# Analyse des subzellulären Proteinrepertoires von intraerythrocytären Stadien des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* (WELCH 1897)

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg

> Vorgelegt von Christoph Gelhaus aus Vechta

Würzburg, 2003

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg auf Antrag von Herrn Professor Dr. M. LEIPPE

Weitere Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. R. D. WALTER

Tag der Disputation: 24. Januar 2003

Hamburg, den 07. Januar 2003



llos his

Professor Dr. U. Wienand Dekan

1	Ein	LEITUN	G	1
	1.1	Lebens	szyklus von <i>P. falciparum</i>	1
	1.2	Die Inv	vasion von Erythrocyten durch Merozoiten	3
	1.2.	1 Die R	hoptrien von P. falciparum	5
	1.2.	2 Die Pi	roteine der Micronemen	7
	1.2.	3 Die <i>D</i>	ense Granules	8
	1.3	Die pa	rasitophore Vakuolen-Membran	9
	1.3.	1 Die P	VM und der Stofftransport	10
	1.3.	2 Die P	VM und die Evasion von Merozoiten	12
	1.4	Proteo	mics	14
	1.5	Zielset	zung	17
2	Ma	terial u	nd Methoden	18
	2.1	Materi	al	18
	2.1.	1 Reage	enzien	18
	2.1.	2 Allgei	meine Pufferlösungen	21
	2.1.	3 Immu	noreagenzien und Konjugate	21
	2.1.	4 Geräte	e und sonstiges Verbrauchsmaterial	23
	2.2	Metho	den	25
	2.2.	1 Führu	ng einer Plasmodium falciparum-Kultur	25
	2	.2.1.1	Medien, Erythrocyten und Lösungen:	25
	2	.2.1.2	In vitro-Kultivierung von P. falciparum	26
	2	.2.1.3	Einfrieren von Plasmodien	27
	2	.2.1.4	Auftauen von Plasmodien	27
	2	.2.1.5	Synchronisation der Parasitenstadien mit L-Alanin	28
	2	.2.1.6	Synchronisation der Parasitenstadien mit D-Sorbitol	29
	2.2.	2 Präpa	ration von Rhoptrien aus Plasmodium falciparum	29
	2	.2.2.1	Präparation von Schizonten-infizierten iRBCs	29
	2	.2.2.2	Aufschluß von Schizonten-infizierten Erythrocyten mittels Stickstoff-	
			Druckkammer und subzelluläre Fraktionierung über eine Dichtegradienten-	
			Zentrifugation	30

2.2.3 Isolierung von PEMS (Parasitophorous Vacuolar Membrane-Enclosed Merozoite					
Struct	Structures)				
2.2.4 Präpa	ration der Parasitophoren Vakuolen-Membran (PVM)	34			
2.2.5 Behan	ndlung von intraerythrocytären Stadien von P. falciparum mit einem				
biotin	yliertem Aziridin-2,3-Dicarbonsäure-Derivat	36			
2.2.6 Elekt	ronenmikroskopie	36			
2.2.6.1	Herstellung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie	37			
2.2.6.2	Immun-Elektronenmikroskopie (IEM)	38			
2.2.6.3	Negativ-Färbung von resuspendierten Partikeln	39			
2.2.7 Immu	Influoreszenzmikroskopie	39			
2.2.8 SDS-	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41			
2.2.9 Zwei	dimensionale Polacrylamid-Gelelektrophorese	43			
2.2.9.1	Die erste Dimension (Isolelektrische Fokussierung)	44			
2.2.9.2	Solubilisierung von Proteinen für die erste Dimension	44			
2.2.9.3	Die erste Dimension	45			
2.2.9.4	Äquilibrieren des IEF-Gelstreifens für die zweite Dimension	46			
	-				
2.2.9.5	Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAC	θE)			
2.2.9.5	Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAG	θE) 47			
2.2.9.5 2.2.9.6 B	Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAC	iE) 47 ib.48			
2.2.9.5 2.2.9.6 B 2.2.10 Prot	Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAC Gesonderheiten bei der Durchführung der 2-D PAGE im präparativen Maßsta ein-Färbung mit Silbernitrat	iE) 47 ib.48 48			
2.2.9.5 2.2.9.6 B 2.2.10 Prot 2.2.11 Prot	Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAC Besonderheiten bei der Durchführung der 2-D PAGE im präparativen Maßsta ein-Färbung mit Silbernitrat einfärbung mit kolloidalem Coomassie-Brillant-Blue G-250	6E) 47 10.48 48 48			
2.2.9.5 2.2.9.6 B 2.2.10 Prot 2.2.11 Prot 2.2.11.1	Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAC Besonderheiten bei der Durchführung der 2-D PAGE im präparativen Maßsta ein-Färbung mit Silbernitrat einfärbung mit kolloidalem Coomassie-Brillant-Blue G-250 Untersuchung zur stadienspezifischen Expression von Proteinen in <i>P</i> .	iE) 47 ib.48 48 48			
2.2.9.5 2.2.9.6 B 2.2.10 Prot 2.2.11 Prot 2.2.11.1	Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAC Gesonderheiten bei der Durchführung der 2-D PAGE im präparativen Maßsta ein-Färbung mit Silbernitrat einfärbung mit kolloidalem Coomassie-Brillant-Blue G-250 Untersuchung zur stadienspezifischen Expression von Proteinen in <i>P.</i> <i>falciparum</i>	iE) 47 ib.48 48 49 49			
2.2.9.5 2.2.9.6 B 2.2.10 Prot 2.2.11 Prot 2.2.11.1 2.2.12 Wes	Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAC Gesonderheiten bei der Durchführung der 2-D PAGE im präparativen Maßsta ein-Färbung mit Silbernitrat einfärbung mit kolloidalem Coomassie-Brillant-Blue G-250 Untersuchung zur stadienspezifischen Expression von Proteinen in <i>P.</i> <i>falciparum</i> <i>tern-Blotting</i> : Transfer von Proteinen auf eine Membran	iE) 47 ib.48 48 49 49 49 50			
2.2.9.5 2.2.9.6 B 2.2.10 Prot 2.2.11 Prot 2.2.11.1 2.2.12 Wes 2.2.13 Imm	Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAC Gesonderheiten bei der Durchführung der 2-D PAGE im präparativen Maßsta ein-Färbung mit Silbernitrat einfärbung mit kolloidalem Coomassie-Brillant-Blue G-250 Untersuchung zur stadienspezifischen Expression von Proteinen in <i>P.</i> <i>falciparum</i> <i>tern-Blotting</i> : Transfer von Proteinen auf eine Membran	iE) i 47 ib . 48 48 49 49 50 50			
2.2.9.5 2.2.9.6 B 2.2.10 Prot 2.2.11 Prot 2.2.11.1 2.2.12 Wes 2.2.13 Imm 2.2.14 Mas	Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAC Gesonderheiten bei der Durchführung der 2-D PAGE im präparativen Maßsta ein-Färbung mit Silbernitrat einfärbung mit kolloidalem Coomassie-Brillant-Blue G-250 Untersuchung zur stadienspezifischen Expression von Proteinen in <i>P.</i> <i>falciparum</i> <i>tern-Blotting</i> : Transfer von Proteinen auf eine Membran nunologischer Nachweis von Proteinen auf einer PVDF-Membran	iE) i 47 ib . 48 i 48 i 49 i 50 i 50 i 51			
2.2.9.5 2.2.9.6 B 2.2.10 Prot 2.2.11 Prot 2.2.11 I 2.2.12 Wes 2.2.13 Imm 2.2.14 Mas 2.2.14.1	Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAC Besonderheiten bei der Durchführung der 2-D PAGE im präparativen Maßsta ein-Färbung mit Silbernitrat einfärbung mit kolloidalem Coomassie-Brillant-Blue G-250 Untersuchung zur stadienspezifischen Expression von Proteinen in <i>P.</i> <i>falciparum</i> <i>tern-Blotting</i> : Transfer von Proteinen auf eine Membran nunologischer Nachweis von Proteinen auf einer PVDF-Membran ssenspektrometrie	iE) ib. 47 ib. 48 48 49 50 51 51			
2.2.9.5 2.2.9.6 B 2.2.10 Prot 2.2.11 Prot 2.2.11 Ves 2.2.12 Wes 2.2.13 Imm 2.2.14 Mas 2.2.14.1 2.2.14.2	Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAG Besonderheiten bei der Durchführung der 2-D PAGE im präparativen Maßsta ein-Färbung mit Silbernitrat	iE) ib . 47 ib . 48 48 49 50 51 51 52			
2.2.9.5 2.2.9.6 B 2.2.10 Prot 2.2.11 Prot 2.2.11 Prot 2.2.12 Wes 2.2.13 Imm 2.2.14 Mas 2.2.14.1 2.2.14.2 2.2.14.3	Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAC Besonderheiten bei der Durchführung der 2-D PAGE im präparativen Maßsta ein-Färbung mit Silbernitrat	iE) ib . 47 ib . 48 48 49 50 51 51 52			
2.2.9.5 2.2.9.6 B 2.2.10 Prot 2.2.11 Prot 2.2.11 Prot 2.2.12 Wes 2.2.13 Imm 2.2.14 Mas 2.2.14.1 2.2.14.2 2.2.14.3	Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAC Besonderheiten bei der Durchführung der 2-D PAGE im präparativen Maßsta ein-Färbung mit Silbernitrat	iE) ib . 47 ib . 48 48 49 50 51 51 52 53			
2.2.9.5 2.2.9.6 B 2.2.10 Prot 2.2.11 Prot 2.2.11 Prot 2.2.12 Wes 2.2.13 Imm 2.2.14 Mas 2.2.14.1 2.2.14.2 2.2.14.3 2.2.14.4	Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAC Gesonderheiten bei der Durchführung der 2-D PAGE im präparativen Maßsta ein-Färbung mit Silbernitrat	iE) ib . 47 ib . 48 48 49 50 51 51 52 53 53			

3	E	CRGEBNISSE	55
	3.1	Präparation von maturen Parasitenstadien	55
	3.2	Etablierung der 2-D PAGE für P. falciparum	57
	3	.2.1 Untersuchungen zur Effizienz der Proteinextraktion	57
	3	.2.2 Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der 2-D PAGE	60
	3.3	Isolierung von Rhoptrien aus P. falciparum	62
	3.4	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen	68
	3.5	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen nach subzellulärer Fraktionierung	
		infizierter Erythrocyten	75
	3.6	Sequentielle Extraktion von Proteinen aus Schizontenstadien von P. falciparum	86
	3.7	Extraktion von Proteinen durch Temperatur-abhängige Phasentrennung	93
	3.8	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen nach hochauflösender 2-D PAGE.	97
	3.9	Gesamtbetrachtung der massenspektrometrischen Untersuchungen	101
	3.10	Die Identifizierung von Proteinen des Rhoptrien-Mastergels	105
	3.11	1 Stadienspezifische Expression von Proteinen	106
	3.12	2 Untersuchungen zum <i>Histo-Aspartic Protein</i> (HAP)	110
	3.13	3 Isolierung von PEMS	112
	3.14	Präparation der parasitophoren Vakuolen-Membran	122
	3.15	5 Der Effekt des Biotin-markierten Aziridin-2,3-dicarbonsäure-Derivates auf	
		erythrocytäre Stadien von P. falciparum	126
4	D	Diskussion	134
	4.1	Die Präparation von Rhoptrien aus P. falciparum	135
	4	.1.1 Die massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen	137
	4	.1.2 Kontamination oder Organellen-assoziierte Proteine?	140
	4	.1.3 Proteine der parasitophoren Vakuole und der Merozoiten-Plasmamembran	141
	4	.1.4 Der schmale Grat	143
	4	.1.5 Das Histo-Aspartic Protein (HAP)	144
	4	.1.6 Die hypothetischen Proteine des Mastergels	146
	4.2	Die Isolierung von Parasitophorous Vacuolar Membrane-Enclosed Merozoite	
		Structures (PEMS)	148
	4.3	Die Präparation der PVM	151

	4.4	Der Effekt des Biotin-markierten Aziridin-2,3-dicarbonsäure-Derivates auf	
		erythrocytäre Stadien von P. falciparum	153
5	Zus	AMMENFASSUNG	158
6	LIT	ERATUR	161
D	ANKSA	GUNG	175
L	EBENSI	AUF	176

# Abkürzungsverzeichnis

2-D	zwei-dimensional
2-D PAGE	Zwei-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Gramm Substanz in 100 ml Lösung
% C	Verhältnis von % T (s. u.) zu N,N'-Methylenbisacrylamid in Lösung
	(ausgedrückt in %(w/v)).
% T	Prozentualer Anteil (w/v) an Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid
	in Lösung
Abb.	Abbildung
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACHC	α-Cyano-3-Hydroxy-Zimtsäure
AMS	Ammoniumsulfat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxosulfat
A <sup>RH+</sup>	Blutgruppe A, Rhesus positiv
ASB-14	Amidosulfobetain-14; Tetradecanoylamido-propyl-dimethyl-ammonio-
	propansulfonat
ASB-16	Amidosulfobetain-16; Hexadecanoylamido-propyl-dimethyl-ammonio-
	propansulfonat
bADS	1-[6-(+)-Biotinylamino]-caproyl-aziridin-2,3-dicarboxylsäure-
	dibenzylester
BCA	Bichinoninsäure (bichinonic acid)
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CBB G-250	Coomassie Brillant Blue G-250
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat

Cy3	Indocarbocyanin
Da	Dalton, relative Molmasse
DB	Zellaufschluß-Puffer (disruption buffer)
DMF	Dimethylformamid
dpi	Dots per inch
DTT	1,4-Dithio-L-Threitol
E64	L-Transepoxy-succinyl-leucylamido-(4-guanidino)butan
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	einfache Gravitationsbeschleunigung
GA	Glutardialdehyd für Elektronenmikroskopie, 25 %, vacuum-
	destilliert
HAP	histo-aspartic proteinase (GenBank Accession Nr. CAB40630)
НСТ	Hämatokrit; Volumenprozent Erythrocyten in einer Suspension
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan-sulfonsäure Natriumsalz
Hoechst 33258	2'-[4-Hydroxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-
	Benzimidazol
HRP	Peroxidase, aus Meerrettich isoliert (horse raddish peroxidase)
IAA	Iodacetamid
IEM	Immuno-Transmissions-Elektronenmikroskopie
IFA	Immuno-Fluoreszenzmikroskopie
IgG	Immunglobulin G
IPG	Immobilisierter pH-Gradient (immobilized pH gradient)
iRBC	Erythrocyt, der mit Stadien von Plasmodium falciparum infiziert
	ist (infected red blood cell); Plural: iRBCs (infected red blood
	cells)
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanine
mAb	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass
	Spectrometry

MeOH	Methanol			
Mes	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure			
MWCO	Molekulare Ausschlußgröße in Da (molecular weight cut off)			
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium; 2,2'-Di-p-nitrophenyl-5,5'-diphenyl-3,3'-			
	[3,3'-Dimethoxy-4,4'-diphenylen]-ditetrazoliumchlorid			
NHS	N-(Hydroxyl)-succinimid			
Р	Sediment (Pellet)			
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese			
PBS	Phosphate buffered saline (physiologischer Phosphatpuffer)			
PEMS	Parasitophorous Vacuolar Membrane Enclosed Merozoite Structure ;			
	Extraerythrocytäre Segmenterstadien von P. falciparum; die entwickelten			
	Merozoiten befinden sich in einem Verband, der durch die PVM umgeben			
	ist. Erythrocytäre Membranen sind nicht vorhanden (Salmon et al.,			
	2001).			
PFA	Paraformaldehyd			
PMF	Peptide mass fingerprint			
PTA	Phosphor-Wolfram-Säure (Phosphorous Tungsten Acid)			
PVDF	Polyvinylidendifluorid			
PVM	Parasitophore Vakuolen-Membran (parasitophorous vacuolar membrane)			
Rab	Kaninchen (rabbit)			
RBC	Erythrocyt(en) (red blood cell(s))			
red	reduzierende Bedingungen			
rpm	Umdrehungen in der Minute (rounds per minute)			
RT	Raumtemperatur			
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (sodium dodecylsulphate)			
SNT	Überstand (supernatant)			
TBS	Tris-buffered saline (Tris-Puffer mit Kochsalz, physiologische			
	Osmolarität)			
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie			
TEMED	N,N-N.N-Tetramethylethylendiamid			
Tricin	N-(2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycin			

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
Triton X-100	Polyoxyethylen-(10)-isooctylphenylether
Triton X-114	Polyoxyethylen-(8)-isooctylphenylether
TTBS	TBS mit 0,05 %(v/v) Tween 20
Tween 20	Polyoxyethylene(20)-Sorbitan-Monolaurate
β-MSH	β-Mercaptoethanol

# 1 Einleitung

Plasmodien gehören zu den Protozoa und sind den Apikomplexa zuzuordnen.

Alle Mitglieder dieses Stammes sind obligate Endoparasiten. Es gibt vier verschiedene Arten von Plasmodien, die den Menschen befallen, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* und *P. falciparum*, von denen *Plasmodium falciparum* der medizinisch relevanteste ist. *P. falciparum* ist im Menschen Erreger der Malaria tropica, die in den Gebieten der Tropen und der Subtropen eine permanente Gefährdung darstellt. Etwa 40 % der Weltbevölkerung sind von der Malaria bedroht und es fallen ihr jährlich ca. 2,7 Millionen Menschen zum Opfer, vornehmlich Kinder unter fünf Jahren (Breman, 2001).

Neben den Plasmodien gehören auch andere den Menschen befallende Parasiten wie die Mitglieder der Gattungen *Toxoplasma* und *Cryptosporidium* zu den Apikomplexa. In diesem Stamm finden sich auch Parasiten von Rindern, wie *Theileria* und *Babesia*, oder Parasiten von Geflügel wie *Eimeria*.

#### 1.1 Lebenszyklus von *P. falciparum*

*P. falciparum* durchläuft einen komplexen Lebenszyklus und wird durch die weiblichen Mücken der Gattung *Anopheles* auf den Menschen übertragen. Aus der Speicheldrüse der infizierten Mücke gelangen Sporozoiten in die Blutbahn, über die sie sehr schnell die Leber erreichen. Dort werden schließlich Hepatocyten befallen, in denen durch asexuelle Vermehrung Tausende von Merozoiten entstehen, ohne Krankheitsymptome zu verursachen. Im Gegensatz zu der Situation bei *P. falciparum* können bei *P. vivax* und *P. ovale* auch sogenannte Hypnozoiten entstehen, die als Dauerformen in der Leber bleiben und sich erst bis zu 2 Jahre später zu Schizonten entwickeln, die dann erst die Merozoiten freisetzen (Krotoski, 1989; Cogswell, 1992). Schließlich gelangen die Merozoiten durch die Zerstörung der Wirtszellen in die Blutbahn. Jeder Merozoit kann einen Erythrocyten (RBC) befallen. In der Blutbahn beginnt dann der intraerythrocytäre Zyklus. Während dessen differenziert sich der eingedrungene Merozoit innerhalb von ca. 48 Stunden. Während dieser Zeit können verschiedene Stadien mikroskopisch unterschieden werden: In den ersten 26 Stunden nach der Invasion entwickelt sich der Merozoit zu einem jungen Trophozoiten, der Ringform. Diese reift in den nachfolgenden 12 Stunden zu einem reifen Trophozoiten, der durch Schizogonie zunächst zu einem mehrkernigen Schizonten wird (ca. 38 Stunden nach der Invasion) und sich danach zu einem sogenanntem Segmenter weiterentwickelt. Im Segmenter befinden sich die neugebildeten invasiven Merozoiten, die nach ca. 48 Stunden in die Blutbahn freigesetzt werden. Bei *P. falciparum* enstehen pro invasivem Merozoit ca. 20 neue Merozoiten. Dieses zyklische Wachstum der Parasiten im Blut (erythrocytärer Zyklus) ist verantwortlich für das klinische Bild der Malaria, zu dem Fieber, Schüttelfrost, Anämien und Hypoglykämie gehören. Die Adhäsion des Parasiten an die Endothelzellen und die Rosettenbildung mit nicht-infizierten Erythrocyten in den Blutbahnen des Gehirns können zur meist tödlich verlaufenden cerebralen Malaria führen (Newbold et al., 1997).

Einige Merozoiten entwickeln sich zu Gametocyten, die durch eine saugende Mücke aufgenommen werden können und sich im Mückendarm zu männlichen und weiblichen Gameten (Mikrogameten und Makrogameten) differenzieren. Nach der Fusion der Gameten bildet sich die entstandene Zygote zu einem Ookineten um, der die Darmwand der Mücke durchdringt und sich dann zu einer Oocyste umbildet, in der die Reduktionsteilung stattfindet. Nach weiteren mitotischen Kernteilungen entstehen Sporozoiten, die über die Hämolymphe zur Speicheldrüse gelangen, von wo aus sie auf einen anderen Menschen beim Stich der Mücke übertragen werden. Der Entwicklungszyklus des Erregers ist in Abb. 1.1 schematisch dargestellt.



Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *P. falciparum* (verändert nach Sinnis und Sim, 1997).

### 1.2 Die Invasion von Erythrocyten durch Merozoiten

Ein wichtiges morphologisches Charakteristikum der Apikomplexa ist der Apikal-Komplex. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Invasion in die Wirtszellen (Sam-Yellowe, 1996) und besteht aus einer einzigartigen Organellen-Ansammlung am apikalen Ende des invasiven Parasiten, mit dem er stets zuerst in seine Witrszelle eindringt. Die Proteine des Apikal-Komplexes sollen an der Wirtszell-Erkennung, -Bindung, -Invasion und an der Bildung der parasitophoren Vakuolen-Membran (PVM) beteiligt sein, die den intraerythrocytären Parasiten umgibt. Doch ist der genaue molekulare Mechanismus der Invasion immer noch nicht aufgeklärt.

Der Apikal-Komplex besteht aus verschiedenen sekretorischen Organellen, wie den Rhoptrien, Micronemen und den *Dense Granules*. Obwohl letztere mehr im Cytoplasma verteilt sind, werden sie mit zum Apikal-Komplex gezählt. Abb 1.2 zeigt schematisch die morphologische Organisation von Organellen in einem Merozoiten von *Plasmodium*.



Abb. 1.2: Schematische Darstellung der subzellulären Organisation eines Merozoiten von *P. falciparum* (verändert nach Preiser et al., 2000).

Bei der Invasion der Merozoiten in die Erythrocyten kommt es zunächst zur Bindung des Parasiten an den Erythrocyten. Dies kann an jeder Stelle der Oberfläche des Merozoiten stattfinden und wird durch verschiedene Oberflächen-Moleküle vermittelt, obwohl auch hier die genauen Mechanismen noch nicht aufgeklärt worden sind. So sind eine Reihe von *Merozoite Surface Proteins* (MSP) beschrieben worden, die zum Teil EGF-ähnliche Domänen besitzen und so eine Protein-Protein-Interaktion vermitteln könnten (Cowman und Crabb, 2002). Auch Proteine aus apikalen Organellen werden als Kandidaten für eine Zielzell-Bindung diskutiert (Chitnis und Blackman, 2000). Als Liganden auf der Erythrocyten-Oberfläche sind Glycophorine und ein oder mehrere unbekannte Bindungspartner im Gespräch (Howard et al., 1982; Pasvol et al., 1982). Lediglich für EBA-175, ein Protein des Apikal-Komplexes, konnte eine Bindung an Sialinsäure nachgewiesen werden (Orlandi et al., 1990).

Nach der Anheftung des Parasiten an die Zielzelle orientiert sich der Merozoit auf der Erythrocyten-Oberfläche so, dass das apikale Ende zur Plasmamembran der Wirtszelle weist. Dann kommt es zur Sekretion des Micronemen- und Rhoptrien-Inhalts, und es wird eine Verbindung der Plasmamembranen von Wirt und Parasit hergestellt (*junction*). Die

Erythrocyten-Membran beginnt sich einzustülpen, und Micronemen und Rhoptrien werden vollständig entleert während der Parasit aktiv eindringt. Die Verbindung der Plasmamembranen bleibt erhalten, liegt nun ringförmig um den Merozoiten herum und wandert durch das weitere Eindringen zu seinem posterioren Ende bis sich schließlich die Plasmamembran des Wirts hinter dem Merozoiten schließt. Der Parasit liegt nun umschlossen von der parasitophoren Vakuolen-Membran in der invadierten Zelle und verbleibt in ihr bis zum Ende seiner Entwicklung (Ward et al., 1993).

#### 1.2.1 Die Rhoptrien von *P. falciparum*

Rhoptrien sind von einer einzigen Membran umgebene, paarige und flaschenförmige Organellen, die aus zwei morphologisch unterscheidbaren Bereichen bestehen, dem kugeligen bis gestreckten Rhoptrien-Körper und dem Ausführkanal, der bis zur Spitze des Merozoiten führt und über den die Rhoptrien und auch die Micronemen Material sezernieren. Ihre Länge beträgt in *P. falciparum* 300 bis 550 nm. Beide Bereiche der Rhoptrien unterscheiden sich auch in ihrem Proteinrepertoire: Während sich das sogenannte *Apical Membrane Antigen 1* (AMA-1) und der sogenannte RHOP-H-Komplex im Ausführkanal befinden, wurden Mitglieder der RAP-Familie (*Rhopty Associated Proteins*) im basalen Körper der Rhoptrien lokalisiert (Crewther et al., 1990; Sam-Yellowe et al., 1995). Der basale Körper erscheint im Elektronenmikroskop sehr elektronendicht (Bannister und Mitchell, 1989). Außerdem wurde für die Rhoptrien eine recht hohe physikalische Dichte von ca. 1,16 g/ml bestimmt (Etzion et al., 1991). Beides deutet darauf hin, dass die Rhoptrien einen hohen Proteingehalt besitzen. Obwohl die genaue Funktion der bisher identifizierten Rhoptrien-Proteine immer noch nicht geklärt ist, deuten folgende Hinweise auf eine wichtige Rolle der Rhoptrien bei der Invasion hin:

- Die Umorientierung, d. h. nach dem Binden des Merozoiten an die Oberfläche des Erythrocyten kommt es zu einer Orientierung des Parasiten, so dass der apikale Komplex direkt in die unmittelbare N\u00e4he der Wirtszellmembran kommt (Trager et al., 1992)
- Es kommt zur Sekretion des Rhoptrien-Inhaltes während des Eindringens des Parasiten (Bannister et al., 1986; Bannister und Mitchell, 1989)
- 3. Rhoptrien werden während eines jeden intraerythrocytären Zyklus *de novo* im sich entwickelnden Merozoiten gebildet (Jaikaria et al., 1993; Bannister et al., 2000).

Diese Hinweise lassen vermuten, dass die Proteine der Rhoptrien mechanistisch an der Invasion beteiligt und daher von großer Bedeutung für den Parasiten sind.

So konnte eine Inhibition der Invasion durch Antikörper gegen das Rhoptrien-Protein RAP-1 festgestellt werden (Howard et al., 1998b; Ridley et al., 1990; Schofield et al., 1986). Dies wies auf eine essentielle Funktion von RAP-1 bei der Invasion hin. Durch Transfektionsversuche gelang die teilweise Zerstörung des *rap1*-Gens, und ein Protein-Komplex aus den Rhoptrien-Proteinen RAP-1/RAP-2/RAP-3 konnte nicht mehr gebildet werden. Allerdings war dies nicht letal für den Parasiten. Dies deutet darauf hin, dass die Antikörper-Bindung an RAP-1 die Invasion aus sterischen Gründen verhinderte. RAP-1 scheint also selbst nicht essentiell für die Invasion zu sein (Baldi et al., 2000; Cowman et al., 2000).

Im Gegensatz dazu scheint ama-1 essentiell zu sein, dessen Genprodukt das Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) ist. Der Ersatz durch das strukturell homologe ama-1-Gen von P. chabaudi - einer Art, die Mäuse befällt - zeigte aber, dass die Parasiten überlebten und eine erhöhte Wirtszell-Spezifität für Erythrocyten aus der Maus aufwiesen (Triglia et al., 2000). Somit scheint zumindest ein Teil der Proteine des Apikal-Komplexes an der Wirtszell-Erkennung und -Bindung beteiligt zu sein. Neben den RAP-Proteinen und AMA-1 wurden noch weitere Proteine den Rhoptrien zugeschrieben, deren Funktion allerdings unklar ist. Dazu gehören Proteine eines bereits erwähnten hochmolekularen Komplexes, dem RHOP-H-Komplex. Er besteht aus den Proteinen RHOP-H1, -H2 und -H3 und besitzt die Fähigkeit, an die innere Schicht der Erythrocyten-Membran zu binden (Sam-Yellowe und Perkins, 1991; Sam-Yellowe et al., 1995). Vor kurzem wurde RHOP-H3 außerdem in den Strukturen der Maurer's Clefts lokalisiert (Sam-Yellowe et al., 2001). Maurer's Clefts sind elektronenmikroskopisch sichtbare Spalten im Cytosol infizierter Erythrocyten, die mit Membranen ausgekleidet sind. Sie sollen am Transport von Makromolekülen des Parasiten im infizierten RBC beteiligt sein (Behari und Haldar, 1994; Etzion und Perkins, 1989). Weitere Proteine der Rhoptrien sind die Mitglieder einer Multigen-Familie (Pf60) (Grellier et al., 1994), ein 225 kDa Protein (Roger et al., 1988) und eine Serin-Protease (Braun-Breton et al., 1988), die vermutlich das humane Bande-3 Protein verändert, um so die Invasion zu unterstützen (Roggwiller et al., 1996). Vor kurzem wurde MAEBL entdeckt, dass zu der Familie der Erythrocyten-bindenden Proteine gehört, zu denen eine Reihe anderer Proteine des Apikal-Komplexes in verschiedenen Plasmodien-Arten und auch weitere Proteine in P. falciparum gezählt werden. MAEBL wurde in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit

bereits bekannten Rhoptrien-Proteinen kolokalisiert. Außerdem sind zwei Proteine (PfRBP2-Ha, PfRBP2-Hb) im Apikal-Komplex der Merozoiten von *P. falciparum* identifiziert worden, die homolog zu den 235 kDa Rhoptrien-Proteinen aus *P. vivax* und *P. yoelii* sind und für die Wirtszell-Spezifität wichtig sein sollen. Auch bei diesen beiden Proteinen könnte es sich um Rhoptrien-Proteine handeln (Rayner et al., 2000).

#### 1.2.2 Die Proteine der Micronemen

Aus den Micronemen von P. falciparum sind weit weniger Proteine bekannt als aus den Rhoptrien. EBA-175, ein 175 kDa Erythrocyten-bindendes Protein (Sim et al., 1992) ist Mitglied der Erythrocyte-binding proteins-Familie (EBP). Zur Familie gehören auch die Duffy binding proteins (DBP) aus P. vivax und P. knowlesi. Mitglieder dieser Familie sind Transmembran-Proteine und sind durch zwei Cystein-reiche Domänen ausgezeichnet (Kappe et al., 1997). EBA-175 bindet an Sialinsäure des Glycophorin A auf Erythrocyten (Adams et al., 1992; Sim et al., 1994). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen eine dieser Regionen die Invasion von P. falciparum in vitro blockieren (Pandey et al., 2002). EBA-140 ist ein jüngst identifiziertes Protein der EBP-Familie und konnte auch in den Micronemen lokalisiert werden. Es wurde gezeigt, dass es wie EBA-175 Sialinsäure auf Erythrocyten binden kann, doch bindet es weder an Glycophorin A, B noch C (Thompson et al., 2001). Seit kurzem muss man vermutlich auch das oben erwähnte AMA-1 als Micronemen-Protein bezeichnen (Healer et al., 2002), obwohl es zuvor als Protein der Rhoptrien klassifiziert worden ist (Crewther et al., 1990; Narum und Thomas, 1994). AMA-1 ist ein Transmembran-Protein und wird umfangreich proteolytisch prozessiert (Howell et al., 2001). Die Proform mit 83 kDa wird zunächst in die Micronemen transportiert, dort zu einem 62 kDa Protein prozessiert und anschließend gelangt es in den Ausführkanal der Rhoptrien. Von dort wird es an die Oberfläche des Merozoiten gebracht, wo es noch weiter prozessiert wird und mit seiner Transmembran-Domäne über die gesamte Zelloberfläche verbreitet wird. Seine Funktion dort ist nicht geklärt (s.o.)(Howell et al., 2001).

#### 1.2.3 Die Dense Granules

Die Dense Granules besitzen wie die Rhoptrien eine hohe Dichte (1,16-1,18 g/ml), sind aber mit 80 nm deutlich kleiner (Blackman und Bannister, 2001; Trager et al., 1992). Sie sezernieren ihren Inhalt nach der Invasion eines Merozoiten, weshalb sie in Zusammenhang mit dem Aufbau und mit der Erweiterung der parasitophoren Vakuolen-Membran gebracht wurden (Torii et al., 1989; Aikawa et al., 1990; Culvenor et al., 1991). Das Ring infected Erythrocyte Surface Antigen (RESA) ist ein Dense Granule-Protein, das von Ringstadien intraerythrocytärer Parasiten über die parasitophore Vakuolen-Membran in das Wirts-Cytosol transportiert wird und vermutlich mit dem Cytoskelett der Wirtszelle interagiert (Culvenor et al., 1991). RIMA (Ring Membrane Antigen), ein 14 kDa Protein, ist nach der Invasion auf der Membran junger Ringstadien lokalisiert worden (Trager et al., 1992). Funktionell ist nichts über dieses Protein bekannt. Zwei weitere Proteine der Dense Granules sind die Subtilisinähnlichen Serin-Proteasen, PfSUB-1 und PfSUB-2. PfSUB-1 wird als 82 kDa Proform gebildet und dann in zwei Schritten autokatalytisch prozessiert, so dass schliesslich ein 47 kDa Protein entsteht, das in einer gespaltenen Form vom Merozoiten ausgeschieden wird, obwohl es nicht in frisch invadierten RBC gefunden wurde (Sajid et al., 2000). Es schien, dass PfSUB-1 für die Prozessierung von MSP-1 verantwortlich ist, einem Oberflächenprotein der Merozoiten (Blackman et al., 1998), doch ist diese Hypothese strittig (Sajid et al., 2000). Bei der maturen Form von PfSUB-1 wurde weder eine Transmembran-Domäne, noch ein GPI-Anker identifiziert, obwohl die Prozessierungsprodukte in Abwesenheit von ionischen Detergenzien unlöslich sind (Blackman et al., 1998). Daher wird vermutet, dass PfSUB-1 an Membranen oder Komponenten des Cytoskeletts bindet. Im Gegensatz dazu besitzt PfSUB-2 eine Transmembran-Domäne. Auch PfSUB-2 wird proteolytisch prozessiert (Hackett et al., 1999), und auch hier wurde vorgeschlagen, dass das Prozessierungsprodukt MSP-1 spalten kann (Barale et al., 1999). Wie oben erwähnt, sezernieren die Dense Granules ihren Inhalt in einer späten Phase der Invasion und scheinen demnach an der Bildung der parasitophoren Vakuolen-Membran beteiligt zu sein. MSP-1 ist wichtig für die frühen Schritte der Invasion (Holder und Freeman, 1984; Holder et al., 1985a) und muss daher vor der Freisetzung der Merozoiten und der nächsten Invasion prozessiert werden. Daher scheint es einen Widerspruch zu geben zwischen dem Zeitpunkt der Sekretion des Inhaltes der Dense Granules und der Prozessierung von MSP-1. Es gibt Hinweise durch Untersuchungen bei

*Cryptosporidium*, dass die *Dense Granules* in mehrere Subpopulationen mit unterschiedlicher Protein-Ausstattung unterteilt sind, so dass auch die Sekretion deren Inhalte zeitlich unterschiedlich sein könnte (Bonnin et al., 1995). Für diese interessante Hypothese fehlen bei *Plasmodium* allerdings experimentelle Beweise.

#### 1.3 Die parasitophore Vakuolen-Membran

Während der Invasion in humane Erythrocyten initiiert *P. falciparum* die Bildung der parasitophoren Vakuolen-Membran (PVM), die während der gesamten Runde eines Infektionszyklus ein einzigartiges Kompartiment umschließt, die parasitophore Vakuole (PV). In ihr differenziert sich der eingedrungene Parasit bis zur nächsten Freisetzung von Merozoiten. Proteine von apikalen Organellen wie Rhoptrien sollen an der Biogenese, der Erhaltung und der Ausbreitung der PVM beteiligt sein (Lingelbach und Joiner, 1998). Die molekularen Grundlagen dafür und für die Ruptur der PVM beim Freisetzen neugebildeter Merozoiten (Evasion) sind weitestgehend unklar.

Für die Bildung der PVM werden Proteine der Wirtsmembran ausgeschlossen (Atkinson et al., 1988), doch scheint der größte Teil der Lipide zum Aufbau der PVM von der Wirtszelle zu stammen. Weder die Lipid- noch die Protein-Zusammensetzung der PVM konnten bis dato genau analysiert werden. In den Rhoptrien wurden neben den oben aufgeführten Proteinen auch Lipid-Komponenten nachgewiesen, wie in einer elektronenmikroskopischen Arbeit über P. knowlesi beschrieben wurde (Bannister et al., 1986). Es wurde postuliert, dass diese Lipide die parasitophore Vakuolen-Membran beim Eindringen des Parasiten bilden, doch scheint es eher so zu sein, dass der größte Anteil der Lipide der PVM aus der Erythrocyten-Membran stammt und lediglich ein kleinerer Teil (ca. 20 %) vom Parasiten geliefert wird (Lingelbach und Joiner, 1998). Die Micronemen sezernieren ihren Inhalt schon in einer sehr frühen Phase der Invasion und scheinen nicht für die PVM-Bildung zuständig zu sein, da die sezernierten Proteine wohl eher der Wirtszell-Spezifität des Parasiten dienen (Adams et al., 2001; Kappe et al., 1997; Peterson et al., 1995). In der späten Phase der Invasion sezernieren die Dense Granules ihre Proteine in den Spalt zwischen der sich bildenden PVM und der Parasiten-Plasmamembran, doch ist ihr Anteil bei der PVM-Bildung nicht bekannt (Preiser et al., 2000). Während der Entwicklung des Parasiten innerhalb des Erythrocyten dehnt sich die PVM im Wirtscytosol aus und bildet ein Netzwerk, das als Tubovesikulares Netzwerk bezeichnet wird (TVN; Elmendorf und Haldar, 1994). Die Quelle der Lipide, die zur Bildung des TVN notwendig sind, sowie die Kontrolle und der Auslöser des TVN-Aufbaus sind im Detail unbekannt. Weder können Erythrocyten aktiv externes Medium aufnehmen, noch besitzen sie die molekulare Ausstattung zur Lipid-Synthese. Daher muss der Parasit selbst dafür verantwortlich sein, die nötigen Komponenten zur TVN-Bildung beizusteuern. Allerdings wurden bisher keine experimentellen Belege dafür geliefert (Lingelbach und Joiner, 1998). Es wurde unlängst berichtet, dass der intrazelluläre Parasit sogenannte Rafts in die PVM aufnimmt (Lauer et al., 2000; Haldar et al., 2002). Rafts zeichnen sich durch einen hohen Cholesterol- und Sphingomyelin-Gehalt aus und stellen Microdomänen aus Lipid und Protein in der Doppellipid-Schicht der Plasmamembran dar (Simons und Ikonen, 1997; Brown und London, 1998). RBC-Rafts sollen als Lipidquelle für die PVM dienen und damit eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der PVM spielen. Es wurde sogar im Gegensatz zu älteren Untersuchungen (s. o.) von der Aufnahme einiger erythrocytärer Membranproteine berichtet, die Rafts-assoziiert sind und in die PVM/TVN integriert werden, wo sie zuvor noch nicht lokalisiert worden waren (Lauer et al., 2000). Der Hauptanteil der Proteine der Erythrocyten-Plasmamembran konnte allerdings weder im TVN noch in der PVM nachgewiesen werden. Es ist derzeit nicht bewiesen, wie Lipide zum Parasiten gelangen (Haldar et al., 2002). Auch sollen Rafts eine wichtige Rolle bei der Invagination der Erythrocyten-Membran während der Invasion der Merozoiten spielen (Haldar et al., 2002).

#### 1.3.1 Die PVM und der Stofftransport

Die genauen Abläufe des Transports von Makromolekülen und anderen Stoffen über die PVM sind wenig charakterisiert. So ist nicht bekannt, wie z. B. das TVN den Stofftransport in den Erythrocyten und in den Parasiten organisiert. Zunächst favorisierte eine Hypothese, die inzwischen widerlegt ist, einen sog. "Parasitophoren Ductus" (Pouvelle et al., 1991; Ginsburg, 1994). Bei diesem Modell sollte das TVN an die RBC-Membran reichen mit ihr fusionieren und einen direkten Kontakt über einen nichtselektiven Kanal zum extrazellulären Medium ausbilden. Lauer et al. (1997) schlugen dagegen vor, dass das TVN bis zu der Plasmamembran des infizierten Erythrocyten reichen könnte. Eine Verbindung von TVN und RBC-Plasmamembran könnte zur Bildung eines molekularen Siebes führen, das Nährstoffe durchläßt, die der Versorgung des Parasiten dienen. Desai und Kollegen fanden durch Patch-Clamp-Versuche und durch Experimente mit planaren Lipid-Doppelschichten eine Pore in der

PVM, die Moleküle bis zu einer molekularen Masse von 1300 Da zum Parasiten passieren läßt (Desai et al., 1993). Diese Pore soll von einem abundanten Protein der PVM gebildet werden, ist aber auf molekularer Ebene weder charakterisiert noch identifiziert. Ebenso wurde von Desai et al. ein Kanal in der Plasmamembran von infizierten Erythrocyten gefunden, der zusammen mit der Pore in der PVM für die Versorgung des Parasiten mit einer Vielzahl von extrazellulären Nährstoffen (z. B. Aminosäuren, Zuckerverbindungen, Purine, Cholin etc.) verantwortlich sein soll (Desai et al., 2000). Es ist nicht bekannt, ob dieser Kanal durch exportierte Parasiten-Proteine gebildet wird oder durch modifizierte Proteine der Wirtszelle.

Auf der anderen Seite werden auch Parasiten-Proteine über die Parasiten-Plasmamembran und die PVM in das Wirtszell-Cytosol und an die bzw. in die RBC-Plasmamembran tranportiert (Bianco et al., 1987; Aikawa et al., 1990; Culvenor et al., 1991; Gormley et al., 1992; Pasloske et al., 1993; Benting et al., 1994a/b; Pouvelle et al., 1994; Albano et al., 1999). Einige von diesen exportierten Proteinen modifizieren die biochemischen und morphologischen Eigenschaften der RBC-Membran (Deitsch und Wellems, 1996). Die Transport-Mechanismen für diese Proteine sind noch nicht aufgeklärt. Ein Model favorisiert einen Vesikel-vermittelten Protein-Transport in das Wirts-Cytoplasma und an die RBC-Plasmamembran (Taraschi et al., 2001).

Zwei Proteine sollen vom Parasiten in die PVM transportiert werden, für die ein vesikularer Transport vorgeschlagen worden ist: EXP-1 wird als Transmembran-Protein synthetisiert (Günther et al., 1991) und EXP-2 wurde als PVM-assoziiertes Protein beschrieben (Johnson et al., 1994). Ihre biologische Rolle und der wirkliche Transport-Mechanismus zur PVM ist unbekannt. Bisher wurden noch keine Transport-Vesikel in der PV beobachtet (Lingelbach und Joiner, 1998).

Die Proplasmepsine sollen über das ER in die PV und an die Parasiten-Plasmamembran exportiert werden. Von dort sollen sie im Bereich des Cytostoms akkumulieren und in Nahrungsvesikeln zusammen mit dem Hämoglobin des Wirts zur Nahrungsvakuole transportiert werden (Francis et al., 1997). Des weiteren wurde auch der Transport von Proteinen des Apicoplasten über die PV beschrieben (Waller et al., 2000). Somit stellt die PV und damit auch die PVM wahrscheinlich eine wichtige "Schaltstelle" zur Sortierung, zum Export und zur Aufnahme von Proteinen für den Parasiten dar.

### 1.3.2 Die PVM und die Evasion von Merozoiten

Die unzureichende Charakterisierung der molekularen Zusammensetzung der PVM liegt sicherlich an technischen Problemen, die bei der Isolierung dieser Membran auftreten. Salmon et al. (2001) haben in jüngster Zeit einen Ansatz aufgezeigt, der diese Problem lösen könnte. Nach der Reifung des Parasiten innerhalb der Wirtszelle werden die Merozoiten freigesetzt, um eine neue Wirtszelle zu befallen. Dabei müssen sie sich von der Plasmamembran der Wirtszelle und der PVM befreien. Vor der Merozoiten-Freisetzung wurden infizierte RBC mit dem Cystein-Protease-Inhibitor E64 inkubiert (Salmon et al., 2001). Als Folge wurden die Merozoiten nicht als einzelne Zellen freigesetzt, sondern sie blieben auch nach dem Verlassen der Wirtszelle zusammen. Diese Assoziation von Merozoiten blieb erhalten, da diese Merozoiten von der PVM umgeben waren. Derartige Strukturen wurden daher als Parasitophorous Vacuolar Membrane-Enclosed Merozoite Structure (PEMS) bezeichnet. Es wurde vorgeschlagen, dass eine oder mehrere Cystein-Proteasen an der Freisetzung von Merozoiten durch Destabilisierung der PVM beteiligt sind. Dies gab Anlaß zur Diskussion über verschiedene Theorien zur Evasion der Merozoiten (Lew, 2001). Aus ihren Ergebnissen schlossen Salmon et al. (2001), dass die Bildung der PEMS ein natürlich vorkommendes Ereignis ist und durch Inhibition von Cystein-Proteasen mit E64 die Freisetzung der Merozoiten aus den PEMS verhindert wird. Sie wird nur verzögert, wenn nach der PEMS-Bildung das E64 wieder entfernt wird. Eine alternative Theorie zur Evasion von Merozoiten beschreibt die nicht-explosionsartige Ruptur der Erythrocyten-Membran in Folge der Verschmelzung von PVM und der RBC-Plasmamembran (Clavijo et al., 1998; Winograd et al., 1999). In diesem Fall kann es kein Freisetzen von PVM-umschlossenen Merozoiten geben.

In Abb. 1.3 sind die beiden Modelle zusammenfassend dargestellt. Salmon et al. (2001) beschrieben, dass die PEMS lebensfähige, invasive Merozoiten enthalten. Über die Natur des Zielproteins des E64 ist bislang nichts bekannt. Allerdings wurde angenommen, dass SERA (*Serine Rich Antigen*) und seine Homologen dafür in Frage kommen und am Prozess der Evasion und vielleicht auch an der Invasion der Merozoiten beteiligt sind (Delplace et al., 1987; Knapp et al., 1991; Gor et al., 1998; Blackman, 2000).



