

**RUHE
VOR**

**DEM
STURM**

RUHE VOR DEM STURM

NEUE ANSÄTZE IM KAMPF GEGEN MALARIA

FRIEDRICH FRISCHKNECHT

Jährlich erkranken in den Tropen und Subtropen über 250 Millionen Menschen an Malaria, mehr als 500.000 sterben daran, zumeist Kinder. Übertragen wird das gefährliche „Wechselfieber“ von Stechmücken, die den Malaria-Erreger in sich tragen – einen einzelligen Parasiten, der einen komplexen Lebenszyklus durchläuft. Heidelberger Wissenschaftler haben mit neuen Methoden auffällige Pausen während des verhängnisvollen parasitären Eroberungsfeldzuges des Erregers erkannt. Möglicherweise finden sich in den Phasen der Ruhe vor dem Sturm neue molekulare Ansätze, um die uralte Menschheitsgeißel wirkungsvoll zu bekämpfen.

E

Einst war die Malaria fast überall auf der Welt verbreitet. Selbst in der Region rund um Heidelberg trat das „Sumpf- oder Wechselfieber“ auf. Erst im 19. Jahrhundert gelang es in Deutschland, die von Stechmücken übertragene Krankheit zurückzudrängen – eine Folge der Zerstörung ihrer Lebensräume im Zuge der Begradigung des Rheins. Bis in die 1970er-Jahre hinein dauerte es, die Malaria aus Europa zu vertreiben.

„Insgesamt sind weit über hundert Spezies von Malaria-Erregern bekannt. Sie befallen Vögel, Nagetiere, Echsen und Affen. Fünf Erregertypen rufen beim Menschen Malaria hervor.“

Die Erreger der gefährlichen Infektionskrankheit – einzelne Parasiten der Gattung Plasmodium – gelangen beim Stich einer weiblichen Anopheles-Stechmücke in die Haut des Menschen. Die Parasiten bewegen sich durch das Unterhautgewebe fort und suchen nach einem Blutgefäß, in welches sie eindringen können. Ist ihnen das gelungen, lassen sie sich vom Blutstrom im Körper verteilen. In der Leber schließlich halten sie an und dringen gezielt in die Zellen des Organs ein, um sich in ihnen zu vermehren. Die Nachkommen – neu entstandene Parasitenformen – treten aus den Leberzellen aus und dringen anschließend in rote Blutkörperchen ein. Erst dieser Befall löst die Symptome der Krankheit aus. Die nächste Mücke, die den infizierten Menschen sticht, nimmt mit dem Blut wieder Parasiten auf. Der Kreislauf beginnt aufs Neue.

Im Laufe ihres komplexen Lebenszyklus verändern die Parasiten mehrfach Form und Verhalten. Unsere Arbeitsgruppe in Heidelberg untersucht seit nunmehr über zehn Jahren, wie die Parasiten im Körper der Stechmücke heranreifen. Hierzu verfolgen wir, wie sich die Parasiten in

großen Zysten entwickeln, die sich an der Wand des Mückenmagens befinden. Bis zu tausend Erreger können im Innern einer solchen Zyste entstehen und aus ihr hervorbrechen. Im Zuge unserer Arbeiten konnten wir mehrere Proteine in den Membranen der Parasiten identifizieren, die eine entscheidende Rolle bei diesen Vorgängen spielen. Doch welche genaue Funktion haben diese Proteine? Um mehr darüber zu erfahren, stellen wir mit genetischen Methoden Parasiten her, denen diese wichtigen Proteine fehlen oder deren Aufbau verändert ist. Wir haben beispielsweise fluoreszierende Farbstoffe in diese Proteine eingeschleust, sodass die Membranen der Parasiten im Mikroskop leuchten und wir ihre Entwicklung beobachten können.

