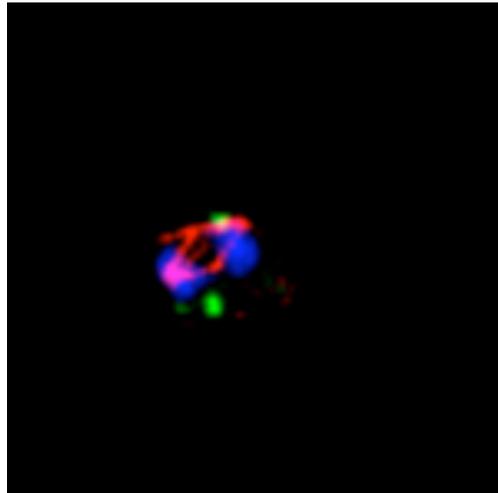


**Charakterisierung des Golgi Apparates und Untersuchungen zum
zielgerichteten Proteintransport im Malariaerreger
Plasmodium falciparum (Welch, 1897)**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Nicole Sunaina Struck
aus Bombay

Hamburg 2007

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	7
2	STAND DER FORSCHUNG	9
2.1	Malaria – ein Überblick.....	9
2.1.1	Pathophysiologie.....	10
2.1.2	Medikamente, Vektorbekämpfung und Vakzine	11
2.2	Die Biologie des Parasiten	13
2.3	Die Zellbiologie des Parasiten.....	17
2.3.1	Das endoplasmatische Retikulum	17
2.3.2	Der Golgi Apparat.....	19
2.3.3	Die sekretorischen Organellen.....	22
2.3.4	Der Apikoplast.....	25
2.4	Proteintransport und Proteinprozessierung	27
2.4.1	Vesikelabhängiger Proteintransport	28
2.4.2	„Targeting“-Signale in <i>P. falciparum</i>	29
2.4.3	Proteolytische Prozessierung sekretorischer Proteine.....	31
3	ZIELSETZUNG	32
4	FORSCHUNGSBERICHT	33
4.1	Untersuchungen des Golgi Komplexes in <i>P. falciparum</i>	33
4.1.1	Struck <i>et al.</i> , 2005	33
4.1.2	Struck <i>et al.</i> , 2007	38
4.2	Analyse unterschiedlicher Transportwege, sowie essentieller Transport- und Prozessiersignale im sekretorischen Membransystem von <i>P. falciparum</i>	42
4.2.1	Tonkin <i>et al.</i> , 2006	42
4.2.2	Treeck <i>et al.</i> , 2006.....	44
4.2.3	O’Donnell <i>et al.</i> , 2006.....	46
5	DISKUSSION	49
5.1	Untersuchungen des Golgi Komplexes in <i>P. falciparum</i>	49
5.1.1	Struck <i>et al.</i> , 2005	49
5.1.2	Struck <i>et al.</i> , 2007	53

5.2	Analyse unterschiedlicher Transportwege, sowie essentieller Transport- und Prozessiersignale im sekretorischen Membransystem von <i>P. falciparum</i>	54
5.2.1	Tonkin <i>et al.</i> , 2006	54
5.2.2	Trecek <i>et al.</i> , 2006.....	58
5.2.3	O'Donnell <i>et al.</i> , 2006.....	60
6	LITERATUR.....	63
7	ANHANG	72
7.1	Anteile der Autorin an den Publikationen.....	72
7.1.1	Anteile der Autorin an der vorgelegten Veröffentlichung „Re-defining the Golgi complex in <i>Plasmodium falciparum</i> using the novel Golgi marker PfGRASP“ (Struck <i>et al.</i> , 2005).	72
7.1.2	Anteile der Autorin an der vorgelegten Veröffentlichung „GRASPing the Golgi – evidence of a GRASP splice variant in the malaria parasite <i>Plasmodium falciparum</i> “ (Struck <i>et al.</i> , 2007, Manuskript eingereicht).....	72
7.1.3	Anteile der Autorin an der vorgelegten Veröffentlichung „Evidence for Golgi-independent transport from the early secretory pathway to the plastid in malaria parasites“ (Tonkin <i>et al.</i> , 2006).	72
7.1.4	Anteile der Autorin an der vorgelegten Veröffentlichung „A conserved region in the EBL-Proteins is implicated in Microneme targeting of the malaria parasite <i>Plasmodium falciparum</i> “ (Trecek <i>et al.</i> , 2006).....	73
7.1.5	Anteile der Autorin an der vorgelegten Veröffentlichung „Intramembrane proteolysis mediates shedding of a key adhesin during erythrocyte invasion by the malaria parasite“ (O'Donnell <i>et al.</i> , 2006).....	73
7.2	Publikationen.....	74