Abb. 1.3: Schematische Darstellung, die zwei Modelle zur Freisetzung von Merozoiten aus einem infizierten RBC beschreibt. Unter natürlichen Bedingungen (1) werden die Merozoiten nach dem Modell von Winograd et al. (1999) freigesetzt, nachdem RBC-Membran und PVM fusioniert sind. In (2) ist das Evasions-Modell gemäß Salmon et al. (2001) dargestellt. In Gegenwart von E64 und/oder unter natürlichen Bedingungen erfolgt die Evasion nach der Bildung von PEMS.

Abschließend läßt sich sagen, dass nur wenig über die makromolekulare Struktur der PVM bekannt ist (Salmon et al., 2001). Ebenso sind die Rolle der apikalen Organellen für die Bildung der PVM sowie der Mechanismus ihrer Expansion und die daran beteiligten Proteine nicht bekannt. In Zukunft wird es von Interesse sein, das Wissen über die PV zu vervollständigen und das gesamte Repertoire an Proteinen dieses einzigartigen Kompartimentes zu analysieren (Lingelbach und Joiner, 1998).

#### 1.4 **Proteomics**

Aufgrund der Bedeutung von *P. falciparum* als Erreger der Malaria tropica wurde 1996 ein Genom-Projekt für den Parasiten initiiert. Im Oktober 2002 wurde die Genom-Sequenz für den 3D7-Klon veröffentlicht. Es wurde berichtet, dass das Genom aus 23 Megabasen, verteilt auf 14 Chromosomen, besteht und es soll für ca. 5300 Gene codieren (Gardner et al., 2002). Es können auch die bisher annotierten und vorhergesagten Genprodukte für Datenbank-Suchen verwandt werden. Bei ca. 60 % der vorhergesagten Genprodukte konnte keine signifikante Ähnlichkeit zu Proteinen anderer Organismen gefunden werden. Diese Genprodukte wurden daher zunächst als "hypothetische Proteine" bezeichnet. Insgesamt 31 % der vorhergesagten Genprodukte haben eine oder mehrere Transmembran-Domänen und bei ca. 17 % kann ein Signalpeptid angenommen werden (Gardner et al., 2002).

Umfangreiche Genom-Daten sind nun verfügbar und können für die Untersuchung des Parasiten-Proteoms genutzt werden.

Der Begriff "Proteom" umfaßt alle Proteine einer Zelle, die nach den Vorgaben deren Genoms produziert werden (Wilkins et al., 1996). Techniken, die zur Darstellung und Analyse des Proteomes dienen, werden unter dem Sammelbegriff "*Proteomics*" vereint. Proteomics kann in zwei Bereiche unterteilt werden:

- "*Expression Proteomics*" bezieht sich auf die gesamte Protein-Ausstattung einer Zelle oder eines Gewebes. So können mit Hilfe von *Expression Proteomics* Stoffwechselwege untersucht werden, der Einfluß von Medikamenten-Applikationen analysiert oder Unterschiede zwischen kranken und gesunden Geweben verglichen werden.
- "Cell Map Proteomics" befasst sich mit der Protein-Zusammensetzung von räumlich abgetrennten Bereichen einer Zelle oder funktionellen Einheiten wie z. B. eines Organells oder eines Protein-Komplexes in einer Zelle (Blackstock und Weir, 1999).

Um die zellulären Funktionen von Proteinen von *P. falciparum* besser verstehen zu können, wurde die Proteom-Analyse schon seit längerem als geeignete Methode angesehen (Ashton et al., 2001; Bhasin, 2000; Cowman, 2001). Zeitgleich mit der Veröffentlichung der Genom-Daten wurden auch zwei Arbeiten publiziert, in denen das Proteom von *P. falciparum* untersucht wurde (Florens et al., 2002; Lasonder et al., 2002). In den umfassenden Analysen wurden sexuelle und asexuelle Stadien bezüglich ihrer Genprodukte verglichen. Lasonder und Kollegen integrierten eine Vorfraktionierung der Proteine aus den Parasitenstadien. Sie

extrahierten die Proteine differentiell und analysierten die einzelnen Fraktionen. Zusätzlich trennten sie die Proteine der Fraktionen vor der Analyse nach ihren molekularen Massen auf. Florens et al. (2002) beschränkten sich auf die Fraktionierung entsprechend der Löslichkeit der Proteine. In dieser Arbeit wurden 2415 Parasiten-Proteine durch die *Multidimensional Protein Identification Technology* (MudPIT; Washburn et al., 2001) unter Verwendung massenspektrometrischer Techniken identifiziert. Von diesen waren 1875 in den erythrocytären Stadien gefunden worden (ca. 78 %). Davon wurden 839 in den Merozoiten gefunden, den invasiven Blutstadien (34 %). Geht man von möglichen 5300 Genprodukten in *P. falciparum* aus, so entspricht dies 15 bis 16 % der maximalen Anzahl an Proteinen des Parasiten.

Lasonder et al. (2002) fanden mit Hilfe von NanoLC/LC-MS-MS-Technologie (Rappsilber et al., 2002) insgesamt 1289 Proteine, von denen 714 (55 %) in den Blutstadien gefunden wurden. Dies entspricht ca. 13 % aller Genprodukte (bezogen auf 5300).

In diesen beiden Arbeiten lag das Hauptziel in der Erfassung der Protein-Ausstattung der einzelnen Stadien. Gemäß Blackstock und Weir (1999) entspricht dies dem *Expression Proteomics*.

Barrett et al. (2000) schlugen vor, mittels Proteomics eine räumliche Karte über die Proteinverteilung innerhalb einer Zelle zu zeichnen. Die effiziente Zellfraktionierung und die Verbindung von Zwei-dimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D PAGE) und Massenspektrometrie sollte es erlauben, das molekulare Repertoire von Proteinen zu untersuchen, die einem bestimmten Organell zugeordnet werden können (Blackman und Bannister, 2001), z. B. den Organellen des Apikal-Komplexes oder der PVM aus P. falciparum. Dies kann dem Cell Map Proteomics zugeordnet werden. Die 2-D PAGE in Assisted Laser *Ionization/Desorption* Verbindung mit Matrix *Time-Of-Flight* Masspectrometry (MALDI-TOF MS) ist eine Schlüsseltechnologie auf dem Gebiet der Proteomics geworden. In den letzten Jahren wurde die 2-D PAGE-Technologie stark verbessert. So konnte eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch die Einführung kommerziell verfügbarer Gele mit immobilisierten pH-Gradienten für die Isolelektrische Fokussierung erreicht werden (Bjellqvist et al., 1982). Durch weiterentwickelte Gerätschaften Reagenzien sowie durch die Verbesserung der Messgenauigkeit und von Massenspektrometern und ihre preisgünstigere Handhabung wurde die 2-D PAGE immer attraktiver (Ashton et al., 2001). Obwohl die 2-D PAGE ihre Nachteile hat, wie z. B. bei der Analyse hochmolekularer oder sehr hydrophober Proteine, können zusätzliche Informationen

über den isoelektrischen Punkt und die Molekularmasse eines Proteins erhalten werden, was die Tandem-Massenspektrometrie nicht ohne Weiteres erbringt (Carucci et al., 2002). Solche Informationen lassen zusammen mit einem *Peptide Mass Fingerprint* (Ashton et al., 2001) Aussagen über posttranslationale Modifikationen oder Prozessierungen eines Proteins zu.

2-D PAGE und MALDI-TOF MS wurden bisher nicht in größerem Maßstab auf *P. falciparum* angewandt, werden anscheinend aber immer attraktiver, die Protein-Ausstattung bestimmter subzellulärer Fraktionen des Parasiten oder seiner Wirtszelle zu studieren (Nyalwidhe et al., 2002; Rabilloud et al., 1999).



Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Identifizierung von Proteinen der Rhoptrien und der PVM. Auf der linken Seite sind methodische Wege aufgezeigt, die zur Herstellung präparativer zwei-dimensionaler Gele führen. Auf der rechten Seite ist die Herstellung der *Mastergele* gezeigt. Präparative Gele sollen mit den *Mastergelen* verglichen werden und ausgesuchte Proteine in präparativen Gelen massenspektrometrisch identifiziert werden.

#### 1.5 Zielsetzung

Trotz der zentralen Bedeutung der Organellen des Apikal-Komplexes und der parasitophoren Vakuole für das Leben des intraerythrocytären Parasiten Plasmodium falciparum sind viele Komponenten dieser Kompartimente weder molekular noch funktionell ausreichend charakterisiert. Das Hauptziel dieser Arbeit war die Analyse des molekularen Repertoires von Organellen des Apikal-Komplexes und später der parasitophoren Vakuolen-Membran durch einen experimentellen Ansatz, der sich der als Cell Map Proteomics bezeichneten Methodik bedient. Dazu sollte die Zwei-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D PAGE) für P. falciparum etabliert werden. Die Isolierung von Rhoptrien des Apikal-Komplexes von intraerythrocytären Stadien des Erregers wurde zuvor schon beschrieben, was hier ausgenutzt werden sollte. Für die Präparation der parasitophoren Vakuolen-Membran sollte eine Methodik erst erarbeitet werden. Die Proteine dieser beiden subzellulären Fraktionen sollten mittels 2-D PAGE getrennt werden. Die resultierenden zwei-dimensionalen Protein-Verteilungsmuster sollten als Schablone dafür dienen, Proteine der entsprechenden Fraktionen aus präparativen Gelen zu isolieren. Für jedes dieser Proteine sollte mit Hilfe der Massenspektrometrie ein spezifisches Fragmentierungsmuster, ein sogenannter Peptide Mass Fingerprint (PMF), erstellt werden. Die PMF sollten mit den Genom-Daten des P. falciparum Genom-Projektes verknüpft werden, um die jeweiligen Proteine zu identifizieren, wie schematisch in Abb. 1.4 dargestellt. Die Analysen der Protein-Ausstattungen der Rhoptrien und der parasitophoren Vakuolen-Membran sollen als Grundlage dafür dienen, in Zukunft die Mechanismen des Parasiten zum Eindringen in eine Wirtzelle, zum Überleben in der Wirtszelle und zum Verlassen der Wirtszelle auf molekularer Ebene zu verstehen.

# 2 Material und Methoden

# 2.1 Material

# 2.1.1 Reagenzien

1)	ABC	Sigma, Deisenhofen	
2)	Aceton	Roth, Karlsruhe	
3)	ACHC	Sigma	
4)	Acrylamid-Lösungen	Applichem, Darmstadt	
5)	Agarose NA	Amersham Bioscience (ehemal	S
		Amersham Pharmacia Biotech)	, Freiburg
6)	AlbuMAX II	Invitrogen, Karlsruhe	
7)	Albumin Fraktion V	Applichem	
8)	Ammoniumacetat	Sigma	
9)	AMS	Merck, Darmstadt	
10)	APS	Merck, Darmstadt	
11)	ASB-14	Calbiochem, Schwalbach	
12)	ASB-16	Calbiochem	
13)	bADS	Prof. Dr. T. Schirmeister, Univ.	. Würzburg
14)	BPB	Sigma	
15)	BCIP	Promega, Mannheim	
16)	Bleinitrat	Sigma	
17)	BPB; Bromphenolblau	Merck	
18)	BSA	Sigma	
19)	CHAPS	Calbiochem	
20)	Complete Protease Inhibitor Cocktail Table	s Roche Applied Science,	Mannheim
21)	Coomassie-Brillant-Blue G250	Serva, Heidelberg	
22)	D(+)-Sorbitol	Sigma	

23)	Dikaliumhydrogenphosphat	Fluka, über Sigma
24)	Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
25)	DTT	Sigma
26)	E64	Sigma
27)	EDTA, Dinatriumsalz	Merck
28)	Epon 812	Serva
29)	Erythrocyten-Konzentrat, Human,	
	Blutgruppe A; Rhesus (D)-positiv	Blutspendedienst des Bayer. Roten
		Kreuzes / Blutspendedienst des
		Hamburger Roten Kreuzes
30)	Essigsäure	Applichem
31)	Ethanol	Applichem
32)	Fromaldehyd	Applichem
33)	GA	Merck
34)	Gelatine	Sigma
35)	Gentamycinsulfat	Invitrogen
36)	Giemsa-Lösung	Merck, VWR
37)	Glycerin	Amersham Bioscience (ehemals
		Amersham Pharmacia Biotech)
38)	Harnstoff	Amersham Bioscience (ehemals
		Amersham Pharmacia Biotech)
39)	HCl, 37 %(w/v)	Merck
40)	Hepes	Biomol, Hamburg
41)	Hoechst33258	Sigma
42)	IAA	Calbiochem
43)	IPG Cover Fluid	Amersham Bioscience (ehemals
		Amersham Pharmacia Biotech)
44)	IPG Puffer (versch. pH-Bereiche)	Amersham Bioscience (ehemals
		Amersham Pharmacia Biotech)
45)	Kaliumchlorid	Merck
46)	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
47)	L-Alanin	Merck
48)	LR-White	London Resin Company, UK

49)	MeCN	Merck/Roth
50)	Methanol	Merck
51)	Milchpulver	Glücksklee, Hamburg
52)	Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
53)	Mowiol 4-88	Calbiochem
54)	NaOH-Plätzchen	Merck
55)	Natrium-Cacodylat-Trihydrat	Sigma
56)	Natriumcarbonat	Merck
57)	Natriumchlorid	Merck
58)	Natriumcitrat	Sigma
59)	Natriumdihydrogenphosphat	Merck
60)	Natriumhydrogencarbonat (Bicarbonat)	Sigma
61)	Natriumthiosulfat	Merck
62)	NBT	Promega
63)	Osmiumtetroxid	Serva
64)	Phosphorsäure, 87 %(w/v)	Roth
65)	Plasma, human	UnivKlinikum Eppendorf, Blutbank,
		Hamburg
66)	Protein-Größenstandards:	
	Multimark Multi-Colored Standard	Invitrogen Life Technologies
	Prestained Molecular Weight Marker	MBI Fermentas
	Molecular Weight Protein Ladder	MBI Fermentas
67)	PVDF-Membran Immun-Blot <sup>TM</sup>	Bio-Rad, München
68)	RPMI 1640, mit 25 mM Hepes	Gibco BRL, Invitrogen Life Technologies
69)	Saccharose	Merck
70)	Saponin (aus Gypsophila)	Sigma
71)	SDS	Amersham Bioscience (ehemals
		Amersham Pharmacia Biotech)
72)	Silbernitrat	Merck
73)	Silbernitrat	Sigma
74)	TEMED	Sigma
75)	TFA	Sigma

76)	Thioharnstoff	Fluka
77)	Tricin	Serva
78)	Tris	Amersham Bioscience (ehemals
		Amersham Pharmacia Biotech)
79)	Triton X-100	Sigma
80)	Triton X-114	Serva
81)	Trizma	Sigma
82)	Trypsin (bovin, sequential grade)	Roche
83)	Tween20	Sigma
84)	β-MSH	Serva

# 2.1.2 Allgemeine Pufferlösungen

I) PBS:	NaCl	137 mM	
	KCl	2,7 mM	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,24 mM	
	KH <sub>2</sub> PO4	0,14 mM	
	рН 7,2		

2) TBS:	Tris-HCl	20 mM	
	NaCl	150 mM	
	pH 7,4		

3) TTBS TBS mit 0,05 %(w/v) Tween 20

# 2.1.3 Immunoreagenzien und Konjugate

- mAb61.3 monoklonaler Maus-Antikörper gegen RHOP-H1 (140 kDa) (A. Holder, London, UK; Holder et al., 1985b)
- 2. Anti-Bande 3 Monoklonaler Maus-Antikörper (IgG2a; Klon BIII-136) gegen humanes, erythrocytäres Bande 3-Protein (Sigma)
- 3. Anti-Glycophorin A+B Monoklonaler Maus-Antikörper (IgG1) gegen humanes, erythrocytäres Glycophorin A und B, Klon E3 (Sigma)

- Kaninchen-anti-EXP-1 Kaninchenserum gegen EXP-1, einem Protein der Parasitophoren Vakuolen Membran aus *P. falciparum* (Prof. Dr. K. Lingelbach, Universität Marburg)
- 5. Kaninchen-anti-SERP Kaninchenserum gegen SERP (*SERine-Rich Protein*), einem Protein der Parasitophoren Vakuolen aus *P. falciparum* (Prof. Dr. K. Lingelbach, Universität Marburg (Ansorge et al., 1996; Knapp et al., 1991)
- 6. Schwein-anti-Kaninchen-IgG-FITC FITC-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper aus Schwein (DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg)
- 7. Ziege-anti-Kaninchen-IgG-FITC FITC-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper aus Ziege (DAKO)
- 8. Ziege-anti-Maus-Alexa488 Alexa488-konjugierter anti-Maus-Antikörper (IgG) aus Ziege (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.; vertrieben über Dianova, Hamburg)
- Ziege-anti-Kaninchen-Alexa488 Alexa488-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper (IgG) aus Ziege (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.; vertrieben über Dianova, Hamburg)
- 10. Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 Cy3- konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper (IgG) aus Ziege (DAKO)
- 11. Ziege-anti-Kaninchen-AP Alkalische Phosphatase-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (IgG) (Sigma)
- 12. Ziege-anti-Maus-AP Ziege-Anti-Maus-Antikörper (IgG), konjugiert an Alkalische Phosphatase (Sigma)
- 13. Ziege-anti-Maus IgG aus der Ziege an 12 nm kolloidales Gold konjugiert (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.; vertrieben über Dianova, Hamburg)
- 14. Esel-anti-Kaninchen IgG an 12 nm kolloidales Gold konjugiert (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.; vertrieben über Dianova, Hamburg)
- 15. Streptavidin-Cy3 Streptavidin, konjugiert an Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.; vertrieben über Dianova, Hamburg)
- 16. SA12 Kaninchen-Serum nach Immunisierung mit zwei KLH-gekoppelten Peptiden, die aus der AMA-1-Sequenz (GenBank Accession Nr. AAB36701) abgeleitet wurden (F42-H356 und D580-E594) (DOUBLE-X Programm; Eurogentec, Belgien).
- 17. SA13 Kaninchen-Serum nach Immunisierung mit zwei KLH-gekoppelten Peptiden, die aus der AMA-1-Sequenz (GenBank Accession Nr. AAB36701) abgeleitet wurden (F42-H356 und D580-E594)(DOUBLE-X Programm; Eurogentec, Belgien).
- SA743 Kaninchen-Serum nach Immunisierung mit zwei KLH-gekoppelten Peptiden (N2-K16C und C372-K387), die aus der HAP-Sequenz (GenBank Accession Nr. CAB40630) abgeleitet wurden (DOUBLE-X Programm; Eurogentec, Belgien).

- 19. SA744 Kaninchen-Serum nach Immunisierung mit zwei KLH-gekoppelten Peptiden (N2-K16C und C372-K387), die aus der HAP-Sequenz (GenBank Accession Nr. CAB40630) abgeleitet wurden (DOUBLE-X Programm; Eurogentec, Belgien)
- 20. Anti-HAP-IgG Kaninchen-IgG, gereinigt mittels Affinitätschromatographie über eine EP011416-Säule (Eurogentec, Belgien). Der Antikörper wurde aus den Seren SA743 und SA744 gewonnen. Das Epitop EP011416 hat folgende Aminosäuresequenz und wurde am N-terminalen Cysteinrest an die Affinitäts-Säule gekoppelt: CGNTKLPTLEYRSPNK, der C-Terminus lag amidiert vor.
- 21. Kaninchen-anti-EBA-175 Affinitätsgereiniger Kaninchen-IgG gegen EBA-175 (Reed et al., 2000) (Dr. A. Mayer, WEHI Melbourne, Australien)

# 2.1.4 Geräte und sonstiges Verbrauchsmaterial

1)	Airfuge <sup>TM</sup> , Air Driven Ultracentrifuge AB901	Beckman	
2)	Centricon Concentrators MWCO 10000	Amicon	
3)	Elektrophorese Spannungsgeber EPS 200 2A	Hoefer, über Amersham	
		Pharmacia	
4)	Elektrophorese Spannungsgerät Power Pac 300	Bio-Rad	
5)	Elektrophorese-Apparatur P10DS	Owl Scientific Inc., USA	
6)	Elektrophorese-Apparatur P8DS	Owl Scientific Inc., USA	
7)	7) Fluoreszenzmikroskop Leica DMRB mit Konfokaler Lasereinheit TCS NT Leica		
8)	Fluoreszenz-Spektrometer LS50B	Perkin-Elmer, Rodgau-	
		Jügesheim	
9)	IPGphor Isoelectric Focusing System	Amersham-Pharmacia	
10) Konfokales Mikroskop Axiovert 100 M mit Konfokaler Lasereinheit LSM5 Zeiss,			
		Göttingen	
11)	Laborzentrifuge 2 K15	Sigma Laborzentrifugen,	
		Osterode	
12) Laborzentrifugen Sigma 4-10		Sigma Laborzentrifugen	
13) Lichtmikroskop Axiolab Zei		Zeiss	
14)	MALDI-TOF Massenspektrometer Voyager DE STR		
	Biospectrometry Workstation	Perseptive Biosystems,	
		Framingham, USA	
15) Membranvacuumpumpe Modell 1		Roth	
16)	Microcon Concentrators MWCO 10000	Millipore, Schwalbach	
17) Minifuge PE		Heraeus, Hanau	

18) Neubauer-Zählkammer	Invitrogen	
19) Quarzglasküvetten 108.002B-QS, 10 mm Schichtdicke	Hellma	
20) Schräghals-Zellkulturflachen 690 ml	Nerbe Plus GmbH	
21) Semi-Dry-Blotting Apparatur 22 x 20 cm <sup>2</sup>	PHASE, Lübeck	
22) Semi-Dry-Blotting Apparatur Semiphor	Hoefer, über Amersham	
	Pharmacia	
23) Software für Konfokal-Mikroskopie Leica TCS NT V 1.5.4	51 Leica	
24) SpeedVac Plus SC110A	Thermo Savant, USA	
25) Sterilfilter 60 Filter Unit	Pall Corporation, Dreiech	
26) Stickstoff-Druckkammer Serien-Nr. 48331-0	Artisan Industries, USA	
27) Tischzentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg	
28) Transmissions-Elektronenmikroskop CM10	Philips	
29) Transmissions-Elektronenmikroskop EM 301	Philips	
30) Transmissions-Elektronenmikroskop E12	Zeiss	
31) Ultraschallbad Sonorex Super RK106	Bandelin Sonorex, Berlin	
32) Ultrazentrifuge L8-M	Beckman	
33) Ultrazentrifuge LE-70	Beckman	
34) Vivaspin 5, Ultrafiltrationseinheiten	Vivascience, Göttingen	
35) Zentrifuge J2-21	Beckman	
36) Zentrifuge J2-HS	Beckman	
37) Zentrifuge Sorvall RC 5C Plus	Du Pont	
38) ZipTip <sub>C18</sub>	Millipore	

# 2.2 Methoden

# 2.2.1 Führung einer *Plasmodium falciparum*-Kultur

Prinzipiell wurde sich an den Methoden von Trager und Jensen (1976) und Lambros und Vanderberg (1979) orientiert.

Alle Arbeitsschritte zur Kulturführung wurden unter sterilen Bedingungen bzw. mit sterilem Material und Lösungen durchgeführt.

## 2.2.1.1 Medien, Erythrocyten und Lösungen:

Ungepuffertes RPMI 1640-Medium:		15,43 g RPMI 1640 mit 25 mM Hepes wurden in	
		900 ml ddH <sub>2</sub> O gelöst und steril filtriert.	
NaHCO <sub>3</sub> -Lösung:		8,125 %(w/v) NaHCO3-Lösung in ddH2O	
Gepuffertes RPMI 1640-Medium:		900 ml ungepuffertes RPMI 1640-Medium wurden	
		mit 40 ml NaHCO3-Lösung versetzt	
Albumax II	5 %(w/v) Alb	umax II in ungepuffertem RPMI 1640. Bei 37	
	°C unter gelegentlichem Rühren gelöst und sterilfiltriert.		
Komplettmedium:	gepufferetes RPMI 1640 Medium mit 0,25 % Albumax II;		
	z. T. wurde z	usätzlich 5 %(v/v) humanes, hitzeinaktiviertes	
	Plasma (A Rh	n <sup>+</sup> Spender) zugesetzt.	
Für einige Versuche wur	rde auf humar	nes Plasmakomponenten im Medium verzichtet und	
durch insgesamt 0.5 % Al	lbumax II erset	zt.	
Giemsa-Lösung:	10 %(v/v) Giemsa-Färbelösung in Giemsa-Puffer (0,49 g		
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,09	g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O in 1 l)	
Methanol:	100 %, zur Fixierung		
Erythrocyten:	Je 30 ml des Erythrocyten-Konzentrates (Blutgruppe A <sup>RH+</sup> )		
	wurden unter	sterilen Bedingungen auf 50 ml Zentrifugenröhrchen	
	verteilt. Die S	uspension wurde für 10 min bei 800 g bei 4°C	
	zentrifugiert.	Der Überstand wurde verworfen. Anschließend	

wurden die Zellen zweimal mit gepuffertem RPMI 1640Medium gewaschen. Die gewaschenen Erythrocyten
wurden mit Komplettmedium auf einen Hämatokrit von
50 % gebracht. Für die Kultur wurden nur ErythrocytenKonzentrate verwandt, die nicht älter als eine Woche waren.
Gewaschene Erythrocyten wurden innerhalb von 4 Wochen
verwandt.

#### 2.2.1.2 In vitro-Kultivierung von P. falciparum

Es wurden ausschließlich Parasiten des Stammes *P. falciparum* 3D7 (Rosario, 1981) verwandt. Dieser Stamm hatte seinen Ursprung in einem Patientenisolat vom Flugahfen Amsterdam und wurde vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, von Herrn Prof. Dr. R. D. Walter zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um denselben Stamm, der für das *P. falciparum*-Genomprojekt verwandt wurde (Gardner et al., 2002).

Stammhaltung:

In Petrischalen wurden zu 1 ml 50 %iger Erythrocyten-Suspension 10 ml Komplettmedium gegeben. Der Hämatokrit lag bei ca. 5 % liegen. In Flaschen (Nerbe plus GmbH) lag bei einem Volumen von 100 ml ein Hämatokritanteil von 2,5 % vor (5 ml 50 % HCT RBCs auf 100 ml). Bis auf 5 % erhöhbar. Flaschen wurden dazu nicht ganz zugedreht (Gasaustausch im begasten Brutschrank).

Passagen:

Bei einer nichtsynchronisierten Kultur wurde ab einer Parasitämie von 7 % verdünnt. Synchronisierte Kulturen wurden im Ringstadium bei einer Parasitämie > 10 % verdünnt, als Trophozoiten bzw. Schizonten bei einer Parasitämie > 5 %. Eine höhere Parasitämie sollte nur dann erreicht werden, wenn am nächsten Tag die Zellen geerntet werden sollten.

Bestimmung der Parasitämie:

Vom Schälchen- bzw. Flaschenboden wurde ein Tropfen Erythrocyten-Suspension mit einer Pipette aufgenommen, auf einen Objektträger gebracht und ausgestrichen. Dieser Blutausstrich wurde zunächst luftgetrocknet, 1 min in MeOH fixiert, und anschließend für 10 min in einer 10 %igen Giemsa-Lösung gefärbt. Der Objektträger wurde nach der Färbung unter Leitungswasser abgespült und dann getrocknet. Bei 1000-facher Vergrößerung wurde
mit einem Ölimmersionsobjektiv der Anteil infizierter Erythrocyten aus 1000 bis 2000 Zellen ausgezählt. Die Parasitaemie wurde als prozentualer Anteil der infizierten Erythrocyten in dem Blutasusstrich ermittelt.

Mediumwechsel:

Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Bei Parasitaemien unter 1 % konnte die Kultur bei einem Hämatokrit von 2,5 % für 3 Tage inkubiert werden ohne das Medium zu wechseln. Das Medium aus der Flasche oder Schale wurde unter leichtem Kippen mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und durch neues Komplettmedium ersetzt. Kulturbedingungen:

Kulturflaschen wurden mit einem Gasgemisch (90 % N<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) begast. Die Kulturen wurden bei 37°C im Brutschrank (Heraeus) inkubiert.

### 2.2.1.3 Einfrieren von Plasmodien

Lösungen: 30 %(w/v) Glycerin in PBS PBS

Kulturen einer Parasitämie ab 3 %, die vor allem Ringstadien enthalten, können eingefroren werden. Zuvor sollte ein Medienwechsel durchgeführt werden. Die Kultur wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und bei RT für 10 min bei 2000 rpm (Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ein Sedimentvolumen abgenommen und zwei Sedimentvolumen an 30 %(w/v) Glycerin in PBS-Lösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Je 500  $\mu$ l dieser Suspension wurde in sterile Cryogefäße gefüllt und für 10 min auf Eis gestellt. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff gelagert (Cryoröhrchen).

#### 2.2.1.4 Auftauen von Plasmodien

Lösungen:

5 % bzw. 27 %(w/v) Sorbitol in 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 (sterilfiltriert)

Die gefrorene Probe wurde im Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schütteln aufgetaut; danach sofort auf Eis gelagert. Die Zellen wurden in ein steriles kalibriertes Röhrchen überführt (15 ml Falcon-Röhrchen). Es wurden tropfenweise unter Schütteln 2 Volumenteile (VT) kalte 5 %(w/v) Sorbitol-Lösung zugegeben und die Zellsuspension weitere 10 min auf Eis stehen gelassen. Wie oben beschrieben wurden nochmals 2 VT kaltes 5 %(w/v) Sorbitol zugegeben und weitere 10 min auf Eis stehen gelassen. Danach wurde für 5 min bei 1500 rpm (Heraeus) bei 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in 2 VT kaltem 5 %(w/v) Sorbitol-Lösung vorsichtig resuspendiert, 8 min auf Eis stehengelassen und dann für 5 min bei 1500 rpm (Heraeus) bei 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment komplettmedium gewaschen. Zur Kultivierung wurden die Zellen in eine frische 2,5 %ige Erythrocytensuspension überführt.

## 2.2.1.5 Synchronisation der Parasitenstadien mit L-Alanin

Die Behandlung von Parasiten mit einer L-Alanin-Lösung erlaubt die Synchronisation der Parasitenentwicklung mit möglichst vielen Ringstadien (Braun-Breton et al., 1988).

Lösungen: 0,3 M L-Alanin

10 mM Hepes

pH 7,2 mit 1 M KOH eingestellt

Bei einer Kultur mit vielen Ringstadien wurde das Medium abgenommen und die Zellen in gepuffertem RPMI 1640-Medium resuspendiert. Bei Raumtemperatur wurde für 5 min bei 2000 rpm in der Heraeus-Laborzentrifuge in Falcontubes zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die auf 37°C vorgewärmte L-Alaninlösung (2,5 x Sedimentvolumen) zu den Zellen gegeben und vorsichtig gemischt; es wurde 5 min bei 37°C inkubiert. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit 37°C warmen Komplettmedium aufgefüllt, gemischt und bei RT für 5 min bei 550 g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde ein- bis zweimal mit Komplettmedium gewaschen. Die gewaschenen Erythrocyten wurden zur Rekultivierung verwandt. Um eine synchrone Kultur beizubehalten wurde die Prozedur mindestens einmal wöchentlich durchgeführt.

# 2.2.1.6 Synchronisation der Parasitenstadien mit D-Sorbitol

Ebenso wie die Synchronisation mit Alanin (Abschnitt 2.2.1.5) dient diese Methode der Eleminierung später Trophozoiten und Schizonten und damit die Selektionierung junger Trophozoiten (Ringstadien) (Lambros und Vanderberg, 1979).

Lösungen:

Komplettmedium

5 %(w/v) Sorbitol in ddH<sub>2</sub>O (steril)

Zellen aus der Kultur mit 2.5 % HCT und möglichst vielen Ringstadien wurden sedimentiert (5 min 550 g, RT). Das Zellsediment wurde in einem 10-fachen Volumen 5 % Sorbitol-Lösung resuspendiert und für 10 min bei RT unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde 1 Volumen vorgewärmtes Komplettmedium zugegeben und gemischt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und rekultiviert. Um eine synchrone Kultur beizubehalten wurde die Prozedur mindestens einmal wöchentlich durchgeführt.

# 2.2.2 Präparation von Rhoptrien aus Plasmodium falciparum

Die Präparation von Rhoptrien erfolgt verändert nach den Methoden von Etzion et al. (1991) und von Sam-Yellowe et al. (1995 und 1998).

### 2.2.2.1 Präparation von Schizonten-infizierten iRBCs

Diese Methode dient der Isolierung und Anreicherung von Schizonten-infizierten RBCs zur weiteren Präparation von Rhoptrien und wurde verändert nach Kutner et al. (1985) durchgeführt.

In PBS gewaschene iRBCs mit möglichst vielen Schizonten wurden in wenig PBS resuspendiert und vorsichitig auf ein Kissen von 37°C warmer 65 %(v/v) Percoll/5 %(w/v) Sorbitol/PBS-Lösung gegeben. Für 2,5 bis 3 ml gepackter Kulturzellen wurden 25 ml des Percoll-Kissens verwandt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1500 g für 20 min und bei RT.

Späte Stadien (Schizonten) befanden sich als Bande an der Phasengrenze von Percoll und PBS. Dies wurde stets durch Giemsa-gefärbte Ausstriche kontrolliert. Zur Rhoptrienpräparation wurden die Schizonten-infizierten RBCs aus insgesamt einem Liter Kulturmedium bei einem HCT von 5 % verwandt. Die Anzahl der isolierten Schizonten richtete sich nach der Parasitaemie in der Kultur kurz vor der Ernte. Gewöhnlich ergab die Ernte ca. 1 x  $10^9$  Schizonten. Die Parasitämie betrug stets 90 bis 97 %.

# 2.2.2.2 Aufschluß von Schizonten-infizierten Erythrocyten mittels Stickstoff-Druckkammer und subzelluläre Fraktionierung über eine Dichtegradienten-Zentrifugation

Diese Methode dient der Präparation von Schizontenhomogenaten (Etzion et al., 1991) und deren weiterer subzellulärer Fraktionierung. Ein schonender Aufschluß der Schizonten ist Grundlage der subzellulären Fraktionierung und damit für die weitere Reinigung von Rhoptrien. Es wurden angereicherte Schizontenstadien (siehe 2.2.2.1) verwandt.

Lösungen:

DB (Disruption buffer)	10 mM Hepes
	10 mM KCl
	1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA
	250 mM Saccharose, pH 7,4

2,2 M Saccharose

Die angereicherten Schizonten-infizierten iRBCs aus 10 Kulturflachen wurden sedimentiert und 1:4 mit DB verdünnt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 20 min. Die Suspension wurde unter Eiskühlung für 20 min einem Druck von 50 bar ausgesetzt (Artisan, USA). Durch langsame Druckentspannung am Auslaß-Ventil wurde die Suspension tropfenweise aus der Kammer entlassen und in einem JA20-Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Suspension wurde bei 4°C für 10 min bei 8000 g im JA20-Rotor (Beckmann) sedimentiert. Der Überstand wurde ein weiteres Mal abzentrifugiert. Der Überstand wurde direkt auf einen kontinuierlichen Saccharose-Gradienten (0,4 bis 1, 6 M mit 1 ml 2,2 M Saccharose-Kissen, SW40-Polyallomer-Ultrazentrifugen-Röhrchen (17 ml), Beckmann) gegeben. Zentrifugation erfolgte in der Beckman Ultrazentrifuge (SW40-Schwenkbecher-Rotor, Beckman) bei 4°C für 30 min 72.000 g und für weitere 4 h 130.000 g. Es wurden 0,5 ml Fraktionen entweder mit einer Peristaltik-Pumpe (Pharmacia) oder mit einer 1-ml-Injektionsspritze vorsichtig abgesaugt. Fraktionen wurden 1:4 mit DB verdünnt und für 30 min bei 150.000 g im SW55-Rotor (Beckman) zentrifugiert. Das Sediment wurde für elektronenmikroskopische Untersuchungen in 2 %(v/v) GA/Cacodylatpuffer aufgenommen oder für proteinchemische Untersuchungen in PBS resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

In dem folgenden Diagramm ist die Vorgehensweise zur Rhoptrien-Präparation schematisch dargestellt.

Abb. 2.1: (nächste Seite) Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur subzellulären Fraktionierung für die Rhoptrien-Präparation von *P. falciparum* und nachfolgende Analysen der Rhoptrien-haltigen Fraktionen (mit Modifikationen nach Sam-Yellowe *et al.*, 1998).



1.

2.

3.

4. 5.

# 2.2.3 Isolierung von PEMS (*Parasitophorous Vacuolar Membrane-Enclosed Merozoite Structures*)

Die PEMS-Präparation wurde im Wesentlichen gemäß Salmon et al. (2001) durchgeführt. Parasiten wurden mit 2,5 % HCT unter normalen Kulturbedingungen kultiviert, wobei im Medium auf humanes Plasma verzichtet wurde. Es befanden sich 0,5 % Albumax II im kompletten Medium. Die Kultur wurde mittels Alanin- oder Sorbitol-Behandlung synchronisiert. Es wurden mindestens 2 Behandlungen im Abstand von ca. 48 h durchgeführt. Im Giemsa-gefärbten Ausstrich wurde der Zeitpunkt bestimmt, an dem sich hauptsächlich Schizonten mit 5 bis 7 Kernen in der Kultur befanden. Die synchronen Kulturen wurden für 8 h bis 10 h in komplettem Kulturmedium gehalten, das 10 µM E64 (Sigma) enthielt.

Die E64-Konzentration wurde aus einer 15 mM Stammlösung in 50 % EtOH eingestellt. Zusätzlich wurden unbehandelte Parasiten einer synchronen Kultur als Kontrolle eingesetzt, um späte Schizonten mit 8 bis 16 Kernen zu ernten. Um PEMS zu reinigen, wurden Zellen aus einer E64-behandelten Kultur (4 x100 ml Kulturmedium) mit einer Parasitämie von 5 bis 10 % durch Zentrifugation bei 2000 g für 10 min geerntet und dann auf einem Kissen von 45 %(v/v) Percoll in PBS bei 2500 g für 20 min von intakten iRBC und RBC getrennt. Nach Salmon et al. (2001) befanden sich die PEMS oben auf dem Percoll-Kissen. Die PEMS-Fraktionen wurden vorsichtig abgenommen und 3 mal mit gepuffertem RPMI inklusive eines Protease-Inhibitor Cocktails (Roche) gewaschen.

Als Alternative zu dieser Methode zur PEMS-Präparation wurden die Zellen einer synchronen, Schizonten-reichen Kultur mit gepuffertem RPMI 1640-Medium gewaschen und die Schizonten auf einem Percollkissen isoliert (siehe Kapitel 2.2.2.1). Die angereicherten Schizonten wurden einmal in Komplettmedium gewaschen und in Anwesenheit von 10  $\mu$ M E64 für ca. 8 h unter Kulturbedingungen inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden intakte iRBC und restliche RBC bei 900 g für 5 min, RT, abzentrifugiert und der resultierende Überstand für weitere 5 min bei 2000 g, RT, zentrifugiert, um die PEMS zu sedimentieren. Diese wurden einmal in PBS gewaschen und für weitere Analysen bei –70°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

Die PEMS-Präparationen wurden durch Giemsa-gefärbte Ausstriche und Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Für letztere wurden getrockenete Ausstriche der PEMS-Präparation mit monoklonalem anti-humanes Bande 3-Protein-IgG (α-Bande 3; Sigma) und anti-EXP-1 Kaninchenserum (K. Lingelbach, Marburg) bzw. mit monoklonalem antihumanes Glycophorin A+B-IgG (Sigma) und anti-SERP Kaninchenserum (K. Lingelbach, Marburg) koinkubiert. Bande 3-Protein und Glycophorin A+B können in der Erythrocytenmembran lokalisiert werden. SERP befindet sich in der PV und EXP-1 ist mit der PVM der Plasmodien assoziiert. Nach Inkubation mit entsprechenden Fluorophorkonjugierten sekundären Antikörpern und Kernfärbung mit Hoechst 33258, wurden die Präparate im Konfokalen Laser-Mikroskop (Zeiss) untersucht (siehe dazu Kapitel 2.2.7).

# 2.2.4 Präparation der Parasitophoren Vakuolen-Membran (PVM)

PEMS wurden gemäß Salmon et al. (2001) aus einer E64-inkubierten Parasiten-Kultur über ein Percoll-Kissen isoliert (siehe Kapitel 2.2.3). Gewaschene PEMS wurden zu 1 ml mit gepuffertem RPMI inklusive eines Protease-Inhibitor Cocktails resuspendiert und zehnmal durch eine 27 G Kanüle gepresst. Aus den PEMS freigesetzte Merozoiten wurden bei 3000 g für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und nochmals bei 3000 g für 5 min zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde in der Ultrazentrifuge (Airfuge; Beckman) für 30 min bei 100.000 g zentrifugiert Das Sediment wurde bei –70°C eingefroren. Aliquots einzelner Fraktionen wurden auf einen Objektträger pipettiert und luftgetrocknet. Die Präparate selber wurden bei –70°C eingefroren.

Zur Veranschaulichung ist im Folgenden eine schematisierte Darstellung der Vorgehensweise zur PEMS-Präparation abgebildet, wie es bei Salmon et al. (2001) beschrieben wurde. Darüber hinaus sind weitere Schritte zur Präparation von Merozoiten und der PVM dargestellt.



Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Präparationsverlaufs zur Isolierung von PEMS und die weiterführende Präparation der PVM und von Merozoiten

# 2.2.5 Behandlung von intraerythrocytären Stadien von *P. falciparum* mit einem biotinyliertem Aziridin-2,3-Dicarbonsäure-Derivat

Eine mit Sorbitol synchronisierte Parasitenkultur (2,5 % HCT, 5 % Parasitämie) wurde für 10 h mit 10  $\mu$ M 1-[6-(+)-Biotinylamino]-caproyl-aziridin-2,3-dicarboxylsäure-dibenzylester (bADS) unter normalen Kulturbedingungen inkubiert, nachdem die Parasiten ein Schizonten-Stadium mit 3 bis 7 Kernen erreicht hatten. Bei der Substanz handelt es sich um einen Cystein-Protease-Inhibitor und wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Schirmeister, Univ. Würzburg, synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Als Stammlösung diente eine Lösung mit 155 mM bADS in DMSO. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen aus der Kultur dreimal mit einem 50fachen Volumen an PBS gewaschen, auf Objektträgern ausgestrichen und getrocknet.

Die Präparate wurden mit 4 %(w/v) PFA in PBS für 20 min bei RT fixiert, die freien Aldehydgruppen mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS blockiert und die Ausstriche für 1 h bei RT in 5 %(w/v) BSA/TTBS inkubiert. Dann erfolgte eine einstündige Inkubation mit Streptavidin-Cy3-Konjugat (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., vertrieben über Dianova, Hamburg) (1:10 in TTBS verdünnt). Schliesslich wurden die Nuklei mit 1 µg/ml Hoechst 33258 markiert und nach gründlichem Waschen der Ausstriche in PBS wurden die Präparate in Glycerin eingebettet und mit dem Konfokalen Laser-Mikroskop (Zeiss) untersucht. Die Filter- und Lasereinstellungen wurden entsprechend der Fluoreszenz für Cy3- und DAPI-Fluoreszenz gewählt. Als Kontrolle wurde mit Kulturzellen ebenso verfahren, die nicht mit bADS behandelt worden waren.

### 2.2.6 Elektronenmikroskopie

Alle verwendeten Lösungen werden durch 0,22 µm Filter filtriert.

Allgemeine Lösungen:

PBS

Na-Cacodylatpuffer: 50 mM Na-Cacodylat (Na(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-AsO<sub>2</sub> x 3H<sub>2</sub>O) pH 7,4

	2 %(w/v) OsO <sub>4</sub> /50 mM Cacodylatpuffer pH 7,4
	0,5 %(w/v) Uranylacetat
Fixanz A:	4 %(w/v) PFA/PBS
Fixanz B:	2 %(w/v) PFA/2 %(v/v) GA/100 mM Na-Cacodylat pH 7,4
LR-White	
Epon 812	

## 2.2.6.1 Herstellung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie

Isolierte und in PBS gewaschene Parasiten wurden in frisch angesetztem Fixanz resuspendiert. Für die Herstellung von Präparaten, die zur IEM verwandt werden sollten, wurde zur Fixierung Fixanz A verwandt. Sofort nach der Resuspension wurde das Zellmaterial für 1 min bei 4000 g abzentrifugiert, um für weitere Schritte ein stabiles Zellsediment zu erhalten.

Die Fixierung erfolgte über Nacht bei 4°C. Das Sediment wurde in PBS gewaschen, die freien Aldehydgruppen mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl für 15 min bei RT blockiert und das fixierte Sediment wurde in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Entwässerung der Probe erfolgte in aufsteigender Alkoholreihe mit 30, 50, 70, 90 und 100 % EtOH. Schliesslich wurde die Probe in LR-White überführt und für 3 Tage bei 40°C polymerisiert. Dieses wurde von der Zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie, Universität Würzburg, durchgeführt. Ebenso wurde die Herstellung von Ultradünnschnitten aus dem eingebetteten Material und die Bestückung von Pioloform-beschichteten Nickel-Netzchen von der Zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie durchgeführt.

Für die Herstellung von Präparaten, die rein morphologischen Untersuchungen dienen sollten, wurde zur Fixierung Fixanz B verwandt. Nach Inkubation in Fixanz B für 3 h oder über Nacht bei 4°C wurden die Präparate in 50 mM Cacodylatpuffer gewaschen dann in 2 %(w/v) OsO<sub>4</sub> (Roth) in 50 mM Cacodylatpuffer inkubiert.

Nach Waschen der Präparate in Wasser wurde mit 0,5 %(w/v) wässriger Uranylacetat-Lösung über Nacht kontrastiert und schließlich vor der Entwässerung in der Ethanolreihe nochmals gewaschen. Die Einbettung der Präparate in Epon 812 (Serva), die Anfertigung von Ultradünnschnitten und weitere Kontrastierung mit 2 % Uranylacatat und Bleicitrat nach Reynolds wurde von der Zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie, Universität Würzburg, durchgeführt.

