 µl
Kompetente Hefezellen	100 µl
Plasmid-DNA	1.10 µg
Hefetransformations-Puffer 2	300 µl

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle angeführten Komponenten in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß pipettiert und mittels Vortex vorsichtig aufgewirbelt und gemischt, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation bei 30 °C im Schüttelinkubator.

Im nächsten Schritt erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 15 - 20 min unter leichtem Schütteln sowie anschließend ein sofortiges Abkühlen auf Eis für 5 min.

Daraufhin wurden die Hefezellen für 1 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Pico) und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen.

Schließlich wurde das verbleibende Hefe-Pellet in 300 µl H₂O_{dest} resuspendiert und je 150 µl auf die jeweiligen Selektivplatten ausgestrichen (SGR^{-His-Ura} und SD^{-His-Ura}).

Die Platten wurden mit Parafilm luftdicht versiegelt und bei 26 °C für 3 - 5 Tage im Brutschrank inkubiert.

Begleitend zur Transformation der Plasmide mit Insert wurde stets auch eine Negativ-Kontrolle mit einem „leeren“ p426 MET 25-Plasmid ohne Insert durchgeführt.

3.2.11 Mini-Präp-Plasmidpräparation im kleinen Maßstab

Um Plasmide für weiterführende Versuche zu isolieren, wurden zunächst die nach der Transformation (3.2.9/10) bzw. Ligation (3.2.7) auf Ampicillin-haltigen und mit XGal und IPTG behandelten Agarplatten gezüchteten Klone gepickt. Hierbei wurde darauf geachtet, nur die weißen Kolonien zu übernehmen. Wurde das DNA-Fragment zuvor korrekt integriert, wurde dadurch die im Plasmid enthaltene β -Galaktosidase zerstört, wodurch das Bakterium die Fähigkeit verliert, einen blauen Farbstoff zu bilden und die gewünschten Klone demnach weiß imponieren.

Die Kolonien wurden mithilfe der Spitze einer 200 μ l Pipette von den Platten „gepickt“ und einzeln in 15-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit je 3 ml LB-Amp-Medium überführt.

Nach einer 16-stündigen Übernacht-Inkubation bei 37 °C auf dem Schüttler erfolgte am nächsten Tag die Zentrifugation der Ansätze bei 10000 G für 1 min bei RT. Zuvor wurde etwa 50 μ l pro Konstrukt separiert und für eine evtl. nachfolgende Reaktivierung bei 4 °C aufbewahrt.

Für die Isolation der Plasmide aus dem so gewonnenen Pellet wurde das Spin-protocol des E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Abschließend wurden die Konzentration der vektoruellen DNA mittels Absorptionsspektrometrie bestimmt (3.2.4) und die Konstrukte sequenziert (3.2.13).

3.2.12 Maxi-Präp-Plasmidpräparation im großen Maßstab

Unter Zuhilfenahme des E.Z.N.A.® Fastfilter Plasmid Maxi Kit konnte Plasmid-DNA im großen Maßstab extrahiert werden. Nachdem dank einer DNA-Sequenzierung (3.2.13) der Produkte der Mini-Präp (3.2.11) die korrekten Konstrukte ermittelt werden konnten, wurden die entsprechenden Kolonien in 200 ml LB-Amp-Medium inokuliert und für 16 h bei 37 °C über Nacht auf dem Schüttler bei 225 rpm reaktiviert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine Zentrifugation der Ansätze mittels Ultrazentrifuge (Rotor JA 10, 4000RCF x g, 4 °C, 10 min). Den Herstellerangaben folgend, wurde die vektoruelle DNA mittels Vacuum Protocol aus dem

Bakterienzentrifugat isoliert und erneut sequenziert. Abschließend wurde die Konzentration der vektoriellen DNA mittels Absorptionsspektrometrie bei 260 nm bestimmt (3.2.4).

3.2.13 DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung der Basenfolge wurden die Proben der Firma SeqLab Sequence Laboratories (Göttingen) übersandt, welche diese mithilfe der Kettenabbruchmethode sequenzierte (Sanger, Nicklen, and Coulson 1992).

Hierzu wurden je 13 - 17 µl der Plasmid-DNA mit 3 µl des entsprechenden Sequenzier-Primers versetzt und mit H₂O_{dest} auf 20 µl adjustiert.

Alle weiteren für die Sequenzierung notwendigen Reagenzien wurden von SeqLab hinzugegeben.

Nach Erhalt der Resultate wurde die Richtigkeit der Sequenzen unter Zuhilfenahme von NCBI-Blast, NCBI-Align-Two Sequences und des Vektorprogramms CloneChart verifiziert und Konstrukte, die etwaige nicht gewünschte Punktmutationen oder Frameshifts aufwiesen, aussortiert.

Im Zuge dieser Promotionsarbeit wurden sämtliche DNA-Proben sequenziert und so die korrekten Konstrukte ausgewählt.

3.2.14 Entfernen der Intron-Sequenz aus dem Gen *PfCA*

3.2.14.1 *Via Sitemutagenesis*

Das 2007 von M. D. Hansson et al. weiterentwickelte Verfahren der PCR-vermittelten Mutagenese ermöglicht es, die für die weiteren Versuche hinderliche Intron-Sequenz des Gens *PfCA* zu entfernen (Hansson et al. 2008).

Hierbei spielt die Fähigkeit des Bakteriums *E. coli in vivo* DNA-Rekombination bei Vorliegen homologer Enden zu vollbringen, eine entscheidende Rolle. Aufgrund dieser Eigenschaft genügt ein PCR-Durchgang mit zwei komplementären Primern. Eine Ligation oder vorangehende Aufreinigung ist nicht notwendig.

Die Sequenz des Primers *PfcaDelIntS* entspricht einem invertierten Komplement von 16 - 20 Basen upstream kombiniert mit 16 - 20 Basen downstream des zu entfernenden Introns. Die Basenfolge des Oligonukleotids *PfcaDelIntAS* wird gegengleich zum Erstgenannten konstruiert (vgl. 2.7).

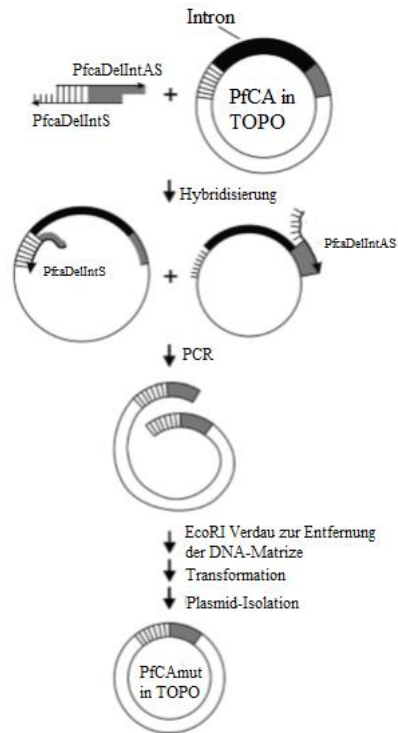


Abb. 5a: Schematische Darstellung der PCR-vermittelten Modifikation einer Plasmid-DNA. Die zu entfernende Basenfolge ist in Schwarz dargestellt, die komplementären Oligonukleotidsequenzen jeweils in Grau bzw. gestreift. (modifiziert nach (Hansson et al. 2008))

Im Nachfolgenden ist der verwendete PCR-Ansatz aufgeführt:

PhuUltra® HF	1 µl
Phu® 10x High Fidelity Puffer	5 µl
Senes Primer (10 µM)	1 µl
Antisense Primer (10 µM)	1 µl
dNTP-Mix (10 mM)	5 µl
MgCl ₂	2,5 µl
DNA	50 ng
ddH ₂ O	add 50 µl

PCR-Zyklus-Parameter

Denaturierung vor dem 1. Zyklus	95 °C	30 s	16 - 18x
Denaturierung	95 °C	30 s	
Hybridisierung	39 °C	30 s	
Elongation	68 °C	min/0,5 kb	
Finale Elongation	68 °C	10 min	

Zur Berechnung der möglichst exakten Elongationszeit wurde die Länge der erwarteten intronfreien Sequenz herangezogen (Länge des Ursprungs-Plasmids – Länge des Introns).

Nach Ablauf der PCR wurde der Ansatz mit 10 U *DpnI* verdaut, um die überflüssige Matrizen-DNA zu entfernen.

DpnI ist in der Lage, methylierte DNA zu binden. Diese Methylierung findet sich jedoch nur an DNA, die zuvor durch Bakterien repliziert und modifiziert wurde. Somit können die aus der initialen Minipräp gewonnenen DNA-Templats, welche noch immer das Intron enthalten, verdaut und zerstört werden. Erhalten bleiben die neu synthetisierten DNA-Stränge ohne Intron.

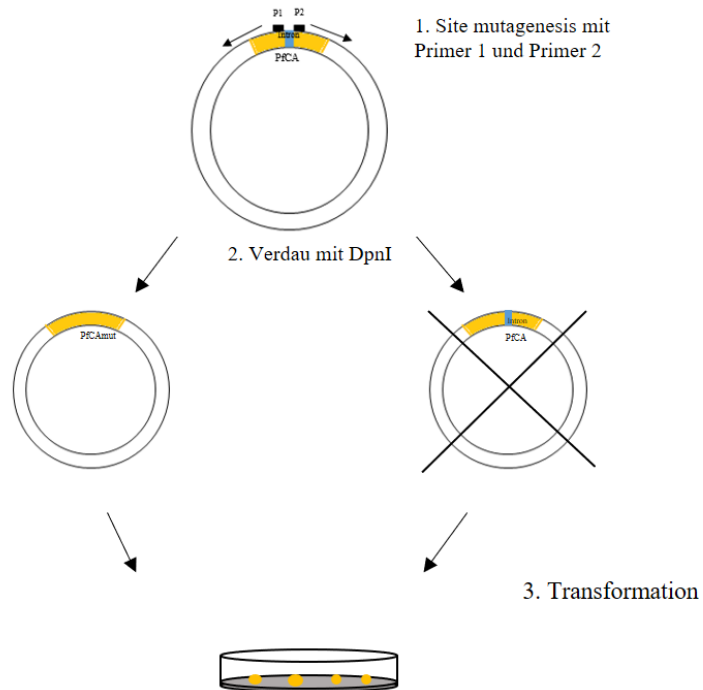


Abb. 5b Verdau mit *DpnI*: Durch den Verdau mit *DpnI* kann die methylierte MatrizenDNA entfernt werden. Zurück bleiben die intronfreien DNA-Stränge.

Abschließend wurde die Sequenz *PfCAmut* in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und über Nacht bei 30 °C auf mit X-Gal und IPTG vorbehandelten Agarplatten mit Selektionsmedium kultiviert (Agarplatten mit 40 µl [20 mg/ml X-Gal] und 40µl IPTG [100mM] per LB Platte + Ampicillin).

Der Nachweis über das erfolgreiche Entfernen der Intron-Sequenz wurde mithilfe einer DNA-Sequenzierung (3.2.13) erbracht.

3.2.14.2 Via *QuickChange II Site Directed Mutagenesis Kit*

50 ng der zuvor isolierten vollständigen DNA-Sequenz des Gens *PfCA* wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers der „*Mutant Strand Synthesis Reaction; Thermal Cycling*“ unterzogen. Die verwendeten Oligonukleotid-Primer sind mit denen der unter 3.2.14.1 aufgeführten Methode identisch (*PfcaDelIntS*; *PfcaDelIntAS*).

Entsprechend den Angaben des Protokolls wurde der Ansatz nach Zugabe der *PfuUltra* ®HF DNA Polymerase 18 PCR-Zyklen unterzogen, um das 149 Basenpaare große Intron vollständig zu entfernen.

PCR-Zyklus-Parameter

Denaturierung vor dem 1. Zyklus	95 °C	30 s	
Denaturierung	95 °C	30 s	18x
Hybridisierung	55 °C	30 s	
Elongation	68 °C	1 min/kb Intron-Seq.	
Finale Elongation	68 °C	10 min	

Nach einer abschließenden 2-minütigen Inkubation auf Eis wurde das PCR Produkt in *XL 10 Gold ultracompetent cells* transformiert und 30 °C über Nacht auf mit X-Gal und IPTG vorbehandelten Agarplatten mit Selektionsmedium kultiviert.

Der Nachweis über das erfolgreiche Entfernen der Intron-Sequenz wurde mithilfe einer DNA-Sequenzierung (3.2.13) erbracht.

3.2.15 Markierung der *PfCA* mittels Protein-Tag

Die Zuhilfenahme sogenannter Protein-Tags (engl. Tag = Schildchen) ermöglicht es, einzelne Proteine mit einer Markierung zu versehen, um diese zwecks genauerer Analysen selektiv isolieren zu können.

Die hierbei verwendeten kurzen Aminosäuresequenzen werden mittels PCR N-terminal

unmittelbar hinter dem Startcodon des zu markierenden Proteins integriert und anschließend in einen Expressionsvektor kloniert (TOPO TA CloningKit). Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, die Tag-Sequenz C-terminal unmittelbar vor dem Stopcodon zu inserieren.

Zu beachten ist in beiden Fällen, dass das Leseraster der zu untersuchenden Protein-Sequenz nicht verschoben wird, um eine fehlerhafte Translation zu vermeiden.

In einem nächsten Schritt kann der eingefügte Tag genutzt werden, um das Protein beispielsweise mittels antikörperbasierten Nachweismethoden sichtbar zu machen (vgl. 3.2.15, 3.2.16).

Im Zuge dieser Dissertationsarbeit wurde ein FLAG-Tag verwendet (Sequenz: DYKDDDK) (Hopp et al. 1988). Dieser wurde n-terminal integriert und erhöht die Proteinmaße um 1012 Da.

3.2.16 SDS-Page-Analyse und Western Blot

Das erstmals 1979 bzw. 1981 beschriebene molekularbiologische Verfahren des Western Blots (engl. Blot = Klecks Fleck; blotting paper = Löschpapier) dient dem Transfer zuvor mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennter Proteine auf eine Trägermembran. Die Proteine können danach weiteren Analysen unterzogen und gezielt nachgewiesen werden (Burnette 1981; Renart et al. 1979).

In einem ersten Schritt wurden die zu untersuchenden Proteine entsprechend ihrer Größe mittels Elektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurden Polyacrylamidgele (SDS-Page) vorbereitet, die im unteren Teil aus einem „Trenngel“ und im oberen Abschnitt aus einem „Sammelgel“ bestehen. Die Polymerisationszeit der einzelnen Gelkomponenten betrug je 20 Min. Anschließend wurden je 13 µl der entsprechenden Proteine der Klone sowie des Wildtyps auf ein SDS-Gel aufgetragen, die Elektrophoresekammer (BioRad) mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt und in einem senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feld bei 100 V über eine Stunde separiert. Um die spätere Analyse der Banden zu erleichtern, wurden gleichfalls 5 µl Page Ruler Plus aufgetragen.

Das Gel wurde anschließend 20 min unter ständigem Schütteln in Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt und die überschüssige Lösung anschließend durch je 20-minütiges Waschen mit Entfärber 1 und Entfärber 2 entfernt. Der verwendete Farbstoff lagert sich hierbei an den basischen Seitenketten der Proteine und ermöglicht dadurch eine

unspezifische Proteinfärbung, die zur Überprüfung der Auftrennung und zum Abschätzen der Proteinmenge genutzt werden kann.

Zur Durchführung des eigentlichen Western Blots wurden zehn 3M Whatman® Filterpapier auf eine Größe von 10 x 7,5 cm zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Fünf dieser Filterpapiere wurden anodenseitig in die Blotkammer gelegt. Die nächste Schicht bildete eine in Transferpuffer getränkte Whatman® Nitrocellulose Filtermembran (0,45 µm), auf welcher das entfärbte Gel zum Liegen kam. Katodenseitig komplettierten fünf weitere 3M Filterpapiere den Aufbau. Die Blotkammer wurde verschlossen und die Proteine bei einer Stromstärke von 60 mA über einen Zeitraum von 2 h vom Polyacrylamidgel auf die Trägermembran transferiert.

Abschließend wurde die Nitrozellulosemembran in die zuvor hergestellte „Milch“ verbracht und über Nacht inkubiert. Hierdurch werden die freien Stellen auf der Trägermembran mit einem Protein blockiert, welches für die anschließend verwendeten Antikörper nicht nachweisbar ist und ihre unspezifische Bindung verhindert.

3.2.17. Immundetektion des mit FLAG markierten Proteins

Die im Zuge dieser Dissertationsarbeit verwendete indirekte Immunfluoreszenz erlaubt es, gezielt einzelne Proteine sichtbar zu machen, um diese genaueren Untersuchungen und Analysen zu unterziehen.

In einem ersten Schritt wurde die proteinbeladene Nitrozellulosemembran des WesternBlots (vgl. 3.2.16) in 2ml eines 1:500 verdünnten monoklonalen Maus-Anti-FLAG-Antikörpers (Anti-FLAG M“ monoclonal produced in mouse) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dieser sogenannte Primärantikörper bindet spezifisch an ein Epitop der zuvor inserierten FLAG-Sequenz (vgl. 3.2.15).

Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen und dadurch die Qualität bzw. Aussagekraft der Immundetektion zu verbessern, wurde die Membran nach Ablauf der Inkubationszeit mit Detergentien nach folgendem Schema auf der Schüttelplatte gewaschen:

3x je 5 min in PBSTween

3x je 5 min in PBS

3x je 5 min in PBSTween

Anschließend folgte die Inkubation mit 2 ml eines 1:40000 verdünnten Immunkonjugats, bestehend aus eine Mausimmunglobulin (Anti-Maus, produced in Goat), welches mit einer Horesradish-Peroxidase (HRP; Meerrettichperoxidase) gekoppelt ist. Dieser Sekundärantikörper bindet den Fc-Teil des Primärantikörpers und ermöglicht so dessen Detektion.

Nach Ablauf einer 1,5-stündigen Inkubationszeit erfolgte ein erneutes Waschen nach dem oben aufgeführten Schema.

Die verwendete Peroxidase ist in der Lage, Luminol bzw. Dioetane in ihre oxidierte Form zu überführen und dadurch eine Chemolumineszenz zu induzieren, welche mithilfe des Bio-Rad Chemidoc MP Gel Imaging Systems sichtbar gemacht werden kann.

Hierzu wird das SuperSignal®West Fento Maximum Sensitivity Substrate der Firma Fisher ThermoScience verwendet und jeweils 500 µl SuperSignal®West Fento Luminal/Enhancer Solution sowie 500 µl SuperSignal®West Fento Stable Peroxide Buffer auf die Antikörper-behandelte Nitrozellulosemembran aufgetragen.

3.2.18 Aufreinigung des Triton X-114

Vor der Verwendung des Triton X-114 ist es notwendig, die oftmals enthaltenen hydrophilen Verunreinigungen aus dem Detergens zu entfernen (Bordier 1981).

Hierfür werden etwa 5 g Triton X-114 in 50 ml TBS-Puffer gelöst und anschließend für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Lösung trübt sich während dieser Zeit ein. Anschließend wird sie mithilfe einer Tischzentrifuge 10 min bei 1000 x g und 24 °C zentrifugiert, wodurch eine Auftrennung in 2 Phasen erfolgt. Die obere, Detergens-arme Phase wird verworfen, die untere Phase erneut mit TBS vermengt und die beschriebene Reinigungsprozedur noch 2 Mal wiederholt. Das abschließend erhaltene, aufgereinigte Triton X-114 kann bei 4 °C aufbewahrt oder eingefroren werden.

3.2.19 Triton X-114 Phasenseparation

Um das zu untersuchende Protein aus den transformierten Hefezellen zu isolieren, wurden die Flüssigkulturen zunächst abzentrifugiert und das entstandene Pellet mit 400 µl Hefelysepuffer resuspendiert und in Keramik- und Glasbeats enthaltende Eppendorfgefäße überführt. Zusätzlich wurde dem Ansatz 0,2 mM ZnCl₂ hinzugefügt, um die Aktivität einer möglicherweise vorhandenen PLC zu hemmen und eine Abspaltung des GPI-Ankers zu verhindern (Cross 1984). Die Proben wurden zunächst über 5 min „gevortext“ und anschließend nochmals 10 min mithilfe der Mixermill behandelt. Hierdurch soll eine

möglichst vollständige Zerstörung der Hefezellwand erreicht werden, um das gesuchte Protein aus den Zelltrümmern isolieren zu können (Cordero et al. 2009).

In einem nächsten Schritt wurden die Proben bei 0 °C für 10 min mit 9,6 rpm / 8,800 x g zentrifugiert.

Zeitgleich wurde eine Lösung, bestehend aus 2 ml Saccharose-Puffer und 13,4 µl des aufgereinigten Triton X-114, hergestellt und je 300 µl in Eppendorfgefäße aliquotiert. Anschließend wurde der bei der Zentrifugation gewonnene Überstand zugegeben und hierbei darauf geachtet, dass zwei separate Phasen, im Sinne einer Überschichtung, bestehen blieben. Daraufhin wurden die Proben bei 37 °C für 10 min inkubiert, wodurch eine Trübung der Reagenzien erreicht werden konnte. Abschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation der Lösungen bei 24 °C für 3 min mit 3000 x g. Die Detergens-haltige Phase bildet sich hiernach als öliges Tröpfchen am Boden des Gefäßes aus. Die Lokalisation des gesuchten Proteins kann nun mithilfe eines Western Blots eruiert werden (Bordier 1981; Pryde und Phillips 1986; Cordero et al. 2009).

3.3 Bioinformatische Methoden

3.3.1. Einführung

Ziel der bioinformatischen Studien im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens war es, durch die Entwicklung neuer Prädiktion-Algorithmen einerseits, als auch durch die Kombination bereits etablierter Programme andererseits, die GPI-Proteome verschiedener Plasmodienspezies möglichst vollständig zu detektieren und zugleich die Rate der Falsch-Positiven bzw. Falsch-Negativen zu minimieren.

Hierzu wurde ein deskriptiver Ansatz gewählt, welcher auf folgenden Parametern basiert:

- I. Anwesenheit eines N-terminalen Signalpeptids: Hierbei handelt es sich um eine hydrophobe Sequenz, welche die Translation des Proteins in das Endoplasmatische Retikulum bedingt. Selbige wurde mithilfe von SignalP und TmPred bestimmt.
- II. Vorhandensein einer C-terminalen GPI-Bindestelle (ω): Diese hydrophobe Sequenz wird von speziellen Transamidasen erkannt und geschnitten, woraufhin eine GPI-Verankerung möglich ist. Diese Schnitt- bzw. Bindestelle kann durch PredGPI und TmPred detektiert werden.
- III. Abwesenheit anderer Transmembrandomänen im Innern des Proteins bzw. Score < 1100.

Zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen der Daten ist lediglich ein Personalcomputer (PC) oder ein Macintosh (Mac) mit einer Internetverbindung notwendig. Die Wahl des verwendeten Internetbrowsers ist hierbei zweitrangig. Die manuellen Analysen einzelner Zwischenresultate erfolgten unter Zuhilfenahme der Microsoft Office©-Produkte Word, Excel und Access.

3.3.2 PlasmoDB

Die funktionelle Datenbank PlasmoDB ist Teil des EuPathDB-Projekts, welches es sich zur Aufgabe gemacht hat, möglichst umfassende und doch einfach zu handhabende Portale zur Analyse pathogener und non-pathogener Organismen zu erstellen (Aurrecoechea et al. 2017). Der Webdienst ist verfügbar unter:

PlasmoDB: <http://plasmodb.org/plasmo/>

EuPathDB: <https://eupathdb.org/eupathdb/>

PlasmoDB verfügt hierbei sowohl über genomische als auch funktionelle Daten von aktuell 21 Plasmodienspezies, einschließlich Informationen über Annotationen, Transkriptionsevidenzen, proteomische Evidenzen, Proteinfunktionen, Populationsbiologie und Evolution.

Die Website ermöglicht es, sowohl einzelne Gene als auch ganze Genome zu analysieren und zu visualisieren.

Um alle verfügbaren Informationen bezüglich des Gens bzw. Genoms von Interesse zu erhalten, kann der Nutzer zum einen gezielte Suchen mittels exaktem Gen-ID, Gen-Name oder Genprodukt-Name nutzen, oder andererseits mithilfe einzelner Fragen bzw. Fragefolgen Suchergebnisse kombinieren und die Resultate dadurch präzisieren (Aurrecoechea et al. 2009).

Die Datenbank wird stetig weiterentwickelt und ergänzt. Während der bioinformatischen Recherche im Zug dieser Promotionsarbeit standen auf der Homepage (29. Veröffentlichung Oktober 2016) lediglich die 8 folgenden Genome zur Verfügung:

P. falciparum, *P. vivax*, *P. berghei*, *P. chaubaudi chaubaudi*, *P. cynomolgi*, *P. knowlesi*, *P. reichenowi*, *P. yoelii yoelii*

Im Zuge zahlreicher Aktualisierungen (38. Version, Juli 2018) wurden die Genome von 13 weiteren Plasmodienspezies eingepflegt:

P. adleri, *P. billcollinsi*, *P. blacklocki*, *P. coatneyi*, *P. fragile*, *P. gaboni*, *P. gallinaceum*,
P. inui, *P. malariae*, *P. ovale curtisi*, *P. praefalciparum*, *P. relictum*, *P. vinckei*

3.3.3 SignalP

Mithilfe der Datenbank SignalP 4.1 des Zentrums für biologische Sequenzanalyse (CBS) der Technischen Universität Dänemark (<http://www.cbs.dtu.dk/index.shtml>) ist es möglich, sowohl das Vorhandensein von Signalpeptiden und auch die Lage möglicher Signalpeptidspaltungsstellen in den zu untersuchenden Aminosäuresequenzen zu detektieren. Das Programm ermöglicht die Analyse prokaryotischer als auch eukaryotischer Organismen (Nielsen et al. 1997b).

Der zugrunde liegende Algorithmus basiert auf der Fähigkeit des „maschinellen Lernens“. Hierbei wird durch das Lernen an ausgewählten Beispielen „Erfahrung“ generiert, welche im Anschluss an die Trainingsphase verallgemeinert und auf andere Datensätze übertragen werden kann. SignalP nutzt hierbei eine Kombination aus künstlichen neuronalen Netzwerken und Hidden Markov Modellen (Nielsen et al. 1999; Nielsen et al. 1997a). Durch die Weiterentwicklung der ursprünglichen Version ist die Software zusätzlich in der Lage, Transmembranregionen und Signalpeptide zu differenzieren (Petersen et al. 2011; Bendtsen et al. 2004). Der Webdienst ist verfügbar unter:

SignalP: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>

3.3.4 PredGPI

Circa 1 % aller genomisch codierten Proteine bzw. 10 bis 20 % der Membranproteine eukaryontischer Lebewesen werden im Zuge der posttranslationalen Modifikation kovalent an ein GPI-Ankermolekül gebunden (Orlean und Menon 2007). Wie bereits beschrieben, erfolgt im ER die proteolytische Abspaltung einer c-terminalen Peptidsequenz (Propeptid) vom Proteinvorläufer (Proprotein). Die Schnittstelle (ω -Stelle) befindet sich hierbei etwa 20 bis 30 Aminosäuren upstream des C-Terminus (Udenfriend und Kodukula 1995; Signorell und Menon 2009).

Basierend auf der Kombination eines Hidden Markov Model (HMM) sowie einer Support Vector Machine (SVM) ist der 2008 publizierte Algorithmus „PredGPI“ in der Lage, die ω -Schnittstelle mit hoher Wahrscheinlichkeit zu prognostizieren. Die SVM dient hierbei der Diskriminierung des Propeptids, während das HMM die wahrscheinlichste ω -Stelle errechnet (Pierleoni et al. 2008).

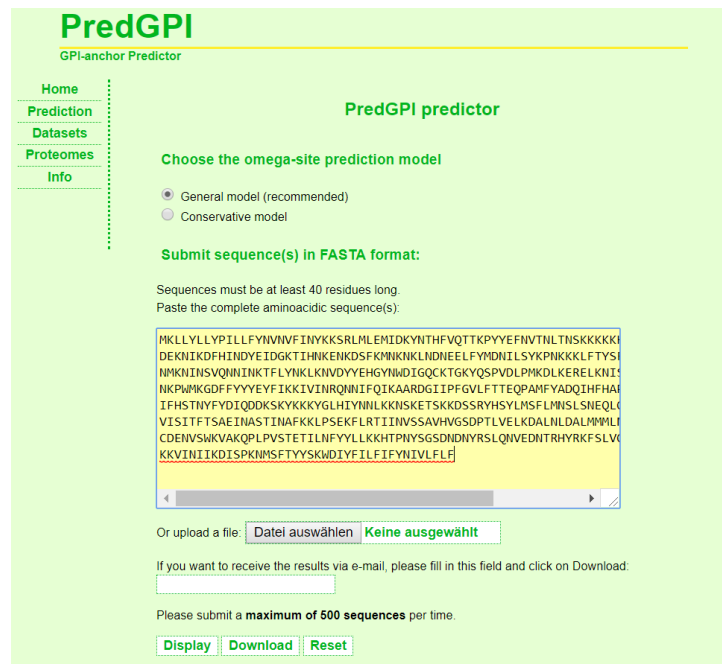


Abb.6: PredGPI-Benutzeroberfläche; Eingabe der AS-Sequenz von PF3D7_1140000 zur Untersuchung auf eine mögliche GPI-Verankerung

Im Zuge der Analyse der Proteome verschiedener Plasmodienspezies wurden die zu untersuchenden Aminosäuresequenzen in das Programm eingespeist, um hierdurch eine Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit und Position etwaiger Spaltstellen bzw. einer GPI-Verankerung zu erhalten. Der Webdienst ist verfügbar unter:

PredGPI: <http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/pred.htm>

3.3.5 TMpred (Transmembrane Predictor)

Die Software TMpred wurde konzipiert, um Proteine auf das Vorliegen etwaiger Transmembrandomänen hin analysieren zu können. Basierend auf der statistischen Auswertung von TMbase, einer Datenbank natürlich vorkommender membrandurchspannender Proteine, ist das Programm in der Lage, Aussagen sowohl über das Vorliegen als auch über die Orientierung möglicher Transmembranregionen treffen zu können. Der zugrunde liegende Algorithmus nutzt hierfür eine Kombination mehrerer gewichteter Matrizen für die finale Wertung der zu untersuchenden Aminosäuresequenz (Hofmann und Stoffel 1993). Der Webdienst ist verfügbar unter:

TMpred: https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html

Im Zuge dieser Dissertation nutzten wir TMpred, um die Proteome diverser Plasmodienspezies zu analysieren und sowohl mögliche n- als auch c-terminale hydrophobe Regionen einzelner Aminosäuresequenzen entsprechend einem Signalpeptid (n-term) bzw. einer GPI-Bindestelle (c-term) zu detektieren.

Prediction of Transmembrane Regions and Orientation

The TMpred program makes a prediction of membrane-spanning regions and their orientation. The algorithm is based on the statistical analysis of TMbase, a database of naturally occurring transmembrane proteins. The prediction is made using a combination of several weight-matrices for scoring.

- **K. Hofmann & W. Stoffel (1993)**
TMbase - A database of membrane spanning proteins segments
 Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374,166

For further information see the **TMbase** documentation.

- Usage: Paste your sequence in one of the supported **formats** into the sequence field below and press the "Run TMpred" button.
Make sure that the format button (next to the sequence field) shows the correct format
 Choose the minimal and maximal length of the hydrophobic part of the transmembrane helix

Output format: **html** | minimum: **17** | maximum: **33**

Query title (optional):

Input sequence format: **Plain Text**

Query sequence:
 or ID or AC or GI
 (see above for valid formats)

```

MKLLYLLYPILLFYNNVFIYKKSRLMLEMIDKYNTHFVQTTKPYEFNVTNLNSKK
KTKKKKREHNLIGSGENMQKK
DEKNIKDFHINDYEIDGKTIHNKENKDSFKMKNKLNDEELFYMDNLSYKPNKKKLF
TYSFSENEGNSKEETLYNFK
NMKNINSVQNNINKTFLYNLKNVDYEHGYNWDIGQCKTGKYQSPVDLPMKDLKEREL
  
```

Run TMpred | Clear Input

Abb. 7: TMpred-Benutzeroberfläche; Eingabe der AS-Sequenz von PF3D7_1140000 zur Untersuchung auf hydrophobe Domänen

Hierzu wurden die Proteinsequenzen der einzelnen Organismen der Datenbank PlasmoDB entnommen und in einer jeweiligen FASTA-Datei gebündelt und in TMpred eingespeist.

Anschließend wurden die Resultate im Zuge einer manuellen Analyse überprüft und entsprechend der Suchparameter eingegrenzt.

Am „*Institut de Biologie Computationelle*“ (IBC) in Montpellier wurde TMPred in C++ neu geschrieben und ist jetzt unter <https://github.com/rcanovas/TMPred> verfügbar. Die neue Version erlaubt es, alle internen Parameter zu modifizieren, die von TMPred zur Erkennung von Transmembrandomänen verwendet werden. TMPred dient hierdurch als Kernstück für eine GPI-Detektionssoftware, die sich diese Parameter zunutze macht, um bisher unbekannte GPI-Proteine anhand ihrer Struktur nachzuweisen. (Publikation ausstehend). Hierzu werden die zu untersuchenden Aminosäuresequenzen in einer FASTA-Datei gebündelt und automatisch an TMpred transferiert. Die Resultate dieses ersten Schritts werden als csv-Datei an die Software zurückgesandt und in einem zweiten Schritt gemäß der oben angeführten Vorgabe selektiert.

TMpred steht seit 2022 nicht mehr online zur Verfügung.

3.3.6 NGPhylogeny.fr

Basierend auf der Analyse phylogenetischer Zusammenhänge (Phylogenese von phylon altgr. Stamm und génesis altgr. Ursprung), bietet die Plattform Phylogeny.fr zum einen die Möglichkeit, etwaige Beziehungen und Homologien zwischen den

Aminosäuresequenzen des zu untersuchenden Datensatzes zu detektieren bzw. zu rekonstruieren, als auch die Option, die Sequenzen zu alignieren und abschließend die Ergebnisse in einem Stammbaum zu veranschaulichen.

Die Funktionen der durch das „Laboratoire d’Informatique de Robotique et de Microélectronique de Montpellier“ (LIRMM) in Kooperation mit dem „Laboratoire Information Génomique et Structurale“ (IGS-CNRS) entwickelten Software beruhen hierbei auf der Kombination verschiedener bioinformatischer Algorithmen. Die Verbindung zwischen eigens für diese Plattform entwickelten und bereits existierenden externen Programmen eröffnet eine Vielzahl an analytischen Möglichkeiten, welche sowohl den Anforderungen phylogenetischer Laien als auch den Bedürfnissen von Spezialisten genügen (Dereeper et al. 2008; Dereeper et al. 2010).

Phylogeny.fr stellt je nach Erfordernissen drei Programmvarianten zur Verfügung: den „One-click“-Modus für phylogentisch nicht-erfahrene Nutzer, den „Advanced“-Modus sowie den „A la carte“-Modus für Experten. Der Webdienst ist verfügbar unter:

NGPhylogeny.fr: <https://ngphylogeny.fr/>

Für Untersuchung der Plasmodien-Sequenzen im Zuge dieser Promotionsarbeit wurde die „One-Click“-Methode gewählt. Die entsprechenden Sequenzen wurden in einer FASTA-Datei gesammelt und in das Programm eingespeist und unter anderem mithilfe der eingebundenen Programme MUSCLE 3.7, Gblocks 0.91b, PhyML 3.0 und TreeDyn 198.3 analysiert (Edgar 2004; Chevenet et al. 2006; Guindon et al. 2010).

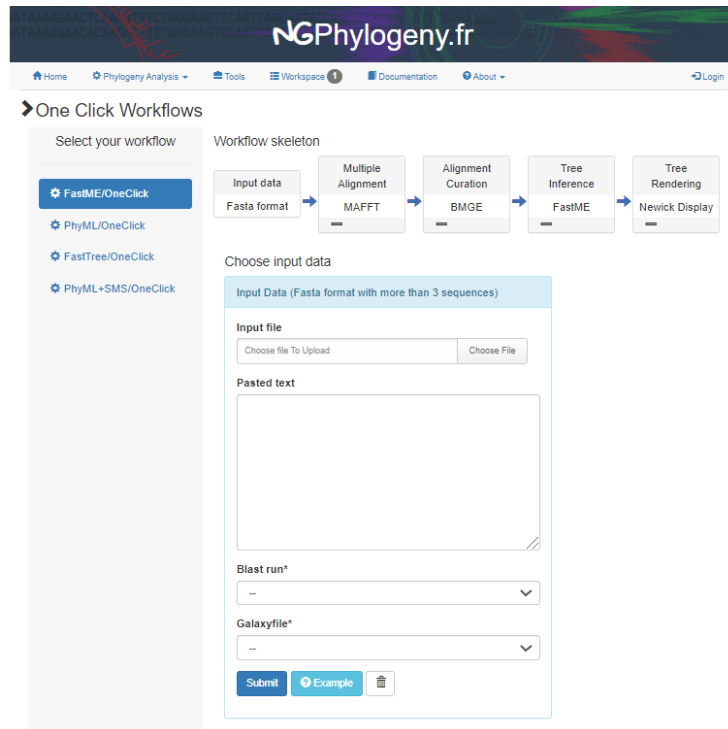


Abb. 8 Benutzeroberfläche des „One-Click“-Modus der Plattform NGPhylogeny.fr. Durch Einfügen der zu untersuchenden Aminosäuresequenzen (weißes leeres Feld) im FASTA-Format. Die eingebundenen Programme errechnen in mehreren Schritten eine Voraussage über die phylogenetischen Zusammenhänge der eingegebenen Sequenzen.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse der bekannten GPI-Proteine

Die Analyse der durch Gilson *et.al.* 2006 (Gilson et al. 2006) veröffentlichten experimentell und bioinformatisch detektierten potenziellen GPI-APs wurden unter Zuhilfenahme der bereits beschriebenen bioinformatischen Programme TMPred, SignalP und PredGPI untersucht.

Anhand der Gemeinsamkeiten wurde eine erste Eingrenzung der möglichen Suchkriterien für derartige Proteinsequenzen vorgenommen (vgl. Tab. 3). Ziel war es darüber hinaus, in diesem Schritt ein Set an richtig-positiven Proteinen zu definieren, auf das die späteren Suchläufe angewendet werden konnten.

ID	Proteinlänge	Beginn				TMPred				SignalP			PredGPI		Score
		Länge	Start	Stopp	Score	Länge	Start	Stopp	Dist_Ende	Score	Schnittstelle	Omega	C-term		
PF3D7_0930300	1720	18	3	20	2058	18	1703	1720	0	2644	0.845	20	1694	26	100
PF3D7_0206800	272	18	1	18	984	17	256	272	0	2045	0.427	NO	247	25	100
PF3D7_0207000	272	21	1	21	1539	17	256	272	0	2281	0.323	NO	249	23	99.9
PF3D7_0206900	272	17	3	19	2111	17	256	272	0	2446	0.309	NO	246	26	99.5
PF3D7_0502400	597	23	1	23	2102	17	581	597	0	2771	0.902	26	573	24	95.7
PF3D7_1133400	525	23	3	25	1589	17	509	525	0	1978	0.849	27	502	23	99.4
PF3D7_0612700	347	20	8	27	1041	23	325	347	0	2227	0.780	26	322	25	99.7
PF3D7_0508000	349	20	4	23	1829	21	329	349	0	2025	0.789	22	328	21	99.8
PF3D7_0304600	397	20	1	20	1072	17	380	396	1	1834	0.683	19	374	23	99.9
PF3D7_0707300	861	18	1	18	980	18	843	860	1	2231	0.551	21	839	22	100
PF3D7_0405900	731	17	2	18	509	18	714	731	0	2483	0.558	21	707	24	34.8
PF3D7_1031000	217	18	2	19	853	18	200	217	0	2252	0.677	23	192	25	99.6
PF3D7_1030900	218	18	2	19	1002	22	197	218	0	1478	0.712	23	195	23	99.9
PF3D7_0419700	325	21	4	24	1401	17	309	325	0	2228	0.537	25	300	25	100
PF3D7_1346800	439	19	3	21	2039	20	420	439	0	2882	0.465	NO	412	27	87.1
PF3D7_1346700	448	18	10	27	1112	17	432	448	0	2250	0.367	NO	426	22	64.0
PF3D7_0404500	478	20	12	31	2232	17	460	476	2	2077	0.172	NO	448	30	99.2
PF3D7_1364100	796	19	1	19	1398	23	774	796	0	2311	0.743	27	771	25	99.8
PF3D7_1420700	969	21	5	25	1968	21	949	969	0	2361	0.832	23	945	24	100
PF3D7_1002200	979	49	39	57	2257	/	/	/	/	/	0.101	NO	958	21	21.1
PF3D7_0828800	738	20	3	22	1717	17	721	737	1	1893	0.779	22	713	25	99.8
PF3D7_0612800	371	19	3	21	3175	18	354	371	0	2377	0.875	21	346	25	97.4
PF3D7_0317100	969	19	4	22	767	17	953	969	0	1847	0.793	22	941	28	98.6
PF3D7_0502500	594	21	3	23	1785	19	571	589	5	2530	0.657	22	566	28	67.7
PF3D7_1431400	990	22	34	55	504	17	974	990	0	1588	0.527	25	968	22	99.0
PF3D7_1136200	679	21	286	306	1440	17	663	679	0	1694	0.372	NO	655	24	99.9
PF3D7_0504500	275	19	1	19	1298	19	249	267	8	2972	0.599	22	245	30	99.6
PF3D7_1434400	285	/	/	/	/	17	269	285	0	2109	0.419	NO	265	20	99.1
PF3D7_0514200	876	17	1	17	2457	21	846	866	10	1896	0.281	NO	842	34	28.0
PF3D7_0620000	505	18	7	24	1500	19	487	505	0	1908	0.868	25	482	23	99.5

Tab.3 Analyse der bekannten GPI-Proteine von *P. falciparum*

So war beispielsweise die Analyse mit TMPred in der Lage, aufzuzeigen, dass mit Ausnahme von 2 der hier aufgeführten Proteine (PF3D7_1002200 PF3D7_1434400) alle über mindestens 2 hydrophobe Domänen verfügen, die in der Annahme stehen, als Signalpeptid und GPI-Bindestelle zu fungieren.