Sobald die Reifung der Parasiten im Innern der Zyste abgeschlossen ist, brechen sie aus ihr hervor und gelangen in den „Blutkreislauf“ der Mücke. Wir konnten erstmals verfolgen, in welchen einzelnen Schritten das geschieht: Zunächst liegen die Parasiten in der Zyste eng beieinander und sind weitgehend regungslos, doch dann beginnen sie,

sich zu bewegen. Aus der großen zirkulierenden parasitären Masse im Innern der Zyste treten einzelne Parasiten aus oder sie werden zu Hunderten explosionsartig aus der Zyste herausgeschleudert.

Auffälliges Verharren

Aus der Zyste befreit, treiben die Parasiten im Körper der Mücke, bis sie in die Speicheldrüsen eindringen. Während unserer Forschungsarbeiten konnten wir ein Protein identifizieren, ohne das die Parasiten die Zyste nicht verlassen und nicht in die Speicheldrüsen eindringen können. Auf ihrem Weg in die Speicheldrüse scheinen sich die Parasiten nochmals aktiv zu bewegen, dann aber gehen sie erneut in eine zunächst regungslose Phase über. In den Speicheldrüsen können sich mehrere Tausend Parasiten ansammeln, beim Stich der Mücke gelangen aber meist nur zehn bis hundert Parasiten in die Haut des Menschen. Bislang verstehen wir nicht, warum nur eine so kleine Anzahl von Parasiten übertragen wird.

In Untersuchungen mit Mäusen ist es uns gelungen, den Weg der Parasiten in den Wirtsorganismus zu filmen. Dazu markierten wir die Parasiten mit fluoreszierenden Proteinen und beobachteten mithilfe spezieller Mikroskope, wie die Mücke ihren Stechrüssel in die Haut der Mäuse einführt und sich danach regelrecht durch das Gewebe kaut. Mit ihrem Ober- und Unterkiefer zerstört sie dabei kleine Blutgefäße, woraufhin es zu Blutungen im Unterhautgewebe kommt. Damit dies nicht sofort zu Schmerzen führt, die auf die Gefahr aufmerksam machen würden, spuckt die Mücke Speichel in die von ihr verursachte Wunde: Er enthält Substanzen, die kurzfristig schmerzlindernd wirken. Zudem hemmen weitere im Speichel enthaltene Substanzen die Blutgerinnung – schließlich will die Mücke das Blut ihres Opfers trinken. Mit dem Fluss des Speichels gelangen auch die Parasiten in die Haut des Menschen. Dort angekommen, haben es die Parasiten plötzlich sehr eilig. Sehr schnell bewegen sie sich im Gewebe fort – rund zehn Mal schneller als die ihnen nachstellenden Fresszellen des menschlichen Immunsystems. Auch von Zellen, die ihnen im Weg stehen, lassen sich die Parasiten nicht aufhalten: Sie rasen einfach durch sie hindurch. Von den Parasiten, die während des Stichs übertragen werden, schafft es etwa ein Drittel, in ein Blutgefäß einzudringen; den anderen geht zuvor die Energie aus, wieder andere wandern – wohl versehentlich – in ein Lymphgefäß ein.

Doch wie finden die Parasiten die Blutgefäße? Auch das haben wir in Heidelberg erforscht. Die Parasiten, die von der Mücke übertragen werden, sind circa zehn Mikrometer lang, einen Mikrometer breit und leicht gekrümmt. Isolierte Parasiten laufen wegen dieser Krümmung immer im Kreis. Das erleichtert es uns enorm, sie mit dem Mikroskop zu beobachten – sie können aus dem gewählten Bildausschnitt nicht davonrennen. Die

auffällige Krümmung der Parasiten ist aber noch aus einem ganz anderen Grund bemerkenswert: Sie entspricht ungefähr der Krümmung der kleinsten Blutgefäße. Wir denken, dass dies kein Zufall ist, sondern sich im Laufe der Evolution so entwickelt hat: Ihre charakteristische Krümmung könnte es den Parasiten ermöglichen, passende Blutgefäße zu finden, sich an sie anzuschmiegen und in sie einzudringen.