#### 2.2.6.2 Immun-Elektronenmikroskopie (IEM)

Allgemeine Lösungen:

Bleicitrat nach Reynolds: 1,33 g Bleinitrat

+ 1,76 g Na-Citrat
ad 30 ml ddH<sub>2</sub>O
1 min schütteln, 30 min stehen lassen
8 ml 1 M NaOH zugeben, ad 50 ml ddH<sub>2</sub>O, pH 12,0
0 mit 0.01 NaOH (filtriert) frisch, ansatzen

Für den Gebrauch 1:10 mit 0,01 NaOH (filtriert) frisch ansetzen

PBS

Abgekochtes ddH<sub>2</sub>O

Lösung A: 1 %(w/v) BSA/0,1 % Tween20/PBS

Lösung B: 0,1 %(w/v) BSA/0,1 % Tween20/PBS

Ultradünnschnitte auf Pioloform-beschichteten Kupfernetzchen wurden zunächst für 5 min in PBS inkubiert und für weitere 5 min in Lösung A. Dann wurden die Präparate über Nacht bei 4°C mit primären Antikörpern/-seren (Verdünnungen in Lösung A) inkubiert. Nach Waschen der Schnitte (2 x 10 min je mit Lösung A und Lösung B) erfolgte die Inkubation mit sekundärem Antikörper, verdünnt in Lösung B, für 1 h bei RT. Je nach Ursprung des primären Antikörpers/Antiserums wurden folgende sekundäre Antikörperlösungen verwandt:

- Anti-Maus IgG aus Ziege an 12 nm kolloidales Gold konjugiert (Dianova). Verdünnung 1:10 in 0,1 % BSA/0,1 % Tween20/PBS
- Anti-Kaninchen IgG aus Esel an 12 nm kolloidales Gold konjugiert (Dianova).
   Verdünnung 1:10 in 0,1 % BSA/0,1 % Tween20/PBS

Die Schnitte wurden 2 x für 10 min mit Lösung B gewaschen und danach 2 x mit ddH<sub>2</sub>O. Gewaschene und getrocknete Schnitte wurden mit wässriger 2 %iger Uranylacetat-Lösung gefärbt, gefolgt von einer Färbung mit Bleicitrat nach Reynolds.

### 2.2.6.3 Negativ-Färbung von resuspendierten Partikeln

Fraktionen aus dem Saccharose-Gradienten zur Rhoptrienpräparation (siehe Kapitel 2.2.2) wurden 1:4 in DB verdünnt und 30 min bei 150.000 g und 4°C zentrifugiert (SW55-Rotor mit Polyallomer-Zentrifugenröhrchen). Danach wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in etwas PBS resuspendiert. Nach der Fixierung der Proben im gleichen Volumen 2 %(v/v) GA/PBS (siehe oben) erfolgte das Negativfärben mit Phosphor-Wolframsäure (PTA). Dazu wurden je 10 µl Probe auf mit Kohle beschichtete Nickelnetzchen (C. Schmetz, BNI Hamburg) gebracht. Die Beschichtung der Netzchen befand sich auf der Oberseite der Netzchen. Nach einer Inkubation für 0,5 h bei RT zur Sedimentation der resuspendierten Partikel wurden die Netzchen gründlich in ddH<sub>2</sub>O gespült und auf einem Filterpapier getrocknet. Dann wurde je ein Tropfen 2 %(w/v) PTA, pH 6,5 auf die Netzchen-Oberseite gegeben. Nach 30 s wurde die PTA-Lösung bis auf einen gleichmäßig verteilten Rest mit einem Filterpapier abgesaugt. Nachdem die Restflüssigkeit verdunstet war, konnten die Netzchen im Elektronenmikroskop EM301 (Phillips) untersucht werden.

#### 2.2.7 Immunfluoreszenzmikroskopie

Immunfluoreszenzmikroskopie (IFA) von *Plasmodium falciparum* wurde mit luftgetrockneten Ausstrichen durchgeführt.

Lösungen: PBS Blockierungslösung: 5 %(w/v) BSA/PBS MeOH 4 % PFA/PBS

Ausstriche von angereicherten Parasiten oder von Zellen aus der Kultur wurden für 20 min in 4 % PFA/PBS bei RT fixiert und dann für 15 min in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl. Dann wurde mit 5 % BSA/PBS blockiert. Verdünnungen der primären und sekundären Antikörper/-seren wurden in der Blockierungslösung angesetzt. Die Inkubation mit primärem Antikörper/-serum erfolgte 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Nach dem Waschen der Präparate in PBS wurden die Ausstriche für weitere 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C

mit der unten angegebenen Verdünnung des sekundären Antikörpers in der Blockierungslösung inkubiert (Alexa488-konjugierter Ziege-anti-Maus IgG (1:250), FITC-konjugierter Schwein-anti-Kaninchen IgG (1:20), FITC-konjugierter Schwein-anti-Kaninchen IgG (1:20) oder Cy3-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen IgG (1:250)). Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Ausstriche für 10 min mit Hoechst 33258 (3  $\mu$ g/ml) inkubiert, um die Nuklei zu markieren, und dann erneut in PBS gewaschen. Das Material wurde in 87 % Glycerol eingebettet und mittels Konfokaler Laser-Mikroskopie untersucht. Es wurden Anregungs-/Emissions-Filtereinstellungen für FITC-, TRITC- und DAPI-Markierung verwandt.

#### Verwendung von SA13-Serum:

Ein luftgetrockneter Kultur-Ausstrich wurde für 15 min bei -20°C in Aceton inkubiert und nach gründlichem Waschen in TBS für 15 min wurde in einer 5 %igen Milchpulver/TBS-Kaninchen-Serum Lösung blockiert. Als primäres wurde SA13 (1:1000)in Blockierungslösung verwandt. Nach jeweils einer Stunde Inkubation bei 37°C und 4°C und anschließendem Waschen in TBS, wurde 1 h mit sekundärer Antikörperlösung (Ziege-anti-Kaninchen-FITC-Konjugat; 1:20 in Blockierungslösung), inklusive 10 µg/ml PI bei 4°C inkubiert. Schliesslich wurde der Ausstrich mit Mowiol 4-88 (mit 1 mM Phenylendiamin) und einem Deckglas versiegelt.

#### Verwendung von mAb61.3:

Ein luftgetrockneter Ausstrich von angereicherten Schizonten wurde 30 min mit 5 % BSA/PBS/1 %(v/v) Triton X-100 und anschließend mit mAb61.3 (1:500 in der gleichen Lösung; A. Holder, London, GB) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert, in PBS gewaschen und schließlich mit FITC-konjugierten sekundärem Anitkörper (Ziege-anti-Maus-FITC IgG, 1:20 in 5 % BSA/PBS/1 %(v/v) Triton X-100) für 2 h bei RT inkubiert.

#### Verwendung von SA12-Serum und mAb61.3:

Hierzu wurde ein getrockneter Ausstrich von Percoll-angereicherten Schizonten für 30 min bei RT in 5 % Milchpulver/TBS inkubiert und 2,5 h mit SA12 (1:10.000)/mAb61.3 (1:500) in 0,05 % Tween 20 in TBS. Nach dreimaligem Waschen des Ausstrichs in TBS wurden die sekundären Antikörperlösungen (Ziege-anti-Maus-FITC IgG, 1:20, und Schwein-anti-Kaninchen-TRITC IgG, 1:20 in 0,05 % Tween 20/TBS) zugegeben und für 1,5 h bei 4°C inkubiert. Nach wiederholtem Waschen in TBS wurde der Ausstrich mit Mowiol 4-88 (mit 1 mM Phenylendiamin) unter einem Deckglas versiegelt.

#### Verwendung von anti-HAP-IgG:

Ein luftgetrockneter Kultur-Ausstrich wurde für 30 min in 4 % PFA/PBS fixiert, in PBS gewaschen und für 15 min in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl inkubiert. Nach dem Blockieren mit 5 % BSA/PBS für 30 min wurde der Ausstrich mit einer 1:200 Verdünnung der Antikörperlösung in TTBS inkubiert. Schliesslich wurde nach erneutem Waschen in PBS die sekundäre Antikörperlösung mit Alexa488-konjugiertem Ziege-anti-Maus IgG 1:250 in TTBS inklusive 1  $\mu$ g/ml Hoechst 33258 für eine Stunde eingesetzt.

### 2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese Methode der Polyacrylamid-Gelelktrophorese wurde modifiziert nach Laemmli (1970) durchgeführt.

Alle verwendeten Chemikalien waren vom Hersteller mit dem Vermerk *electrophoresis grade* (für die Elektrophorese geeignet) ausgezeichnet.

Stamm-Lösungen:

Acrylamid-Lösung I	29 %(w/v) Acrylamid, 1 %(w/v)
	N,N'-Methylenbisacrylamid
Acrylamid-Lösung II	49 %(w/v) Acrylamid, 1 %(w/v)
	N,N'-Methylenbisacrylamid
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, 0,4 %(w/v) SDS, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, 0,4 %(w/v) SDS, pH 6,8
Elektrophorese-Puffer	25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1 %(w/v) SDS, pH 8,3
TEMED	fertige Lösung
APS	40 %(w/v) APS in ddH <sub>2</sub> O
Probenpuffer	10 %(w/v) Glycerin, 3,1 %(w/v) SDS, 62,5 mM Tris
	pH 6,8, 0,01 %(w/v) Bromphenolblau, 5 %(v/v)
	$\beta$ -Mercaptoethanol (für reduzierende Bedingungen frisch
	zugegeben)

Final: % T ⊨>	10,0 % T	11,0 % T
Trenngelpuffer	0,375 M Tris, 0,1 %	0,375 M Tris, 0,1 %
	SDS, pH 8,8	SDS, pH 8,8
Acrylamid (Lösung	10,0 %	11,0 %
2 verwandt)		
TEMED	0,025 %	0,025 %
APS	0,12 %	0,12 %

Präparation des Trenngels (C = 2%)

Das Sammelgel (C = 3 %) wurde wie folgt hergestellt:

Acrylamid	5,0 % T
(Lösung 1	
verwandt)	
Sammelgelpuffer	0,125 M Tris, 0,1
	% SDS, pH 6,8
TEMED	0,1 %(w/v)
APS	0,12 %(w/v)

Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel zu gleichen Volumenteilen mit Probenpuffer versetzt. Die Denaturierung erfolgte durch Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur, 3 min bei 95°C oder für 15 min bei 65°C.

Es wurden Doppelgelkammern für Glasplatten der Größe 20 x 20 cm<sup>2</sup> (Modell P10DS; Owl Scientific Inc., USA) bzw. Minigelsysteme mit Glasplatten von 10 x 10 cm<sup>2</sup> verwandt (Modell P8DS; Owl Scientific Inc., USA). Bei beiden Systemen wurden Glasplattenabstandhalter von jeweils 1,5 mm Dicke benutzt.

Die Elektrophorese wurde bei 40 mA konstanter Stromstärke duchgeführt bis die Bromphenolblau-Bande das Trenngel erreicht hatte. Dann wurde für den Rest des Laufs eine begrenzte Spannung von 35 mA gewählt.

## 2.2.9 Zweidimensionale Polacrylamid-Gelelektrophorese

Alle verwendeten Chemikalien waren vom Hersteller mit dem Vermerk *electrophoresis grade* (für die Elektrophorese geeignet) ausgezeichnet.

Lösungen:

#### Äquilibrierungspuffer 1

50 mM Tris-HCl pH 8,8
6 M Harnstoff
30 %(v/v) Glycerin
2 %(w/v) SDS
65 mM DTT
eine Spur BPB

#### Äquilibrierungspuffer 2

50 mM Tris-HCl pH 8,8
6 M Harnstoff
30 %(v/v) Glycerin
2 %(w/v) SDS
135 mM IAA
eine Spur BPB

#### **SDS-Elektrophoresepuffer**

25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 %(w/v) SDS pH 8,3

#### Agarose-Lösung

0,5 %(w/v) NA Agarose (Amersham Bioscience) in SDS-Elektrophoresepuffer. Eine Spur BPB Acrylamid-Lösung 11 % T, 2 % C 0,375 M Tris pH 8,8 5 %(v/v) Glycerin

# 2.2.9.1 Die erste Dimension (Isolelektrische Fokussierung)

Für die erste Dimension (Isolelektrische Fokussierung, IEF) der Zwei-Dimensionalen Polacrylamid-Gelelektrophorese (2-D PAGE) wurde die IPGphor-Apparatur (*IPGphor Isolectric Focusing System*) von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwandt.

Es wurden die kommerziell erhältlichen sog. *IPG-DryStrips* (IPG-Gelstreifen; ehemals Amersham Pharmacia Biotech, nun Amersham Bioscience, Freiburg) benutzt. Sie zeichnen sich durch einen in der Gelmatrix immobilisierten pH-Gradienten aus. Diese Polyacrylamid-Streifen sind für verschiedene pH-Gradienten und Gellängen (7-24 cm) verfügbar. Das Gel selbst ist auf eine Plastikfolie (GelBond) aufpolymerisiert. In dieser Arbeit wurden stets 18 cm lange Gelstreifen verwandt. Der entsprechende pH-Gradient im Gel wird im folgenden angegeben.

Die bezogenen IPG-Gelstreifen wurden in dehydrierter Form geliefert. Die Rehydrierung und die IEF konnten in ein und demselben Halterungen (*Strip-Holder*) aus Aluminiumoxid durchgeführt werden. Vor der Verwendung wurden die Halterungen mit Spülmittel (*StripHolder Cleaning Solution*, Amersham Pharmacia Biotech) gründlich gereinigt und intensiv mit ddH<sub>2</sub>O abgespült. Danach wurden die Halterungen unter einem Staubschutz luftgetrocknet.

# 2.2.9.2 Solubilisierung von Proteinen für die erste Dimension

Für die erste Dimension der 2-D PAGE wurde die Probe durch die sog. *in-gel* Reydrationstechnik in den IPG Gelstreifen appliziert.

Die aufzutrennende Proteinprobe wurde mindestens 1:10 in Rehydrierungslösung (s. unten) aufgenommen. Diese Suspension wurde für 15 min bei 18°C im Ultraschallbad bei max.

Leistung ultrabeschallt und schließlich für weitere 15 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 20.000 g und 18°C abzentrifugiert. Nur der Überstand wurde weiter verwandt.

#### 2.2.9.3 Die erste Dimension

Wenn nicht anders erwähnt, wurden stets 18 cm lange *IPGDryStrips* mit einem immobilisierten linearen pH-Gradient von pH 4-7 (Amersham Pharmacia, Amersham Bioscience) verwandt.

Für die einzelnen *IPGDryStrips* wurden geeignete Mengen an Rehydrationspuffer in die Mitte der *StripHolder* pipettiert (350 µl für 18 cm Gel).

Die IEF-Gelstreifen wurden von ihrer Schutzfolie befreit und mit einer Pinzette vorsichtig auf die Rehydrationslösung gelegt.

Es wurde darauf geachtet, dass

a) die Gelseite nach unten zur Rehydrierungslösung wies,

b) die anodische Seite des Gels an der Anode der Halterung zu liegen kam und

c) sich keine Luftblasen unter dem Gel befanden,

d) die Probenlösung nicht auf die GelBond-Folie des IPG-Streifens läuft.

Nach erfolgreichem Auflegen der Gelsstreifen wurden 0,8 bis 1 ml *IPG-Cover Fluid* (Amersham Pharmacia Biotech) auf die oben liegende GelBond-Folie pipettiert, um Verdunstung und Harnstoff-Kristallisierung vorzubeugen. Dann erfolgt abschließend das Auflegen der Abdeckungen der Halterungen, was einen guten Kontakt zwischen Gel und Elektroden gewährleistet, während das Gel quillt.

	Endkonzentration
Harnstoff	8 M
Thioharnstoff	2 M
CHAPS	4 %(w/v)
ASB-14	2 %(w/v)
DTT	40 mM
IPG Puffer (gleicher pH Bereich wie	0,5 %(v/v)
im verwendeten IPG-Streifen)	

Rehydrierungslösung: Wenn im folgenden keine weiteren Angaben gemacht sind, wurde folgender Rehydrierungslösung verwandt:

Die Verdünnung der Probe mit Rehydrierungslösung war empirisch zu ermitteln. Für analytische Gele und Western-Blotting von 2-D Gelen wurden Proteine aus ca.  $2 \times 10^7$  Parasiten, für präparative Gele wurden Proteine aus ca.  $1,5 \times 10^8$  Parasiten extrahiert.

Es wurde folgendes Protokoll für die IEF, pH 4-7, linearer Gradient, Gellänge 18 cm, angewandt:

Rehydrierung	6:00 h
30 V	6:00 h
500 V	0:30 h
1000 V	1:00 h
3000V	1:00 h
8000 V	bis 100.000 Vh erreicht waren

Maximal wurden 50  $\mu$ A/Gelstreifen zugelassen. Die Temperatur wurde bei 18°C gehalten.

# 2.2.9.4 Äquilibrieren des IEF-Gelstreifens für die zweite Dimension

Nach dem Lauf in der ersten Dimension erfolgte die weitere Auftrennung der Proteine aus dem *IPGDryStrip* über die SDS-PAGE.

Hierzu wurde der jeweilige Gelstreifen aus der IPGphor-Apparatur entnommen und in einer Einweg-Plastik-Pipette oder ein anderes passendes Gefäß mit 5 ml Äquilibrierungspuffer 1 für 5 min bei RT inkubiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Gelseite Kontakt zur Flüssigkeit hat. Danach wurde derselbe Gelstreifen in 5 ml frischem Äquilibrierungspuffer 2 für weitere 15 min bei RT inkubiert. Inkubationen erfolgten auf einem Taumeltisch.

# 2.2.9.5 Die Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAGE)

Die zweite Dimension erfolgte nach dem Elektrophoresesystem nach Laemmli (1970) mit der Modifikation, dass in der vertikalen SDS-PAGE auf ein Sammelgel verzichtet wurde (siehe 2.2.8). Das Trenngel wurde bis zu einer Höhe von 0,5 cm vom oberen Glasplattenrand gegossen.

Um den *IPGDryStrip* nach der IEF auf der Oberfläche des SDS-PAGE-Gels zu fixieren, wurde etwas 0,5 %ige Agaroselösung in Elektrophoresepuffer auf die Geloberfläche pipettiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Agaroselösung nicht zu heiss wurde (ca. 50 bis 55°C)

Der Gelstreifen wurde aus der Äquilibrierlösung entnommen, kurz in ddH2O geschwenkt und auf dem Laemmli-Trenngel (11 %=T; 18 x 18 cm<sup>2</sup>) in der Agaroselösung plaziert. Der äquilibrierte Gelstreifen lag gleichmäßig auf der Oberfläche des SDS-PAGE-Gels auf.

Zum Auftrag von Markerproteinen wurden diese in geeigneter Konzentration auf ein 0,5 cm x 0,5 cm großes Whatman-Papierstück pipettiert, welches dann auf der Trenngeloberfläche neben dem IEF-Streifen plaziert wurde. Zur Erleichterung späterer Orientierung wurden die Markerproteine stets direkt neben der anodischen Seite des IEF-Gelstreifens aufgetragen. Der Lauf wurde mit 25 mA/Gel bei 25°C (Wasserbad-Kühlung) durchgeführt bis die Bromphenol Blau-Front ca. 5 mm vom unteren Gelrand entfernt war (ca. 6 h).

Nach dem Lauf wurden die Proteine im Gel mit Silber nach Heukeshoven und Dernick (1988) oder mit kolloidaler Coomassie-Färbung (Neuhoff et al., 1988) sichtbar gemacht (s. unten).

Im Folgenden werden 2-D Gele so abgebildet, dass diejenige Seite des Gels links abgebildet ist, an der sich die Anode während der ersten Dimension befunden hat.

# 2.2.9.6 Besonderheiten bei der Durchführung der 2-D PAGE im präparativen Maßstab

Im Prinzip wurde so vorgegangen wie oben beschrieben. Allerdings wurde die Probe über *Centricon Concentrators* MWCO 10000 entsalzt und möglichst stark eingeengt und nach der *in-gel-* Rehydrierungsphase der rehydrierte *IPGDryStrip* mit Elektrodenplättchen verwandt. Dazu wurde unter Verwendung von 0,5 x 0,5 cm<sup>2</sup> großen, angefeuchteten Elektrodenplättchen den Anweisungen des Herstellers gefolgt.

### 2.2.10 Protein-Färbung mit Silbernitrat

Die Silberfärbung von Proteinen nach der SDS-PAGE bzw. 2-D PAGE wurde modifiziert nach der Methode von Heukeshoven und Dernick (1988) durchgeführt.

Stamm-Lösungen:

Fixierlösung	30 %(v/v) EtOH, 10 %(v/v) Eisessig
Natriumthiosulfat-Lösung	0,02 %(w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
	0,5 M Na-Acetat
	0,5 %(v/v) GA
	30 %(v/v) EtOH
Silbernitrat-Lösung	0,2 %(w/v) AgNO <sub>3</sub> , 0,03 %(v/v) Paraformaldehyd
Entwickler-Lösung	3 %(w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,02 %(v/v) Paraformaldehyd
Stop-Lösung	0,05 M Na <sub>2</sub> -EDTA

Die Gele wurden für 10 min in Fixierlösung geschüttelt. Dann erfolgte die Vorbehandlung der Gele in Natriumthiosulfat-Lösung für 20 min und das Waschen der Gele für 5 x 15 min in ddH<sub>2</sub>O. Dann wurden die Gele in Silbernitrat-Lösung für 30 min inkubiert und nochmals in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Inkubation des Gels in Entwickler-Lösung dauerte so lange bis die gewünschte Farbintensität vorhanden war. Gestoppt wurde die Färbung durch die Stop-Lösung. Die Dokumentation der Gele erfolgte durch Digitalisierung mit einer Auflösung von 300 dpi.

# 2.2.11 Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie-Brillant-Blue G-250

Die Proteinfärbung mit kolloidalem CBB G-250 wurde mit der Methode von Neuhoff et al. (1988) durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

Färbelösung: 1,4 %(w/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in 100 ml ddH<sub>2</sub>O 8 %(w/v) AMS 0,1%(w/v) CBB G-250 20 %(v/v) MeOH

Die Färbung erfolgte für 12 bis 30 h bei RT auf einem Taumeltisch. Das Fortschreiten der Färbung der Proteine im Gel wurde in ddH<sub>2</sub>O festgestellt.

Nach der Färbung der Proteine wurden die Gele kurz in 25 %(v/v) MeOH gewaschen und für eine stabile Aufbewahrung in 25 %(w/v) AMS gebracht.

# 2.2.11.1 Untersuchung zur stadienspezifischen Expression von Proteinen in *P. falciparum*

Aliquots (2 ml) einer mit Sorbitol-Behandlung synchronisierten Plasmodien-Kultur (5 % HCT) wurden zu unterschiedlichen Zeiten entnommen, in Methionin-freiem gepuffertem RPMI-Medium gewaschen und für 6 h mit Methionin-freiem RPMI-Medium mit 0,5 % Albumax II inkubiert, dem 100  $\mu$ Ci [<sup>35</sup>S]-Methionin (Amersham Pharmacia Biotech) zugesetzt worden war. Zu Beginn des Experimentes wurde eine Parasitämie von 4 % mit Trophozoiten in der Kultur mittels Giemsa-Färbung festgestellt. Das Alter des Entwicklungsstadiums der Parasiten war 24 h nach Invasion der Erythrocyten. Alle Entwicklungsstadien befanden sich in einem Zeitfenster von 4 bis 6 h. Nach der Inkubation wurden die Zellen in TBS gewaschen und mit Saponin behandelt. Die freien Parasiten wurden dann in Rehydrationspuffer lysiert und die solubilisierten Proteine wurden in der 2-D PAGE aufgetrennt. In der ersten Dimension wurde ein pH-Gradient von pH 4-7 gewählt. Für die zweite Dimension wurde ein 11 % iges (=T) Trenngel verwandt. Nach dem Lauf wurden die Proteine mit Silberfärbung sichtbar gemacht, dann das Gel unter Vakuum getrocknet und

phototechnisch digitalisiert. Mit dem getrockneten Gel wurde anschließend ein Röntgenfilm Biomax MR (Amersham Pharmacia Biotech) für 1 Woche bei RT exponiert. Nach der Digitalisierung des Röntgenfilms wurden die entsprechenden Bilder des Gels und des Films mit der Zwei-Kanal-Technik nach Bernhardt et al. (1999) bearbeitet.

# 2.2.12 *Western-Blotting*: Transfer von Proteinen auf eine Membran

Zum Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamid-Gel wurde die *Semi-Dry-Blot*-Technik, verändert nach Towbin (1979), angewandt. Als Transferpuffer diente SDS-Elektrophoresepuffer (siehe Kapitel 2.2.8), der mit 20 %(v/v) MeOH versetzt wurde. Proteine wurden ausschließlich auf PVDF-Membranen (Bio-Rad) transferiert. Zum Blotting wurde eine *Semi-Dry-Blot*-Aparatur mit 20 x 20 cm<sup>2</sup> Elektrodenflächen (Amersham Pharmacia Biotech) verwandt. Der Transfer wurde bei 1,5 mA/cm<sup>2</sup> für 1 h durchgeführt.

## 2.2.13 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer PVDF-Membran

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte über die Alkalische Phosphatase-Reaktion.

Verwendete Lösungen:

Blockpuffer:	20 mM Tris-HCl, pH 7,5
	0,05 %(v/v) Tween 20
	150 mM NaCl
	3 %(w/v) Magermilchpulver
TTBS:	20 mM Tris-HCl, pH 7,5
	150 mM NaCl
	0,05 %(v/v) Tween 20
Färbelösung:	100 mM Tris-HCl, pH 9,5
	100 mM NaCl

5 mM MgCl<sub>2</sub> 150 mM BCIP 150 mM NBT

Die Membran wurde nach Elektrotransfer der Proteine für 1 h in Blockpuffer geschüttelt. Anschließend erfolgte unter leichtem Schütteln die Inkubation mit einem primären polyklonalen Antiserum in entsprechender Verdünnung in TTBS über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen in TTBS für 15 min wurden die Membranen mit der sekundären Antikörperlösung für 2 bis 3 h bei RT inkubiert. Sekundäre Antikörper waren mit alkalischer Phosphatase konjugiert (Sigma) und wurden dem Hersteller entsprechend verdünnt eingesetzt. Nach wiederholtem Waschen der Membran erfolgte die Färbereaktion durch Zugabe der Färbelösung. Die Reaktion wurde bei Erreichen der gewünschten Färbeintensität mit ddH<sub>2</sub>O gestoppt.

#### 2.2.14 Massenspektrometrie

# 2.2.14.1 *In-gel-*Fragmentierung von Proteinen und Elution von Peptiden

Verwendete Lösungen: 50 %(v/v) MeCN, 12,5 mM ABC 5 mM ABC 0,3 µg/µl Trypsin (bovin, *sequencing grade*; Roche) in 5 mM ABC 0,1 %(v/v) TFA 0,3 %(v/v) TFA in MeCN MeCN Matrixlösung: 8 mg/ml ACHC in 65 %(v/v) MeCN/0, 1 %(v/v)TFA Die mit kolloidaler Coomassie-Färbung sichtbar gemachten Proteine wurden so eng wie möglich aus dem 2-D-Gel ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in 1 mm<sup>3</sup> grosse Stücke zerschnitten. Die Gelfragmente wurden in 50 % MeCN/12,5 mM ABC gewaschen und in MeCN dehydriert. MeCN wurde dann im Vakuum entfernt. Die Gelstückchen wurden mit 0,03  $\mu$ g/ $\mu$ l Trypsin in 5 mM ABC rehydriert und das gleiche Volumen 5 mM ABC zupipettiert. Die tryptische Spaltung der Proteine im Gel erfolgte über Nacht bei 37°C. Die tryptische Aktivität wurde durch eine finale Konzentration von 0,2 %(v/v) TFA gestoppt. Peptide wurden zunächst mit 0,3 % TFA/MeCN im Ultraschallbad, dann mit 0,1 % TFA/5 % MeCN und erneuter Ultraschallbehandlung extrahiert. Die Eluate wurden im Vakuum eingeengt. Die Peptide wurden mit Hilfe von ZipTip<sub>C18</sub> (10  $\mu$ l Pipettenspitze mit 0,6  $\mu$ l C18-Material, Millipore) konzentriert, mit 0,1 % TFA gewaschen und mit 2,5  $\mu$ l Matrixlösung direkt auf eine Probenplatte (Perseptive Biosystems) eluiert. Die durch die Selbstspaltung von Trypsin entstandenen Peptide wurden in der nachfolgenden MALDI-TOF MS-Analyse zur internen Kalibrierung der Spektren verwandt.

#### 2.2.14.2 MALDI-TOF MS und Datenbanksuche

*Peptide-Mass-Fingerprints* (PMF) von Proteinen, die mittels 2-D PAGE aufgetrennt worden waren, wurden mit einem MALDI-TOF Voyager DE STR Massenspektrometer (Perseptive Biosystems) am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Berlin (FMP Berlin, Abtlg. für Peptidchemie/Massenspektrometrie, Dr. E. Krause) generiert. Messungen wurden im Reflectron-Modus mit einer angelegten Spannung von 20 kV durchgeführt. Die Spektren wurden mit dem Programm Voyager Data Explorer Version 3.5.0.0 ausgewertet.

Die Peptidmassen der generierten PMF wurden zur Suche in Proteinsequenz-Datenbanken verwandt. Dazu wurde das Programm MS-Fit (<u>http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml/msfit.htm</u>) benutzt. Die Datenbanksuchen beschränkten sich auf die nicht-redundante NCBI Datenbank. Es wurde stets eine Massentoleranz von  $\pm$  0,07 Da zugelassen. Oxidierte Methionine, eine Fehlspaltung pro Peptid und die Carbamidomethylierung von reduzierten Cysteinresten wurden bei den Suchen berücksichtigt.

## 2.2.14.3 Sequentielle Extraktion von Proteinen aus Schizontenstadien von *P. falciparum*

Zu angereicherten, sedimentierten Schizonten (200 µl Sediment) wurden 1800 µl ddH<sub>2</sub>O gegeben (inklusive Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Die Mischung wurde für 1 min im Vortexer gut durchmischt und dann bei -20°C eingefroren, dann bei 20°C aufgetaut und nochmals durchmischt. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Das entstandene Lysat wurde im Ultraschallbad für 10 min in Eiswasser behandelt und danach für 20 min bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Daraus ergab sich Überstand 1 (S1) und Sediment 1 (P1). Der Überstand (S1) wurde abgenommen, nochmals zentrifugiert und das entstandene Sediment verworfen. Das Sediment (P1) wurde zu 2 ml in ddH<sub>2</sub>O (inklusive Protease-Inhibitor-Cocktail, Roche) aufgenommen, mittels Vortexer resuspendiert und die Suspension abzentrifugiert. Der entstandene Überstandv (S2) wurde verworfen, das Sediment (P2) wurde für die 2-D PAGE im präparativen Maßstab eingesetzt. Dazu wurde P2 in Rehydrierungslösung aufgenommen und Proteine wie oben beschrieben extrahiert. Die in unlöslichen Komponenten wurden abzentrifugiert und in 200 µl Rehydrierungslösung reduzierendem SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen. Nach Behandlung der Probe mit dem Vortexer wurde zentrifugiert, das entstandene Restpellet in 200 µl reduzierendem SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen und nochmals durchmischt und abzentrifugiert. Die beiden resultierenden Überstände wurden vereinigt (S3). Von den einzelnen Fraktionen wurden entsprechende Volumina für ein Westernblot-Experiment eingesetzt. Hierzu wurde das SA13-Serum verwandt, um AMA-1 in entsprechenden Fraktionen nachzuweisen.

## 2.2.14.4 Extraktion von Proteinen durch Temperaturabhängige Phasentrennung

Das Protokoll wurde verändert nach Smythe et al. (1988) durchgeführt. Triton X-114 wurde in TBS vorkondensiert. Dazu wurden 1,5 g Triton X-114 mit 50 ml TBS versetzt und auf Eis gestellt bis eine klare Lösung entstand. Dann wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt bis die Lösung trübe wurde. Schliesslich wurde bei RT für 10 min bei 1000 g zentrifugiert und die obere Phase verworfen. Die untere Phase wurde mit dem gleichen Volumen eiskalter TBS versetzt und auf 37°C erwärmt. Die Prozedur wurde dreimal wiederholt.

Ein Sediment aus angereicherten Schizonten (250 µl) wurde mit 250 µl TBS und 55 µl vorkondensiertem Triton X-114 versetzt. Die Lyse der Zellen fand für 1 h auf Eis statt. Das Lysat wurde 15 min bei 4°C und 10.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf ein 1 ml Kissen von 6 %(w/v) Saccharose in 10 mM Hepes, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA und 0,5 %(v/v) vorkondensiertes Triton X-114, pH 7,4 gegeben. Es folgte eine Inkubation von 10 min bei 37°C und eine Zentrifugation von 5 min bei 510 g. Der Überstand inklusive Saccharose-Lösung wurde abgenommen und verworfen. Das Sediment (angereichertes Triton X-114) wurde mit 4 Volumen eiskaltem TBS versetzt und auf Eis gestellt bis die Lösung klar wurde. Danach wurde die Lösung wie oben beschrieben auf einem Saccharosekissen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Triton X-114 angereicherte Sediment für die 2-D PAGE eingesetzt. Dazu wurde die Präparation 1:10 mit Rehydrierungslösung versetzt, für 10 min bei 18°C im Ultraschallbad beschallt und für 20 min bei 18°C und 20.800 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur 2-D PAGE einem 18 cm langen IPGDryStrip mit einem linearen pH-Gradient pH 4-7 durch in-gel-Rehydrierung appliziert. Der weitere beschrieben. Proteine wurden mittels kolloidaler CBB G-250-Fortgang ist in Kapitel 2.2.9 Färbung sichtbar gemacht.

## 2.2.14.5 Präparation von rekonstituierten Erythrocyten-Membranen

Es wurde 1 ml Erythrocyten-Konzentrat (50 % HCT in komplettem Kulturmedium; s Kap. 2.2.1) zweimal in PBS bei RT gewaschen. Das Sediment wurde dann mit einem Volumen PBS resuspendiert und mit dem gleichen Volumen einer eiskalten Lösung von 0,04 %(w/v) Saponin in PBS versetzt. Die Lyse fand für 10 min auf Eis statt. Danach wurde ein 10faches Volumen eiskaltes PBS zugegeben und 15 min bei 2000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde grob abgenommen und das lose Sediment nochmals gewaschen. Schliesslich wurde das Sediment in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und in eiskaltem PBS bei 20.000 g und 4°C für 40 min zentrifugiert. Die Rekonstitution der Erythrocyten-Membranen (*Ghosts*) wurde durch ein Lichtmikroskop mit Normarski-Optik überprüft. Die rekonstituierten Erythrocyten-Membranen (*resealed ghosts*) besaßen einen Durchmesser von 7 bis 10  $\mu$ m, wie es für intakte Erythrocyten der Fall ist, doch fehlte die typische bikonkave Form (hier nicht gezeigt).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Präparation von maturen Parasitenstadien

Voraussetzung für eine Reihe der hier durchgeführten Experimente ist die Trennung maturer Parasiten über ein Percoll-Kissen. Die Präparation erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben. Die größte Ausbeute an Schizonten wurde durch vorhergehende Synchronisation des Parasitenwachstums mit Alanin- oder Sorbitol-Behandlungen erreicht, wobei direkt vor der Ernte der infizierten Parasiten die Parasitämie möglichst hoch sein sollte. Abb. 3.1 zeigt ein Percoll-Kissen mit 65 % Percoll/5 % Sorbitol in PBS, über das die Schizonten von nichtinfizierten RBC von früheren Parasitenstadien infizierten RBC getrennt wurden. Insgesamt wurden 1 x 10<sup>9</sup> Zellen aus einer Kultur auf das Percoll-Kissen gegeben. Die Interphase (mit einem Pfeil markiert) zwischen Percoll-Kissen und Überstand enthielt vornehmlich mature Parasitenstadien, wie in Abb. 3.2 nach einer Giemsa-Färbung der Fraktion dargestellt ist. Die Schicht oberhalb der Interphase enthielt Hämozoin-haltiges Material, wie mikroskopisch beobachtet wurde. Diese Fraktion wurde nicht weiter verwandt und verworfen. Es ist nicht sicher, ob es sich dabei um freies Hämozoin und/oder um Parasiten-Debris bzw. intakte Nahrungsvakuolen der Parasiten handelt, das noch Hämozoin enthielt. Das Sediment am Boden des Röhrchens enthielt nichtinfizierte RBC und frühe Parasitenstadien.



Abb. 3.1: Aufnahme eines Zentrifugenröhrchens mit einem Percoll-Kissen (65 % Percoll, 5 % Sorbitol in PBS). Über das Percoll-Kissen sind mature Parasiten (Pfeil) von nichtinfizierten RBC und frühen Parasitenstadien (Zell-Sediment am Boden des Röhrchens) getrennt worden.



Abb. 3.2: Aufnahme von maturen Parasitenstadien nach Anreicherung über ein Percoll-Kissen. Die Zellen wurden jeweils nach Giemsa angefärbt.

#### 3.2 Etablierung der 2-D PAGE für P. falciparum

#### 3.2.1 Untersuchungen zur Effizienz der Proteinextraktion

Die Solubilisierung von Proteinen ist eine elementare Voraussetzung für die Durchführung einer 2-D PAGE (Molloy et al., 1998). Dabei spielt das Extraktionsmedium eine entscheidende Rolle. Zunächst wurden verschiedene Extraktionsmedien auf der Basis bisher veröffentlichter Ergebnisse (Molloy et al., 1998; Rabilloud et al., 1999) auf ihre Wirksamkeit zur Proteinsolubilisierung getestet. 50 µl von jedem Extraktionsmedium wurden mit 10 µl einer Suspension von angereicherten Schizonten (50 % HCT) versetzt und für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Die einzelnen Extrakte wurden dann für 5 min bei 16.000 g zentrifugiert und der Überstand für 20 min bei 100.000 g in einer Ultrazentrifuge nochmals zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde abgenommen und in 100 µl reduzierendem Probenpuffer für die SDS-PAGE (40 mM DTT) gegeben. Die Proben wurden für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert und schliesslich wurden jeweils 75 µl für die SDS-PAGE nach Laemmli (11 % T) eingesetzt. Nach der Auftrennung der Proteine wurde mit kolloidalem Coomassie Brillant Blue G-250 (gemäß Neuhoff et al., 1988) gefärbt. Das Resultat ist in Abb. 3.3 gezeigt. Eine auffallend stärkere Färbung im Vergleich zu allen anderen Spuren erkennt man in Spur 3. Es wurde hier ein Extraktionsmedium mit dem Detergens CHAPS, sowie einem Amidosulfobetain (ASB-14) eingesetzt. Mit diesem Medium wurden die Proteine, die größer als ca. 40 kDa sind, offensichtlich sogar effektiver extrahiert als es durch den SDShaltigen Probenpuffer für die SDS-PAGE der Fall ist. Alle anderen Extraktionsmedien mit oder ohne Detergenzien bzw. Mischungen verschiedener Detergenzien wiesen keine derartige Extraktionseffizienz auf. So scheinen Mischungen von CHAPS und ASB-14 mit ASB-16 oder Triton X-100 im Extraktionsmedium die Banden-Anzahl und -Intensität in der eindimensionalen SDS-PAGE nicht zu erhöhen, sondern eher zu verringern. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Extraktion von Proteinen stark von den verwandten Extraktionsmedien abhängt. Für die Proteinextraktion erwies sich eine Mischung aus Harnstoff, Thioharnstoff, CHAPS, ASB-14 und IPGBuffer am geeignetsten. Diese Mischung wurde daher als Extraktionslösung für die 2-D PAGE eingesetzt und mit einem Standard-



Extraktionsmedium verglichen, welches oft in der 2-D PAGE seinen Einsatz findet (Rabilloud, 1996).

Untersuchung der Effizienz der Proteinextraktion aus iRBC in Abhängigkeit des Abb. 3.3: Extraktionsmediums. Infizierte Erythrocyten wurden mittels Zentrifugation über ein Percoll-Kissen konzentriert, in PBS gewaschen und zu 50 % HCT in PBS mit einer Mischung aus Proteaseinhibitoren (Roche) resuspendiert. 10 µl dieser Suspension wurden jeweils zu 50 µl des entsprechenden Extraktionsmediums gegeben und für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Die Proben wurden für 20 min in einer Ultrazentrifuge (Airfuge, Beckman) bei ca. 100000 g zentrifugiert und der Überstand wurde zu 100 µl reduzierendem Probenpuffer für die SDS-PAGE gegeben und bei RT für 3 h inkubiert. Je 75 µl dieser Lösung wurde für die SDS-PAGE auf ein 11 %iges Gel aufgetragen. Nach dem Lauf wurden die aufgetrennten Proteine mit kolloidalem Coomassie G-250 sichtbar gemacht. Folgende Extraktionsmedien wurden verwandt. Spur 1) 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 40 mM DTT, 0,5 % IPGBuffer pH 4-7; 2) 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 1 % Triton X-100, 40 mM DTT, 0,5 % IPGBuffer pH 4-7; 3) 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 2 % ASB-14, 40 mM DTT, 0,5 % IPGBuffer pH 4-7; 4) 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 2 % ASB-16, 40 mM DTT, 0,5 % IPGBuffer pH 4-7; 5) 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 1 % ASB-14, 1% ASB-16, 40 mM DTT, 0,5 % IPGBuffer pH 4-7; 6) 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 2 % ASB-14, 1% Triton X-100, 40 mM DTT, 0,5 % IPGBuffer pH 4-7; 7) 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 2 % ASB-16, 1 % Triton X-100, 40 mM DTT, 0,5 % IPGBuffer pH 4-7; 8) 62,5 % Tris, 10 % Glycerin, 3,1 % SDS, pH 6.8, 40 mM DTT, 0,01 % Bromphenolblau (SDS-Probenpuffer). Die Molekularmassen der Standardproteine sind jeweils in kDa angegeben.

Proteine aus *P. falciparum* Schizonten wurden in den verschiedenen Extraktionsmedien solubilisiert und in der 2-D PAGE separiert. Abb. 3.4 zeigt Ausschnitte aus zwei unterschiedlichen 2-D-Gelen nach der Silberfärbung. In beiden Fällen wurde ein linearer pH-Gradient von pH 4 bis 7 verwandt. Spalte **A** zeigt Proteinspots nach Solubilisierung von Proteinen aus *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten mit 8 M Harnstoff, 4 % CHAPS, 40 mM DTT und 0,5 % IPG Puffer pH 4-7. Spalte **B** zeigt Proteinspots korrespondierender Gelbereiche nach Protein-Extraktion mit 8 M Harnstoff, 4 M Thioharnstoff, 2 % CHAPS, 40 mM DTT und 1,6 % ASB-14. Für beide Gele wurden die gleichen Proteinmengen eingesetzt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Spotmuster der am stärksten gefärbten Proteinspots als in Spalte **A**. Im Gegenzug sind nahezu alle der ca. 1200 Spots von Gel **A** sind in Gel **B** wiederzufinden. Zusätzlich treten im letzteren noch ungefähr weitere 800 Spots auf, die in Gel **A** nicht zu finden waren.



Abb. 3.4: Vergleich zweier 2-D-Gele. I) Die Spalten A und B zeigen Ausschnitte von zwei verschiedenen 2-D-Gelen. Proteine aus *P. falciparum* (jeweils 10<sup>7</sup> Schizonten) wurden in A und B unterschiedlich solubilisiert. (A) Solubilisierung in 8 M Harnstoff, 4 % CHAPS, 40 mM DTT, 0,5 % *IPGBuffer* pH 4-7. (B) Solubilisierung in 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 2 % ASB-14, 40 mM DTT, 0,5 % *IPGBuffer* pH 4-7. Es wurden 18 cm lange *IPGDryStrips* pH 4-7 verwandt. Nach dem Lauf der zweiten Dimension (11 %T Trenngel) wurden die Proteine im Gel mit Silber gefärbt. II) zeigt das identische Bild, ergänzt mit Markierungen, die das Auffinden korrespondierender einzelner Proteinspots oder –gruppen erleichtern sollen.

# 3.2.2 Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der 2-D PAGE

Trotz der unterschiedlichen Extraktionseffizienz der beiden in Kapitel 3.2.1 verwandten Medien kann hier das Proteinmuster der beiden Gele verglichen werden und differentielle Proteinspots können eindeutig bestimmt werden. Zusätzlich wurde die Reproduzierbarkeit der Proteinmuster in verschiedenen 2-D PAGE-Läufen getestet. Abb. 3.5 zeigt hierzu das Ergebnis zweier Silber-gefärbter 2-D-Gele. Abb. 3.5 A und B zeigen zwei gefärbte 2-D-Gele mit nahezu identischem Proteinmuster. Dies ist in Abb. 3.5 A' und B' verdeutlicht, indem einzelne Proteinspots bzw. Spotmuster umkreist sind, die auf beiden Gelen A und B wiederzufinden sind.

In Abb. 3.5  $\mathbf{A}'$  und  $\mathbf{B}'$  wird auch deutlich, dass die Auftrennung von Proteinen mit großen Molekularmassen (100 bis 150 kDa) reproduzierbar erfolgte. In Abb. 3.6 sind exemplarische Bereiche der beiden hier gezeigten Gele vergrößert dargestellt, um die Muster von weniger abundanten Proteinspots zu vergleichen. Bei den entsprechenden Gelausschnitten kann man das Muster der Proteinspots beider Gele wiederfinden, selbst wenn die jeweiligen Proteine nur schwach angefärbt worden sind.



Abb. 3.5: Darstellung zweier 2-D-Gele. Proteine aus angereicherten Schizontenstadien wurden in 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % CHAPS, 1.6 % ASB-14, 40 mM DTT und 0,5 % *IPGBuffer* pH 4-7 solubilisiert. Es wurden 18 cm lange *IPGDryStrips* pH 4-7 verwandt. Nach dem Lauf der zweiten Dimension (11 %T Trenngel) wurden die Proteine im Gel mit Silber gefärbt. Zur Verdeutlichung sind entsprechende Gele mit exemplarischer Markierung reproduzierter Proteinspots gezeigt (A´, B´). Die Molekularmassen der Standardproteine sind jeweils in kDa angegeben.



Abb. 3.6: Darstellung verschiedener Ausschnitte aus zwei 2-D-Gelen. In jeder Spalte handelt es sich um Ausschnitte aus jeweils einem Gel (Abb. 3.5). Proteine aus angereicherten Schizontenstadien wurden in 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % CHAPS, 1.6 % ASB14, 40 mM DTT und 0,5 % *IPGBuffer* pH 4-7 solubilisiert. Es wurden 18 cm lange *IPGDryStrips* pH 4-7 verwandt. Nach dem Lauf der zweiten Dimension (11 %T Trenngel) wurden die Proteine im Gel mit Silber gefärbt.

#### 3.3 Isolierung von Rhoptrien aus *P. falciparum*

Rhoptrien wurden, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, mittels Ultrazentrifugation über einen Saccharose-Gradienten isoliert. Einzelne Fraktionen dieses Gradienten wurden daraufhin getestet, ob sie mit Antiserum SA12 gegen das AMA-1-Protein aus *P. falciparum* reagierten. AMA-1 ist bekannt dafür, dass es sich in den halsförmigen Kanälen der Rhoptrien befindet (Crewther et al., 1990; Narum und Thomas, 1994). Somit diente der Nachweis von AMA-1 dazu, Rhoptrien in Fraktionen des Saccharosegradienten nachzuweisen.