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	15
Abb. 2 Erythrozytärer Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	16
Abb. 3 Morphologische Unterschiede des Golgi Apparates.....	21
Abb. 4 Schemazeichnung eines Merozoiten und der Invasion.....	23
Abb. 5 Lokalisation des <i>Pf</i> GRASP-GFP Fusionsproteins in unfixierten Parasiten.....	34
Abb. 6 Ko-Lokalisierungsstudien von <i>Pf</i> GRASP-GFP mit den Markerproteinen ERD2 und BiP	35
Abb. 7 Dynamik des Golgi Apparates während der erythrozytären Lebensphase von <i>P. falciparum</i>	36
Abb. 8 Dynamik und Entwicklung von <i>Pf</i> ERD2-GFP exprimierenden Parasiten.....	37
Abb. 9 Identifikation von zwei unterschiedlichen <i>grasp</i> Populationen	39
Abb. 10 Zwei GRASP Proteine werden in <i>P. falciparum</i> hergestellt	40
Abb. 11 Lokalisation und Dynamik von GRASP2-GFP in unfixierten Parasiten	41
Abb. 12 Die Signalpeptide sekretorischer Proteine sind austauschbar	43
Abb. 13 Apikoplastproteine können über den Golgi Apparat zurück in das ER geführt werden	44
Abb. 14 Domänstruktur von EBA-175 und Schemazeichnung der EBA-175-GFP Fusionskonstrukte („Minigene“)	45
Abb. 15 Lokalisation der EBA-175-GFP Minigene.....	46
Abb. 16 Mutation des Protease-Erkennungsmotivs in der Transmembrandomäne von EBA-175	48
Abb. 17 Biogenese des Golgi Apparates in <i>P. falciparum</i>	53

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Alpha/anti
Abb.	Abbildung
ACP	Acyl Carrier Protein
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AMA1	Apical Membrane Antigen 1
bp	Basenpaare
BFA	Brefeldin A
bzw.	Beziehungsweise
Ca	Kalzium
cDNA	Copy-DNA
CSP	Circumsporozoite Protein
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBL-EBP	Duffy binding-like Erythrocyte Binding Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBA-175	Erythrocyte Binding Antigen 175 kDa
ERD	Endoplasmic Reticulum Retention Defective
ERES	ER exit sites
gDNA	Genomische DNA
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRASP	Golgi Re-Assembly Stacking Protein
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	Horse Radish Peroxidase
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
m	Meter
μ	Mikro
min.	Minute
MSP1	Merozoite Surface Protein 1
mTRAP	merozoite specific TRAP
cMyc	Cellular homologue of the oncogene vMyc
NIH	National Institute of Health
NSF	N-ethylmaleimide sensitive factor

<i>Pb</i>	<i>P. berghei</i>
<i>Pc</i>	<i>P. chabaudi</i>
<i>Pf</i>	<i>P. falciparum</i>
<i>Pg</i>	<i>P. gallinaceum</i>
<i>Pk</i>	<i>P. knowlesi</i>
<i>Pv</i>	<i>P. vivax</i>
<i>Py</i>	<i>P. yoelii</i>
pi	Post Invasion
PCR	Polymerase Chain Reaction
pV	Parasitophore Vakuole
pVM	Parasitophore Vakuolenmembran
ROM	Rhomboid-like Proteins
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SDS PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
sec.	Sekunde
SNAP	Soluble NSF attachment protein
SNARE	SNAP-Receptor
sog.	Sogenanntes
sp.	Spezies
SUB	Subtilisin-like Protease
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TMD	Transmembrandomäne
TRAP	Thrombospondin-related Adhesive Protein
u.a.	Unter anderem
WHO	World Health Organization
z.B.	Zum Beispiel