Des Weiteren ergab die Betrachtung der Distanz der ersten Aminosäure eines möglichen Signalpeptids vom Beginn der Proteinsequenz, dass sich diese bei den meisten aufgezeigten Molekülen in einem Bereich zwischen 1 und 12 bewegt. Auch in diesem Fall konnten mithilfe von TMPred 3 Proteine eruiert werden, die von dieser Aussage ausgeschlossen werden müssen (PF3D7_1002200, PF3D7_1431400, PF3D7_1136200).

Anzumerken ist hierbei, dass bei PF3D7_0404500 das zweite Methionin in der Aminosäurefolge verwendet wurde, da dies eine Entfernung innerhalb der geforderten Grenzen ermöglicht. Ähnliche Versuche mit den abweichenden Proteinen zeigten keinen vergleichbaren Effekt.

Ein noch einheitlicheres Bild bot auch der Abstand der letzten Aminosäure der potenziellen GPI-Bindestelle respektive des letzten hydrophoben Abschnitts bis zum Ende des Proteins, welcher sich, wiederum unter Aussparung dreier Moleküle (PF3D7_0514200, PF3D7_0504500, PF3D7_0502500) zwischen 0 und 2 bewegte.

Eine Analyse der Länge der jeweiligen hydrophoben Areale ergab einen gerundeten Wert von 19 Aminosäuren für die N-terminale Domäne und 18 Aminosäuren für die C-terminale Domäne.

4 der durch eine der genannten Abweichungen aufgefallenen Proteine wurden nach dieser ersten Analyse als fälschlicherweise mit dem Attribut GPI-verankert versehen detektiert und im weiteren Verlauf nicht mehr als potenzielle GPI-APs aufgeführt. Hierunter fallen die folgenden Eiweiße: PF3D7_1002200, PF3D7_1431400, PF3D7_1136200 und PF3D7_1434400.

Die Untersuchungen mit SignalP und PredGPI stimmten nur bedingt mit den mittels TMPred getroffenen Aussagen über die Zugehörigkeit zur Gruppe der GPI-verankerten Proteine überein.

Zwar erkennen beide Algorithmen beispielsweise PF3D7_1002200 als Nicht-GPI-Protein, deklarieren aber wiederum andere in der Literatur als GPI verankert beschriebene Moleküle als fehlerhaft (Gilson et al. 2006).

Umgekehrt detektiert PredGPI PF3D7_1434400, welches nur eine hydrophobe Sequenz aufweist und somit deutlich von den festgelegten Kriterien abweicht, als potenziellen Kandidaten.

Aufgrund der augenscheinlich geringeren Sensitivität dieser Programme fokussierten sich die weiteren Versuche auf das webbasierte Prädiktionsprogramm TMPred.

Die Betrachtung des GPI-Proteoms *S. cerevisiae* erbrachte ähnliche Resultate. 5 der untersuchten Proteine wiesen nur eine hydrophobe Domäne auf und wurden aufgrund dessen nicht länger als GPI gemäß der oben genannten Definition aufgeführt.

Die Analyse der Distanz der ersten Aminosäure des potenziellen Signalpeptids vom Beginn des Proteins ergab bei dieser Hefe Werte im Bereich zwischen 1 und 8, wobei wiederum 5 Protein-Sequenzen abweichende Ergebnisse aufwiesen (vgl. Tab. 4). Im Vergleich zu *P. falciparum* scheint die N-terminale Domäne nur unwesentlich länger und besteht durchschnittlich aus 20 Aminosäuren.

ID	Proteiniänge	Beginn				TMPred				SignalP		PredGPI		C-term	Score
		Länge	Start	Stopp	Score	Länge	Start	Stopp	Dist_Ende	Score	Schnittstelle	omega	Score		
YAL063C	1322	20	3	22	1796	19	1304	1322	0	2476	0.916	25	1297	25	100
YAR050W	1537	19	7	25	1572	19	1519	1537	0		0.906	25	1512	25	100
YBL091C-A	99					16	83	98	1	2424	0.137	NO	72	27	99.2
YBR067C	210	19	3	21	1165	18	193	210	0	1806	0.791	20	186	24	100
YCL048W	463	21	8	28	2059	17	447	463	0	1213	0.877	26	440	23	100
YCR089W	1609	18	1	18	809	20	1590	1609	0	1053	0.538	23	1584	25	99.7
YDL039C	115	19	7	9	1156	17	99	115	0	1024	0.105	NO	92	23	99.5
YDR055W	444	19	3	21	1219	19	426	444	0	1230	0.834	20	419	25	100
YDR077W	338	19	3	21	1294	17	322	338	0	1955	0.725	19	307	31	100
YDR134C	136	22	1	22	1475	17	120	136	0	1699	0.664	19	112	24	100
YDR522C	502	22	7	5	88	18	485	502	0	1264	0.393	NO	480	22	90.9
YDR534C	528	19	3	21	1390	18	511	528	0	2041	0.752	19	506	22	100
YEL040W	467	18	1	18	1789	17	450	466	1	899	0.940	24	445	22	99.9
YER011W	254	21	1	21	1202	17	238	254	0	1816	0.723	19	233	21	99.9
YER100W	250	18	10	11	1028	16	234	249	1	3272	0.101	NO	228	22	34.8
YER150W	148	16	7	22	1344	16	133	148	0	1425	0.779	20	127	21	100
YGR136W	241					22	219	240	1	838	0.103	NO	215	26	99.0
YHR211W	1075	16	7	22	2078	19	1057	1075	0	2092	0.945	25	1050	25	100
YIL011W	269	22	1	22	953	20	250	269	0	2072	0.803	23	249	20	100
YIR019C	1367	24	4	27	1570	18	1350	1367	0	1603	0.927	22	1345	22	100
YIR039C	537	19	3	21	1747	18	520	537	0	1235	0.735	22	515	22	99.9
YJL078C	881	22	1	22	814	17	865	881	0	2049	0.712	19	859	22	100
YJR004C	650	19	4	22	1707	20	631	650	0	2093	0.939	20	619	31	99.9
YJR150C	298	19	4	22	1903	17	282	298	0	1941	0.877	20	275	23	100
YJR151C	1161	23	1	23	1828	17	1145	1161	0	1233	0.702	20	1141	20	99.9
YGR189C	507	20	3	22	1307						0.699	23	485	22	100
YGR259C	146	22	7	9	694						0.450	NO	125	21	24.4
YHR126C	159	16	3	18	1304						0.722	21	136	23	100
YAL022C	517	22	7	9	2121	20	493	512	5	2251	0.109	NO	492	25	47.8
YDR144C	596	20	5	24	1468	24	501	524	7	524	0.750	23	575	21	81.8

Tab. 4 Analyse der bekannten GPI-Proteine von *S. cerevisiae*

Ähnliches lässt sich für die C-terminale Sequenz konstatieren, deren Länge bei *S. cerevisiae* 18 Aminosäuren beträgt. Auch die Entfernung der letzten AS der möglichen GPI-Bindestelle, die sich, unter Vorbehalt zweier Moleküle, zwischen 0 und 1 bewegt, korreliert mit den für das Proteom *P. falciparum*s getroffenen Aussagen.

Gemäß der durchgeführten Analyse und der im Vorangegangenen getroffenen Definition müssen folgende Proteine als Nicht-GPI revidiert werden: YBL091C-A, YDL039C, YDR522C, YER100W, YGR136W, YGR189C, YGR259C, YHR126C, YAL022C, YDR144C.

Im Vergleich mit den für *P. falciparum* erhaltenen Resultaten war PredGPI im Fall *S. cerevisiae* in der Lage 4, der bereits genannten Moleküle gleichfalls als Nicht-GPI-verankert zu erkennen.

Die Ergebnisse der mithilfe von Tmpred getätigten Untersuchung der 30 ausgewählten humanen GPI-Proteine legen nahe, dass die Distanz der ersten Aminosäure des Signalpeptids einen im Durchschnitt größeren Abstand zur ersten Aminosäure des Gesamtproteins aufweist. Diese bewegt sich im Falle des Menschen zwischen 1 und 17

und weist eine deutlich größere Varianz auf als die zuvor untersuchten Organismen. Auch die Entfernung der c-terminalen Sequenz vom Ende des Moleküls zeigt eine ähnliche Tendenz (vgl. Tab. 5). Hierbei sind 3 Proteine auffällig geworden, die aufgrund der großen Entfernung ihrer potenziellen GPI-Bindestellen zum Ende des Proteins als fraglich angesehen werden müssen.

ID	Proteinlänge	Länge	Beginn			TMPred				SignalP		PredGPI			
			Start	Stopp	Score	Länge	Start	Stopp	Dist_End	Score	Score	Schnittstelle	omega	C-term	Score
ENSP0000014935	302	19	1	19	1000	20	283	302	0	1366	0.797	19	276	26	100
ENSP0000043402	473	20	16	35	900	19	452	470	3	1473	0.792	27	447	26	100
ENSP00000215368	213	21	3	23	585	17	196	212	1	902	0.786	27	188	25	100
ENSP00000220940	158	17	1	17	1539	20	139	158	0	874	0.937	18	133	25	100
ENSP00000221264	290	19	6	24	952	20	270	289	1	1204	0.876	23	259	31	100
ENSP00000223028	509	22	17	38	1841	19	491	509	0	2297	0.248	NO	483	26	100
ENSP00000229702	125	19	3	21	1660	19	106	124	1	2144	0.872	19	99	26	100
ENSP00000229708	244	23	1	23	1852	22	222	243	1	2131	0.825	26	221	23	100
ENSP00000235933	181	23	8	30	1073	20	162	181	0	639	0.609	25	159	22	100
ENSP00000242338	372	19	4	22	1913	23	350	372	0	1639	0.802	23	347	25	100
ENSP00000244336	349	22	13	34	1329	21	329	349	0	1378	0.684	35	319	30	100
ENSP00000247271	440	21	5	25	2228	19	421	439	1	1366	0.927	25	417	23	100
ENSP00000249842	428	19	1	19	915	17	410	426	2	1853	0.939	19	379	49	100
ENSP00000253335	244	21	1	21	311	20	224	243	1	1847	0.471	32	222	22	100
ENSP00000257770	574	23	5	27	1765	18	556	573	1	2164	0.873	27	549	25	100
ENSP00000261160	1007	18	3	20	1455	21	987	1007	0	1996	0.891	21	982	25	100
ENSP00000261615	411	19	1	19	1745	19	393	411	0	1921	0.744	17	385	26	100
ENSP00000261918	666	16	33	48	1192	16	651	666	0	1718	0.623	45	635	31	100
ENSP00000264029	582	20	5	24	828	21	562	582	0	1152	0.847	24	556	26	100
ENSP00000272852	374	19	3	21	744	18	357	374	0	1402	0.563	21	350	24	100
ENSP00000274721	400	20	9	28	1197	20	381	400	0	1932	0.794	32	375	25	100
ENSP00000287097	1445	17	6	22	1553	19	1426	1444	1	1245	0.794	22	1418	27	100
ENSP00000288197	1092	16	13	28	1454	18	1074	1091	1	1476	0.699	29	1068	24	100
ENSP00000199764	344	18	17	34	710	16	324	339	5	1883	0.474	35	313	31	100
ENSP00000251296	467	23	4	26	590	21	163	183	284	654	0.824	25	443	24	100
ENSP00000263723	920	19	2	20	1395	22	895	916	4	2120	0.831	22	891	29	100
ENSP00000264039	558	17	5	21	1262	18	536	553	5	1357	0.838	24	530	28	100
ENSP00000280115	207	19	1	19	1675	17	153	169	38	1297	0.211	NO	181	26	100
ENSP00000280663	1137	19	13	31	1309	20	1078	1097	40	1095	0.234	NO	1109	28	100
ENSP00000284240	161	17	1	17	1266	22	135	156	5	1395	0.862	20	130	31	100

Tab. 5 Analyse bekannter humaner GPI-Proteine

4.2 Definition der Suchparameter

ID	Score										Früheste Startposition (900/11)								Spätestes Ende (900/36)										
	700	750	800	850	900	950	1000	1100	2000	2500	3	7	10	15	28	30	32	34	36	38	15	11	9	5	3	2	0		
PF3D7_0502500	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	out		
PF3D7_0317100	nok	nok	out	out	out	out	out	out	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	out	schwacher Score	
PF3D7_0504500	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out
PF3D7_0514200	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0620000	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0930300	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0206800	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0207000	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0206900	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0502400	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0620400	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0612700	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0508000	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0304600	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0707300	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0405900	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	schwacher Score	
PF3D7_1031000	ok	ok	ok	ok	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	schwacher Score	
PF3D7_1030900	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0419700	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_1346800	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_1346700	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0404500	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	
PF3D7_1364100	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_1420700	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0828800	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_0612800	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	out	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	out	
PF3D7_1431400	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	
PF3D7_1136200	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	
PF3D7_1434400	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	
PF3D7_1002200	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	

Tab. 6 Variation der Suchparameter: Der Score wurde variiert unter Beibehaltung der Werte Start 36/ Ende 11; die früheste Startposition wurde unter Beibehaltung eines Scores von 900 und des spätesten Endes bei 11 verändert; das späteste Ende wurde variiert unter Beibehaltung eines Scores von 900 sowie einer frühesten Startposition von 36

Die gestrichelten Proteine konnten in vorangegangenen Analysen als GPI-APs ausgeschlossen werden, da sie nicht die grundlegenden Eigenschaften der GPI-verankerten Proteine aufzuweisen scheinen.

In einem nächsten Schritt galt es, die in 4.1. definierten Suchparameter zu optimieren. Hierzu wurden diese variiert, um so die bestmögliche Parameter-Kombination festzulegen, welche anschließend auf das gesamte Proteom übertragen werden sollte (vgl. Tab. 6).

Auch in diesem Versuch fielen 5 Proteine auf, die durch keine der Parameter-Kombinationen als GPI-AP detektiert werden konnten, wobei 4 dieser Moleküle im Zuge der ersten Analysen bereits fälschlicherweise als GPI-verankert deklariert worden waren.

Unter Zuhilfenahme der in Tabelle 6 erzielten Resultate und unter Berücksichtigung der größeren Distanzen bei Homo sapiens und S. cerevicae wurden für einen ersten proteomweiten Suchlauf folgende Kriterien ausgewählt:

Score	850
früheste Startposition	15
Spätestes Ende	9

Auch die anderen zum Zeitpunkt der Untersuchung auf PlasmoDB verfügbaren Plasmodien Proteome wurden mit diesen Werten analysiert und die Ergebnisse in einer gemeinsamen Tabelle aufgelistet und verglichen (vgl. Tab 7). Gleichzeitig erfolgte eine manuelle Auswertung der Ergebnisse, die deutlich machte, dass die ausgewählten Parameter eine zu geringe Sensitivität und Spezifität aufweisen. Dieser Umstand wurde insbesondere durch den Vergleich orthologer Proteine augenscheinlich.

	Gilson	P.falciparum	P.vivax	P.knowlesi	P.cynomogli	P.reichenowi	P.yoelii	P.berghei	P.chaubaudi
rhoptry-associated membrane antigen, putative	<>	PF3D7_0707300	PVX_087885	PKNH_0105800	PCYB_011430	PRCDC_0705500	PYYM_0807500	PBANKA_0804500	PCHAS_0804800
apical rhoptry neck protein, putative	<>	PF3D7_0511600	PVX_080657	PKNH_1022000	PCYB_103010	PRCDC_0510800	PYYM_1113300	PBANKA_1111200	PCHAS_1110800
GPI-anchored micronemal antigen, putative	<>	PF3D7_0828800	PVX_088910	PKNH_1322900	PCYB_051250	PRCDC_0828100	PYYM_0702100	PBANKA_0701900	PCHAS_0936100
6-cysteine-protein	<>	PF3D7_0404500	PVX_001020	PKNH_0302500	PCYB_031220	PRCDC_0402100	PYYM_1003600	PBANKA_1002200	PCHAS_1003100
6-cysteine-protein	<>	PF3D7_0317100	PVX_095375	PKNH_0824700	PCYB_083260	PRCDC_0316400	PYYM_0811100	PBANKA_0808100	PCHAS_0808400
6-cysteine-protein	<>	PF3D7_0508000	PVX_097960	PKNH_1025600	PCYB_103360	PRCDC_0507200	PYYM_1109800	PBANKA_1107600	PCHAS_1107300
6-cysteine-protein	<>	PF3D7_1364100	PVX_115165	PKNH_1107200	PCYB_111650	PRCDC_1363000	o	o	o
6-cysteine-protein	<>	PF3D7_0612700	PVX_113775	PKNH_1137300	PCYB_114430	PRCDC_0611400	PYYM_0112000	PBANKA_0111000	PCHAS_0111600
6-cysteine-protein	<>	PF3D7_1346700	PVX_083235	PKNH_1254400	PCYB_121700	PRCDC_1345700	PYYM_1361700	PBANKA_1359600	PCHAS_1364200
6-cysteine-protein	<>	PF3D7_0612800	PVX_113780	PKNH_1137200	PCYB_114420	PRCDC_0611500	PYYM_0112100	PBANKA_0111100	PCHAS_0111700
6-cysteine-protein	<>	PF3D7_1346800	PVX_083240	PKNH_1254100	PCYB_121690	PRCDC_1345800	PYYM_1361800	PBANKA_1359700	PCHAS_1364300
conserved Plasmodium protein, unknown function	<>	PF3D7_1410700	PVX_085915	PKNH_1347600	PCYB_134600	PRCDC_1410000	PYYM_1033900	PBANKA_1031800	PCHAS_1032600
conserved Plasmodium protein, unknown function	<>	PF3D7_1013300	PVX_094885	PKNH_0813100	PCYB_082310	PRCDC_1012700	PYYM_1214300	PBANKA_1211700	PCHAS_1212400
conserved Plasmodium Protein, unknown function	<>	PF3D7_0418800	PVX_090030	PKNH_0511500	PCYB_053310	PRCDC_0416300	PYYM_0720900	PBANKA_0720900	PCHAS_0729900
conserved Plasmodium Protein, unknown function	<>	PF3D7_0625400	PVX_114375	PKNH_1124400	PCYB_113260	PRCDC_0623800	PYYM_1126600	PBANKA_1124300	PCHAS_1123800
conserved Plasmodium Protein, unknown function	<>	PF3D7_0933300	PVX_087044	PKNH_0732000	PCYB_074080	PRCDC_0931300	PYYM_0837200	PBANKA_0834100	PCHAS_0834400
conserved Plasmodium protein, unknown function	<>	PF3D7_0622000	PVX_114215	PKNH_1128200	PCYB_113580	PRCDC_0620400	PYYM_1123200	PBANKA_1120900	PCHAS_1120400
conserved Plasmodium protein, unknown function	<>	PF3D7_1434400	PVX_084815	PKNH_0421000	PCYB_132450	PRCDC_1433700	PYYM_1012000	PBANKA_1010400	PCHAS_1011300
conserved Plasmodium protein, unknown function	<>	PF3D7_0504500	PVX_097787	PKNH_1029100	PCYB_103710	PRCDC_0503700	PYYM_1106300	PBANKA_1104100	PCHAS_1103800
conserved Plasmodium Protein, unknown function	<>	PF3D7_1131300	PVX_092170	PKNH_0929400	PCYB_093730	PRCDC_1129700	PYYM_0918000	PBANKA_0916900	PCHAS_0929100
conserved plasmodium Protein, unknown function	<>	PF3D7_1431400	PVX_084970	PKNH_1327300	PCYB_132730	PRCDC_1430700	PYYM_1014900	PBANKA_1013400	PCHAS_1014200
conserved Plasmodium protein, unknown function	<>	PF3D7_0624800	PVX_114346	PKNH_1125400	PCYB_113320	PRCDC_0623200	PYYM_1126000	PBANKA_1123700	PCHAS_1123200
conserved Plasmodium Protein, unknown function	<>	PF3D7_1133000	o	o	o	PRCDC_1131400	PYYM_0916400	PBANKA_0915400	PCHAS_0930600
conserved Plasmodium protein, unknown function	<>	PF3D7_0502500	PVX_097630	PKNH_1031400	PCYB_104040	PRCDC_0501800	o	o	o
conserved Plasmodium protein, unknown function	<>	PF3D7_1136200	PVX_092425	PKNH_0934400	PCYB_094210	PRCDC_1134600	PYYM_0913400	PBANKA_0912400?	PCHAS_0713700
conserved Plasmodium protein, unknown function	<>	PF3D7_1360300	PVX_114980	PKNH_1111000	PCYB_112030	PRCDC_1359200	PYYM_1138900	PBANKA_1136500	PCHAS_1136000
conserved Plasmodium protein, unknown function	<>	PF3D7_0313700	PVX_119780	PKNH_0828500	PCYB_083610	PRCDC_0313000	PYYM_0414300	PBANKA_0411400	PCHAS_0412300
conserved Plasmodium protein, unknown function	<>	PF3D7_1002300	PVX_094310	PKNH_0801100	PCYB_081170	PRCDC_1001700	PYYM_1203200	PBANKA_1200700	PCHAS_1201400
protein kish, putative	<>	PF3D7_0935100	PVX_086962	PKNH_0733800	o	PRCDC_0933100	PYYM_0839000	PBANKA_0835900	PCHAS_0836200
thrombospondin related sporozoite protein ₂	<>	PF3D7_0104000	PVX_081560	PKNH_0209500	PCYB_021990	PRCDC_0101900	PYYM_0212000	PBANKA_0209100	PCHAS_0207500
apical merozoite protein, (putative)	<>	PF3D7_0419700	PVX_090075	PKNH_0512400	PCYB_053400	PRCDC_0417200	PYYM_0721800	PBANKA_0721800	PCHAS_0730800
Yos1-like protein, putative ₃	<>	PF3D7_1453300	PVX_117812	PKNH_1228800	o	PRCDC_1452600	PYYM_1317800	PBANKA_1317000	PCHAS_1320300
conserved Plasmodium protein, unknown function ₆	<>	PF3D7_0620000	PVX_114125	PKNH_1130300*	PCYB_113750	PRCDC_0618400	PYYM_1121200	PBANKA_1119200	PCHAS_1118700
apicoplast conserved ycf19 protein precursor, unknown function ₇	<>	PF3D7_0313300	PVX_119760	PKNH_0828900	PCYB_083650	PRCDC_0312600	PYYM_0413900	PBANKA_0411000	PCHAS_0411900
apical sushi protein(putative) ₁₂	<>	PF3D7_0405900	PVX_000945()	PKNH_0304000()	PCYB_031370	PRCDC_0403500()	PYYM_1005000	PBANKA_1003600()	PCHAS_1004500()
hypothetical protein	<>	PF3D7_1237700	PVX_100835	PKNH_1457500	PCYB_146340	PRCDC_1236900	PYYM_1456300	PBANKA_1452300	PCHAS_1454600
hypothetical protein	<>	PF3D7_1013800	PVX_113250	PKNH_1149000	PCYB_115470	o	o	o	o
hypothetical protein, conserved	<>	PF3D7_1403300	PVX_094905	PKNH_0813600	PCYB_082360	o	PYYM_1214800	PBANKA_1212200	PCHAS_1212900
hypothetical protein	<>	PF3D7_1403300	PVX_086272	1354800, PKNH_1354800	PCYB_135320	PRCDC_1402600	PYYM_1040800	PBANKA_1038700	PCHAS_1039500
hypothetical protein	<>	PF3D7_0422100	PVX_090145	PKNH_0513900	PCYB_053550	PRCDC_0419300	PYYM_0523000	PBANKA_0522500	PCHAS_0522700
hypothetical protein	<>	o	5*, PVX_112635*, PVX_112635*	o	o	o	o	o	o
merozoite surface protein 1	<>	PF3D7_0930300	PVX_099980	PKNH_0728900	PCYB_073770	PRCDC_0928300	PYYM_0834100	PBANKA_0831000	PCHAS_0831300
merozoite surface protein 1 paralog	<>	o	PVX_099975	PKNH_0728800	PCYB_073760	o	o	o	o
merozoite surface protein 2	<>	PF3D7_0206800	o	o	o	PRCDC_0205800	o	o	o
merozoite surface protein 4, (putative) ₄	<>	PF3D7_0207000	PVX_003770()	PKNH_0414100	PCYB_042340	PRCDC_0206000	PYYM_0305300	PBANKA_0304400	PCHAS_0306600
merozoite surface protein 5	<>	PF3D7_0206900	PVX_003770	PKNH_0414200	PCYB_042350	PRCDC_0205900	o	o	o
merozoite surface protein 8, (putative)	<>	PF3D7_0502400	PVX_097625()	PKNH_1031500	PCYB_104050	PRCDC_0501700	PYYM_1104400	PBANKA_1102200	PCHAS_1101900()
merozoite surface protein 10, (putative)	<>	PF3D7_0620400	PVX_114145()	PKNH_1129800	PCYB_113710()	PRCDC_0618800	PYYM_1121600	PBANKA_1119600()	PCHAS_1119100()
ookinete surface protein Pvs25/25 kDa ookinete surface antigen precursor	<>	PF3D7_1031000	PVX_111175	PKNH_0615700	PCYB_062520	PRCDC_1030300	PYYM_0515400	PBANKA_0515000	PCHAS_0515100
28 kDa ookinete surface protein, putative	<>	PF3D7_1030900	PVX_111180	PKNH_0615600	PCYB_062530*, PCYB_062530*	PRCDC_1030200	PYYM_0515300	PBANKA_0514900	PCHAS_0515000
glideosome-associated protein 50, (putative)/ acid phosphatase	<>	PF3D7_0918000	PVX_099320()	PKNH_0716000	o	PRCDC_0916000	PYYM_0822000#	PBANKA_0819000()	PCHAS_0819300()
circumsporozoite (CS) protein	<>	PF3D7_0304600	PVX_119355	PKNH_0838500	PCYB_084460?	PRCDC_0303900	PYYM_0405600	PBANKA_0403200	o
surface protein P113, (putative)	<>	PF3D7_1420700	PVX_085445()	PKNH_1337300	PCYB_133650	PRCDC_1420000()	PYYM_1024100	PBANKA_1022500	PCHAS_1023300()
N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol deacetylase, putative	<>	PF3D7_0624700	PVX_114344	o	o	PRCDC_0623100	PYYM_1125900	PBANKA_1123600	PCHAS_1123100
GPI-anchor transamidase, putative	<>	PF3D7_1128700	PVX_092055	PKNH_0926800	PCYB_093500	PRCDC_1127200	PYYM_0921000	PBANKA_0919500	PCHAS_0924900
carbonic anhydrase, putative	<>	PF3D7_1140000	o	o	o	PRCDC_1138400	PYYM_0909900	PBANKA_0909000	PCHAS_0710300
schizont membrane associated cytoadherence protein	<>	o	o	o	o	o	PYYM_0101600	PBANKA_0100600	PCHAS_0101300
pseudouridylyl synthase, putative	<>	PF3D7_0914000	PVX_099125	PKNH_0711900	PCYB_072160	PRCDC_0912000	PYYM_0818000	PBANKA_0815000	PCHAS_0815300
aspartyl protease, putative	<>	PF3D7_1234400	PVX_100670	PKNH_1453800	PCYB_146010	PRCDC_1233600	PYYM_1453000	PBANKA_1449000	PCHAS_1451300
serine repeat antigen 3, putative	<>	PF3D7_0207400*	PVX_003825*, PVX_003825*	PKNH_0413400*	PCYB_042280*	PRCDC_0206700*	PYYM_0305700*	PBANKA_0304900*	PCHAS_0307000*
circumsporozoite (CS) protein, putative	<>	o	PVX_118360	0300400*, PKNH_0903000*	o	o	o	o	PCHAS_0404100
conserved rodent malaria protein, unknown function	<>	o	o	o	o	o	PYYM_0525000	PBANKA_0524500	PCHAS_0524700
Plasmodium exported protein, unknown function	<>	o	o	o	o	o	0016500*, PYYM_0525000	PBANKA_1245900	PCHAS_0700100, PCHAS_0836700
Plasmodium exported protein, unknown function	<>	o	o	o	o	o	PYYM_0839500	PBANKA_0836400	PCHAS_0836700
Plasmodium exported protein (hyp6), unknown function	<>	PF3D7_0425100?, PF3D7_0114500*, PF3D7_0114500*, PF3D7_0114500*, PF3D7_1371900	o	o	o	PRCDC_0053900(), PRCDC_0112700#...	o	o	o
Plasmodium exported protein (hyp10), unknown function ₁₀	<>	PF3D7_0114500*, PF3D7_0114500*, PF3D7_1371900	o	o	o	PRCDC_0112700*, PRCDC_1369800	o	o	o
apical membrane antigen 1 ₀	<>	PF3D7_1371900	o	o	o	PRCDC_1369800	o	o	o
Plasmodium exported protein, unknown function	<>	1478300*, PF3D7_02081300	o	o	o	0, PRCDC_1252900, PRCDC_0830600	o	o	o
Plasmodium exported protein, unknown function	<>	PF3D7_0831300	o	o	o	PRCDC_0830600	o	o	o
Plasmodium exported Protein, unknown Function	<>	PF3D7_0112900	o	o	o	PRCDC_0111100	o	o	o
Plasmodium exported protein, unknown function	<>	PF3D7_1401200	o	o	o	PRCDC_1400500	o	o	o
Plasmodium exported protein, unknown function	<>	o	PVX_113245	PKNH_1149100	PCYB_115480	o	o	o	o
Plasmodium exported protein, unknown function	<>	o	PVX_115460	PKNH_1100700	PCYB_111050	o	o	o	o
Plasmodium exported protein, unknown function	<>	o	PVX_101605	o	o	o	o	o	o
mitochondrial carrier protein	<>	PF3D7_0407500	PVX_000870	PKNH_0305500	PCYB_031520	PRCDC_0404900	PYYM_1006500	PBANKA_1005100	PCHAS_1006000
40S ribosomal protein S30	<>	o	o	o	PCYB_041140	o	o	o	o
protease, putative	<>	PF3D7_0913500	PVX_099107	PKNH_0711400	PCYB_072120	PRCDC_0911500	PYYM_0817500	PBANKA_0814500	PCHAS_0814800
transporter protein	<>	PF3D7_0609100	PVX_113615	PKNH_1141100	PCYB_114740	PRCDC_0607800	PYYM_0108700	PBANKA_0107700	PCHAS_0108300
phosphatidylinositol synthase	<>	PF3D7_1315600	PVX_122605	PKNH_1416300	PCYB_142500	PRCDC_1314600	PYYM_1417600	PBANKA_1414100	PCHAS_1415900
parasite-infected erythrocyte surface protein	<>	PF3D7_0501200	o	o	o	PRCDC_0500500	o	o	o
serpentine receptor, putative	<>	PF3D7_0713400	PVX_122895	PKNH_1422300	PCYB_143080	PRCDC_0710700	PYYM_1423500	PBANKA_1420000	PCHAS_1421800
protein MAM3, putative	<>	PF3D7_0932100	PVX_087105	PKNH_0730800	PCYB_073960	PRCDC_0930100	PYYM_0836000	PBANKA_0832900	PCHAS_0833200
apicoplast beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III precursor, putative	<>	PF3D7_0211400	PVX_002960	PKNH_0409900	PCYB_041870	PRCDC_0210300			

So vermochte das manuelle Analysieren des ersten Suchlaufs aufzuzeigen, dass die Auswahl von nur 3 Kriterien, nämlich Score, früheste Startposition sowie spätestes Ende, nicht ausreichte, um die gesuchten Proteine sicher zu identifizieren.

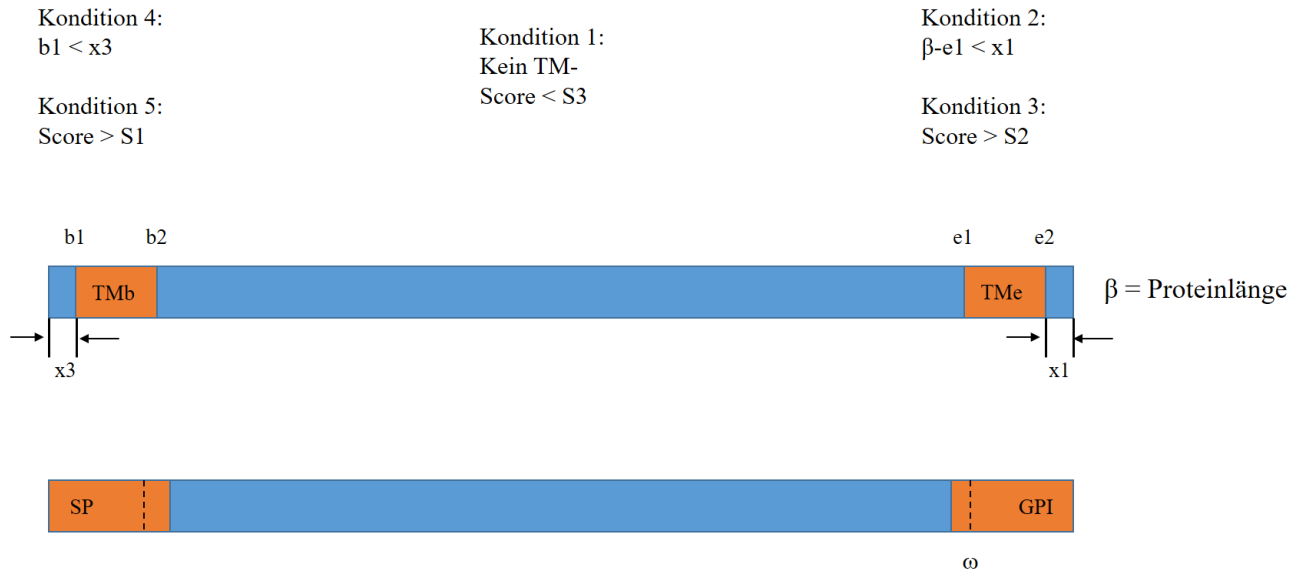


Abb. 9 Definition der Suchparameter

Daraufhin wurden weitere Konditionen definiert und umgesetzt (vgl. Abb. 9)

Die neuen Suchparameter inkludierten differenzierte Scores für die N-terminale und C-terminale Domäne, die als unterer Grenzwert für mögliche GPI-APs dienen sollten (vgl. Abb. 9 Kondition 3 und 5). Darüber hinaus wurde ein maximaler Score für weitere zentral gelegene hydrophobe Sequenzen festgelegt, um Moleküle mit etwaigen Transmembrandomänen auszuschließen (vgl. Abb. 9 Kondition 1). Auch die unter Kondition 2 und 4 aufgeführten Distanzen (vgl. Abb. 9) wurden nochmals variiert, um die Vorhersage zu optimieren.

Diese Neuerungen testeten wir sowohl an den bereits 2006 publizierten GPI-Proteinen *P. falciparums* als auch mithilfe eines Trainingssets, bestehend aus einer zufälligen Auswahl von Orthologen dieser Proteine in anderen Spezies (*P. vivax*, *P. yoelii*, *P. chaubaudi*, *P. berghei*, *P. knowlesi*) sowie mittels eines entsprechenden Testsets, bestehend aus Negativbeispielen zur Bestimmung der Spezifität.

Wie den Tabellen 8.1 und 8.2 zu entnehmen ist, wurde die bestmögliche Sensitivität von 93,89 % in dem Testset für die im Folgenden aufgeführten Werte erreicht:

Suchlauf 1

Score Start	500	früheste Startposition/Grenzposition Start	13
Score Zwischenteil	950	spätestes Ende/Grenzposition Ende	15
Score Ende	1200		
minimale Länge	17	maximale Länge	23

Set		Parameter												Sensibilität
		Score			Grenzposition		Länge		Ergebnis					
		Start	Zwischenteil	Ende	Start	Ende	Minimum	Maximum	positiv	falsch positiv	falsch negativ	negativ		
Gilson et. al.	1	500	900	1000	9	9	17	23	22	0	5	0	81,48%	
	2	500	950	1000	9	9	17	23	22	0	5	0	81,48%	
	3	500	950	1000	9	9	17	31	22	0	5	0	81,48%	
	4	600	950	1000	9	9	17	23	21	0	6	0	77,78%	
	5	700	950	1000	9	9	17	23	21	0	6	0	77,78%	
	6	800	950	1000	9	9	17	23	21	0	6	0	77,78%	
	7	900	950	1000	9	9	17	23	20	0	7	0	74,07%	
	8	500	950	1000	9	12	17	23	22	0	5	0	81,48%	
	9	500	950	1000	9	15	17	23	22	0	5	0	81,48%	
	10	500	950	1000	12	9	17	23	23	0	4	0	85,19%	
	11	500	950	1000	13	9	17	23	24	0	3	0	88,89%	
	12	500	2500	1000	13	9	17	23	26	0	1	0	96,30%	
	13	500	950	1200	13	15	17	23	24	0	3	0	88,89%	
Pf3D7_GPI +Orthologe	1	400	950	1000	13	15	17	23	123	0	8	0	93,89%	
	2	500	800	1200	13	15	17	23	122	0	9	0	93,13%	
	3	500	800	1200	10	10	17	23	112	0	19	0	85,50%	
	4	500	950	1000	13	9	17	23	117	0	14	0	89,31%	
	5	500	950	1000	15	12	17	23	122	0	9	0	93,13%	
	6	500	950	1000	15	9	17	23	117	0	14	0	89,31%	
	7	500	950	1000	9	12	17	23	112	0	19	0	85,50%	
	8	500	950	1000	13	12	17	23	122	0	9	0	93,13%	
	9	600	950	1000	13	12	17	23	118	0	13	0	90,08%	
	10	500	950	1000	13	15	17	23	123	0	8	0	93,89%	
	11	500	900	1000	13	15	17	23	123	0	8	0	93,89%	
	12	500	950	1000	20	20	17	23	123	0	8	0	93,89%	
	13	500	950	1000	13	14	17	23	122	0	9	0	93,13%	
	14	500	950	1000	13	15	17	31	123	0	8	0	93,89%	
	15	500	1000	1000	13	15	17	23	123	0	8	0	93,89%	
	16	500	950	900	13	15	17	23	123	0	8	0	93,89%	
	17	500	950	1200	13	15	17	23	123	0	8	0	93,89%	
	18	500	950	2000	13	15	17	23	98	0	33	0	74,81%	
	19	550	950	1000	13	15	17	23	121	0	10	0	92,37%	
20	700	950	1200	13	15	17	23	118	0	13	0	90,08%		
21	500	800	1200	10	10	17	31	112	0	19	0	85,50%		
22	500	800	2000	13	15	17	23	98	0	33	0	74,81%		

Tab. 8.1

Gleichzeitig erzielte diese Auswahl in einer Negativkohorte eine Spezifität von 91,27 %.

Set		Parameter												Spezifität
		Score			Grenzposition		Länge		Ergebnis					
		Start	Zwischenteil	Ende	Start	Ende	Minimum	Maximum	positiv	falsch positiv	falsch negativ	negativ		
negativ	1	400	950	1000	13	15	17	23	0	16	0	133	89,26%	
	2	500	800	1200	13	15	17	23	0	15	0	134	89,93%	
	3	500	800	1200	10	10	17	23	0	15	0	134	89,93%	
	4	500	950	1000	13	9	17	23	0	8	0	141	94,63%	
	5	500	950	1000	15	12	17	23	0	13	0	136	91,28%	
	6	500	950	1000	15	9	17	23	0	8	0	141	94,63%	
	7	500	950	1000	9	12	17	23	0	12	0	137	91,95%	
	8	500	950	1000	13	12	17	23	0	13	0	136	91,28%	
	9	600	950	1000	13	12	17	23	0	13	0	136	91,28%	
	10	500	950	1000	13	15	17	23	0	16	0	133	89,26%	
	11	500	900	1000	13	15	17	23	0	13	0	136	91,28%	
	12	500	950	1000	20	20	17	23	0	18	0	131	87,91%	
	13	500	950	1000	13	14	17	23	0	16	0	133	89,26%	
	14	500	950	1000	13	15	17	31	0	16	0	133	89,26%	
	15	500	1000	1000	13	15	17	23	0	18	0	131	87,91%	
	16	500	950	900	13	15	17	23	0	16	0	133	89,26%	
	17	500	950	1200	13	15	17	23	0	13	0	136	91,27%	
	18	500	950	2000	13	15	17	23	0	10	0	139	93,29%	
	19	550	950	1000	13	15	17	23	0	16	0	133	89,26%	
	20	700	950	1200	13	15	17	23	0	5	0	144	96,64%	
	21	500	800	1200	10	10	17	31	0	5	0	144	96,64%	
	22	500	800	2000	13	15	17	23	0	9	0	140	93,96%	

Tab. 8.2

Im weiteren Verlauf der bioinformatischen Analyse erfolgten, nach detaillierter manueller Analyse der bisherigen Ergebnisse, nochmals 2 Anpassungen der Suchkriterien. So konnte beispielsweise durch die Erhöhung des Score Zwischenteil von 950 auf 1050 ein weiteres Protein der „Gilson-Analyse“ miteingeschlossen werden.

Suchlauf 2

Score Start	500	früheste Startposition/Grenzposition Start	13
Score Zwischenteil	1050	spätestes Ende/Grenzposition Ende	3
Score Ende	1200		
minimale Länge	17	maximale Länge	23

Nach Analyse der verschiedenen Plasmodienspezies, insbesondere hinsichtlich der orthologen Proteine, entschieden wir uns, die Parameter nochmals anzupassen.

Suchlauf 3

Score Start	500	früheste Startposition/Grenzposition Start	13
Score Zwischenteil	1100	spätestes Ende/Grenzposition Ende	4
Score Ende	1200		
minimale Länge	17	maximale Länge	23

Hierdurch war es uns möglich, im Proteom von *Plasmodium falciparum* 35 potenzielle GPI-verankerte Proteine zu detektieren. Von den 30 durch Gilson et al. 2006 publizierten Aminosäuresequenzen hielten 23 unseren Suchparametern stand, wohingegen 7 Proteine der damaligen Analyse, gemäß den gewählten Kriterien, als Non-GPI-APs zu werten sind. Darüber hinaus gelang es, 12 bisher unbekannte GPI-verankerte Proteine zu definieren.