Abb. 3.7: Immunfluoreszenz-Aufnahmen eines Schizonten-infizierten Erythrocyten. A: Lokalisation von AMA-1; B: Kernfärbung mit PI; C: Überlagerte Bilder A und B. Maßstab: 5 μm.

Wie man in Abb. 3.7 A sieht, erkennt das SA13-Serum paarige Strukturen. Dies ist das typische Fluoreszenz-Signal, das Rhoptrien in maturen Schizonten zeigen.



Abb. 3.8: Immunfluoreszenz-Aufnahmen eines Schizonten-infizierten Erythrocyten zur Lokalisation von AMA-1 und RHOP-H1; A: Lokalisation von RHOP-H1; B: Lokalisation von AMA-1; C: Überlagerte Bilder A und B.

Zusätzlich wurde überprüft, ob das anti-AMA-1-Serum die gleichen Strukturen erkennt, wie mAb61.3, der monoklonale Antikörper, der RHOP-H1 erkennt, welches in den Rhoptrien lokalisiert ist (zur Verfügung gestellt von A. A. Holder, Mill Hill, London, GB; Holder et al., 1985b). Abb. 3.8 zeigt das Ergebnis. In Abb. 3.8 C kann man eine Kolokalisation von AMA-1 und RHOP-H1 erkennen. Beide Signale zeigen ein identisches Muster, allerdings scheint AMA-1 nicht exakt mit RHOP-H1 zu kolokalisieren, sondern beide Signale liegen etwas versetzt zueinander.

Zur Isolierung von Rhoptrien wurden als Startmaterial angereicherte Schizonten eingesetzt. Mittels Stickstoff-Dekompression wurde aus den infizierten Erythrocyten ein Homogenat hergestellt. Intakte Zellen und Zelldebris wurden durch Zentrifugation entfernt und die Bestandteile des resultierenden Überstands über einen Dichte-Gradienten getrennt, wie es in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben ist. Die einzelnen Fraktionen aus dem Gradienten wurden mittels SDS-PAGE und Westernblotting auf das Vorhandensein von AMA-1 überprüft. Wie in Abb. 3.9 zu sehen, wurden in den Fraktionen 9 bis 12 Proteine nachgewiesen, die die Molekularmassen der Proform (83 kDa) und der maturen Form von AMA-1 (62 kDa) besitzen (Howell et al, 2001). Außerdem konnten mit demselben Antiserum in den Fraktionen 10 bis 14 drei Proteine mit einer Molekularmasse um 50 kDa nachgewiesen werden.



Abb. 3.9: *Immun-Blot*: Nachweis von AMA-1 in Fraktionen des Saccharose-Dichte-Gradienten durch Antiserum SA12 (1:10.000 in TTBS). Die Fraktionen sind in aufsteigender Reihenfolge vom oberen Ende des Gradienten (niedrigste Dichte) bis nach unten (höchste Dichte) nummeriert. Bei Fraktion SM handelt es sich um das Startmaterial nach dem Aufschluß der Parasiten (Positiv-Kontrolle). Es wurden in allen Spuren gleiche Volumina aufgetragen (20 µl). Die Fraktionen 9 bis 12 wurden als positiv reagierende Spuren eingeschätzt, hier waren die Doppelbanden zu erkennen, die nach den Größenstandards die Molekularmassen von maturem AMA-1 und der Proform besitzen (angedeutet durch Pfeile).

Ein Westernblot mit Fraktionen einer anderen Präparation wurde zum Nachweis von EBA-175, einem Protein der Micronemen, eingesetzt. EBA-175 wurde hier auch in Fraktionen hoher Dichte nachgewiesen.



Abb. 3.10: Nachweis von EBA-175 in Fraktionen hoher Dichte aus einer Rhoptrien-Präparation. Die Fraktionen sind in aufsteigender Reihenfolge vom oberen Ende des Gradienten (niedrigste Dichte) bis nach unten (höchste Dichte) nummeriert. Es wurden in jeder Spur gleiche Volumina der einzelnen Fraktionen eingesetzt. Ganz rechts wurden 2 μl gepackte Schizonten in SDS-Probenpuffer aufgetragen. Der Lauf fand unter reduzierenden Bedingungen statt. Der Kaninchen-anti-EBA-175-IgG wurde 1:500 eingesetzt (Dr. A. Mayer, Walter und Elisa Hall Institute, Melbourne, Australien; Reed et al., 2000).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass nach Western-Blotting von 2-D Gelen durch das SA12-Serum ebenfalls Signale bei ca. 60 und 80 kDa auftraten (Abb. 3.11). Es handelte sich dabei nicht um jeweils einen einzigen Proteinpunkt, sondern um jeweils drei bis vier Punkte mit entsprechender Molekularmasse. Warum es zu dieser Auftrennung in der ersten Dimension der 2-D PAGE kam, ist unklar. Die pI-Werte der markierten Proteinspots liegen im Bereich der pI-Werte, die für die Proform und mature Form von AMA-1 kalkuliert wurden (pI 5,3 und 5,5).

Die Fraktionen 9 bis 12 des Dichte-Gradienten wurden zusammengeführt, das Volumen über Ultrafiltration eingeengt und in Rehydrationspuffer für die 2-D PAGE umgepuffert. Danach erfolgte eine 2-D PAGE und die Silberfärbung der aufgetrennten Proteine. Das Ergebnis ist in Abb. 3.12 dargestellt. Es handelt sich bei diesem Gel um ein sogenanntes *Mastergel*. Dies bedeutet, dass dieses Gel als Vorlage dafür dienen soll, in präparativen Gelen diejenigen Proteine zu finden, die sich in den ausgewählten Fraktionen des Dichtegradienten zur Isolierung von Rhoptrien befanden. In dem *Mastergel* konnten 123 Proteinspots ausgemacht werden, die ihren pI im Bereich von pI 4 bis 7 besitzen und eine Molekularmasse zwischen 20 und ca. 300 kDa aufweisen.



Abb. 3.11: *Immun-Blot*: Nachweis von AMA-1 durch Antiserum SA12 (1:10.000 in TTBS). Es wurden Proteine aus einem Gesamt-Extrakt von angereicherten Schizonten mittels 2-D PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Es wurden wie angegeben zwei verschiedene pH-Gradienten in der ersten Dimension verwandt (pH 4-7 und pH 5-6). Durch Pfeile sind die Positionen der markierten Proteine mit den Molekularmassen der Pro- und der maturen Form von AMA-1 angegeben.



Abb. 3.12: Mit Silberfärbung sichtbar gemachte Proteine aus Fraktionen des Saccharose-Gradienten nach 2-D PAGE, in denen AMA-1 nachgewiesen werden konnte. Es wurde ein pH-Gradient von pH 4 bis 7 in der ersten Dimension verwandt. Die Molekularmassen der Grössenstandards sind jeweils in kDa angegeben.

In einem weiteren Experiment wurden einzelne Fraktionen des Dichte-Gradienten elektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 3.13). In Fraktionen mit hoher physikalischer Dichte (1,14 bis 1,16 g/ml) konnten zahlreiche Vesikel erkannt werden. Zum großen Teil besaßen diese Vesikel Durchmesser von 200 bis 400 nm, wie es für Rhoptrien bekannt ist. Es befanden sich allerdings auch kleinere vesikuläre Strukturen in den gleichen Fraktionen. In weiteren Fraktionen des Gradienten konnten keine solche Strukturen festgestellt werden. In einer Fraktion vom Boden des Gradientenröhrchens (höchste spezifische Dichte) waren zahlreiche Percoll-Partikel zu finden, die vermutlich durch die Anreicherung von Schizonten zu Beginn der Präparation in den Gradienten eingetragen worden waren.



Abb. 3.13: Darstellung der Anreicherung von Rhoptrien durch einen Saccharose-Gradienten mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Die Fraktionen, die Rhoptrien enthielten (A-C), wurden dem Gradienten entnommen (links schematisch durch den Balken angedeutet). In (C) ist die flaschenähnliche Form der Rhoptrien gut zu erkennen. (D) Fraktion mit höherer Dichte und ohne vesikuläre Strukturen. Hier erkennt man Percoll-Partikel, die aufgrund der vorangegangenen Prozedur der Schizonten-Präparation in jeder Fraktion des Saccharose-Gradienten zu erkennen waren.

### 3.4 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

Zur Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF MS war es nötig, 2-D-Gele im präparativen Maßstab herzustellen. Präparative Gele wurden nach der Proteinfärbung mit analytischen Gelen verglichen und ausgewählte Proteinspots massenspektrometrisch untersucht. Abb. 3.14 zeigt exemplarisch einen solchen Vergleich zwischen dem *Mastergel* aus der Rhoptrien-Präparation (s. Kapitel 3.3) und einem präparativen Gel, in dem Proteine aus einem Gesamtextrakt von angereicherten Schizonten aufgetrennt wurden.



Abb. 3.14: Vergleich von Ausschnitten aus dem analytischen Mastergel (linke Spalte) und aus einem präparativen Gel mit Proteinen aus einem Gesamt-Schizonten-Extrakt (rechte Spalte). Proteine, die in beiden Gelen gefunden wurden, sind mit Pfeilen markiert.

Aus dem präparativen Gel wurden 39 Proteinspots analysiert (Abb. 3.15). Die Ergebnisse sind in Tab. 2 dargestellt und in Abb. 3.20 graphisch zusammengefasst. Der größte Teil der untersuchten Proteine ist plasmodialen Ursprungs (75 %), lediglich 10 % sind humane Proteine und 15 % der Proteine konnten nicht identifiziert werden. Bei ca. 1/3 der identifizierten Proteine aus *P. falciparum* (34 %) ist nichts über deren biologische Funktion bekannt. Ein ähnlicher Anteil (31 %) wurde bisher noch nicht zellulär lokalisiert bzw. es konnten keine Homologien zu bisher lokalisierten Proteinen aus anderen Organismen festgestellt werden. Bei 38 % der plasmodialen Proteine wurde ein Signalpeptid vorhergesagt und in 5 von 7 Fällen trifft dies für die hier gefundenen "hypothetischen" Proteine zu, die insgesamt 24 % der identifizierten Proteine aus *P. falciparum* ausmachen. Nur im Falle eines einzigen Proteins, eine mutmaßliche Proteasomen-Untereinheit (Zugangs-Nr. 23499217), konnte eine Transmembran-Domäne vorhergesagt werden.



Abb. 3.15: 2-D Gel mit aufgetrennten Proteinen aus einem Gesamtextrakt von Schizonten-infizierten Erythrocyten. In der ersten Dimension der 2-D PAGE wurde ein pH-Gradient von pH 4 bis 7 verwandt. Die Markierungen und Numerierungen zeigen diejenigen Proteine, die für die MALDI-TOF MS-Analyse ausgesucht wurden. Links sind die Molekularmassen der verwandten Proteinstandards in kDa angegeben.

Protein- Nr.	Erhaltene Fragmente	Treffer	Exp. MW	Theor. MW	% Seq	Identifiziertes Protein	Zugangs-Nr. (GI)	Gen-Locus	Exp. pl/ Theor. pl	SP	тм
1	68	49	250	271	24	ALPHA SPECTRIN, HUMAN	1174412	n.b.	5,1 / 5,0	n.b.	n.b.
2	45	22	100	111	22	SERINE RICH ANTIGEN/PAPAIN- LIKE PROTEINASE (SERA)	16804967	PFB0340c	5,4 / 5,3	1	0
3	46	28	70	72	44	HEAT SHOCK PROTEIN	23613697	PFI0875w	5,3 / 5,2	1	0
4	33	6	80	74	11	HEAT SHOCK 70 KDA PROTEIN	23612827	PF08_0054	5,6 / 5,5	0	0
5	31	12	65	54	34	HEAT SHOCK COGNATE PROTEIN 54, HUMAN	11526573	n.b.	5,6 / 5,6	n.b.	n.b.
6	36	24	70	75	39	HEAT SHOCK 70 KDA PROTEIN	23612827	PF08_0054	5,8 / 5,5	0	0
7	43	22	65	72	38	HEAT SHOCK PROTEIN, HOMOLOGUE PFHSP 70-3	11127605	PF11_0351	5,8 / 5,9	0	0
8	34	18	65	69	29	V-ATP SYNTHASE, SUBUNIT A	23615264	PF13_0065	5,8 / 5,3	0	0
9	28	0	60	-	-	-	-	-	/ -	-	-
10	13	5	60	52	16	ELF-4A-LIKE DEAD FAMILY RNA HELICASE	16804988	PFB0445c	6,0 / 5,7	0	0
11	35	18	60	59	36	T-COMPLEX PROTEIN BETA SUBUNIT, PUTATIVE	23957736	PFC0285c	5,8 / 5,5	0	0
12	0	0	60	-	-	-	-	-	5,7 / -	-	-
13	23	5	60	52	8	HYP. PROTEIN	23505021	PFI0590c	5,3 / 5,9	0	0
14	38	16	65	52	31	HYP. PROTEIN	23508493	PF11_0302	5,1 / 5,0	1	0
15	30	16	65	52	30	HYP. PROTEIN	23508493	PF11_0302	5,1 / 5,0	1	0
16	20	4	60	61	8	IMPORTIN ALPHA, PUTATIVE	23612892	PF08_0087	5,4 / 5,2	0	0

Protein- Nr.	Erhaltene Fragmente	Treffer	Exp. MW	Theor. MW	% Seq	Identifiziertes Protein	Zugangs-Nr. (GI)	Gen-Locus	Exp. pl/ Theor. pl	SP	тм
17	40	20	50	42	49	ACTIN I	113224	PFL2215w	5,3 / 5,2	0	0
18	37	14	50	21	22	RNA HELICASE, PUTATIVE	23509877	PF14_0655	5,6 / 5,5	0	0
19	23	0	50	-	-	-	-	-	5,9 / -	-	-
20	14	0	50	-	-	-	-	-	5,9 / -	-	-
21	24	0	50	-	-	-	-	-	6,0 / -	-	-
22	15	5	50	32	13	TRANSLATION ELONGATION FACTOR 1 BETA	6740011	PFI0645w	5,2 / 4,9	0	0
23	18	5	40	90	7	HYP. PROTEIN	23504707	PFE1105c	4,9 / 6,6	0	0
24	19	10	40	52	23	HAP, PUT. ASPARTIC PROTEINASE	23509299	PF14_0078	5,1 / 8,0	1	0
25	23	4	35	33	17	EXPORTED PROTEIN 2 (EXP-2)	23509900	PF14_0678	5,2 / 5,3	1	0
26	21	4	35	33	28	EXPORTED PROTEIN 2 (EXP-2)	23509900	PF14_0678	5,2 / 5,3	1	0
27	46	14	35	41	40	MEROZOITE SURFACE PROTEIN 7 (MSP-7)	23619291	PF13_0197	5,4 / 4,7	1	0
28	35	13	35	56	16	FALCIPAIN 2 PRECURSOR, PUTATIVE	23508352	PF11_0161	5,2 / 8,0	1	0
29	0	-	35	-	-	-	-	-	5,1 / -	-	-
30	22	10	35	28	51	PROTEASOME SUBUNIT ALPHA TYPE 5, PUTATIVE	23612640	PF07_0112	4,9 / 5,0	0	0
31	34	5	25	25	25	HYP. PROTEIN	23613776	PFI1270w	5,1 / 5,5	1	0
32	37	9	25	25	34	HYP. PROTEIN	23505159	PFI1270w	4,9 / 5,5	1	0
33	31	6	25	24	25	BETA 3 PROTEASOME SUBUNIT, PUTATIVE	23613439	PFA0400c	5,1 / 5,1	0	0

Protein- Nr.	Erhaltene Fragmente	Treffer	Exp. MW	Theor. MW	% Seq	Identifiziertes Protein	Zugangs-Nr. (GI)	Gen-Locus	Exp. pl/ Theor. pl	SP	тм
34	28	11	35	31	29	PHOSPHOETHANOLAMINE N- METHYLTRANSFERASE, PUTATIVE	23619361	MAL13P1.214	5,7 / 5,4	0	0
35	30	11	35	31	44	PHOSPHOETHANOLAMINE N- METHYLTRANSFERASE, PUTATIVE	23619361	MAL13P1.214	5,7 / 5,4	0	0
36	25	9	35	33	31	PROTEASOME SUBUNIT ALPHA, PUTATIVE	23499217	MAL8P1.128	5,7 / 5,9	0	1
37	19	6	35	29	26	PROTEASOME SUBUNIT ALPHA TYPE 1, PUTATIVE	23509938	PF14_0716	5,8 / 5,5	0	0
38	28	13	25	22	50	THIOREDOXIN POD, RBC	9955007	n. b.	5,7 / 5,7	n. b.	n. b.
39	26	15	25	22	51	THIOREDOXIN POD, RBC	9955007	n. b.	5,7 / 5,7	n. b.	n. b.

Tab. 1: (vorherige Seiten) Zusammenfassende Ergebnisse der massenspektrometrischen Identifizierung von Proteinen aus einem 2-D-Gel zur Identifizierung mutmaßlicher Rhoptrienproteine (zu Abb 3.15). Angegeben sind die Numerierung der Proteinspots, wie sie Abb. 3.15 zu entnehmen ist. Zusätzlich ist die im entsprechenden Massenspektrum ermittelte Anzahl der Peptidfragmente verzeichnet, die durch die tryptische *In-gel*-Spaltung entstanden sind, sowie die Anzahl der in der Datenbank gefundenen Peptide, die der jeweiligen Aminosäuresequenz des identifizierten Proteins entsprechen (Treffer), und die sich aus den Treffern ergebene Sequenzabdeckung in Prozent (% Seq). Außerdem ist die im Gel experimentell ermittelte Molekularmasse des untersuchten Proteins (Exp. MW) und die theoretische Molekularmasse des entsprechenden identifizierten Proteins (Theor. MW) in kDa, der experimentell ermittelte pl (Exp. pl) und der theoretisch berechnete pl (Theor. pl) (MS-Fit, Protein-Prospektor) angegeben. Bei erfolgreicher Identifizierung sind die Bezeichnung des Proteins und seine GI-Zugangsnummer angegeben. Bei identifizierten Proteinen aus *P. falciparum* wurde zusätzlich die Bezeichnung des Gen-Locus eingefügt, sowie die Anzahl der vorhergesagten Signalpeptide (SP) und/oder Transmembran-domänen bzw. GPI-Modifikationen (TM). Dazu wurde auf die ermittelten Daten von Florens et al. zurückgegriffen (Florens et al., 2002) bzw. SignalP 2.0 (Nielsen et al., 1997) und TMHMM 2.0 (Krogh et al., 2001) verwandt (n.b.: nicht bestimmt).



Abb. 3.16: Prozentuale Verteilung der untersuchten Proteine aus Abb. 3.15 bezüglich ihrer biologischen Funktion/Aktivität oder zellulären Lokalisation. Identifizierte humane Proteine und bis dato durch den *Peptide Mass Fingerprint* nicht identifizierbare Proteine sind ebenfalls aufgeführt. Außerdem ist dargestellt, bei welchem Anteil der identifizierten plasmodialen Proteine ein Signalpeptid vorhergesagt werden konnte, welchen Anteil die hypothetischen Proteine, bereits bekannte Proteine und Proteine mit mutmaßlicher biologischer Funktion/Aktivität (in der Datenbank mit dem Vermerk "putative" ausgestattete Genprodukte) ausmachen.

# 3.5 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen nach subzellulärer Fraktionierung infizierter Erythrocyten



Abb. 3.17: Schema der Vorgehensweise zur subzellulären Fraktionierung aus einem Parasiten-Homogenat mit anschließender massenspektrometrischer Analyse von Proteinen. Das Startmaterial (angereicherte mature Parasiten) sowie die Fraktionen nach differentieller Zentrifugation (8000 g und 130000 g) wurden im Westernblot auf das Vorhandensein von AMA-1 getestet. Das Sediment nach der Ultrazentrifugation wurde für die präparative 2-D PAGE verwandt und gefärbte Proteine der MALDI-TOF MS-Analyse zugeführt (siehe unten).

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, wurden Proteine aus einem Gesamtextrakt durch 2-D PAGE aufgetrennt, einige Proteinspots ausgewählt und mittels MALDI-TOF MS untersucht. Um eine Anreicherung und teilweise Reinigung von Proteinen zu erreichen, die mit subzellulären Strukturen assoziiert sind, wurde ein weiterer Ansatz zur Probenpräparation eingeführt. Wie schematisch in Abb. 3.17 dargestellt ist, wurde aus Schizontenstadien durch Stickstoff-Dekompression ein Homogenat erstellt und dieses differentiell zentrifugiert. Schließlich wurde ein Sediment erhalten, dessen Proteine für eine präparative 2-D PAGE eingesetzt wurden. Das Ergebnis ist in Abb. 3.18 zu sehen.



Abb. 3.18: Präparatives 2-D-Gel mit Proteinen, die aus Parasiten-Homogenat durch Ultrazentrifugation sedimentiert worden waren (gemäß Abb. 3.17). Es wurde ein pH-Gradient von pH 4 bis 7 in der ersten Dimension verwandt. Die Molekularmassen der Grössenstandards sind jeweils in kDa angegeben. Die Proteine, die für die MALDI-TOF MS-Analyse verwandt wurden, sind numerisch markiert. Die den Proteinen entsprechenden Nummern mit den Ergebnissen der massenspektrometrischen Identifizierung sind in der folgenden Tabelle angegeben.



Abb. 3.19: Vergleich von Ausschnitten zweier 2-D-Gele. A) Silbergefärbtes Mastergel aus der Rhoptrien-Präparation; B) Präparatives 2-D Gel nach Subfraktionierung des Parasiten-Homogenates (wie in Abb. 3.17 dargestellt). Proteinspots, die in beiden Gelen zu finden waren, sind hier mit Pfeilen markiert.

Die Proteinspot-Muster dieses Gels wurden mit jenem des Rhoptrien-Mastergels verglichen, wie in Abb. 3.19 dargestellt. 79 Proteinspots des präparativen Gels wurden für die massenspektrometrische Analyse eingesetzt. Ein großer Anteil (32 %) der untersuchten Proteinspots konnte bisher nicht identifiziert werden. Dazu kommen noch 24 %, die humanen oder bovinen Ursprungs sind. Die identifizierten Proteine aus *P. falciparum* (44 %) wurden im Folgenden separat unterteilt. Proteine aus *P. falciparum* wurden danach eingeteilt, ob deren zelluläre Lokalisation oder deren Funktion bzw. Aktivität bereits bekannt oder noch unbekannt ist. Dabei wurde auf Literaturdaten zurückgegriffen. Genprodukte mit signifikanten Sequenzähnlichkeiten zu anderen Proteinen aus *P. falciparum* oder anderen Organismen, deren Funktion, Aktivität oder Lokalisation bekannt ist, wurden entsprechend der Kategorie von Proteinen mit bekannter Lokalisation oder Funktion/Aktivität zugeordnet. Als Beispiel sei hier eine mutmaßliche Proteasomen-Untereinheit (Zugangs-Nr.: 23498939)

genannt. Dieses hier identifizierte Protein hat in seiner Sequenz große Identität zu Proteasomen-Untereinheiten aus Trypanosoma brucei brucei und Drosophila melanogaster (http://www.plasmodb.org/plasmodb/servlet/sv?page=gene&source\_id=PF07\_0112&detail=; in beiden Fällen >50 %). Ein Signalpeptid wurde nicht vorhergesagt. Demnach wurde hier angenommen, dass die Lokalisation dieses Proteins cytosolisch ist. In Abb. 3.20 ist ersichtlich, dass ca. <sup>1</sup>/<sub>4</sub> der identifizierten Proteine aus P. falciparum (26 %) keinem zellulären Kompartiment zuzuordnen ist. Anders sieht es bei den Zuordnungen bezüglich der biologischen Funktion oder der Aktivität eines Proteins aus. Für 60 % der identifizierten Proteine gibt es keine gesicherten Hinweise über ihre Funktion oder spezifische Aktivität. Hier seien einige Proteine der parasitophoren Vakuole als Beispiel erwähnt. EXP-1, EXP-2 und SERA konnten zwar in der parasitophoren Vakuole lokalisiert werden (Debrabant et al., 1992; Delplace et al., 1987; Johnson et al., 1994; Simmons et al., 1987), ihre biologische Funktion ist allerdings noch unklar (Fischer et al., 1998; Miller et al., 2002). Es fällt auf, dass bei ca.  $^{2}/_{3}$  (63 %) der hier gefundenen Proteine aus *P. falciparum* ein Signalpeptid vorhergesagt werden konnte. Dies trifft für alle gefundenen hypothetischen Proteine zu, wie auch für bereits bekannte Proteine, die zu extracytosolischen Kompartimenten transportiert werden müssen. Hier seien als Beispiele einige Plasmepsine und die histo-aspartic protease (HAP) der Nahrungsvakuole genannt (Banerjee et al., 2002), die Proteine der parasitophoren Vakuole (EXP-1, EXP-2, SERA; Delplace et al., 1987; Johnson et al., 1994), auf die Oberfläche der Merozoiten exportierte Proteine (MSP-1, MSP-7, ABRA) (Kushwaha et al., 2000; Pachebat et al., 2001) und Proteine anderer Kompartimente wie ein Calcium-bindendes Protein des ER (La Greca et al., 1997) und eine Protein-Disulfid-Isomerase, die vermutlich ER auch im anzutreffen ist http://plasmodb.org/plasmodb/servlet/sv?page=gene&source\_id=MAL8P1.17&detail). Für ein Hitze-Schock-Protein (Heat-Shock Protein, HSP) wurde ein Signalpeptid vorhergesagt, seine zelluläre Lokalisation ist nicht bekannt aber (http://www.plasmodb.org/plasmodb/servlet/sv?page=gene&source\_id=PFI0875w&detail). Proteine von P. falciparum mit vorhergesagter bzw. experimentell ermittelter Membran-Assoziation wurden bei der hier angewandten Subfraktionierung nur im Fall von MSP-1 und EXP-1 gefunden.

Protein-Nr.	Erhaltene Fragmente	Treffer	Exp. MW	Theor. MW	% Seq	Identifiziertes Protein	Zugangs-Nr. (GI)	Gen-Locus	Exp. pl/	SP	тм
1	64	25	270	280	23	ALPHA SPECTRIN, ERYTHROCYTIC, HUMAN	13639059	n. b.	5,1 / 5,0	n. b.	n. b.
2	7	0	200	-	-	-	-	-	5,7 / -	-	-
3	33	14	150	147	26	HYPOTHETICAL PROTEIN, CONSERVED	23499274	PF08_0137	5,8 / 5,8	1	0
4	25	13	120	112	14	SERINE-REPEAT ANTIGEN PROTEIN PRECURSOR	23613549	PF0340c	5,5 / 5,2	1	0
5	22	0	120	-	-	-	-	-	5,8 / -	-	-
6	15	0	110	-	-	-	-	-	5,9 / -	-	-
7	19	0	90	-	-	-	-	-	6,2 / -	-	-
8	14	0	85	-	-	-	-	-	6,3 / -	-	-
9	25	7	90	86	16	COMPLEMENT FACTOR B, HUMAN	14782402	n. b.	6,5 /	n.b.	n.b.
10	21	5	100	87	9	101 KDA MALARIA PROTEIN, (ACIDIC BASIC REPEAT ANTIGEN, ABRA)	113005	PFL1385c	5,1 / 4,8	1	0
11	25	7	110	130	9	GBP PRECURSOR	23495024	PF10_0159	4,9 / 5,0	1	0
12	13	0	100	-	-	-	-	-	4,8 / -	-	-
13	15	0	85	-	-	-	-	-	4,6 / -	-	-
14	14	4	90	96	6	GLYCOPHORIN-BINDING PROTEIN 130 PRECURSOR	23507963	PF10_0159	4,6 / 5,0	1	0
15	13	0	90	-	-	-	-	-	4,3 / -	-	-
16	7	0	100	-	-	-	-	-	5,8 / -	-	-
17	61	16	90	95	23	ENDOPLASMIN HOMOLOG PRECURSOR, PUTATIVE	23508908	PFL1070c	5,6 / 5,3	1	0

Protein-Nr.	Erhaltene Fragmente	Treffer	Exp. MW	Theor. MW	% Seq	Identifiziertes Protein	Zugangs-Nr. (GI)	Gen-Locus	Exp. pl/ Theor. pl	SP	тм
18	23	0	75	-	-	-	-	-	5,9 / -	-	-
19	40	15	70	74	24	HEAT SHOCK PROTEIN	23612827	PF08_0054	5,8 / 5,5	0	0
20	26	0	70	-	-	-	-	-	6,1 /	-	-
21	40	16	65	71		SERUM ALBUMIN, BOVINE	1351907	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
22	26	12	70	68	25	HUMAN SERUM ALBUMIN	4389275	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
23	16	0	55	-	-	-	-	-	6,3 / -	-	-
24	19	0	60	-	-	-	-	-	6,2 / -	-	-
25	28	13	65	71		SERUM ALBUMIN, BOVINE	1351907	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
26	33	11	60	69	20	V-ATP SYNTHASE, CATALYTIC SUBUNIT A	23615264	PF13_0065	5,9 / 5,5	0	0
27	15	10	60	72	21	HEAT SHOCK PROTEIN	23508542	PF11_0351	5,9 / 5,9	0	0
28	12	8	65	70	15	HSP-70, HUMAN	6729803	n. b.	5,8 / 6,7	n. b.	n. b.
29	31	12	65	54	34	HEAT SHOCK COGNATE PROTEIN 54, HUMAN	11526573	n. b.	5,7 / 5,6	n. b.	n. b.
30	26	0	70	-	-	-	-	-	5,7 / -	-	-
31	21	9	70	71	15	BOVINE SERUM ALBUMIN	3336842	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
32	27	16	70	72	31	HEAT SHOCK PROTEIN	23613697	PFI0875w	5,4 / 5,2	1	0
33	27	16	70	72	31	HEAT SHOCK PROTEIN	23613697	PFI0875w	5,3 / 5,2	1	0
34	23	6	55	52	13	HYP. PROTEIN	23508493	PF11_0302	5,2 / 5,0	1	0
35	14	0	55	-	-	-	-	-	5,7 / -	-	-
36	22	0	55	-	-	-	-	-	5,8 / -	-	-

	1		1	1	1	1	[			1	
Protein-Nr.	Erhaltene Fragmente	Treffer	Exp. MW	Theor. MW	% Seq	Identifiziertes Protein	Zugangs-Nr. (GI)	Gen-Locus	Exp. pl/ Theor. pl	SP	тм
37	29	14	48	49	42	FIBRINOGEN, GAMMA HUMAN	4503715	n. b.	5,8 / 5,6	n. b.	n. b.
38	28	11	50	49		FIBRINOGEN, GAMMA HUMAN	4503715	n. b.	5,9 / 5,6	n. b.	n. b.
39	30	22	48	55	51	DISULFIDE ISOMERASE PRECURSOR, PUTATIVE (PDI)	23612738	MAL8P1.17	5,8 / 5,6	1	0
40	14	4	43	45	12	RNA HELICASE-1, PUTATIVE	23509877	PF14_0655	5,9 / 5,5	0	0
41	17	9	42	43	29	MEROZOITE SURFACE PROTEIN 1 (MSP-1)	2789670	PFI1475w	6,0 / 5,7	1	1
42	28	18	48	49	39	ENOLASE	23507959	PF10_0155	6,6 / 6,2	0	0
43	16	0	40	-	-	-	-	-		-	-
44	27	0	43	-	-	-	-	-	6,7 / -	-	-
45	23	0	40						6,8 / -		
46	17	6	45	42	20	BETA ACTIN, HUMAN	14250401	n. b.	5,5 / 5,6	n. b.	n. b.
47	19	8	46	42	29	ACTIN	23509135	PFL2215w	5,5 / 5,2	0	0
48	9	0	50	-	-	-	-	-	4,9 / -	-	-
49	9	0	52	-	-	-	-	-	4,4 / -	-	-
50	17	8	43	43	29	CYTOPLASMIC DOMAIN OF HUMAN ERYTHROCYTE BAND-3 PROTEIN, HUMAN (N-TERMINAL) ; 12 BZGL. DES UNGESPALTENEN PROTEINS	28714	n. b.	4,6 / 4,5	n. b.	n. b.
51	9	0	43	-	-	-	-	-	4,5 / -	-	-
52	32	5	40	40	19	ENDOPLASMIC RETICULUM- RESIDENT CALCIUM BINDING PROTEIN; MEMBRANE-ASSOCIATED CALCIUM-BINDING PROTEI	23508293	PF11_0098	4,3 / 4,5	1	0

Protein-Nr.	Erhaltene Fragmente	Treffer	Exp. MW	Theor. MW	% Seq	Identifiziertes Protein	Zugangs-Nr. (GI)	Gen-Locus	Exp. pl/ Theor. pl	SP	тм
53	23	11	38	37	41	PLASMEPSIN IV	21730846	PF14_0075	4,4 / 4,4	1	0
54	15	4	35	51	12	PLASMEPSIN 2 PRECURSOR	23509298	PF14_0077	4,7 / 5,4	1	0
55	12	0	35	-	-	-	-	-	4,8 / -	-	-
56	8	0	35	-	-	-	-	-	4,8 / -	-	-
57	16	0	35	-	-	-	-	-	4,9 / -	-	-
58	23	13	38	51	36	PLASMEPSIN 1 PRECURSOR	23509297	PF14_0076	4,9 / 6,7	1	0
59	22	10	42	188	8	COMPLEMENT COMPONENT 3 PRECURSOR, HUMAN (C-TERMINAL)	4557385	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
60	17	4	43	40	15	PARAOXONASE B-TYPE / ARYLESTERASE B-TYPE PRECURSOR, HUMAN	408299	n. b.	5,0 / 5,2	n. b.	n. b.
61	22	7	40	45	19	ATP SYNTHASE SUBUNIT, PUTATIVE	23497689	PF14_0615	5,1 / 5,0	0	0
62	25	10	38	33	32	C3d, A C3 FRAGMENT AND LIGAND FOR COMPLEMENT RECEPTOR 2, HUMAN	3745750	n. b.	5,1 / 6,3	n. b.	n. b.
63	10	4	38	32	14	TRANSLATION ELONGATION FACTOR 1 BETA	23613651	PFI0645w	5,2 / 4,9	0	0
64	31	13	38	33	42	c3d, A C3 FRAGMENT AND LIGAND FOR COMPLEMENT RECEPTOR 2, HUMAN	3745750	n. b.	5,0 / 6,3	n. b.	n. b.
65	14	9	36	52	17	PUTATIVE ASPARTIC PROTEINASE, HAP PROTEIN	23509299	PF14_0078	5,2 / 8,0	1	0

	1	1	1	1	1	1				r	1
Protein-Nr.	Erhaltene Fragmente	Treffer	Exp. MW	Theor. MW	% Seq	Identifiziertes Protein	Zugangs-Nr. (GI)	Gen-Locus	Exp. pl/ Theor. pl	SP	тм
66	18	9	33	42	30	CYTOPLASMATIC DOMAIN OF HUMAN	14277739	n. b.	5,3 / 4,5	n. b.	n. b.
						RBC BAND-3 PROTEIN, HUMAN					
67	16	6	32	33	19	EXPORTED PROTEIN 2 (EXP-2)	23509900	PF14_0678	5,4 / 5,3	1	0
68	15	8	32	33	25	EXPORTED PROTEIN 2 (EXP-2)	23509900	PF14_0678	5,3 / 5,3	1	0
69	20	4	30	41	12	MEROZOITE SURFACE PROTEIN 7 (MSP-7) PRECURSOR	15808769	PF13_0197	5,6 / 4,7	1	0
70	17	10	28	32	30	HYP. PROTEIN	23508265	PF11_0069	5,3 / 4,9	1	0
71	17	8	30	27	42	14-3-3 PROTEIN	3158460	MAL8P1.69	5,0 / 4,8	0	0
72	11	3	30	31	22	PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA) (CYCLIN)	23477638	PF13_0328	4,9 / 4,7	0	0
73	19	9	30	27	36	14-3-3 PROTEIN	3158460	MAL8P1.69	4,8 / 4,8	0	0
74	21	8	30	27	39	14-3-3 PROTEIN	3158460	MAL8P1.69	4,9 / 4,8	0	0
75	44	8		28	44	PROTEASOME SUBUNIT ALPHA TYPE 5, PUTATIVE	23498939	PF07_0112	5,0 / 5,0	0	0
76	18	6	25	25	25	HYP. PROTEIN	23505159	PFI1270w	5,1 / 5,5	1	0
77	25	15	25	29	50	PROAPOLIPOPROTEIN A-I, HUMAN	178775	n. b.	5,5 / 5,4	n. b.	n. b.
78	17	9	25	22	33	THIOREDOXIN PEROXIDASE B, CHAIN A, FROM RBC, HUMAN	9955007	n. b.	5,9 / 5,7	n. b.	n. b.
79	20	5	20	17	22	EXPORTED PROTEIN 1 (EXP-1)	23508415	PF11_0224	5,9 / 5,6	1	1

Tab. 2: (vorherige Seiten) Zusammenfassende Ergebnisse der massenspektrometrischen Identifizierung von Proteinen aus einem 2-D-Gel. Angegeben ist die Numerierung der Proteinspots, wie sie Abb. 3.18 zu entnehmen ist. Zusätzlich ist die im entsprechenden Massenspektrum ermittelte Anzahl der Peptidfragmente verzeichnet, die durch die tryptische *In-gel*-Spaltung entstanden sind, sowie die Anzahl der in der Datenbank gefundenen Peptide, die der jeweiligen Aminosäuresequenz des identifizierten Proteins entsprechen (Treffer), und die sich aus den Treffern ergebene Sequenzabdeckung in Prozent (% Seq). Außerdem ist die im Gel experimentell ermittelte Molekularmasse des untersuchten Proteins (Exp. MW) und die theoretische Molekularmasse des entsprechenden identifizierten Proteins (Theor. MW) in kDa, der experimentell ermittelte pl (Exp. pl) und der theoretisch berechnete pl (Theor. pl) (MS-Fit, Protein-Prospektor) angegeben. Bei erfolgreicher Identifizierung sind die Bezeichnung des Proteins und seine GI-Zugangsnummer angegeben. Bei identifizierten Proteinen aus *P. falciparum* wurde zusätzlich die Bezeichnung des Gen-Locus eingefügt, sowie die Anzahl der vorhergesagten Signalpeptide (SP) und Transmembran-Domänen bzw. GPI-Modifikationen (TM). Dazu wurde auf die ermittelten Daten von Florens et al. zurückgegriffen (Florens et al., 2002) bzw. SignalP 2.0 (Nielsen et al., 1997) und TMHMM (Krogh et al., 2001) verwandt (n. b.: nicht bestimmt).



Abb. 3.20: Prozentuale Verteilung der untersuchten Proteine aus Abb. 3.18 bezüglich ihrer Funktion/Aktivität oder zellulären Lokalisation. Identifizierte humane Proteine und bis dato durch den *Peptide Mass Fingerprint* nicht identifizierbare Proteine sind ebenfalls aufgeführt. Außerdem ist dargestellt, bei welchem Anteil der identifizierten plasmodialen Proteine ein Signalpeptid vorhergesagt werden konnte, welchen Anteil die hypothetischen Proteine, bereits bekannte Proteine und Proteine mit mutmaßlicher biologischer Funktion/Aktivität (in der Datenbank mit dem Vermerk "putative" ausgestattete Genprodukte) ausmachen.

# 3.6 Sequentielle Extraktion von Proteinen aus Schizontenstadien von *P. falciparum*

Proteine aus Schizontenstadien wurden wie in Kapitel 2.2.16.3 sequentiell extrahiert. Dabei entstanden folgende Fraktionen:

S1: in ddH<sub>2</sub>O extrahierbare Proteine

S2: in ddH<sub>2</sub>O unlösliche und in Rehydrierungslösung extrahierbare Proteine

S3: in ddH<sub>2</sub>O und Rehydrierungslösung unlösliche, in reduzierendem SDS-PAGE-

Probenpuffer extrahierbare Proteine

Diese Fraktionen wurden auf das Vorhandensein von AMA-1-Protein mittels Westernblotting und Immun-Nachweis untersucht (Abb. 3.21). AMA-1 ist ein Typ I-Transmembranprotein (Crewther et al., 1990; Narum und Thomas, 1994). Der Nachweis von AMA-1 sollte hier dem Aufspüren von integralen Membranproteinen oder membranassoziierten Proteinen in den einzelnen Fraktionen dienen.

Die deutlichsten Signale sind in Fraktion S2 zu erkennen. Hierbei handelt es sich um diejenige Fraktion, in der sich Proteine befinden, die durch die in dieser Arbeit standarisierte Rehydrierungslösung für die 2-D PAGE solubilisiert werden können. Es sind deutlich die zwei Banden zu erkennen, welche die Molekularmassen der Pro- und der maturen Form von AMA-1 besitzen. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da AMA-1 ein membrangebundenes Protein ist und daher ohne Detergenzien nur schwer löslich ist. Des weiteren befindet sich in der gleichen Spur eine Bande bei ca. 50 kDa, die der Molekularmasse von AMA-1<sub>48</sub> entspricht, einem Prozessierungsprodukt von AMA-1 (Howell et al., 2001). Im Vergleich befindet sich in S1 eine schwache Bande, die weder der maturen noch der Proform von AMA-1 zuzuordnen ist. Außerdem tritt eine weitere Bande mit einer Molekularmasse von 30 kDa auf. In Spur S3 sind Proteine enthalten, die weder in ddH<sub>2</sub>O, noch in Rehydrierungslösung zu solubilisieren sind. Wie in S2 können hier die für AMA-1 typischen Doppelbanden bei 66 und 83 kDa ausgemacht werden. Allerdings sind hier die Banden-Intensitäten weit schwächer als in S2.

Die Proteine aus S2 wurden für die präparative 2-D PAGE verwandt und anschließend ausgewählte Proteinspots mittels MALDI-TOF MS analysiert.



Abb. 3.21: Immunologischer Nachweis von AMA-1 in Fraktionen der sequentiellen Solubilisierung. S1: in ddH<sub>2</sub>O extrahierbare Proteine; S2: in Rehydrierungslösung extrahierbare Proteine; S3: in reduzierendem SDS-Probenpuffer extrahierbare Proteine. Es wurden für alle Spuren entsprechend des jeweiligen Fraktionsvolumens vergleichbare Mengen aufgetragen.

Es wurden aus dieser Präparation 46 Proteinspots analysiert (Abb. 3.22). Die Ergebnisse sind in Tab. 3 dargestellt und in Abb. 3.23 zusammengefasst. Es wurden in 57 % der Fälle Proteine aus *P. falciparum* identifiziert. Dagegen stehen 17 % humane Proteine und 26 % nichtidentifizierte Proteine. Bei ca. 1/3 der plasmodialen Proteine (35 %) ist die biologische Funktion oder Aktivität unbekannt und bei 23 % ist keine zelluläre Lokalisation bekannt. Ebenfalls 23 % der gefundenen plasmodialen Proteine besitzen nach Vorhersage ein Nterminales Signalpeptid und 19 % wurden als hypothetische Proteine identifiziert. Bis auf einen Fall wurde für alle gefundenen hypothetischen Proteine ein Signalpeptid vorhergesagt, was auf eine nichtcytosolische Lokalisation dieser Proteine schliessen lässt. Es konnte für keines der hier untersuchten Proteine eine Transmembran-Domäne bzw. ein GPI-Anker vorhergesagt werden.



Abb. 3.22: Präparatives 2-D Gel mit aufgetrennten Proteinen aus S2. Markierungen und Numerierung zeigen diejenigen Proteine, die für die MALDI-TOF MS-Analyse ausgewählt wurden. Rechts sind die Molekularmassen der verwandten Proteinstandards in kDa angegeben.

Protein-Nr.	Erhaltene Fragmente	Treffer	Exp. MW	Theor. MW	% Seq	Identifiziertes Protein	Zugangs-Nr. (GI)	Gen-Locus	Exp. pl/ Theor. pl	SP	ТМ
1	18	5	100	87	9	101 KDA MALARIA PROTEIN, (ACIDIC BASIC REPEAT ANTIGEN, ABRA)	113005	PFL1385c	4,9 / 4,8	1	0
2	22	10	100	90	17	CELL DIVISION CYCLE PROTEIN 48 HOMOLOGUE, PUTATIVE	23498515	MAL6P1.232	5,0/ 5,0	0	0
3	24	6	110	107	6	HEAT SHOCK PROTEIN, PUTATIVE	23509639	PF14_0417	5,2 / 5,4	1	0
4	0	-	-	-	-	-	-	-	5,2 / -	-	-
5	18	10	120	112	14	CYSTEINE PROTEASE, PUTATIVE (SERA)	16804967	PFB0340c	5,3 / 5,3	1	0
6	33	22	120	112	28	SERINE REPEAT ANTIGEN, SERA/PAPAIN- LIKE PROTEASE WITH ACTIVE SER (SERA)	16804967	PFB0340c	5,3 / 5,3	1	0
7	0	-	-	-	-	-	-	-	5,6 / -	-	-
8	26	7	80	80	12	HYP. PROTEIN	23508151	PF10_0348	5,0 / 5,0	1	0
9	9	0	100	-	-	-	-	-	5,3 / -	-	-
10	35	0	100	-	-	-	-	-	5,3 / -	-	-
11	39	15	100	95	23	ENDOPLASMIN HOMOLOG PRECURSOR, PUTATIVE	23508908	PFL1070c	5,4 / 5,3	1	0
12	16	9	100	95	12	ENDOPLASMIN HOMOLOG PRECURSOR, PUTATIVE	23508908	PFL1070c	5,4 / 5,3	1	0
13	20	6	80	52	19	HUMAN ALPHA-1B-GLYCOPROTEIN	112892	n. b.	5,3 / 5,6	n. b.	n. b.
14	15	10	80	110	11	CYSTEINE PROTEASE, PUTATIVE	16804967	PFB0340c	5,2 / 5,3	1	0
15	26	12	85	52	36	HUMAN ALPHA-1-B-GLYCOPROTEIN	69990	n. b.	5,2 / 5,6	n. b.	n. b.
16	37	10	85	72	19	HEAT SHOCK PROTEIN	23613697	PFI0875w	5,1 / 5,1	1	0
17	15	6	80	80	12	HYP. PROTEIN	23508151	PF10_0348	5,1 / 5,0	1	0
18	27	13	80	80	26	HEAT SHOCK PROTEIN	23613697	PFI0875w	5,1 / 5,2	1	0
19	37	10	70	73	21	HEAT SHOCK PROTEIN	23613697	PFI0875w	5,2 / 5,2	1	0

Protein-Nr.	Erhaltene Fragmente	Treffer	Exp. MW	Theor. MW	% Seq	Identifiziertes Protein	Zugangs-Nr. (GI)	Gen-Locus	Exp. pl/ Theor. pl	SP	тм
20	25	10	70	72	19	HEAT SHOCK PROTEIN	23613697	PFI0875w	5,2 / 5,2	1	0
21	25	10	70	72	19	HEAT SHOCK PROTEIN	23613697	PFI0875w	5,3 / 5,2	1	0
22	13	7	70	148	5	HYP. PROTEIN	23612974	PF08_0127	5,4 / 5,4	0	0
23	0	-	75	-	-	-	-	-	5,4 / -	-	-
24	27	5	75	86	9	GELSOLIN, HUMAN	4504165	n. b.	5,5 / 5,9	n. b.	n. b.
25	24	7	70	72	18	HEAT SHOCK PROTEIN HSP70 HOMOLOGUE PFHSP70-3	11127605	PF11_0351	5,6 / 5,9	0	0
26	23	0	70	-	-	-	-	-	5,5 / -	-	-
27	25	15	70	71	26	HEAT SHOCK 70 KDA PROTEIN, HUMAN	5729877	n. b.	5,7 / 5,4	n. b.	n. b.
28	18	11	68	69	20	ATP SYNTHASE, CATALYTIC SUBUNIT A	418177	PF13_0065	5,7 / 5,5	0	0
29	17	6	60	63	16	HEAT SHOCK PROTEIN 60 KDA	23507957	PF10_0153	6,0 / 6,7	0	0
30	19	6	55	55	13	DISULFIDE ISOMERASE PRECURSOR, PUTATIVE	23612738	MAL8P1.17	5,6 / 5,6	1	0
31	0	-	55	-	-	-	-	-	5,2 / -	-	-
32	13	4	60	52	6	HYP. PROTEIN	23508493	PF11_0302	5,0 / 5.0	1	0
33	14	0	50	-	-	-	-	-	4,5 / -	-	-
34	12	0	50	-	-	-	-	-	4,5 / -	-	-
35	40	19	45	42	55	ACTIN	23509135	PFL2215w	5,3 / 5,2	0	0
36	28	11	45	40	35	BETA ACTIN, HUMAN	15277503	n. b.	5,3 / 5,8	n. b.	n. b.
37	22	0	35	-	-	-	-	-	4,8 / -	-	-
38	17	4	35	35	14	EXPORTED PROTEIN 2 (EXP-2)	23509900	PF14_0678	5,2 / 5,1	1	0
39	25	7	25	46	14	FIBRINOGEN, HUMAN	223170	n. b.	5,2 / 5,5	n. b.	n. b.
40	20	6	28	46	23	FIBRINOGEN, HUMAN	223170	n. b.	5,2 / 5,5	n. b.	n. b.
41	20	5	30	32	17	HYP. PROTEIN	23508265	PF11_0069	5,1 / 4,9	1	0
42	17	8	38	37	39	PLASMEPSIN IV	21730846	PF14_0075	4,3 /4,4	1	0

Protein-Nr.	Erhaltene Fragmente	Treffer	Exp. MW	Theor. MW	% Seq	Identifiziertes Protein	Zugangs-Nr. (GI)	Gen-Locus	Exp. pl/ Theor. pl	SP	ТМ
43	26	10	40	39	28		23508293	PF11_0098	4,1 /4,5	1	0
44	15	0	40	-	-		-	-	4.1 / -	-	-
									.,.,		
45	11	0	45	-	-	-	-	-	4,4 / -	-	-
46	12	3	40	42	13	CYTOPLASMIC DOMAIN OF HUMAN ERYTHROCYTE BAND-3 PROTEIN	14277740	n .b.	4,4 / 4,5	n. b.	n. b.