1 ZUSAMMENFASSUNG

Malaria ist eine lebensgefährliche Infektionskrankheit, die durch einzellige Organismen der Gattung *Plasmodium* hervorgerufen wird. Von den vier humanpathogenen Arten hat *P. falciparum* die höchste Mortalitätsrate. Eine rasche Verbreitung von Chemotherapeutika-resistenten Erregerstämmen erschwert in zunehmendem Masse Prävention und Therapie. Ein Impfstoff steht nicht zur Verfügung.

Ein zielgerichteter Proteintransport ist essentiell für das Überleben des Parasiten. Sowohl die Invasion und Modifikation der Wirtszelle, als auch der Transport von kernkodierten Proteinen in die sekretorischen oder DNA-haltigen Organellen (z.B. die Mikronemen oder Apikoplasten) des Parasiten setzen besondere Transportmechanismen voraus (Foth *et al.*, 2003; Ralph *et al.*, 2004; Marti *et al.*, 2005; Cowman und Crabb, 2006). In eukaryotischen Zellen beginnt der Transport sekretorischer Proteine mit der Ko-translationalen Insertion in das endoplasmatische Retikulum (ER) und führt über den Golgi Apparat (bzw. *cis*- und *trans*-Golgi Netzwerken) zu den subzellulären Bestimmungsorten.

Obwohl ein klassischer sekretorischer Transportweg im Malariaerreger beschrieben worden ist (Waller *et al.*, 2000; van Dooren *et al.*, 2000; Gardner *et al.*, 2002; Tonkin *et al.*, 2006), sind wichtige Fragen des Proteintransports und der Organisation des sekretorischen Transportsystems noch ungeklärt. Zum Beispiel werden Organisation und Lokalisierung des Golgi Apparates im Parasiten kontrovers diskutiert (Elmendorf und Haldar, 1993; Banting *et al.*, 1995; Van Wye *et al.*, 1996; Lingelbach, 1993 und 1997). Ebenfalls sind Transport- und Sortiermechanismen noch unbekannt (Albano *et al.*, 1999; Trelka *et al.*, 2000; Adisa *et al.*, 2001 und 2002; Taraschi *et al.*, 2003; Papakrivov *et al.*, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Identifikation und Charakterisierung eines Golgi-definierenden Markerproteins die Organisation und Morphologie des Organells genauer untersucht. Ein Homolog des „Golgi ReAssembly and Stacking Protein“ (GRASP) wurde mit einem GFP-Reporter markiert und gegen bereits charakterisierte (*cis*- und *trans*-) Golgi Marker evaluiert. Die Expression des Fusionsproteins ermöglichte erstmalig eine Visualisierung des Organells im lebenden Parasiten und erlaubte es, die Dynamik und Biogenese im Zuge der erythrozytären Lebensphase zu verfolgen. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass es zu keinem Zeitpunkt innerhalb des asexuellen Lebenszyklus' zu einem Export des (GRASP-definierten) Golgi Apparates über die parasitären Grenzen hinaus kommt.

Der Golgi Apparat hat als Protein Modifikations- und Sortierzentrum eine zentrale und herausragende Stellung im sekretorischen Transportsystem. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Proteintransport in den Apikoplasten unabhängig vom Golgi Apparat und direkt aus dem ER erfolgt. Kernkodierte Apikoplastproteine verfügen über N-terminale Signalsequenzen, die sich aus einem Signal- und einem Transitpeptid zusammensetzen (Waller *et al.*, 2000; Foth *et al.*, 2003). Das Signalpeptid vermittelt den Eintritt in das Endomembransystem, das Transitpeptid sorgt über einen unbekanntem Mechanismus für einen Weitertransport in den Apikoplasten. Mit Hilfe von chimären GFP-Fusionskonstrukten (aus Signalpeptiden unterschiedlicher sekretorischer Proteine und Transitpeptiden mit und ohne C-terminalem ER-Signal), konfokaler Mikroskopie, sowie dem Einsatz eines speziellen Inhibitors konnte gezeigt werden, dass der Apikoplast in einer Subdomäne des ER sitzt und Apikoplastproteine aus dem ER nicht über den Golgi Apparat, sondern über eine sekretorisch „abweichende“ Route in den Apikoplasten gelangen.