	P.falciparum	P.vivax	P.knowlesi	P.cynomolgi	P.berghei	P.yoelii	P.chaubaudi	P.reichenowi								
apical sushi protein	PF3D7_0405900	PVX_000945	PKNH_0304000	PCYB_031370	PBANKA_1003600	PYYM_1005000	PCHAS_1004500	PRCDC_0403500								
6-cysteine protein	PF3D7_1364100	PVX_115165	PKNH_1107200	dist_end 8	/	/	/	PRCDC_1363000								
merozoite surface protein 1	PF3D7_0930300	PVX_099980	PKNH_0728900	dist_end 4, Center 1218	PCYB_073770	PBANKA_0831000	PYYM_0834100	PCHAS_0831300	PRCDC_0928300							
merozoite surface protein 2	PF3D7_0206800	/	/	/	/	/	/	PRCDC_0205800								
merozoite surface protein 4	PF3D7_0207000	PVX_003775	PKNH_0414100	PCYB_042340	PBANKA_0304400	PYYM_0305300	PCHAS_0306600	PRCDC_0206000								
rhoptry-associated membrane antigen	PF3D7_0707300	PVX_087885	PKNH_0105800	PCYB_011430	PBANKA_0804500	PYYM_0807500	PCHAS_0804800	PRCDC_0705500								
surface protein P113	PF3D7_1420700	PVX_085445	PKNH_1337300	PCYB_133650	Cter Score 1144	PBANKA_1022500	PYYM_1024100	PCHAS_1023300	PRCDC_1420000							
merozoite surface protein 5	PF3D7_0206900	PVX_003770	PKNH_0414200	PCYB_042350	/	/	/	/								
merozoite surface protein 8	PF3D7_0502400	PVX_097625	PKNH_1031500	PCYB_104050	PBANKA_1102200	PYYM_1104400	PCHAS_1101900	PRCDC_0501700								
GPI-anchored micronemal antigen	PF3D7_0828800	PVX_088910	PKNH_1322900	Center 1075	PCYB_051250	Center 1112	PBANKA_0701900	PYYM_0702100	PCHAS_0936100	PRCDC_0828100						
6-cysteine protein	PF3D7_1346700	PVX_083235	PKNH_1254400	PCYB_121700	PBANKA_1359600	PYYM_1361700	PCHAS_1364200	PRCDC_1345700								
merozoite surface protein 10	PF3D7_0620400	PVX_114145	PKNH_1129800	PCYB_113710	PBANKA_1119600	PYYM_1121600	PCHAS_1119100	PRCDC_0618800								
apical merozoite protein	PF3D7_0419700	PVX_090075	PKNH_0512400	PCYB_053400	no Nter	PBANKA_0721800	PYYM_0721800	PCHAS_0730800	PRCDC_0417200	Start 201 2.ATG ?						
6-cysteine protein	PF3D7_0404500	2. ATG	PVX_001020	PKNH_0302500	dist_end 3	PCYB_031220	no Cter	PBANKA_1002200	PYYM_1003600	PCHAS_1003100	PRCDC_0402100					
6-cysteine protein	PF3D7_0612800	PVX_113780	no Nter	PKNH_1137200	PCYB_114420	no Nter	PBANKA_0111100	PYYM_0112100	PCHAS_0111700	PRCDC_0611500						
6-cysteine protein	PF3D7_0612700	PVX_113775	PKNH_1137300	PCYB_114430	no model found	PBANKA_0111000	no Nter	PYYM_0112000	PCHAS_0111600	PRCDC_0611400						
circumsporozoite (CS) protein	PF3D7_0304600	PVX_119355	PKNH_0838500	PCYB_084460	PBANKA_0403200	PYYM_0405600	/	/	PRCDC_0303900							
28 kDa ookinete surface protein	PF3D7_1030900	PVX_111180	PKNH_0615600	PCYB_062530, PCYB_007100	PBANKA_0514900	PYYM_0515300	PCHAS_0515000	PRCDC_1030200								
6-cysteine protein	PF3D7_1346800	PVX_083240	PKNH_1254100	PCYB_121690	Start 242	PBANKA_1359700	PYYM_1361800	PCHAS_1364300	PRCDC_1345800							
6-cysteine protein	PF3D7_0508000	PVX_097960	PKNH_1025600	No Nter	PCYB_103360	no Cter	PBANKA_1107600	PYYM_1109800	PCHAS_1107300	PRCDC_0507200						
conserved Plasmodium protein, unknown function	PF3D7_0620000	PVX_114125	PKNH_1130300, PKNH_1130900	PCYB_113750	dist_end 16	PBANKA_1119200	PYYM_1121200	PCHAS_1118700	PRCDC_0618400							
25 kDa ookinete surface antigen precursor	PF3D7_1031000	PVX_111175	PKNH_0615700	PCYB_062520	no Cter	PBANKA_0515000	PYYM_0515400	PCHAS_0515100	PRCDC_1030300							
6-cysteine protein	PF3D7_0317100	PVX_095375	PKNH_0824700	PCYB_083260	no Cter	PBANKA_0808100	PYYM_0811100	PCHAS_0808400	PRCDC_0316400	Center 3411						
conserved Plasmodium protein, unknown function	PF3D7_1431400	Start 34	PVX_084970	start32	PKNH_1327300	Center 1782	PCYB_132730	Start 26	PBANKA_1013400	PYYM_1014900	PCHAS_1014200	Start 749	PRCDC_1430700	Start 34		
conserved Plasmodium protein, unknown function	PF3D7_1136200	Start 286	PVX_092425	start 436	PKNH_0934400	Start 362	PCYB_094210	no Nter	PBANKA_0912400	Start 18	PYYM_0913400	Start 18	PCHAS_0713700	PRCDC_1433700	no Nter	
conserved Plasmodium protein, unknown function	PF3D7_0514200	Center 2095	PVX_080530	start 530	PKNH_1018900	Cter Score 775	PCYB_102740	Start 204	PBANKA_1113900	Start 592	PYYM_1116000	Start 296	PCHAS_1113500	Start 596	PRCDC_0513300	Center 2080
tryptophan-rich antigen 3	PF3D7_1002200	no Cter	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	PRCDC_1001600	no Cter, Start 39
conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	PF3D7_1434400	no Cter	PVX_084815	PKNH_0421000	PCYB_132450	no model found	PBANKA_1010400	PYYM_1012000	PCHAS_1011300	PRCDC_1433700	no Nter					
conserved Plasmodium protein, unknown function	PF3D7_0502500	dist_end 5	PVX_097630	dist_end 14	PKNH_1031400	no Nter	PCYB_104040	dist_end 14	/	/	/	/	/	/	PRCDC_0501800	dist_end 5
conserved Plasmodium protein, unknown function	PF3D7_0504500	dist_end 8	PVX_097787	dist_end 5	PKNH_1029100	dist_end 5	PCYB_103710	dist_end 7	PBANKA_1104100	dist_end 7	PYYM_1106300	dist_end 6	PCHAS_1103800	PRCDC_0503700	dist_end 8	
Plasmodium exported protein (hyp10), unknown function	PF3D7_0114500	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	PRCDC_0112700	
protein kish, putative	PF3D7_0935100	PVX_086962	PKNH_0733800	/	/	/	PBANKA_0835900	PYYM_0839000	PCHAS_0836200	PRCDC_0933100						
conserved Plasmodium protein, unknown function, unspe	PF3D7_0313700	PVX_119780	no Cter	PKNH_0828500	no Cter	PCYB_083610	no Cter	PBANKA_0411400	no Cter	PYYM_0414300	no Nter	PCHAS_0412300	no Cter	PRCDC_0313000		
conserved Plasmodium protein, unknown function	PF3D7_0933300	PVX_087044	no Nter	PKNH_0732000	no Nter	PCYB_074080	no Nter	PBANKA_0834100	dist_end 6	PYYM_0837200	PCHAS_0834400	dist_end 6	PRCDC_0931300			
carbonic anhydrase	PF3D7_1140000	/	/	/	/	/	PBANKA_0909000	PYYM_0909900	PCHAS_0710300	PRCDC_1138400						
conserved Plasmodium protein, unknown function	PF3D7_1002300	PVX_094310	PKNH_0801100	PCYB_081170	PBANKA_1200700	PYYM_1203200	PCHAS_1201400	PRCDC_1001700								
probable protein, unknown function	PF3D7_1371500	/	/	/	no Nter	/	/	/	PRCDC_1369400							
Yos1-like protein, putative	PF3D7_1453300	PVX_117812	PKNH_1228800	/	/	PBANKA_1317000	PYYM_1317800	PCHAS_1320300	PRCDC_1452600							
6-cysteine-protein	/	PVX_001015	PKNH_0302600	PCYB_031230	no Nter	/	/	/	/							
conserved Plasmodium protein, unknown function	PF3D7_1403300	Center 1232, Cter score 583	PVX_086272	PKNH_1354900	PCYB_135320	Start 204, Cter Score 668	PBANKA_1038700	Start 47, Cter Score 871	PYYM_1040800	Cter Score 856	PCHAS_1039500	Cter Score 914	PRCDC_1402600	Start 401		
SICAvAr type1	/	/	PKNH_1320000	a) PCYB_001410, b) PCYB_001660, c) PCYB_005410	a) no model found B) Start 129 c) no Nter	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
probable protein, unknown function	PF3D7_0606800	no Cter	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	PRCDC_0605400	no Cter	
Plasmodium exported protein, unknown function	/	a) PVX_086900, b) PVX_110832	a) dist_end 34, b) dist_end 15	PKNH_1124900, PKNH_1000400	PCYB_074370	no Cter	/	/	/	/	/	/	/	/		
GPI-anchor transamidase, putative	PF3D7_1128700	dist_end 9	PVX_092055	PKNH_0926800	PCYB_093500	start 16, no Cter	PBANKA_0919500	PYYM_0921000	PCHAS_0924900	PRCDC_1127200	dist_end 7					
fam-a protein	/	/	/	/	/	/	PBANKA_0900700	PYYM_0003300	9	/	/					
schizont membrane associated cytoadherence protein, pu	/	/	/	/	/	/	PBANKA_1000951	PYYM_0101600	PCHAS_0101300	/						
conserved rodent malaria protein, unknown function	/	/	/	/	/	/	PBANKA_0524500	no Cter	PYYM_0525000	PCHAS_0524700	/					
conserved Plasmodium protein, unknown function	PF3D7_1131300	no Cter, Start 15	PVX_092170	no model found	PKNH_0929400	PCYB_093730	no Nter	PBANKA_0916900	Cter Score 1119	PYYM_0918000	PCHAS_0929100	Cter Score 556	PRCDC_1129700	no Cter		
rifin	PF3D7_0901100	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	PRCDC_0038800		
erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1), pseudogene	PF3D7_0500200	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1), exon 1, pseud	PF3D7_0400600	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
Plasmodium exported protein (hyp15), unknown function	PF3D7_0221200	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
aspartyl protease, putative	PF3D7_1234400	Start 25	PVX_100670	PKNH_1453800	Center 1121	PCYB_146010	Cter Score 986	PBANKA_1449000	PYYM_1453000	Center 1152	PCHAS_1451300	PRCDC_1233600	Start 25			
Plasmodium exported Protein, unknown function	/	/	PVX_101605	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
merozoite surface protein 1 paralog, putative	/	/	PVX_099975	PKNH_0728800	Start 20	PCYB_073760	/	/	/	/	/	/	/	/		
circumsporozoite protein precursor-related	/	/	PVX_118360	dist_end 46	a) PKNH_0300400, b) PKNH_0946500	a) dist_end 112, b) dist_end 115	/	/	/	/	PCHAS_0404100	/	/			
erythrocyte membrane-associated antigen	PF3D7_1018300	Start 120, dist_end 12	PVX_001780	dist_end 15	PKNH_0602500	dist_end 12	PCYB_061260	PBANKA_0502600	dist_end 12	PYYM_0503000	dist_end 5	PCHAS_0502700	dist_end 12	PRCDC_1017700	dist_end 12	
hypothetical protein	/	/	PVX_113250	Start 32, dist_end 6	PKNH_1149000	Start 32, dist_end 5	PCYB_115470	/	/	/	/	/	/	/		
hypothetical protein	PF3D7_1246000	dist_end 17	PVX_101190	no Nter	PKNH_1465600	Start 17, dist_end 10	PCYB_147040	PBANKA_1459100	Start 27, dist_end 12	PYYM_1463100	Start 27, dist_end 12	PCHAS_1461400	Start 27, dist_end 16	PRCDC_1245400	dist_end 17	
Pv-fam-h protein	/	/	PVX_094290	Center 1116, dist_end 6	PKNH_1254300	Start 42, dist_end 10	PCYB_004600	/	/	/	/	/	/	/		
Plasmodium exported protein, unknown function	PF3D7_1401200	dist_end 9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	PRCDC_1400500		
stevor	x	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	PRCDC_0023900		
Plasmodium exported protein, unknown function	PF3D7_0831300	no Cter	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	PRCDC_0830600		

Mensch
Mensch + Primaten
Primaten
Nager
durch Gilson et. al. beschrieben
13_3_500_1050_1200
13_4_500_1100_1200
Orthologe

Tab. 9 Analyse und Vergleich potenzieller GPI-Proteine und ihrer Orthologe innerhalb verschiedener Plasmodienspezies:

Die Proteome wurden zunächst mit den Parametern 13_3_500_1050_1200 gescreent (hellgrün), nach Anpassung der Suchparameter auf 13_4_500_1100_1200 konnten die Dunkelgrünen hinterlegten Proteine ergänzt werden. Die orthologen Proteine wurden erneut manuell untersucht und die Ausschlusskriterien aufgelistet. Die entsprechenden Proteine weisen z.B. keine typische N- oder C-terminale Sequenz auf (No N/Cter), die Scorewerte sind nicht mit den gewählten Suchkriterien vereinbar, oder Start bzw. Ende der gesuchten Sequenzen befindet sich außerhalb der Suchparameter (dist_end/Start).

4.3 Analyse der Sensitivität und Spezifität

Mithilfe erweiterter Parameter (entsprechend Zeile 1 Tab. 10) wurden 105 Proteine aus dem Proteom *P. falciparums* extrahiert, die als Kohorte für eine graphische Auswertung dienen sollten.

	Grenzposition		Score			Länge	
	Start	Ende	Start	Zwischenteil	Ende	Minimal	Maximal
1	17	17	500	2500	1000	17	23
2	13	4	500	1100	1200	17	23
3	13	3	500	1050	1200	17	23
4	13	15	500	950	1200	17	23
5	13	5	500	1050	1200	17	23
6	10	3	500	1050	1200	17	23

Tab. 10 Auflistung verschiedener Suchparameter-Kombinationen

Diese 105 Proteine wurden mit 5 verschiedenen Parameter-Sets (vgl. Tab. 10) analysiert, um nach Bestimmung der Falsch-Positiven(FP), Richtig-Positiven(TP), Falsch-Negativen(FN) und Richtig-Negativen(TN) die Sensitivität und Spezifität der einzelnen Test-Sets zu errechnen und eine Wahrheitsmatrix (confusion matrix) für jedes Set zu erstellen. Hierzu nutzten wir die vorangegangenen Analysen insbesondere in Form der in den Tabellen 7 und 9 aufgeführten Ergebnisse.

Im graphischen Vergleich wird ersichtlich, dass die Parameter des 2. Suchlaufs (hier Zeile 3 Tab. 10) für *P. falciparum* die bestmögliche Sensitivität und Spezifität ergeben. Da sich in der manuellen Analyse jedoch zeigt, dass eine geringfügige Änderung der Parameter den Einschluss zahlreicher orthologer Proteine anderer Plasmodienspezies ermöglicht, wurde die diskrete Verschlechterung der Sensitivität in Bezug auf *P. falciparum* akzeptiert und die endgültigen Suchkriterien definiert (vgl. Zeile 2 Tab. 10).

Abschließend nutzten wir das Statistik-Programm „R“, um die Resultate letzterer Untersuchung graphisch aufzuarbeiten und die Ergebnisse bezüglich Sensitivität und Spezifität durch einen fourfold plot darzustellen.

(<http://stackoverflow.com/questions/23891140/r-how-to-visualize-confusion-matrix-using-the-caret-packagen>; 04.01.2017)

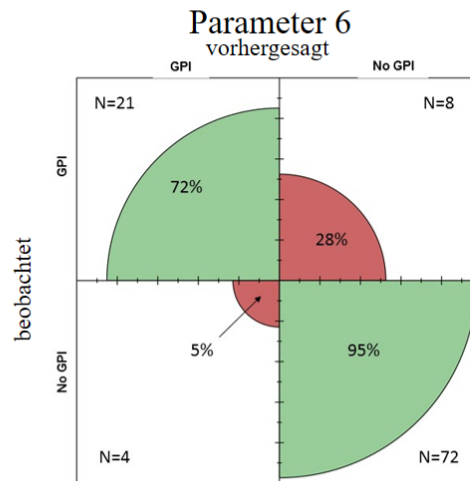
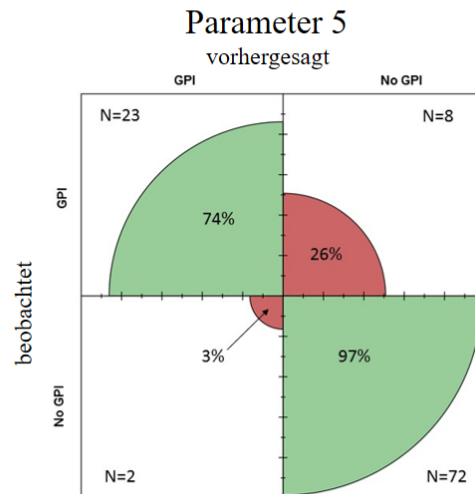
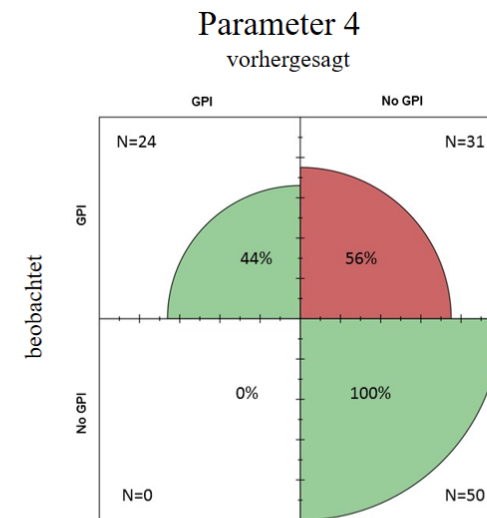
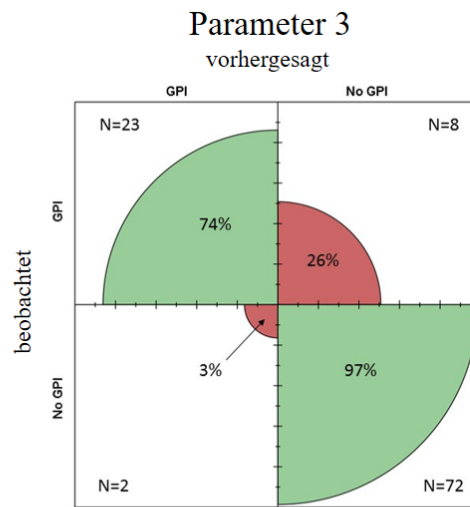
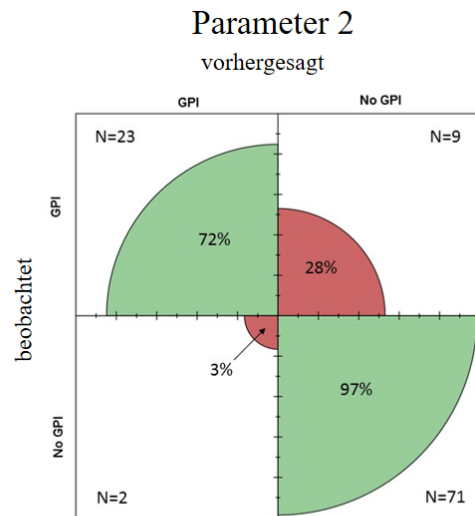


Abb. 10 Graphischer Vergleich der verschiedenen Parameter
Im graphischen Vergleich wird ersichtlich, dass die Parameter des 2. Suchlaufs (hier Zeile 3 Tab. 8) für *P. falciparum* die bestmögliche Sensitivität und Spezifität ergeben. Da sich in der manuellen Analyse jedoch zeigt, dass eine geringfügige Änderung der Parameter den Einschluss zahlreicher orthologer Proteine anderer Plasmodienspezies ermöglicht, wurden die diskrete Verschlechterung der Sensitivität in Bezug auf *P. falciparum* akzeptiert und die endgültigen Suchkriterien definiert (vgl. Zeile 2 Tab. 8). Zur besseren Übersicht wurden die Daten in einem fourfold plot dargestellt

4.4 Analyse der potenziellen GPI-Proteome

Nachdem die Suchparameter definiert wurden, konnte für die untersuchten Parasiten ein potenzielles GPI-Proteom definiert werden. Hierbei ergaben sich interessante Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies (vgl. Tab. 9)

So war es möglich, im Proteom von *Plasmodium falciparum* 35 potenzielle GPI-verankerte Proteine zu beschreiben. Von den 30 durch Gilson et al. 2006 publizierten Aminosäuresequenzen hielten 23 den angewendeten Suchparametern stand, wohingegen 7 Proteine der damaligen Analyse gemäß diesen Kriterien als Non-GPI-APs zu werten sind. 2 der durch die damalige Forschungsgruppe beschriebenen Moleküle weisen keine C-terminale hydrophobe Domäne auf (PF3D7_1002200, PF3D7_1434400). Bei PF3D7_1431400 und PF3D7_1136200 lag die N-terminale hydrophobe Domäne zu weit im Innern des Proteins, wohingegen bei PF3D7_0502500 und PF3D7_0504500 die C-terminale Region zu weit vom Ende entfernt war. PF3D7_0514200 hingegen scheint eine weitere hydrophobe und so ggf. membranständige hydrophobe Domäne in der Mitte des Proteins auszuweisen. Letztendlich vermag nur eine *in vitro* Analyse dieser Moleküle eine abschließende Klarheit zu erbringen. Auffällig ist jedoch, dass auch die Orthologen der phylogenetisch nahe verwandten Spezies *P. reichenowi* (BRAY 1958) ähnliche Ausschlusskriterien aufweisen. Beispielsweise besitzen auch die zu PF3D7_1002200 orthologen Proteine dieses Parasiten und PRCDC_1001600 keine c-terminale hydrophobe Domäne. Bei PRCDC_1430700 zeigt sich wie bei PF3D7_1431400 die N-terminale Domäne zu weit vom Beginn des Moleküls entfernt bzw. bei PRCDC_0501800(ortholog zu PF3D7_0502500) und PRCDC_0503700 (ortholog zu PF3D7_0504500) befindet sich der C-Terminus zu weit im Innern des Proteins.

Somit gelang es im Zuge dieser Arbeit, 12 bisher unbekannte GPI-verankerte Proteine für *P. falciparum* zu definieren, von denen die Carboanhydrase (PF3D7_1140000) für die weiteren molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen gewählt wurde. Sie stellt das bisher erste potenziell GPI-verankerte Enzym in *P. falciparum* dar. Dieses Enzym wurde darüber hinaus in *P. berghei*, *P. yoelli*, *P. chaubaudi* und *P. reichenowi* detektiert. In *P. vivax*, *P. cynomolgi* und *P. knowlesi* fehlt das Molekül komplett.

Für *P. vivax* konnten 30 GPI-APs beschrieben werden, von denen 24 mit den durch Carlton et. al. beschriebenen Molekülen übereinstimmten (Jane M. Carlton et al. 2008). Bei den durch die genannte Arbeitsgruppe als GPI-gebunden definierten Proteinen PVX_084970, PVX_092425, PVX_080530 befindet sich die mögliche hydrophobe N-

terminale Domäne zu weit im Inneren des Moleküls, bei PVX_113780 ließ sich überhaupt keine solche Region definieren. Bei PVX_115165 und PVX_090030 befindet sich die C-terminale hydrophobe Sequenz zu weit vom Ende des Moleküls entfernt, um gemäß den hier verwendeten Suchparametern als GPI-AP gezählt zu werden.

Eine Übersicht über diese Proteine findet sich in Tabelle 11 (vgl. 9.3). Darüber hinaus konnten für 6 Plasmodienspezies bisher noch nicht beschriebene GPI-Sets definiert werden (vgl. Tab. 9).

Der Vergleich der Orthologen zeigt eine große Übereinstimmung der möglichen GPI-Proteine der einzelnen Parasitenarten (vgl. Tab. 9).

Bei 8 der beschriebenen Moleküle konnte in allen untersuchten Parasitenspezies eine GPI-Verankerung nachgewiesen werden. Hierzu gehören die Merozoiten-Oberflächenproteine MSP 4, 8 und 10, das rhoptry-associated membrane antigen sowie das apical sushi protein. Jedes dieser Proteine spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung und Invasion der roten Blutkörperchen. Weiterhin finden sich das 28k Da ookinete surface protein sowie ein Protein der 6-Cystein-Familie in allen 8 analysierten Parasitenspezies.

Darüber hinaus fällt auf, dass unter anderem das 25 kDa ookinete surface protein, das surface protein P113 sowie das apical merozoite protein lediglich in *P. cynomolgi* im Zuge der bioinformatischen Analysen als Non-GPI-Molekül beschrieben wurden. Das circumsporozoite (CS) protein konnte ebenfalls in 7 der 8 betrachteten Spezies als GPI-verankert nachgewiesen werden. In *P. chabaudi* fehlt dieses Eiweiß jedoch gänzlich. MSP1 wiederum konnte in allen untersuchten Plasmodien außer in *P. knowlesi* als GPI-Protein beschrieben werden.

4.5 Phylogenetische Besonderheiten

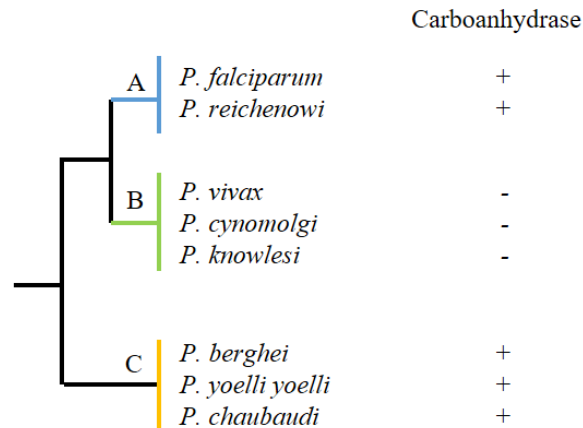


Abb. 11 Vereinfachter Stammbaum der betrachteten Plasmodien Spezies. Die Carboanhydrase findet sich einerseits im sogenannten Laverania subgenus (A) sowie in der Nagetierlinie (C), nicht jedoch in der Gruppe der Primaten- und Humanpathogenen Stämme (B).

In einem nächsten Schritt wurden die phylogenetischen Beziehungen der einzelnen Plasmodien nochmals betrachtet. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei auf dem Vorhandensein der im Rahmen dieser Dissertationsarbeit genauer betrachteten Carboanhydrase.

Letztere konnte bisher in 5 der 8 untersuchten Plasmodienspezies nachgewiesen werden. Die Betrachtung des mithilfe von NGPhylogeny.fr entwickelten Stammbaums (Abb. 11) vermag aufzuzeigen, dass die Carboanhydrase zum einen im sogenannten Laverania subgenus sowie zum anderen in der Nagetierlinie zu finden ist, wohingegen es in der großen Gruppe der primaten- und humanpathogenen Stämme bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Prugnolle et al. 2011).

4.6 Amplifikation des Gens PF3D7_1140000

Die aus den zuvor gezüchteten Plasmodien des Stammes Pf3D7 extrahierte Parasiten-DNA diente als Basis für die Amplifikation des gesuchten Gens Pf3D7_1140000, welches für eine Carboanhydrase codiert. Das auf Chromosom 11 lokalisierte Gen verfügt über ein Intron und weist eine Gesamtlänge von 1952 Basenpaaren (bp) auf (Gardner et al. 2002).

Für die selektive Amplifikation des beschriebenen Gens wurden anhand der auf „plasmoDB“ publizierten DNA-Sequenz zunächst 2 Primer (PfcaS; PfcaAS) erstellt und mehrere PCR-Ansätze mit unterschiedlichem DNA-Gehalt vorbereitet. Anschließend

wurde die Polymerase-Kettenreaktion gemäß der unter 3.2.1 beschriebenen Technik durchgeführt.

Abschließend verwendeten wir die unter 3.2.2 aufgeführte Methode der Agarose-Gelelektrophorese, um die erhaltenen DNA-Fragmente zu visualisieren.

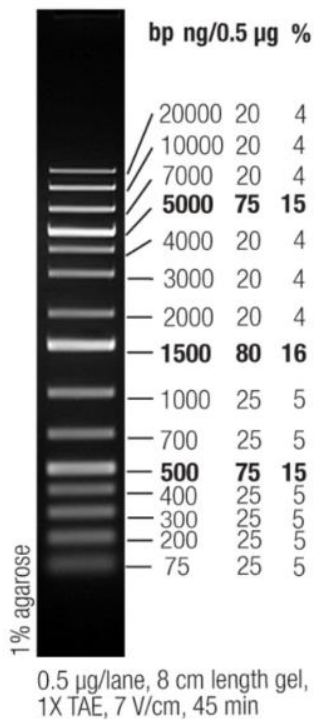


Abb. 12a Thermo Scientific™ GeneRuler™
1kb Plus DNA Ladder

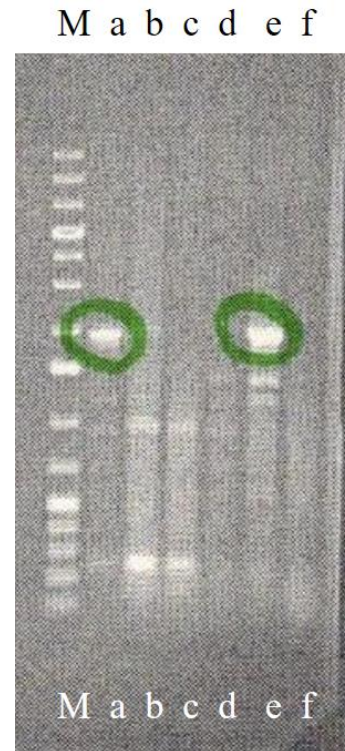


Abb. 12 b PCR vom 18.05.2017:

- (M) DNA-Marker
- (a) 1,7 µg Pf-DNA
- (e) 1,5 µg Pf-DNA
- (b-d)+(f) PCR
fehlgeschlagen

In den PCR-Ansätzen, die zwischen 1,5 und 1,7µl der Plasmodien-DNA enthielten, konnte Pf3D7_1140000 erfolgreich amplifiziert werden.

4.7 Klonierung des Gens PF3D7

In einem nächsten Schritt galt es, die durch die PCR gewonnenen DNA-Fragmente unter Zuhilfenahme des TOPO-TA-Vektors in das Bakterium *E. coli* einzuschleusen und so für nachfolgende Versuche nutzbar zu machen. Hierfür wurde zunächst wie unter 3.2.7 beschrieben, durch die Taq-Polymerase ein Adenosin-Basenüberhang geschaffen und das so modifizierte Gen in den Vektor integriert. Der Adenosin-Überhang komplementiert die freien Thyminbasen im Bereich der Multiple cloning site (MCS) des Vektors.

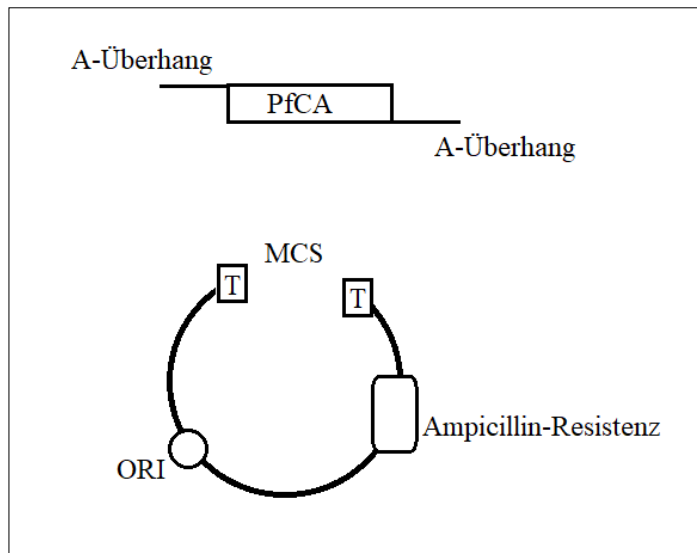


Abb. 13 Ligation des Gens Pf3D7_1140000 in den TOPO-TA-Vektor ORI = Origin of replication (Replikationsursprung); MCS = Multiple cloning site, A= Adenosin, T= Thymin

Anschließend erfolgte die Transformation der so präparierten Plasmide mittels Hitzeschock in die kompetenten *E. coli*-Zellen.

Danach wurden die Bakterien auf zuvor mit X-Gal und IPTG sowie LB und Ampicillin behandelten Agarplatten ausgestrichen.

Nur Bakterien, die den Klonierungsvektor während der Transformation integriert haben, sind in der Lage, auf dem beschriebenen Medium zu wachsen, da der Vektor über ein Resistenzgen verfügt, das den aufnehmenden Organismus widerstandsfähig gegenüber dem aufgetragenen Antibiotikum Ampicillin werden lässt.

Um die gesuchten transgenen Organismen zu identifizieren, verwendeten wir die Technik der Blau-Weiß-Selektion (Vieira und Messing 1982). Durch die Insertion des Transgens in den Vektor wurde das Enzym Galaktosidase absichtlich zerstört. Diese Glykosidase kann in intaktem Zustand den gelben Farbstoff XGal in einen blauen Farbstoff umwandeln, wodurch die Kolonien bläulich erscheinen. Die transgenen Organismen bleiben ungefärbt und können so isoliert werden.

Nachdem die in korrekter Weise modifizierten Organismen identifiziert und 19 Klone in ein Ampicillin-haltiges LBG-Flüssigmedium zur weiteren Kultivierung überführt worden waren, erfolgte eine Mini-Präp (vgl. 3.2.11) zur Isolation der Plasmid-DNA. Nachdem die Proben über Nacht mit EcoRI verdaut worden waren, erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Abb. 4.5.b).

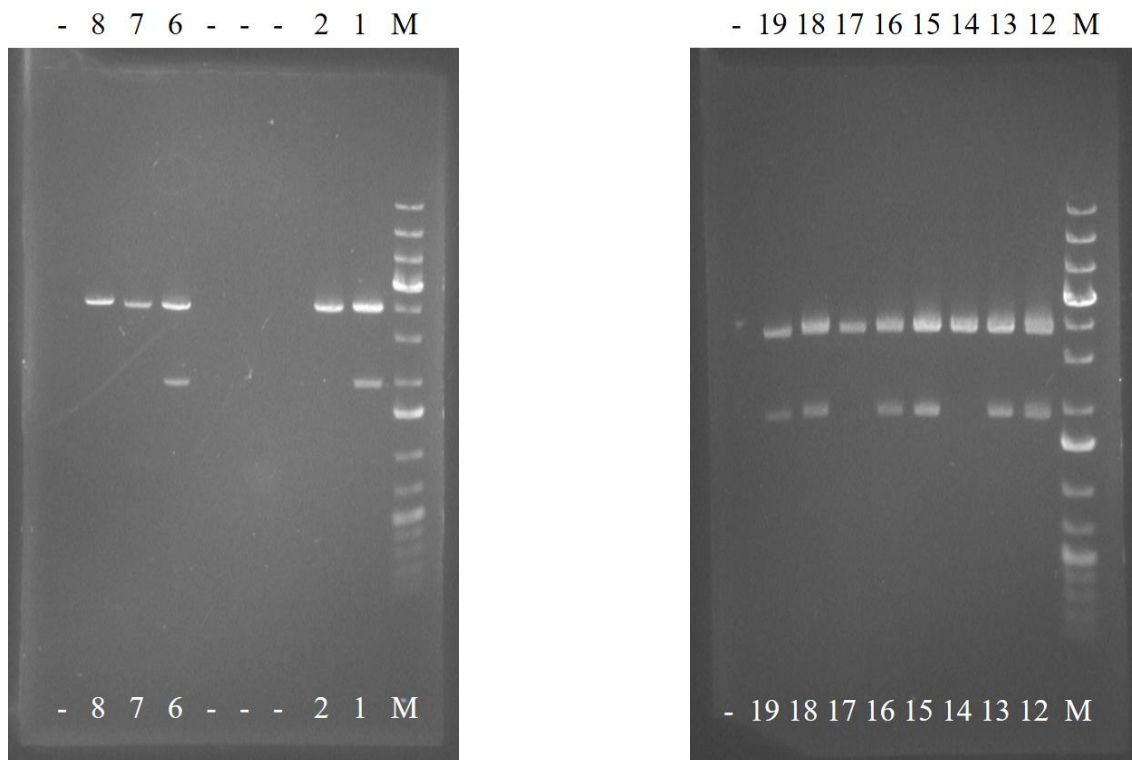


Abb.14 Agarose-Gelelektrophorese der Mini-Präp vom 13.06.2017: Die Klone 1,2, 6-8 sowie 12-19 weisen das gewünschte Plasmid auf. Die kleinere Bande repräsentiert hierbei das Insert, während die größere Bande den Vektor darstellt.

Die abschließend veranlasste DNA-Sequenzierung der Proben 1, 6, 12, 13, 15, 16 und 19 unter Zuhilfenahme des Primers M13 Reverse zeigte zahlreichen Stopcodons in den Klonen 1, 12, 13, 15 und 16. Darüber hinaus fanden sich Frameshift-Mutationen in den Klonen 6 und 19. Lediglich Klon 18 konnte nach dieser Sequenzierung als korrekt eingestuft werden.

Aufgrund der zahlreichen Stopcodons in einer Vielzahl von Klonen erfolgte eine reverse Sequenzierung mit dem Primer T7. Hierbei zeigte sich, dass das gewünschte Gen auch in korrekter Form in Klon 1 integriert worden war, es allerdings entgegen der üblichen Ableserichtung im Plasmid zu liegen kam.

4.8 Entfernen der Introns

Pf3D7_1140000 weist ein 149 bp großes Intron auf, welches vor der Ligation des Gens in den Hefevektor entfernt werden musste. Die hierfür genutzte zielgerichtete Mutagenese wurde mithilfe des unter 3.2.14.2 beschriebenen QuickChange-II-SiteDirectedMutagenesis-Kit durchgeführt. Es erfolgte eine Transformation der modifizierten DNA in die XL10 Gold ultrakompetenten Zellen des genannten Kits. Die Inkubation erfolgte bei maximal 30 Grad, da die vorangegangenen Versuche aufzuzeigen vermochten, dass höhere Temperaturen scheinbar eine toxische Wirkung auf das

Wachstum der transgenen Zellen haben. 18 Klone wurden ausgewählt, weiter kultiviert und anschließend mit EcoRI verdaut.

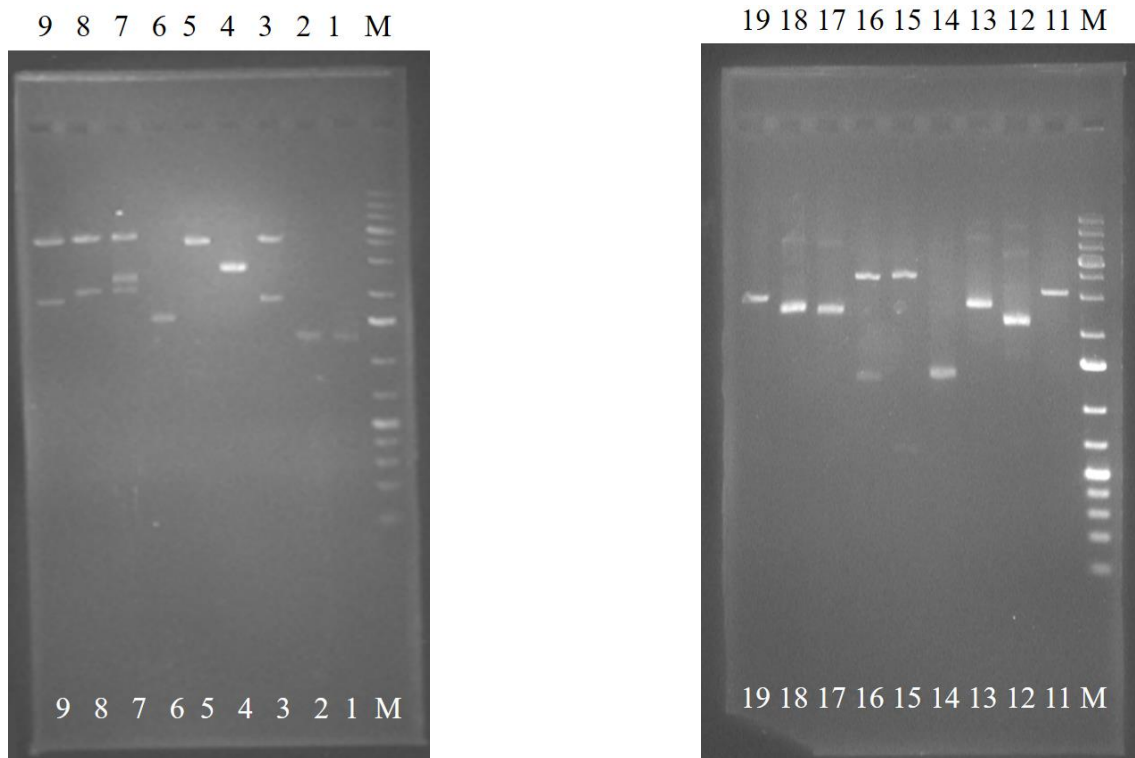


Abb. 15 Agarose-Gelelektrophorese des EcoRI-Verdau von 20.07.2017: Die Klone 3,7,8 und 9 verfügen über ein entsprechendes Fragment der gesuchten Größe von ca. 1803bp.

Unter Bezugnahme auf die anschließende Sequenzierung mit den Primern M13 reverse und T7 erwies sich lediglich Klon 3 als für die weitere Verwendung geeignet. Die 2 hierbei aufgefallenen Punktmutationen (glu->lys; ser->thr) führten wir auf die genetische Variationsbreite des Parasiten zurück.

4.9 Heterologe Komplementation in Hefe

4.9.1 Die Carboanhydrase ist essenziell für das Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae*

Um das PfCA-Gen für weitere Untersuchungen einfacher nutzbar zu machen, entschieden wir uns, es in ein Hefemodell zu exprimieren. Zu diesem Zweck wählten wir den Stamm YPH 499 der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, welche ein hinlänglich erprobtes Modellsystem zur Erforschung der Molekularbiologie verschiedenster eukaryotischer Organismen darstellt. Eine große Anzahl eukaryotischer Genfunktionen weist eine hohe evolutionäre Konservierung auf, ein Umstand, der durch die heterologe Komplementation konditional letaler Mutanten die Untersuchung funktioneller homologer verschiedener Spezies ermöglicht. So verfügt die gewählte Hefe über eine

essenzielle Carboanhydrase, welche als Zielgen genutzt werden kann (Aguilera et al. 2005).