Tab. 3: Zusammenfassende Ergebnisse der massenspektrometrischen Identifizierung von Proteinen aus einem 2-D-Gel. Angegeben ist die Numerierung der Proteinspots, wie sie Abb. 3.22 zu entnehmen ist. Zusätzlich ist die im entsprechenden Massenspektrum ermittelte Anzahl der Peptidfragmente verzeichnet, die durch die tryptische *In-gel*-Spaltung entstanden sind, sowie die Anzahl der in der Datenbank gefundenen Peptide, die der jeweiligen Aminosäuresequenz des identifizierten Proteins entsprechen (Treffer), und die sich aus den Treffern ergebene Sequenzabdeckung in Prozent (% Seq). Außerdem ist die im Gel experimentell ermittelte Molekularmasse des untersuchten Proteins (Exp. MW) und die theoretische Molekularmasse des entsprechenden identifizierten Proteins (Theor. MW) in kDa, der experimentell ermittelte pl (Exp. pl) und der theoretisch berechnete pl (Theor. pl) (MS-Fit, Protein-Prospektor) angegeben. Bei erfolgreicher Identifizierung sind die Bezeichnung des Proteins und seine GI-Zugangsnummer angegeben. Bei identifizierten Proteinen aus *P. falciparum* wurde zusätzlich die Bezeichnung des Gen-Locus eingefügt, sowie die Anzahl der vorhergesagten Signalpeptide (SP) und Transmembran-Domänen/GPI-Bindungsstellen (TM). Dazu wurde auf die ermittelten Daten von Florens et al. zurückgegriffen (Florens et al., 2002) bzw. SignalP 2.0 (Nielsen et al., 1997) und TMHMM (Krogh et al., 2001) verwandt (n.b.: nicht bestimmt).



Abb. 3.23: Prozentuale Verteilung der untersuchten Proteine aus Abb. 3.22 bezüglich ihrer biologischen Funktion/Aktivität oder zellulären Lokalisation. Identifizierte humane Proteine und bis dato durch den *Peptide Mass Fingerprint* nicht identifizierbare Proteine sind ebenfalls aufgeführt. Außerdem ist dargestellt, bei welchem Anteil der identifizierten plasmodialen Proteine ein Signalpeptid vorhergesagt werden konnte, welchen Anteil die hypothetischen Proteine, bereits bekannte Proteine und Proteine mit mutmaßlicher biologischer Funktion/Aktivität (in der Datenbank mit dem Vermerk "putative" ausgestattete Genprodukte) ausmachen.

# 3.7 Extraktion von Proteinen durch Temperaturabhängige Phasentrennung

Proteine aus Schizonten von *P. falciparum* wurden mit Hilfe der Temperatur-abhängigen Phasentrennung mit dem nichtionischen Detergens Triton X-114 isoliert. Dieses sollte zur Anreicherung von Membran-assoziierten Proteinen für die präparative 2-D PAGE dienen. Es konnte gezeigt werden, dass das nichtionische Detergens Triton X-114 mit der Durchführung der 2-D PAGE kompatibel ist. Dies zeigt Abb. 3.24. Im präparativen 2-D Gel wurden ca. 70 Proteinspots mit CBB G-250 gefärbt. Proteine mit einer molekularen Masse von größer als 80 kDa sind allerdings nur schwach gefärbt. Im Bereich der Kathode sind die Proteine nicht optimal fokussiert. Dennoch zeigt das Gel, dass die Einführung von Triton X-114 in die 2-D PAGE technisch möglich ist.

Es wurden 15 Proteinspots für die MALDI-TOF MS-Analyse präpariert. Die Auswertung der Ergebnisse ist in Tab. 4 zusammengefaßt. Aufgrund der wenigen analysierten Proteinspots wurde darauf verzichtet, eine statistische Auswertung der Analyse zu dokumentieren. Von den 15 Proteinspots konnten 13 identifiziert werden, von denen 11 aus *P. falciparum* stammen. Fünf Proteine besitzen ein vorhergesagtes Signalpeptid und bei drei Genprodukten sind eine oder mehrere Transmembranhelices bzw. GPI-Bindungsstellen vorhergesagt oder bekannt.



Abb. 3.24: Präparatives 2-D Gel mit aufgetrennten Proteinen aus Schizonten-infizierten Erythrocyten, die mittels Temperatur-abhängiger Phasentrennung durch Verwendung von Triton X-114 isoliert wurden. Markierungen und Numerierung zeigen diejenigen Proteine, die für die MALDI-TOF MS-Analyse ausgesucht wurden. Links sind die Molekularmassen der verwandten Proteinstandards in kDa angegeben.

r	r	1	1						T	r	T
Protein-Nr.	Erhaltene Fragmente	Treffer	Exp. MW	Theor. MW	% Seq	Identifiziertes Protein	Zugangs-Nr. (GI)	Gen-Locus	Exp. pl/ Theor. pl	SP	тм
1	70	20	70	72	37	HEAT SHOCK PROTEIN	23613697	PFI0875w	5,3 / 5,1	1	0
2	69	11	70	89	15	HYP. PROTEIN	23613557	PFI0175w	5,6 / 5,4	0	1
3	51	27	70	74	39	HEAT SHOCK 70 KDA PROTEIN	23499105	PF08_0054	5,7 / 5,5	0	0
4	19	12	70	71	23	heat shock 70kDa protein, human	5729877	n. b.	5,6 / 5,4	n. b.	n. b.
5	22	6	60	52	18	HYP. PROTEIN	23508493	PF11_0302	5,1 / 5,0	1	0
6	23	6	55	70	9	HYP. PROTEIN	23509578	PF14_0356	4,7 / 9,0	0	0
7	18	4	60	79	13	HYP. PROTEIN	23509239	PF14_0018	5,3 / 7,1	0	1
8	22	7	55	56	18	PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE, PUTATIVE	23612738	MAL8P1.17	5,7 / 5,6	1	0
9	20	9	60	50	25	TUBULIN ALPHA CHAIN	23504938	PFI0180w	5,7 / 4,9	0	0
10	47	16	50	53	50	HYP. PROTEIN	23510617	MAL1P1.33	5,2 / 5,6	1	0
11	17	4	48	28	29	MEROZOITE SURFACE ANTIGEN 2 (MSA-2)	3845147	PFB0300c	4,6 / 5,4	1	1
12	21	0	45	-	-	-	-	-	4,4 / -	-	-
13	50	24	50	42	53	ACTIN	23509135	PFL2215w	5,4 / 5,2	0	0
14	30	18	50	40	42	UNKNOWN PROTEIN	15277503	n. b.	5,5 / 5,6	n. b.	n. b.
						HOMO SAPIENS					
15	0	0	35	-	-	-	-	-	4,9 / -	-	-

Tab. 4: (vorherige Seiten) Zusammenfassende Ergebnisse der massenspektrometrischen Identifizierung von Proteinen aus einem 2-D-Gel. Angegeben ist die Numerierung der Proteinspots, wie sie Abb. 3.24 zu entnehmen ist. Zusätzlich ist die im entsprechenden Massenspektrum ermittelte Anzahl der Peptidfragmente verzeichnet, die durch die tryptische *In-gel*-Spaltung entstanden sind, sowie die Anzahl der in der Datenbank gefundenen Peptide, die der jeweiligen Aminosäuresequenz des identifizierten Proteins entsprechen (Treffer), und die sich aus den Treffern ergebene Sequenzabdeckung in Prozent (% Seq). Außerdem ist die im Gel experimentell ermittelte Molekularmasse des untersuchten Proteins (Exp. MW) und die theoretische Molekularmasse des entsprechenden identifizierten Proteins (Theor. MW) in kDa, der experimentell ermittelte pl (Exp. pl) und der theoretisch berechnete pl (Theor. pl) (MS-Fit, Protein-Prospektor) angegeben. Bei erfolgreicher Identifizierung sind die Bezeichnung des Proteins und seine GI-Zugangsnummer angegeben. Bei identifizierten Proteinen aus *P. falciparum* wurde zusätzlich die Bezeichnung des Gen-Locus eingefügt, sowie die Anzahl der vorhergesagten Signalpeptide (SP) und Transmembran-Domänen/GPI-Bindungsstellen (TM). Dazu wurde auf die ermittelten Daten von Florens et al. zurückgegriffen (Florens et al., 2002) bzw. SignalP 2.0 (Nielsen et al., 1997) und TMHMM (Krogh et al., 2001) verwandt (n. b.: nicht bestimmt).

## 3.8 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen nach hochauflösender 2-D PAGE

Es sollte gezeigt werden, ob die zweidimensionale Auftrennung von Schizonten-Proteinen verbessert werden kann, indem ein hochauflösender pH-Gradient in der ersten Dimension verwandt wurde. Dies sollte die Überlagerung von Proteinen im Gel verhindern, deren pI-Werte und molekularen Massen nicht identisch, aber sehr ähnlich sind. Dadurch wird eine einwandfreie Identifizierung dieser Proteine möglich. In Abb. 3.25 ist ein präparatives 2-D Gel gezeigt, wobei in der ersten Dimension ein pH-Gradient von pH 5,0 bis 6,0 auf 18 cm Länge benutzt wurde. In diesem pH-Bereich liegen die pI-Werte einer Vielzahl von Proteinen (s. dazu Abb. 3.15).



Abb. 3.25: Präparatives 2-D Gel mit Proteinen aus einem Gesamtextrakt von Schizonten-infizierten Erythrocyten. In der ersten Dimension wurde ein linearer pH-Gradient von pH 5,0 bis 6,0 verwandt. Markierungen und Numerierung zeigen diejenigen Proteine, die für die MALDI-TOF MS-Analyse ausgesucht wurden. Links sind die Molekularmassen der verwandten Proteinstandards in kDa angegeben.

Abb. 3.25 zeigt, dass die Auflösung der einzelnen Proteinspots bis ca. 100 kDa sehr hoch ist. Hier konnten ca. 50 Proteinspots ausgemacht werden, von denen 21 für die MALDI-TOF MS-Analyse verwandt wurden. Sechs Spots konnten nicht identifiziert werden und fünf konnten als humane Proteine identifiziert werden.

Die Analyse zeigte, dass mit dem kleinen pH-Gradienten in der ersten Dimension die gleichen Ergebnisse erhalten worden sind wie mit einem Gradienten pH 4-7. Damit kann ausgeschlossen werden, dass zuvor Proteine nicht identifiziert worden sind, weil sie mit anderen Proteinen als Spot überlappen.
#### Ergebnisse

Protein-Nr.	Erhaltene Fragmente	Treffer	Exp. MW	Theor. MW	% Seq	Identifiziertes Protein	Zugangs-Nr. (GI)	Gen-Locus	Exp. pl/ Theor. pl	SP	тм
1	0	-	-	-	-	-	-	-	5,4 / -	-	-
2	19	8	80	81	15	ACYL-PEPTIDE HYDROLASE, HUMAN	13640732	n. b.	5,2/ 5,3	n. b.	n. b.
3	17	0	80	-	-	-	-	-	5,3 / -	-	-
4	18	11	70	72	24	HEAT SHOCK PROTEIN HOMOLOGUE PFHSP70-3	11127605	pfhsp70-3	5,4 / 5,9	0	0
5	16	0	70	-	-	-	-	-	5,4 /-	-	-
6	11	0	60	-	-	-	-	-	5,4 / -	-	-
7	0	0	58	-	-	-	-	-	5,4 / -	-	-
8	18	9	55	56	28	VACUOLAR ATPase SUBUNIT B	23510050	PFD0300c	5,3 / 5,5	0	0
9	26	11	50	55	25	PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE, PUTATIVE	23612738	MAL8P1.17	5,4 / 5,6	1	0
10	28	8	50	55	25	PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE, PUTATIVE	23612738	MAL8P1.17	5,4 / 5,6	1	0
11	33	11	50	56	27	PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE, PUTATIVE	23612738	MAL8P1.17	5,5 / 5,6	1	0
12	10	6	45	49	20	ENOLASE	23507959	PF10_0155	5,6 / 6,2	0	0
13	17	7	50	52	22	SELENIUM BINDING PROTEIN 1, HUMAN	NP_003935.2	n.b.	5,6 / 5,9	n.b.	n.b.
14	19	8	35	37	22	CHAIN A, HUMAN HEART L-LACTATE DEHYDROGENASE H CHAIN, TERNARY COMPLEX WITH NADH AND OXAMATE	13786847	n. b.	5,7/ 5,7	n. b.	n. b.

Protein-Nr.	Erhaltene Fragmente	Treffer	Exp. MW	Theor. MW	% Seq	Identifiziertes Protein	Zugangs-Nr. (GI)	Gen-Locus	Exp. pl/ Theor. pl	SP	тм
15	23	13	50	52	31	SELENIUM BINDING PROTEIN 1, HUMAN	NP_003935.2	n. b.	5,8 / 5,9	n. b.	n. b.
16	24	0	60	-	-	-	-	-	5,8 /-	-	-
17	14	4	40	43	18	ADENOSIN DEAMINASE, PUTATIVE	23508092	PF10_0289	5,2 / 5,4	0	0
18	30	10	40	42	32	ADENOSINE DEAMINASE, PUTATIVE	23508092	PF10_0289	5,3 / 5,4	0	0
19	19	8	35	37	22	HUMAN LDH	13786847	n. b.	5,5 / -	n. b.	n. b.
20	13	7	32	33	29	HYP. PROTEIN, CONSERVED	23508128	PF10_0325	5,6 / 5,6	0	0
21	12	3	30	29	16	PROTEASOME SUBUNIT ALPHA TYPE 1, PUTATIVE	23509938	PF14_0716	5,4 / 5,5	0	0

Tab. 5: Zusammenfassende Ergebnisse der massenspektrometrischen Identifizierung von Proteinen aus einem 2-D-Gel. Angegeben ist die Numerierung der Proteinspots, wie sie Abb. 3.25 zu entnehmen ist. Zusätzlich ist die im entsprechenden Massenspektrum ermittelte Anzahl der Peptidfragmente verzeichnet, die durch die tryptische *In-gel*-Spaltung entstanden sind, sowie die Anzahl der in der Datenbank gefundenen Peptide, die der jeweiligen Aminosäuresequenz des identifizierten Proteins entsprechen (Treffer), und die sich aus den Treffern ergebene Sequenzabdeckung in Prozent (% Seq). Außerdem ist die im Gel experimentell ermittelte Molekularmasse des untersuchten Proteins (Exp. MW) und die theoretische Molekularmasse des entsprechenden identifizierten Proteins (Theor. MW) in kDa, der experimentell ermittelte pl (Exp. pl) und der theoretisch berechnete pl (Theor. pl) (MS-Fit, Protein-Prospektor) angegeben. Bei erfolgreicher Identifizierung sind die Bezeichnung des Proteins und seine GI-Zugangsnummer angegeben. Bei identifizierten Proteinen aus *P. falciparum* wurde zusätzlich die Bezeichnung des Gen-Locus eingefügt, sowie die Anzahl der vorhergesagten Signalpeptide (SP) und Transmembran-Domänen (TM). Dazu wurde auf die ermittelten Daten von Florens et al. zurückgegriffen (Florens et al., 2002) bzw. SignalP 2.0 (Nielsen et al, 1997) und TMHMM (Krogh et al., 2001) verwandt (n. b.: nicht bestimmt).

## 3.9 Gesamtbetrachtung der massenspektrometrischen Untersuchungen

Es sind im Laufe dieser Arbeit 200 Proteinspots aus zweidimensionalen Gelen ausgestanzt und tryptisch fragmentiert worden. Die entstandenen Peptide wurden aus dem Gel eluiert und für die Generierung von Peptide Mass Fingerprints (PMF) verwandt. Die erhaltenen monoisotopischen Massen wurden dazu benutzt, in silico das entsprechende Protein in der NCBI-Datenbank zu identifizieren. Die identifizierten Proteine wurden in dieser Arbeit so benannt wie sie in der Datenbank eingetragen sind. Sie wurden entsprechend ihrer Funktion bzw. ihrer zellulären Lokalisation eingeteilt. Die Einteilung umfaßt sowohl die Funktion eines Proteins als auch die zelluläre Lokalisation, weil für verschiedene Proteine keine Funktion bekannt ist, aber deren zelluläre Lokalisation. So ist zum Beispiel EXP-2 (exported protein 2) mit der PVM assoziiert, dessen Funktion ist aber nicht bekannt (Fischer et al., 1998). Die identifizierten humanen und bovinen Proteine stammen entweder aus den Wirtszellen (z. B. Thioredoxin-Peroxidase) bzw. Plasma (z. B. Apolipoproteine; siehe Kulturführung von P. falciparum) oder aus dem Albumax-Anteil im Kulturmedium (z. B. Rinder-Serum-Albumin). Humane und bovine Proteine stellen 20 % aller in dieser Arbeit identifizierten Proteine dar. Einen ähnlichen Anteil (26 %) machen die hier nicht identifizierbaren Proteine aus (Abb. 3.27). Bei der massenspektrometrischen Analyse konnten für 17 % der nichtidentifizierten Proteinspots keine peptidischen Massen erhalten werden. Dagegen wurde bei 83 % ein PMF erhalten, dennoch konnte das entsprechende Protein nicht identifiziert werden. Hier besteht Hoffnung, dass die entsprechenden Genprodukte in naher Zukunft identifiziert werden können, wenn die Annotierung des gesamten Genoms von P. falciparum abgeschlossen ist.

Bei 41 % der identifizierten Genprodukte aus *P. falciparum* ist über eine Funktion nichts bekannt, und für 27 % gibt es keine Lokalisationsstudien. Auch mittels Gen-Ontologien (GO) konnte bei diesen nicht über die Funktion oder zelluläre Lokalisation eines Genproduktes gemutmaßt werden. Diese Ontologien wurden entweder durch die jeweiligen Genom-Sequenzierungs-Zentren oder durch *PlasmoDB* in einem automatischen Annotierungs-Prozess untersucht (Ashburner et al., 2000). Diejenigen Genprodukte, bei denen Ontologien mit anderen, bereits bekannten Proteinen gefunden worden sind, machen 26 % aller identifizierten Genprodukte aus *P. falciparum* aus. Bei der Identifizierung wurden diese

Genprodukte mit dem Vermerk "*putative*" versehen. Bei 55 % handelt es sich um bereits bekannte plasmodiale Proteine. Weitere 19 % wurden als sogenannte "hypothetische" Proteine mit nicht vorhersagbarer Funktion oder zellulärer Lokalisation identifiziert. Bei 70 % der hypothetischen Proteine wurde ein N-terminales Signalpeptid vorhergesagt. Eine mögliche Transmembran-Domäne bzw. eine GPI-Modifizierungsstelle wurde nur bei zweien der hypothetischen Proteine vorhergesagt. Beide Proteine wurden durch temperaturabhängige Phasentrennung für die 2-D PAGE fraktioniert. Die Bezeichnung "hypothetisch" für die identifizierten Proteine wurde entsprechend ihrer Bezeichnung aus der NCBI-Datenbank übernommen, obwohl diese Proteine mit ihrer Identifizierung nicht mehr als hypothetisch zu bezeichnen sind.

In ca. 95 % der Fälle stimmen die experimentell ermittelten Molekularmassen der Proteine mit den theoretischen Massen identifizierter Proteine in den Datenbanken überein. Das läßt darauf schliessen, dass proteolytische Prozesse während der Proben-Präparation zu vernachlässigen sind. So wurde z. B. für das Plasmepsin 2 eine theoretische Molekularmasse von 51 kDa angegeben. Diese Masse besitzt die Vorläuferform (Precursor) des Proteins. Die im Gel gefundene Masse von ca. 35 kDa entspricht der für das mature Protein beschriebenen Masse (37 kDa)(Banerjee et al., 2002; Siripurkpong et al., 2002). Bei der temperaturabhängigen Phasentrennung durch Triton X-114 wurde nach der 2-D PAGE ein Protein mit einer experimentellen Masse von ca. 50 kDa als Merozoite Surface Antigen 2 (MSA-2) identifiziert (Abb. 3.24; Protein-Nr.11). Der Aminosäuresequenz zu Folge besitzt dieses Protein allerdings eine theoretische molekulare Masse von 28 kDa. Außerdem wurde ein experimenteller pI von 4,6 im Vergleich zu einem theoretischen pI von 5,4 ermittelt. Diese Diskrepanzen können durch posttranslationale Modifikationen des Proteins erklärt werden (Berhe et al., 2000; Bhattacharya et al., 1995). MSA-2 wurde bereits 1988 (Smythe et al., 1988) als Triton X-114-lösliches Protein charakterisiert, was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte.

Bei den einzelnen massenspektrometrischen Experimenten konnte die Reproduzierbarkeit der zwei-dimensionalen Auftrennung von Proteinen und deren massenspektrometrische Identifizierung gezeigt werden. Proteinspots, die aus verschiedenen Präparationen aufgetrennt wurden und im Gel die gleichen Koordinaten (experimentell bestimmte Molekularmasse und pI) besaßen, wurden jeweils als dasselbe Genprodukt identifiziert. Dies ist am Beispiel eines identifizierten hypothetischen Proteins aus *P. falciparum* in Abb. 3.26 gezeigt. Dieses

Genprodukt wurde in vier verschiedenen 2-D-Gelen identifiziert. Dabei wurde mit den peptidischen Fragmenten eine Sequenzabdeckung auf Aminosäurebasis von 31, 18,13 und 6 % erreicht. 6 % Sequenzabdeckung sind zwar eher zu wenig, um eine sichere Identifizierung des Genproduktes zu gewährleisten, doch die Koordinaten (Molekularmasse und pI) des Proteinspots im Gel und der Vergleich mit den verläßlich identifizierten Proteinspots lassen demnach eine sichere Identifizierung zu.



Abb. 3.26: Reproduzierbarkeit der massenspektrometrischen Identifizierung eines Genproduktes am Beispiel eines hypothetischen Proteins (Zugangs-Nr.: 23508493). Gezeigt sind vergleichbare Ausschnitte aus vier verschiedenen 2-D Gelen (entsprechend der angegebenen Abbildungen in dieser Arbeit), die jeweils zur Identifizierung des selben Genproduktes (Proteinspot jeweils markiert) führten.

Es sei hier darauf hingewiesen, dass in der vorliegenden Arbeit jeder untersuchte Proteinspot als eine Proteinsspezies innerhalb der Präparation angesehen wurde. Wenn zwei nebeneinanderliegende Proteinspots in einem 2-D Gel als ein und dasselbe Protein identifiziert worden sind, so ist nicht bewiesen, ob es sich bei den beiden Spots wirklich um ein identisches Protein handelt. Die Unterschiede zwischen zwei Proteinen können sehr klein sein, wie zum Beispiel nur ein Aminosäureaustausch oder eine einzige Modifikation eines Aminosäurerestes (Rappsilber und Mann, 2002). Da die Abdeckung der Sequenz eines Proteins durch den PMF im Regelfall nicht vollständig ist, gehen solche Informationen oft verloren.



Abb. 3.27: Prozentuale Verteilung der Proteine, die in dieser Arbeit mittels MALDI-TOF MS analysiert worden sind, bezüglich ihrer biologischen Funktion/Aktivität oder zellulären Lokalisation. Identifizierte humane Proteine und bis dato durch den *Peptide Mass Fingerprint* nicht identifizierbare Proteine sind ebenfalls aufgeführt. Außerdem ist dargestellt, bei welchem Anteil der identifizierten plasmodialen Proteine ein Signalpeptid vorhergesagt werden konnte, welchen Anteil die hypothetischen Proteine, bereits bekannte Proteine und Proteine mit mutmaßlicher biologischer Funktion/Aktivität (in der Datenbank mit dem Vermerk "putative" ausgestattete Genprodukte).

# 3.10 Die Identifizierung von Proteinen des Rhoptrien-Mastergels

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reproduzierbarkeit der 2-D PAGE-Technik genutzt, um über Massenspektrometrie identifizierte Proteine den Proteinspots des Rhoptrien-Mastergels zuzuordnen. Um jeweils das Mastergel mit einem präparativen Gel zu vergleichen, wurde sich der Zwei-Kanal-Methode (*Dual channel imaging*) bedient (Bernhardt et al., 1999). Hierzu wurde die Adobe Photoshop Version 5.0 verwandt.

Das Ergebnis ist in Abb. 3.28 zu sehen. 26 verschiedene identifizierte Proteine konnten den Proteinspots des Mastergels zugeordnet werden. Darin sind 6 hypothetische Proteine enthalten, die bisher in keiner Weise charakterisiert worden waren. Bei Albumin, Actin und zumindest einigen *Heat shock* Proteinen ist anzunehmen, dass es sich dabei um Proteinkontaminationen in der Präparation handelte. Es sei hier erwähnt, dass deutlich gefärbte Proteine des Mastergels bisher noch nicht identifiziert werden konnten. Zum einen konnten diese Spots auf präparativen Gelen nicht ausgemacht werden oder es konnte wiederholt kein zur Identifizierung brauchbares PMF generiert werden, da entweder keine oder nur sehr wenige Peptide nach der tryptischen *In-gel*-Spaltung eluiert werden konnten.



Abb. 3.28: Identifizierte Proteine, die dem Rhoptrien-Mastergel zugeordnet werden konnten. Aus präparativen 2-D Gelen identifizierte Proteine sind entsprechenden Proteinspots des Mastergels aus der Rhoptrien-Präparation zugeordnet. ABRA: Acidic Basic Repeat Antigen; SERA: Serine Rich Antigen; HSP: Heat Shock Protein; MSA-2: Merozoite Surface Antigen 2; PDI: Protein Disulfide Isomerase; HAP: Histo-Aspartic Protein; TEF1β: Translation Elongation Factor 1 beta; MSP-7: Merozoite Surface Protein 7; EXP-1, -2: Exported Protein 1 und 2.

#### 3.11 Stadienspezifische Expression von Proteinen

Ziel der massenspektrometrischen Untersuchungen war es, nach bisher noch nicht identifizierten Proteinen zu fahnden, die aus subzellulären Fraktionen des Parasiten stammen. In diesem Zusammenhang wurden 20 hypothetische Proteine aus *P. falciparum* identifiziert. Bei den beiden hypothetischen Proteinen, die aus den Proteinspots 31 und 32 in Abb. 3.15 identifiziert wurden (Zugangs-Nr. 23505159 und 23613776), wurde in beiden Fällen ein N-terminales Signalpeptid vorhergesagt, was auf eine nicht-cytosolische zelluläre Lokalisation

dieser Proteine hindeutet. Mittels metabolischer Markierung konnte, wie in Abb. 3.29 gezeigt, die stadienspezifische Expression beider Genprodukte nachgewiesen werden. Beide Proteinspots treten spät im intraerythrocytären Entwicklungszyklus des Erregers (ab ca. 38 h nach Infektion) auf.



Abb. 3.29: Autoradiogramme von 2-D Gelen zur Darstellung der Expression zweier hypothetischer Proteine (Zugangs-Nr. 23505159 und 23613776, weiße Markierung). Die Expression der Proteine wurde durch metabolische Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin in 6-Stunden-Intervallen von 24 h bis 50 h nach Beginn eines Infektionszyklus und 2-D PAGE beobachtet. Die Entwicklungsstadien der Parasiten befanden sich in einem Zeitfenster von ca. 4 bis 6 h. Gezeigt sind Ausschnitte aus den jeweiligen Röntgenfilmen (mit Zeitintervall nach Infektion der Erythrocyten), die mit den entsprechenden radioaktiv-markierten 2-D Gelen exponiert worden waren. Zusätzlich ist für das Zeitintervall von 38 h bis 44 h nach Infektion ein Zwei-Kanal-Bild (Bernhardt et al., 1999) abgebildet, das den gleichen Ausschnitt des Silber-gefärbten 2-D Gels (grüne Proteinspots) und des Röntgenfilms (rote Proteinspots) übereinandergelagert zeigt. Die beiden identifizierten hypothetischen Proteine sind jeweils mit weißen Kreisen markiert. Nicht-stadienspezifische Proteine sind mit schwarzen Kreisen umrandet.

Bei vier hypothetischen Proteinen konnte kein entsprechender Proteinspot einwandfrei im Autoradiogramm zugeordnet werden. Dies lag zum einen daran, dass das identifizierte Protein eine große molekulare Masse besaß und nicht sauber von anderen Proteinspots in der 2-D PAGE werden konnte. und zum anderen daran. diesem getrennt dass in Molekularmassenbereich die Proteinspots im Autoradiogramm zu schwach abgebildet waren. Im Falle der anderen hier identifizierten hypothetischen Proteine konnte festgestellt werden, dass deren Expression nicht auf Schizonten beschränkt ist, sondern bereits in Trophozoiten stattfindet. So zeigt z. B. Abb. 3.30 die radioaktive Markierung zweier Proteinspots, die beide als hypothetische Proteine mit der gleichen Zugangs-Nr. identifiziert wurden. Beide Proteinspots treten in allen Autoradiogrammen auf.

Ergebnisse



Abb. 3.30: Autoradiogramme von 2-D Gelen zur Darstellung der Expression zweier hypothetischen Proteine (Spots 14 und 15; Zugangs-Nr. 23508493) aus Abb. 3.15. Die Expression der Proteine (weiß umrandet) wurde durch metabolische Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin in 6-Stunden-Intervallen von 24 h bis 50 h nach Beginn eines Infektionszyklus und 2-D PAGE beobachtet. Die Entwicklungsstadien der Parasiten befanden sich in einem Zeitfenster von ca. 4 bis 6 h. Gezeigt sind Ausschnitte aus den jeweiligen Röntgenfilmen (mit Zeitintervall nach Infektion der Erythrocyten), die mit den entsprechenden radioaktiv-markierten 2-D Gelen exponiert worden waren.

Das gleiche gilt für das identifizierte hypothetische Protein in Abb. 3.31. Der entsprechende Proteinsspot ist in allen Autoradiogrammen zu sehen. Allerdings scheint der Spot im Verlaufe der Parasiten-Entwicklung (vom Trophozoiten zum maturen Schizonten) deutlicher zu werden, was auf eine erhöhte Expressionsrate schliessen ließe.





Abb. 3.31: Autoradiogramme von 2-D Gelen (Ausschnitte) zur Darstellung der Expression des hypothetischen Proteins (Spot 70; Zugangs-Nr. 23508265) im Zeitraum von 24 bis 50 h nach Beginn eines Infektionszyklus (Invasion von Merozoiten). Die Entwicklungsstadien der Parasiten befanden sich in einem Zeitfenster von ca. 4 bis 6 h. Gezeigt sind Ausschnitte aus den jeweiligen Röntgenfilmen (mit Zeitintervall nach Infektion der Erythrocyten), die mit den entsprechenden radioaktiv-markierten 2-D Gelen exponiert worden waren.

Bei anderen, in der Literatur bereits näher beschriebenen Proteinen lässt sich die Expression in Abhängigkeit des Parasitenstadiums ebenfalls kontrollieren. Falcipain 2 und EXP-2 wurden nach den hier gezeigten Untersuchungen sowohl in Trophozoiten, als auch im späten Schizonten synthetisiert. Im Falle des *Merozoiten Surface Protein* 7 (MSP-7) konnte festgestellt werden, dass dessen Synthese erst sehr spät im Entwicklungszyklus stattfindet.



Abb. 3.32: Autoradiogramme von 2-D Gelen (Ausschnitte) zur Darstellung der Expression von Falcipain 2, EXP-2 (schwarz markiert) und MSP-7 (weiß markiert) im Zeitraum von 24 bis 50 h nach Beginn eines Infektionszyklus (Invasion von Merozoiten). Die Entwicklungsstadien der Parasiten befanden sich in einem Zeitfenster von ca. 4 bis 6 h. Gezeigt sind Ausschnitte aus den jeweiligen Röntgenfilmen (mit Zeitintervall nach Infektion der Erythrocyten), die mit den entsprechenden radioaktiv-markierten 2-D Gelen exponiert worden waren. Drei weitere Proteinspots, die in allen Autoradiogrammen zu sehen waren, sind zusätzlich schwarz markiert.



Abb. 3.33: Autoradiogramme von 2-D Gelen (Ausschnitte) zur Darstellung der Expression von *histo-aspartic protein* (HAP) im Zeitraum von 24 bis 50 h nach Beginn eines Infektionszyklus (Invasion von Merozoiten). Die Entwicklungsstadien der Parasiten befanden sich in einem Zeitfenster von ca. 4 bis 6 h. Gezeigt sind Ausschnitte aus den jeweiligen Röntgenfilmen (mit Zeitintervall nach Infektion der Erythrocyten), die mit den entsprechenden radioaktiv-markierten 2-D Gelen exponiert worden waren. Der Proteinsspot des identifizierten HAP ist weiß umrandet. Andere markierte Proteine, die in allen untersuchten Entwicklungsstadien synthetisiert werden sind schwarz umrandet.

#### 3.12 Untersuchungen zum *Histo-Aspartic Protein* (HAP)

Das *Histo-Aspartic Protein* (HAP) wurde in dieser Arbeit mehrfach während der massenspektrometrischen Analyse von Proteinen aus einem Proteinspot identifiziert. Ein Massenspektrum ist in der folgenden Abbildung dargestellt.



Abb. 3.34: PMF des *Histo-Aspartic Protein* (HAP). Das Spektrum wurde mit trypsinisierten Peptiden aus Spot 24 aus Abb. 3.15 generiert. Die Abdeckung der Aminosäuresequenz von HAP mit den erhaltenen Peptiden betrug 23 %.

1MNLTIKEEDFTNTFMKNEESFNTFRVTKVKRWNAKRLFKILFVTVFIVLAGGFSYYIFEN61FVFQKNRKINHIIKTSKYSTVGFNIENSYDRLMKTIKEHKLKNYIKESVKLFNKGLTKKS121YLGSEFDNVELKDLANVLSFGEAKLGDNGQKFNFLFHTASSNVWVPSIKCTSESCESKNH181YDSSKSKTYEKDDTPVKLTSKAGTISGIFSKDLVTIGKLSVPYKFIEMTEIVGFEPFYSE241SDVDGVFGLGWKDLSIGSIDPYIVELKTQNKIEQAVYSIYLPPENKNKGYLTIGGIEERF301FDGPLNYEKLNHDLMWQVDLDVHFGNVSSKKANVILDSATSVITVPTEFFNQFVESASVF361KVPFLSLYVTTCGNTKLPTLEYRSPNKVYTLEPKQYLEPLENIFSALCMLNIVPIDLEKN421TFVLGDPFMRKYFTVYDYDNHTVGFALAKNLKK

Abb. 3.35: Aminosäure-Sequenz von HAP (23509299). Die Peptidsequenzen sind fett markiert, deren monoisotopische Masse (MH<sup>+</sup>) mit Massen des PMF von HAP übereinstimmen. Links zeigen die Zahlen die Positionen der Aminosäurereste zu Beginn jeder Zeile an.

Durch das PMF des Proteins wurde das Genprodukt identifiziert. Es fällt auf, dass die Peptide, die mit dem PMF und der Aminosäuresequenz von HAP übereinstimmen, ab D133 C-terminal in der Sequenz liegen. Das Polypeptid D133-L451 hat eine berechnete Molekulare Masse von 36 kDa und einen pI von 5.17 (Abb. 3.35). Bezieht man die Sequenzabdeckung der treffenden Peptide auf diese Polypeptid-Sequenz, ergibt sich eine prozentuale Abdeckung von 33 % an Stelle von 23 %, wie es für die gesamte Sequenz berechnet wurde.

Es wurde festgestellt, dass dieses Protein im Mastergel aus der Rhoptrien-Präparation enthalten war. Die zelluläre Lokalisation dieses Proteins sowie seine biologische Aktivität war bis dato unbekannt. HAP besitzt eine große Sequenzidentität (~60 %) mit den Plasmepsinen I und II. Es sind einige Aminosäure-Austausche bekannt, die die biologische Aktivität des Proteins bestimmten könnten, z. B. der Austausch eines bei den Plasmepsinen katalytischen Aspartatrestes gegen einen Histidinrest (Berry et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Herstellung von Antiseren gegen zwei Peptide aus der HAP-Sequenz in Auftrag gegeben (Eurogentec, Belgien, DOUBLE-XP Programm; s. Kapitel 2.1.3). Neben den Seren wurden auch mit den eingesetzten Epitopen Affinitäts-gereinigte Antikörper erhalten. Im Western-Blot erkannte der anti-HAP-IgG zwei Banden bei ca. 40 und 25 kDa (Abb. 3.36). In der Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte mit dem IgG eine Markierung nachgewiesen werden, die bei Schizonten hauptsächlich um die Parasiten-Kerne herum liegt, allerdings nicht mit der Nahrungsvakuole kolokalisert (Abb. 3.36).



Abb. 3.36: Immunologischer Nachweis von HAP in Schizonten aus *P. falciparum* durch Western-Blot (I; anti-HAP-IgG 1:500) und Immunfluoreszenz-Mikroskopie (II; anti-HAP-IgG 1:200). In I) wurden 1x10<sup>6</sup>
Zellen für die SDS-PAGE aufgetragen und die Signale auf der Membran mit Pfeilen gekennzeichnet. Die molekularen Massen der Grössenstandards sind in kDa angegeben. In II) wurde der primäre Antikörper mit Alexa-488-gekoppeltem sekundärem Antikörper markiert (A; die Nahrungsvakuole ist mit einem weißen Pfeil angedeutet) und die Nuklei mit Hoechst 33258 (B). In II C sind die Bilder A und B übereinandergelagert. (Maßstab = 5 μm)

#### 3.13 Isolierung von PEMS

Merozoitenstrukturen, die durch den Einfluß von E64 allein von der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) umschlossen werden, stellen laut Salmon et al. (2001) ein hervorragendes Ausgangsmaterial für die weitere Reinigung der PVM und von Merozoitenstadien dar. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, bislang nicht bekannte Proteine der PVM zu finden. Aus diesem Grund wurde das Protokoll der Isolierung von PEMS übernommen und weitergeführt.

Die Präparationen wurden gemäß Abschnitt 2.2.5 durchgeführt. PEMS wurden entweder mit einem 40 %(v/v) Percoll-Kissen aus einer E64-inkubierten Kultur isoliert oder es wurden

zunächst 5- bis 7-kernige Schizonten mit einem 65 %(v/v) Percoll-Kissen aus einer synchronen Kultur isoliert und danach mit E64 inkubiert. Beide Methoden zeigten die gleichen Ergebnisse. Im Folgenden sind Abbildungen dargestellt, für die die PEMS mit der letzteren Methode präpariert worden sind. In Giemsa-gefärbten Kulturausstrichen erkennt man deutlich zusammenhängende, punktförmige Strukturen (Abb. 3.37). Intakte Erythrocyten sind hier nicht zu finden. Betrachtet man im Vergleich Abb. 3.38, so wird der Effekt von E64 auf die Parasiten deutlich. Unbehandelte mature Parasiten sind zu erkennen als Merozoiten-Cluster, die jeweils von der Wirtszelle umgeben werden. Die Wirtszellkomponenten bei E64behandelten Parasiten sind nicht so leicht zu erkennen. Vielmehr scheinen die Merozoiten-Cluster eher lose zusammenzuhängen. Hämozoinkristalle sind jeweils in diese Cluster eingeschlossen.



Abb. 3.37: Giemsa-gefärbte Ausstriche einer PEMS-Präparation (8h, 10 μM E64). In A ist ein Maßstab von 10 μm und in B von 5 μm eingezeichnet.



Abb. 3.38: Giemsa-gefärbter Ausstrich von Percoll-angereicherten maturen Stadien (Maßstab: 5 µm)



Abb. 3.39: Immunologischer Nachweis von humanem Bande 3-Protein in der PEMS-Fraktion und in nicht-infizierten Erythrocyten durch Western-Blotting. Pro Spur wurden 0,4 μl sedimentierte PEMS bzw. RBC aufgetragen. Es wurde ein monoklonaler anti-humanes Bande 3-Protein IgG (Sigma; 1:500) und anti-Maus-IgG, konjugiert an Alkalische Phosphatase (Sigma) eingesetzt. Der Nachweis von Bande 3-Protein erfolgte über die Alkalische Phosphatase-Reaktion. Die molekularen Massen des Größenstandards sind in kDa angegeben.

Die PEMS-Fraktion wurde im Vergleich zu nicht-infizierten RBC auf das Vorhandensein von humanem Bande 3-Protein im Western-Blot getestet (Abb. 3.39). Es stellte sich heraus, dass eine Bande bei ca. 100 kDa in beiden Spuren nachgewiesen werden konnte. Dies entspricht der molekularen Massen von humanem Bande 3-Protein. Obwohl die Bande in der PEMS-Fraktion schwächer erschien als bei nicht-infizierten RBC, war das erhaltene Signal deutlich. Bei den PEMS konnte eine zusätzliche Bande bei 20 kDa nachgewiesen werden, die bei nichtinfizierten RBC fehlt. Umgekehrt erschien hier eine Bande bei 53 kDa, die in der PEMS-Fraktion nicht nachgewiesen werden konnte. Demnach sind die Signale in beiden Proben unterschiedlich, obwohl Bande 3-Protein überall nachgewiesen werden konnte.

Um das Bande 3-Protein und Parasitenproteine in den Präparaten zu lokalisieren, wurde auf Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IFA) zurückgegriffen. In den folgenden Abbildungen sind lokalisierte Parasitenproteine jeweils rot dargestellt, Wirtszellkomponenten grün und die Nuklei blau. In Abb. 3.40 handelt es sich um iRBC, die über ein Percoll-Kissen angereichert worden sind. Ohne den Einfluß von E64 kann EXP-1, ein Parasitenprotein der PVM,

innerhalb der Wirtszellen lokalisiert werden. Die Kernfärbung beweist, dass es sich um vielkernige mature Parasitenstadien handelt. In Abb. 3.41 ist ein Ausschnitt eines Ausstrichs von Zellen gezeigt, die E64 ausgesetzt worden waren. EXP-1 kann nicht innerhalb der Wirtszelle lokalisiert werden, sondern – zusammen mit den Nuklei – außerhalb dieser. Die grüne Färbung als Markierung von humanem Bande 3-Protein der RBC-Membran kann nicht mit EXP-1 kolokalisert werden. Auffallend sind in Abb. 3.41 die grün gefärbten Zellen, in denen keine Nuklei markiert sind. Für diesen Versuch wurden Parasiten mit Percoll angereichert, was zu einer Parasitämie von 97 % führte. Die nachfolgende Inkubation mit E64 für 8 h erhöhte demnach den Anteil von Erythrocyten-Strukturen, die frei von Parasiten waren, was durch deren fehlende Nuklei-Markierung deutlich wird.



Abb. 3.40: Immunfluoreszenz-Aufnahme von angereicherten Schizonten. (A: Lokalisation von EXP-1; B: Lokalisation von Bande 3; C: Hoechst 33258 (Nuklei-Markierung); D: überlagerte Bilder)



Abb. 3.41: Immunfluoreszenz-Aufnahme von Ausstrichen einer PEMS-Präparation. (A: Lokalisation von EXP-1; B: Lokalisation von Bande 3; C: Hoechst 33258 (Nuklei-Markierung); D: überlagerte Bilder.

In Abb. 3.42 ist dargestellt, wie zusammenhängende Merozoiten, die von der PVM umgeben sind, aus der Wirtszelle herausgetreten sind. Auch hier wurde sich der Markierung von EXP-1 (**A**; rot) und des erythrocytären Bande 3-Proteins (**B**; grün), sowie der Parasiten-Kernfärbung

(C; blau) bedient. In der Durchlichtaufnahme (E) erkennt man gut die zusammenhängenden Merozoiten sowie das lichtundurchlässige Hämozoin. Die übereinandergelagerten Bilder in (D) machen deutlich, dass die Merozoiten-Struktur mit EXP-1 kolokalisiert, es aber an der gleichen Stelle nur eine schwache grüne Fluoreszenz gibt, also Bande 3 zumindest partiell enthalten ist. Dies wird auch in Abb. 3.43 bestätigt. EXP-1 und Nuklei können in demselben Cluster nachgewiesen werden. Nur an einer einzigen kleinen Stelle dieser Struktur kann eine Grünfluoreszenz erkannt werden.