Um diese Hypothese zu prüfen, haben wir zusammen mit Wissenschaftlern des Physikalisch-Chemischen Instituts (PIC) der Universität Heidelberg mikroskopisch kleine Labyrinth mit unterschiedlich dicken Säulen hergestellt. Gibt man nun Parasiten in die Labyrinth, die mit Hunderten solcher Säulen verschiedener Dicke bestückt sind, lässt sich tatsächlich beobachten, dass sich die Parasiten am liebsten um Säulen mit derjenigen Krümmung schlängeln, die ihrer eigenen Krümmung am ähnlichsten ist. Wir wollen diese Beobachtung nun im lebenden Organismus mittels Untersuchungen an Mäusen überprüfen. Dazu erzeugen wir zurzeit mit gentechnischen Methoden Parasiten, die unterschiedliche Krümmungen aufweisen.

Kräfte sammeln

Bevor die Parasiten in die Blutgefäße eindringen, scheinen manche wieder eine Pause einzulegen: Womöglich stellt die stabile Wand der Blutgefäße doch eine Barriere dar, welche die Parasiten nicht ganz so einfach, sondern nur mit geballter Kraft überwinden können. Gemeinsam mit Wissenschaftlern des Instituts für Theoretische Physik der Universität Heidelberg untersuchen wir, wie groß die Kräfte sind, die die Parasiten hierzu aufbringen müssen. Dazu setzen wir zwei unterschiedliche Methoden ein. Zum einen untersuchen wir die Kräfte, die Parasiten auf winzige Kügelchen ausüben. Die Kügelchen werden dafür im Fokus eines Laserstrahls gefangen und präzise auf den Parasiten platziert. Anhand der Auslenkung der Kügelchen lässt sich dann die Kraft berechnen, mit welcher der Parasit an ihnen zieht. Dies erlaubt es uns, auf den Mechanismus der Kraftübertragung rückzuschließen. Zum anderen bestimmen wir die Kräfte, mit denen der Parasit am Boden zieht: Dazu setzen wir die Parasiten auf flexible Gele, in denen sehr kleine leuchtende Kügelchen sitzen, und messen deren Auslenkung, sobald sich der Parasit bewegt.

Derartige Kraftmessungen erfolgen zusätzlich mit Parasiten, die genetisch verändert wurden. Während dieser Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Kräfte der Parasiten massiv beeinträchtigt sind, wenn nur drei Aminosäuren-Bausteine eines bestimmten Proteins verändert sind. Die Parasiten sind aufgrund dieser Veränderung derart geschwächt, dass sie sich nicht wie üblich fortbewegen können. Es handelt sich dabei um ein Protein, das imstande ist, ein anderes Protein namens „Aktin“ zu binden. Aktin ist wichtig für die Funktion der Muskel-



PROF. DR. FRIEDRICH FRISCHKNECHT studierte Biochemie an der Freien Universität Berlin und promovierte dort zu Arbeiten an Pockenviren, die er am Europäischen Molekularbiologischen Laboratorium (EMBL) in Heidelberg durchführte. Es folgte ein vierjähriger Aufenthalt am Institut Pasteur in Paris, an dem er seine Forschungen zur Malaria aufnahm. Von 2005 an baute Frischknecht in der Universitätsklinik Heidelberg seine Arbeitsgruppe auf, seit 2014 ist er Professor für Integrative Parasitologie am Zentrum für Infektiologie der Medizinischen Fakultät Heidelberg; darüber hinaus ist er Mitglied des Exzellenzclusters CellNetworks. Die im Text beschriebenen Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit den Doktoranden Mirko Singer, Benjamin Spreng, Dennis Klug, Johanna Kratzer, Mendi Muthinja, Catherine Moreau und Katharina Quadt, dem Postdoc Dr. Ross Douglas sowie Prof. Dr. Joachim Spatz vom Physikalisch-Chemischen Institut, Prof. Dr. Ulrich Schwarz vom Institut für Theoretische Physik (beide Universität Heidelberg) und Prof. Dr. Rogerio Amino vom Pariser Institut Pasteur.