Zur Erzeugung einer konditional letalen Mutante wurde der natürliche Promotor der Hefe durch den stringent regulierten Glukose-reprimierten Gal1-Promoter ersetzt (Mumberg et al. 1994). Hierdurch wird das Wachstum der Hefe auf glukosehaltigen Medien reprimiert, während die Anwesenheit von Galaktose das Wachstum induziert (Johnston und Davis 1984). Auf diese Weise kann durch einen einfachen Wechsel des Mediums das Wachstum der Mutante beeinflusst bzw. unterdrückt werden. Darüber hinaus benötigt der Hefestamm YPH 499 Histidin und Uracil.

Mithilfe des Verfahrens des „Chromosomal Promotor Replacement“ (CPR) wurde die im Weiteren verwendete konditional letale Mutante YPH 499-His-Gal1-ScCA konstruiert (Mazhari-Tabrizi et al. 2004; Orlean et al. 1988).

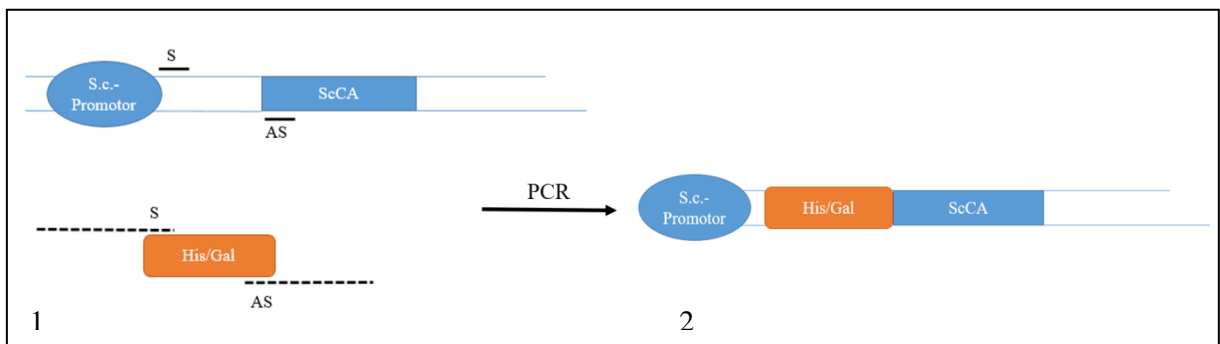


Abb. 16 Schematische Darstellung des Chromosomal Promotor Replacements

Zu diesem Zweck wurden zunächst die Primer ScCAHisGalS und ScCAHisGalAS erstellt, wobei die Basenfolge so gewählt wurde, dass die His3/Gal1-Kassette unmittelbar vor dem zu steuernden Gen zum Liegen kam. Durch diese Modifikation wird das für die ScCA kodierende Gen nur in Anwesenheit von Galaktose im Nährmedium exprimiert.

Die so veränderten Hefeklone wurden daraufhin auf SGR- und SD-Nährmedien ausgestrichen. Während auf den Galaktose-haltigen Medien ein Wachstum zu verzeichnen war, konnten auf den Glukose-haltigen Nährböden keine Hefen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 22). Daher zeigten unsere Ergebnisse eindeutig, dass dieses Gen ein essenzielles Gen in der Hefe ist.

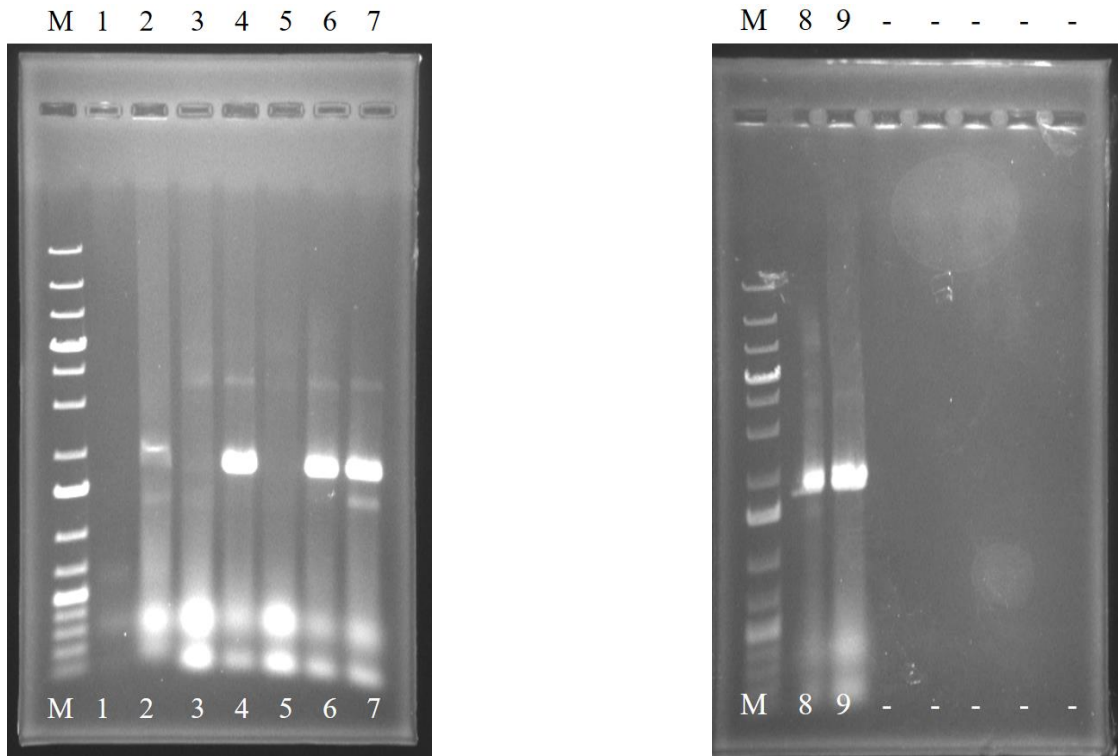


Abb. 17 Agarose-Gelelektrophorese des „Chromosomal promoter replacements“; durch die Analyse des Elektrophorese-Ergebnisses und des beobachteten Wachstumsmusters entschieden wir uns für die Klone 6 und 8. Diese zeigten ein gutes Wachstum auf den SGR-Platten, jedoch keines auf den verwendeten SD-Platten

4.9.2 Funktionale Komplementation der konditional letalen Hefenmutante durch PfCA
 Anschließend galt es, das zuvor modifizierte Gen Pf3D7_114000 mithilfe des Shuttelexpressionsvektors pRS426 MET 25, welcher den Selektionsmarker Uracil (*ura3+*) aufweist, in die Hefe zu transformieren (Christianson et al. 1992).

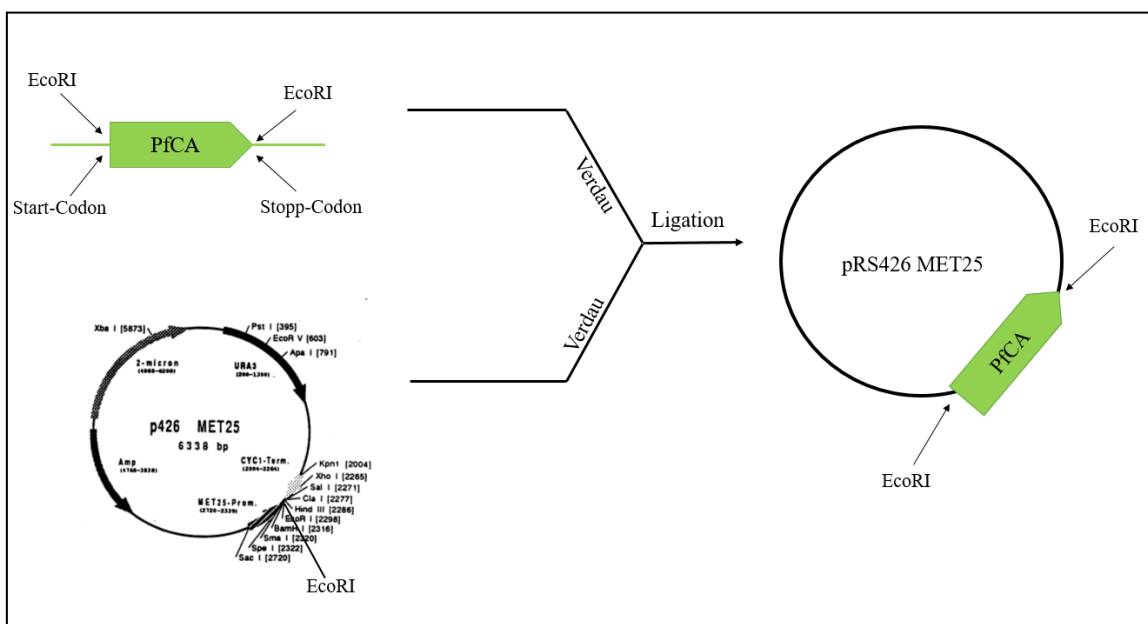


Abb. 18 Klonkarte mit der Strategie für die Ligation von PfCA in den Hefevektor pRS426 MET 25

Dazu wurden der unter 4.8 beschriebene Klon 3 (InsertCA) sowie das genannte Plasmid mit dem Restriktionsenzym EcoRI über Nacht verdaut. Anschließend wurde das Plasmid aufgereinigt und auf ein Agarose-Gel zwecks Elektrophorese aufgebracht. Das gleichfalls verdauete InsertCA wurde ebenfalls einer Elektrophorese unterzogen und das Gen danach aus dem Gel extrahiert (vgl.3.2.3).

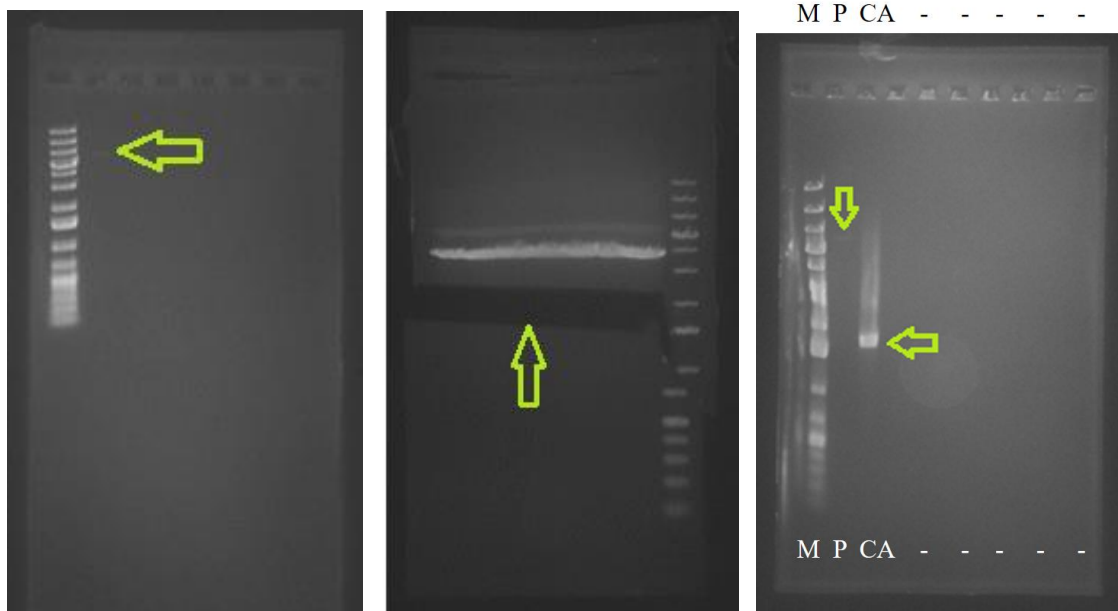


Abb. 19a

Abb. 19b

Abb. 19c

a) 09.08.2017 Agarose-Gelelektrophorese des aufgereinigten Plasmids pRS426

b) 09.08.2017 Agarose-Gelelektrophorese + Gel-Extraktion des InsertCA

c) 09.08.2017 Agarose-Gelelektrophorese des Plasmids pRS426 (P) und des Gel-extrahierten InsertCA (CA), Marker (M)

Im nächsten Schritt erfolgten eine Ligation (vgl. 3.2.7) der aufgereinigten Einzelprodukte sowie eine Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen. Durch den Vergleich unterschiedlicher Versuchsreihen zeigte sich, dass bei einer Inkubationstemperatur von maximal 26 °C die besten Resultate erzielt werden konnten.

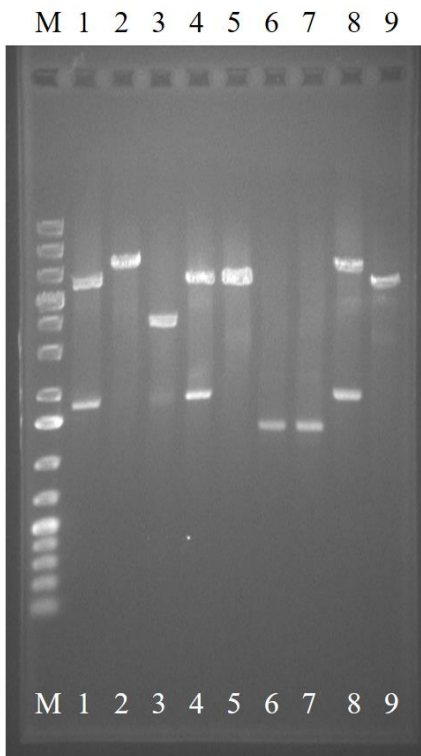


Abb.20a

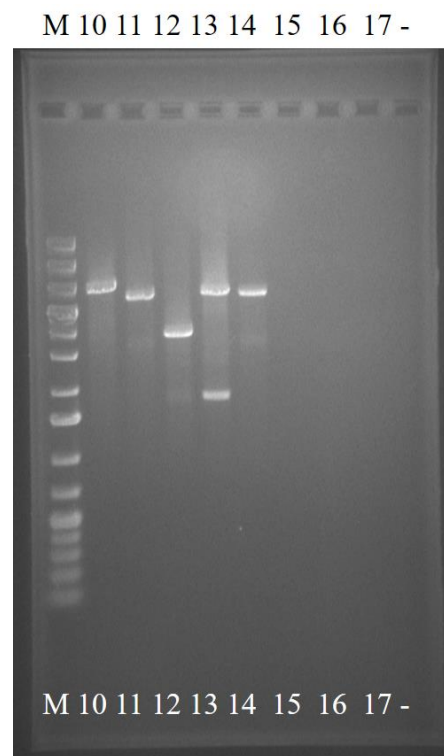


Abb. 20b

14.08.2017 Agarose-Gelelektrophorese, Ligation 1 des aufgereinigten Plasmids pRS426 und der Gel-extrahierten InsertCA, Inkubationstemperatur 30°C. Es zeigten sich 4 positive Klone (1, 4, 8, 13)

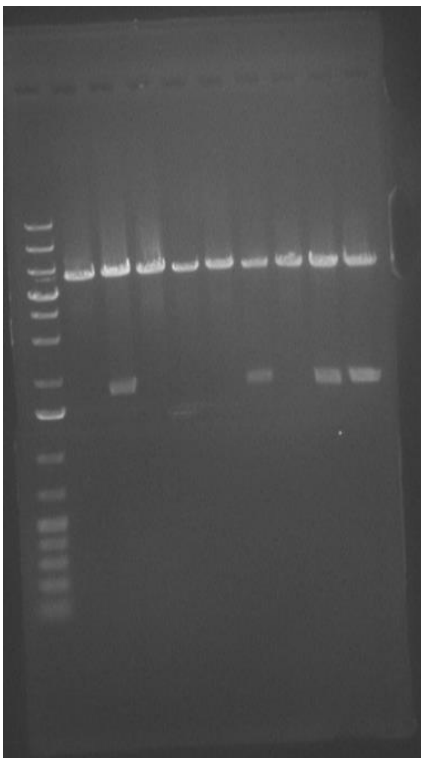


Abb. 20c

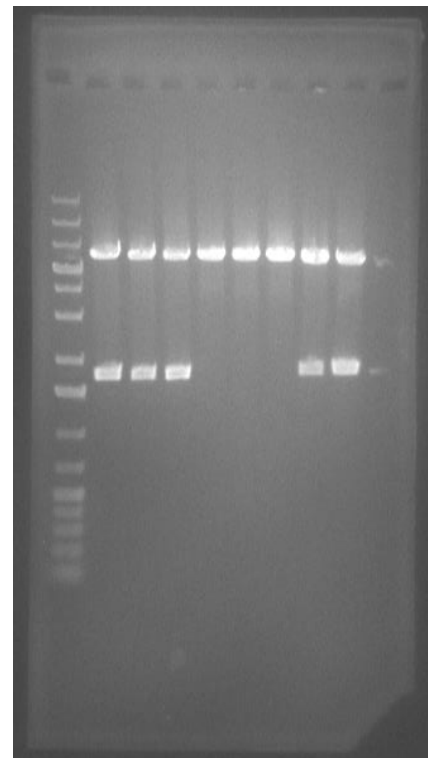


Abb. 20d

15.08.2017 Agarose-Gelelektrophorese, Ligation 2 des aufgereinigten Plasmids pRS426 und der Gel-extrahierten InsertCA, Inkubationstemperatur 26 °C. Es zeigten sich 9 positive Klone (2, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 17).

Das Gen Pf3D7_1140000 weist relativ zu Anfang der Sequenz eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Hind III auf. Darüber hinaus besitzt auch der Vektor pRS426 MET25 eine solche. Diese befindet sich unmittelbar hinter der EcoRI-Schnittstelle des Plasmids. Durch die Digestion und Ligation, die im Vorangegangenen beschrieben wurden, wurde das relevante Gen zwischen den EcoRI-Schnittstellen eingefügt. Liegt die inserierte Gensequenz in korrekter Orientierung im Shuttlevektor, so entsteht beim Verdau mit HindIII ein Fragment, welches mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden kann. Liegt es jedoch entgegen der üblichen Ableserichtung, so ist bei der Digestion mit HindIII eine Linearisierung zu erwarten. Ein Fragment wäre hierbei nicht zu detektieren. Auch kann anhand der Größe des verdauten Plasmids unterschieden werden, ob nur eines oder mehrere InsertCAs in unterschiedlicher Orientierung integriert wurden.

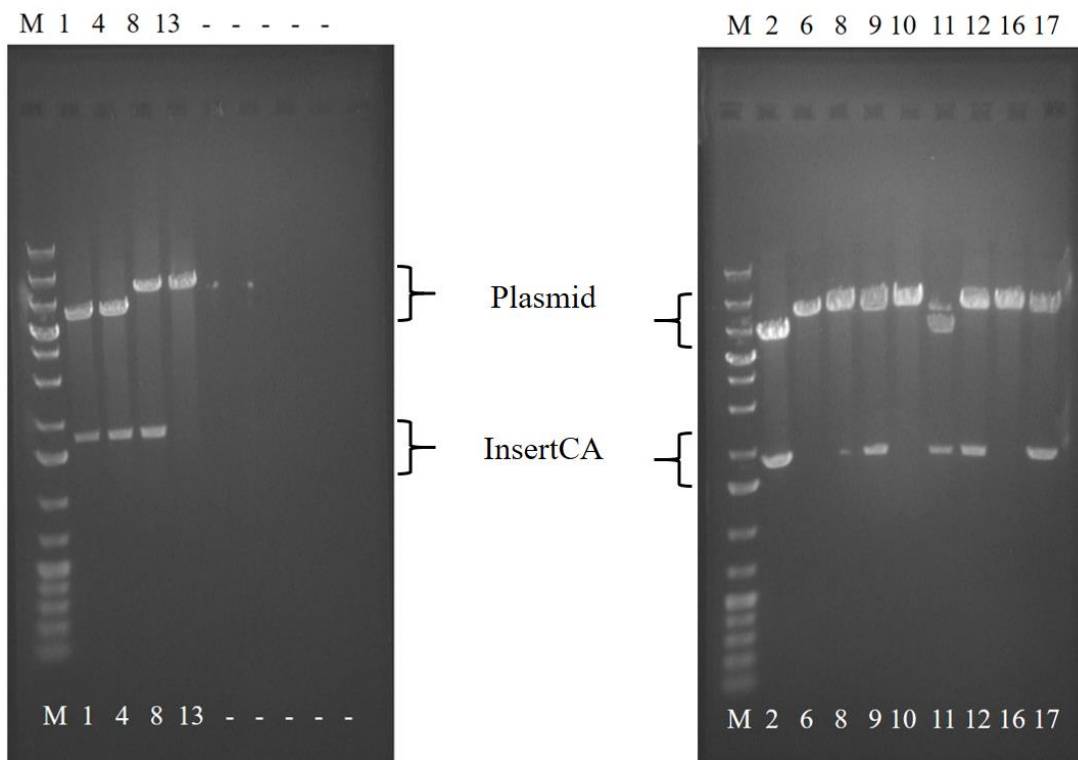


Abb. 21a Verdau der Klone aus Ligation 1 mit HindIII

Abb. 21b Verdau der Klone aus der 2. Ligation mit HindIII

Hierbei zeigten sich 4 Konstrukte, die ein korrekt inseriertes Insert aufwiesen: 1, 4, 2, 11

Die auf diese Weise identifizierten Klone 1, 2, 4 und 11 wurden anschließend mit den Primern Met und Term sequenziert. Die hierbei erhaltenen Sequenzen zeigten sich mit dem Ausgangsklon 3 identisch und konnten alle für die nachfolgenden Experimente genutzt werden.

Das so erzeugte rekombinante Plasmid wurde mithilfe der unter 3.2.7 beschriebenen Technik in die Hefeklone 6 und 8 transformiert und anschließend auf glukosehaltige SD-

Platten und auch auf galaktosehaltige SGR-Platten ausgestrichen und auf ihr Wachstum hin untersucht.

Da der GAL1-Promotor durch die Glukose des SD+Ura-Mediums effektiv reprimiert wurde, und somit die für *S. c.* essenzielle, endogene Carboanhydrase nicht exprimiert wurde, war auf diesen Platten kein Wachstum zu verzeichnen. Die Galaktose der SGR+Ura-Platten hingegen bewirkte eine Induktion der His/Gal-Kassette und somit ein Wachstum der Hefemutante. Wurde während der Herstellung der Platten kein Uracil hinzugegeben, findet sich weder auf den SD- noch auf den SGR-Nährböden ein Wachstum.

Wurde jedoch während der Transformation das rekombinante Plasmid in der Hefemutante YPH499-His3-Gal1-ScCA exprimiert, so kann der Organismus sowohl auf den SGR-Ura als auch den SD-Ura-Nährböden überleben. Das Fehlen von Uracil in den Platten wird hierbei als Selektionskriterium genutzt, da pRS426 wie bereits erwähnt, über einen entsprechenden Selektionsmarker verfügt. Während auf den SGR-Platten durch die Aktivierung des GAL1-Promotors die endogene *S.c.*-Carboanhydrase exprimiert wird, findet auf den SD-Platten eine heterologe Komplementation mit der parasitären Carboanhydrase PfCA statt.

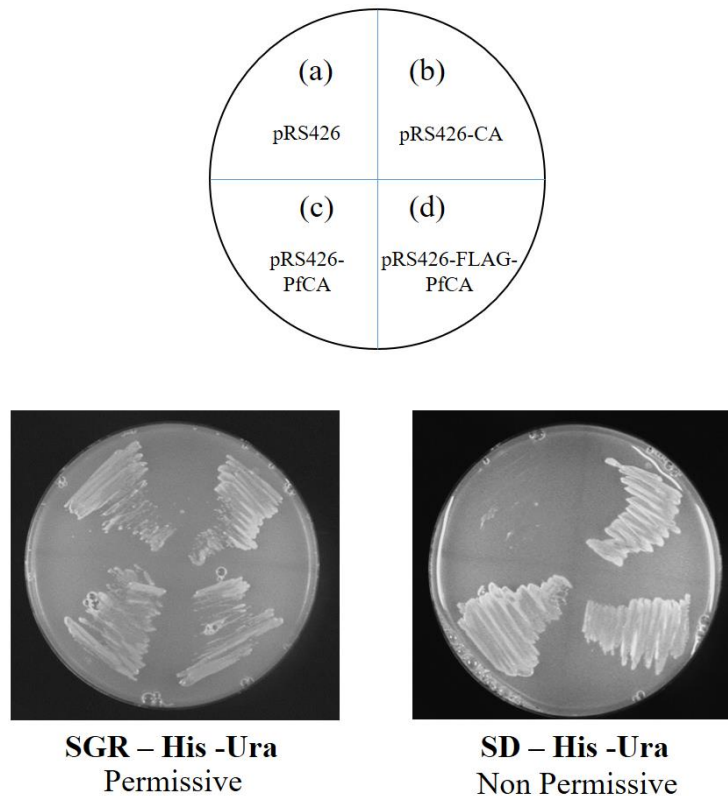


Abb. 22 Komplementation der YPH499–HIS–GAL–CA Hefemutante durch homologe oder heterologe Gene: Die Expression von CA kann durch den Wechsel des Wachstumsmediums gesteuert werden. In einem Galaktose-haltigen Medium (SGR) wird der Promotor nicht unterdrückt, während er auf einem Glucose-haltigen Medium (SD, das 5 % Glucose enthält) ausgeschaltet bleibt. Die Mutante wurde mit pRS426 (a), pRS426-ScCA (b), pRS426-PfCA (c) bzw. pRS426-FLAG-PfCA (d) transformiert. Die transformierten Zellen wurden dann auf Platten ausgestrichen, die ein Minimalmedium ohne Histidin sowie Uracil und entweder Galaktose (SGR) oder Glucose (SD) enthielten, und bei 26 °C inkubiert.

4.10 Die fusionierte FLAG-Sequenzen beeinflussen die Komplementation in der Hefemutante nicht

Zur genaueren Analyse des potenzielle GPI-verankerten Proteins Pf3D7_1140000 wurde in einem nächsten Schritt eine Proteinmarkierung mittels Flag-Tag vorgenommen. Dieser Protein-Tag (tag = engl. Markierung, Schildchen) kann zur Reinigung und Charakterisierung rekombinanter Moleküle genutzt werden. Die 1020 Da große Aminosäuresequenz (DYKDDDDK) kann hierbei sowohl N- als auch C-terminal in das Fusionsprotein integriert werden.

Hierfür wurden zunächst mithilfe der Sequenzierungsergebnisse der rekombinanten Klone die Primer PfCAflagmutS und PfCAflagmutAS erstellt und die FLAG-Sequenz anschließend mittels PCR N-terminal in das Fusionsprotein integriert.

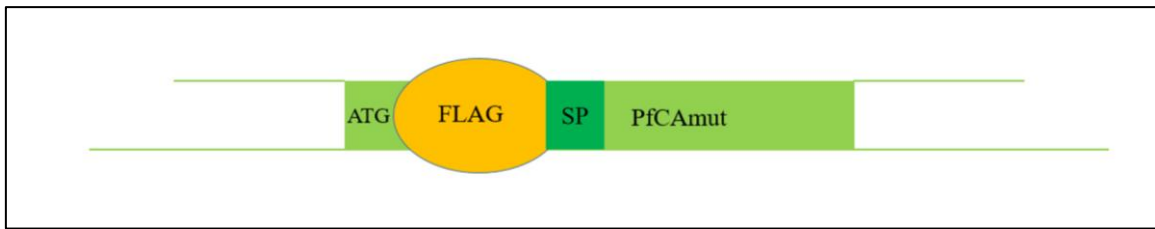


Abb. 23 Lokalisation des Flag-Tag-Proteinmarkers: N-terminale Integration der Marker-Sequenz unmittelbar hinter dem Startcodon und vor dem für das Signalpeptid codierenden Abschnitt (SP) des Fusionsprotein

Das auf diese Weise modifizierte Protein wurde erneut in den Shuttlevektor pRS426 integriert und in die Hefeklone 6 und 8 transformiert.

Die erwartete Größe des FLAG-markierten Proteins beträgt nunmehr 72472,67 Da. (PfCAmut = 71452,67 Da + FLAG-tag = 1020 Da).

Die so erzeugten Hefeklone wurde wiederum auf die Nährmedien SD und SGR ausplattiert. Beide Kulturen zeigten ein gutes Wachstum, sodass davon auszugehen ist, dass die FLAG-Markierung keinen Einfluss auf die heterologe Komplementation nimmt (vgl. Abb. 22).

4.11 Detektion des FLAG-markierten Proteins PfCAmut

Um die mit einer Flag-Sequenz markierten Proteine genauer zu analysieren, wurden diese zunächst mittels SDS-Elektrophorese separiert und anschließend mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran überführt (vgl. 3.2.16) (Burnette 1981).

Um den Protein-Marker sichtbar zu machen, wurden die Antikörper „AntiFlag M2“ als Primärantikörper sowie Ziege anti-Maus IgG Antikörper (HRP), ein Immunkonjugat, als Sekundärantikörper hinzugegeben. Der monoklonale Maus-Antikörper „AntiFlag M2“ bindet die in PfCAmut exprimierte FLAG-Sequenz. Der 2. Antikörper wiederum richtet sich gegen mehrere Epitope des Fc-Teils des Maus-Antikörpers und bindet diese. Die durch die Mehrfachbindung der Sekundärantikörper bedingte Signalverstärkung erleichtert die folgende Detektion der durch das Reporterenzym des Immunkonjugats katalysierte Chemilumineszenz-Reaktion (vgl. 3.2.17).

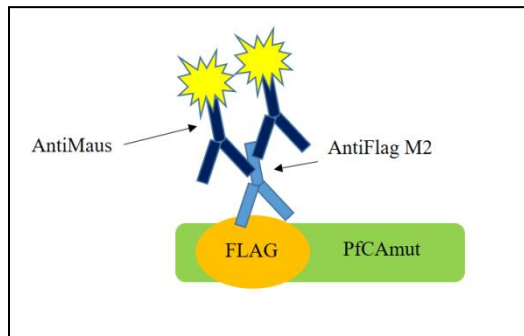


Abb. 24 Schematische Darstellung der Immunmarkierung

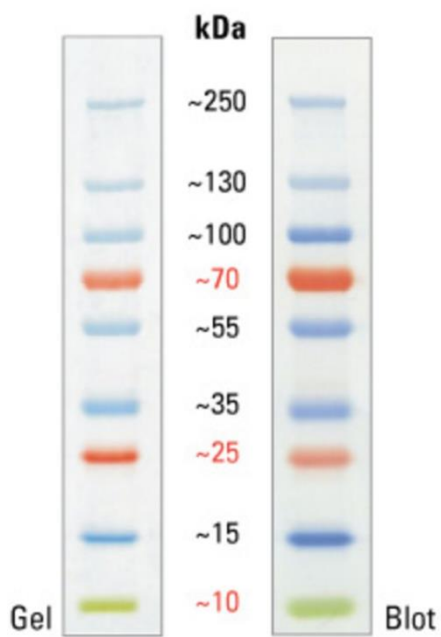


Abb. 25a
SDS-PAGE Bandenprofil des PageRuler Plus 26619

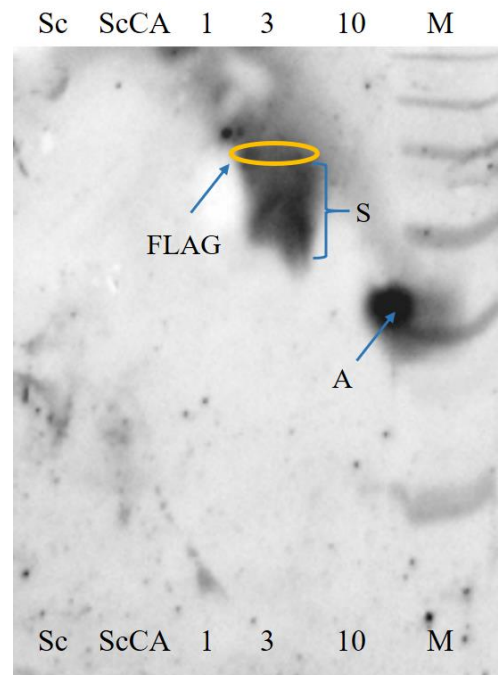


Abb. 25b Western Blot vom 02.05.2018
Die Größe des Flag-markierten Proteins stimmt in etwa mit der erwarteten Größe überein. Die mit S markierte Schliere besteht höchstwahrscheinlich aus Zuckermodifikationen der Hefeglykosilierung. evtl. hat die Lyse bei 1 und 10 nicht optimal funktioniert, weshalb hier keine Banden zu sehen sind.
A = Artefakt, M = Marker

4.12 Die Triton X-114-Phasentrennung zeigt, dass CA ein GPI-Protein ist

Mithilfe der Triton X-114-Phasentrennung ist es möglich, Proteine gemäß ihrer Löslichkeit aufzutrennen und so genauer zu charakterisieren (Pryde und Phillips 1986; Bordier 1981). Frühere Untersuchungen der amphipatischen GPI-verankerten Proteine waren in der Lage aufzuzeigen, dass der hydrophobe Teil der Ankerstruktur in Bezug auf die Löslichkeit überwiegt. Eine Tatsache, die die Lokalisation der betrachteten Moleküle in der hydrophoben Triton-Phase zu erklären vermag (Eckert et al. 1996). Dieser Umstand wurde für die weitere Untersuchung des Flag-markierten Proteins PfCA herangezogen, um eine mögliche GPI-Bindung zu detektieren.

Hierzu wurde das unter Zuhilfenahme der transgenen Hefeorganismen gewonnene und mittels Flag-Markierung modifizierte Protein gemäß dem unter 3.2.15 aufgeführten Versuchsaufbau behandelt und anschließend ein Western Blot (vgl. 3.2.16) durchgeführt. Verwendet wurde das bisher als Klon 3 bezeichnete Konstrukt.

Das Flag-markierte Protein fand sich in der öligen Phase des Separationsexperiments, was darauf hinweist, dass es sich um ein GPI-verankertes Protein handelt.

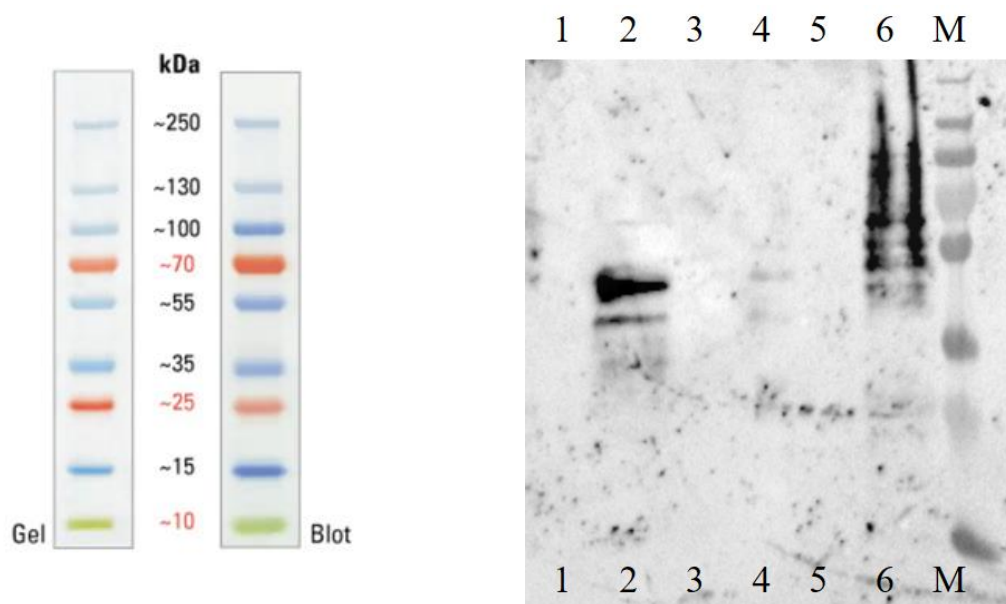


Abb. 26 Western Blot mit AntiFlag, Ergebnisse der Triton X-114 Phasenseparation
1 Lysat YPH499; 2 Lysat YPH44-His-Gal-CA transformiert mit prs426FlagPfCA (K3); 3 wässrige Phase YPH499; 4 wässrige Phase YPH44-His-Gal-CA transformiert mit prs426FlagPfCA (K3); 5 Triton x 114 Pellet Phase YPH499; 6 Triton x 114 Pellet YPH44-His-Gal-CA transformiert mit prs426FlagPfCA (K3); 7 Marker

Das Vorliegen einer Bande in Tasche 6 zeigt das Vorliegen des gesuchten Proteins in der Triton-X-114-Phase und spricht somit für die GPI-Bindung der Carboanhydrase. Die Tatsache, dass hier mehrere Banden zu sehen sind, lässt annehmen, dass das Protein in unterschiedlichen Glykosilierungen vorliegt.

Um die tatsächlich korrekte Verteilung der GPI-Proteine zu überprüfen, wurde der Western Blot zusätzlich mit dem Antikörper gegen das bekannte GPI-verankerte GAS1-Hefeprotein wiederholt (Stebel et al. 2000).

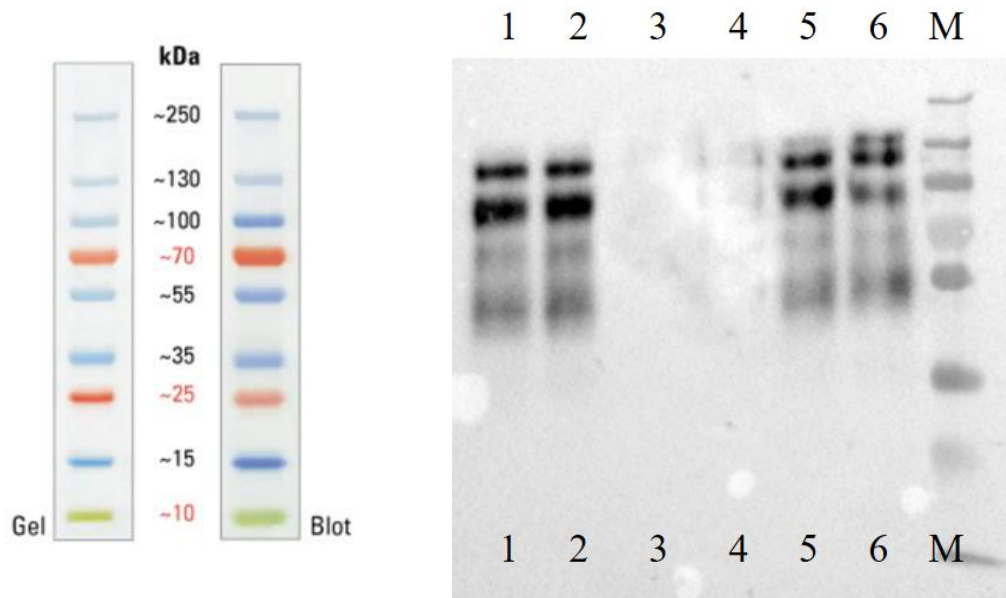


Abb. 27 Western Blot mit AntiGAS1, Ergebnisse der Triton X-114 Phasenseparation
 1 Lysat YPH499; 2 Lysat YPH499-His-Gal-CA transformiert mit prs426FlagPfCA (K3); 3 wässrige Phase YPH499; 4 wässrige Phase YPH499-His-Gal-CA transformiert mit prs426FlagPfCA (K3); 5 Triton x 114 Pellet Phase YPH499; 6 Triton x 114 Pellet YPH499-His-Gal-CA transformiert mit prs426FlagPfCA (K3); 7 Marker

Da es sich bei dem wachstumshemmenden Protein GAS1 um ein bekanntes GPI-Protein handelt (Stebel et al. 2000), bestätigt das Auftreten der Banden in Tasche 5 und 6 die korrekte Verteilung der Proteine und somit die Annahme, dass es sich auch bei PfCA um ein GPI-Protein handelt.

Überraschenderweise verschob sich die CarboAnhydrase in die wässrige Phase, als die Triton-X-Phasentrennung mit den Klonen 3 und 10 erneut in Abwesenheit von Zinkchlorid durchgeführt wurde, was auf eine enzymatische Abspaltung des GPI-Ankors mittels der endogenen Phospholipasen hinweist.

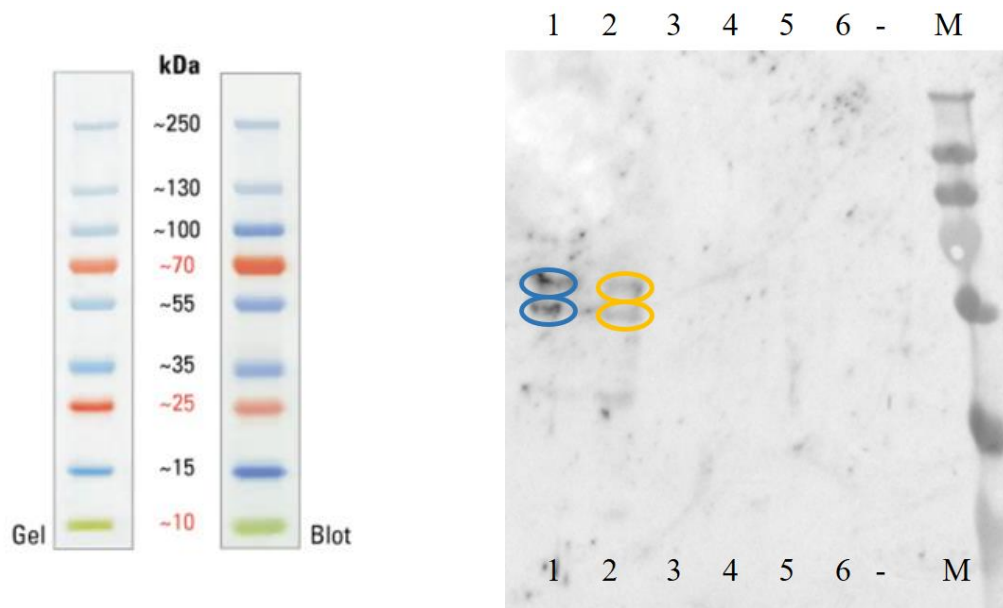


Abb. 28 Western Blot vom 02.08.2019, Ergebnisse der Triton X-114 Phasenseparation ohne Zugabe von $ZnCl_2$

1 - 3 Darstellung der hydrophilen Phase; 4 - 6 Darstellung der hydrophoben (Triton) Phase; M = Marker
 Die Taschen 1 und 4 enthalten den Wildtyp des Proteins, wie zu erwarten findet sich keine Bande. In Tasche 2 wurde die wässrige Phase des Experiments mit Klon 3, in Tasche 3 selbiges mit Klon 10 aufgetragen. Es finden sich jeweils zwei deutliche Banden (Klon 3 > Klon 10), deren Größe mit der erwarteten Proteingröße in Einklang zu bringen ist. Die Tatsache, dass sich je 2 Banden finden, lässt den Schluss zu, dass ein Teil des Proteins in glykosylierter Form vorliegt.