Abb. 3.42: Immunfluoreszenz-Aufnahme eines maturen E64-behandelten Parasiten während des Verlassens der Wirtszelle (A: Lokalisation von EXP-1; B: Lokalisation von Bande 3; C: Hoechst 33258 (Nuklei-Markierung); D: überlagerte Bilder A-C; E: Transmissionsbild des gleichen Bildausschnitts.



Abb. 3.43: Immunfluoreszenz-Aufnahme eines Merozoiten-Clusters aus einer PEMS-Präparation, (A: Lokalisation von EXP-1; B: Lokalisation von Bande 3; C: Hoechst 33258 (Nuklei-Markierung); D: überlagerte Bilder A, B und C; E: Durchlicht-Aufnahme F: überlagerte Bilder D und E). Ebenfalls zu erkennen ist eine deutliche Grün-Markierung einer Struktur, in der keine Nuklei nachgewiesen werden konnten. (Maßstab = 10 μm)



Abb. 3.44: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von isolierten und in LR-White eingebetteten PEMS-Präparaten. Die Präparate wurden vor der Einbettung in 4 % PFA/PBS fixiert. Die Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat nach Reynolds kontrastiert.

Um die Merozoitenstrukturen aus der Präparation näher zu untersuchen, wurde auf die Elektronenmikroskopie zurückgegriffen. Wie bereits beschrieben, wurden angereicherte

Ergebnisse

Parasiten mit E64 inkubiert und danach die präparierten Merozoitenstrukturen elektronenmikroskopisch untersucht.

Abb. 3.44 zeigt drei verschiedene Merozoitenstrukturen. Die Merozoiten scheinen morphologisch intakt zu sein. Z. T. erkennt man gut die paarig angelegten, elektronendichten Rhoptrien. Im mittleren Bild ist die gut sichtbare Nahrungsvakuole angeschnitten und deren Hämozoin-Einlagerungen sind deutlich zu erkennen. Auffallend ist, dass die Merozoiten jeweils nicht lose zusammen liegen, sondern jede Gruppe von Merozoiten durch eine einzige Membran umgeben wird. Innerhalb dieser Merozoiten-Gruppen kann kein homogenes, elektronendichtes Material nachgewiesen werden, wie es für intakte intrazelluläre Stadien der Fall ist. Um den Ursprung der umgebenden Membran zu klären, wurde Bande 3-Protein elektronenmikroskopisch immunolokalisiert. Die Ergebnisse dazu sind in Abb. 3.45 dargestellt.



Abb. 3.45: Elektronenmikroskopische Aufnahme von isolierten und mit E64-behandelten Parasiten. Präparate wurden in 4 % PFA/PBS fixiert und nach der Entwässerung in der Ethanolreihe in LR-White eingebettet. Ultradünnschnitte wurden mit monoklonalem Antikörper gegen humanes Bande 3-Protein (Sigma, 1:500) und danach mit 12 nm kolloidalem Gold-konjugiertem sekundärem Antikörper (Ziegeanti-Maus IgG) inkubiert. Die Schnitte wurden schließlich mit Uranylacetat und Bleicitrat nach Reynolds kontrastiert. In (B) ist der markierte Ausschnitt aus (A) vergrößert abgebildet. Die Goldmarkierungen an der Membran sind mit Pfeilköpfen in (B) hervorgehoben. Rhoptrien (R) und Hämozoinkristalle (Nahrungsvakuole) sind z. T. markiert. Es ist gut zu erkennen, dass die die Merozoiten umgebende Membran markiert worden ist. Demzufolge befindet sich das Epitop aus dem Bande 3-Protein bei einem nicht unbeachtlichen Teil der Merozoiten-Strukturen in bzw. an dieser Membran, was darauf hindeutet, dass es sich dabei um die Erythrocytenmembran handelt. Allerdings konnten die sonst elektronenmikroskopisch gut sichtbaren *knob*-Strukturen auf der Membran infizierter Erythrocyten nicht ausgemacht werden. Da aber die PVM anscheinend nicht sichtbar ist, mußte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Beobachtung um ein Präparations-Artefakt handelt. Aus diesem Grund wurden Präparate für morphologische EM-Untersuchungen mit Glutaraldehyd, PFA und Osmiumtetroxid fixiert.



Abb. 3.46: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer PEMS-Präparation. Alle Strukturen befanden sich in derselben Präparation. Die Probe wurde für morphologische Studien in Epon eingebettet.

Wie in Abb. 3.46 **A** und **B** zu erkennen ist, sind auch hier die entwickelten Merozoiten von nur einer Membran umgeben. In denselben Präparaten wurden auch Strukturen wie in Abb.

3.46 C und D gesichtet. Es wurde festgestellt, dass ca. 50 % der Merozoiten-Strukturen von nur einer Membran umgeben sind und die andere Hälfte von zweien. In C sieht man deutlich, dass die Merozoiten von zwei Membranen umgeben sind. Hier steht fest, dass es sich bei der inneren Membran um die PVM und bei der äußeren um die Plasmamembran des Erythrocyten handelt. Des Weiteren waren auch Strukturen wie in D zu sehen. In Zusammenhang mit den Ergebnissen aus der Immunfluoreszenz-Mikroskopie, wo festgestellt wurde, dass die PEMS-Präparationen durch Erythrocytenmembranen verunreinigt sind, handelt es sich bei Abb. 3.46 D wohl um cytoplasmafreie Erythrocyten (Ghosts). Damit muß die Frage gestellt werden: Ist die Immunolokalisierung des humanen Bande 3-Proteins an der die Merozoiten umgebenden Membran ein tatsächlicher Befund aufgrund einer spezifischen Bindung des Antikörpers an das Bande 3-Protein bzw. ein Fragment dessen oder handelt es sich hierbei um ein artifizielles Ergebnis? Um diese Frage zu beantworten, wurde ein anderer Antikörper gegen ein weiteres humanes Erythrocytenprotein, nämlich Glycophorin, eingesetzt. Bei dem Antikörper handelt es sich ebenfalls - wie bei dem anti-Bande 3-Antikörper - um einen monoklonalen Antikörper mit Ursprung in der Maus. Der Antikörper erkennt nach Herstellerangaben humanes Glycophorin A und B und wurde zusammen mit einem Kaninchenserum gegen das Serine-Rich Protein (SERP; Ansorge et al., 1996; Knapp et al., 1991) aus Plasmodium falciparum in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt. SERP ist ebenso wie EXP-1 mit der parasitophoren Vakuole des Parasiten assoziiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.47 dargestellt. Trotz einer schwachen grünen Hintergrund-Fluoreszenz wird deutlich, dass in der PEMS-Präparation Merozoiten-Cluster vorliegen, die mit SERP kolokalisieren, allerdings nicht mit Glycophorin A+B. Parallel wurden Parasiten in Kultur ebenso für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt, um die Funktionalität des Anti-Glycophorin A+B-Antikörpers zu zeigen (Abb. 3.48). Erwartungsgemäß erkennt hier der monoklonale Antikörper auch nichtinfizierte Erythrocytenmembranen, was an der grünen Markierung zu erkennen ist. Eine Lokalisation von Glycophorin in den Merozoiten-Clustern konnte elektronenmikroskopisch nicht gezeigt werden.



Abb. 3.47: Immunfluoreszenz-Aufnahme von Ausstrichen einer PEMS-Präparation. A: Lokalisation von SERP, 1:40; B: Lokalisation von Glycophorin A+B, 1:40; C: Hoechst 33258-Markierung (Nuklei-Markierung); D: überlagerte Bilder A – C. Der Maßstab entspricht 10 μm.



Abb. 3.48: Immunfluoreszenz-Aufnahme eines Ausstrichs von Zellen einer Parasitenkultur. (Rot: Lokalisation von SERP, 1:40; Grün: Lokalisation von Glycophorin A+B, 1:40; Blau: Hoechst 33258-Markierung (Nuklei-Markierung)

#### 3.14 Präparation der parasitophoren Vakuolen-Membran

Ziel der PEMS-Präparation war es, ein Protokoll zu entwickeln, um die die Merozoiten-Cluster umgebende Membran (PVM) zu isolieren und deren Protein-Zusammensetzung zu studieren.

Aus diesem Grund wurde das Protokoll von Salmon et al. (2001) erweitert, wie schematisch in der folgenden Abbildung dargestellt.



Abb. 3.49: Schematische Darstellung zur Präparation der PVM. Als Ausgangsmaterial dienten hier Präparationen von PEMS gemäß Salmon et al. (2001) (links mit schematisierten Merozoiten und Nahrungsvakuole inklusive Hämozoin-Pigment). Zur Scherung der PEMS wurde eine Kanüle mit einem Innendurchmesser von 0,9 mm eingesetzt.

Angereicherte PEMS dienten hierfür als Ausgangsmaterial und wurden mittels Scherkräften aufgeschlossen. Die resultierende Suspension wurde zentrifugiert, um Merozoiten und Hämozoin zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und schließlich mit 100.000 g zentrifugiert. Es entstand ein weißliches Sediment. Zur Überprüfung der Präparationen wurden entsprechende Fraktionen mittels Giemsa-Lösung gefärbt. Wie in Abb. 3.50 dargestellt, konnten entsprechende Merozoiten-Cluster in der E64-behandelten Kultur erkannt werden (A bis C) und diese von nicht-infizierten Erythrocyten isoliert werden (D und E). Nach dem Scheren wurden die Merozoiten erhalten (F). Dieses Ergebnis stimmte mit dem Erwarteten überein.



Abb. 3.50: Giemsa-Färbung einzelner Fraktionen während der Präparation von Merozoiten und der PVM. In A bis C sind Zellen aus einer E64-behandelten Parasiten-Kultur abgebildet. D und E zeigen isolierte Merozoiten-Cluster und in F sind Merozoiten zu sehen, die nach dem Aufschluß der Merozoiten-Cluster gewonnen wurden (Maßstäbe: je 10 μm).

Das nach der Ultrazentrifugation erhaltene Sediment wurde komplett für die 2-D PAGE eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.51 als PVM-*Mastergel* dargestellt. Es sind ca. 250 Proteinspots zu sehen, wobei ca. 80 % der Proteinspots eine molekulare Masse von 50 bis 200 kDa besitzen. Das Proteinspot-Muster dieses gefärbten Gels wurde nach der Zwei-Kanal-Methode von Bernhardt et al. (1999) mit 2-D Gelen verglichen, die für die vorangegangenen massenspektrometrischen Untersuchungen verwandt wurden. Es wurde festgestellt, dass neun Genprodukte von *P. falciparum* bereits identifiziert worden sind. Dazu gehören EXP-1 und EXP-2, die beide mit der PVM assoziiert sind (Simmons et al., 1987; Johnson et al., 1994). Deutlich gefärbte Proteinspots konnten identifizierten *Heat Shock Proteinen* (HSP) bzw. Actin zugeordnet werden. Das charakteristische Spotmuster bei ca. 30 bis 35 kDa und pI von ca. 4,8 konnte zuvor als 14-3-3 Proteine und als *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (Cyclin) identifiziert werden. Die direkte Identifizierung von Proteinen aus der PVM-Präparation werden in Zukunft mit präparativen 2-D Gelen durchgeführt werden.

Erythrocytäre Proteine konnten in der Präparation nicht als deutliche Proteinspots festgestellt werden. Dies zeigt beispielhaft der Vergleich mit dem 2-D Gel Abb. 3.52. Es wurden nicht-

infizierte Erythrocyten mittels Saponin lysiert, dann das Detergenz ausgewaschen und die Membranfraktion zur 2-D PAGE eingesetzt. Das Proteinspot-Muster unterscheidet sich deutlich von dem in Abb. 3.51.

In beiden Fällen wurde eine membranöse Fraktion zur elektrophoretischen Auftrennung der enthaltenen Proteine eingesetzt. Dass eine Extraktion von Membranproteinen möglich ist zeigt Abb. 3.52, in der das Bande 3-Protein markiert ist. Dieses Protein besitzt 12 Transmembranhelices und zeigt in der 2-D PAGE eine charakteristische Spotform (Rabilloud et al., 1999). Das Fehlen dieses Spots in Abb. 3.51 deutet darauf hin, dass in der PVM-Präparation keine oder eine nicht nachweisbare Menge an Bande 3-Protein enthalten ist.



Abb. 3.51: 2-D Gel mit aufgetrennten Proteinen aus der PVM-Präparation (PVM-*Mastergel*). Es wurde ein pH-Gradient von 4-7 in der ersten Dimension verwandt. Das Gel wurde silbergefärbt. Proteinspots, die mittels bisheriger MALDI-TOF MS identifiziert werden konnten, sind markiert und beschriftet. Die Molekularmassen der Größenstandards sind in kDa angegeben. (POD<sub>RBC</sub>: humane Thioredoxin-Peroxidase aus Erythrocyten; HSP: *Heat Shock Protein*; EXP: *Exported Protein*)

Um zu klären, ob erythrocytäre Membranen in der Merozoiten-Fraktion zu finden sind, wurde auch diese Fraktion in der 2-D PAGE eingesetzt. Das entstandene 2-D Gel wurde dann anhand des Bande 3-Proteins und Spectrins mit dem Gel verglichen, in dem Proteine aus der PVM-Präparation aufgetrennt worden waren (PVM-*Mastergel*). Der Vergleich der beiden

Gele ist in Abb. 3.53 zu sehen. Sowohl das Bande-3 Protein als auch Spectrin konnten deutlich in der Merozoiten-Fraktion erkannt werden, aber nicht im PVM-*Mastergel*.



Abb. 3.52: Silbergefärbtes 2-D Gel mit aufgetrennten Proteinen aus Erythrocyten-*Ghosts*. Erythrocyten wurden mittels Saponin-Behandlung lysiert, das Saponin entfernt und die entstandene Membran-Fraktion für die 2-D PAGE eingesetzt. Es wurden die Proteine aus 2x10<sup>7</sup> *Ghosts* für die 2-D PAGE eingesetzt. Die molekularen Massen der Größenstandards sind in kDa angegeben. Zusätzlich ist das Bande 3-Protein im Gel markiert (s. dazu Rabilloud et al. (1999)).

Außerdem ist in Abb. 3.53 zu sehen, dass EXP-1 und EXP-2 im PVM-*Mastergel* angereichert worden sind, aber nicht in der Merozoiten-Fraktion (Mz-Gel) gefunden wurden. Andere Protein-Spots sind dagegen in beiden Gelen gleich intensiv gefärbt. Diese Proteine, die in beiden Gelen zu finden sind, sind durch die Überlagerung von Rot- und Grün-Kanal gelb gefärbt. Es wurden 18 Proteinspots gefunden, die nur im PVM-*Mastergel* zu finden waren und nicht im Mz-Gel. Viele abundante Proteine wie HSP und Actin waren in beiden Gelen zu finden, dagegen konnten die bekannten Proteine der PVM, EXP-1 und EXP-2, in der PVM-Fraktion angereichert werden. Andere Proteine, wie die Phosphoethanolamine N-Methyltransferase erschienen gleich stark gefärbt in beiden Gelen, während die 14-3-3 Proteine relativ stärker in der Merozoiten-Fraktion angereichert waren.



Abb. 3.53: Vergleich zwischen PVM-*Mastergel* und dem 2-D Gel mit Proteinen der Merozoiten-Fraktion (Mz). Die Positionen von Spectrin und Bande 3 sind im Mz-Gel markiert und die entsprechenden Bereiche im PVM-*Mastergel*, in dem beide Proteine nicht ausgemacht werden konnten. Rechts sind Zwei-Kanal-Bilder der Regionen von EXP-1 und EXP-2 abgebildet (Rot: PVM-*Mastergel*, grün: Mz-Gel). Die Positionen von EXP-1 und EXP-2 wurden zusätzlich im PVM-*Mastergel* markiert. Die molekularen Massen der Größenstandards sind für das PVM-*Mastergel* in kDa angegeben.

# 3.15 Der Effekt des Biotin-markierten Aziridin-2,3dicarbonsäure-Derivates auf erythrocytäre Stadien von *P. falciparum*

Laut Salmon et al. (2001) soll eine Cystein-Protease-Aktivität dafür verantwortlich sein, dass eine Evasion der Merozoiten aus der infizierten Wirtszelle erfolgen kann. Um die entsprechende(n) Protease(n) aufzuspüren, wurde neben E64 ein weiterer Cystein-Protease-Inhibitor gegen intraerythrocytäre Plasmodien eingesetzt. Der Vorteil dieses zusätzlichen Inhibitors liegt darin, dass er biotinyliert ist, was einen direkten Nachweis mittels Streptavidin ermöglicht. Es handelt sich dabei um ein biotinyliertes Aziridin-2,3-dicarbonsäure-Derivat (bADS) und wurde von Prof. Dr. T. Schirmeister, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt. Die Strukturformel sowie die genaue chemische Bezeichnung ist in Abb. 3.54 angegeben.



1-[6-(+)-Biotinylamino]-caproyl-aziridin-2,3-dicarboxylsäure-dibenzylester

Abb. 3.54: Strukturformel und Bezeichnung des verwandten biotinylierten Cystein-Protease-Inhibitors, im Folgenden bADS genannt.

Die Biotinylierung dient als Markierung des Inhibitors zwecks Kopplung an ein Streptavidin-Konjugat, mit dem sich der Inhibitor-Enzym-Komplex nachweisen läßt. Es ist bereits bekannt, dass sich das nichtbiotinylierte Aziridin-2,3-Dicarbonsäure-Derivat kovalent an das aktive Zentrum von der bisher getesteten Cystein-Proteasen bindet und diese so irreversibel inaktiviert (persönliche Mitteilung, Prof. Dr. T. Schirmeister, Univ. Würzburg; Schirmeister, 1999; Schirmeister, 1999; Schirmeister und Peric, 2000). Die Eigenschaft des Inhibitors, kovalent an das Zielenzym zu binden, macht die Substanz interessant für die Identifizierung des Zielmoleküls über 2-D PAGE und Massenspektrometrie sowie für Lokalisationssstudien mittels Fluorophor-gekoppeltem Streptavidin. Dies ist in Abb. 3.55 schematisch dargestellt: Mit bADS inkubierte Schizonten dienen der Präparation von PEMS oder können direkt für die 2-D PAGE eingesetzt werden. Die Extraktion und die Auftrennung der enthaltenen Proteine über die 2-D PAGE führt zum Nachweis der Zielproteine und damit zu ihrer Identifizierung.



Abb. 3.55: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Identifizierung der Zielproteine von bADS. Schizonten werden mit bADS inkubiert, die sich entweder zur PEMS-Präparation verwenden lassen oder direkt für die 2-D PAGE eingesetzt werden. Nach dem Nachweis von bADS mit z. B. Streptavidin-AP, können die Zielproteine nachfolgend identifiziert werden.

Für das Aufspüren biotinylierter Proteine nach Inkubation von Parasiten mit bADS unter Kulturbedingungen wurde wie für Abb. 3.56 beschrieben vorgegangen. Es sind 24 markierte separate Proteinspots auf der Membran zu erkennen und weitere markierte Bereiche, in denen Ketten von gefärbten Punkten auftraten. Es handelt sich dabei um Proteine mit einer Molekularmasse von ca. 20 bis 70 kDa, die im pI-Bereich von 4 bis 7 liegen. Es konnten keine Signale auf der Membran festgestellt werden, als eine entsprechende Menge Parasiten eingesetzt wurde, die nicht mit bADS behandelt worden waren (nicht abgebildet).

Durch die Zwei-Kanal-Methode (Bernhardt et al., 1999) und den zuvor beschriebenen massenspektrometrischen Analysen konnte die mature Form von Falcipain 2 als markierter Proteinspot identifiziert werden, indem die PVDF-Membran mit den markierten Proteinspots mit einem entsprechenden Silber-gefärbten Gel verglichen wurde (Abb. 3.57). Die Position von Falcipain hat sich durch die bADS-Markierung nicht merklich verändert.



Abb. 3.56: Nachweis biotinylierter Proteine nach der 2-D PAGE (pH 4-7 in der ersten Dimension). Eine synchronisierte Kultur mit frühen Schizonten wurde mit 10 μM bADS für 10 h unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden Schizonten mittels Zentrifugation über ein Percoll-Kissen isoliert und dreimal mit einem 50fachen Volumen an PBS gewaschen und die Proteine für die 2-D PAGE extrahiert. Der 2-D PAGE folgte der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran mit anschließendem einstündigem Blockieren freier Bindungsstellen mit 5 %(w/v) Albumin Fraktion V (Applichem) in TTBS. Danach wurde die Membran mit einer 1 : 2000 Verdünnung eines Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugates (Amersham Bioscience, Freiburg) in der Blockierungslösung für 2,5 h bei RT inkubiert. Schliesslich erfolgte nach dreimaligem Waschen der Membran in TTBS die Anfärbung markierter Proteine mit BCIP/NBT nach den Angaben des Herstellers (Promega, Mannheim). Die Größen des Molekularmassenstandards sind in kDa angegeben. Sichtbar gemachte Proteinspots sind markiert. Der Pfeil weist auf die Position von Falcipain 2 (s. u.).



Abb. 3.57: Zwei-Kanal-Abbildung zur Identifizierung von Falcipain 2, das mit bADS markiert vorliegt. Es wurden ein Silber-gefärbtes 2-D Gel und die markierte Membran aus Abb. 3.55 mit aufgetrennten Proteinen aus Schizonten-Extrakt miteinander verglichen.

Um die biotinylierten Proteine durch Fluoreszenz-Mikroskopie zu lokalisieren, wurde ein Streptavidin-Cy3-Konjugat eingesetzt (Abb. 3.58 bis Abb. 3.60). Es war zu beobachten, dass sich die Fluoreszenz-Markierung bei bADS-inkubierten Trophozoiten und Schizonten deutlich unterschied. Bei Trophozoiten war die Nahrungsvakuole deutlich markiert, die an den Hämozoin-Kristallen zu erkennen ist. Zusätzlich trat eine ringförmige Markierung um den intrazellulären Parasiten herum auf, was darauf schliessen ließ, dass die Markierung im Cytosol der infizierten Wirtszelle lokalisiert ist, nicht aber im Cytosol des Parasiten. Dies trifft auch bei jungen Schizonten zu, die zwischen 5 und 8 Kerne besitzen (Abb. 3.59). Ob in iRBC auch die parasitophore Vakuole markiert wurde, konnte nicht gezeigt werden. Bei maturen Schizontenstadien mit mehr als 12 Nuklei wurde beobachtet, dass zwar die Fluoreszenz der Nahrungsvakuole vorhanden war, aber die Markierung im Wirts-Cytoplasma deutlich schwächer war als bei Trophozoiten bzw. frühen Schizontenstadien (Abb. 3.60). In nichtinfizierten Erythrocyten konnte keine deutliche Fluoreszenz festgestellt werden. Dies traf auch für RBC und iRBC zu, die zuvor nicht mit bADS inkubiert worden waren (nicht gezeigt).



Abb. 3.58: Aufnahmen (Konfokale Lasermikroskopie) von Parasiten in einer Kultur, die zuvor mit 10 μM bADS inkubiert worden waren. Die Lokalisation von bADS erfolgte mit Streptavidin-Cy3-Konjugat. A: Cy3-Fluoreszenz; B: Durchlichtabbildung des selben Ausschnittes; C: Hoechst 33258-Fluoreszenz (Kern-Färbung); D: überlagerte Bilder A und C.



Abb. 3.59: Fluoreszenzaufnahme (Konfokale Lasermikroskopie) eines frühen Schizontenstadiums in einer Kultur, die zuvor mit 10 μM bADS inkubiert worden waren. Die Lokalisation von bADS erfolgte mit Streptavidin-Cy3-Konjugat. A: Cy3-Fluoreszenz; B: Durchlichtabbildung des selben Ausschnittes; C: Hoechst 33258-Fluoreszenz (Kern-Färbung); D: überlagerte Bilder A und C.



Abb. 3.60: Fluoreszenzaufnahme (Konfokale Lasermikroskopie) eines maturen Parasiten in einer Kultur, die zuvor mit 10 μM bADS inkubiert worden war. Die Lokalisation von bADS erfolgte mit Streptavidin-Cy3-Konjugat. A: Cy3-Fluoreszenz; B: Durchlichtabbildung des selben Ausschnittes; C: Hoechst 33258-Fluoreszenz (Kern-Färbung); D: überlagerte Bilder A und C.

Junge Schizonten, die zuvor für 6 h mit 10  $\mu$ M bADS inkubiert worden waren, zeigten in der Elektronenmikroskopie deutlich Unterschiede zu denjenigen Parasiten, die nicht mit bADS behandelt waren (Abb. 3.61). Behandelte Parasiten zeigten als elektronendichtes Material wenige und kleinere Hämozoin-Kristalle in der Nahrungsvakuole, während die Nahrungsvakuole unbehandelter Parasiten eher hell erschien und die Kristalle größer und häufiger waren.



Abb. 3.61: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von jungen Schizontenstadien, die entweder mit 10 μM (+ bADS) oder ohne (- bADS) bADS vor der Fixierung und Einbettung inkubiert wurden. Zur Veranschaulichung ist die Nahrungsvakuole der Parasiten mit den Hämozoin-Kristallen jeweils mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet.

### 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine aus Schizonten von *Plasmodium falciparum* durch die Verwendung von Zwei-dimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D PAGE) und *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight* Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) identifiziert. Die Schizonten des Parasiten sind aus zwei Gründen von besonderer Bedeutung für dessen intraerythrocytären Lebenszyklus:

- 1) Die sich innerhalb des Schizonten entwickelnden Merozoiten besitzen die nötige Ausstattung, um neue Erythrocyten zu befallen (Invasion) und sich in ihnen einzunisten.
- Die Schizonten selbst benötigen Faktoren, die es ermöglichen, die Merozoiten sowohl aus der parasitophoren Vakuole als auch aus dem infizierten Erythrocyten freizusetzen (Evasion).

Weder das für die Invasion und Einnistung noch das für die Evasion des Parasiten erforderliche Proteinrepertoire konnte bisher ausreichend identifiziert und funktionell charakterisiert werden. Für die Invasion des Merozoiten spielen die Proteine des Apikal-Komplexes (Rhoptrien, Micronemen und *Dense Granules*) eine entscheidende Rolle (Cowman und Crabb, 2002). Für die Überlebensfähigkeit des intraerythrocytären Parasiten und vermutlich auch für dessen Evasion ist das Proteinrepertoire der Parasitophoren Vakuole (PV) essentiell (Guevara Patino et al., 1997; Haldar et al., 2002; Salmon et al., 2001).

Da diese beiden subzellulären Strukturen (Apikal-Komplex und PV) von derart entscheidender Bedeutung für den Lebenszyklus des Parasiten sind, sollte in dieser Arbeit nach Proteinen beider subzellulärer Strukturen gefahndet werden. Dazu wurde eine Kombination eingesetzt, die aus subzellulärer Fraktionierung der Kompartimente, der der damit assoziierten Proteine durch 2-D PAGE und Trennung deren massenspektrometrische Identifizierung besteht. Eine solche Kombination wurde von Blackstock und Weir (1999) als "Cell Map Proteomics" bezeichnet und wurde vorgeschlagen, um intrazelluläre, räumliche Unterschiede der Protein-Ausstattung in einer Zelle zu untersuchen (Barrett et al., 2000). Eine derartige Vorgehensweise wurde auch von Blackman und Bannister (2001) zur Charakterisierung des gesamten Repertoires an Genprodukten eines subzellulären Kompartiments von P. falciparum vorgeschlagen. Die Etablierung der 2-D
PAGE für P. falciparum war notwendig, um diese Fragestellung zu bearbeiten. Die Durchführung der 2-D PAGE bei P. falciparum ist allerdings mit einigen inherenten Problemen behaftet: Der Parasit ist obligat intrazellulär und Methoden, ihn als intakte Einheit ohne kontaminierende Wirtszell-Komponenten zu isolieren, sind bislang nicht zugänglich. Somit mußte damit gerechnet werden, in sämtlichen Präparationen humane Proteine der Erythrocyten und des Mediums zu finden. Besondere Probleme bereitet das Hämoglobin, da es ca. 95 % der Proteinmasse im Wirtszell-Cytoplasma ausmacht. Eine solche Abundanz eines Proteins in einem Zellextrakt behindert die Durchführung einer 2-D PAGE in hohem Maße, besonders, wenn sie im präparativen Maßstab durchgeführt wird. Hier ist es von Vorteil, mit den Schizonten ein matures Parasitenstadium als Untersuchungsobjekt wählen zu können, da während des Entwicklungszyklus bis zu 65 % des Hämoglobins vom Parasiten für den eigenen Stoffwechsel abgebaut werden (Krugliak et al., 2002). Ein weiteres Problem stellte die effektive Extraktion von Parasiten-Proteinen für die nachfolgende 2-D PAGE dar. Sowohl das Extraktionsmedium als auch die Extraktionsprozedur wurden empirisch optimiert. Als besonders effektiv erwies sich die Verwendung von Thioharnstoff und ASB-14 in Anlehnung an Rabilloud et al. (1999) und die Temperatur-kontrollierte Ultraschallbehandlung der Proteinprobe. Die 2-D PAGE-Technik für P. falciparum wurde in der hier dargestellten Arbeit in Zusammenhang mit einer umfangreichen Analyse von Proteinspots durch Massenspektrometrie etabliert. Dies wurde benutzt, um die Protein-Ausstattung von subzellulären Kompartimenten bzw. Strukturen des Parasiten, wie den Rhoptrien und der parasitophoren Vakuolen-Membran (PVM), zu analysieren.

### 4.1 Die Präparation von Rhoptrien aus *P. falciparum*

Zur subzellulären Fraktionierung und Reinigung der Rhoptrien wurde auf ein bereits bestehendes Protokoll zurückgegriffen (Etzion et al., 1991), das von Sam-Yellowe und Kollegen (Sam-Yellowe et al., 1998) modifiziert worden war. Zum Nachweis von Organellen in einer Präparation ist es wichtig, darin spezielle Proteine zu identifizieren, die dem isolierten Organellen-Typus zweifelsfrei zugeordnet werden können (Blackman und Bannister, 2001). Aus diesem Grund wurde ein Antiserum gegen das *Apical Membrane Antigen 1* (AMA-1) eingesetzt. AMA-1 ist ein integrales Membranprotein und wurde in den Ausführgängen der

Rhoptrien mittels Elektronenmikroskopie lokalisiert (Crewther et al., 1990; Narum und Thomas, 1994). AMA-1 ist das Genprodukt eines essentiellen single copy-Gens und besitzt strukturelle Übereinstimmungen in allen bisher untersuchten Plasmodien-Arten sowie in Toxoplasma (Cheng und Saul, 1994; Donahue et al., 2000; Dutta et al., 1995; Kappe und Adams, 1996; Kocken et al., 2000; Marshall et al., 1989; Marshall et al., 1996; Oliveira et al., 1996; Peterson et al., 1990; Triglia et al., 2000). In Toxoplasma wurde AMA-1 allerdings in den Micronemen lokalisert (Donahue et al., 2000). In dieser Arbeit zeigte der Nachweis von AMA-1 in der Immunofluoreszenz-Mikroskopie punktförmige Signale in vielkernigen Schizonten, wie es für Rhoptrien-Proteine bereits mehrfach publiziert wurde (Preiser et al., 2000). Bei Kolokalisationsstudien wurde festgestellt, dass die Verteilungsmuster von AMA-1 und dem bekannten Rhoptrien-Protein RHOP-H1 nicht exakt übereinstimmen. Dies wurde nicht erwartet, da beide Proteine in den Ausführgängen der Rhoptrien lokalisiert sein sollten. Im Oktober 2002 konnten Healer und Kollegen zeigen, dass auch AMA-1 aus P. falciparum in den Micronemen lokalisiert ist (Healer et al., 2002), ebenso wie es zuvor für AMA-1 aus Toxoplasma gondii beschrieben worden ist (Donahue et al., 2000). Es kann angenommen werden, dass Micronemen eine geringere physikalische Dichte besitzen als Rhoptrien und Dense Granules (Blackman und Bannister, 2001). Dennoch wurden die Proform und die mature Form von AMA-1 in Fraktionen des Dichte-Gradienten zur Präparation von Rhoptrien nachgewiesen, in denen eine hohe Saccharose-Konzentration und damit eine hohe Dichte herrschte. In der Studie von Etzion et al. (1991) wurde keine Kontamination mit Micronemen in den Fraktionen des Saccharose-Gradienten, in denen Rhoptrien angereichert worden waren, beobachtet. Daher ist es interessant, dass AMA-1 in den Fraktionen hoher Dichte nachgewiesen werden konnte, und zwar die 83 kDa-Form und die 62 kDa-Form. Die gleiche Beobachtung wurde schon zuvor von Sam-Yellowe und Kollegen (Sam-Yellowe et al., 1999) gemacht. Um diesen Widerspruch zu früheren Arbeiten zu erklären, zeigten Healer et al. (2002), dass die Proform von AMA-1 in den Micronemen (AMA-1<sub>83</sub>; 83 kDa) zur maturen 62 kDa Form (AMA-1<sub>62</sub>) prozessiert wird und aus den Micronemen über die Ausführgänge der Rhoptrien sezerniert wird. Auf der extrazellulären Seite der Merozoiten-Oberfläche erfolgt die weitere proteolytische Spaltung. Dies bedeutet, dass in der Präparation Micronemen vorhanden sind, was im Westernblot zum Nachweis der 83 kDa Proform in den entsprechenden Fraktionen führte. Die prozessierte 62 kDa-Form von AMA-1 aus dem Rhoptrien-Ausführkanal wurde in den gleichen Fraktionen des Saccharose-Gradienten mit

hoher physikalischer Dichte nachgewiesen. Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass bei den Präparationen auch EBA-175, ein bekanntes Micronemen-Protein, in Fraktionen hoher Dichte angereichert werden kann. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten eine Anreicherung von vesikulären Strukturen in den entsprechenden Fraktionen mit einer Dichte von 1,14 bis 1,16 g/ml. Die hohe Dichte der Vesikel und ihre Größe von 200 bis 400 nm stimmen mit den Ergebnissen von Etzion et al. (1991) und Sam-Yellowe et al. (1998) überein. Bei kleineren Vesikeln handelt es sich vermutlich um Dense Granules (Etzion et al., 1991). Daraus kann geschlossen werden, dass Rhoptrien, Micronemen und vermutlich auch Dense Granules gemeinsam aus Parasiten-Homogenat gereinigt wurden. Es ist möglich, dass die Rhoptrien und Micronemen morphologisch miteinander in Verbindung stehen. Dies wurde bereits durch elektronenmikroskopische Studien beschrieben (Aikawa, 1966; Scholtyseck und Mehlhorn, 1970). Zur Invasion des Parasiten in einen Erythrocyten verschwinden die Micronemen, so dass hier eine Fusion von Micronemen mit dem Ausführkanal der Rhoptrien anzunehmen ist (Bannister et al., 1986b). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es - zumindest kurz vor dem Freisetzen bzw. der Reinvasion eines Merozoiten - zu einer Verbindung zwischen Micronemen und Rhoptrien kommt. Dense Granules werden, wenn überhaupt, aufgrund ihrer eigenen Dichte mit Rhoptrien/Micronemen gemeinsam angereichert. Sie haben, elektronenmikroskopischen Untersuchungen folgend, keine Verbindung mit den Organellen der apikalen Spitze, sondern liegen im Cytosol zwischen Nukleus und dem Apikal-Komplex und sezernieren ihren Inhalt über die Merozoiten-Oberfläche nach der Invasion (Bannister und Dluzewski, 1990; Trager et al., 1992)

## 4.1.1 Die massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen

Die Einführung der 2-D PAGE für *P. falciparum* ermöglichte, die Proteine derjenigen Fraktionen zwei-dimensional zu trennen, in denen AMA-1 nachgewiesen werden konnte. Das resultierende Gel wurde als Rhoptrien-*Mastergel* bezeichnet. Im Vergleich zu einem 2-D Gel, in dem Proteine eines Gesamtextraktes getrennt wurden, ist das Spotmuster im *Mastergel* weit weniger komplex. Laut Perkins (1992) besitzen Rhoptrien in *P. falciparum* 9 – 15 unterschiedliche Proteine. Zehn Proteine wurden bereits in den Rhoptrien von *P. falciparum* lokalisiert: RHOP-H1, -H2, -H3 (Sam-Yellowe et al., 1995), RAP-1 (Ridley et al., 1990), RAP-2, RAP-3, ein 225 kDa-Protein (Roger et al., 1988), eine Serin-Protease (Braun-Breton et al., 1988), ein 60 kDa Protein (Carcy et al., 1994; Grellier et al., 1994) und MAEBL (Blair et al., 2002). Das entspricht ca. 1/10 der im *Mastergel* gefundenen Proteinspots. Es sei erwähnt, dass durch die hier eingesetzte Form der 2-D PAGE nur Proteine erfasst werden können, deren pI-Wert im Bereich von 4-7 und deren Molekularmassen zwischen 20 und 150 kDa liegen.



Abb. 4.1: Kalkulierte Molekularmassen und pl-Werte verschiedener apikaler Proteine aus *P. falciparum* 3D7. Die Aminosäuresequenzen zur Berechnung der Koordinaten sind der Plasmodium-Datenbank (<u>www.plasmodb.org</u>) entnommen. Molekularmasse und pl-Werte wurden mit dem Programm "Compute pl/Mw" (<u>http://www.expasy.org/tools/pi tool.html</u>) berechnet. Bekannte oder vorhergesagte Signalpeptide, sowie prozessierte Fragmente wurden nicht mit in die Berechnung einbezogen. Der Bereich von pl 4 bis 7 ist durch eine gestrichelte Linie vom basischen Bereich getrennt. Die Bezeichnungen der Genprodukte in der Legende ist Florens et al. (2002, Anhang 2) entnommen.

Abb. 4.1 zeigt die Positionen von Rhoptrien-Proteinen und mutmaßlichen Rhoptrien-Proteinen in einer virtuellen 2-D Trennung über pI und molekularer Masse des Proteins. Wie

zu erkennen, könnten RAP-1, RHOP-H1, RHOP-H3, ein mutmaßliches Rhoptrien-Protein sowie Pro- und die mature Form von AMA-1 im Gel nachgewiesen werden, wenn man einen pH-Bereich von pH 4-7 in der ersten Dimension der 2-D PAGE wählt. Theoretisch fokussieren dann RAP-1 und RHOP-H1 bei einer 2-D PAGE nahe der Kathode und sind daher schwer zu aufzuspüren. Bei einem in Florens et al. (2002) genannten mutmaßlichen Rhoptrien-Protein ist nicht klar, ob das Genprodukt wirklich in den Rhoptrien von Merozoiten zu finden ist, denn es wurde in Merozoiten bisher nicht gefunden (Florens et al., 2002; Gen-Locus PF14\_0637). RHOP-H3 könnte theoretisch gefunden werden. Die anderen in Abb. 4.1 aufgeführten Proteine besitzen einen anderen kalkulierten pI-Wert, der ausserhalb des Bereichs von 4 bis 7 liegt, und es war nicht anzunehmen, dass sie mittels 2-D PAGE erfaßt würden. Darüber hinaus ist jüngst die Familie der Reticulocyte Binding Protein Homologues (PfRBP-H) gefunden worden, deren Mitglieder Ähnlichkeiten mit der bekannten Rhoptrien-Protein-Familie Py235 aus P. yoelii und den Reticulocyte Binding Proteins aus P. vivax besitzen. Es wurde gezeigt, dass diese Proteine apikal in Merozoiten lokalisiert sind, doch ist deren Molekulare Masse so groß (350 kDa), dass sie für einen Nachweis in der 2-D PAGE nicht in Frage kommen und daher hier nicht aufgeführt worden sind (Rayner et al., 2000). Dieses mögen die Gründe dafür sein, dass in dieser Arbeit außer AMA-1 kein weiteres bekanntes Protein der Rhoptrien/Micronemen identifiziert wurde.

Obwohl die 2-D PAGE eine der besten Methoden zur Trennung komplexer Proteingemische darstellt, sollen einige Nachteile erwähnt werden, die die Identifizierung eines Proteins erschweren: Je nach Effizienz der Proteinextraktion, der Abundanz eines Proteins, des verwandten pH-Gradienten und der Auftrennung in der zweiten Dimension kann nur ein gewisser Ausschnitt des gesamten Proteinrepertoires eines Gewebes, einer Zelle oder eines Organells untersucht werden. Einige Techniken zur Umgehung dieses Problems konnten in jüngster Zeit entwickelt werden. Dazu zählt auch die *Multidimensional Protein Identification Technology* (MudPIT)(Washburn et al., 2001), die bereits auf *P. falciparum* angewandt wurde (Carucci et al., 2002; Florens et al., 2002). Allerdings birgt eine solche Technik auch Nachteile, denn trotz hohen Daten-Durchsatzes kann sie beispielsweise nicht zwischen einem maturen Protein und seiner Proform unterscheiden oder nicht unbedingt zwischen glycosyliertem und nichtglycosyliertem Protein unterscheiden. Dagegen ermöglicht die 2-D PAGE Aussagen über pI und molekulare Masse, mit denen man solche Unterschiede eher

identifizieren kann. In dieser Arbeit wurde das auch für die Identifizierung plasmodialer Proteine ausgenutzt, was später exemplarisch anhand zweier Proteine beschrieben wird.

# 4.1.2 Kontamination oder Organellen-assoziierte Proteine?

In dieser Arbeit wurden einige Proteine dem Mastergel zugeordnet, die bisher nicht mit apikalen Organellen in Zusammenhang gebracht worden sind. Vielmehr wurden diese Proteine anderen Organellen zugesprochen oder sogar darin lokalisiert. Zu diesen gehören Plasmepsin 1 der Nahrungsvakuole, PDI, Endoplasmin, Calcium-binding protein (Proteine des Endoplasmatischen Reticulum (ER)) oder auch TEF1β, 14-3-3 Protein (vermutlich im Cytosol lokalisiert). Die einfachste Erklärung für das Auftreten dieser Proteine in der Präparation wäre hier sicherlich eine Verunreinigung durch andere Organellen. Dies steht im Gegensatz zu der Tatsache, dass zur Herstellung des Mastergels subzelluläre Fraktionen mit hoher Dichte verwandt wurden, in denen keine anderen Organellen oder Membranen zu erwarten waren. Für viele der hier identifizierten Proteine wurden bisher noch keine Lokalisationsstudien durchgeführt, so dass die Entscheidung oft nicht getroffen werden kann, ob die vorhergesagte der tatsächlichen Lokalisation eines Proteins entspricht. Darüber hinaus waren viele der identifizierten Proteine bisher nur als mutmaßliche Genprodukte bekannt, deren zelluläre Funktion z. T. anhand von Sequenzähnlichkeiten zu bereits bekannten Proteinen im Rahmen der Annotierung der Genom-Daten vorhergesagt wurde. Ein wichtiges Hilfsmittel zur Evaluierung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Identifizierung von Proteinen aus subzellulären Fraktionen kann die Vorhersage eines Signalpeptides von Genprodukten sein. Sowohl für Rhoptrien-Proteine als auch für Proteine der Micronemen ist bekannt, dass sie N-terminale Signalsequenzen besitzen, die es ihnen ermöglichen, über das ER zu ihrem Bestimmungsort zu gelangen (Lingelbach und Joiner, 1998). Insgesamt wurden in dieser Arbeit bei 19 % der identifizierten Plasmodien-Genprodukte ein Signalpeptid vorhergesagt. Dies ähnelt dem Anteil der Proteine, die Gardner et al. (2002) im ganzen Plasmodium-Proteom vermutete (17 %). Bei sogar ca. 70 % der hier gefundenen "hypothetischen" Proteine konnte ein Signalpeptid vorhergesagt werden. Dies deutet insgesamt darauf hin, dass die subzellulären Fraktionierungen eine gute Anreicherung derjenigen Proteine bewirkten, die vermutlich in Organellen lokalisiert sind.

# 4.1.3 Proteine der parasitophoren Vakuole und der Merozoiten-Plasmamembran

Die Identifizierungen von Proteinen aus der Präparation von Rhoptrien/Micronemen brachten einige interessante Ergebnisse (siehe Kaptitel 3.10): Es konnten verschiedene Proteine der parasitophoren Vakuole (PV) und der Merozoiten-Oberfläche (ABRA, SERA, EXP-1, EXP-2, MSA-2, MSP-7) identifiziert werden. ABRA wurde auf der Oberfläche von Merozoiten und in der PV lokalisiert (Kushwaha et al., 2000) und es wurde gezeigt, dass ABRA eine Serin-Protease-Aktivität besitzt (Nwagwu et al., 1992) und mit der Erythrocyten-Membran über eine spezifische Bindung an das Bande 3-Protein interagiert (Kushwaha et al., 2000). Diese Eigenschaften und die Tatsache, dass Antikörper gegen ABRA die Invasion von Merozoiten blockieren, lassen vermuten, dass ABRA eine wesentliche Rolle bei dem Invasions-Prozess spielt (Sharma et al., 1998). Allerdings ist bislang nicht exakt bekannt, auf welche Weise ABRA in die PV und an die Merozoitenoberfläche gelangt. Dagegen wurde gezeigt, dass der Transport von ABRA zu seinem Bestimmungsort von MSP-3 (Merozoite Surface Protein 3) abhängt (Mills et al., 2002). SERA ist ebenfalls ein Protein der PV (Delplace et al., 1987; Debrabant et al., 1992) und wird kurz vor der Reinvasion der Merozoiten mehrfach prozessiert (Li et al., 2002). Auch hier ist der genaue Transportweg zur PV nicht bekannt. Das gleiche gilt für EXP-1 (Johnson et al., 1994) und EXP-2 (Fischer et al., 1998). Es wurde berichtet, dass EXP-1 im Cytosol des Parasiten synthetisiert wird und über einen Vesikel-vermittelten Transport in die PVM gelangt, doch dies konnte bisher nicht bewiesen werden (Lingelbach und Joiner, 1998). Hier stellt sich die Frage, wie solche Proteine der PV in eine subzelluläre Fraktion gelangen, die sich durch eine hohe physikalische Dichte auszeichnet. Interessant ist dabei auch, dass es sich bei den erwähnten Proteinen nicht nur um membranständige Proteine handelt, wie EXP-1 und -2, sondern bei ABRA und SERA um Proteine, bei denen keine Transmembran-Domäne oder GPI-Bindungsstelle vorliegt. Bei diesen Proteinen ist nicht sicher, ob sie jeweils identifiziert wurden, weil sie durch die Fraktionierung ihres Ziel-Kompartimentes angereichert wurden

oder ob sie aus subzellulären Kompartimenten isoliert wurden, über die diese Proteine zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden. Hier ist nicht ausgeschlossen, dass solche Proteine über Organellen des Apikal-Komplexes auf die extrazelluläre Seite des Merozoiten gelangen.