Kontakt: freddy.frischknecht@med.uni-heidelberg.de

„Wenn wir die Bewegungsfähigkeit der Parasiten einschränken, können wir womöglich auch verhindern, dass sie ihren Lebenszyklus fortsetzen und Malaria auslösen.“

zellen des Menschen – und ebenso für die Bewegung der Parasiten. Aktin scheint aber bei den Parasiten anders zu funktionieren: Im Unterschied zu seiner Organisation in menschlichen Muskelzellen bildet es in den einzelligen Parasiten nur äußerst kleine und zudem instabile „Mikrofilamente“, winzige längs ausgerichtete Fasern. Wie es zu diesem Unterschied kommt, untersuchen wir derzeit. Wir hoffen, dabei auf eine „Achillesferse“ des Parasiten zu treffen. Denn wenn wir die Bewegung der Parasiten einschränken können, dann schaffen sie es nicht bis in das Blut, sie können sich im Organismus also nicht verbreiten und den Menschen krank machen.

Ein Blick zurück

Wenn die Parasiten im Blut angekommen sind, reißt sie der Blutstrom mit durch den ganzen Körper. Früher gingen die Wissenschaftler davon aus, dass Parasiten ohne Zwischenstopp direkt nach dem Stich der Mücke in die Zellen des Blutes eindringen und unmittelbar die Symptome der Malaria auslösen. Doch die experimentellen Beobachtungen stimmten mit dieser Annahme nicht überein. Ein Beispiel ist ein – heute undenkbares – Experiment Anfang des 20. Jahrhunderts. Damals ließ man freiwillige Versuchsteilnehmer von vielen Mücken stechen und nahm den Probanden daraufhin zeitlich versetzt Blut ab, um es einer zweiten Gruppe von Freiwilligen zu injizieren. Es zeigte sich, dass zwar die erste, nicht aber die zweite Gruppe der Versuchsteilnehmer an Malaria erkrankte. Erst nach neun Tagen, so stellte sich heraus, ließ sich die Malaria von der ersten auf die zweite Gruppe übertragen. In der Zwischenzeit, das vermuteten die Wissenschaftler damals, verstecken sich die Parasiten irgendwo im Körper. Mitte des 20. Jahrhunderts zeigten dann Untersuchungen mit Tieren, wo sich die Parasiten zwischenzeitlich aufhalten und gleichsam ihre Kräfte vor dem Angriff sammeln: in der Leber. Dort nisten sich die Parasiten in den Zellen ein, vermehren sich in ihnen und verändern ihre Form so, dass sie wiederum in das Blutgefäßsystem abgegeben und rote Blutzellen befallen können. Erst dann macht sich die Malaria mit ihren typischen Krankheitszeichen bemerkbar.

Nachfolgende Untersuchungen zeigten, wie erstaunlich schnell sich die Parasiten in der Leber vermehren: Aus einem einzigen von der Mücke übertragenen Parasiten formen sich rund 20.000 komplett anders aussehende, nurmehr ein bis zwei Mikrometer kleine Parasiten. Ein einziger dieser winzigen Parasiten, der in das Blutgefäßsystem eintritt, reicht aus, um Malaria auszulösen. Bei einem infizierten Menschen können bis zu vierzig Prozent der roten Blutkörperchen von Parasiten befallen sein. Dann befinden sich in seinem Blut mehr als 10.000.000.000 Parasiten – dies entspricht ungefähr einem halben Kilogramm an parasitärer Masse. Doch schon ein Parasitenbefall von weniger als 0,1 Prozent der Blutzellen kann für den Menschen tödlich enden.