In Tasche 5 findet sich die Triton-Phase des Versuchs mit Klon 3, in Tasche 6 selbige des Klons 10.

Die Unterschiede in der Qualität der Darstellung der aufgeführten Westernblots lassen sich u. a. durch die unterschiedlichen Belichtungszeiten erklären.

GAS-1 ist ein hoch exprimiertes Hefeprotein. Hierdurch liegt eine große Proteinmenge vor, welche bereits nach kurzer Belichtungszeit (19 s) deutlich zu sehen ist. Im Gegensatz dazu ist die Expression von PfcAmut in Hefe deutlich geringer. Die somit erheblich kleinere Proteinmenge benötigt eine höhere Belichtungszeit (12 min), um ein deutlich sichtbares Signal zu erhalten. Durch diesen Umstand entsteht allerdings auch deutlich mehr Hintergrundrauschen, welches das Bild weniger klar erscheinen lässt.

Darüber hinaus ist zu beachten, dass Triton-X-114 selbst das Laufverhalten der Proteine beeinflussen kann.

5. Diskussion

Trotz der fortwährenden Bemühungen im Kampf gegen Malaria stellt diese Parasitose noch immer eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit dar. Gemäß den aktuellen Daten des Robert Koch Institutes leben ca. 40 % der Weltbevölkerung in Endemiegebieten (RKI-Ratgeber 2018). Auch wird aktuell eine erneute Ausbreitung der Protozoenerkrankung nach Europa diskutiert (Medialdea-Carrera et al. 2018).

Im Jahr 2021 konnten global ca. 247 Millionen Malariafälle beschrieben werden, etwa 400 000-619 000 davon verliefen tödlich (WHO 2022b). Auch wenn die weltweiten Fallzahlen seit 2010 deutlich reduziert werden konnten, ist in den letzten Jahren eine drastische Verlangsamung dieses Trends zu verzeichnen (WHO 2022b). Während der Corona-Pandemie konnte im Gegenteil ein erneuter Anstieg der Fallzahlen und Todesfälle beobachtet werden.

Um das Ziel der UN sowie der WHO, Malaria mittelfristig auszurotten, erreichen zu können, ist eine ständige Erweiterung des Grundverständnisses dieses Parasiten unabdingbar, um bei einer zunehmenden Resistenzentwicklung gegen die gängigen Malariamedikamente handlungsfähig zu bleiben und neue Ansätze möglicher zukünftiger Pharmakotherapien zu akquirieren (malERA 2017; Dwivedi et al. 2016).

Diese Dissertationsarbeit legt den Fokus auf die Analyse der ubiquitär vorkommenden GPI-verankerten Proteine. Hierfür wurde eine Kombination aus bioinformatischen und biochemischen Ansätzen entwickelt, um mithilfe der bisher beschriebenen Proteine noch unbekannte potenzielle GPI-Proteine in Plasmodien zu detektieren und zu verifizieren.

5.1 Diskussion der Bioinformatischen Erkenntnisse

5.1.1 Allgemeine Betrachtungen

Unter Zuhilfenahme der durch Gilson et. al. für *P. falciparum* sowie der durch Carlton et. al. für *P. vivax* beschriebenen potenziellen GPI-Proteine, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein deskriptiver softwarebasierter Analyseansatz entwickelt (Gilson et al. 2006; Jane M. Carlton et al. 2008). Die Auswertung dieser etwa 60 bereits bekannten GPI-verankerten Proteine ergab eine charakteristische Struktur. Es zeigte sich sowohl eine N- als auch eine C-terminale hydrophobe Region, welche eine deutlich hydrophilere Mitte umschließen. Die N-terminale Domäne fungiert hierbei als Signalpeptid und dient der Adressierung des Proteins an das endoplasmatische Retikulum, während die C-terminale Domäne mit welcher der Transamidase-Komplex interagiert nach einer spezifischen Spaltungsreaktion, die Verknüpfung des Proteins mit dem GPI-Anker ermöglicht. In

einem nächsten Schritt wurden Score-Werte für die Hydrophobizität bzw. für die Hydrophilie der einzelnen Regionen festgelegt und die Position der einzelnen Abschnitte definiert.

Unter Zuhilfenahme dieser Parameter erfolgte anschließend das softwarevermittelte Screening der Proteome acht verschiedener Plasmodienspezies (Petersen et al. 2011; Pierleoni et al. 2008; Hofmann und Stoffel 1993). Die auf diese Weise detektierten potenziellen GPI-Proteine wurden anschließend manuell auf ihre Plausibilität überprüft. Hierbei lag das Augenmerk insbesondere auch auf dem Vergleich orthologer Proteine der einzelnen Spezies (vgl. Tab 7).

Durch die händische Kontrolle der Orthologen, zeigte sich, dass die zunächst gewählten Suchparameter 13_3_500_1050_1200, welche in *P. falciparum* die bestmögliche Spezifität und Sensitivität aufwiesen, für das Speziesübergreifende Screening zu restriktiv definiert waren und auf diese Weise zahlreiche potenzielle Proteine ausgeschlossen wurden. Daraufhin erfolgte eine erneute Adjustierung der Kriterien auf 13_4_500_1100_1200. Der leichte Verlust an Sensitivität und Spezifität in Bezug auf das Proteom des Pathogens der *Malaria tropica* (*P. falciparum*) wurde im Hinblick auf den so ermöglichten Einschluss wahrscheinlich GPI-verankerter Orthologe und die somit erreichte insgesamt Verbesserung der Voraussagewerte toleriert.

Die durch Gilson et. al. 2006 beschriebenen Proteine konnten unter Anwendung der genannten Kriterien nur zum Teil als GPI-verankert bestätigt werden. So hielten 23 der 30 2006 publizierten Proteine der erneuten Überprüfung stand. 7 Moleküle des damals definierten Kanons mussten gemäß den hier angewendeten Paradigmen als Non-GPI-APs gewertet werden. So zeigte sich insbesondere, dass die hydrophoben C- und N-terminalen Sequenzen in diesen Proteinen von den Grenzwerten abwichen bzw. gar nicht nachweisbar waren. Auch eine oder mehrere zusätzliche hydrophobe Sequenzen im Innern des Moleküls führte zum Ausschluss des jeweiligen Polypeptids (vgl. 4.2).

Letztendlich müssten die einzelnen Proteine im Zuge einer *in vitro* Analyse verifiziert werden um eine abschließende Klarheit diesbezüglich zu erlangen.

Dennoch scheinen die im Zuge der bioinformatischen Analyse getroffenen Aussagen über mögliche GPI-Anker insofern plausibel zu sein, dass auch die Orthologen der phylogenetisch nahe verwandten Spezies *P. reichenowi* (Bray 1958) ähnliche Ausschlusskriterien aufweisen. Weitere Beispiele können der Tabelle 9 entnommen werden.

Von den auf diese Weise definierten, 12 bisher unbekanntem GPI-verankerten Proteinen für *P. falciparum* wurde die Carboanhydrase PF3D7_1140000 für meine weiteren molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen gewählt. Sie stellt das bisher erste potenziell GPI-verankerte Enzym in *P. falciparum* dar.

Der Vergleich der Orthologen zeigt eine große Übereinstimmung der möglichen GPI-Proteine der einzelnen Parasitenarten (vgl. Tab. 9).

So konnte mithilfe der Bioinformatik unter anderem nachgewiesen werden, dass acht der beschriebenen Eiweißmoleküle in allen betrachteten Plasmodienarten einen GPI-Anker besitzen. Beispielfhaft sollen hier die Merozoiten-Oberflächenproteine MSP 4, 8 und 10, das rhoptry-associated membrane antigen sowie das apical sushi protein genannt werden. Jedes dieser Proteine spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung und Invasion der roten Blutkörperchen. Die konkrete Funktion jedes einzelnen ist hierbei jedoch noch nicht abschließend geklärt (Drew et al. 2005; Marshall et al. 1997b; Puentes et al. 2005; Kirkitadze und Barlow 2001; Srivastava et al. 2010; Topolska et al. 2004). Die Tatsache, dass für diese Moleküle die GPI-Bindung in den verschiedenen Plasmodienspezies nachgewiesen werden konnte, lässt möglicherweise Rückschlüsse auf die Wichtigkeit dieser Verankerung für die Funktion der genannten Proteine zu, da diese im Laufe der evolutionären Entwicklung des Parasiten konserviert wurde.

In der differenzierten Betrachtung der einzelnen Spezies fällt jedoch auf, dass *P. cynomolgi* deutlich weniger potenzielle GPI-Proteine aufweist. Aufgrund der Nähe dieses Parasiten zu *P. vivax* (Martinelli und Culleton 2018; Leclerc et al. 2004) und im Hinblick auf die hier aufgefallenen Ausschlusskriterien wie z.B. das häufige Fehlen einer N- oder C-terminalen Domäne, ist davon auszugehen, dass die Aufarbeitung des verwendeten Proteoms einer weiteren Überprüfung und Überarbeitung bzw. einer erneuten Sequenzierung bedarf und das Screening nach einer erneuten Überarbeitung des selbigen teilweise ein anderes Ergebnis bringen würde, welches in höherem Maße mit den Ergebnissen in den anderen Spezies übereinstimmen würde.

5.1.2 Betrachtung einzelner GPI-Proteine

Wie bereits angemerkt, finden sich einige der betrachteten Moleküle in nahezu allen untersuchten Parasitenspezies als GPI-verankert wieder. Einige sollen hierbei genauer betrachtet werden.

Das Merozoiten-Oberflächenprotein MSP1 ist eines der am besten untersuchten GPI-APs. In den hier aufgeführten Untersuchungen zeigte sich 7 von 8 Parasiten eine GPI-

Verankerung. Lediglich das Molekül von *P. knowlesi* ist gemäß den getroffenen Suchparametern nicht GPI-verankert.

MSP1 wird zu Beginn der Schizogonie durch eine Subtilisin-artige Protease SUB1 prozessiert und besteht aus einem Komplex aus 4 Polypeptidfragmenten (P₈₃ N-terminal, P₃₀ und P₃₈ im Inneren, sowie P₄₂ C-terminal). P₄₂ wiederum ist mit dem GPI-Anker verbunden (Birkenmeyer et al. 2010).

Es wird angenommen, dass dieser Komplex sowohl mit MSP6 (bindet an P₃₈) als auch mit MSP7 (bindet an P₈₃, P₃₀, P₃₈) interagiert. Darüber hinaus sind auch MSPDBL1 und -2 potenzielle Interaktionspartner dieses Oberflächenproteins. Selbige sind in der Lage, zu Beginn der parasitären Invasion direkt an den humanen Erythrozyten zu binden. (Kadekoppala und Holder 2010; Koch und Baum 2016; Lin et al. 2014) Etwa zur gleichen Zeit wird das Fragment P₄₂ durch eine Subtilisin- ähnliche Protease SUB2 gespalten, so dass das Fragment P₁₉ entsteht, welches in die invadierte Blutzelle internalisiert wird und als erster Marker für die Biosynthese der parasitophoren Vakuole zu fungieren scheint. Das verbleibende Fragment P₃₃ wird abgespalten (Michael Waisberg et al. 2012; Bentley 2006).

Die genaue Rolle von MSP1 während des eigentlichen Invasionsprozesses bleibt jedoch weiterhin unklar (Das et al. 2015).

Des Weiteren muss das Ergebnis der durchgeführten Analyse im Hinblick auf MSP1 des Parasiten *P. knowlesi* kritisch hinterfragt werden. Weist dieses Protein anders als in den 7 anderen untersuchten Parasiten tatsächlich keine GPI-Verankerung auf oder handelt es sich hierbei um eine Schwäche der Bioinformatik, die aufgrund des strikten Befolgens vordefinierter Parameter Ausnahmefälle strikt ausschließt? Auf der anderen Seite ist zu überlegen, welche Vor- oder gar Nachteile der tatsächliche Verlust des GPI-Ankers dieses Proteins in *P. knowlesi* mit sich bringen würde. So könnte eine genauere Analyse einer potenziell fehlenden GPI-Verankerung im Vergleich mit anderen Spezies eventuell weitere Rückschlüsse auf die Funktion von MSP1 erlauben. Dennoch sollte zunächst eine biochemische Analyse dieses Moleküls erfolgen, um die tatsächliche Art der Membranverankerung darzustellen.

Auch die Rolle der anderen Merozoiten-Oberflächenproteine ist noch nicht abschließend geklärt. Es ist davon auszugehen, dass sie eine mehr oder weniger wichtige Rolle bei der Invasion der roten Blutkörperchen sowie in Wachstum und Entwicklung des asexuellen Parasiten im Wirt spielen.

MSP2 stellt neben MSP1 eines der am häufigsten vorkommenden Proteine an der Oberfläche der Blutstadienparasiten dar. Es wird angenommen, dass es eine entscheidende Rolle für die Replikation und Invasion des Merozoiten spielt (MacRaild et al. 2012; Wickham et al. 2003). Es enthält als einziges Merozoiten-Oberflächenprotein keine Epidermal-Growth-Factor-ähnliche Domäne (Cowman und Crabb 2006). Außerdem ist es in der Lage, zu polymerisieren und amyloidartige Fibrillen zu bilden. Der Vorteil dieser Funktion ist bisher noch nicht geklärt. Es könnte jedoch hierdurch einerseits zu einer verbesserten Anheftung und Invasion in den Erythrozyten oder andererseits zu einer verbesserten Abwehr der Immunantwort des Wirtes kommen (Zhang et al. 2012; Adda et al. 2009).

MSP2 kann nur in *P. falciparum* und dem Schimpansen-Malariaparasiten *P. reichenowi* nachgewiesen werden und scheint gemäß den hier getätigten Analysen in beiden Organismen GPI-verankert zu sein. So ist entweder anzunehmen, dass MSP2 in diesen Parasiten eine einzigartige Funktion besitzt, die in den anderen Spezies nicht zu finden ist, oder aber seine Funktion in den übrigen Plasmodien durch ein redundantes Protein, beispielsweise MSP4 oder MSP5, übernommen werden kann.

So waren frühere Studien in der Lage eine enge Assoziation zwischen den Genen von MSP2, -4 und -5 am proximalen Ende des Chromosoms 2 aufzuzeigen, ein Umstand, der die Hypothese zulässt, dass sie sich funktionell ähneln und die entwicklungsstadienspezifische Expression übereinstimmt (Marshall et al. 1998; Cowman und Crabb 2006).

Die auffallende Ähnlichkeit der Gene, die für MSP4 und MSP5 kodieren, legt nahe, dass in einem frühen Stadium der Plasmodien-Evolution eine Genduplikation stattgefunden haben muss. Diese Theorie wird auch durch die Tatsache gestützt, dass bei den Nagetier-Malariaerregern (*P. yoelli*, *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. reichenowi*) nur ein einziges Gen nachweisbar ist, welches homolog zu MSP4 und MSP5 des Parasiten *P. falciparum* zu sein scheint.

In Folge der Duplikation kam es zu zahlreichen Variationen zwischen den beiden Genen, wobei jedoch die EGF-ähnliche Domäne konserviert blieb (Marshall et al. 1997a; Sanders et al. 2006; Black et al. 1999; Kedzierski et al. 2000).

MSP4 wird während des späten Ringstadiums synthetisiert und findet sich besonders im späten asexuellen Stadium des Parasiten sowie in den Leberschizonten. Es wird ohne Prozessierung auf die Merozoitenoberfläche übertragen. Die genaue Funktion dieses Oberflächenmoleküls ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Es wird jedoch eine

Protein-Protein-Interaktion der EGF-ähnlichen-Domänen angenommen, welche ggf. eine Rolle in der Stabilisierung der peripheren Membranproteine im Oberflächenmantel spielen oder direkt an der Bindung an den Erythrozyten beteiligt sein könnte (Marshall et al. 1997a; Benet et al. 2004).

MSP5 wiederum findet sich in Trophozoiten, freien Merozoiten und Schizonten. Auch bei diesem Protein bleibt die genaue Funktion unklar. Sanders et. al. 2006 konnten mithilfe eines Knockout-Experiments jedoch nachweisen, dass es für *P. falciparum* nicht essenziell zu sein scheint. So ist entweder anzunehmen, dass MSP5 nur eine untergeordnete Rolle spielt oder seine Funktion redundant zu anderen Proteinen dieses Organismus ist (Black et al. 1999; Kedzierski et al. 2000).

Interessant wären ähnliche Experimente in Parasiten, in denen MSP4 nicht nachweisbar ist, um zu überprüfen, ob hierbei MSP5 die Funktion des fehlenden Oberflächenproteins übernehmen kann. Letzteres würde die These der Genduplikation zusätzlich unterstützen. Sollte MSP5 essenziell für das Wachstum eben dieser Parasiten sein, könnte seine Erforschung als möglicher Impfstoffkandidat von Interesse sein, denn MSP5 weist anders als die meisten Merozoitenoberflächenproteine keine Antigen-Variationen auf (Sanders et al. 2006).

Die Synthese von MSP8 beginnt etwa 4 h nach der Invasion des Wirtes und erreicht ihr Maximum etwa 12 bis 20 h später. Die genaue Funktion dieses Eiweißes ist jedoch nach wie vor unbekannt, jedoch scheinen weder die Invasion in die Blutzelle noch die Expression anderer Oberflächenproteine durch das Fehlen von MSP8 beeinträchtigt zu werden (Drew et al. 2005; Black et al. 2003; Drew et al. 2004; Black et al. 2005).

Schließlich wird angenommen, dass MSP10 ein funktionelles Analogon von MSP1 ist und seine vermutete Funktion darin besteht, spezifische Oberflächenrezeptoren auf Erythrozyten zu verankern (Drew et al. 2004; Black et al. 2003; Puentes et al. 2005).

5.1.3 Die Carboanhydrase PF3D7_1140000 ein putatives GPI-verankertes Protein

Mithilfe der im Vorangegangenen beschriebenen bioinformatischen Methodik gelang es, 12 bis zu diesem Zeitpunkt unbekannte potenzielle GPI-verankerte Proteine in *P. falciparum* zu beschreiben. Eine Besonderheit in diesem Molekül-Kanon stellt die Carboanhydrase PF3D7_1140000, als bisher erstes potenziell GPI-gebundenes Enzym dieses Parasiten, dar.

Interessanterweise findet sich dieses Enzym in 5 der 8 untersuchten Parasiten. Eine differenzierte phylogenetische Betrachtung vermag aufzuzeigen, dass die Carboanhydrase zum einen im sogenannten Laverania subgenus sowie zum anderen in der Nagertierlinie zu finden ist, wohingegen sie in der großen Gruppe der Primaten- und Humanpathogenen Stämme bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Prugnolle et al. 2011). Zur Verdeutlichung der Abstammungs- und Verwandtschaftsverhältnisse sei auf den hier eingefügten vereinfachten Stammbaum verwiesen (vgl. Abb.29).

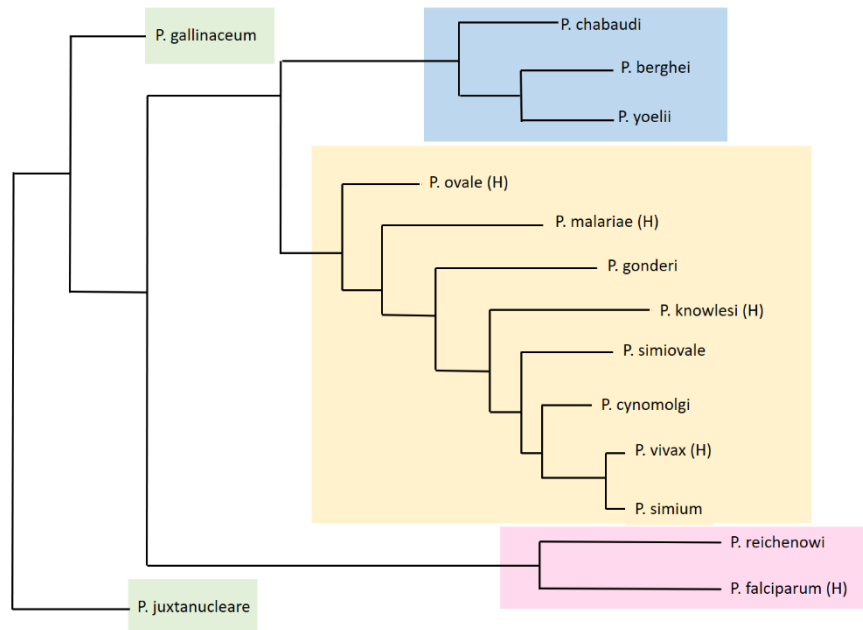


Abb. 29 Vereinfachter Stammbaum ausgewählter Plasmodienspezies, Grün: Vogelparasiten; Blau: Nagerparasiten; Rosa: Laverania subgenus; Gelb: primaten- und/oder humanpathogene Parasiten; (H): Humanpathogen (Prugnolle et al. 2011)

Die Untergattung Laverania besteht gemäß der aktuellen Studienlage neben den von uns untersuchten Spezies *P. falciparum* und *P. reichenowi* aus 5 weiteren Parasitenarten (Prugnolle et al. 2011; Otto et al. 2014).

Eine Analyse der Proteome der übrigen Vertreter dieser Untergruppe im Hinblick auf die Carboanhydrase und ihre GPI-Verankerung ist eventuell in der Lage, weitere interessante Erkenntnisse zu den Abstammungsverhältnissen der einzelnen Spezies aufzuzeigen. Möglicherweise ist zu konstatieren, dass dieses GPI-gebundene Enzym auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen ist und in der im Stammbaum gelb markierten Gruppe der Primaten- und Humanpathogenen Plasmodien im Zuge der Evolution verloren ging. Sicherlich sollten in diesem Zusammenhang noch weitere Spezies dieser Linie auf das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit dieses Eiweißes überprüft werden.

Von zusätzlichem Interesse könnte auch der Nachweis eines solchen in entfernter verwandten Parasiten wie beispielsweise in Babesien (Dede et al. 2008) sein, was ggf. wichtige Erkenntnisse zur evolutionären Entwicklung und den Verwandtschaftsverhältnissen dieser Organismen ermöglichen könnte.

Grundsätzlich ist zu erwähnen, dass Carboanhydrasen in einer Vielzahl von Lebewesen vorkommen. Diese Metalloenzyme lassen sich in 6 genetische Familien mit bis zu 14 Isoenzymen einteilen, wobei die PfCA eine eigene genetische Gruppe darstellt, die als η -Carboanhydrase bezeichnet wird (Del Prete et al. 2014; Simone et al. 2015; Fujikawa-Adachi et al. 1999; Hilvo et al. 2005).

Die GPI-Verankerung ist bisher lediglich für 2 Isoenzyme der nahe verwandten Familie der α -Carboanhydrasen beschrieben worden, die in zahlreichen Wirbeltieren nachzuweisen ist (Hilvo et al. 2005; Waheed und Sly 2014). Das GPI-verankerte Isoenzym IV findet sich unter anderem in der menschlichen Lunge, in Endothelzellen kleiner Blutgefäße sowie in Skelett- und Herzmuskulatur (Zhu und Sly 1990; Sender et al. 1998; Sender et al. 1994; Fleming et al. 2016; Fleming et al. 1993). Die ebenfalls GPI-gebundene CA XV konnte unter anderem bei Mäusen, nicht jedoch bei Menschen oder Schimpansen nachgewiesen werden (Hilvo et al. 2005). Ein Vergleich dieser beiden Enzyme mit dem durch uns erstmalig beschriebenen GPI-Protein der η -Familie ist gegebenenfalls in der Lage, die Gemeinsamkeiten und Unterschiede dieser Klassen näher zu definieren.

Insbesondere im Hinblick auf die Tatsache, dass nach aktuellem Forschungsstand davon auszugehen ist, dass sich die Carboanhydrasen im Laufe der Evolution der verschiedenen Lebensformen mehrfach unabhängig voneinander entwickelt zu haben scheinen (Liljas und Laurberg 2000).

So wäre einerseits zu klären, ob die GPI-Verankerung einen funktionellen Vorteil mit sich bringt, welcher wiederum eine wiederholte Entwicklung dieser Membranbindung in den einzelnen Organismen begünstigt haben könnte.

Es ist wahrscheinlich, dass die hier beschriebenen Formen auf ein gemeinsames, GPI-gebundenes Vorläuferprotein zurückgeführt werden könnten. Die weitere Untersuchung sowohl der Funktion des Enzyms sowie seiner Verankerung als auch der möglichen phylogenetischen Zusammenhänge könnte wichtige Erkenntnisse zur Entwicklung dieser Proteinmoleküle liefern.

Die Enzymklasse der Carboanhydrasen katalysiert die Umwandlung von CO_2 zu HCO_3^- und spielt in der Entwicklung und für das Wachstum der Plasmodien eine entscheidende Rolle (Meldrum und Roughton 1933; Krungkrai et al. 2005; Supuran 2008). Während die Parasiten Purine des Wirts für die DNA- und RNA-Synthese nutzen könnten, müssen die benötigten Pyrimidine neu gebildet werden (Krungkrai et al. 2005). Dies ist jedoch nur unter Anwesenheit von HCO_3^- möglich, welches in den befallenen Zellen in hohem Maße durch PfCA bereitgestellt wird. In den infizierten roten Blutkörperchen findet sich abhängig vom Entwicklungsstadium des Parasiten eine bis zu doppelt so hohe Carboanhydraseaktivität wie in nicht befallenen Zellen (Krungkrai et al. 2001).

Die Hemmung dieser Biokatalysatoren ist Gegenstand zahlreicher Forschungen. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass Sulfonamide, Azetazolamide, Methazolamide, Dichlorophenamide und Indisulame *in vitro* und in Mausmodellen auch *in vivo* über die Inhibition der PfCA eine antiparasitäre Wirkung aufweisen (Krungkrai et al. 2005; Reungprapavut et al. 2004; Krungkrai und Krungkrai 2011).

Gegebenenfalls ermöglicht die in dieser Dissertation konstatierte GPI-Bindung dieses *drug-targets* eine Weiterentwicklung der bestehenden Therapieansätze, beispielsweise durch die Kombination des CA-Inhibitors mit einer Phospholipase, welche direkt am GPI-Anker angreift.

5.2 Diskussion der biochemischen Aufarbeitung der Carboanhydrase

5.2.1 PF3D7_1140000 komplementiert eine NCE103-defiziente Hefemutante von *Saccharomyces cerevisiae*

Wie bereits erwähnt, finden sich Carboanhydrasen in allen Lebensformen, von Bakterien bis hin zu hoch entwickelten Säugetieren (Aguilera et al. 2005). Auch die im Weiteren betrachtete Bäckereihefe *S. cerevisiae* verfügt über ein solches Metalloenzym (Isik et al. 2009; Elleuche und Pöggeler 2010). Gemäß dem aktuellen Forschungsstand ist davon auszugehen, dass einerseits die Bereitstellung von Bikarbonat für HCO_3^- abhängige Carboxylierungsprozesse beispielsweise im Citratzyklus sowie andererseits die Wahrung des Säure-Base-Gleichgewichts die hauptsächlichen Funktionen dieses Enzyms darstellen (Aguilera et al. 2005; Elleuche und Pöggeler 2010).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das zur genetischen Familie der β -Carboanhydrasen gehörende Enzym Nce103 essenziell für das Wachstum der Hefe unter atmosphärischen Normalbedingungen ist (Aguilera et al. 2005; Götz et al. 1999). Durch zahlreiche heterologe Komplementationsexperimente mit z. B. der humanen α -CAII

sowie der β -CA des Bakteriums *E. coli* konnte außerdem demonstriert werden, dass die Aktivität einer artfremden Carboanhydrase ausreicht, um die effektive Bereitstellung von Bikarbonat und somit das Wachstum der Hefe zu gewährleisten (Clark et al. 2004; Cronk et al. 2001; Elleuche und Pöggeler 2010). Dieses Wissen konnte für die im Folgenden diskutierten Versuche genutzt werden. Zur genaueren Betrachtung der PfCA entschieden, wurde diese in eine konditional letale Hefemutante kloniert.

Wie unter 4.9 aufgezeigt, wurde zur Erzeugung der CA-defizienten Mutante YPH499 His-Gal-ScCA das Verfahren des „Chromosomal Promotor Replacement“ (CPR) genutzt (Mazhari-Tabrizi et al. 2004; Orlean et al. 1988). Durch das Einfügen des Glukose-reprimierten Gal1-Promotors (Mumberg et al. 1994) wird das Wachstum der Hefe auf glukosehaltigen Medien gehemmt, während die Anwesenheit von Galaktose das Wachstum induziert (Johnston und Davis 1984). Auf diese Weise kann durch einen einfachen Medienwechsel das Wachstum der Mutante beeinflusst bzw. unterdrückt werden. Darüber hinaus benötigt der Hefestamm YPH 499 Histidin und Uracil.

Die Mutante YPH499 His-Gal-ScCA ist nicht in der Lage, auf dem Medium SD +Ura -His zu wachsen, da die darin enthaltene Glukose den eingefügten Promotor hemmt und so ein Ablesen der endogenen Carboanhydrase verhindert. Auf dem Galaktose haltigen-Medium SGR +Ura -His hingegen zeigte sich bereits wenige Tage nach der Beimpfung ein Hefewachstum, da die Expression der ScCA durch die Aktivierung des Gal-Promotors ermöglicht wurde.

Es wurden stets histidinfreie Nährmedien verwendet, um sicherzustellen, dass nur die konditional letale Mutante und nicht der S.c.-Wildtyp auf den jeweiligen Platten zu finden ist.

Auf einem Uracil-Mangelmedium ist weder auf den SD- noch auf den SGR-Platten ein Wachstum zu verzeichnen, da YPH499 nicht in der Lage ist, Uracil selbstständig zu bilden.

Dieser Umstand wurde genutzt, um die erfolgreiche Transformation des Plasmids pRS426 MET 25 in die Hefemutante zu demonstrieren. Da dieser Vektor ein Uracil-Gen aufweist, ist selbst nach korrekter Transformation eines leeren Plasmids ein Wachstum auf den SGR-Ura-His Platten zu verzeichnen. Auf den SD-Platten ist auch nach Einbringen des leeren Plasmids keine Hefekolonie zu erkennen, da die Expression der endogenen ScCA noch immer blockiert ist. Dieser Umstand zeigt einerseits, dass die ScCA als funktionelles Enzym zu werten ist und andererseits nur ein Enzym im Proteom der Bäckereihefe vorhanden ist, welches diese Funktion ausführen kann.

Nach erfolgreicher Transformation des Plasmids pRS426 MET 25 PfCA in die Carboanhydrase-defiziente Hefemutante entsteht ein heterologer Organismus, der nun in der Lage ist, auf einem SD-Ura-His Nährmedium zu wachsen. Die durch die Glukose blockierte Expression der endogenen ScCA wird in diesem Organismus durch die im Vektor enthaltene, artfremde PfCA ersetzt bzw. komplementiert und so das Wachstum der Hefe ermöglicht.

Zusätzlich konnte auf diese Weise gezeigt werden, dass es sich bei der PfCA um ein auch in der Hefe funktionelles Enzym handelt.

Zur Kontrolle des Versuchsaufbaus erfolgte darüber hinaus die Transformation der konditional letalen Hefemutante mit einem pRS426 MET 25 ScCA-Plasmid. Auch hier zeigte sich eine erfolgreiche Komplementation, da durch das Einbringen der hefeeigenen Carboanhydrase über den Shuttlevektor auch auf den permissiven Nährmedien eine Expression dieses Enzyms erreicht werden konnte.

Um dem eigentlichen Ziel dieser Dissertationsarbeit, neue GPI-Proteine zu detektieren und zu beschreiben, näherzukommen, wurde das in die Hefe klonierte Parasiten-Gen PF3D7_1140000 im darauffolgenden Schritt mit einer FLAG-TAG-Proteinmarkierung versehen (Hopp et al. 1988). Ich habe mich nach der Abwägung möglicher struktureller Konsequenzen für die Integration der Markersequenz im Bereich des N-Terminus unmittelbar hinter dem Startcodon entschieden. Wie durch Zordan et. al. für das Epitop-Tagging beschrieben, können mit dem Einfügen eines solchen TAGs verschiedene Eventualitäten auftreten, die die korrekte Expression bzw. Funktion des zu untersuchenden Proteins stören. So kann allein die Anwesenheit der zusätzlichen Aminosäuresequenz die Eigenschaften des Moleküls verändern, die posttranslationale Modifikation oder die Proteinfaltung. Darüber hinaus kann auch die Protein-Protein-Interaktion gestört oder die Sekretion gehemmt werden (Zordan et al. 2015).

Glücklicherweise stellte sich die gewählte Position als günstig gewählt heraus. Der nur wenige AS lange Proteinmarker schien die Expression der PfCAmut nicht zu verhindern und soweit ersichtlich auch die Funktion des Proteins nicht zu stören. Es wurde lediglich eine längere Wachstumsphase der Hefekulturen verzeichnet.

Auch die Hefen, die im Zuge des Kontrollversuchs mit ScCAmut komplementiert wurden, wiesen ein komplikationsloses Wachstum auf.

5.2.2 Biochemischer Nachweis der GPI-Verankerung von PfCA mittels

Triton-X-114-Phasentrennung.

Um den Beweis zu erbringen, dass das bioinformatisch als GPI-verankert deklarierte Protein PfCA tatsächlich über eine solche Membranbindung verfügt, wurde das im Hefemodell exprimierte und mittels FLAG-TAG visualisierte Molekül einer Triton-X-114-Phasentrennung unterzogen.

Dieser Versuch nutzt die Eigenschaft des Triton-X-114, je nach Konzentration in Wasser bei bestimmten Temperaturen zwei Phasen auszubilden. Eine Phase weist hierbei hydrophile Eigenschaften und Stoffe auf, während sich die hydrophoben Stoffe in der öligen Phase sammeln (Bordier 1981).

Vorangegangene Untersuchungen des amphipathischen Charakters der GPI-Proteine vermochten zu zeigen, dass in Bezug auf die Löslichkeit der lipophile Anteil der Membranverankerung überwiegt (Eckert et al. 1996). Sollte es sich, wie mithilfe der Bioinformatik konstatiert, bei der betrachteten Carboanhydrase von *P. falciparum* um ein GPI-gebundenes Protein handeln, wäre sein Nachweis in der hydrophoben Phase Beweis für eine solche Bindung.

Um eine Abspaltung des Proteins durch eine endogen vorhandene Phospholipase zu verhindern, wurde dem Versuchsansatz Zinkchlorid zugesetzt, welches in der Lage ist, eine solche Spaltung zu inhibieren (Cross 1984).

Nachdem PfCAmut der unter 3.2.19 beschriebenen Prozedur unterzogen wurde, wurden die einzelnen Phasen unter Zuhilfenahme eines Westernblots (Cordero et al. 2009) eingehend analysiert.

Die Westernblot-Analyse bestätigte das Vorhandensein von PfCAmut in der öligen Phase, wodurch, ergänzend zu den bioinformatischen Ergebnissen, abschließend der biochemische Beweis erbracht werden konnte, dass es sich bei diesem Enzym mit großer Wahrscheinlichkeit um ein GPI- gebundenes Protein handelt.

Um zu verifizieren, dass es sich bei der untersuchten Phase tatsächlich um die lipophile Fraktion handelt und dass GPI-Anker auch wirklich in dieser zu finden sind, wurde im gleichen Versuchsaufbau auch das bekannte Hefeprotein GPI-Protein Gas1 markiert und betrachtet (Stebel et al. 2000). Durch die Anwesenheit dieses Moleküls in der betrachteten Phase, in welcher sich auch PfCAmut befand, konnte nochmals bestätigt werden, dass es sich auch bei der im Zuge dieser Dissertationsarbeit beschriebenen Carboanhydrase aller Wahrscheinlichkeit nach um ein GPI-gebundenes Molekül handelt.

Um die letzten Zweifel auszuräumen und die getroffenen Aussagen nochmals zu verifizieren, wurde der unter 3.2.19 beschriebene Versuch erneut durchgeführt, dieses Mal jedoch ohne den Zusatz von Zinkchlorid. Auf diese Weise waren die endogenen Phospholipasen nicht länger inhibiert und somit in der Lage, den durch die Erkenntnisse des vorangegangenen Experiments angenommenen GPI-Anker abzuspalten. Anschließend erfolgte erneut eine Triton-X-114-Phasentrennung und ein Western Blot. Das zu untersuchende Molekül PfCAmut tauchte nun in der wässrigen Phase auf.

Die Tatsache, dass eine fehlende Hemmung der endogenen Phospholipase dazu führt, dass sich die betrachtete Carboanhydrase in den Separationsversuchen in einer anderen Phase als ursprünglich aufgezeigt wiederfindet, ist in der Lage, die getroffene Aussage über die Membranbindung des Eiweißes zu bestätigen und die Qualität der Vorhersage zu erhöhen. Zusätzlich nutzten wir das bekanntermaßen GPI-verankerte wachstumshemmenden Protein GAS1 (Stebel et al. 2000), um eine weitere Bestätigung zu erhalten. Der Nachweis dieses Proteins in der gleichen Phase wie die Carboanhydrase bestärkt nochmals die Aussage, dass es sich auch bei PfCA um ein GPI-Protein handelt.

So konnte unter Zuhilfenahme mehrerer Verifikationsmechanismen zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass es sich bei der Carboanhydrase PfCA um ein GPI-verankertes Protein handelt.

Zusätzlich bestätigt dieser Nachweis die Funktionstüchtigkeit der genutzten Software bzw. der erarbeiteten Analyseparameter.

5.2.3 Mögliche Lokalisation der Carboanhydrase PfCA

Die bisher beschriebenen GPI-verankerten Proteine der Plasmodien sind an der Oberflächenmembran der Parasiten lokalisiert. Ihre Funktion ist vielfältig und reicht von einer Schutzfunktion über die Beteiligung an der Signaltransduktion bis hin zu pathogenen Wirkungen (Eckert et al. 1996; Robinson 1991b; Shams-Eldin et al. 2009; Debierre-Grockiego et al. 2007).

Die Lokalisation der in dieser Dissertation beschriebenen Carboanhydrase innerhalb des Parasiten ist bisher noch nicht beschrieben worden. Im Folgenden sollen, wenn auch spekulativ, unter Berücksichtigung der bisher bekannten allgemeinen biochemischen Funktion des genannten Enzyms, 3 mögliche Membranen bzw. Kompartimente genauer betrachtet werden, in welchen sich PfCA befinden könnte.

Die bisher wahrscheinlichste Position des untersuchten Moleküls stellt die parasitäre Oberflächenmembran dar. Auch wenn bisher noch in *P. falciparum* kein GPI-gebundenes

Enzym beschrieben werden konnte, gibt es doch zahlreiche andere GPI-verankerte Oberflächenproteine, die für den Schutz sowie die Entwicklung des Parasiten von essenzieller Bedeutung sind (Robinson 1991b; Shams-Eldin et al. 2009; Eckert et al. 1996; Ferguson et al. 1994).

Das Vorhandensein einer GPI-gebundenen Carboanhydrase an der Oberfläche des Parasiten könnte dazu beitragen, eine für das Plasmodium wirtliche und nährstoffreiche Umgebung zu schaffen.

Weiterhin könnte die Membran der parasitophoren Vakuole ein solches Protein enthalten. Eine der Aufgaben dieses Kompartiments ist neben dem Schutz des Parasiten auch die Versorgung der Plasmodien mit wichtigen Nährstoffen für Wachstum und Entwicklung (Matz et al. 2020; Spielmann et al. 2012). Die PfCA wiederum stellt durch die Interkonversion von CO_2 zu HCO_3^- eine wichtige Komponente für die Pyrimidinsynthese der Apicoplasten bereit (Supuran 2008; Krungkrai et al. 2005).

Wäre die in dieser Untersuchung beschriebene Carboanhydrase innerhalb der PVM lokalisiert und dort unmittelbar neben einer Nahrungspore bzw. eines nährstoffaufnehmenden Transporters zu finden (Lingelbach und Joiner 1998; Matz et al. 2020), könnte sie die Zufuhr lebenswichtiger Moleküle in die parasitophore Vakuole vereinfachen bzw. die Aufnahmewahrscheinlichkeit der gewünschten Stoffe erhöhen.

Bisher konnten für die PVM von *P. falciparum* mithilfe von Biotinylation, Massenspektrometrie und dem BioID-Verfahren insgesamt 34 mögliche Proteine identifiziert werden (Nyalwidhe und Lingelbach 2006; Khosh-Naucke et al. 2018). Hierbei handelt es sich insbesondere um Proteasen und Chaperone (Nyalwidhe und Lingelbach 2006). Insgesamt ist jedoch noch sehr wenig über das Proteom der PVM bekannt, auch konnten bisher keine GPI-Verankerungen innerhalb dieses Kompartiments nachgewiesen werden (Schnider et al. 2018), sodass eine Lokalisation der PfCA hier als unwahrscheinlich anzusehen ist.

Eine weitere mögliche Lokalisation der Carboanhydrase stellt die Membran des Apicoplasten dar. Dieses rudimentäre Plastid, welches insbesondere für die Invasion in die Wirtszelle und das Überleben in selbiger verantwortlich ist, hat darüber hinaus noch unzählige weitere Funktionen (Yu et al. 2008; Ralph et al. 2004). Als Target-Sequenz, welche den Einbau eines Proteins in die Membran dieses Organells initiiert, dient eine zweiteilige N-terminale Signalsequenz, bestehend aus einem Signalpeptid und einem Transitpeptid, die in verschiedenen Kompartimenten des Apicoplasten modifiziert und

letztendlich posttranslational abgespalten wird (Soll und Schleiff 2004; Sheiner und Striepen 2013; Lang et al. 1998). Die interaktive Datenbank PlasmoAP nutzt einen speziell entwickelten Algorithmus zur Identifizierung dieser Signalpeptide (Foth et al. 2003). Eine Analyse des Genoms des hier betrachteten Moleküls PF3D7_1140000 zeigt keine derartigen Sequenzen, sodass nach aktuellem Kenntnisstand eine Lokalisation in dieser Membran als unwahrscheinlich anzusehen ist.

Die Lokalisation innerhalb des Parasiten der hier beschriebenen Carboanhydrase konnte nicht näher bestimmt werden, da die hierfür notwendigen Untersuchungen den zeitlichen Rahmen dieser Dissertation bei Weitem überschritten hätten.