Das hier identifizierte MSP-7 wurde erst kürzlich näher untersucht und die mature Form als peripheres Membranprotein deklariert, das nicht-kovalent mit Merozoite Surface Protein 1 (MSP-1) auf der Oberfläche der Merozoiten interagiert (Pachebat et al., 2001). Auch hier ist der Transport-Weg von MSP-7 an die Merozoiten-Oberfläche nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde durch metabolisches Markieren mit [<sup>35</sup>S]-Methionin gefunden, dass MSP-7 erst sehr spät im intraerythrocytären Entwicklungsstadium von P. falciparum synthetisiert wird. Dies stimmt mit Northern-Blot-Analysen überein, die gezeigt haben, dass MSP-7 sehr spät im Entwicklungszyklus (32 bis 42 h nach der Invasion) exprimiert wird (Pachebat et al., 2001). Da dem Protein im Gel eine Masse von ca. 35 kDa Protein zugeordnet wurde, spricht einiges dafür, dass es sich dabei um ein Vorläufermolekül ohne das Signalpeptid handelt (kalkuliert: 38 kDa). Es wurde berichtet, dass MSP-7 mehrfach proteolytisch prozessiert wird, so dass ein 22 kDa (MSP-722) und ein 19 kDa Protein (MSP- $7_{19}$ ) entstehen. Bei diesen Proteinen kann es sich nicht um das identifizierte Protein handeln, da die molekulare Masse und die Sequenzabdeckung der erhaltenen Peptide im Peptide Mass Fingerprint (PMF) nicht mit den Prozessierungsprodukten übereinstimmen. Eine Modifikation des Proteins durch Glycosylierungen, die das Laufverhalten des Proteins im Gel veränderten, wurde ausgeschlossen (Pachebat et al., 2001). Es wurde vermutet, dass MSP-7 erst kurz vor der Evasion der Merozoiten prozessiert wird, da das Vorläufermolekül nicht auf der Oberfläche der Merozoiten nachgewiesen werden konnte (Stafford et al., 1996). Dies alles spricht dafür, dass MSP-7 nicht aufgrund eingebrachter Kontaminationen von Merozoiten-Plasmamembranen in die Präparation gelangte, sondern durch die Anreicherung eines Kompartimentes, in dem eine Vorläuferform von MSP-7 vorhanden ist. Es könnte sich dabei um apikale Organellen handeln, über die MSP-7 an die Oberfläche der Merozoiten gelangt, wie es z. B. auch für AMA-1 beschrieben worden ist (Howell et al., 2001; Healer et al., 2002). Das gleiche könnte für das Merozoite surface antigen 2 (MSA-2) gelten, das auf der Merozoiten-Oberfläche lokalisiert wurde und auch im Rhoptrien-Mastergel gefunden wurde (Smythe et al., 1988; Bhattacharya et al., 1995). MSA-2 ist über einen GPI-Anker mit der Plasmamembran der Merozoiten verbunden. In dieser Arbeit wurde MSA-2 sowohl im

*Mastergel* als auch in einem 2-D Gel identifiziert, für das eine Probenpräparation mit Temperatur-abhängiger Phasentrennung durch Triton X-114 verwandt wurde. Diese Extraktionsmethode wurde schon in einer früheren Arbeit zur Isolierung des MSA-2 eingesetzt und eignet sich besonders für die Isolierung Membran-assoziierter und Membrangebundener Proteine (Smythe et al., 1988). Wie bereits berichtet, zeigt MSA-2 in der SDS-PAGE ein Laufverhalten wie ein 50 kDa Protein. Die kalkulierte Masse beträgt aber nur 28 kDa. Das irreguläre Laufverhalten von MSA-2 kann durch umfangreiche posttranslationale Modifikationen (Glycosylierungen) erklärt werden (Khan et al., 1997).

#### 4.1.4 Der schmale Grat

Proteine wie die Protein Disulfide Isomerase (PDI), das 14-3-3 Protein, das Calcium-Binding Protein, der Translation Elongation Factor 1 beta (TEF1B), Endoplasmin, eine Proteasomen-Untereinheit, eine V-ATPase Untereinheit, die Heat Shock-Proteine (HSP) und Plasmepsin 1 wurden bisher nicht den apikalen Organellen zugeordnet. Bei Actin und Albumin kann man davon ausgehen, dass diese Proteine Kontaminationen in der Präparation sind, wobei die Albumine nicht einmal vom Parasiten stammen. Allerdings wurde für PDI, das Calciumbinding protein, Endoplasmin, Plasmepsin 1 und für ein HSP ein Signalpeptid vorhergesagt, was auf deren Transport in bestimmte Kompartimente hindeutet. PDI, Endoplasmin und das Calcium-binding protein wurden aufgrund von Gen-Ontologien dem Endoplasmatischen Reticulum zugesprochen, eine genaue Lokalisation fehlt derzeit (www.plasmodb.org). Es wurde berichtet, dass ER-Proteine in Phagosomen-Präparationen entdeckt worden sind, aber keine Proteine anderer Organellen wie Mitochondrien, Golgi-Vesikeln etc.. In diesem Fall wurden die Phagosomen durch Latex-Kügelchen mit einer hohen Dichte versehen und dann über einen Dichte-Gradienten präpariert, so dass sie sich im Gradienten dort befanden, wo andere Organellen nicht flotieren (Desjardins et al., 1994). Das Auftreten von ER-Proteinen könnte daran liegen, dass ER-Strukturen mit subzellulären Kompartimenten verbunden sind und demzufolge gemeinsam mit diesen isoliert wurden. Proteine des Apicoplasten oder Mitochondrien konnten nicht nachgewiesen werden. Noe et al. (2000) berichteten, dass MSP-1 zusammen mit ER-Proteinen und MAEBL, einem Protein der Rhoptrien, während der Schizogonie in einem vom ER-abgeleiteten Kompartiment an der Oberfläche des Parasiten

(*Tubular Reticular Network*) akkumuliert, bevor MAEBL in die Rhoptrien gelangt. Dies bestätigt die Vermutung, dass die Organellen des Apikal-Komplexes auf unbekannte Weise mit dem ER assoziiert sein könnten und erklärt möglicherweise auch die Identifizierung des oben erwähnten MSP-7.

Plasmepsin 1 ist in der Nahrungsvakuole lokalisiert worden (Goldberg et al., 1990 und 1991; Goldberg, 1992 und 1993). Es handelte sich wohl nicht um die Proform, sondern um das mature Protein, so dass dieses Protein sicherlich als Kontaminante anzusehen ist.

Ein identifiziertes HSP (Zugangs-Nr.: 23613697) besitzt laut Vorhersage ebenfalls ein Signalpeptid. Demnach ist eine nichtcytosolische Lokalisation wahrscheinlich. Es ist durchaus möglich, dass HSPs in apikalen Organellen für die Faltung sekretorischer Proteine verantwortlich sein können.

Das identifizierte 14-3-3 Protein konnte bereits in Trophozoiten nachgewiesen werden und scheint abundant im Parasiten vorzuliegen. Ein Signalpepid wurde nicht vorhergesagt. Die zellulären Funktionen des 14-3-3 Proteins sind in anderen Organismen vielfältig und bei *P. falciparum* noch nicht weiter untersucht (Al-Khedery et al., 1999). Erst kürzlich wurde entdeckt, dass das 14-3-3 Protein aus *Dictyostelium discoideum* mit Phagosomen assoziiert ist (Garin et al., 2001). Eine andere Arbeit zeigte, dass das 14-3-3 Protein vermutlich die Exocytose sekretorischer Vesikel reguliert (Morgan und Burgoyne, 1992). Demnach wäre es möglich, dass das 14-3-3 Protein aus *P. falciparum* mit subzellulären Organellen, wie die des apikalen Komplexes, oder Vesikeln zum Transport von Proteinen assoziiert ist und die Sekretion von deren Inhalten steuert. Dies könnte den Proteintransport in die PV oder an die Merozoiten-Oberfläche regulieren.

## 4.1.5 Das *Histo-Aspartic Protein* (HAP)

HAP wurde in der vorliegenden Arbeit mehrfach in 2-D Gelen identifiziert und schliesslich auch einem Proteinspot des *Rhoptrien-Mastergels* zugeordnet. Ein HAP-Transcript wurde erstmals 1999 nachgewiesen. Das Genprodukt selbst war aber noch nicht identifiziert (Berry et al., 1999). HAP weist große Sequenzidentität mit den Aspartat-Proteasen der Nahrungsvakuole des Parasiten, Plasmepsin 1 und 2, auf (60 %), doch ist u. a. ein in den Plasmepsinen aktiver Aspartat-Rest in HAP gegen ein Histidin ausgetauscht. Vor kurzem

wurde veröffentlicht, dass HAP eine aktive Protease ist, die Globin in der Nahrungsvakuole spalten kann, wobei der enzymatische Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist. HAP wird, wie Plasmepsin 1 und 2, als 51 kDa Protein synthetisiert und dann in eine mature Form von 37 kDa prozessiert. Für das aktive Protein wurde ein pH-Optimum um pH 6 beschrieben, während die Plasmepsine ein pH-Optimum im saureren Bereich haben (Banerjee et al., 2002). In der gleichen Arbeit wurde unlängst mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen rekombinantes HAP gezeigt, dass HAP in der Nahrungsvakuole lokalisiert ist. Zusätzlich wurde natives HAP aus angereicherten Nahrungsvakuolen des Parasiten gereinigt. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen, affinitätsgereinigten Antikörper gegen KLH-gekoppelte Peptide, die aus der HAP-Sequenz abgeleitet worden sind, zeigten in den Immunfluoreszenz-Mikroskopie ein anderes Bild. Hier konnte HAP um die Parasitenkerne von Schizonten herum lokalisiert werden, während die Nahrungsvakuole nicht markiert wurde. Dadurch steht hier die Lokalisation von HAP im Gegensatz zu dem bisher Veröffentlichten. Eventuell lassen sich diese Unterschiede dadurch erklären, dass in der veröffentlichten Arbeit die Lokalisierung an Trophozoiten durchgeführt wurde und nicht an Schizonten, wie in dieser Arbeit. In der hier vorgestellten Arbeit war es nicht möglich, HAP durch elektronenmikroskopische Studien im Parasiten zu lokalisieren.

Alle Peptide des HAP, deren Massen dem PMF entsprachen, lagen C-terminal von K132. Somit ist anzunehmen, dass die Proform des Proteins in der Sequenz vor D133 gespalten wird, um das mature Protein zu bilden. Die genaue Schnittstelle ist unbekannt, kann aber aufgrund der Sequenzähnlichkeiten zu Plasmepsin 1 und 2 zwischen G123 und S124 vermutet werden. Die Proform der Plasmepsine 1 und 2 wird zwischen G123-N124 bzw. G124-S125 zur maturen Form gespalten (Francis et al., 1997). Es ist weiterhin auffällig, dass für die gesamte Sequenz ein pI von 8,0 berechnet wurde und für D133-L451 ein pI von 5,2. Letzterer trifft recht gut mit dem experimentell bestimmten pI des entsprechenden Proteins im 2-D Gel überein (pI 5,1). Für den N-Terminus (M1-K132) wurde ein pI von 9,2 berechnet. Dies ist übereinstimmend mit den Plasmepsinen der Nahrungsvakuole (Zugangs-Nr.: 23509297; 23509298). Bei beiden wurde ebenfalls ein pI von ca. 9 bis 10 für die Sequenz der ersten 125 Aminosäuren der Prä-Proform berechnet, obwohl z. B. für Plasmepsin 1 im Gel ein pI von 4,9 bestimmt wurde. Auch für Falcipain 2, eine Cystein-Protease der Nahrungsvakuole (Zugangs-Nr.: 23508352), wurde im Gel ein pI von 5,2 bestimmt, während die Proform einen kalkulierten pI von 8,0 besitzt. Dies weist darauf hin, dass die Proteasen der Nahrungsvakuole

durch eine basische N-terminale Proregion in einem inaktiven Zustand gehalten werden bis sie in die Nahrungsvakuole gelangt sind. Ähnliches ist z. B. auch für Pepsinogen und andere Aspartat-Proteasen des Magens bekannt (Richter et al., 1998).

Wie oben erwähnt, wurden zur Lokalisation von HAP mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie Antikörper verwandt, die gegen ein Peptid gerichtet sind, das C-terminal in der Protein-Sequenz liegt. Demnach erkennt der Antikörper das mature Protein, wie eine Western-Blot-Analyse bestätigte. Zusätzlich konnte eine Bande bei ca. 25 kDa nachgewiesen werden. Diese Bande kann nicht vom abgespaltenen N-Terminus aus der Proform stammen, da das Epitop nicht aus dem N-Terminus abgeleitet wurde. Ob es sich dabei um ein Fragment des HAP handelt, konnte ausgeschlossen werden, da ein Antikörper gegen den N-Terminus des Proteins ebenfalls eine Bande bei 25 kDa erkannte (nicht gezeigt). Die Ursache dafür ist noch unbekannt. Fest steht, dass HAP in dieser Arbeit nicht in der Nahrungsvakuole der Parasiten nachgewiesen werden konnte. Demnach kann auch eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit den sehr ähnlichen Plasmepsinen der Vakuole ausgeschlossen werden. Die genaue Lokalisation des HAP bleibt noch offen.

Die Unterschiede in experimentell ermittelten und von den Datenbanken ausgegebenen, kalkulierten pI-Werten und Molekularmassen am Beispiel des identifizierten HAP machen deutlich, dass durch die Kombination von 2-D PAGE und massenspektrometrischer Untersuchung von Proteinen weit mehr ausgesagt werden kann, als durch eine genomische Analyse bzw. durch die sogenannte *Multidimensional Protein Identification Technology* (MudPIT) (Carucci et al., 2002; Florens et al., 2002).

## 4.1.6 Die hypothetischen Proteine des *Mastergels*

Dem *Mastergel* wurden sechs Genprodukte zugeordnet, die bisher gänzlich unbekannt waren. In der folgenden Tabelle sind die identifizierten Proteine, die als hypothetische Proteine klassifiziert worden waren, zusammengefaßt.

ZUGANGS- NR.	SIGNALPEPTID	MEMBRAN- ASSOZIIERT?
23505159	JA	NEIN
23508265	JA	NEIN
23508493	ЈА	NEIN
23510617	ЈА	NEIN
23509239	NEIN	JA
23509578	NEIN	NEIN

- Diskussion
- Tab. 6: Zugangs-Nr. der identifizierten Proteine, die dem Mastergel zugeordnet werden konnten und entsprechend der Datenbank als hypothetische Proteine bezeichnet wurden. Des Weiteren ist aufgeführt, ob jeweils ein Signalpeptid oder eine Membranassoziation über Transmembran-Domäne/GPI-Anker vorhergesagt werden konnte.

Die Bezeichnung "hypothetische Protein" wurde aus der Datenbank übernommen und hier weiter verwandt, um Konfusionen zu vermeiden.

Bei vier der Proteine wurde ein N-terminales

Signalpeptid vorhergesagt, so dass hier eine nicht-cytosolische Lokalisation dieser Proteine erwartet werden kann. Die genaue Lokalisation dieser Proteine muss noch nachgewiesen werden. Es wurde festgestellt, dass das Protein mit der Zugangs-Nr. 23505159 erst in den letzten Stunden der Stadiendifferenzierung kurz vor der Evasion der Merozoiten synthetisiert wird.

Hier liegt eine Beteiligung des Proteins an der Invasion oder Evasion besonders nahe. Bei den anderen Proteinen konnte nicht gezeigt werden, dass sie nur sehr spät im Entwicklungszyklus gebildet werden. Dennoch wurden alle diese Proteine aus Schizonten präpariert. Die Proteine 23509239 und 23509578 wurden beide mittels Temperatur-abhängiger Phasentrennung vor der 2-D PAGE angereichert. Entsprechend findet man bei dem ersteren eine vorhergesagte Membran-Assoziation, wenn auch ein Signalpeptid nicht vorhergesagt werden konnte. Weder das eine noch das andere gilt für 23509578. Es wäre möglich, dass dieses Protein weder über eine Transmembran-Domäne noch über einen GPI-Anker verfügt. Dennoch könnte es als peripheres Membran-Protein vorliegen oder einen Komplex mit einem Membranprotein bilden. All diese Proteine müssen in Zukunft subzellulär lokalisiert werden. Fest steht, dass diese Proteine nun nicht mehr als hypothetisch zu bezeichnen sind.

# 4.2 Die Isolierung von *Parasitophorous Vacuolar Membrane-Enclosed Merozoite Structures* (PEMS)

Nach der Invasion von Merozoiten in Erythrocyten nisten sich die Parasiten in der Wirtszelle ein und durchlaufen ihren Entwicklungszyklus. Dabei bleibt der Parasit für die gesamte Dauer der Differenzierung von der PVM umgeben. Um erneut Erythrocyten zu befallen und damit den intraerythrocytären Entwicklungszyklus aufrecht zu erhalten, müssen die neu entstandenen Merozoiten sowohl die Wirtszelle als auch die PV verlassen. Wie dieser Evasions-Prozess genau abläuft ist unbekannt, doch sind einige Modelle dazu aufgestellt worden (zusammengefaßt in Lew, 2001). Proteasen scheinen bei der Evasion der Merozoiten eine wichtige Rolle zu spielen (Hanspal et al., 2002a; Raphael et al., 2000; Rosenthal, 1998). Lyon und Haynes (1986) beobachteten, dass in Gegenwart einer Reihe von Protease-Inhibitoren eine verminderte Reinvasionsrate der Merozoiten auftritt und es zur Bildung von Merozoiten-Clustern kommt, die von der Erythrocyten-Membran umgeben sind. Salmon und Kollegen (2001) untersuchten die Wirkung des Cystein-Protease-Inhibitors E64 auf die Freisetzung von Merozoiten und fanden ebenfalls, dass es zur Bildung von Merozoiten-Clustern kommt. Es wurde aber gezeigt, dass diese Cluster nicht von der Erythrocyten-Membran umgeben sind, wie es Lyon und Haynes festgestellt haben, sondern von der PVM. Daher wurden solche Strukturen als PVM-Enclosed Merozoite Structures (PEMS) bezeichnet. Es wurde postuliert, dass Merozoiten in zwei Schritten freigesetzt werden: Merozoiten sollen zunächst innerhalb der PVM aus dem Erythrocyten freigesetzt werden und dann erst soll es zur Entlassung der Merozoiten aus der PVM kommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Protokoll von Salmon und Kollegen (2001) übernommen und modifiziert, um PEMS zu präparieren. In Giemsa-gefärbten PEMS-Präparaten konnten keine Wirtszellen ausgemacht werden, im deutlichen Unterschied zu iRBC, die als Kontrolle dienten. Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IFA) bestätigte die Ergebnisse von Salmon et al., nämlich, dass die PEMS tatsächlich von der PVM umgeben waren. EXP-1, ein Protein der PVM, konnte nicht zusammen mit dem humanen Bande 3-Protein der Erythrocyten-Membran um die PEMS herum lokalisiert werden. Dennoch konnten auch iRBC in der Präparation ausgemacht werden. Kleine Bereiche an der Peripherie der PEMS zeigten meist die Präsenz des Bande 3-Proteins an. Es wäre möglich, dass Membranfragmente der RBC-Plasmamembran beim Austreten der PEMS entstehen, die dann zumindest vorübergehend an der PVM haften bleiben. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die PVM über das Tubovesikulare Netzwerk (TVN) mit der Erythrocyten-Membran verbunden ist (Haldar et al., 2001) und die Merozoiten an diesen Stellen mit der PVM austreten. Dabei könnte an der Verbindungsstelle von TVN und Erythrocyten-Membran etwas Material aus der RBC-Plasmamembran herausgerissen werden, was dann typischerweise das Bild einer kleinen "Fahne" an den PEMS in den IFA-Untersuchungen abgibt. Dies wäre nicht in Übereinstimmung mit der These von Winograd und Kollegen (1999). Sie schlugen die Bildung einer Öffnung in der Wirtsmembran und der PVM vor, was zur Evasion der Merozoiten und zur Fusion von PVM und RBC-Membran führen soll. Vielmehr scheint sich nur – zumindest in Gegenwart von E64 - die Erythrocyten-Membran zu öffnen. Die PVM fusioniert demnach nicht mit der RBC-Membran und bleibt um die freigesetzten Merozoiten erhalten.

Das Protokoll zur Isolierung von PEMS wurde insoweit modifiziert, dass vor der Inkubation mit E64 die Parasiten aus einer Kultur angereichert wurden. Dies ergab zu Beginn des Versuchs eine bis zu 97 %ige Parasitämie. Es waren also kaum nichtinfizierte Erythrocyten im Ausgangsmaterial enthalten. Dies konnte in der Immunfluoreszenz bestätigt werden. Solche Präparationen wurden dann E64 ausgesetzt, wodurch die PEMS erhalten wurden. Gleichzeitig aber konnte mit Immunfluoreszenz-Mikroskopie festgestellt werden, dass ein großer Anteil von Erythrocyten-Membranen ebenfalls in der Präparation vorhanden war. Somit kann gefolgert werden, dass die PEMS aus den Wirtszellen austreten, ohne diese komplett zu lysieren. Dies konnte mittels IFA auch daran erkannt werden, dass die PEMS nach ihrem Austritt aus der Wirtszelle diese bzw. die Wirtszell-Membran zurücklassen. Durch differentielle Zentrifugation konnten diese Membranen nicht entfernt werden und sedimentierten zusammen mit den PEMS. Somit konnte auch auf einem Western-Blot Bande 3-Protein in der PEMS-Präparation nachgewiesen werden, wenn auch die Banden-Intensität im Vergleich zu nichtinfizierten Erythrocyten geringer war.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass bei rund 50 % der Merozoiten-Cluster nur eine Membran vorhanden war. In den Fällen, in denen zwei Membranen zu finden waren, handelte es sich bei der inneren um die PVM und bei der äußeren um die Plasmamembran der Wirtszelle. Dieses Ergebnis wurde schon von Lyon und Haynes für andere Protease-Inhibitoren beschrieben (Lyon und Haynes, 1986). Außerdem waren die Präparationen durch Erythrocyten-Membranen kontaminiert, was konsistent mit den IFA-Untersuchungen war. Bei Merozoiten-Clustern, die durch nur eine Membran umgeben waren, handelte es sich tatsächlich um PEMS. Auffällig war, dass kein elektronendichtes Material innerhalb der Erythrocyten-Membranen zu erkennen war. Vermutlich wurden die Wirtszell-Membranen permeabilisiert, bis es zur Evasion der Merozoiten kam. Ob dieser Effekt durch E64 oder durch Proteasen zustande kommt, ist fraglich. Allerdings scheint E64 diesen Effekt nicht zu verhindern, so dass ausgeschlossen werden kann, dass Cystein-Proteasen die einzige Ursache für die Permeabilisierung sind. Eventuell führen Lipasen zur partiellen Lyse der Wirtszell-Membran, so dass diese permeabilisiert wird (Roggwiller et al., 1998). Im Laufe dieser Lipolyse könnten dann PEMS freigesetzt werden. Die Lipolyse beträfe aber nicht die PVM, obwohl sie z. T. aus den Lipiden der Erythrocyten-Membran bestehen soll (Lingelbach und Joiner, 1998). Dies bedeutete, dass die Merozoiten-Cluster innerhalb der PVM und der Erythrocyten-Plasmamembran eine Vorstufe der PEMS wären.

Bezüglich der Reinheit der PEMS-Präparationen muss hier betont werden, dass Salmon und Kollegen (2001) ihre Analysen mit Zellen aus einer E64-inkubierten Kultur durchgeführt haben. Weitere Reinigungsschritte zur Trennung der PEMS von infizierten und nichtinfizierten RBC wurden zwar beschrieben, aber nicht mittels IFA oder überprüft. Die Giemsa-Färbung Elektronenmikroskopie präparierter PEMS wurde dokumentiert und zeigte keine Unterschiede zu dem hier Beschriebenen. Dennoch war in dieser Arbeit erst durch IFA feststellbar, dass die Präparationen Erythrocyten-Membranen enthielten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass sowohl die Ergebnisse von Lyon und Haynes als auch die von Salmon und Kollegen bestätigt worden sind. Merozoiten-Cluster wurden sowohl innerhalb als auch ausserhalb der Wirtszell-Plasmamembran in der Präparation gefunden. Die PEMS verlassen mit der PVM den Erythrocyten. Die Freisetzung der PEMS geschieht ohne die totale Zerstörung der Erythrocyten-Plasmamembran. Dies ist in Einklang mit der Theorie von Salmon und Mitarbeitern, dass die Evasion der Merozoiten ein Prozess ist, der in zwei Schritten abläuft. Das Schicksal der Wirtszellen nach der Evasion wurde in deren Arbeit aber nicht untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die PEMS die Wirtszelle verlassen, und dabei kleine Stücke der Erythrocyten-Membran mitreißen. Dies könnte bedeuten, dass der Parasit an denjenigen Stellen die Wirtszelle zuerst verläßt, an der das TVN mit der Erythrocyten-Membran verbunden ist. Folglich gäbe es keine zufällige Austrittspforte für den Parasiten aus der Wirtszelle, sondern prädestinierte Bereiche für die Evasion.

### 4.3 Die Präparation der PVM

Die Präparation der PVM aus infizierten Erythrocyten stellt ein großes Problem dar (Haldar et al., 1994). Über die Protein-Ausstattung der PVM ist wenig bekannt, obwohl sie für das Überleben des Parasiten von entscheidender Bedeutung ist. Die PVM ist am Protein-Transport vom Parasiten in die Wirtszelle, an der Nährstoff- und an der Protein-Versorgung des Parasiten beteiligt (Lingelbach und Joiner, 1998). Außerdem sollen Proteasen der PV an der Evasion beteiligt und dadurch zur Aufrechterhaltung des erythrocytären Entwicklungszyklus erforderlich sein (Salmon et al., 2001). Offensichtlich sind die Organellen des Apikal-Komplexes in die Bildung der PVM involviert. Bei der Invasion der Wirtszelle durch einen Merozoiten sezernieren die Rhoptrien Proteine, die in die PVM eingebaut werden (Sam-Yellowe et al., 1988). Um das Proteinrepertoire der PVM zu untersuchen, musste zunächst ihre Reinigung möglich werden.

PEMS wurden dazu verwandt, ein Protokoll für die Präparation der PVM zu entwickeln. Durch Scherkräfte wurden aus präparierten PEMS die Merozoiten freigesetzt und durch Zentrifugation entfernt. Aus dem Überstand wurden die Membranen sedimentiert. Die Giemsa-Färbung der Zellen in den einzelnen Fraktionen ergab, dass sich durch die Scherung der PEMS die Merozoiten-Cluster auflösten und die entlassenen Merozoiten geerntet werden konnten. Wie oben geschildert, konnten in dieser Arbeit PEMS isoliert werden, doch wurde eine nicht unerhebliche Verunreinigung mit Erythrocyten-Membranen nachgewiesen. Somit war zu erwarten, dass sich auch Plasmamembranen der Wirtszellen in derjenigen Fraktion befanden, in denen die PVM angereichert wurden. Dies stört aber die Identifizierung von PVM-Proteinen über *Cell Map Proteomics* nicht, da sich die 2-D PAGE-Methodik dazu eignet, erythrocytäre Proteine durch vergleichende 2-D Gelen subtraktiv ausfindig zu machen. In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass sich das Proteinmuster eines 2-D Gels, in dem Proteine aus Erythrocyten-Membranen aufgetrennt wurden, stark von demjenigen unterschied, in dem Proteine aus der PVM-Präparation aufgetrennt wurden. Dies wurde anhand des abundanten Erythrocyten-Proteins Bande 3 gezeigt. Dieses Protein konnte zwar leicht im 2-D Gel mit RBC-Membran-Proteinen entdeckt werden, aber nicht im Gel mit Proteinen aus der PVM-Präparation. Somit ist die PVM-Fraktion relativ frei von erythrocytären Membran-Proteinen. Es konnte festgestellt werden, dass in der Merozoiten-Fraktion das Bande 3-Protein und Spectrin enthalten waren. Wie die IFA-Untersuchungen und die Elektronenmikroskopie zeigten, schienen die in der PEMS-Fraktion enthaltenen RBC-Membranen intakt zu sein. Durch die Scherkräfte wurden vermutlich nur die PEMS aufgeschlossen, aber nicht die Erythrocyten-Membranen, die dann mit den Merozoiten zusammen aus der Präparation entfernt werden konnten. Damit scheint das hier entwickelte Protokoll zur PVM-Präparation geeignet zu sein. Die Protein-Verteilung der PVM-Präparation zeigte nach der 2-D PAGE eine komplexes Muster. Der Vergleich der 2-D Gele mit Proteinen der Merozoiten-Fraktion und der PVM-Präparation zeigte, dass nur relativ wenige (18) Proteinspots im PVM-*Mastergel* angereichert waren, die in der Merozoiten-Fraktion nicht zu finden waren. Diese Proteinspots müssen z. T. noch massenspektrometrisch identifiziert werden.

Man muss in Betracht ziehen, dass auch diejenigen Proteine PVM-Proteine sein könnten, die sowohl in Merozoiten als auch in der PVM-Präparation mit ähnlicher Intensität im Gel erschienen. Dies liegt daran, dass die Merozoiten als invasive Stadien schon während des Eindringens in die Wirtszelle direkt an dem Aufbau der PVM beteiligt sein sollen. So soll die Sekretion des Rhoptrien-Inhaltes bei der Invasion zumindest teilweise an der Bildung der PVM beitragen (Aikawa et al., 1981).

Die bekannten Proteine der PVM, EXP-1 und EXP-2, wurden in der PVM-Präparation angereichert, was darauf schließen läßt, dass die Methodik der subzellulären Fraktionierung der PVM funktioniert. Man kann zwar nicht davon ausgehen, dass alle Proteine im PVM-*Mastergel* Kandidaten dafür sind, PVM-Proteine zu sein, doch ist die hier beschriebene subzelluläre Fraktionierung der PVM sicherlich ein geeignetes Werkzeug, um deren Protein-Komposition zu studieren. Abundante Proteine der Erythrocyten-Membran wie Bande 3 und Spectrin konnten aus der PVM-Präparation effektiv ausgeschlossen werden. Es sei betont, dass in dieser Arbeit die PEMS Ausgangsmaterial für die PVM-Präparation waren. Die PEMS stellen die eine mature Form der Parasiten dar, den Segmenter. Demzufolge stellt die präparierte PVM die ausgereifte Form der Vakuolen-Membran dar, also mit der Protein-Ausstattung am Ende einer Runde des Entwicklungszyklus. Lösliche Proteine aus dem Vakuolen-Innenraum können vermutlich nicht durch den hier geschilderten Ansatz erfasst werden, da sie nicht in der Membran-Fraktion zu erwarten sind.

Erst im Oktober 2002 wurde eine Arbeit publiziert, laut der nach Streptolysin-Behandlung von intakten Parasiten PV- und PVM-Proteine durch Biotinylierung nachgewiesen werden können (Nyalwidhe et al., 2002). Dieses Prinzip könnte man in Zukunft auch in dem hier geschilderten Ansatz anwenden. Dazu könnten PEMS isoliert werden, und die Oberflächen-Proteine würde man vor dem Freisetzen der Merozoiten biotinylieren. Die Membranen könnten wie beschrieben präpariert werden und deren Proteine mittels 2-D PAGE nachgewiesen und identifiziert werden. Selbstverständlich markierte man auch die RBC-Membranen. Dieses Problem könnte man lösen, indem man Erythrocyten-Membranen präpariert, biotinyliert und die Proteine gleichermaßen in einem 2-D Gel/Blot nachweist. Die Proteinmuster der PVM-Präparation und der RBC-Membranen ließen sich subtraktiv vergleichen. Parasitenproteine und vom Parasiten modifizierte Wirtszell-Proteine der Erythrocyten-Membran könnte man aber nicht auf diese Weise ausschließen. Dennoch stellt diese Kombination eine Verbesserung der beiden einzelnen Methoden dar. Auch Proteine des PV-Innenraumes ließen sich finden, wenn man die Proteine im Überstand nach Entfernen der Merozoiten biotinylierte.

Durch die Isolierung der PVM können nun deren assoziierte Proteine identifiziert werden. So wird erwartet, die von Desai et al. (1993) postulierte Pore bzw. deren eventuelle Untereinheiten in der PVM zu identifizieren. Die Immunolokalisierung von identifizierten Proteinen soll dies beweisen und deren Route vom Apikal-Komplex zu ihrem Ziel verfolgen. Dies könnte Hinweise über deren Funktion bei der Invasion geben und somit auch die Funktionen des Apikal-Komplexes erleuchten.

# 4.4 Der Effekt des Biotin-markierten Aziridin-2,3dicarbonsäure-Derivates auf erythrocytäre Stadien von *P. falciparum*

Durch die Analyse der kürzlich veröffentlichten Genom-Daten (<u>www.plasmodb.org</u>; Gardner et al., 2002) konnten 13 Gene identifiziert werden, die für bekannte und mutmaßliche Cystein-Proteasen codieren (Gen-Loci: PF11\_0165, PF11\_0162, PFB0350c, PFB0345c,

PFB0340c, PFB0330c, PFB0325c, PFB0335c, PFB0360c, PFB0355c, PFI0135c, PF14\_0553, PFD0230c). Darunter sind auch die bekannten Falcipaine 1-3 und die Mitglieder der SERA-Familie. Das *Serine Rich Antigen* (SERA) und seine Homologen sind wahrscheinlich an der Evasion der Parasiten durch Proteolyse der PVM beteiligt (Blackman, 2000; Chitnis und Blackman, 2000; Delplace et al., 1987; Gor et al., 1998; Knapp et al., 1991).

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit ein zusätzlicher Cystein-Protease-Inhibitor (1-[6-(+)-Biotinylamino]-caproyl-aziridin-2,3-dicarboxylsäuredibenzylester, bADS) gegen intraerythrocytäre Stadien von *P. falciparum* eingesetzt, der spezifisch Proteasen kovalent bindet und dadurch inaktiviert (Otto und Schirmeister, 1997). Eine Biotinylierung der Inhibitorstruktur ermöglichte dabei den Nachweis der gebundenen Proteasen.

Aus Schizonten konnten mindestens 24 distinkte Proteine nachgewiesen werden, an die bADS gebunden hat, darunter auch Falcipain 2, eine bereits bekannte Cystein-Protease der Nahrungsvakuole des Parasiten. Die Anzahl der erhaltenen, markierten Proteine ist größer als es mutmaßliche Cystein-Proteasen als Genprodukte aus dem Genom abzuleiten sind. Hier könnte es sich zum Teil um artifiziell mit bADS markierte Proteine handeln. Ein Vorteil des Inhibitors ist darin zusehen, dass der pI des Proteins durch seine Kopplung nicht verändert Andere markierte Proteine wurden in der hier dargestellten wird. Arbeit massenspektrometrisch noch nicht identifiziert. SERA wurde zwar identifiziert, doch konnten keine Proteine mit einer entsprechenden molekularen Masse und dem pI auf der Membran markiert werden. SERA und seine Homologen gehören zur Familie der Papain-ähnlichen Proteine (Gor et al., 1998). Es bleibt zu bedenken, ob SERA wirklich eine aktive Cystein-Protease ist, da die Papain-ähnliche "Protease-Domäne" ein vermutlich aktives Serin anstelle von Cystein besitzt, so dass nicht klar ist, ob bADS überhaupt spezifisch an SERA binden kann (Higgins et al., 1989; Li et al., 2002). Über einen eventuellen Hydrolysemechanismus kann bisher nur spekuliert werden. Die 120 kDa-Form wird kurz vor der Freisetzung der Merozoiten prozessiert, so dass zeitlich und räumlich ein Zusammenhang zwischen SERA der Evasion der Merozoiten aus der Wirtszelle besteht. Ein bestimmtes und Prozessierungsprodukt (P50) besitzt die Protease-ähnliche Domäne (Li et al., 2002). Es kann vermutet werden, dass dieses P50 eine wichtige Rolle bei der Evasion spielt. Es ist möglich, dass die Proform nicht proteolytisch aktiv ist. Es wurde ein pI von 5,3 und eine molekulare kDa berechnet. Im Bereich Masse von 49 dieser Koordinaten sind zwei

nebeneinanderliegende Proteinspots nach 2-D PAGE und Proteintransfer auf eine PVDF-Membran markiert worden, so dass es sich bei diesen Proteinen durchaus um das Prozessierungsprodukt von SERA, P50, handeln könnte. Die massenspektrometrische Analyse der Proteinspots muss diese Vermutung noch bestätigen.

Elektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass bADS-behandelte Trophozoiten eine Nahrungsvakuole mit ungewöhnlich großer Elektronendichte besitzen. Außerdem erscheinen die Hämozoin-Kristalle relativ klein und mengenmäßig reduziert. Dies spricht dafür, dass der Globin-Abbau in der Vakuole durch bADS zum Erliegen kommt, dieses und weitere Proteine des Wirtscytoplasmas aber weiter vom Parasiten aufgenommen werden und dadurch der Vakuoleninhalt elektronendichter erscheint als selbst das Erythrocyten-Cytoplasma. Folglich ist auch die Hämozoin-Bildung eingeschränkt. Dies ist auch schon für andere Cystein-Protease-Inhibitoren wie Leupeptin festgestellt worden (Dluzewski et al., 1986; Rosenthal, 1995; Rosenthal et al., 1988; Vander Jagt et al., 1989).

Die Lokalisation von bADS in infizierten Erythrocyten mittels Affinitätsmarkierung durch ein Streptavidin-Cy3-Konjugat zeigte ein interessantes Ergebnis: In jungen Parasitenstadien (Trophozoiten) wurde bADS in der Nahrungsvakuole und rund um den Parasiten spezifisch lokalisiert. Ob die Lokalisation auf die Nahrungsvakuole und das Erythrocyten-Cytosol beschränkt ist oder auch die PV betrifft konnte nicht optisch aufgelöst werden. Im Cytoplasma des Parasiten wurde kein bADS nachgewiesen. Es ist anzunehmen, dass Cystein-Proteasen des Parasiten nicht nur in der Nahrungsvakuole vertreten sind, sondern auch im Wirts-Cytoplasma, vielleicht auch in der PV. Nichtinfizierte Erythrocyten und unbehandelte Parasiten zeigten keine Signale, so dass weder endogenes Biotin (z. B. Acetyl-CoA Carboxylase, putative; Gen-Locus PF14\_0664) noch erythrocytäre Cystein-Proteasen wie die Calpaine (Michetti et al., 1996) die Lokalisation beeinflussten. Vor kurzem wurde berichtet, dass erythrocytäre Calpaine keinen Einfluß auf die Invasion von Merozoiten haben (Hanspal et al., 2002b), obwohl dies zuvor angenommen wurde (Olaya und Wasserman, 1991). Junge Schizonten zeigten ein ähnliches Bild, aber in maturen Schizonten, die kurz vor der Evasion von Merozoiten stehen, wurde nur die Nahrungsvakuole markiert, die Markierung im Wirts-Cytoplasma war sehr schwach und randständig. Dies kann damit zusammenhängen, dass sich der Parasit während der Reifung im iRBC ausdehnt und so das Wirts-Cytoplasma verdrängt. Durch die Aktivität von Parasiten-Proteasen im Cytosol des Wirts könnte eine fortschreitende Permeabilisierung der RBC-Plasmamembran mit der Reifung des Parasiten einhergehen, so

dass diese Proteasen ins Medium freigesetzt werden. Andererseits wäre eine Proteolyse der Proteasen mit steigendem Reifungsgrad des Parasiten vorstellbar, da immer weniger Wirtsproteine als Substrate übrig bleiben oder der Parasit nimmt seine eigenen Proteasen aus dem Wirts-Cytoplasma wieder auf. In den durchgeführten Studien konnte die Nahrungsvakuole auch in Segmentern markiert werden. Es wurde bereits berichtet, dass Proteasen des Parasiten ins Wirtscytosol gelangen und dort Erythrocyten-Proteine spalten (Deguercy et al., 1990; Dua et al., 2001; Le Bonniec et al., 1999; Raphael et al., 2000; Roggwiller et al., 1996). Zu diesen Proteasen gehören eine Aspartat-Protease, eine Serin-Protease sowie Cystein-Proteasen. Kürzlich wurde beschrieben, dass die Cystein-Protease Falcipain 2 aus P. falciparum bei neutralem pH-Wert Komponenten des Cytoskeletts der Wirtszelle (Ankyrin und Protein 4.1) angreift. Bis dahin war bekannt, dass Falcipain 2 an dem Hämoglobin-Abbau in der Nahrungsvakuole des Parasiten beteiligt ist. Bei saurem pH-Wert, wie er in der Nahrungsvakuole vorliegt, gibt es eine erhöhte Substratspezifität für das Hämoglobin. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität zur Hämoglobin-Spaltung ab dem Trophozoiten-Stadium abnimmt und die Aktivität für das Spalten der Cytoskelett-Komponenten bis zum Schizonten-Stadium zunimmt. Die proteolytische Spaltung von Ankyrin und Protein 4.1 soll demnach für die Destabilisierung der Erythrocyten-Membran eine Rolle spielen, was den Merozoiten ihre Freisetzung ermöglicht (Hanspal et al., 2002a).

Die in dieser Arbeit gezeigte Lokalisation von bADS-markierten Proteinen stimmt demnach mit den Ergebnissen von Hanspal et al. (2002a) überein. Sowohl in der Nahrungsvakuole als auch im Cytosol des Wirts konnte der Cystein-Protease-Inhibitor in Trophozoiten und Schizonten nachgewiesen werden. Ob auch Falcipain 1 und 3, sowie andere Cystein-Proteasen, Komponenten des Wirts ausserhalb der Nahrungsvakuole spalten, ist nicht bekannt. Aber es wurde vermutet, dass auch andere Proteasen vom Wirtscytosol aus das Cytoskelett des Erythrocyten angreifen und damit die Evasion der Merozoiten einleiten (Rosenthal, 2002).

Wenn die Inhibition von Cystein-Proteasen noch zuläßt, dass der Parasit die Wirtszelle verläßt, aber nicht die PVM, wie bei der PEMS-Präparation gesehen, kann die Destabilisierung der Erythrocyten-Plasmamembran nicht nur durch die Aktivität von Cystein-Proteasen erfolgen, sondern es müssen noch andere Klassen von Proteasen beteiligt sein.

Eine zelluläre Lokalisation von Cystein-Proteasen mit Hilfe eines biotinylierten Inhibitors wurde hier erstmals bei *P. falciparum* durchgeführt und bestätigte das noch neue Bild der

Aktivitäten von Parasiten-Proteasen im Wirtscytosol. Weitere Erkenntnisse sollte in Zukunft die Identifizierung weiterer Zielproteine von bADS mittels Affinitätsreinigung, 2-D PAGE und Massenspektrometrie liefern.

Abschließend bleibt zu sagen, dass durch die Anwendung von *Cell Map Proteomics* in der vorliegenden Arbeit neue Erkenntnisse über die mögliche Organisation subzellulärer Strukturen von *P. falciparum* erhalten worden sind. Dabei wurde die subzelluläre Fraktionierung aus einem Parasiten-Homogenat mit der 2-D PAGE und Massenspektrometrie kombiniert. Der Verdacht verdichtete sich, dass Rhoptrien und Micronemen einen Komplex mit hoher physikalischer Dichte bilden, die zusammen präpariert werden. Außerdem weisen einige der hier vorgestellten Ergebnisse auf eine Assoziation des ER mit den Rhoptrien und Micronemen des Apikal-Komplexes hin.

Die Versuche zur PEMS- und PVM-Präparation deuten auf die nicht-explosionsartige Ruptur der Wirtszellen bei der Evasion hin, und es gab ein Indiz, dass die Merozoiten an einer räumlich sehr begrenzten Stelle der Erythrocyten-Membran austreten, z. B über eine Verbindungsstelle von TVN und Wirts-Plasmamembran.

Es wurde ein Protokoll zur Subfraktionierung der PVM erstellt, das auf der PEMS-Präparation basierte. Es konnte durch Affinitätsmarkierungen festgestellt werden, dass Cystein-Protease-Inhibitoren nicht nur Proteasen der Nahrungsvakuole inhibieren, sondern auch Parasiten-Proteasen, die in das Cytosol der Wirtszelle transportiert werden.

Die weitergehende Analyse der Proteinrepertoires des Apikal-Komplexes und der PVM sollte entscheidende neue Einblicke in die Bildung der PVM einerseits und über die Funktionen der Organellen des Apikal-Komplexes andererseits ermöglichen und damit neue Erkenntnisse über Mechanismen der Invasion, der Evasion und des intrazellulären Überlebens des Parasiten liefern.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mature, intraerythrocytäre Formen des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum* zur Präparation zweier subzellulärer Strukturen verwandt; der Rhoptrien des Apikal-Komplexes und der parasitophoren Vakuolen-Membran (PVM). Bei beiden handelt es sich um einzigartige Strukturen, die für den Parasiten von essentieller Bedeutung sind.

Bei der Präparation der Rhoptrien stellte sich heraus, dass diese zusammen mit den Micronemen, ebenfalls Organellen des Apikal-Komplexes, isoliert wurden. Die Isolierung der PVM gelang erstmalig durch die Modifikation eines Protokolls zur Isolierung von Merozoiten, die noch von der PVM umgeben waren (*Parasitophorous Vacuolar Membrane-Enclosed Merozoite Structure*, PEMS).

Die Proteine jeder Präparation wurden dazu verwandt, jeweils zwei-dimensionale *Mastergele* herzustellen, Schablonen der jeweiligen Protein-Verteilung. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Zwei-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D PAGE) für *Plasmodium falciparum* etabliert. Die Protein-Verteilungsmuster der *Mastergele* wurde mit derjenigen in präparativen Gelen verglichen. Für letztere wurden Proteine zuvor aus einem Zellextrakt auf unterschiedliche Weise fraktioniert. Ausgesuchte Proteine aus den präparativen Gelen wurden mittels *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight* Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) identifiziert und entsprechenden Proteinen in den *Mastergelen* zugeordnet. Die Analyse der Präparationen der Rhoptrien/Micronemen und der PVM sowie die nachfolgenden massenspektrometrischen Analysen lieferten folgende Ergebnisse:

 Der Präparation von Rhoptrien und Micronemen konnte eine Reihe von Proteinen zugeordnet werden, die als Proteine der Parasitophoren Vakuole, der Merozoiten-Oberfläche, der Nahrungsvakuole und des Endoplasmatischen Reticulums (ER) bekannt sind. Es wurden Indizien dafür gefunden, dass zusammen mit den Rhoptrien/Micronemen auch Komponenten eines ER- und/oder Vesikel-vermittelten Transports gereinigt wurden. Hieraus lässt sich schließen, dass ein derartiger Transportweg über den Apikal-Komplex verläuft und die beteiligten Kompartimente mit ihm in Verbindung stehen. Es wurden sechs bisher hypothetische Proteine der Präparation zugeordnet, wobei für vier ein Signalpeptid vorhergesagt wird, was auf eine extracytosolische Kompartimentierung hindeutet. Eines davon wird erst sehr spät im Entwicklungszyklus des Parasiten synthetisiert, wodurch besonders nahe liegt, dass es an der Invasion oder Evasion von Plasmodien beteiligt ist.