Eines der bestuntersuchten sekretorischen Proteine des Parasiten ist das „erythrocyte binding antigen“ EBA-175. Dieses Protein wird zu bestimmten sekretorischen Organellen (sog. Mikronemen) transportiert. Während des Invasionsvorganges werden diese Organellen sezerniert und adhäsive Proteine, u.a. EBA-175, gelangen als membrangebundene Proteine an die Oberfläche des Parasiten. Dort binden sie mit hoher Affinität an bestimmte Rezeptoren des Erythrozyten (im Falle von EBA-175 ist es Glykophorin A, Sim *et al.*, 1990). Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der zielgerichtete Transport von EBA-175 (und zwei weiteren, eng verwandten Mikronemenproteinen EBA-181 und EBA-140), unabhängig sowohl von der zytoplasmatischen-, als auch von der Transmembrandomäne (TMD) ist. Um diesen, für einen Transport notwendigen Bereich weiter einzuengen, wurde ein Expressionssystem für *P. falciparum* entwickelt, was erlaubt verschiedene Domänen von EBA-175 als GFP Fusionsprotein zu exprimieren und im Parasiten zu lokalisieren. Mit Hilfe dieses Systems konnte gezeigt werden, dass ein konservierter, luminaler Bereich von EBA-175 für den zielgerichteten Transport in die Mikronemen verantwortlich ist. Für den aktiven Invasionsvorgang, bzw. der Motilität des Parasiten während des Eintritts in die Wirtszelle, ist eine Trennung der hoch affinen Bindung zwischen Parasitenligand (z.B. EBA-175) und Wirtszellenrezeptor (z.B. Glykophorin A) notwendig. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Rhomboid Protease in *P. falciparum*, ROM-4, EBA-175 innerhalb seiner TMD sequenzspezifisch schneidet. Diese ROM-4-abhängige Prozessierung scheint essentiell für den Invasionsvorgang und damit für das Überleben des Parasiten zu sein.

2 STAND DER FORSCHUNG

2.1 Malaria – ein Überblick

Malaria ist die bedeutendste Tropenkrankheit der Welt. Sie wird verursacht durch einzellige Organismen der Gattung *Plasmodium*. Neben den vier humanpathogenen Arten (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae*) sind in dieser Gattung mehr als 170 Spezies zusammengefasst, deren Zwischenwirte von Nagetieren (z.B. *P. berghei*) über Affen (z.B. *P. knowlesi*) bis hin zu den Vögeln (z.B. *P. gallinaceum*) und Reptilien (z.B. *P. mexicanum*) reichen. Endwirt und gleichzeitig Überträger dieser Infektionskrankheit sind Mücken der Gattung *Anopheles*.