Gegebenenfalls könnten eine Immunfluoreszenzmikroskopie oder auch radioaktive Labeling-Versuche sowie bioinformatische Ansätze zur genaueren Analyse und Verortung der PfCA beitragen (Nyalwidhe und Lingelbach 2006; Khosh-Naucke et al. 2018; Sack et al. 2009).

5.3 Ausblick

Im Zuge der vorliegenden Untersuchung konnte mithilfe bioinformatischer Verfahren die Existenz zahlreicher, GPI-verankerter Protein-Kandidaten in 8 verschiedenen Plasmodienspezies nachgewiesen werden.

Für eines der näher untersuchten Moleküle, das Enzym PF3D7_1140000 von *P. falciparum*, wurde darüber hinaus exemplarisch und damit gleichsam stellvertretend für die anderen aufgefundenen Proteine die vermutete GPI-Verankerung unter Zuhilfenahme eines Hefeexpressionsmodells *in vitro* bewiesen.

In einem nächsten Schritt gilt es nun, die GPI-Bindung der PfCA auch in den Parasiten nachzuweisen, die in der Hefe gezeigt wurde. Hierzu könnte einerseits, wie auch bei *S. cerevisiae*, ein Knock-out-Modell des zu untersuchenden Plasmodienenzym entwickelt werden, um zu überprüfen ob es sich um ein für *P. falciparum* essenzielles Protein handelt. Anschließend könnte eine Proteinmarkierung z. B. mittels FLAG-Tag in Kombination mit einer Triton-X-114-Phasentrennung erfolgen, um eine GPI-Verankerung der Carboanhydrase PF3D7_1140000 in *P. falciparum in vivo* definitiv nachzuweisen.

Nach einer radioaktiven Markierung der Komponenten des GPI-Ankers könnte es möglich sein, den Acylierungsstatus des Inositolrings des GPI-Anteils von PfCA zu

überprüfen. In GPIs von *P. falciparum* ist der Inositolanteil acyliert und verleiht PIPLC Resistenz.

Auch ein experimentelles Überprüfen weiterer *in silico* detektierter, potenzielle GPI-verankerter Proteine von *P. falciparum*, aber auch anderer Plasmodienspezies, mithilfe des beschriebenen Hefekonstrukts oder aber auch direkt in den entsprechenden Parasiten wäre wünschenswert. Ein weiterer positiver experimenteller Nachweis für das Vorliegen einer GPI-Verankerung in diesen Proteinen würde die Sensitivität und Spezifität der verwendeten Software belegen.

Letztlich sollte auch die Möglichkeit erwogen werden, die im Zuge dieser Dissertationsarbeit entwickelte und hier verwendete Software auf Proteine anderer Parasiten wie beispielsweise *Toxoplasma gondii* oder *Babesia microti* anzuwenden. Gegebenenfalls müssten die verwendeten Suchparameter gemäß den bereits bekannten C-terminalen Spaltungsregionen der GPI-Proteine dieser Protozoen angepasst werden. Auch hier sollte sich eine experimentelle molekularbiologische und biochemische Überprüfung anschließen.

Sollte sich dieser Ansatz auch für andere Parasiten produktiv erweisen, könnte innerhalb kurzer Zeit eine Reihe möglicher, bisher unbekannter GPI-gebundener Proteine erkannt werden, die eventuell als Grundlagen für die Entwicklung neuer antiparasitärer Therapien herangezogen werden könnten.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb.1 Lebenszyklus der Plasmodien, übersetzt aus dem Englischen

Abb. 2 Struktureller Aufbau eines GPI-verankerten Proteins*

Abb. 3 Ablauf der Transamidase-Reaktion

Abb. 4 Plasmidkarte von pRS426Met

Abb. 5a Schematische Darstellung der PCR-vermittelten Modifikation einer Plasmid-DNA

Abb. 5b Verdau mit DpnI: Durch den Verdau mit DpnI kann die methylierte MatrizenDNA entfernt werden. Zurück bleiben die Intronfreien DNA-Stränge.

Abb. 6 PredGPI-Benutzeroberfläche

Abb. 7 Tmpred-Benutzeroberfläche

Abb. 8 Benutzeroberfläche des „One-Click“-Modus der Plattform NGPhylogeny.fr

Abb. 9 Definition der Suchparameter *

Abb. 10 Graphischer Vergleich der verschiedenen Parameter

Abb. 11 Vereinfachter Stammbaum der betrachteten Plasmodien Spezies *

Abb 12a Thermo Scientific™ GeneRuler™

Abb. 12b PCR vom 18.05.2017*

Abb 13 Integration des Gens Pf3D7_1140000 in den TOPO-TA-Vektor *

Abb.14 Agarose-Gelelektrophorese der Mini-Präp vom 13.06.2017*

Abb. 15 Agarose-Gelelektrophorese des EcoRI-Verdau vom 20.07.2017*

Abb. 16 Schematische Darstellung des Chromosomal Promotor Replacements*

Abb. 17 Agarose-Gelelektrophorese des „Chromosomal promotor replacements“**

Abb. 18 Klonkarte mit der Strategie für die Ligation von PfCA in den Hefevektor pRS426 MET 25*

Abb. 19a Agarose-Gelelektrophorese des aufgereinigten Plasmids pRS426*

Abb. 19b Agarose-Gelelektrophorese + Gel-Extraktion des InsertCA*

- Abb. 19c Agarose-Gelelektrophorese des Plasmids pRS426 (P) und des Gel-extrahierten InsertCA (CA)*
- Abb. 20 a+b Agarose-Gelelektrophorese, Ligation 1 des aufgereinigten Plasmids pRS426 und der Gel-extrahierten InsertCA *
- Abb. 20 c+d Agarose-Gelelektrophorese, Ligation 2 des aufgereinigten Plasmids pRS426 und der Gel-extrahierten InsertCA*
- Abb. 21a Verdau der Klone aus Ligation 1 mit HindIII*
- Abb. 21b Verdau der Klone aus der 2. Ligation mit HindIII*
- Abb. 22 Komplementation der YPH499–HIS–GAL–CA Hefemutante durch homologe oder heterologe Gene
- Abb. 23 Lokalisation des Flag-Tag-Proteinmarkers*
- Abb. 24 Schematische Darstellung der Immunmarkierung*
- Abb. 25a SDS-PAGE Bandenprofil des PageRuler Plus 26619
- Abb. 25b Western Blot vom 02.05.2018*
- Abb. 26 Western Blot mit AntiFlag, Ergebnisse der Triton X-114 Phasenseparation*
- Abb. 27 Western Blot mit AntiGAS1, Ergebnisse der Triton X-114 Phasenseparation*
- Abb. 28 Western Blot vom 02.08.2019, Ergebnisse der Triton X-114 Phasenseparation ohne Zugabe von ZnCl₂*
- Abb. 29 Vereinfachter Stammbaum ausgewählter Plasmodienspezies*
- Abb. 30 Übersicht der durch Gilson beschriebenen GPI-verankerten Proteine
- *Abbildungen erstellt von Lena Sauer (2016-2023)

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Übersicht über Gene der GPI-Biosynthese.

Tab. 2 Übersicht über Gene der GPI-Transamidase-Reaktion

Tab. 3 Analyse der bekannten GPI-Proteine von *P. falciparum*

Tab. 4 Analyse der bekannten GPI-Proteine von *S. cerevisiae*

Tab. 5 Analyse bekannter humaner GPI-Proteine

Tab. 6 Variation der Suchparameter

Tab. 7 Erste proteomweite Analyse

Tab 8.1 und 8.2 Analyse der Verschiedenen Suchparameter im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität

Tab. 9 Analyse und Vergleich potenzieller GPI-Proteine und ihrer Orthologe innerhalb verschiedener Plasmodienspezies

Tab. 10 Auflistung verschiedener Suchparameter-Kombinationen

Tab. 11 Potenzielle GPI-Proteine bei *P. vivax*

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb. Abbildung

AB Antibiotika

ACT Artemisinin basierte Kombinationstherapie

ART Artemisinin

AS Aminosäure

AP Alkalische Phosphatase

bp Basenpaare

cDNA komplementierte DNA

cm Zentimeter

CO₂ Kohlenstoffdioxid

COOH Carboxy-Terminus

Da Dalton

DNA Desoxyribonukleinsäure

dNTP Desoxynukleosidtriphosphat

E. coli Escherichia coli

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

EKG Elektrokardiogramm

FFP gefrorenes Frischplasma (Fresh Frozen Plasma)

g Gramm

G-force (g) Gravitationskraft

GPI Glykosylphosphatidylinositol

GPI-AP Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Protein

HCl Hydrogenchlorid (Salzsäure)

His Histidin

HRP Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase)

Ig Immunglobuline

kDA KiloDalton

kg Kilogramm

m Meter

M Mol

min Minute

ml Milliliter

mRNA messenger RNA

NaCl Natriumchlorid (Kochsalz)

NaOH Natriumhydroxid (Natronlauge)

Ng Nanogramm

NH₂ Aminoterninale Domäne

nm Nanometer

NO Stickstoffmonoxid

OD Optical density Optische Dichte

P. Plasmodium

p.i. post infectionem

p.m. post mortem

PBS Phosphat gepufferte Salzsäure

PCR Polymerasekettenreaktion

P. berghei/ PBANKA Plasmodium berghei

P. chabaudi / PCHAS Plasmodium chabaudi

P. cynomogli/ PCYB Plasmodium cynomogli

P. falciparum/ PF3D7 Plasmodium falciparum

P. knowlesie/ PKNH Plasmodium knowlesie

P. ovale/ Plasmodium ovale

P. reichenowi/ PRCDC Plasmodium reichenowi

P. vivax/ PVX Plasmodium vivax

P. yoelii yoelii/ PYYM Plasmodium yoelii yoelii

PfCA Plasmodium falciparum Carboanhydrase

PV Parasitophore Vakuole

PVM Membran der Parasitophoren Vakuole

RNA Ribonukleinsäure

rpm Rotation pro Minute

RT Raumtemperatur

s Sekunde

S. cerevisiae/S.c. Saccharomyces cerevisiae

ScCA *Saccharomyces cerevisiae* Carboanhydrase

SD Selektives Dextran

SGR Selektive Galaktose-Raffinose

TETRIS und EDTA

TMD Transmembrandomäne

TRIS Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Ura Uracil

WHO Weltgesundheitsorganisation

YNB Yeast Nitrogen Base

µl Mikroliter

9. Anhang

9.1 Graphische Übersicht über die durch Gilson beschriebenen GPI-Proteine

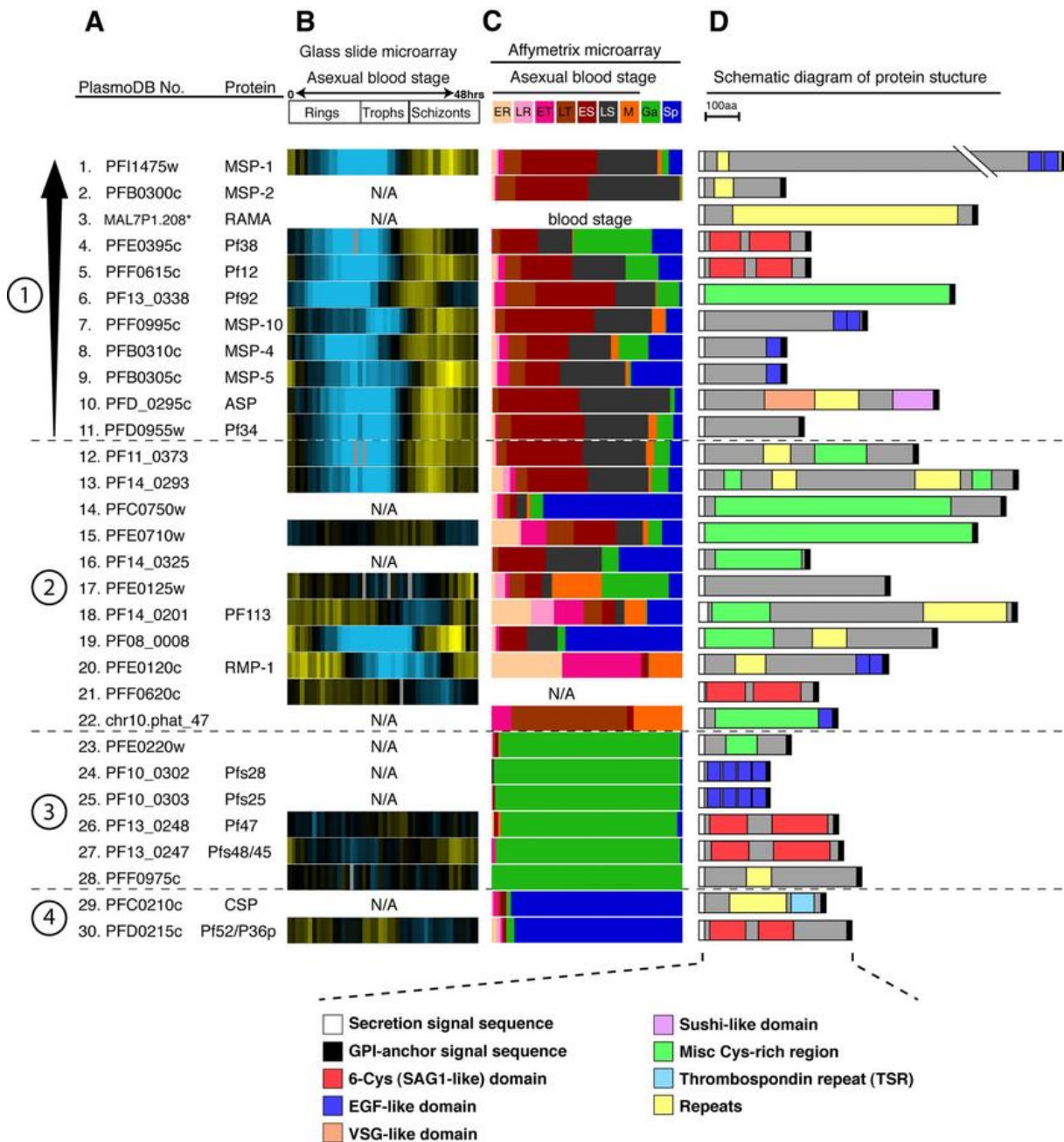


Abb. 30 Übersicht der durch Gilson beschriebenen GPI-verankerten Proteine (Gilson et al. 2006)

9.2 Auflistung der Orthologen zu Tabelle 7

hypothetical protein: PVX_121875*, PVX_112635~, PVX_094247~

28 kDa ookinete surface protein, putative: PCYB_062530 *, PCYB_062510~, PCYB_007100 *

serine repeat antigen 3, putative: PF3D7_0207400~, PF3D7_0207600~, PF3D7_0207700~, PF3D7_0207800~, PF3D7_0208000~, PF3D7_0902800~, PVX_003795~, PVX_003800~, PVX_003805~, PVX_003810~, PVX_003820~, PVX_003825~

PVX_003825~, PVX_003830~, PVX_003835~, PVX_003840~, PVX_003845~,
PVX_003850~, PKNH_0413100~, PKNH_0413200~, PKNH_0413400~,
PKNH_0413600~, PKNH_0413700~, PCYB_042290~, PCYB_042190~,
PCYB_042270~, PCYB_042280~, PCYB_042220~, PCYB_042210~,
PCYB_042200~, PRCDC_0206400~, PRCDC_0206500~, PRCDC_0206600~,
PRCDC_0206700~, PRCDC_0206800~, PRCDC_0206900~, PRCDC_0900900~,
PYYM_0305700~, PYYM_0306000~, PYYM_0305900~, PYYM_0305800~,
PBANKA_0304800~, PBANKA_0304900~, PBANKA_0305000~, PCHAS_0307100*,
PCHAS_0307000~, PCHAS_0307200~, PCHAS_0307300~

Plasmodium exported protein, unknown function: PYYM_0016500~,
PYYM_0525400~, PCHAS_0501100!, PCHAS_0525100~, PCHAS_0525451!,
PCHAS_0700100!, PCHAS_0732200!, PCHAS_1246700!, PCHAS_1300001!

Plasmodium exported protein (hyp6), unknown function: PF3D7_0425100?,
PF3D7_1478200?, PF3D7_1477100*, PF3D7_0901800~, PF3D7_0220900~,
PF3D7_1253200~, PRCDC_0053900!, PRCDC_1477200?, PRCDC_1476100~,
PRCDC_1252800?, PRCDC_1038400?, PRCDC_0532400~

Plasmodium exported protein (hyp10), unknown function10: PF3D7_0114500*,
PF3D7_0201400*, PRCDC_0112700#

apical membrane antigen 110: PF3D7_0114500*, PF3D7_0201400*#,
PRCDC_0112700*, PRCDC_0006100, PRCDC_0056300, PRCDC_0058000,
PRCDC_0200500, PRCDC_1000200, PRCDC_1038300

Plasmodium exported protein (hyp15), unknown function: PF3D7_0221200*,
PF3D7_1478300~, PF3D7_0221000~, PF3D7_0425200~, PRCDC_0219900,
PRCDC_1477300, PRCDC_1252900, PRCDC_1038500, PRCDC_0054000

fam-a-protein: PYYM_0008900*, PYYM_0003300*, PCHAS_1145900~,
PCHAS_1401100~, PCHAS_1370800~, PCHAS_1370700~, PCHAS_1303000~,
PCHAS_1302400~, PCHAS_1301900~, PCHAS_1247900~, PCHAS_1247800~

fam-a-protein: PYYM_0115400~, PYYM_0403200~, PYYM_0525700~,
PYYM_0700400~, PYYM_0802300~, PYYM_0840800~, PYYM_1201000~,
PYYM_1202400~, PYYM_1300400~, PBANKA_0500700*, PBANKA_0112701~,
PBANKA_0200650~, PBANKA_0317121~, PBANKA_0400800~,
PBANKA_0700521~, PBANKA_1000051?, PBANKA_1100750~,
PBANKA_1246141~

SICAvar, type I: PKNH_1320000*, PCYB_001410~, PCYB_001660~,
PCYB_005410~

9.3 Potenzielle GPI-Proteine von *P. vivax*

	P.vivax		
apical sushi protein	PVX_000945		
6-cysteine protein	PVX_115165	dist_End 8	Carlton et al. 2008
merozoite surface protein 1	PVX_099980		in list 13_4_500_1100_1200
merozoite surface protein 4	PVX_003775		kein GPI-AP
rhostry-associated membrane antigen	PVX_087885		
surface protein P113	PVX_085445		
merozoite surface protein 5	PVX_003770		
merozoite surface protein 8	PVX_097625		
GPI-anchored micronemal antigen	PVX_088910		
6-cysteine protein	PVX_083235		
merozoite surface protein 10	PVX_114145		
apical merozoite protein	PVX_090075		
6-cysteine protein	PVX_001020		
6-cysteine protein	PVX_113780	No Nter	
6-cysteine protein	PVX_113775		
circumsporozoite (CS) protein	PVX_119355		
28 kDa ookinete surface protein	PVX_111180		
6-cysteine protein	PVX_083240		
6-cysteine protein	PVX_097960		
conserved Plasmodium protein, unknown function	PVX_114125		
25 kDa ookinete surface antigen precursor	PVX_111175		
6-cysteine protein	PVX_095375		
conserved Plasmodium protein, unknown function	PVX_084970	start32	
conserved Plasmodium protein, unknown function	PVX_092425	start 436	
conserved Plasmodium protein, unknown function	PVX_080530	start 530	
conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	PVX_084815		
protein kish, putative	PVX_086962		
conserved Plasmodium protein, unknown function	PVX_094310		
Yos1-like protein, putative	PVX_117812		
6-cysteine-protein	PVX_001015		
conserved Plasmodium protein, unknown function	PVX_086272		
GPI-anchor transamidase, putative	PVX_092055		
aspartyl protease, putative	PVX_100670		
Plasmodium exported Protein, unknown function	PVX_101605		
merozoite surface protein 1 paralog, putative	PVX_099975		
hypothetical protein, conserved	PVX_90030	dist_End 6	

Tab. 11 Potenzielle GPI-Proteine bei *P. vivax*: Die durch Calton et. al. (Jane M. Carlton et al. 2008) definierten Proteine wurden hellrot hinterlegt. Konnten sie mit den Suchparametern 13_4_500_1100_1200 bestätigt werden, wurden sie grünmarkiert. Hierdurch konnten 24 der 30 durch Carlton et. al. 2008 beschriebenen Proteine als GPI-verankert bestätigt werden. Bei den drei Proteinen PVX_084970, PVX_092425, PVX_080530 lag die Startsequenz zu weit im Inneren des Proteins. Bei PVX_9003 und PVX_115165 lagen die terminalen Sequenzen zu weit im Innern des Moleküls. Bei PVX_113780 konnte keine N-terminale Signalsequenz nachgewiesen werden. Mit Hilfe der im Zuge dieser Dissertationsarbeit entwickelten Suchparameter konnten zusätzlich sechs bisher unbekannte GPI-verankerte Proteine beschrieben werden.

10. Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertationsarbeit fanden Eingang in

„FT-GPI, a highly sensitive and accurate predictor of GPI-anchored proteins, reveals the composition and evolution of the GPI proteome in Plasmodium species“

Publiziert Januar 2023 im Malaria Journal (Sauer et al. 2023)

11. Verzeichnis akademischer Lehrender

Meine akademischen Lehrer im Studiengang Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg waren folgende Damen und Herren:

Adamkiewicz, Aigner, Bartsch, Baumann, Becker, Bette, Brehm, Bien, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, del Rey, Eickmann, Donner-Banzhoff, Fendrich, Feuser, Fritz, Görg, Greulich, Grundmann, Grzeschik, Gress, Grimm, Hasilik, Hegele, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Kalder, Kann, Kircher, Klose, Koolmann, Koczulla, Leonhardt, Lill, Loeffler, Lohoff, Maisch, Maisner, Mandrek, Meyer, Moll, Moosdorf, Mutters, Neumüller, Nimphius, Olbert, Oliver, Oertel, Pagenstecher, Plant, Preisig-Müller, Ramaswamy, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Röper, Ruchholtz, Sekundo, Schäfer, Schwarz, Steinfeldt, Steiniger, Stiewe, Suske, Tackenberg, Timmesfeld, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Waldmann, Weihe, Werner, Westermann, Wiegand, Wrocklage, Wulff, Zwiorek

12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne die das Erstellen dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt zunächst Professor Ralph T. Schwarz, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit. Nur dank seiner stetigen Unterstützung, seiner freundlichen Hilfe und Motivation sowie durch seine große Expertise konnte diese Dissertation gelingen. Die zahlreichen Gespräche auf intellektueller und persönlicher Ebene werde ich immer als bereichernden und konstruktiven Austausch in Erinnerung behalten.

Darüber hinaus gilt mein Dank Emmanuel Cornillot, für seine Unterstützung in den Bereichen der Bioinformatik. Durch sein kritisches Hinterfragen, gelang es Experimente zu optimieren und die Sachverhalte klar und stringet darzustellen. Vielen Dank auch für die Unterstützung bei der Anfertigung der wissenschaftlichen Publikation.

Mein außerordentlicher Dank gilt Hosam Shams-Eldin für seinen Optimismus, sein Fachwissen und seine stete Unterstützung. Sein moralischer Beistand, seine kritischen Betrachtungen und zweckdienlichen Diskussionen haben mir Kraft und Mut zur Anfertigung und Vollendung meiner Dissertation gegeben.

Ferner danken möchte ich Howard Riezman für die Bereitstellung von GAS1, sowie Jörg Schmidt für seine technische Unterstützung.

Danken möchte ich auch meiner lieben Studienfreundin Franziska Wahl, die mich getreu dem Motto „geteiltes Leid ist halbes Leid“ in den vielen Stunden der Arbeit an dieser Doktorarbeit unterstützt hat.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Walter und Sabine Sauer, für ihre unglaubliche Unterstützung und ihr Verständnis bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit. Ihnen, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben, ist diese Arbeit gewidmet.

13. Literaturverzeichnis

- Abeijon, C.; Hirschberg, C. B. (1992): Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. In: *Trends in biochemical sciences* 17 (1), S. 32–36.
- Adda, Christopher G.; Murphy, Vince J.; Sunde, Margaret; Waddington, Lynne J.; Jesse, Schloegel; Talbo, Gert H. et al. (2009): Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein 2 is Unstructured and Forms Amyloid-Like Fibrils. In: *Molecular and biochemical parasitology* 166 (2), S. 159–171. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2009.03.012.
- Adjuik, M.; Babiker, A.; Garner, P.; Olliaro, P.; Taylor, W.; White, N. (2004): Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. In: *Lancet (London, England)* 363 (9402), S. 9–17. DOI: 10.1016/s0140-6736(03)15162-8.
- Aguilera, Jaime; van Dijken, Johannes P.; Winde, Johannes H. de; Pronk, Jack T. (2005): Carbonic anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* at atmospheric carbon dioxide pressure. In: *The Biochemical journal* 391 (Pt 2), S. 311–316. DOI: 10.1042/BJ20050556.
- Aguzzi, Adriano (2005): Cell biology. Prion toxicity: all sail and no anchor. In: *Science (New York, N.Y.)* 308 (5727), S. 1420–1421. DOI: 10.1126/science.1114168.
- Aguzzi, Adriano; Polymenidou, Magdalini (2004): Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. In: *Cell* 116 (2), S. 313–327.
- Almeida, Antonio M.; Murakami, Yoshiko; Layton, D. Mark; Hillmen, Peter; Sellick, Gabrielle S.; Maeda, Yusuke et al. (2006): Hypomorphic promoter mutation in PIGM causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. In: *Nature medicine* 12 (7), S. 846–851. DOI: 10.1038/nm1410.
- Anderson, R. G. (1994): Functional specialization of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor. In: *Seminars in immunology* 6 (2), S. 89–95. DOI: 10.1006/smim.1994.1013.
- Anderson, R. G.; Kamen, B. A.; Rothberg, K. G.; Lacey, S. W. (1992): Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. In: *Science (New York, N.Y.)* 255 (5043), S. 410–411.
- Anderson, S. M.; Yu, G.; Giattina, M.; Miller, J. L. (1996): Intercellular transfer of a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked protein: release and uptake of CD4-GPI from recombinant adeno-associated virus-transduced HeLa cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (12), S. 5894–5898.
- Ashida, Hisashi; Hong, Yeongjin; Murakami, Yoshiko; Shishioh, Nobue; Sugimoto, Nakaba; Kim, Youn Uck et al. (2005): Mammalian PIG-X and yeast Pbn1p are the essential components of glycosylphosphatidylinositol-mannosyltransferase I. In: *Molecular Biology of the Cell* 16 (3), S. 1439–1448. DOI: 10.1091/mbc.e04-09-0802.
- Aurrecoechea, Cristina; Barreto, Ana; Basenko, Evelina Y.; Brestelli, John; Brunk, Brian P.; Cade, Shon et al. (2017): EuPathDB: the eukaryotic pathogen genomics database resource. In: *Nucleic acids research* 45 (D1), D581–D591. DOI: 10.1093/nar/gkw1105.
- Aurrecoechea, Cristina; Brestelli, John; Brunk, Brian P.; Dommer, Jennifer; Fischer, Steve; Gajria, Bindu et al. (2009): PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. In: *Nucleic acids research* 37 (Database issue), D539–43. DOI: 10.1093/nar/gkn814.
- AWMF S1-Leitlinie (2021): S1-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Malaria. Hg. v. AWMF. Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit e.V. Online verfügbar

unter https://register.awmf.org/assets/guidelines/042-0011_S1_Diagnostik-Therapie-Malaria_2021-08.pdf.

Bagnat, M.; Keranen, S.; Shevchenko, A.; Simons, K. (2000): Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. In: *Science (New York, N.Y.)* 97 (7), S. 3254–3259. DOI: 10.1073/pnas.97.7.3254.

Baird, J. Kevin (2018): Tafenoquine for travelers' malaria: evidence, rationale and recommendations. In: *Journal of travel medicine* 25 (1). DOI: 10.1093/jtm/tay110.

Bangs, J. D.; Doering, T. L.; Englund, P. T.; Hart, G. W. (1988): Biosynthesis of a variant surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*. Processing of the glycolipid membrane anchor and N-linked oligosaccharides. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (33), S. 17697–17705.

Baragaña, Beatriz; Hallyburton, Irene; Lee, Marcus C. S.; Norcross, Neil R.; Grimaldi, Raffaella; Otto, Thomas D. et al. (2015): A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis. In: *Nature* 522 (7556), S. 315–320. DOI: 10.1038/nature14451.

Baron, Gerald S.; Wehrly, Kathy; Dorward, David W.; Chesebro, Bruce; Caughey, Byron (2002): Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. In: *The EMBO Journal* 21 (5), S. 1031–1040. DOI: 10.1093/emboj/21.5.1031.

Baumeister, Stefan; Winterberg, Markus; Duranton, Christophe; Huber, Stephan M.; Lang, Florian; Kirk, Kiaran; Lingelbach, Klaus (2006): Evidence for the involvement of *Plasmodium falciparum* proteins in the formation of new permeability pathways in the erythrocyte membrane. In: *Molecular microbiology* 60 (2), S. 493–504. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05112.x.

Bendtsen, Jannick Dyrlov; Nielsen, Henrik; Heijne, Gunnar von; Brunak, Soren (2004): Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. In: *Journal of molecular biology* 340 (4), S. 783–795. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.05.028.

Benet, A.; Tavul, L.; Reeder, J. C.; Cortés, A. (2004): Diversity of *Plasmodium falciparum* vaccine candidate merozoite surface protein 4 (MSP4) in a natural population. In: *Molecular and biochemical parasitology* 134 (2). DOI: 10.1016/j.molbiopara.2003.12.005.

Bentley, G. A. (2006): Functional and immunological insights from the three-dimensional structures of *Plasmodium* surface proteins. In: *Current opinion in microbiology* 9 (4). DOI: 10.1016/j.mib.2006.06.002.

Birkenmeyer, Larry; Muerhoff, A. Scott; Dawson, George J.; Desai, Suresh M. (2010): Isolation and Characterization of the MSP1 Genes from *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 82 (6), S. 996–1003. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.09-0022.

Black, C. G.; Wang, L.; Hibbs, A. R.; Werner, E.; Coppel, R. L. (1999): Identification of the *Plasmodium chabaudi* homologue of merozoite surface proteins 4 and 5 of *Plasmodium falciparum*. In: *Infection and immunity* 67 (5). DOI: 10.1128/IAI.67.5.2075-2081.1999.

Black, C. G.; Wang, L.; Wu, T.; Coppel, R. L. (2003): Apical location of a novel EGF-like domain-containing protein of *Plasmodium falciparum*. In: *Molecular and biochemical parasitology* 127 (1). DOI: 10.1016/s0166-6851(02)00308-0.

Black, C. G.; Wu, T.; Wang, L.; Topolska, A. E.; Coppel, R. L. (2005): MSP8 is a non-essential merozoite surface protein in *Plasmodium falciparum*. In: *Molecular and biochemical parasitology* 144 (1). DOI: 10.1016/j.molbiopara.2005.06.010.

Boothroyd, John C.; Paynter, Cora A.; Cross, George A.M.; Bernard, Andre; Borst, Piet (1981): Variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* are synthesised with cleavable

- hydrophobic sequences at the carboxy and amino termini. In: *Nucleic acids research* 9 (18), S. 4735–4743. DOI: 10.1093/nar/9.18.4735.
- Bordier, C. (1981): Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. In: *J. Biol. Chem.* 256 (4), S. 1604–1607. Online verfügbar unter <http://www.jbc.org/content/256/4/1604.full.pdf>.
- Bosson, Régine; Jaquenoud, Malika; Conzelmann, Andreas (2006): GUP1 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an O-acyltransferase involved in remodeling of the GPI anchor. In: *Molecular Biology of the Cell* 17 (6), S. 2636–2645. DOI: 10.1091/mbc.e06-02-0104.
- BRAY, R. S. (1958): Studies on malaria in chimpanzees. VI. *Laverania falciparum*. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 7 (1), S. 20–24. DOI: 10.4269/ajtmh.1958.7.20.
- Brodsky, Robert A. (2006): New Insights into Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. In: *Hematology* 2006 (1), S. 24–28. DOI: 10.1182/asheducation-2006.1.24.
- Brodsky, Robert A.; Sensenbrenner, Lyle L.; Smith, B. Douglas; Dorr, Donna; Seaman, Phillip J.; Lee, Shing M. et al. (2001): Durable Treatment-Free Remission after High-Dose Cyclophosphamide Therapy for Previously Untreated Severe Aplastic Anemia. In: *Ann Intern Med* 135 (7), S. 477–483. DOI: 10.7326/0003-4819-135-7-200110020-00006.
- Brown, D.; Crise, B.; Rose, J. (1989): Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells. In: *Science* 245 (4925), S. 1499–1501. DOI: 10.1126/science.2571189.
- Brown, D. A.; London, E. (1998): Structure and Origin of Ordered Lipid Domains in Biological Membranes. In: *The Journal of Membrane Biology* 164 (2), S. 103–114. DOI: 10.1007/s002329900397.
- Brown, Deborah A.; Rose, John K. (1992): Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. In: *Cell* 68 (3), S. 533–544. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90189-J.
- Bülow, R.; Nonnengässer, C.; Overath, P. (1989): Release of the variant surface glycoprotein during differentiation of bloodstream to procyclic forms of *Trypanosoma brucei*. In: *Molecular and biochemical parasitology* 32 (1), S. 85–92.
- Burnette, W. Neal (1981): “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. In: *Analytical Biochemistry* 112 (2), S. 195–203. DOI: 10.1016/0003-2697(81)90281-5.
- Burns, William R. (2008): East meets West: how China almost cured malaria. In: *Endeavour* 32 (3), S. 101–106. DOI: 10.1016/j.endeavour.2008.07.001.
- Butler, Declan (2019): Promising malaria vaccine to be tested in first large field trial. In: *Nature*. DOI: 10.1038/d41586-019-01232-4.
- Campana, Vincenza; Sarnataro, Daniela; Zurzolo, Chiara (2005): The highways and byways of prion protein trafficking. In: *Trends in cell biology* 15 (2), S. 102–111. DOI: 10.1016/j.tcb.2004.12.002.
- Carothers, D. J.; Hazra, S. V.; Andreson, S. W.; Medof, M. E. (1990): Synthesis of aberrant decay-accelerating factor proteins by affected paroxysmal nocturnal hemoglobinuria leukocytes. In: *Journal of Clinical Investigation* 85 (1), S. 47–54.
- Cashman, Neil R.; Loertscher, Rolf; Nalbantoglu, Josephine; Shaw, Ivan; Kascsak, Richard J.; Bolton, David C.; Bendheim, Paul E. (1990): Cellular isoform of the scrapie agent protein

- participates in lymphocyte activation. In: *Cell* 61 (1), S. 185–192. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90225-4.
- CDC (2019): Malaria and Travelers for U.S. Residents. Hg. v. U.S. Department of Health & Human Services. Online verfügbar unter <https://www.cdc.gov/malaria/travelers/index.html>.
- Chandramohan, Daniel; Dicko, Alassane; Zongo, Issaka; Sagara, Issaka; Cairns, Matthew; Kuepfer, Irene et al. (2020): Seasonal malaria vaccination: protocol of a phase 3 trial of seasonal vaccination with the RTS,S/AS01E vaccine, seasonal malaria chemoprevention and the combination of vaccination and chemoprevention. In: *BMJ open* 10 (9), e035433. DOI: 10.1136/bmjopen-2019-035433.
- Chandramohan, Daniel; Zongo, Issaka; Sagara, Issaka; Cairns, Matthew; Yerbanga, Rakiswendé-Serge; Diarra, Modibo et al. (2021): Seasonal Malaria Vaccination with or without Seasonal Malaria Chemoprevention. In: *New England Journal of Medicine* 385 (11), S. 1005–1017. DOI: 10.1056/NEJMoa2026330.
- Chen, Rui; Walter, Elizabeth I.; Parker, Gregory; Lapurga, John P.; Millan, Jose L.; Ikehara, Yukio et al. (1998): Mammalian glycosylphosphatidylinositol anchor transfer to proteins and posttransfer deacylation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (16), S. 9512–9517.
- Chesebro, Bruce; Trifilo, Matthew; Race, Richard; Meade-White, Kimberly; Teng, Chao; LaCasse, Rachel et al. (2005): Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. In: *Science (New York, N.Y.)* 308 (5727), S. 1435–1439. DOI: 10.1126/science.1110837.
- Chevenet, François; Brun, Christine; Bañuls, Anne-Laure; Jacq, Bernard; Christen, Richard (2006): TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. In: *BMC Bioinformatics* 7, S. 439. DOI: 10.1186/1471-2105-7-439.
- Chiyonobu, Tomohiro; Inoue, Norimitsu; Morimoto, Masafumi; Kinoshita, Taroh; Murakami, Yoshiko (2014): Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor deficiency caused by mutations in PIGW is associated with West syndrome and hyperphosphatasia with mental retardation syndrome. In: *Journal of medical genetics* 51 (3), S. 203–207. DOI: 10.1136/jmedgenet-2013-102156.
- Christianson, Thomas W.; Sikorski, Robert S.; Dante, Michael; Shero, James H.; Hieter, Philip (1992): Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. In: *Gene* 110 (1), S. 119–122. DOI: 10.1016/0378-1119(92)90454-W.
- Cimen, M. Y. Burak (2008): Free radical metabolism in human erythrocytes. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 390 (1-2), S. 1–11. DOI: 10.1016/j.cca.2007.12.025.
- Clark, Daniel; Rowlett, Roger S.; Coleman, John R.; Klessig, Daniel F. (2004): Complementation of the yeast deletion mutant DeltaNCE103 by members of the beta class of carbonic anhydrases is dependent on carbonic anhydrase activity rather than on antioxidant activity. In: *The Biochemical journal* 379 (Pt 3), S. 609–615. DOI: 10.1042/BJ20031711.
- Collinge, J.; Whittington, M. A.; Sidle, K. C.; Smith, C. J.; Palmer, M. S.; Clarke, A. R.; Jefferys, J. G. (1994): Prion protein is necessary for normal synaptic function. In: *Nature* 370 (6487), S. 295–297. DOI: 10.1038/370295a0.
- Conzelmann, A.; Puoti, A.; Lester, R. L.; Desponds, C. (1992): Two different types of lipid moieties are present in glycosylphosphoinositol-anchored membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The EMBO Journal* 11 (2), S. 457–466.

- Cordero, Esteban M.; Nakayasu, Ernesto S.; Gentil, Luciana G.; Yoshida, Nobuko; Almeida, Igor C.; da Silveira, José Franco (2009): Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. In: *Journal of proteome research* 8 (7), S. 3642–3652. DOI: 10.1021/pr800887u.
- Costello, L. C.; Orlean, P. (1992): Inositol acylation of a potential glycosyl phosphoinositol anchor precursor from yeast requires acyl coenzyme A. In: *J. Biol. Chem.* 267 (12), S. 8599–8603. Online verfügbar unter <http://www.jbc.org/content/267/12/8599.full.pdf>.
- Cowman, A. F.; Crabb, B. S. (2006): Invasion of red blood cells by malaria parasites. In: *Cell* 124 (4). DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.006.
- Cowman, Alan F.; Healer, Julie; Marapana, Danushka; Marsh, Kevin (2016): Malaria: Biology and Disease. In: *Cell* 167 (3), S. 610–624. DOI: 10.1016/j.cell.2016.07.055.
- Crawford, Emily D.; Quan, Jenai; Horst, Jeremy A.; Ebert, Daniel; Wu, Wesley; DeRisi, Joseph L. (2017): Plasmid-free CRISPR/Cas9 genome editing in *Plasmodium falciparum* confirms mutations conferring resistance to the dihydroisoquinolone clinical candidate SJ733. In: *PLoS one* 12 (5), e0178163. DOI: 10.1371/journal.pone.0178163.
- Cronk, J. D.; Endrizzi, J. A.; Cronk, M. R.; O'Neill, J. W.; Zhang, K. Y. (2001): Crystal structure of *E. coli* beta-carbonic anhydrase, an enzyme with an unusual pH-dependent activity. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 10 (5), S. 911–922. DOI: 10.1110/ps.46301.
- Cross, G. A. (1984): Release and purification of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. In: *Journal of cellular biochemistry* 24 (1), S. 79–90. DOI: 10.1002/jcb.240240107.
- Cross, G. A. (1990): Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. In: *Annual review of cell biology* 6, S. 1–39. DOI: 10.1146/annurev.cb.06.110190.000245.
- Das, Sujaan; Hertrich, Nadine; Perrin, Abigail J.; Withers-Martinez, Chrislaine; Collins, Christine R.; Jones, Matthew L. et al. (2015): Processing of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein MSP1 Activates a Spectrin-Binding Function Enabling Parasite Egress from RBCs. In: *Cell host & microbe* 18 (4), S. 433–444. DOI: 10.1016/j.chom.2015.09.007.
- Dattoo, Mehreen S.; Natama, Magloire H.; Somé, Athanase; Traoré, Ousmane; Rouamba, Toussaint; Bellamy, Duncan et al. (2021): Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. In: *Lancet (London, England)* 397 (10287), S. 1809–1818. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00943-0.
- Debierre-Grockiego, F.; Campos, M. A.; Azzouz, N.; Schmidt, J.; Bieker, U.; Resende, M. G. et al. (2007): Activation of TLR2 and TLR4 by Glycosylphosphatidylinositols Derived from *Toxoplasma gondii*. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (2), S. 1129–1137. DOI: 10.4049/jimmunol.179.2.1129.
- Dede, Semiha; Değer, Yeter; Değer, Serdar; Tanritanir, Pinar (2008): Plasma levels of zinc, copper, copper/zinc ratio, and activity of carbonic anhydrase in equine piroplasmiasis. In: *Biological trace element research* 125 (1), S. 41–45. DOI: 10.1007/s12011-008-8136-5.
- DeGasperi, R.; Thomas, L. J.; Sugiyama, E.; Chang, H. M.; Beck, P. J.; Orlean, P. et al. (1990): Correction of a defect in mammalian GPI anchor biosynthesis by a transfected yeast gene. In: *Science (New York, N.Y.)* 250 (4983), S. 988–991.
- Del Prete, Sonia; Vullo, Daniela; Fisher, Gillian M.; Andrews, Katherine T.; Poulsen, Sally-Ann; Capasso, Clemente; Supuran, Claudiu T. (2014): Discovery of a new family of carbonic anhydrases in the malaria pathogen *Plasmodium falciparum*--the η -carbonic anhydrases. In:

Bioorganic & medicinal chemistry letters 24 (18), S. 4389–4396. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.08.015.