2) Für die Präparation der PVM konnten zunächst die als PEMS bezeichneten Strukturen isoliert werden. Hier zeigte sich eine Kontamination mit Erythrocyten-Plasmamembranen. Während der Präparation der PEMS, die in der Gegenwart von E64 stattfindet, einem Inhibitor von Cystein-Proteasen, wurde beobachtet, dass die Evasion nicht die völlige Zerstörung der Wirtszell-Membran zur Folge hat. Dies deutet darauf hin, dass die Evasion nur an einer begrenzten Stelle der Wirtzelle erfolgt.

Die Merozoiten konnten aus den PEMS mechanisch freigesetzt und so die PVM von den Parasiten getrennt werden. Es stellte sich heraus, dass in der Präparation keine abundanten Verunreinigungen durch Proteine der Plasmamembran und des Cytoskeletts von Erythrocyten, vorhanden waren. Diese, in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methodik ermöglicht es erstmalig, die PVM zu isolieren und damit ihr Proteinrepertoire umfassend zu analysieren.

Die Bedeutung von Cystein-Proteasen bei der Evasion der Parasiten wurde bereits bei der Präparation der PEMS gezeigt. Es ist allerdings nicht bekannt, welche Proteasen direkt beteiligt sind. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der Cystein-Protease-Inhibitor bADS, ein biotinyliertes Derivat der Aziridin-Dicarbonsäure, gegen intraerythrocytäre Plasmodien eingesetzt. Durch die Biotinylierung wurden Zielproteine von bADS, die ihren Ursprung im Parasiten haben, in der Nahrungsvakuole und zusätzlich im Cytosol der Wirtszelle lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation der Proteine, vermutlich Cystein-Proteasen, stadienspezifisch ist. In späten Stadien der Parasiten-Entwicklung sind sie hauptsächlich in der Nahrungsvakuole nachzuweisen, bei Trophozoiten-infizierten Erythrocyten jedoch zusätzlich im Wirts-Cytosol. Diese Beobachtungen lassen auf eine wichtige Funktion von Cystein-Proteasen bei der Parasiten-Reifung und seiner Evasion aus der Wirtszelle schließen. Mit Hilfe der 2-D PAGE und anschließender Affinitäts-Markierung von bADS gekoppelten Proteinen konnten zwischen 20 und 30 Proteine als mögliche Zielproteine des Inhibitors sichtbar gemacht werden. Eines davon ist Falcipain 2, eine bereits bekannte Cystein-Protease in *Plasmodium*. Des weiteren wurden Indizien gefunden, dass ein Prozessierungsprodukt von SERA als aktive Protease an bADS bindet.

Die Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit liefern die Grundlagen zu einer weiterführenden Analyse derjenigen Proteine, die mit dem Apikal-Komplex und/oder der PVM assoziiert sind. Die Identifizierung und Untersuchung der Cystein-Proteasen in maturen Parasitenstadien werden deren Funktionen im intraerythrocytären Entwicklungszyklus aufklären.

Dies alles wird dazu beitragen, die molekularen Mechanismen der Invasion und der Evasion des Parasiten in seine und aus seiner Wirtszelle zu verstehen.

## 6 Literatur

- Adams, J. H., Sim, B. K., Dolan, S. A., Fang, X., Kaslow, D. C., and Miller, L. H. (1992). A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 7085-9.
- Adams, J. H., Blair, P. L., Kaneko, O., and Peterson, D. S. (2001). An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. Trends Parasitol 17, 297-9.
- Aikawa, M. (1966). The fine structure of the erythrocytic stages of three avian malarial parasites, *Plasmodium fallax, P. lophurae*, and *P. cathemerium*. Am J Trop Med Hyg 15, 449-71.
- Aikawa, M., Miller, L. H., Rabbege, J. R., and Epstein, N. (1981). Freeze-fracture study on the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion. J Cell Biol *91*, 55-62.
- Aikawa, M., Torii, M., Sjolander, A., Berzins, K., Perlmann, P., and Miller, L. H. (1990). Pf155/RESA antigen is localized in dense granules of *Plasmodium falciparum* merozoites. Exp Parasitol 71, 326-9.
- Al-Khedery, B., Barnwell, J. W., and Galinski, M. R. (1999). Stage-specific expression of 14-3-3 in asexual blood-stage Plasmodium. Mol Biochem Parasitol *102*, 117-30.
- Albano, F. R., Foley, M., and Tilley, L. (1999). Export of parasite proteins to the erythrocyte cytoplasm: secretory machinery and traffic signals. Novartis Found Symp 226, 157-72; discussion 173-5.
- Ansorge, I., Benting, J., Bhakdi, S., and Lingelbach, K. (1996). Protein sorting in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells permeabilized with the pore-forming protein streptolysin O. Biochem J 315, 307-14.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., and Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet 25, 25-9.
- Ashton, P. D., Curwen, R. S., and Wilson, R. A. (2001). Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. Trends Parasitol *17*, 198-202.
- Atkinson, C. T., Aikawa, M., Perry, G., Fujino, T., Bennett, V., Davidson, E. A., and Howard, R. J. (1988). Ultrastructural localization of erythrocyte cytoskeletal and integral membrane proteins in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Eur J Cell Biol 45, 192-9.
- Baldi, D. L., Andrews, K. T., Waller, R. F., Roos, D. S., Howard, R. F., Crabb, B. S., and Cowman, A. F. (2000). RAP1 controls rhoptry targeting of RAP2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. EMBO J 19, 2435-43.
- Banerjee, R., Liu, J., Beatty, W., Pelosof, L., Klemba, M., and Goldberg, D. E. (2002). Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 990-5.
- Bannister, L. H., Mitchell, G. H., Butcher, G. A., Dennis, E. D., and Cohen, S. (1986a). Structure and development of the surface coat of erythrocytic merozoites of *Plasmodium knowlesi*. Cell Tissue Res 245, 281-90.

- Bannister, L. H., Mitchell, G. H., Butcher, G. A., and Dennis, E. D. (1986b). Lamellar membranes associated with rhoptries in erythrocytic merozoites of *Plasmodium knowlesi*: a clue to the mechanism of invasion. Parasitology 92, 291-303.
- Bannister, L. H., and Mitchell, G. H. (1989). The fine structure of secretion by *Plasmodium knowlesi* merozoites during red cell invasion. J Protozool *36*, 362-7.
- Bannister, L. H., and Dluzewski, A. R. (1990). The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. Blood Cells *16*, 257-92; discussion 293-7.
- Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S., and Mitchell, G. H. (2000). Ultrastructure of rhoptry development in *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts. Parasitology 121, 273-87.
- Barale, J. C., Blisnick, T., Fujioka, H., Alzari, P. M., Aikawa, M., Braun-Breton, C., and Langsley, G. (1999). *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease 2, a merozoite candidate for the merozoite surface protein 1-42 maturase. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 6445-50.
- Barrett, J., Jefferies, J. R., and Brophy, P. M. (2000). Parasite proteomics. Parasitol Today 16, 400-3.
- Behari, R., and Haldar, K. (1994). *Plasmodium falciparum*: protein localization along a novel, lipid-rich tubovesicular membrane network in infected erythrocytes. Exp Parasitol 79, 250-9.
- Benting, J., Ansorge, I., Paprotka, K., and Lingelbach, K. R. (1994a). Chemical and thermal inhibition of protein secretion have stage specific effects on the intraerythrocytic development of *Plasmodium falciparum* in vitro. Trop Med Parasitol 45, 303-7.
- Benting, J., Mattei, D., and Lingelbach, K. (1994b). Brefeldin A inhibits transport of the glycophorinbinding protein from *Plasmodium falciparum* into the host erythrocyte. Biochem J *300*, 821-6.
- Berhe, S., Gerold, P., Kedees, M. H., Holder, A. A., and Schwarz, R. T. (2000). *Plasmodium falciparum*: merozoite surface proteins 1 and 2 are not posttranslationally modified by classical N- or O-glycans. Exp Parasitol 94, 194-7.
- Bernhardt, J., Buttner, K., Scharf, C., and Hecker, M. (1999). Dual channel imaging of two-dimensional electropherograms in *Bacillus subtilis*. Electrophoresis 20, 2225-40.
- Berry, C., Humphreys, M. J., Matharu, P., Granger, R., Horrocks, P., Moon, R. P., Certa, U., Ridley, R. G., Bur, D., and Kay, J. (1999). A distinct member of the aspartic proteinase gene family from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. FEBS Lett 447, 149-54.
- Bhasin, V. K. (2000). Proteomics could be key in battle against malaria. Nature 403, 698.
- Bhattacharya, P., Malhotra, P., Sharma, P., Okenu, D. M., and Chauhan, V. S. (1995). Merozoite surface antigen 2 (MSA-2) gene of *Plasmodium falciparum* strains from India. Mol Biochem Parasitol 74, 125-7.
- Bianco, A. E., Culvenor, J. G., Coppel, R. L., Crewther, P. E., McIntyre, P., Favaloro, J. M., Brown, G. V., Kemp, D. J., and Anders, R. F. (1987). Putative glycophorin-binding protein is secreted from schizonts of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 23, 91-102.
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P. G., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R., and Postel, W. (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. J Biochem Biophys Methods 6, 317-39.

- Blackman, M. J., Fujioka, H., Stafford, W. H., Sajid, M., Clough, B., Fleck, S. L., Aikawa, M., Grainger, M., and Hackett, F. (1998). A subtilisin-like protein in secretory organelles of *Plasmodium falciparum* merozoites. J Biol Chem 273, 23398-409.
- Blackman, M. J. (2000). Proteases involved in erythrocyte invasion by the malaria parasite: function and potential as chemotherapeutic targets. Curr Drug Targets *1*, 59-83.
- Blackman, M. J., and Bannister, L. H. (2001). Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. Mol Biochem Parasitol *117*, 11-25.
- Blackstock, W. P., and Weir, M. P. (1999). Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. Trends Biotechnol 17, 121-7.
- Blair, P. L., Kappe, S. H., Maciel, J. E., Balu, B., and Adams, J. H. (2002). *Plasmodium falciparum* MAEBL is a unique member of the ebl family. Mol Biochem Parasitol *122*, 35-44.
- Bonnin, A., Gut, J., Dubremetz, J. F., Nelson, R. G., and Camerlynck, P. (1995). Monoclonal antibodies identify a subset of dense granules in *Cryptosporidium parvum* zoites and gamonts. J Eukaryot Microbiol 42, 395-401.
- Braun-Breton, C., Rosenberry, T. L., and da Silva, L. P. (1988). Induction of the proteolytic activity of a membrane protein in *Plasmodium falciparum* by phosphatidyl inositol-specific phospholipase C. Nature 332, 457-9.
- Breman, J. G. (2001). The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. Am J Trop Med Hyg 64, 1-11.
- Brown, D. A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. Annu Rev Cell Dev Biol 14, 111-36.
- Carcy, B., Bonnefoy, S., Guillotte, M., Le Scanf, C., Grellier, P., Schrevel, J., Fandeur, T., and Mercereau-Puijalon, O. (1994). A large multigene family expressed during the erythrocytic schizogony of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 68, 221-33.
- Carucci, D. J., Yates, J. R., and Florens, L. (2002). Exploring the proteome of *Plasmodium*. Int J Parasitol *32*, 1539-42.
- Cheng, Q., and Saul, A. (1994). Sequence analysis of the apical membrane antigen I (AMA-1) of *Plasmodium vivax*. Mol Biochem Parasitol *65*, 183-7.
- Chitnis, C. E., and Blackman, M. J. (2000). Host cell invasion by malaria parasites. Parasitol Today *16*, 411-5.
- Clavijo, C. A., Mora, C. A., and Winograd, E. (1998). Identification of novel membrane structures in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. Mem Inst Oswaldo Cruz *93*, 115-20.
- Cogswell, F. B. (1992). The hypnozoite and relapse in primate malaria. Clin Microbiol Rev 5, 26-35.
- Cowman, A. F., Baldi, D. L., Healer, J., Mills, K. E., O'Donnell, R. A., Reed, M. B., Triglia, T., Wickham, M. E., and Crabb, B. S. (2000). Functional analysis of proteins involved in *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of red blood cells. FEBS Lett 476, 84-8.
- Cowman, A. F. (2001). Functional analysis of drug resistance in *Plasmodium falciparum* in the postgenomic era. Int J Parasitol *31*, 871-8.

- Cowman, A. F., and Crabb, B. S. (2002). The *Plasmodium falciparum* genome a blueprint for erythrocyte invasion. Science 298, 126-8.
- Crewther, P. E., Culvenor, J. G., Silva, A., Cooper, J. A., and Anders, R. F. (1990). *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. Exp Parasitol 70, 193-206.
- Culvenor, J. G., Day, K. P., and Anders, R. F. (1991). *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. Infect Immun 59, 1183-7.
- Debrabant, A., Maes, P., Delplace, P., Dubremetz, J. F., Tartar, A., and Camus, D. (1992). Intramolecular mapping of *Plasmodium falciparum* P126 proteolytic fragments by N-terminal amino acid sequencing. Mol Biochem Parasitol 53, 89-95.
- Deguercy, A., Hommel, M., and Schrevel, J. (1990). Purification and characterization of 37-kilodalton proteases from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium* berghei which cleave erythrocyte cytoskeletal components. Mol Biochem Parasitol *38*, 233-44.
- Deitsch, K. W., and Wellems, T. E. (1996). Membrane modifications in erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 76, 1-10.
- Delplace, P., Fortier, B., Tronchin, G., Dubremetz, J. F., and Vernes, A. (1987). Localization, biosynthesis, processing and isolation of a major 126 kDa antigen of the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 23, 193-201.
- Desai, S. A., Krogstad, D. J., and McCleskey, E. W. (1993). A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. Nature *362*, 643-6.
- Desai, S. A., and Rosenberg, R. L. (1997). Pore size of the malaria parasite's nutrient channel. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 2045-9.
- Desai, S. A., Bezrukov, S. M., and Zimmerberg, J. (2000). A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. Nature 406, 1001-5.
- Desjardins, M., Celis, J. E., van Meer, G., Dieplinger, H., Jahraus, A., Griffiths, G., and Huber, L. A. (1994). Molecular characterization of phagosomes. J Biol Chem 269, 32194-200.
- Dluzewski, A. R., Rangachari, K., Wilson, R. J., and Gratzer, W. B. (1986). *Plasmodium falciparum*: protease inhibitors and inhibition of erythrocyte invasion. Exp Parasitol *62*, 416-22.
- Donahue, C. G., Carruthers, V. B., Gilk, S. D., and Ward, G. E. (2000). The *Toxoplasma* homolog of *Plasmodium* apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein secreted in response to elevated intracellular calcium levels. Mol Biochem Parasitol *111*, 15-30.
- Dua, M., Raphael, P., Sijwali, P. S., Rosenthal, P. J., and Hanspal, M. (2001). Recombinant falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane ankyrin and protein 4.1. Mol Biochem Parasitol *116*, 95-9.
- Dutta, S., Malhotra, P., and Chauhan, V. S. (1995). Sequence analysis of apical membrane antigen 1 (AMA-1) of *Plasmodium cynomolgi bastianelli*. Mol Biochem Parasitol 73, 267-70.
- Elmendorf, H. G., and Haldar, K. (1994). *Plasmodium falciparum* exports the Golgi marker sphingomyelin synthase into a tubovesicular network in the cytoplasm of mature erythrocytes. J Cell Biol *124*, 449-62.

- Etzion, Z., and Perkins, M. E. (1989). Localization of a parasite encoded protein to erythrocyte cytoplasmic vesicles of *Plasmodium falciparum*-infected cells. Eur J Cell Biol *48*, 174-9.
- Etzion, Z., Murray, M. C., and Perkins, M. E. (1991). Isolation and characterization of rhoptries of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 47, 51-61.
- Fischer, K., Marti, T., Rick, B., Johnson, D., Benting, J., Baumeister, S., Helmbrecht, C., Lanzer, M., and Lingelbach, K. (1998). Characterization and cloning of the gene encoding the vacuolar membrane protein EXP-2 from *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 92, 47-57.
- Florens, L., Washburn, M. P., Raine, J. D., Anthony, R. M., Grainger, M., Haynes, J. D., Moch, J. K., Muster, N., Sacci, J. B., Tabb, D. L., Witney, A. A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M. J., Holder, A. A., Sinden, R. E., Yates, J. R., and Carucci, D. J. (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. Nature 419, 520-6.
- Francis, S. E., Sullivan, D. J., Jr., and Goldberg, D. E. (1997). Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Annu Rev Microbiol *51*, 97-123.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M. S., Nene, V., Shallom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., McFadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Carucci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R. W., Fraser, C. M., and Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Nature *419*, 498-511.
- Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C., and Desjardins, M. (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. J Cell Biol 152, 165-80.
- Ginsburg, H. (1994). Transport pathways in the malaria-infected erythrocyte. Their characterization and their use as potential targets for chemotherapy. Biochem Pharmacol 48, 1847-56.
- Goldberg, D. E., Slater, A. F., Cerami, A., and Henderson, G. B. (1990). Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 2931-5.
- Goldberg, D. E., Slater, A. F., Beavis, R., Chait, B., Cerami, A., and Henderson, G. B. (1991). Hemoglobin degradation in the human malaria pathogen *Plasmodium falciparum*: a catabolic pathway initiated by a specific aspartic protease. J Exp Med 173, 961-9.
- Goldberg, D. E. (1992). Plasmodial hemoglobin degradation: an ordered pathway in a specialized organelle. Infect Agents Dis 1, 207-11.
- Goldberg, D. E. (1993). Hemoglobin degradation in *Plasmodium*-infected red blood cells. Semin Cell Biol 4, 355-61.
- Gor, D. O., Li, A. C., Wiser, M. F., and Rosenthal, P. J. (1998). Plasmodial serine repeat antigen homologues with properties of schizont cysteine proteases. Mol Biochem Parasitol 95, 153-8.

- Gormley, J. A., Howard, R. J., and Taraschi, T. F. (1992). Trafficking of malarial proteins to the host cell cytoplasm and erythrocyte surface membrane involves multiple pathways. J Cell Biol *119*, 1481-95.
- Grellier, P., Precigout, E., Valentin, A., Carcy, B., and Schrevel, J. (1994). Characterization of a new 60 kDa apical protein of *Plasmodium falciparum* merozoite expressed in late schizogony. Biol Cell 82, 129-38.
- Guevara Patino, J. A., Holder, A. A., McBride, J. S., and Blackman, M. J. (1997). Antibodies that inhibit malaria merozoite surface protein-1 processing and erythrocyte invasion are blocked by naturally acquired human antibodies. J Exp Med *186*, 1689-99.
- Günther, K., Tümmler, M., Arnold, H. H., Ridley, R., Goman, M., Scaife, J. G., and Lingelbach, K. (1991). An exported protein of *Plasmodium falciparum* is synthesized as an integral membrane protein. Mol Biochem Parasitol *46*, 149-57.
- Hackett, F., Sajid, M., Withers-Martinez, C., Grainger, M., and Blackman, M. J. (1999). PfSUB-2: a second subtilisin-like protein in *Plasmodium falciparum* merozoites. Mol Biochem Parasitol 103, 183-95.
- Haldar, K., Elmendorf, H. G., Das, A., Li, W. L., Ferguson, D. J., and Elford, B. C. (1994). In vitro secretory assays with erythrocyte-free malaria parasites. Methods Cell Biol 45, 221-46.
- Haldar, K., Samuel, B. U., Mohandas, N., Harrison, T., and Hiller, N. L. (2001). Transport mechanisms in *Plasmodium*-infected erythrocytes: lipid rafts and a tubovesicular network. Int J Parasitol 31, 1393-401.
- Haldar, K., Mohandas, N., Samuel, B. U., Harrison, T., Hiller, N. L., Akompong, T., and Cheresh, P. (2002). Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. Cell Microbiol 4, 383-95.
- Hanspal, M., Dua, M., Takakuwa, Y., Chishti, A. H., and Mizuno, A. (2002a). *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane skeletal proteins at late stages of parasite development. Blood *100*, 1048-54.
- Hanspal, M., Goel, V. K., Oh, S. S., and Chishti, A. H. (2002b). Erythrocyte calpain is dispensable for malaria parasite invasion and growth. Mol Biochem Parasitol *122*, 227-9.
- Healer, J., Crawford, S., Ralph, S., McFadden, G., and Cowman, A. F. (2002). Independent translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. Infect Immun 70, 5751-8.
- Heukeshoven, J., and Dernick, R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. Electrophoresis 9, 28-32.
- Higgins, D. G., McConnell, D. J., and Sharp, P. M. (1989). Malarial proteinase? Nature 340, 604.
- Holder, A. A., and Freeman, R. R. (1984). Characterization of a high molecular weight protective antigen of *Plasmodium yoelii*. Parasitology 88, 211-9.
- Holder, A. A., Lockyer, M. J., Odink, K. G., Sandhu, J. S., Riveros-Moreno, V., Nicholls, S. C., Hillman, Y., Davey, L. S., Tizard, M. L., Schwarz, R. T., and et al. (1985a). Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites. Nature 317, 270-3.

- Holder, A. A., Freeman, R. R., Uni, S., and Aikawa, M. (1985b). Isolation of a *Plasmodium falciparum* rhoptry protein. Mol Biochem Parasitol *14*, 293-303.
- Howard, R. J., Haynes, J. D., McGinniss, M. H., and Miller, L. H. (1982). Studies on the role of red blood cell glycoproteins as receptors for invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. Mol Biochem Parasitol 6, 303-15.
- Howard, R. F., Narum, D. L., Blackman, M., and Thurman, J. (1998a). Analysis of the processing of *Plasmodium falciparum* rhoptry-associated protein 1 and localization of Pr86 to schizont rhoptries and p67 to free merozoites. Mol Biochem Parasitol 92, 111-22.
- Howard, R. F., Jacobson, K. C., Rickel, E., and Thurman, J. (1998b). Analysis of inhibitory epitopes in the *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RAP-1 including identification of a second inhibitory epitope. Infect Immun 66, 380-6.
- Howell, S. A., Withers-Martinez, C., Kocken, C. H., Thomas, A. W., and Blackman, M. J. (2001). Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. J Biol Chem 276, 31311-20.
- Jaikaria, N. S., Rozario, C., Ridley, R. G., and Perkins, M. E. (1993). Biogenesis of rhoptry organelles in *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 57, 269-79.
- Johnson, D., Günther, K., Ansorge, I., Benting, J., Kent, A., Bannister, L., Ridley, R., and Lingelbach, K. (1994). Characterization of membrane proteins exported from *Plasmodium falciparum* into the host erythrocyte. Parasitology 109, 1-9.
- Kappe, S. H., and Adams, J. H. (1996). Sequence analysis of the apical membrane antigen-1 genes (*ama-1*) of *Plasmodium yoelii yoelii* and *Plasmodium* berghei. Mol Biochem Parasitol 78, 279-83.
- Kappe, S. H., Curley, G. P., Noe, A. R., Dalton, J. P., and Adams, J. H. (1997). Erythrocyte binding protein homologues of rodent malaria parasites. Mol Biochem Parasitol *89*, 137-48.
- Khan, A. H., Qazi, A. M., Hoessli, D. C., Torred-Duarte, A. P., Senaldi, G., Qazi, M. H., Walker-Nasir, E., and Nasir ud, D. (1997). Carbohydrate moiety of *Plasmodium falciparum* glycoproteins: the nature of the carbohydrate-peptide linkage in the MSP-2 glycoprotein. Biochem Mol Biol Int 43, 655-68.
- Knapp, B., Hundt, E., and Lingelbach, K. R. (1991). Structure and possible function of *Plasmodium falciparum* proteins exported to the erythrocyte membrane. Parasitol Res 77, 277-82.
- Kocken, C. H., Narum, D. L., Massougbodji, A., Ayivi, B., Dubbeld, M. A., van der Wel, A., Conway, D. J., Sanni, A., and Thomas, A. W. (2000). Molecular characterisation of *Plasmodium* reichenowi apical membrane antigen-1 (AMA-1), comparison with P. falciparum AMA-1, and antibody- mediated inhibition of red cell invasion. Mol Biochem Parasitol *109*, 147-56.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol 305, 567-80.
- Krotoski, W. A. (1989). The hypnozoite and malarial relapse. Prog Clin Parasitol 1, 1-19.
- Krugliak, M., Zhang, J., and Ginsburg, H. (2002). Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. Mol Biochem Parasitol *119*, 249-56.

- Kushwaha, A., Rao, P. P., Duttu, V. S., Malhotra, P., and Chauhan, V. S. (2000). Expression and characterisation of *Plasmodium falciparum* acidic basic repeat antigen expressed in Escherichia coli. Mol Biochem Parasitol 106, 213-24.
- Kutner, S., Breuer, W. V., Ginsburg, H., Aley, S. B., and Cabantchik, Z. I. (1985). Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of *Plasmodium falciparum*: association with parasite development. J Cell Physiol 125, 521-7.
- La Greca, N., Hibbs, A. R., Riffkin, C., Foley, M., and Tilley, L. (1997). Identification of an endoplasmic reticulum-resident calcium-binding protein with multiple EF-hand motifs in asexual stages of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol *89*, 283-93.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-5.
- Lambros, C., and Vanderberg, J. P. (1979). Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. J Parasitol 65, 418-20.
- Lasonder, E., Ishihama, Y., Andersen, J. S., Vermunt, A. M., Pain, A., Sauerwein, R. W., Eling, W. M., Hall, N., Waters, A. P., Stunnenberg, H. G., and Mann, M. (2002). Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. Nature 419, 537-42.
- Lauer, S. A., Rathod, P. K., Ghori, N., and Haldar, K. (1997). A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. Science 276, 1122-5.
- Lauer, S., VanWye, J., Harrison, T., McManus, H., Samuel, B. U., Hiller, N. L., Mohandas, N., and Haldar, K. (2000). Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. EMBO J 19, 3556-64.
- Le Bonniec, S., Deregnaucourt, C., Redeker, V., Banerjee, R., Grellier, P., Goldberg, D. E., and Schrevel, J. (1999). Plasmepsin II, an acidic hemoglobinase from the *Plasmodium falciparum* food vacuole, is active at neutral pH on the host erythrocyte membrane skeleton. J Biol Chem 274, 14218-23.
- Lew, V. L. (2001). Packaged merozoite release without immediate host cell lysis. Trends Parasitol 17, 401-3.
- Li, J., Mitamura, T., Fox, B. A., Bzik, D. J., and Horii, T. (2002). Differential localization of processed fragments of *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen and further processing of its N- terminal 47 kDa fragment. Parasitol Int *51*, 343-52.
- Lingelbach, K., and Joiner, K. A. (1998). The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. J Cell Sci 111, 1467-75.
- Lyon, J. A., and Haynes, J. D. (1986). *Plasmodium falciparum* antigens synthesized by schizonts and stabilized at the merozoite surface when schizonts mature in the presence of protease inhibitors. J Immunol 136, 2245-51.
- Marshall, V. M., Peterson, M. G., Lew, A. M., and Kemp, D. J. (1989). Structure of the apical membrane antigen I (AMA-1) of *Plasmodium chabaudi*. Mol Biochem Parasitol *37*, 281-3.
- Marshall, V. M., Zhang, L., Anders, R. F., and Coppel, R. L. (1996). Diversity of the vaccine candidate AMA-1 of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 77, 109-13.

- Michetti, M., Salamino, F., Tedesco, I., Averna, M., Minafra, R., Melloni, E., and Pontremoli, S. (1996). Autolysis of human erythrocyte calpain produces two active enzyme forms with different cell localization. FEBS Lett 392, 11-5.
- Miller, S. K., Good, R. T., Drew, D. R., Delorenzi, M., Sanders, P. R., Hodder, A. N., Speed, T. P., Cowman, A. F., De Koning-Ward, T. F., and Crabb, B. S. (2002). A Subset of *Plasmodium falciparum* SERA Genes Are Expressed and Appear to Play an Important Role in the Erythrocytic Cycle. J Biol Chem 277, 47524-32.
- Mills, K. E., Pearce, J. A., Crabb, B. S., and Cowman, A. F. (2002). Truncation of merozoite surface protein 3 disrupts its trafficking and that of acidic-basic repeat protein to the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. Mol Microbiol *43*, 1401-11.
- Molloy, M. P., Herbert, B. R., Walsh, B. J., Tyler, M. I., Traini, M., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F., Williams, K. L., and Gooley, A. A. (1998). Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. Electrophoresis 19, 837-44.
- Morgan, A., and Burgoyne, R. D. (1992). Interaction between protein kinase C and Exo1 (14-3-3 protein) and its relevance to exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. Biochem J 286, 807-11.
- Narum, D. L., and Thomas, A. W. (1994). Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. Mol Biochem Parasitol 67, 59-68.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis 9, 255-62.
- Newbold, C., Warn, P., Black, G., Berendt, A., Craig, A., Snow, B., Msobo, M., Peshu, N., and Marsh, K. (1997). Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg 57, 389-98.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng *10*, 1-6.
- Noe, A. R., Fishkind, D. J., and Adams, J. H. (2000). Spatial and temporal dynamics of the secretory pathway during differentiation of the *Plasmodium yoelii* schizont. Mol Biochem Parasitol *108*, 169-85.
- Nwagwu, M., Haynes, J. D., Orlandi, P. A., and Chulay, J. D. (1992). *Plasmodium falciparum*: chymotryptic-like proteolysis associated with a 101-kDa acidic-basic repeat antigen. Exp Parasitol 75, 399-414.
- Nyalwidhe, J., Baumeister, S., Hibbs, A. R., Tawill, S., Papakrivos, J., Volker, U., and Lingelbach, K. (2002). A nonpermeant biotin derivative gains access to the parasitophorous vacuole in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes permeabilized with streptolysin O. J Biol Chem 277, 40005-11.
- Olaya, P., and Wasserman, M. (1991). Effect of calpain inhibitors on the invasion of human erythrocytes by the parasite *Plasmodium falciparum*. Biochim Biophys Acta *1096*, 217-21.
- Oliveira, D. A., Udhayakumar, V., Bloland, P., Shi, Y. P., Nahlen, B. L., Oloo, A. J., Hawley, W. E., and Lal, A. A. (1996). Genetic conservation of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1 (AMA-1). Mol Biochem Parasitol 76, 333-6.

- Orlandi, P. A., Sim, B. K., Chulay, J. D., and Haynes, J. D. (1990). Characterization of the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 40, 285-94.
- Otto, H. H., and Schirmeister, T. (1997). Cysteine Proteases and Their Inhibitors. Chem Rev 97, 133-172.
- Pachebat, J. A., Ling, I. T., Grainger, M., Trucco, C., Howell, S., Fernandez-Reyes, D., Gunaratne, R., and Holder, A. A. (2001). The 22 kDa component of the protein complex on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites is derived from a larger precursor, merozoite surface protein 7. Mol Biochem Parasitol 117, 83-9.
- Pandey, K. C., Singh, S., Pattnaik, P., Pillai, C. R., Pillai, U., Lynn, A., Jain, S. K., and Chitnis, C. E. (2002). Bacterially expressed and refolded receptor binding domain of *Plasmodium falciparum* EBA-175 elicits invasion inhibitory antibodies. Mol Biochem Parasitol *123*, 23-33.
- Pasloske, B. L., Baruch, D. I., van Schravendijk, M. R., Handunnetti, S. M., Aikawa, M., Fujioka, H., Taraschi, T. F., Gormley, J. A., and Howard, R. J. (1993). Cloning and characterization of a *Plasmodium falciparum* gene encoding a novel high-molecular weight host membrane-associated protein, PfEMP3. Mol Biochem Parasitol 59, 59-72.
- Pasvol, G., Jungery, M., Weatherall, D. J., Parsons, S. F., Anstee, D. J., and Tanner, M. J. (1982). Glycophorin as a possible receptor for *Plasmodium falciparum*. Lancet 2, 947-50.
- Perkins, M. E. (1992). Perkins, M. E. (1992) Rhoptry organelles of apicomplexan parasites. Parasitol Today 8, 28-32.
- Peterson, M. G., Nguyen-Dinh, P., Marshall, V. M., Elliott, J. F., Collins, W. E., Anders, R. F., and Kemp, D. J. (1990). Apical membrane antigen of *Plasmodium fragile*. Mol Biochem Parasitol 39, 279-83.
- Peterson, D. S., Miller, L. H., and Wellems, T. E. (1995). Isolation of multiple sequences from the *Plasmodium falciparum* genome that encode conserved domains homologous to those in erythrocytebinding proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 7100-4.
- Pouvelle, B., Spiegel, R., Hsiao, L., Howard, R. J., Morris, R. L., Thomas, A. P., and Taraschi, T. F. (1991). Direct access to serum macromolecules by intraerythrocytic malaria parasites. Nature 353, 73-5.
- Pouvelle, B., Gormley, J. A., and Taraschi, T. F. (1994). Characterization of trafficking pathways and membrane genesis in malaria-infected erythrocytes. Mol Biochem Parasitol *66*, 83-96.
- Preiser, P., Kaviratne, M., Khan, S., Bannister, L., and Jarra, W. (2000). The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. Microbes Infect 2, 1461-77.
- Rabilloud, T. (1996). Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. Electrophoresis 17, 813-29.
- Rabilloud, T., Blisnick, T., Heller, M., Luche, S., Aebersold, R., Lunardi, J., and Braun-Breton, C. (1999). Analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis: comparison of the proteins extracted from normal or *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte ghosts. Electrophoresis 20, 3603-10.
- Raphael, P., Takakuwa, Y., Manno, S., Liu, S. C., Chishti, A. H., and Hanspal, M. (2000). A cysteine protease activity from *Plasmodium falciparum* cleaves human erythrocyte ankyrin. Mol Biochem Parasitol 110, 259-72.
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A. I., and Mann, M. (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. Genome Res 12, 1231-45.
- Rappsilber, J., and Mann, M. (2002). What does it mean to identify a protein in proteomics? Trends Biochem Sci 27, 74-8.
- Rayner, J. C., Galinski, M. R., Ingravallo, P., and Barnwell, J. W. (2000). Two *Plasmodium falciparum* genes express merozoite proteins that are related to *Plasmodium* vivax and *Plasmodium yoelii* adhesive proteins involved in host cell selection and invasion. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 9648-53.
- Reed, M. B., Caruana, S. R., Batchelor, A. H., Thompson, J. K., Crabb, B. S., and Cowman, A. F. (2000). Targeted disruption of an erythrocyte binding antigen in *Plasmodium falciparum* is associated with a switch toward a sialic acid-independent pathway of invasion. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 7509-14.
- Richter, C., Tanaka, T., and Yada, R. Y. (1998). Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin. Biochem J *335*, 481-90.
- Ridley, R. G., Takacs, B., Lahm, H. W., Delves, C. J., Goman, M., Certa, U., Matile, H., Woollett, G. R., and Scaife, J. G. (1990). Characterisation and sequence of a protective rhoptry antigen from *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 41, 125-34.
- Ridley, R. G., Takacs, B., Etlinger, H., and Scaife, J. G. (1990). A rhoptry antigen of *Plasmodium falciparum* is protective in Saimiri monkeys. Parasitology *101 Pt 2*, 187-92.
- Roger, N., Dubremetz, J. F., Delplace, P., Fortier, B., Tronchin, G., and Vernes, A. (1988). Characterization of a 225 kilodalton rhoptry protein of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 27, 135-41.
- Roggwiller, E., Betoulle, M. E., Blisnick, T., and Braun Breton, C. (1996). A role for erythrocyte band 3 degradation by the parasite gp76 serine protease in the formation of the parasitophorous vacuole during invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol *82*, 13-24.
- Roggwiller, E., Blisnick, T., and Braun Breton, C. (1998). A *Plasmodium falciparum* hemolytic activity. Mol Biochem Parasitol *94*, 303-7.
- Rosario, V. (1981). Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. Science 212, 1037-8.
- Rosenthal, P. J., McKerrow, J. H., Aikawa, M., Nagasawa, H., and Leech, J. H. (1988). A malarial cysteine proteinase is necessary for hemoglobin degradation by *Plasmodium falciparum*. J Clin Invest 82, 1560-6.
- Rosenthal, P. J. (1995). *Plasmodium falciparum*: effects of proteinase inhibitors on globin hydrolysis by cultured malaria parasites. Exp Parasitol 80, 272-81.
- Rosenthal, P. J. (1998). Proteases of malaria parasites: new targets for chemotherapy. Emerg Infect Dis 4, 49-57.
- Rosenthal, P. J. (2002). Hydrolysis of erythrocyte proteins by proteases of malaria parasites. Curr Opin Hematol 9, 140-5.

- Sajid, M., Withers-Martinez, C., and Blackman, M. J. (2000). Maturation and specificity of *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease-1, a malaria merozoite subtilisin-like serine protease. J Biol Chem 275, 631-41.
- Salmon, B. L., Oksman, A., and Goldberg, D. E. (2001). Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 271-6.
- Sam-Yellowe, T. Y., Shio, H., and Perkins, M. E. (1988). Secretion of *Plasmodium falciparum* rhoptry protein into the plasma membrane of host erythrocytes. J Cell Biol *106*, 1507-13.
- Sam-Yellowe, T. Y., and Perkins, M. E. (1991). Interaction of the 140/130/110 kDa rhoptry protein complex of *Plasmodium falciparum* with the erythrocyte membrane and liposomes. Exp Parasitol 73, 161-71.
- Sam-Yellowe, T. Y., Fujioka, H., Aikawa, M., and Messineo, D. G. (1995). *Plasmodium falciparum* rhoptry proteins of 140/130/110 kd (Rhop-H) are located in an electron lucent compartment in the neck of the rhoptries. J Eukaryot Microbiol 42, 224-31.
- Sam-Yellowe, T. (1996). Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. Parasitol Today 12: 308-316.
- Sam-Yellowe, T. Y., Del Rio, R. A., Fujioka, H., Aikawa, M., Yang, J. C., and Yakubu, Z. (1998). Isolation of merozoite rhoptries, identification of novel rhoptry- associated proteins from *Plasmodium yoelii*, *P. chabaudi*, *P. berghei*, and conserved interspecies reactivity of organelles and proteins with *P. falciparum* rhoptry-specific antibodies. Exp Parasitol 89, 271-84.
- Sam-Yellowe, T. Y., Fujioka, H., and Aikawa, M. (1999). Morphological analysis of isolated rhoptries from *Plasmodium yoelii*, *P. berghei*, and *P. chabaudi* merozoites. Exp Parasitol 92, 275-8.
- Sam-Yellowe, T. Y., Fujioka, H., Aikawa, M., Hall, T., and Drazba, J. A. (2001). A *Plasmodium falciparum* protein located in Maurer's clefts underneath knobs and protein localization in association with Rhop-3 and SERA in the intracellular network of infected erythrocytes. Parasitol Res 87, 173-85.
- Schofield, L., Bushell, G. R., Cooper, J. A., Saul, A. J., Upcroft, J. A., and Kidson, C. (1986). A rhoptry antigen of *Plasmodium falciparum* contains conserved and variable epitopes recognized by inhibitory monoclonal antibodies. Mol Biochem Parasitol 18, 183-95.
- Scholtyseck, E., and Mehlhorn, H. (1970). Ultrastructural study of characteristic organelles (paired organelles, micronemes, micropores) of sporozoa and related organisms. Z Parasitenkd *34*, 97-127.
- Sharma, P., Kumar, A., Singh, B., Bharadwaj, A., Sailaja, V. N., Adak, T., Kushwaha, A., Malhotra, P., and Chauhan, V. S. (1998). Characterization of protective epitopes in a highly conserved *Plasmodium falciparum* antigenic protein containing repeats of acidic and basic residues. Infect Immun 66, 2895-904.
- Sim, B. K., Toyoshima, T., Haynes, J. D., and Aikawa, M. (1992). Localization of the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen in micronemes of *Plasmodium falciparum* merozoites. Mol Biochem Parasitol *51*, 157-9.
- Sim, B. K., Chitnis, C. E., Wasniowska, K., Hadley, T. J., and Miller, L. H. (1994). Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. Science 264, 1941-4.

- Simmons, D., Woollett, G., Bergin-Cartwright, M., Kay, D., and Scaife, J. (1987). A malaria protein exported into a new compartment within the host erythrocyte. EMBO J *6*, 485-91.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. Nature 387, 569-72.
- Sinnis, P., and Sim, B. K. (1997). Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*. Trends Microbiol *5*, 52-8.
- Siripurkpong, P., Yuvaniyama, J., Wilairat, P., and Goldberg, D. E. (2002). Active site contribution to specificity of the aspartic proteases plasmepsins I and II. J Biol Chem 277, 41009-13.
- Smythe, J. A., Coppel, R. L., Brown, G. V., Ramasamy, R., Kemp, D. J., and Anders, R. F. (1988). Identification of two integral membrane proteins of *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A 85, 5195-9.
- Stafford, W. H., Gunder, B., Harris, A., Heidrich, H. G., Holder, A. A., and Blackman, M. J. (1996). A 22 kDa protein associated with the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 complex. Mol Biochem Parasitol 80, 159-69.
- Taraschi, T. F., Trelka, D., Martinez, S., Schneider, T., and O'Donnell, M. E. (2001). Vesicle-mediated trafficking of parasite proteins to the host cell cytosol and erythrocyte surface membrane in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. Int J Parasitol 31, 1381-91.
- Thompson, J. K., Triglia, T., Reed, M. B., and Cowman, A. F. (2001). A novel ligand from *Plasmodium falciparum* that binds to a sialic acid- containing receptor on the surface of human erythrocytes. Mol Microbiol 41, 47-58.
- Torii, M., Adams, J. H., Miller, L. H., and Aikawa, M. (1989). Release of merozoite dense granules during erythrocyte invasion by *Plasmodium knowlesi*. Infect Immun 57, 3230-3.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 76, 4350-4.
- Trager, W., and Jensen, J. B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. Science 193, 673-5.
- Trager, W., Rozario, C., Shio, H., Williams, J., and Perkins, M. E. (1992). Transfer of a dense granule protein of *Plasmodium falciparum* to the membrane of ring stages and isolation of dense granules. Infect Immun 60, 4656-61.
- Triglia, T., Healer, J., Caruana, S. R., Hodder, A. N., Anders, R. F., Crabb, B. S., and Cowman, A. F. (2000). Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. Mol Microbiol 38, 706-18.
- Vander Jagt, D. L., Caughey, W. S., Campos, N. M., Hunsaker, L. A., and Zanner, M. A. (1989). Parasite proteases and antimalarial activities of protease inhibitors. Prog Clin Biol Res 313, 105-18.
- Waller, R. F., Reed, M. B., Cowman, A. F., and McFadden, G. I. (2000). Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. EMBO J 19, 1794-802.
- Ward, G. E., Miller, L. H., and Dvorak, J. A. (1993). The origin of parasitophorous vacuole membrane lipids in malaria- infected erythrocytes. J Cell Sci 106, 237-48.

- Washburn, M. P., Wolters, D., and Yates, J. R., 3rd (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. Nat Biotechnol 19, 242-7.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., and Williams, K. L. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol Genet Eng Rev 13, 19-50.
- Winograd, E., Clavijo, C. A., Bustamante, L. Y., and Jaramillo, M. (1999). Release of merozoites from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes could be mediated by a non-explosive event. Parasitol Res 85, 621-4.

## Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Matthias Leippe für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit, für seine Diskussionsbereitschaft und steten Anregungen bedanken.

Insbesondere gilt mein Dank Prof. Dr. R. D. Walter für sein stetes Interesse und die große Unterstützung.

Außerdem bedanke ich mich bei den Angehörigen der Sektion Parasitologie des Bernhard-Nocht-Instituts für viele Ratschläge und Diskussionen. Den Mitarbeitern der Abteilung für biochemische Parasitologie danke ich für die hilfreichen Gespräche und für die kollegiale Zusammenarbeit. Bei Prof. Dr. Egbert Tannich möchte ich mich für seine nützlichen Anregungen bedanken.

Prof. Dr. Georg Krohne, Univ. Würzburg, und Christel Schmetz, Bernhard-Nocht-Institut, danke ich für viele Tipps bei elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Bei Prof. Dr. Tanja Schirmeister, Univ. Würzburg, möchte ich mich für die Bereitstellung des Cystein-Protease-Inhibitors "bADS" bedanken.

Dr. Eberhard Krause und Heidi Lerch, Forschungs-Institut für Molekulare Pharmakologie Berlin, danke ich für die gründliche Einarbeitung in die Massenspektrometrie, Diskussionsbereitschaft und Hilfestellungen.

Nicht zuletzt bin ich Dr. Heike Bruhn, Dr. Rosa Herbst, Dr. Beate Riekens, Dr. Thomas Roeder, Maren Rudolph, Maren Simanski und Julia Winkelmann aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Leippe für ihren fachlichen Rat, freundschaftlichen Umgang und die hilfsbereite Art sehr dankbar.

Meinen Eltern gilt ein besonderer Dank für ihre immerwährende Unterstützung.

## Lebenslauf

Name:	Christoph Josef Gelhaus
Geburtsdatum:	19.04.1968
Geburtsort:	Vechta, Niedersachsen
Familienstand:	ledig
Schulische Ausbildung:	1974-1978 Johannes-Grundschule Altenberge
	1978-1988 Städt. Gymnasium Borghorst
Wehrdienst:	1988-1989
Berufliche Ausbildung:	1989-1991 Ausbildung zum Biologisch technischen Assistenten
	(BTA) an der Berufsfachschule für Chemie und
	Pharmazie Dr. von Morgenstern, Braunschweig
	1991 Staatl. anerkannte Prüfung zum Biologisch technischen
	Assistenten
Studium:	1991-1994 Studium im Studiengang Biologie an der
	Westf. Wilhelms-Univ. Münster
	1994-1997 Studium im Studiengang Biologie an der
	Albert-Ludwigs-Univ. Freiburg i. Br.
	1996 Diplom-Hauptprüfung Biologie
	1996-1997 Diplomarbeit in der Abtlg. für Biochemie der
	Pflanzen an der Albert-Ludwigs-Univ. Freiburg i. Br.
	1997 Diplom in Biologie
Doktorarbeit:	1998-2001 in der in der Sektion Parasitologie am Bernhard-
	Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg,
	Thema:"Analyse des subzellulären Proteinrepertoires von
	intraerythrocytären Stadien des Malariaerregers
	Plasmodium falciparum (WELCH 1897)"
	seit 2001 Zentrum für Infektionsforschung, Molekulare
	Parasitologie, Univ. Würzburg.