THE CALM BEFORE THE STORM

NEW APPROACHES IN THE FIGHT AGAINST MALARIA

FRIEDRICH FRISCHKNECHT

Malaria parasites undergo a complex life cycle between their mosquito vectors and their vertebrate hosts. During their roundabout journey they need to be motile at several stages, but can also be sessile for long periods. To achieve these different tasks most efficiently, the parasite adopts many different shapes. My lab is particularly interested in the parasite stage transmitted by the mosquito. We study the development of this parasite in the mosquito gut, where hundreds of parasites are formed from a single progenitor in large cysts. In this way, we found and analysed a number of proteins that are important in this process and used time-lapse microscopy to discover how the parasite egresses from the cysts.

Once liberated from the cyst, the parasite needs to enter the salivary glands of the insect before being transmitted to its host. During my postdoctoral studies my colleague Rogerio Amino and I were able to film parasites making their way through the salivary glands, being spit out by the mosquito and migrating within the skin of mice. Intriguingly, these parasites can migrate through the dermal tissue at extremely high speed, literally outrunning the cells of our immune system. The parasites eventually force their way into blood capillaries to continue their journey to the liver, where they multiply for the first time inside the human body, changing into a different form that infects red blood cells.

We are now trying to understand how the parasite manages to achieve the rapid motility necessary for these first steps of infection. To this end, we generate transgenic parasites that either lack certain genes or express modified forms of them. But we also use biophysical methods, in collaboration with colleagues from the physics department, to measure forces that parasites can produce. Finally, we have generated transgenic parasites that arrest during their development in the liver to examine their potential as experimental vaccines. ●

PROF. DR FRIEDRICH FRISCHKNECHT studied biochemistry at Freie Universität Berlin and earned his doctorate with a thesis on smallpox viruses, which he researched at the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Heidelberg. He then spent four years at the Institut Pasteur in Paris, where he began his research on malaria. Starting in 2005, Frischknecht established his research group at Heidelberg University Hospital; in 2014 he became Professor of Integrative Parasitology at the Medical Faculty's Department of Infectious Diseases. Furthermore, he is member of Heidelberg's interdisciplinary research cluster CellNetworks. The research described in the text was carried out in collaboration with doctoral students Mirko Singer, Benjamin Spreng, Dennis Klug, Johanna Kratzer, Mendi Muthinja, Catherine Moreau and Katharina Quadt, as well as postdoc Dr Ross Douglas, Prof. Dr. Joachim Spatz of Heidelberg's Institute for Physical Chemistry, Prof. Dr. Ulrich Schwarz of Heidelberg's Institute for Theoretical Physics and Prof. Dr. Rogerio Amino of the Institut Pasteur, Paris.

Contact: freddy.frischknecht@med.uni-heidelberg.de

“If we can restrict the parasites’ motility, we can prevent them from continuing their life cycle and triggering malaria.”

„Bis zu vierzig Prozent der roten Blutkörperchen eines infizierten Menschen können von Malaria-Parasiten befallen sein. Dann befinden sich in seinem Blut mehr als 10.000.000.000 Parasiten – dies entspricht ungefähr einem halben Kilogramm an parasitärer Masse.“

Solange der Parasit in der Leber verweilt, spüren die infizierten Personen keine Zeichen der Erkrankung. Auch dieses klinisch noch unauffällige „Leberstadium“ ist ein hochinteressantes und vielversprechendes Forschungsfeld. Es ist beispielsweise möglich, die Parasiten mittels Bestrahlung, Chemotherapie oder genetischer Manipulation so zu verändern, dass sie sich in der Leber nicht vollständig entwickeln und somit nicht in den Blutkreislauf gelangen können. Derart abgeschwächte Parasiten werden zurzeit weltweit als experimentelle Impfstoffe

getestet. Uns ist es kürzlich gelungen, mit einem gezielten Schnitt in das Erbgut des Parasiten nicht nur zwei oder drei, sondern über hundert seiner Gene auszuschalten. Das Ziel unserer künftigen Forschungsarbeiten ist es, zu prüfen, ob geschwächte Parasiten eingesetzt werden können, um gegen Malaria wirksam impfen zu können. ●