Dereeper, A.; Guignon, V.; Blanc, G.; Audic, S.; Buffet, S.; Chevenet, F. et al. (2008): Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. In: *Nucleic acids research* 36 (Web Server issue), W465-9. DOI: 10.1093/nar/gkn180.

Dereeper, Alexis; Audic, Stephane; Claverie, Jean-Michel; Blanc, Guillaume (2010): BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. In: *BMC evolutionary biology* 10, S. 8. DOI: 10.1186/1471-2148-10-8.

Doering, T. L.; Masterson, W. J.; Englund, P. T.; Hart, G. W. (1989): Biosynthesis of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. Origin of the non-acetylated glucosamine. In: *J. Biol. Chem.* 264 (19), S. 11168–11173. Online verfügbar unter <http://www.jbc.org/content/264/19/11168.full.pdf>.

Doering, T. L.; Schekman, R. (1996): GPI anchor attachment is required for Gas1p transport from the endoplasmic reticulum in COP II vesicles. In: *The EMBO Journal* 15 (1), S. 182–191.

Doerrler, William T.; Ye, Jianhua; Falck, J. R.; Lehrman, Mark A. (1996): Acylation of Glucosaminyl Phosphatidylinositol Revisited PALMITOYL-CoA DEPENDENT PALMITOYLATION OF THE INOSITOL RESIDUE OF A SYNTHETIC DIOCTANOYL GLUCOSAMINYL PHOSPHATIDYLINOSITOL BY HAMSTER MEMBRANES PERMITS EFFICIENT MANNOSYLATION OF THE GLUCOSAMINE RESIDUE. In: *J. Biol. Chem.* 271 (43), S. 27031–27038. DOI: 10.1074/jbc.271.43.27031.

Douglas, Nicholas M.; Anstey, Nicholas M.; Angus, Brian J.; Nosten, Francois; Price, Ric N. (2010): Artemisinin combination therapy for vivax malaria. In: *The Lancet. Infectious diseases* 10 (6), S. 405–416. DOI: 10.1016/S1473-3099(10)70079-7.

Drew; O'Donnell, R. A.; Smith, B. J.; Crabb, B. S. (2004): 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. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (19). DOI: 10.1074/jbc.M401114200.

Drew, Damien R.; Sanders, Paul R.; Crabb, Brendan S. (2005): Plasmodium falciparum merozoite surface protein 8 is a ring-stage membrane protein that localizes to the parasitophorous vacuole of infected erythrocytes. In: *Infection and immunity* 73 (7), S. 3912–3922. DOI: 10.1128/IAI.73.7.3912-3922.2005.

DTG (2018): Empfehlungen zur Malariavorbeugung. Hg. v. Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit e.V. Online verfügbar unter https://www.dtg.org/images/Startseite-Download-Box/2018_Broschuere_DTG_Malaria.pdf.

Duru, Valentine; Witkowski, Benoit; Ménard, Didier (2016): Plasmodium falciparum Resistance to Artemisinin Derivatives and Piperaquine: A Major Challenge for Malaria Elimination in Cambodia. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 95 (6), S. 1228–1238. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0234.

Dwivedi, Ankit; Khim, Nimol; Reynes, Christelle; Ravel, Patrice; Ma, Laurence; Tichit, Magali et al. (2016): Plasmodium falciparum parasite population structure and gene flow associated to anti-malarial drugs resistance in Cambodia. In: *Malaria journal* 15, S. 319. DOI: 10.1186/s12936-016-1370-y.

Eckert, Volker; Gerold, Peter; Schwarz, Ralph Thomas (1996): GPI-Anchors: Structure and Functions. In: Hans-Joachim Gabius und Sigrun Gabius (Hg.): *Glycosciences*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, S. 223–243.

- Edgar, Robert C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. In: *Nucleic acids research* 32 (5), S. 1792–1797. DOI: 10.1093/nar/gkh340.
- Eisenhaber, Birgit; Eisenhaber, Stephan; Kwang, Toh Yew; Grüber, Gerhard; Eisenhaber, Frank (2014): Transamidase subunit GAA1/GPAA1 is a M28 family metallo-peptide-synthetase that catalyzes the peptide bond formation between the substrate protein's omega-site and the GPI lipid anchor's phosphoethanolamine. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 13 (12), S. 1912–1917. DOI: 10.4161/cc.28761.
- Elleuche, S.; Pöggeler, S. (2010): Carbonic anhydrases in fungi. In: *Microbiology* 156 (1), S. 23–29. DOI: 10.1099/mic.0.032581-0.
- Englund, P. T. (1993): The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. In: *Annual review of biochemistry* 62, S. 121–138. DOI: 10.1146/annurev.bi.62.070193.001005.
- EYLES, D. E.; HOO, C. C.; WARREN, M.; SANDOSHAM, A. A. (1963): PLASMODIUM FALCIPARUM RESISTANT TO CHLOROQUINE IN CAMBODIA. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 12, S. 840–843. DOI: 10.4269/ajtmh.1963.12.840.
- Fairhurst, Rick M. (2015): Understanding artemisinin-resistant malaria: what a difference a year makes. In: *Current opinion in infectious diseases* 28 (5), S. 417–425. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000199.
- Fairhurst, Rick M.; Dondorp, Arjen M. (2016): Artemisinin-Resistant Plasmodium falciparum Malaria. In: *Microbiology Spectrum* 4 (3). DOI: 10.1128/microbiolspec.EI10-0013-2016.
- Fankhauser, C.; Homans, S. W.; Thomas-Oates, J. E.; McConville, M. J.; Desponds, C.; Conzelmann, A.; Ferguson, M. A. (1993): Structures of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (35), S. 26365–26374.
- Fast, N. M.; Kissinger, J. C.; Roos, D. S.; Keeling, P. J. (2001): Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. In: *Molecular biology and evolution* 18 (3), S. 418–426. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003818.
- Ferguson, M. A.; Brimacombe, J. S.; Cottaz, S.; Field, R. A.; Guther, L. S.; Homans, S. W. et al. (1994): Glycosyl-phosphatidylinositol molecules of the parasite and the host. In: *Parasitology* 108 Suppl, S45-54.
- Ferguson, M. A.; Homans, S. W.; Dwek, R. A.; Rademacher, T. W. (1988): Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. In: *Science* 239 (4841), S. 753–759. DOI: 10.1126/science.3340856.
- Ferguson, M. A.; Murray, P.; Rutherford, H.; McConville, M. J. (1993): A simple purification of procyclic acidic repetitive protein and demonstration of a sialylated glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. In: *Biochemical Journal* 291 (Pt 1), S. 51–55.
- Fleming, Leah; Lemmon, Monica; Beck, Natalie; Johnson, Maria; Mu, Weiyi; Murdock, David et al. (2016): Genotype-phenotype correlation of congenital anomalies in multiple congenital anomalies hypotonia seizures syndrome (MCAHS1)/PIGN-related epilepsy. In: *American journal of medical genetics. Part A* 170A (1), S. 77–86. DOI: 10.1002/ajmg.a.37369.
- Fleming, R. E.; Crouch, E. C.; Ruzicka, C. A.; Sly, W. S. (1993): Pulmonary carbonic anhydrase IV: developmental regulation and cell-specific expression in the capillary endothelium. In: *The American journal of physiology* 265 (6 Pt 1), L627-35. DOI: 10.1152/ajplung.1993.265.6.L627.

- Foth, Bernardo J.; Ralph, Stuart A.; Tonkin, Christopher J.; Struck, Nicole S.; Fraunholz, Martin; Roos, David S. et al. (2003): Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In: *Science (New York, N.Y.)* 299 (5607), S. 705–708. DOI: 10.1126/science.1078599.
- Fraering, Patrick; Imhof, Isabella; Meyer, Urs; Strub, Jean-Marc; van Dorsselaer, Alain; Vionnet, Christine; Conzelmann, Andreas (2001): The GPI Transamidase Complex of *Saccharomyces cerevisiae* Contains Gaa1p, Gpi8p, and Gpi16p. In: *Molecular Biology of the Cell* 12 (10), S. 3295–3306.
- Freeze, Hudson H.; Chong, Jessica X.; Bamshad, Michael J.; Ng, Bobby G. (2014): Solving glycosylation disorders: fundamental approaches reveal complicated pathways. In: *American journal of human genetics* 94 (2), S. 161–175. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.10.024.
- Fu, Rong; Meng, Yinping; Wang, Yihao; Liu, Hui; Liu, Yi; Li, Lijuan et al. (2016): The dysfunction of platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: *Thrombosis research* 148, S. 50–55. DOI: 10.1016/j.thromres.2016.07.012.
- Fujikawa-Adachi, K.; Nishimori, I.; Taguchi, T.; Onishi, S. (1999): Human carbonic anhydrase XIV (CA14): cDNA cloning, mRNA expression, and mapping to chromosome 1. In: *Genomics* 61 (1), S. 74–81. DOI: 10.1006/geno.1999.5938.
- Fujita, Morihisa; Jigami, Yoshifumi (2008): Lipid remodeling of GPI-anchored proteins and its function. In: *Biochimica et biophysica acta* 1780 (3), S. 410–420. DOI: 10.1016/j.bbagen.2007.08.009.
- Fujita, Morihisa; Umemura, Mariko; Yoko-o, Takehiko; Jigami, Yoshifumi (2006a): PER1 is required for GPI-phospholipase A2 activity and involved in lipid remodeling of GPI-anchored proteins. In: *Molecular Biology of the Cell* 17 (12), S. 5253–5264. DOI: 10.1091/mbc.e06-08-0715.
- Fujita, Morihisa; Yoko-o, Takehiko; Jigami, Yoshifumi (2006b): Inositol Deacylation by Bst1p Is Required for the Quality Control of Glycosylphosphatidylinositol-anchored Proteins. In: *Molecular Biology of the Cell* 17 (2), S. 834–850. DOI: 10.1091/mbc.E05-05-0443.
- Furukawa, Yoko; Tsukamoto, Kikuo; Ikezawa, Hiroh (1997): Mutational analysis of the C-terminal signal peptide of bovine liver 5'-nucleotidase for GPI anchoring: a study on the significance of the hydrophilic spacer region. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1328 (2), S. 185–196. DOI: 10.1016/S0005-2736(97)00084-9.
- Gabius, Hans-Joachim (Hg.) (2009): *The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences*: Wiley-Blackwell.
- Gambetti, Pierluigi; Kong, Qingzhong; Zou, Wenquan; Parchi, Piero; Chen, Shu G. (2003): Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. In: *British medical bulletin* 66, S. 213–239. DOI: 10.1093/bmb/66.1.213.
- Gamo, Francisco-Javier; Sanz, Laura M.; Vidal, Jaume; Cozar, Cristina de; Alvarez, Emilio; Lavandera, Jose-Luis et al. (2010): Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. In: *Nature* 465 (7296), S. 305–310. DOI: 10.1038/nature09107.
- Gardner, Malcolm J.; Hall, Neil; Fung, Eula; White, Owen; Berriman, Matthew; Hyman, Richard W. et al. (2002): Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In: *Nature* 419 (6906), S. 498. DOI: 10.1038/nature01097.
- Gaulton, G. N.; Pratt, J. C. (1994): Glycosylated phosphatidylinositol molecules as second messengers. In: *Seminars in immunology* 6 (2), S. 97–104. DOI: 10.1006/smim.1994.1014.

- Gaulton, Glen N.; Kelly, Kathleen L.; Pawlowski, John; Mato, Jose M.; Jarett, Leonard (1988): Regulation and function of an insulin-sensitive glycosyl-phosphatidylinositol during T lymphocyte activation. In: *Cell* 53 (6), S. 963–970. DOI: 10.1016/S0092-8674(88)90509-0.
- Gerber, L. D.; Kodukula, K.; Udenfriend, S. (1992): Phosphatidylinositol glycan (PI-G) anchored membrane proteins. Amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and PI-G attachment in the COOH-terminal signal peptide. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (17), S. 12168–12173.
- Gerold, Peter; Eckert, Volker; Schwarz, Ralph T.; 哲寛, 山田 (1996): GPI-Anchors: An Overview. In: *TIGG* 8 (42), S. 265–277. DOI: 10.4052/tigg.8.265.
- Ghugtyal, Vikram; Vionnet, Christine; Roubaty, Carole; Conzelmann, Andreas (2007): CWH43 is required for the introduction of ceramides into GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular microbiology* 65 (6), S. 1493–1502. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05883.x.
- Gilson, Paul R.; Nebl, Thomas; Vukcevic, Damjan; Moritz, Robert L.; Sargeant, Tobias; Speed, Terence P. et al. (2006): Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5 (7), S. 1286–1299. DOI: 10.1074/mcp.M600035-MCP200.
- Götz, Reinfried; Gnann, Andreas; Zimmermann, Friedrich K. (1999): Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect. In: *Yeast* 15 (10A), S. 855–864. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0061(199907)15:10A<855::AID-YEA425>3.0.CO;2-C.
- Gowda, D. Channe (2007): TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. In: *Trends in parasitology* 23 (12), S. 596–604. DOI: 10.1016/j.pt.2007.09.003.
- Grimme, S. J.; Westfall, B. A.; Wiedman, J. M.; Taron, C. H.; Orlean, P. (2001): The essential Smp3 protein is required for addition of the side-branching fourth mannose during assembly of yeast glycosylphosphatidylinositols. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (29), S. 27731–27739. DOI: 10.1074/jbc.M101986200.
- Guindon, Stéphane; Dufayard, Jean-François; Lefort, Vincent; Anisimova, Maria; Hordijk, Wim; Gascuel, Olivier (2010): New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. In: *Syst Biol* 59 (3), S. 307–321. DOI: 10.1093/sysbio/syq010.
- Hansen, Lars; Tawamie, Hasan; Murakami, Yoshiko; Mang, Yuan; ur Rehman, Shoab; Buchert, Rebecca et al. (2013): Hypomorphic mutations in PGAP2, encoding a GPI-anchor-remodeling protein, cause autosomal-recessive intellectual disability. In: *American journal of human genetics* 92 (4), S. 575–583. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.03.008.
- Hansson, Mattias D.; Rzeznicka, Kamila; Rosenbäck, Matilda; Hansson, Mats; Sirijovski, Nick (2008): PCR-mediated deletion of plasmid DNA. In: *Analytical Biochemistry* 375 (2), S. 373–375. DOI: 10.1016/j.ab.2007.12.005.
- Harinasuta, T.; Suntharasamai, P.; Viravan, C. (1965): Chloroquine-resistant falciparum malaria in Thailand. In: *Lancet (London, England)* 2 (7414), S. 657–660. DOI: 10.1016/s0140-6736(65)90395-8.
- Harper, James T.; Keeling, Patrick J. (2003): Nucleus-encoded, plastid-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) indicates a single origin for chromalveolate plastids. In: *Molecular biology and evolution* 20 (10), S. 1730–1735. DOI: 10.1093/molbev/msg195.
- Hay, Simon I.; Snow, Robert W. (2006): The malaria Atlas Project: developing global maps of malaria risk. In: *PLoS medicine* 3 (12), e473. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030473.

- Herold, Gerd (Hg.) (2022): Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung : 2022 : Unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Selbstverlag (Elsevier elibrary). Online verfügbar unter <https://institut.elsevierelibrary.de/pdfreader/herold-innere-medizin-2022>.
- Hill, Anita; Kelly, Richard J.; Hillmen, Peter (2013): Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: *Blood* 121 (25), 4985-96; quiz 5105. DOI: 10.1182/blood-2012-09-311381.
- Hilvo, Mika; Tolvanen, Martti; Clark, Amy; Shen, Bairong; Shah, Gul N.; Waheed, Abdul et al. (2005): Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. In: *Biochemical Journal* 392 (Pt 1), S. 83–92. DOI: 10.1042/BJ20051102.
- Hirose, S.; Ravi, L.; Hazra, S. V.; Medof, M. E. (1991): Assembly and deacetylation of N-acetylglucosaminyl-plasmanylinositol in normal and affected paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (9), S. 3762–3766.
- Hoessli, Daniel C.; Robinson, Peter J. (1998): GPI-anchors and cell membranes: a special relationship. In: *Trends in Cell Biology* 8 (2), S. 87–89. DOI: 10.1016/S0962-8924(98)80018-4.
- Hof, Herbert; Dörries, Rüdiger (2009): Mikrobiologie: Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Klinische Infektiologie, Hygiene. 4. Aufl. (Duale Reihe).
- Hofmann, K.; Stoffel, W. (1993): TMbase - A Database of Membrane Spanning Proteins Segments (374, 166). Online verfügbar unter <http://www.ch.embnet.org/documentation/mfc-35.pdf>.
- Holder, A. A. (1985): Glycosylation of the Variant Surface Antigens of *Trypanosoma brucei*. In: Leslie Hudson (Hg.): *The Biology of Trypanosomes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Current Topics in Microbiology and Immunology, 117), S. 57–74. Online verfügbar unter https://doi.org/10.1007/978-3-642-70538-0_3.
- Homans, S. W.; Edge, C. J.; Ferguson, M. A.; Dwek, R. A.; Rademacher, T. W. (1989): Solution structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor glycan of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. In: *Biochemistry* 28 (7), S. 2881–2887.
- Homans, Steve W.; Ferguson, Michael A. J.; Raymond A. Dwek; Rademacher, Thomas W.; Anand, Rita; Williams, Alan F. (1988): Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. In: *Nature* 333 (6170), S. 269. DOI: 10.1038/333269a0.
- Hong, Y.; Maeda, Y.; Watanabe, R.; Inoue, N.; Ohishi, K.; Kinoshita, T. (2000): Requirement of PIG-F and PIG-O for transferring phosphoethanolamine to the third mannose in glycosylphosphatidylinositol. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (27), S. 20911–20919. DOI: 10.1074/jbc.M001913200.
- Hong, Y.; Maeda, Y.; Watanabe, R.; Ohishi, K.; Mishkind, M.; Riezman, H.; Kinoshita, T. (1999): Pig-n, a mammalian homologue of yeast Mcd4p, is involved in transferring phosphoethanolamine to the first mannose of the glycosylphosphatidylinositol. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (49), S. 35099–35106. DOI: 10.1074/jbc.274.49.35099.
- Hong, Yeongjin; Ohishi, Kazuhito; Kang, Ji Young; Tanaka, Satoshi; Inoue, Norimitsu; Nishimura, Jun-ichi et al. (2003): Human PIG-U and yeast Cdc91p are the fifth subunit of GPI transamidase that attaches GPI-anchors to proteins. In: *Molecular Biology of the Cell* 14 (5), S. 1780–1789. DOI: 10.1091/mbc.e02-12-0794.
- Hopp, Thomas P.; Prickett, Kathryn S.; Price, Virginia L.; Libby, Randell T.; March, Carl J.; Pat Cerretti, Douglas et al. (1988): A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for

Recombinant Protein Identification and Purification. In: *Nat Biotechnol* 6 (10), S. 1204–1210. DOI: 10.1038/nbt1088-1204.

Horn, Denise; Krawitz, Peter; Mannhardt, Anca; Korenke, Georg Christoph; Meinecke, Peter (2011): Hyperphosphatasia-mental retardation syndrome due to PIGV mutations: expanded clinical spectrum. In: *American journal of medical genetics. Part A* 155A (8), S. 1917–1922. DOI: 10.1002/ajmg.a.34102.

Horn, Denise; Schottmann, Gudrun; Meinecke, Peter (2010): Hyperphosphatasia with mental retardation, brachytelephalangy, and a distinct facial gestalt: Delineation of a recognizable syndrome. In: *European Journal of Medical Genetics* 53 (2), S. 85–88. DOI: 10.1016/j.ejmg.2010.01.002.

Howard, Malcolm F.; Murakami, Yoshiko; Pagnamenta, Alistair T.; Daumer-Haas, Cornelia; Fischer, Björn; Hecht, Jochen et al. (2014): Mutations in PGAP3 impair GPI-anchor maturation, causing a subtype of hyperphosphatasia with mental retardation. In: *American journal of human genetics* 94 (2), S. 278–287. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.12.012.

Ikezawa, Hiroh (2002): Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored Proteins. In: *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25 (4), S. 409–417. DOI: 10.1248/bpb.25.409.

Ilkovski, Biljana; Pagnamenta, Alistair T.; O'Grady, Gina L.; Kinoshita, Taroh; Howard, Malcolm F.; Lek, Monkol et al. (2015): Mutations in PIGY: expanding the phenotype of inherited glycosylphosphatidylinositol deficiencies. In: *Human Molecular Genetics* 24 (21), S. 6146–6159. DOI: 10.1093/hmg/ddv331.

Imhof, I.; Canivenc-Gansel, E.; Meyer, U.; Conzelmann, A. (2000): Phosphatidylethanolamine is the donor of the phosphorylethanolamine linked to the 1,4-linked mannose of yeast GPI structures. In: *The Journal of biological chemistry* 10 (12), S. 1271–1275. DOI: 10.1093/glycob/10.12.1271.

Inoue, N.; Kinoshita, T.; Orii, T.; Takeda, J. (1993): Cloning of a human gene, PIG-F, a component of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, by a novel expression cloning strategy. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (10), S. 6882–6885.

Inoue, N.; Watanabe, R.; Takeda, J.; Kinoshita, T. (1996): PIG-C, one of the three human genes involved in the first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* GPI2. In: *Biochemical and biophysical research communications* 226 (1), S. 193–199. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1332.

Inoue, Norimitsu; Murakami, Yoshiko; Kinoshita, Taroh (2003): Molecular genetics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: *International journal of hematology* 77 (2), S. 107–112.

Isik, Semra; Kockar, Feray; Aydin, Meltem; Arslan, Oktay; Guler, Ozen Ozensoy; Innocenti, Alessio et al. (2009): Carbonic anhydrase activators: activation of the beta-carbonic anhydrase Nce103 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with amines and amino acids. In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 19 (6), S. 1662–1665. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.01.105.

Ito, H.; Fukuda, Y.; Murata, K.; Kimura, A. (1983): Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. In: *Journal of Bacteriology* 153 (1), S. 163–168. DOI: 10.1128/JB.153.1.163-168.1983.

Jaeken, Jaak (2011): Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's (nearly) all in it! In: *Journal of inherited metabolic disease* 34 (4), S. 853–858. DOI: 10.1007/s10545-011-9299-3.

Jane M. Carlton; John H. Adams; Joana C. Silva; Shelby L. Bidwell; Hernan Lorenzi; Elisabet Caler et al. (2008): Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. In: *Nature* 455 (7214), S. 757–763. DOI: 10.1038/nature07327.

- Jiménez-Díaz, María Belén; Ebert, Daniel; Salinas, Yandira; Pradhan, Anupam; Lehane, Adele M.; Myrand-Lapierre, Marie-Eve et al. (2014): (+)-SJ733, a clinical candidate for malaria that acts through ATP4 to induce rapid host-mediated clearance of Plasmodium. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (50), E5455-62. DOI: 10.1073/pnas.1414221111.
- Johnson, R. J. (2002): Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Nature's gene therapy? In: *Molecular Pathology* 55 (3), S. 145–152. DOI: 10.1136/mp.55.3.145.
- Johnston, M.; Davis, R. W. (1984): Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular and Cellular Biology* 4 (8), S. 1440–1448.
- Kadekoppala, M.; Holder, A. A. (2010): Merozoite surface proteins of the malaria parasite: the MSP1 complex and the MSP7 family. In: *International Journal for Parasitology* 40 (10). DOI: 10.1016/j.ijpara.2010.04.008.
- Kamitani, T.; Chang, H. M.; Rollins, C.; Wanek, G. L.; Yeh, E. T. (1993): Correction of the class H defect in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in Ltk- cells by a human cDNA clone. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (28), S. 20733–20736.
- Kang, Ji Young; Hong, Yeongjin; Ashida, Hisashi; Shishioh, Nobue; Murakami, Yoshiko; Morita, Yasu S. et al. (2005): PIG-V Involved in Transferring the Second Mannose in Glycosylphosphatidylinositol. In: *J. Biol. Chem.* 280 (10), S. 9489–9497. DOI: 10.1074/jbc.M413867200.
- Kazmin, Dmitri; Nakaya, Helder I.; Lee, Eva K.; Johnson, Matthew J.; van der Most, Robbert; van den Berg, Robert A. et al. (2017): Systems analysis of protective immune responses to RTS,S malaria vaccination in humans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (9), S. 2425–2430. DOI: 10.1073/pnas.1621489114.
- Kedzierski, L.; Black, C. G.; Coppel, R. L. (2000): Characterization of the merozoite surface protein 4/5 gene of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium yoelii*. In: *Molecular and biochemical parasitology* 105 (1). DOI: 10.1016/s0166-6851(99)00178-4.
- Khosh-Naucke, Melissa; Becker, Johanna; Mesén-Ramírez, Paolo; Kiani, Parnian; Birnbaum, Jakob; Fröhlke, Ulrike et al. (2018): Identification of novel parasitophorous vacuole proteins in *P. falciparum* parasites using BioID. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 308 (1), S. 13–24. DOI: 10.1016/j.ijmm.2017.07.007.
- Kilgour, Elaine (1993): A role for inositol-glycan mediators and G-proteins in insulin action. In: *Cellular Signalling* 5 (2), S. 97–105. DOI: 10.1016/0898-6568(93)90062-Q.
- Kinoshita, Taroh (2014a): Biosynthesis and deficiencies of glycosylphosphatidylinositol. In: *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 90 (4), S. 130–143. DOI: 10.2183/pjab.90.130.
- Kinoshita, Taroh (2014b): Enzymatic mechanism of GPI anchor attachment clarified. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 13 (12), S. 1838–1839. DOI: 10.4161/cc.29379.
- Kinoshita, Taroh; Fujita, Morihisa; Maeda, Yusuke (2008): Biosynthesis, remodelling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: recent progress. In: *Journal of biochemistry* 144 (3), S. 287–294. DOI: 10.1093/jb/mvn090.
- Kirkitadze, M. D.; Barlow, P. N. (2001): Structure and flexibility of the multiple domain proteins that regulate complement activation. In: *Immunological reviews* 180, S. 146–161. DOI: 10.1034/j.1600-065x.2001.1800113.x.
- Kleine, Tatjana; Maier, Uwe G.; Leister, Dario (2009): DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis. In: *Annual review of plant biology* 60, S. 115–138. DOI: 10.1146/annurev.arplant.043008.092119.

- Knaus, Alexej; Awaya, Tomonari; Helbig, Ingo; Afawi, Zaid; Pendziwiat, Manuela; Abu-Rachma, Jubran et al. (2016): Rare Noncoding Mutations Extend the Mutational Spectrum in the PGAP3 Subtype of Hyperphosphatasia with Mental Retardation Syndrome. In: *Human Mutation* 37 (8), S. 737–744. DOI: 10.1002/humu.23006.
- Knaus, Alexej; Pantel, Jean Tori; Pendziwiat, Manuela; Hajjir, Nurulhuda; Zhao, Max; Hsieh, Tzung-Chien et al. (2018): Characterization of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis defects by clinical features, flow cytometry, and automated image analysis. In: *Genome medicine* 10 (1), S. 3. DOI: 10.1186/s13073-017-0510-5.
- Kobayashi, T.; Nishizaki, R.; Ikezawa, H. (1997): The presence of GPI-linked protein(s) in an archaeobacterium, *Sulfolobus acidocaldarius*, closely related to eukaryotes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1334 (1), S. 1–4.
- Koch, Marion; Baum, Jake (2016): The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte - towards a reassessment of the host cell contribution. In: *Cellular microbiology* 18 (3), S. 319–329. DOI: 10.1111/cmi.12557.
- Kollár, R.; Reinhold, B. B.; Petráková, E.; Yeh, H. J.; Ashwell, G.; Drgonová, J. et al. (1997): Architecture of the yeast cell wall. Beta(1--6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1--3)-glucan, and chitin. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (28), S. 17762–17775.
- Koller, Robin; Mombo-Ngoma, Ghyslain; Grobusch, Martin P. (2018): The early preclinical and clinical development of ganaplacide (KAF156), a novel antimalarial compound. In: *Expert opinion on investigational drugs* 27 (10), S. 803–810. DOI: 10.1080/13543784.2018.1524871.
- Krawitz, Peter M.; Murakami, Yoshiko; Hecht, Jochen; Krüger, Ulrike; Holder, Susan E.; Mortier, Geert R. et al. (2012): Mutations in PIGO, a member of the GPI-anchor-synthesis pathway, cause hyperphosphatasia with mental retardation. In: *American journal of human genetics* 91 (1), S. 146–151. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.05.004.
- Krawitz, Peter M.; Murakami, Yoshiko; Rieß, Angelika; Hietala, Marja; Krüger, Ulrike; Zhu, Na et al. (2013): PGAP2 mutations, affecting the GPI-anchor-synthesis pathway, cause hyperphosphatasia with mental retardation syndrome. In: *American journal of human genetics* 92 (4), S. 584–589. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.03.011.
- Krawitz, Peter M.; Schweiger, Michal R.; Rödelsperger, Christian; Marcelis, Carlo; Kölsch, Uwe; Meisel, Christian et al. (2010): Identity-by-descent filtering of exome sequence data identifies PIGV mutations in hyperphosphatasia mental retardation syndrome. In: *Nature genetics* 42 (10), S. 827–829. DOI: 10.1038/ng.653.
- Krungkrai, Jerapan; Scozzafava, Andrea; Reungprapavut, Sutarnthip; Krungkrai, Sudaratana R.; Rattanajak, Roonglawan; Kamchonwongpaisan, Sumalee; Supuran, Claudiu T. (2005): Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase with aromatic sulfonamides: towards antimalarials with a novel mechanism of action? In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 13 (2), S. 483–489. DOI: 10.1016/j.bmc.2004.10.015.
- Krungkrai, Sudaratana R.; Krungkrai, Jerapan (2011): Malaria parasite carbonic anhydrase: inhibition of aromatic/heterocyclic sulfonamides and its therapeutic potential. In: *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1 (3), S. 233–242. DOI: 10.1016/S2221-1691(11)60034-8.
- Krungkrai, Sudaratana R.; Suraveratum, Nongluk; Rochanakij, Sunant; Krungkrai, Jerapan (2001): Characterisation of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. In: *International Journal for Parasitology* 31 (7), S. 661–668. DOI: 10.1016/S0020-7519(01)00172-2.
- Kuhen, Kelli L.; Chatterjee, Arnab K.; Rottmann, Matthias; Gagaring, Kerstin; Borboa, Rachel; Buenviaje, Jennifer et al. (2014): KAF156 is an antimalarial clinical candidate with potential for use in prophylaxis, treatment, and prevention of disease transmission. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58 (9), S. 5060–5067. DOI: 10.1128/AAC.02727-13.

- Kumar, Yadunanda; Valdivia, Raphael H. (2009): Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. In: *Cell host & microbe* 5 (6), S. 593–601. DOI: 10.1016/j.chom.2009.05.014.
- Lang, M.; Apt, K. E.; Kroth, P. G. (1998): Protein transport into "complex" diatom plastids utilizes two different targeting signals. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (47), S. 30973–30978. DOI: 10.1074/jbc.273.47.30973.
- Laurens, Matthew B. (2020): RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. In: *Human vaccines & immunotherapeutics* 16 (3), S. 480–489. DOI: 10.1080/21645515.2019.1669415.
- Leclerc, M. C.; Hugot, J. P.; Durand, P.; Renaud, F. (2004): Evolutionary relationships between 15 Plasmodium species from new and old world primates (including humans): an 18S rDNA cladistic analysis. In: *Parasitology* 129 (Pt 6), S. 677–684. DOI: 10.1017/s0031182004006146.
- Leelawong, Mindy; Adams, Nicholas M.; Gabella, William E.; Wright, David W.; Haselton, Frederick R. (2019): Detection of Single-Nucleotide Polymorphism Markers of Antimalarial Drug Resistance Directly from Whole Blood. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2019.02.004.
- Leidich, S. D.; Drapp, D. A.; Orlean, P. (1994): A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis. In: *J. Biol. Chem.* 269 (14), S. 10193–10196. Online verfügbar unter <http://www.jbc.org/content/269/14/10193.full.pdf>.
- Lemansky, P.; Fatemi, S. H.; Gorican, B.; Meyale, S.; Rossero, R.; Tartakoff, A. M. (1990): Dynamics and longevity of the glycolipid-anchored membrane protein, Thy-1. In: *The Journal of Cell Biology* 110 (5), S. 1525–1531.
- Liljas, A.; Laurberg, M. (2000): A wheel invented three times. The molecular structures of the three carbonic anhydrases. In: *EMBO reports* 1 (1), S. 16–17. DOI: 10.1093/embo-reports/kvd016.
- Lim, Liting; McFadden, Geoffrey Ian (2010): The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365 (1541), S. 749–763. DOI: 10.1098/rstb.2009.0273.
- Lin, C. S.; Uboldi, A. D.; Marapana, D.; Czabotar, P. E.; Epp, C.; Bujard, H. et al. (2014): The merozoite surface protein 1 complex is a platform for binding to human erythrocytes by Plasmodium falciparum. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (37). DOI: 10.1074/jbc.M114.586495.
- Lin, Jessica T.; Juliano, Jonathan J.; Wongsrichanalai, Chansuda (2010): Drug-Resistant Malaria: The Era of ACT. In: *Current infectious disease reports* 12 (3), S. 165–173. DOI: 10.1007/s11908-010-0099-y.
- Lingelbach, K.; Joiner, K. A. (1998): The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. In: *Journal of cell science* 111 (Pt 11), S. 1467–1475.
- Liu, Tong; Li, Ruliang; Pan, Tao; Liu, Dacai; Petersen, Robert B.; Wong, Boon-Seng et al. (2002): Intercellular transfer of the cellular prion protein. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (49), S. 47671–47678. DOI: 10.1074/jbc.M207458200.
- Llanos-Cuentas, Alejandro; Lacerda, Marcus V.; Rueangweeraayut, Ronnatrai; Krudsood, Srivicha; Gupta, Sandeep K.; Kochar, Sanjay K. et al. (2014): Tafenoquine plus chloroquine for the treatment and relapse prevention of Plasmodium vivax malaria (DETECTIVE): a multicentre, double-blind, randomised, phase 2b dose-selection study. In: *The Lancet* 383 (9922), S. 1049–1058. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62568-4.

- Low, M. G.; Finean, J. B. (1977): Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. In: *Biochemical Journal* 167 (1), S. 281–284.
- Lu, C. F.; Kurjan, J.; Lipke, P. N. (1994): A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin. In: *Molecular and Cellular Biology* 14 (7), S. 4825–4833.
- Lu, C. F.; Montijn, R. C.; Brown, J. L.; Klis, F.; Kurjan, J.; Bussey, H.; Lipke, P. N. (1995): Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. In: *The Journal of Cell Biology* 128 (3), S. 333–340.
- Mabry, C. C.; Bautista, A.; Kirk, R. F.; Dubilier, L. D.; Braunstein, H.; Koepke, J. A. (1970): Familial hyperphosphatase with mental retardation, seizures, and neurologic deficits. In: *The Journal of Pediatrics* 77 (1), S. 74–85.
- Macedo, Cristiana Santos de; Shams-Eldin, Hosam; Smith, Terry K.; Schwarz, Ralph T.; Azzouz, Nahid (2003): Inhibitors of glycosyl-phosphatidylinositol anchor biosynthesis. In: *Biochimie* 85 (3-4), S. 465–472.
- MacRaild, C. A.; Pedersen, M. Ø.; Anders, R. F.; Norton, R. S. (2012): Lipid interactions of the malaria antigen merozoite surface protein 2. In: *Biochimica et biophysica acta* 1818 (11). DOI: 10.1016/j.bbame.2012.06.015.
- Madigan, Michael T.; Martinko, John M.; Stahl, David A.; Clark, David P. (2013): Brock Mikrobiologie. 13. Aufl.: Pearson.
- Maeda, Yusuke; Tashima, Yuko; Houjou, Toshiaki; Fujita, Morihisa; Yoko-o, Takehiko; Jigami, Yoshifumi et al. (2007): Fatty acid remodeling of GPI-anchored proteins is required for their raft association. In: *Molecular Biology of the Cell* 18 (4), S. 1497–1506. DOI: 10.1091/mbc.e06-10-0885.
- Maeda, Yusuke; Watanabe, Reika; Harris, Claire L.; Hong, Yeongjin; Ohishi, Kazuhito; Kinoshita, Keiko; Kinoshita, Taroh (2001): PIG-M transfers the first mannose to glycosylphosphatidylinositol on the luminal side of the ER. In: *The EMBO Journal* 20 (1-2), S. 250–261. DOI: 10.1093/emboj/20.1.250.
- malERA. An updated research agenda for insecticide and drug resistance in malaria elimination and eradication (2017). In: *PLoS medicine* 14 (11), e1002450.
- Marcelis, Carlo L.; Rieu, Paul; Beemer, Frits; Brunner, Han G. (2007): Severe mental retardation, epilepsy, anal anomalies, and distal phalangeal hypoplasia in siblings. In: *Clinical dysmorphism* 16 (2), S. 73–76. DOI: 10.1097/MCD.0b013e3280147130.
- Marshall, V. M.; Silva, A.; Foley, M.; Cranmer, S.; Wang, L.; McColl, D. J. et al. (1997a): A second merozoite surface protein (MSP-4) of *Plasmodium falciparum* that contains an epidermal growth factor-like domain. In: *Infection and immunity* 65 (11), S. 4460–4467.
- Marshall, V. M.; Silva, A.; Foley, M.; Cranmer, S.; Wang, L.; McColl, D. J. et al. (1997b): A second merozoite surface protein (MSP-4) of *Plasmodium falciparum* that contains an epidermal growth factor-like domain. In: *Infection and immunity* 65 (11), S. 4460–4467.
- Marshall, V. M.; Tieqiao, W.; Coppel, R. L. (1998): Close linkage of three merozoite surface protein genes on chromosome 2 of *Plasmodium falciparum*. In: *Molecular and biochemical parasitology* 94 (1). DOI: 10.1016/s0166-6851(98)00045-0.
- Martinelli, Axel; Culleton, Richard (2018): Non-human primate malaria parasites: out of the forest and into the laboratory. In: *Parasitology* 145 (1), S. 41–54. DOI: 10.1017/S0031182016001335.
- Masterson, Wayne J.; Raper, Jayne; Doering, Tamara L.; Hart, Gerald W.; Englund, Paul T. (1990): Fatty acid remodeling: A novel reaction sequence in the biosynthesis of trypanosome

- glycosyl phosphatidylinositol membrane anchors. In: *Cell* 62 (1), S. 73–80. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90241-6.
- Mato, J. M.; Kelly, K. L.; Abler, A.; Jarett, L. (1987): Identification of a novel insulin-sensitive glycopospholipid from H35 hepatoma cells. In: *The Journal of biological chemistry* 262 (5), S. 2131–2137.
- Matz, Joachim M.; Beck, Josh R.; Blackman, Michael J. (2020): The parasitophorous vacuole of the blood-stage malaria parasite. In: *Nature reviews. Microbiology*. DOI: 10.1038/s41579-019-0321-3.
- Mayor, Satyajit; Riezman, Howard (2004): Sorting GPI-anchored proteins. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (2), S. 110–120. DOI: 10.1038/nrm1309.
- Mazhari-Tabrizi, Ramin; Blank, Michaela; Mumberg, Dominik; Funk, Martin; Schwarz, Ralph; Eckert, Volker (2004): Chromosomal promoter replacement in *Saccharomyces cerevisiae*: Construction of conditional lethal strains for the cloning of glycosyltransferases from various organisms. In: *Glycoconjugate Journal* 16 (11), S. 673–679. DOI: 10.1023/A:1007132907235.
- McConville, M. J.; Ferguson, M. A. (1993): The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. In: *The Biochemical journal* 294 (Pt 2), S. 305–324.
- McNally, Kristin L.; Ward, Anne E.; Priola, Suzette A. (2009): Cells Expressing Anchorless Prion Protein Are Resistant to Scrapie Infection ∇ . In: *Journal of Virology* 83 (9), S. 4469–4475. DOI: 10.1128/JVI.02412-08.
- McNamara, Case W.; Lee, Marcus Cs; Lim, Chek Shik; Lim, Siau Hoi; Roland, Jason; Simon, Oliver et al. (2013): Targeting Plasmodium PI(4)K to eliminate malaria. In: *Nature* 504 (7479), S. 248–253. DOI: 10.1038/nature12782.
- Medialdea-Carrera, Raquel; Melillo, Tanya; Gauci, Charmaine; Rocco, Graziella; Borg, Maria Louise (2018): Letter to the editor: Is malaria re-emerging in southern Europe? Cryptic *Plasmodium falciparum* malaria in Malta, October 2018. In: *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 23 (50). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.50.1800650.
- Mehlert, A.; Varon, L.; Silman, I.; Homans, S. W.; Ferguson, M. A. (1993): Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of acetylcholinesterase from the electric organ of the electric-fish, *Torpedo californica*. In: *Biochemical Journal* 296 (Pt 2), S. 473–479.
- Meldrum, N. U.; Roughton, F. J. (1933): Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. In: *The Journal of physiology* 80 (2), S. 113–142. DOI: 10.1113/jphysiol.1933.sp003077.
- Menon, A. K.; Eppinger, M.; Mayor, S.; Schwarz, R. T. (1993): Phosphatidylethanolamine is the donor of the terminal phosphoethanolamine group in trypanosome glycosylphosphatidylinositols. In: *The EMBO Journal* 12 (5), S. 1907–1914.
- Menon, A. K.; Mayor, S.; Schwarz, R. T. (1990): Biosynthesis of glycosyl-phosphatidylinositol lipids in *Trypanosoma brucei*: involvement of mannosyl-phosphoryldolichol as the mannose donor. In: *The EMBO Journal* 9 (13), S. 4249–4258.
- Menon, A. K.; Stevens, V. L. (1992): Phosphatidylethanolamine is the donor of the ethanolamine residue linking a glycosylphosphatidylinositol anchor to protein. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (22), S. 15277–15280.
- Michael Waisberg; Gustavo C. Cerqueira; Stephanie B. Yager; Ivo M.B. Francischetti; Jinghua Lu; Nidhi Gera et al. (2012): Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 blocks the proinflammatory protein S100P. In: *PROC. NAT. ACAD. OF SCI. (U.S.A.)* 109 (14), S. 5429–5434. DOI: 10.1073/pnas.1202689109.

- Mikkelsen, R. B.; Kamber, M.; Wadwa, K. S.; Lin, P. S.; Schmidt-Ullrich, R. (1988): The role of lipids in *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes: a coordinated biochemical and microscopic analysis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (16), S. 5956–5960. DOI: 10.1073/pnas.85.16.5956.
- Milhavet, Ollivier; Lehmann, Sylvain (2002): Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. In: *Brain research. Brain research reviews* 38 (3), S. 328–339.
- Milne, K. G.; Ferguson, M. A.; Masterson, W. J. (1992): Inhibition of the GlcNAc transferase of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in African trypanosomes. In: *European journal of biochemistry* 208 (2), S. 309–314.
- Mita, Toshihiro; Tanabe, Kazuyuki; Kita, Kiyoshi (2009): Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. In: *Parasitology international* 58 (3), S. 201–209. DOI: 10.1016/j.parint.2009.04.004.
- Miyata, T.; Takeda, J.; Iida, Y.; Yamada, N.; Inoue, N.; Takahashi, M. et al. (1993): The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. In: *Science* 259 (5099), S. 1318–1320. DOI: 10.1126/science.7680492.
- Miyata, T.; Yamada, N.; Iida, Y.; Nishimura, J.; Takeda, J.; Kitani, T.; Kinoshita, T. (1994): Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: *The New England journal of medicine* 330 (4), S. 249–255. DOI: 10.1056/NEJM199401273300404.
- Moran, P. (1994): Requirements for glycosylphosphatidylinositol attachment are similar but not identical in mammalian cells and parasitic protozoa. In: *The Journal of Cell Biology* 125 (2), S. 333–343. DOI: 10.1083/jcb.125.2.333.
- Morita, Y. S.; Paul, K. S.; Englund, P. T. (2000): Specialized fatty acid synthesis in African trypanosomes: myristate for GPI anchors. In: *Science (New York, N.Y.)* 288 (5463), S. 140–143.
- Mouillet-Richard, S.; Ermonval, M.; Chebassier, C.; Laplanche, J. L.; Lehmann, S.; Launay, J. M.; Kellermann, O. (2000): Signal transduction through prion protein. In: *Science (New York, N.Y.)* 289 (5486), S. 1925–1928.
- Moyo, Victor M.; Mukhina, Galina L.; Garrett, Elizabeth S.; Brodsky, Robert A. (2004): Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. In: *British journal of haematology* 126 (1), S. 133–138. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.04992.x.
- Mullis, Kary B.; Faloona, Fred A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Methods in Enzymology* Volume 155, S. 335–350. Online verfügbar unter <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687987550236?via%3Dihub>.
- Mumberg, D.; Müller, R.; Funk, M. (1994): Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. In: *Nucleic acids research* 22 (25), S. 5767–5768. DOI: 10.1093/nar/22.25.5767.
- Muñiz, Manuel; Nuoffer, Claude; Hauri, Hans-Peter; Riezman, Howard (2000): The Emp24 Complex Recruits a Specific Cargo Molecule into Endoplasmic Reticulum–Derived Vesicles. In: *The Journal of Cell Biology* 148 (5), S. 925–930. DOI: 10.1083/jcb.148.5.925.
- Murakami, Yoshiko; Siripanyaphinyo, Uamporn; Hong, Yeongjin; Tashima, Yuko; Maeda, Yusuke; Kinoshita, Taroh (2005): The initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PIG-Y, a seventh component. In: *Molecular Biology of the Cell* 16 (11), S. 5236–5246. DOI: 10.1091/mbc.e05-08-0743.

- Murakami, Yoshiko; Siripanyapinyo, Uamporn; Hong, Yeongjin; Kang, Ji Young; Ishihara, Sonoko; Nakakuma, Hideki et al. (2003): PIG-W is critical for inositol acylation but not for flipping of glycosylphosphatidylinositol-anchor. In: *Molecular Biology of the Cell* 14 (10), S. 4285–4295. DOI: 10.1091/mbc.e03-03-0193.
- Murphy, Sean C.; Samuel, Benjamin U.; Harrison, Travis; Speicher, Kaye D.; Speicher, David W.; Reid, Marion E. et al. (2004): Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. In: *Blood* 103 (5), S. 1920–1928. DOI: 10.1182/blood-2003-09-3165.
- Nafa, K.; Mason, P. J.; Hillmen, P.; Luzzatto, L.; Bessler, M. (1995): Mutations in the PIG-A gene causing paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are mainly of the frameshift type. In: *Blood* 86 (12), S. 4650–4655.
- Nagarajan, S.; Brodsky, R. A.; Young, N. S.; Medof, M. E. (1995): Genetic defects underlying paroxysmal nocturnal hemoglobinuria that arises out of aplastic anemia. In: *Blood* 86 (12), S. 4656–4661.
- Nakamura, N.; Inoue, N.; Watanabe, R.; Takahashi, M.; Takeda, J.; Stevens, V. L.; Kinoshita, T. (1997): Expression cloning of PIG-L, a candidate N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol deacetylase. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (25), S. 15834–15840. DOI: 10.1074/jbc.272.25.15834.
- Neumeister, Birgid; Geiss, Heinrich K.; Braun, Rüdiger W.; Kimmig Peter (2009): Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie. 2. Aufl.: Thieme.
- Ng, Bobby G.; Freeze, Hudson H. (2015): Human genetic disorders involving glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors and glycosphingolipids (GSL). In: *Journal of inherited metabolic disease* 38 (1), S. 171–178. DOI: 10.1007/s10545-014-9752-1.
- Ng, Bobby G.; Hackmann, Karl; Jones, Melanie A.; Eroshkin, Alexey M.; He, Ping; Williams, Roy et al. (2012): Mutations in the Glycosylphosphatidylinositol Gene PIGL Cause CHIME Syndrome. In: *American journal of human genetics* 90 (4), S. 685–688. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.02.010.
- Nguyen, Thi Tuyet Mai; Murakami, Yoshiko; Sheridan, Eamonn; Ehresmann, Sophie; Rousseau, Justine; St-Denis, Anik et al. (2017): Mutations in GPAA1, Encoding a GPI Transamidase Complex Protein, Cause Developmental Delay, Epilepsy, Cerebellar Atrophy, and Osteopenia. In: *American journal of human genetics* 101 (5), S. 856–865. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.09.020.
- Nielsen, H.; Brunak, S.; Heijne, G. von (1999): Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. In: *Protein engineering* 12 (1), S. 3–9.
- Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S.; Heijne, G. von (1997a): A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. In: *International journal of neural systems* 8 (5-6), S. 581–599.
- Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S.; Heijne, G. von (1997b): Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. In: *Protein engineering* 10 (1), S. 1–6.
- Nozaki, M.; Ohishi, K.; Yamada, N.; Kinoshita, T.; Nagy, A.; Takeda, J. (1999): Developmental abnormalities of glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient embryos revealed by Cre/loxP system. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 79 (3), S. 293–299.

- Nuoffer, C.; Horvath, A.; Riezman, H. (1993): Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (14), S. 10558–10563.
- Nyalwidhe, Julius; Lingelbach, Klaus (2006): Proteases and chaperones are the most abundant proteins in the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. In: *Proteomics* 6 (5), S. 1563–1573. DOI: 10.1002/pmic.200500379.
- Ohishi, K.; Inoue, N.; Kinoshita, T. (2001): PIG-S and PIG-T, essential for GPI anchor attachment to proteins, form a complex with GAA1 and GPI8. In: *The EMBO Journal* 20 (15), S. 4088–4098. DOI: 10.1093/emboj/20.15.4088.
- Ohishi, Kazuhito; Nagamune, Kisaburo; Maeda, Yusuke; Kinoshita, Taroh (2003): Two subunits of glycosylphosphatidylinositol transamidase, GPI8 and PIG-T, form a functionally important intermolecular disulfide bridge. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (16), S. 13959–13967. DOI: 10.1074/jbc.M300586200.
- Orlean, P.; Albright, C.; Robbins, P. W. (1988): Cloning and sequencing of the yeast gene for dolichol phosphate mannose synthase, an essential protein. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (33), S. 17499–17507.
- Orlean, Peter; Menon, Anant K. (2007): Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycosphospholipids. In: *Journal of lipid research* 48 (5), S. 993–1011. DOI: 10.1194/jlr.R700002-JLR200.
- Otto, Thomas D.; Rayner, Julian C.; Böhme, Ulrike; Pain, Arnab; Spottiswoode, Natasha; Sanders, Mandy et al. (2014): Genome sequencing of chimpanzee malaria parasites reveals possible pathways of adaptation to human hosts. In: *Nature Communications* 5, S. 4754. DOI: 10.1038/ncomms5754.
- Paterson, Ross W.; Torres-Chae, Charles C.; Kuo, Amy L.; Ando, Tim; Nguyen, Elizabeth A.; Wong, Katherine et al. (2012): Differential Diagnosis of Jakob-Creutzfeldt Disease. In: *Archives of neurology* 69 (12), S. 1578–1582. DOI: 10.1001/2013.jamaneurol.79.
- Pauly, P. C.; Harris, D. A. (1998): Copper stimulates endocytosis of the prion protein. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (50), S. 33107–33110. DOI: 10.1074/jbc.273.50.33107.
- PETERS, W. (1970): Chemotherapy and drug resistance in malaria. In: *Chemotherapy and drug resistance in malaria*.
- Petersen, Thomas Nordahl; Brunak, Søren; Heijne, Gunnar von; Nielsen, Henrik (2011): SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. In: *Nature methods* 8 (10), S. 785–786. DOI: 10.1038/nmeth.1701.
- Phillips, Margaret A.; Lotharius, Julie; Marsh, Kennan; White, John; Dayan, Anthony; White, Karen L. et al. (2015): A long-duration dihydroorotate dehydrogenase inhibitor (DSM265) for prevention and treatment of malaria. In: *Science translational medicine* 7 (296), 296ra111. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa6645.
- Phyo, Aung Pyae; Jittamala, Podjane; Nosten, François H.; Pukrittayakamee, Sasithon; Imwong, Mallika; White, Nicholas J. et al. (2016): Antimalarial activity of artefenomel (OZ439), a novel synthetic antimalarial endoperoxide, in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria: an open-label phase 2 trial. In: *The Lancet Infectious Diseases* 16 (1), S. 61–69. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00320-5.
- Pierleoni, Andrea; Martelli, Pier Luigi; Casadio, Rita (2008): PredGPI: a GPI-anchor predictor. In: *BMC Bioinformatics* 9 (1), S. 392. DOI: 10.1186/1471-2105-9-392.

- Pittet, Martine; Conzelmann, Andreas (2007): Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biochimica et biophysica acta* 1771 (3), S. 405–420. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2006.05.015.
- Pomorski, T.; Menon, A. K. (2006): Lipid flippases and their biological functions. In: *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 63 (24), S. 2908–2921. DOI: 10.1007/s00018-006-6167-7.
- Pouvelle, B.; Gormley, J. A.; Taraschi, T. F. (1994): Characterization of trafficking pathways and membrane genesis in malaria-infected erythrocytes. In: *Molecular and biochemical parasitology* 66 (1), S. 83–96. DOI: 10.1016/0166-6851(94)90038-8.
- Pradines, Bruno; Dormoi, Jérôme; Briolant, Sébastien; Bogreau, Hervé; Rogier, Christophe (2010): La résistance aux antipaludiques. In: *Revue Francophone des Laboratoires* 2010 (422), S. 51–62. DOI: 10.1016/S1773-035X(10)70510-4.
- Priola, Suzette A.; McNally, Kristin L. (2009): The role of the prion protein membrane anchor in prion infection. In: *Prion* 3 (3), S. 134–138.
- Prugnonne, Franck; Ayala, Francisco; Ollomo, Benjamin; Arnathau, Céline; Durand, Patrick; Renaud, François (2011): *Plasmodium falciparum* is not as lonely as previously considered. In: *Virulence* 2 (1), S. 71–76. DOI: 10.4161/viru.2.1.14608.
- Prusiner, S. B. (1991): Molecular biology of prion diseases. In: *Science (New York, N.Y.)* 252 (5012), S. 1515–1522.
- Prusiner, S. B. (1998): Prions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (23), S. 13363–13383.
- Pryde, J. G.; Phillips, J. H. (1986): Fractionation of membrane proteins by temperature-induced phase separation in Triton X-114. Application to subcellular fractions of the adrenal medulla. In: *Biochemical Journal* 233 (2), S. 525–533.
- Puentes, Alvaro; Ocampo, Marisol; Rodríguez, Luis Eduardo; Vera, Ricardo; Valbuena, John; Curtidor, Hernando et al. (2005): Identifying *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-10 human erythrocyte specific binding regions. In: *Biochimie* 87 (5), S. 461–472. DOI: 10.1016/j.biochi.2005.01.001.
- Ralph, Stuart A.; van Dooren, Giel G.; Waller, Ross F.; Crawford, Michael J.; Fraunholz, Martin J.; Foth, Bernardo J. et al. (2004): Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. In: *Nature reviews. Microbiology* 2 (3), S. 203–216. DOI: 10.1038/nrmicro843.
- Ramya, T. N. C.; Mishra, Satyendra; Karmodiya, Krishanpal; Surolia, Namita; Surolia, Avadhesh (2007): Inhibitors of Nonhousekeeping Functions of the Apicoplast Defy Delayed Death in *Plasmodium falciparum* ▽. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51 (1), S. 307–316. DOI: 10.1128/AAC.00808-06.
- Reggiori, Fulvio; Canivenc-Gansel, Elisabeth; Conzelmann, Andreas (1997): Lipid remodeling leads to the introduction and exchange of defined ceramides on GPI proteins in the ER and Golgi of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The EMBO Journal* 16 (12), S. 3506–3518. DOI: 10.1093/emboj/16.12.3506.
- Renart, J.; Reiser, J.; Stark, G. R. (1979): Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (7), S. 3116–3120.
- Reungprapavut, Sutarnthip; Krungkrai, Sudaratana R.; Krungkrai, Jerapan (2004): *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase is a possible target for malaria chemotherapy. In: *Journal of*

enzyme inhibition and medicinal chemistry 19 (3), S. 249–256. DOI: 10.1080/14756360410001689577.

RKI-Ratgeber (2018): Malaria. Hg. v. Robert-Koch-Institut. Online verfügbar unter https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Malaria.html.

Robinson, P. J. (1991a): Phosphatidylinositol membrane anchors and T-cell activation. In: *Immunology today* 12 (1), S. 35–41. DOI: 10.1016/0167-5699(91)90110-F.

Robinson, P. J. (1991b): Signal transduction by GPI-anchored membrane proteins. In: *Cell Biology International Reports* 15 (9), S. 761–767. DOI: 10.1016/0309-1651(91)90031-D.

Rogers, William O. (2007): Plasmodium and Babesia. In: P. R. Murray (Hg.): *Manual of Clinical Microbiology*. 9. Aufl. 2 Bände: ASM Press Washington, D.C., S. 2040–2056.

Rosenfeld, Stephen; Follmann, Dean; Nunez, Olga; Young, Neal S. (2003): Antithymocyte Globulin and Cyclosporine for Severe Aplastic Anemia. In: *JAMA* 289 (9), S. 1130. DOI: 10.1001/jama.289.9.1130.

Rosenthal, P. (1996): Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. In: *Molecular and biochemical parasitology* 83 (2), S. 131–139. DOI: 10.1016/S0166-6851(96)02763-6.

Rothberg, K. G.; Heuser, J. E.; Donzell, W. C.; Ying, Y. S.; Glenney, J. R.; Anderson, R. G. (1992): Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. In: *Cell* 68 (4), S. 673–682.

Rothberg, K. G.; Ying, Y. S.; Kamen, B. A.; Anderson, R. G. (1990): Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. In: *The Journal of Cell Biology* 111 (6 Pt 2), S. 2931–2938.

Rother, Russell P.; Bell, Leonard; Hillmen, Peter; Gladwin, Mark T. (2005): The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. In: *JAMA* 293 (13), S. 1653–1662. DOI: 10.1001/jama.293.13.1653.

Rother, Russell P.; Rollins, Scott A.; Mojciak, Christopher F.; Brodsky, Robert A.; Bell, Leonard (2007): Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: *Nature biotechnology* 25 (11), S. 1256–1264. DOI: 10.1038/nbt1344.

Rottmann, Matthias; McNamara, Case; Yeung, Bryan K. S.; Lee, Marcus C. S.; Zou, Bin; Russell, Bruce et al. (2010): Spiroindolones, a potent compound class for the treatment of malaria. In: *Science (New York, N.Y.)* 329 (5996), S. 1175–1180. DOI: 10.1126/science.1193225.

RTS, S. Clinical Trials Partnership (2015): Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. In: *The Lancet* 386 (9988), S. 31–45. DOI: 10.1016/s0140-6736(15)60721-8.

Sack, Ulrich; Conrad, Karsten; Csernok, Elena; Frank, Ingrid; Hiepe, Falk; Krieger, Thorsten et al. (2009): Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1173, S. 166–173. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04735.x.

Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, Fred A.; Mullis, Kary B.; Horn, GT, Erlich, HA; Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. In: *Science* Vol. 239, Artikel Issue 4732, S. 1350–1354. Online verfügbar unter <http://science.sciencemag.org/content/230/4732/1350.long>.

- Saltiel, A. R. (1991): The role of glycosyl-phosphoinositides in hormone action. In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 23 (1), S. 29–41.
- Saltiel, A. R.; Fox, J. A.; Sherline, P.; Cuatrecasas, P. (1986): Insulin-stimulated hydrolysis of a novel glycolipid generates modulators of cAMP phosphodiesterase. In: *Science (New York, N.Y.)* 233 (4767), S. 967–972.
- Saltiel, A. R.; Osterman, D. G.; Darnell, J. C.; Sorbara-Cazan, L. R.; Chan, B. L.; Low, M. G.; Cuatrecasas, P. (1988): The function of glycosyl phosphoinositides in hormone action. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 320 (1199), S. 345–358.
- Sampaio, G. de; Bourdineaud, J. P.; Lauquin, G. J. (1999): A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall targeting. In: *Molecular microbiology* 34 (2), S. 247–256.
- Sanders, Paul R.; Kats, Lev M.; Drew, Damien R.; O'Donnell, Rebecca A.; O'Neill, Matthew; Maier, Alexander G. et al. (2006): A Set of Glycosylphosphatidyl Inositol-Anchored Membrane Proteins of *Plasmodium falciparum* Is Refractory to Genetic Deletion. In: *Infection and immunity* 74 (7), S. 4330–4338. DOI: 10.1128/IAI.00054-06.
- Sauer, Lena M.; Canovas, Rodrigo; Roche, Daniel; Shams-Eldin, Hosam; Ravel, Patrice; Colinge, Jacques et al. (2023): FT-GPI, a highly sensitive and accurate predictor of GPI-anchored proteins, reveals the composition and evolution of the GPI proteome in *Plasmodium* species. In: *Malaria journal* 22 (1), S. 27. DOI: 10.1186/s12936-022-04430-0.
- Schnider, Cilly Bernardette; Bausch-Fluck, Damaris; Brühlmann, Francis; Heussler, Volker T.; Burda, Paul-Christian (2018): BioID Reveals Novel Proteins of the *Plasmodium* Parasitophorous Vacuole Membrane. In: *mSphere* 3 (1). DOI: 10.1128/mSphere.00522-17.
- Schofield, L.; Gerold, P.; Schwarz, R. T.; Tachado, S. (1994): Signal transduction in host cells mediated by glycosylphosphatidylinositols of the parasitic protozoa, or why do the parasitic protozoa have so many GPI molecules? In: *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 27 (2), S. 249–254.
- Schofield, L.; Novakovic, S.; Gerold, P.; Schwarz, R. T.; McConville, M. J.; Tachado, S. D. (1996): Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 156 (5), S. 1886–1896.
- Schofield, L.; Vivas, L.; Hackett, F.; Gerold, P.; Schwarz, R. T.; Tachado, S. (1993): Neutralizing monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol, the dominant TNF- α -inducing toxin of *Plasmodium falciparum*: prospects for the immunotherapy of severe malaria. In: *Annals of tropical medicine and parasitology* 87 (6), S. 617–626.
- Sender, S.; Decker, B.; Fenske, C. D.; Sly, W. S.; Carter, N. D.; Gros, G. (1998): Localization of carbonic anhydrase IV in rat and human heart muscle. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 46 (7), S. 855–861. DOI: 10.1177/002215549804600709.
- Sender, S.; Gros, G.; Waheed, A.; Hageman, G. S.; Sly, W. S. (1994): Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase IV in capillaries of rat and human skeletal muscle. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 42 (9), S. 1229–1236. DOI: 10.1177/42.9.8064130.
- Shams-Eldin, Hosam; Debrierre-Grickiege, Françoise; Schwarz, Ralph T. (2009): Glycosylphosphatidylinositol Anchors: Structure, Biosynthesis and Function. In: Hans-Joachim Gabius (Hg.): *The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences*: Wiley-Blackwell, S. 155–173.

- Sheiner, Lilach; Striepen, Boris (2013): Protein sorting in complex plastids. In: *Biochimica et biophysica acta* 1833 (2), S. 352–359. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.05.030.
- Sheiner, Lilach; Vaidya, Akhil B.; McFadden, Geoffrey I. (2013): The metabolic roles of the endosymbiotic organelles of *Toxoplasma* and *Plasmodium* spp. In: *Current opinion in microbiology* 16 (4), S. 452–458. DOI: 10.1016/j.mib.2013.07.003.
- Shimoi, H.; Sakamoto, K.; Okuda, M.; Atthi, R.; Iwashita, K.; Ito, K. (2002): The AWA1 Gene Is Required for the Foam-Forming Phenotype and Cell Surface Hydrophobicity of Sake Yeast. In: *Applied and Environmental Microbiology* 68 (4), S. 2018–2025. DOI: 10.1128/AEM.68.4.2018-2025.2002.
- Shishioh, Nobue; Hong, Yeongjin; Ohishi, Kazuhito; Ashida, Hisashi; Maeda, Yusuke; Kinoshita, Taroh (2005): GPI7 Is the Second Partner of PIG-F and Involved in Modification of Glycosylphosphatidylinositol. In: *J. Biol. Chem.* 280 (10), S. 9728–9734. DOI: 10.1074/jbc.M413755200.
- Sicre de Fontbrune, Flore; Peffault de Latour, Régis (2018): Ten Years of Clinical Experience With Eculizumab in Patients With Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. In: *Seminars in hematology* 55 (3), S. 124–129. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2018.04.001.
- Signorell, Aita; Menon, Anant K. (2009): Chapter 7 Attachment of a GPI Anchor to Protein. In: *The Enzymes : Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchoring of Proteins*, Bd. 26: Academic Press, S. 133–149. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874604709260070>.
- Simone, Giuseppina de; Di Fiore, Anna; Capasso, Clemente; Supuran, Claudiu T. (2015): The zinc coordination pattern in the η -carbonic anhydrase from *Plasmodium falciparum* is different from all other carbonic anhydrase genetic families. In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 25 (7), S. 1385–1389. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.02.046.
- Simons, K.; Ikonen, E. (1997): Functional rafts in cell membranes. In: *Nature* 387 (6633), S. 569–572. DOI: 10.1038/42408.
- Simons, Kai; van Meer, Gerrit (1988): Lipid sorting in epithelial cells. In: *Biochemistry* 27 (17), S. 6197–6202. DOI: 10.1021/bi00417a001.
- Simons, Kai; Wandinger-Ness, Angela (1990): Polarized sorting in epithelia. In: *Cell* 62 (2), S. 207–210. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90357-K.
- Sinclair, David; Donegan, Sarah; Isba, Rachel; Laloo, David G. (2012): Artesunate versus quinine for treating severe malaria. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (6), CD005967. DOI: 10.1002/14651858.CD005967.pub4.
- Sipos, G.; Puoti, A.; Conzelmann, A. (1994): Glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: absence of ceramides from complete precursor glycolipids. In: *The EMBO Journal* 13 (12), S. 2789–2796.
- Sipos, György; Puoti, Alessandro; Conzelmann, Andreas (1995): Biosynthesis of the Side Chain of Yeast Glycosylphosphatidylinositol Anchors Is Operated by Novel Mannosyltransferases Located in the Endoplasmic Reticulum and the Golgi Apparatus. In: *J. Biol. Chem.* 270 (34), S. 19709–19715. DOI: 10.1074/jbc.270.34.19709.
- Skrzypek, M.; Lester, R. L.; Dickson, R. C. (1997): Suppressor gene analysis reveals an essential role for sphingolipids in transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Journal of Bacteriology* 179 (5), S. 1513–1520.
- SLEIN, M. W.; LOGAN, G. F., JR (1963): Partial purification and properties of two phospholipases of *Bacillus cereus*. In: *Journal of Bacteriology* 85, S. 369–381.

- Smith, T. K.; Cottaz, S.; Brimacombe, J. S.; Ferguson, M. A. (1996): Substrate specificity of the dolichol phosphate mannose: glucosaminyl phosphatidylinositol alpha1-4-mannosyltransferase of the glycosylphosphatidylinositol biosynthetic pathway of African trypanosomes. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (11), S. 6476–6482.
- Smith, Terry K.; Gerold, Peter; Crossman, Arthur; Paterson, Michael J.; Borissow, Charles N.; Brimacombe, John S. et al. (2002): Substrate Specificity of the Plasmodium falciparum Glycosylphosphatidylinositol Biosynthetic Pathway and Inhibition by Species-Specific Suicide Substrates †. In: *Biochemistry* 41 (41), S. 12395–12406. DOI: 10.1021/bi0203511.
- Soll, Jürgen; Schleiff, Enrico (2004): Protein import into chloroplasts. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (3), S. 198–208. DOI: 10.1038/nrm1333.
- Spangenberg, Thomas; Burrows, Jeremy N.; Kowalczyk, Paul; McDonald, Simon; Wells, Timothy N. C.; Willis, Paul (2013): The open access malaria box: a drug discovery catalyst for neglected diseases. In: *PloS one* 8 (6), e62906. DOI: 10.1371/journal.pone.0062906.
- Spielmann, Tobias; Montagna, Georgina N.; Hecht, Leonie; Matuschewski, Kai (2012): Molecular make-up of the Plasmodium parasitophorous vacuolar membrane. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 302 (4-5), S. 179–186. DOI: 10.1016/j.ijmm.2012.07.011.
- Srivastava, Anand; Singh, Shailja; Dhawan, Shikha; Mahmood Alam, M.; Mohmmmed, Asif; Chitnis, Chetan E. (2010): Localization of apical sushi protein in Plasmodium falciparum merozoites. In: *Molecular and biochemical parasitology* 174 (1), S. 66–69. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2010.06.003.
- Stahl, N.; Borchelt, D. R.; Prusiner, S. B. (1990): Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. In: *Biochemistry* 29 (22), S. 5405–5412. DOI: 10.1021/bi00474a028.
- Stebel, Marco; Vatta, Paolo; Ruaro, Maria Elisabetta; Del Sal, Giannino; Parton, Robert G.; Schneider, Claudio (2000): The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein. In: *FEBS Letters* 481 (2), S. 152–158. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)02004-4.
- Steinhardt, Laura C.; Magill, Alan J.; Arguin, Paul M. (2011): Review: Malaria chemoprophylaxis for travelers to Latin America. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 85 (6), S. 1015–1024. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.11-0464.
- Stevens, V. L. (1993): Regulation of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis by GTP. Stimulation of N-acetylglucosamine-phosphatidylinositol deacetylation. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (13), S. 9718–9724.
- Stevens, V. L.; Raetz, C. R. (1991): Defective glycosyl phosphatidylinositol biosynthesis in extracts of three Thy-1 negative lymphoma cell mutants. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (16), S. 10039–10042.
- Storb, R.; Blume, K. G.; O'Donnell, M. R.; Chauncey, T.; Forman, S. J.; Deeg, H. J. et al. (2001): Cyclophosphamide and antithymocyte globulin to condition patients with aplastic anemia for allogeneic marrow transplantations: the experience in four centers. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 7 (1), S. 39–44. DOI: 10.1053/bbmt.2001.v7.pm11215697.
- Strelkauskas, Anthony; Strelkauskas, Jennifer; Moszyk-Strelkauskas, Danielle (2010): Microbiology. a clinical approach: Garland Science.
- Suerbaum, Sebastian; Hahn, Helmut; Burchard, Gerd D.; Kaufmann, Stefan H.E.; Schulz, Thomas F. (2012): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 7. Aufl.: Springer Berlin Heidelberg.

- Sullivan, David J. (2002): Theories on malarial pigment formation and quinoline action. In: *International Journal for Parasitology* 32 (13), S. 1645–1653. DOI: 10.1016/S0020-7519(02)00193-5.
- Sulyok, Mihály; Rückle, Thomas; Roth, Alexandra; Mürbeth, Raymund E.; Chalon, Stephan; Kerr, Nicola et al. (2017): DSM265 for Plasmodium falciparum chemoprophylaxis: a randomised, double blinded, phase 1 trial with controlled human malaria infection. In: *The Lancet Infectious Diseases* 17 (6), S. 636–644. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30139-1.
- Supuran, Claudiu T. (2008): Carbonic anhydrases--an overview. In: *Current pharmaceutical design* 14 (7), S. 603–614. DOI: 10.2174/138161208783877884.
- Syed, Yahiya Y. (2022): RTS,S/AS01 malaria vaccine (Mosquirix®): a profile of its use. In: *Drugs & therapy perspectives : for rational drug selection and use* 38 (9), S. 373–381. DOI: 10.1007/s40267-022-00937-3.
- Tachado, Souvenir D.; Gerold, Peter; Schwarz, Ralph; Novakovic, Suzanna; McConville, Malcolm; Schofield, Louis (1997): Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium, Trypanosoma, and Leishmania: Activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (8), S. 4022–4027.
- Takahashi, M.; Inoue, N.; Ohishi, K.; Maeda, Y.; Nakamura, N.; Endo, Y. et al. (1996): PIG-B, a membrane protein of the endoplasmic reticulum with a large lumenal domain, is involved in transferring the third mannose of the GPI anchor. In: *The EMBO Journal* 15 (16), S. 4254–4261.
- Takida, Satoshi; Maeda, Yusuke; Kinoshita, Taroh (2008): Mammalian GPI-anchored proteins require p24 proteins for their efficient transport from the ER to the plasma membrane. In: *The Biochemical journal* 409 (2), S. 555–562. DOI: 10.1042/BJ20070234.
- Takos, Adam M.; Dry, Ian B.; Soole, Kathleen L. (1997): Detection of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on the surface of Nicotiana tabacum protoplasts. In: *FEBS Letters* 405 (1), S. 1–4. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00064-1.
- Tanaka, Satoshi; Maeda, Yusuke; Tashima, Yuko; Kinoshita, Taroh (2004): Inositol deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (14), S. 14256–14263. DOI: 10.1074/jbc.M313755200.
- Taron, Barbara W.; Colussi, Paul A.; Wiedman, Jill M.; Orlean, Peter; Taron, Christopher H. (2004): Human Smp3p adds a fourth mannose to yeast and human glycosylphosphatidylinositol precursors in vivo. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (34), S. 36083–36092. DOI: 10.1074/jbc.M405081200.
- Taverne, J.; Bate, C. A.; Playfair, J. H. (1990): Malaria exoantigens induce TNF, are toxic and are blocked by T-independent antibody. In: *Immunology letters* 25 (1-3), S. 207–212.
- Taylor, David R.; Hooper, Nigel M. (2006): The prion protein and lipid rafts. In: *Molecular membrane biology* 23 (1), S. 89–99. DOI: 10.1080/09687860500449994.
- Taylor, David R.; Hooper, Nigel M. (2011): GPI-Anchored Proteins in Health and Disease: Springer, New York, NY. Online verfügbar unter https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4419-6382-6_2.pdf.
- Thompson, Miles D.; Nezarati, Marjan M.; Gillissen-Kaesbach, Gabriele; Meinecke, Peter; Mendoza, Roberto; Mornet, Etienne et al. (2010): Hyperphosphatasia with seizures, neurologic

- deficit, and characteristic facial features: Five new patients with Mabry syndrome. In: *American Journal of Medical Genetics Part A* 152A (7), S. 1661–1669. DOI: 10.1002/ajmg.a.33438.
- Tiede, A.; Nischan, C.; Schubert, J.; Schmidt, R. E. (2000): Characterisation of the enzymatic complex for the first step in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 32 (3), S. 339–350.
- Topolska, Agnieszka E.; Lidgett, Angela; Truman, Dirk; Fujioka, Hisashi; Coppel, Ross L. (2004): Characterization of a membrane-associated rho-try protein of *Plasmodium falciparum*. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (6), S. 4648–4656. DOI: 10.1074/jbc.M307859200.
- Trape, J. F.; Pison, G.; Preziosi, M. P.; Enel, C.; Du Desgrées Loû, A.; Delaunay, V. et al. (1998): Impact of chloroquine resistance on malaria mortality. In: *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 321 (8), S. 689–697.
- Turner, Helen (2016): Spiroindolone NITD609 is a novel antimalarial drug that targets the P-type ATPase PfATP4. In: *Future medicinal chemistry* 8 (2), S. 227–238. DOI: 10.4155/fmc.15.177.
- Udenfriend, S.; Kodukula, K. (1995): How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. In: *Annual review of biochemistry* 64, S. 563–591. DOI: 10.1146/annurev.bi.64.070195.003023.
- Umemura, Mariko; Fujita, Morihisa; Yoko-o, Takehiko; Fukamizu, Akiyoshi; Jigami, Yoshifumi (2007): *Saccharomyces cerevisiae* CWH43 is involved in the remodeling of the lipid moiety of GPI anchors to ceramides. In: *Molecular Biology of the Cell* 18 (11), S. 4304–4316. DOI: 10.1091/mbc.e07-05-0482.
- Vaidya, Akhil B.; Morrissey, Joanne M.; Zhang, Zhongsheng; Das, Sudipta; Daly, Thomas M.; Otto, Thomas D. et al.: Pyrazoleamide compounds are potent antimalarials that target Na⁺ homeostasis in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. In: *Nature Communications* 5, S. 5521. DOI: 10.1038/ncomms6521.
- van der Vaart, J. M.; te Biesebeke, R.; Chapman, J. W.; Klis, F. M.; Verrips, C. T. (1996): The beta-1, 6-glucan containing side-chain of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* is bound to the glycan core of the GPI moiety. In: *FEMS microbiology letters* 145 (3), S. 401–407.
- van Dijk, Melissa R.; Douradinha, Bruno; Franke-Fayard, Blandine; Heussler, Volker; van Dooren, Maaïke W.; van Schaijk, Ben et al. (2005): Genetically attenuated, P36p-deficient malarial sporozoites induce protective immunity and apoptosis of infected liver cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (34), S. 12194–12199. DOI: 10.1073/pnas.0500925102.
- Vieira, Jeffrey; Messing, Joachim (1982): The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. In: *Gene* 19 (3), S. 259–268. DOI: 10.1016/0378-1119(82)90015-4.
- Vishwakarma, Ram A.; Menon, Anant K. (2005): Flip-flop of glycosylphosphatidylinositols (GPI's) across the ER. In: *Chemical communications (Cambridge, England)* (4), S. 453–455. DOI: 10.1039/b413196g.
- Vorberg, Ina; Raines, Anne; Priola, Suzette A. (2004): Acute formation of protease-resistant prion protein does not always lead to persistent scrapie infection in vitro. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (28), S. 29218–29225. DOI: 10.1074/jbc.M402576200.
- Waheed, Abdul; Sly, William S. (2014): Membrane associated carbonic anhydrase IV (CA IV): a personal and historical perspective. In: *Sub-cellular biochemistry* 75, S. 157–179. DOI: 10.1007/978-94-007-7359-2_9.

- Walker, Naomi F.; Nadjm, Behzad; Whitty, Christopher J.M. (2010): Malaria. In: *Medicine* 38 (1), S. 41–46. DOI: 10.1016/j.mpmed.2009.09.017.
- Walker, Naomi F.; Nadjm, Behzad; Whitty, Christopher J.M. (2018): Malaria. In: *Medicine* 46 (1), S. 52–58. DOI: 10.1016/j.mpmed.2017.10.012.
- Wang, J.; Maziarz, K.; Ratnam, M. (1999): Recognition of the carboxyl-terminal signal for GPI modification requires translocation of its hydrophobic domain across the ER membrane. In: *Journal of molecular biology* 286 (5), S. 1303–1310. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2584.
- Ward, G. E.; Miller, L. H.; Dvorak, J. A. (1993): The origin of parasitophorous vacuole membrane lipids in malaria-infected erythrocytes. In: *Journal of cell science* 106 (Pt 1), S. 237–248.
- Watanabe, R.; Inoue, N.; Westfall, B.; Taron, C. H.; Orlean, P.; Takeda, J.; Kinoshita, T. (1998): The first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is mediated by a complex of PIG-A, PIG-H, PIG-C and GPI1. In: *The EMBO Journal* 17 (4), S. 877–885. DOI: 10.1093/emboj/17.4.877.
- Watanabe, R.; Murakami, Y.; Marmor, M. D.; Inoue, N.; Maeda, Y.; Hino, J. et al. (2000): Initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PIG-P and is regulated by DPM2. In: *The EMBO Journal* 19 (16), S. 4402–4411. DOI: 10.1093/emboj/19.16.4402.
- Watt, Nicole T.; Hooper, Nigel M. (2003): The prion protein and neuronal zinc homeostasis. In: *Trends in biochemical sciences* 28 (8), S. 406–410. DOI: 10.1016/S0968-0004(03)00166-X.
- Weiss, Daniel J.; Lucas, Tim C. D.; Nguyen, Michele; Nandi, Anita K.; Bisanzio, Donal; Battle, Katherine E. et al. (2019): Mapping the global prevalence, incidence, and mortality of *Plasmodium falciparum*, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. In: *The Lancet* 394 (10195), S. 322–331. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)31097-9.
- Wells, G. A.; Scott, A. C.; Johnson, C. T.; Gunning, R. F.; Hancock, R. D.; Jeffrey, M. et al. (1987): A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. In: *The Veterinary record* 121 (18), S. 419–420.
- White, Nicholas J.; Pukrittayakamee, Sasithon; Hien, Tran Tinh; Faiz, M. Abul; Mokuolu, Olugbenga A.; Dondorp, Arjen M. (2014): Malaria. In: *Lancet (London, England)* 383 (9918), S. 723–735. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60024-0.
- WHO (2001): Antimalarial drug combination therapy (archived). Report of a WHO Technical Consultation, 4-5 April 2001. Online verfügbar unter https://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_cds_rbm_2001_35/en/, zuletzt geprüft am 24.06.2019.
- WHO (2006): WHO briefing WHO Briefing on Malaria Treatment Guidelines and artemisinin monotherapies. Online verfügbar unter https://www.who.int/malaria/publications/atoz/meeting_briefing19april.pdf, zuletzt geprüft am 24.06.2019.
- WHO (2014): Status report on artemisinin resistance. Online verfügbar unter https://www.who.int/malaria/publications/atoz/status_rep_artemisinin_resistance_jan2014.pdf?ua=1.
- WHO (2015): Guidelines for the treatment of malaria (WHO/UCN/GMP/2022.01. Third edition. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- WHO (2018a): International travel and health: Malaria. Hg. v. WHO. Online verfügbar unter <https://www.who.int/ith/2017-ith-chapter7.pdf?ua=1&ua=1>.

- WHO (2018b): Status report on artemisinin resistance and ACT efficacy. Online verfügbar unter <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/artemisinin-resistance-august2018/en/>.
- WHO (2019): WORLD MALARIA REPORT 2018. [S.l.]: World Health Organization.
- WHO (2022a): Malaria vaccine: WHO position paper - March 2022. In: *Weekly Epidemiol Record* (97), S. 60–78. Online verfügbar unter <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9709-61%E2%80%9380>.
- WHO (2022b): World Malaria report 2022.
- WHO (2022c): WHO Guidelines for Malaria 2022.
- Wichmann, Dominic; Schwarz, Ralph T.; Ruppert, Volker; Ehrhardt, Stephan; Cramer, Jakob P.; Burchard, Gerd D. et al. (2007): Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositol induces limited apoptosis in liver and spleen mouse tissue. In: *Apoptosis* 12 (6), S. 1037–1041. DOI: 10.1007/s10495-006-0033-9.
- Wickham, M. E.; Thompson, J. K.; Cowman, A. F. (2003): Characterisation of the merozoite surface protein-2 promoter using stable and transient transfection in Plasmodium falciparum. In: *Molecular and biochemical parasitology* 129 (2). DOI: 10.1016/s0166-6851(03)00118-x.
- Wongsrichanalai, Chansuda; Pickard, Amy L.; Wernsdorfer, Walther H.; Meshnick, Steven R. (2002): Epidemiology of drug-resistant malaria. In: *The Lancet Infectious Diseases* 2 (4), S. 209–218. DOI: 10.1016/S1473-3099(02)00239-6.
- Yu, Min; Kumar, T. R. Santha; Nkrumah, Louis J.; Coppi, Alida; Retzlaff, Silke; Li, Celeste D. et al. (2008): The fatty acid biosynthesis enzyme FabI plays a key role in the development of liver-stage malarial parasites. In: *Cell host & microbe* 4 (6), S. 567–578. DOI: 10.1016/j.chom.2008.11.001.
- Zahn, R.; Liu, A.; Lührs, T.; Riek, R.; Schroetter, C. von; López García, F. et al. (2000): NMR solution structure of the human prion protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (1), S. 145–150. DOI: 10.1073/pnas.97.1.145.
- Zahn, Ralph (2003): The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site. In: *Journal of molecular biology* 334 (3), S. 477–488.
- Zhang, X.; Adda, C. G.; Low, A.; Zhang, J.; Zhang, W.; Sun, H. et al. (2012): Role of the helical structure of the N-terminal region of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 in fibril formation and membrane interaction. In: *Biochemistry* 51 (7). DOI: 10.1021/bi201880s.
- Zhu, X. L.; Sly, W. S. (1990): Carbonic anhydrase IV from human lung. Purification, characterization, and comparison with membrane carbonic anhydrase from human kidney. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (15), S. 8795–8801.
- Zinecker, C. F.; Gerold, P.; Azzouz, N.; Striepen, B.; Schmidt, A.; Berhe, S. et al. (1997): Glycosyl-phosphatidylinositols in protozoa structure, biosynthesis and intracellular localisation. In: *Indian journal of biochemistry & biophysics* 34 (1-2), S. 105–109.
- Zordan, Rebecca E.; Beliveau, Brian J.; Trow, Jonathan A.; Craig, Nancy L.; Cormack, Brendan P. (2015): Avoiding the Ends: Internal Epitope Tagging of Proteins Using Transposon Tn7. In: *Genetics* 200 (1), S. 47–58. DOI: 10.1534/genetics.114.169482.