Malaria ist endemisch in Afrika, Teilen von Asien, Zentral- und Südamerika, Ozeanien und bestimmten Karibischen Inseln, wobei *P. falciparum*, der tödlichste unter den *Plasmodium* Spezies, der vorherrschende Malaria-Erreger in Afrika, Haiti und Papua Neu Guinea ist. Schätzungen der WHO zufolge leben 40% der Weltbevölkerung in endemischen Gebieten mit jährlich bis zu 300 Millionen akuten Malariainfektionen. Mehr als eine Million Menschen sterben jedes Jahr an den Folgen dieser Krankheit. 90% dieser Fälle ereignen sich in Afrika, insbesondere bei Kindern im Alter bis zu fünf Jahren (Butler, 2002 und WHO unter <http://www.euro.who.int/>). In einer WHO-unabhängigen Studie wurde ermittelt, dass diese Zahlen weitaus höher liegen (Snow *et al.*, 2005). So sollen im Jahre 2002 weltweit 2,2 Milliarden Menschen einer Malariainfektion ausgesetzt gewesen sein, aus denen sich 515 Millionen klinische Fälle ergeben haben. Dies entspricht einer Erhöhung gegenüber den von der WHO herausgegebenen Zahlen der klinischen Fälle um 50% in und um 200% außerhalb Afrikas (Snow *et al.*, 2005). In Anbetracht dieser Lage ist eine rationale Medikamenten- und Vakzineentwicklung dringend notwendig. Ein Meilenstein auf diesem Weg ist die vollständige Sequenzierung des *P. falciparum* Genoms (Butler, 2002; Gardner *et al.*, 2002 und 2002b; Carlton *et al.*, 2002; Hyman *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 2002), die Untersuchung und Annotierung des Transkriptoms (Le Roch *et al.*, 2003, Bozdech *et al.*, 2003) und die Analyse des Proteoms (Lasonder *et al.*, 2002; Florens *et al.*, 2002) des Krankheitserregers. Die gleichzeitige Zugangsmöglichkeit zu diesen Informationen mit Hilfe einer online Datenbank (<http://www.plasmodb.org>) hat und wird in der Zukunft noch viel dazu beitragen, die Biologie des Parasiten besser zu verstehen und damit hoffentlich die Entwicklung neuer Medikamente und Impfstoffe beschleunigen. In den letzten Jahren wurden mehrere Schwerpunktprogramme ins Leben gerufen (z.B. „Roll back Malaria“ der WHO [<http://www.rbm.who.int>],

„International Multilateral Initiative on Malaria“ des NIH [<http://www.mim.nih.gov>] und die „Public Health Foundation“ von Bill und Melinda Gates [<http://www.gatesfoundation.org/globalhealth>]). Sie alle haben das gemeinsame Ziel die Malaria Todesrate bis zum Jahr 2010 um 50% zu senken.

2.1.1 Pathophysiologie

Das klinische Ausmaß einer Malariainfektion wird von mindestens drei Faktoren beeinflusst: 1) Dem Parasiten, 2) dem Wirt und 3) den geographischen, bzw. sozialen Gegebenheiten eines Gebietes. Zu 1) Die Virulenz eines Parasiten unterscheidet sich durch Faktoren wie Zytoadhärenz, Multiplikationsrate, Medikamentenresistenz, bevorzugter Invasionsweg, antigene Varianz und Polymorphismus. Zu 2) Die Anfälligkeit des Wirtes wird u.a. durch Alter, genetische Eigenschaften (z.B. Sichelzellanämie, Thalassämie), vorhandene Schwangerschaft und (Teil-) Immunität gegen den Parasiten, Ko-Infektionen (z.B. HIV) und einhergehende Immunsuppression (z.B. AIDS) definiert (Abu Raddad *et al.*, 2006; Van Geertruyden *et al.*, 2006). Zu 3) Die geo-sozioökonomischen Eigenschaften spielen eine große Rolle beim klinischen Verlauf einer Malariainfektion und werden von der Transmissionshöhe und -Intensität, der Zugänglichkeit zu Medikamenten, kulturellen Faktoren und der (lokalen) politischen Lage beeinflusst.

Die eigentliche Pathophysiologie wird durch die Vermehrung der Parasiten in den Erythrozyten, die anschließende Zerstörung der Erythrozyten und durch die einsetzende Immunantwort des Menschen bestimmt. Die Symptome einer Malariainfektion sind hohe (periodische) Fieberschübe, Schüttelfrost, Krämpfe, Blutsepsis und Veränderungen des Blutbildes. Besonders bei Kindern kann die Krankheit rasch zum Koma und zum Tode führen. Dabei spielen Toxine (z. B. bestimmte Phospholipide, GPI) eine wichtige Rolle, da sie zur Freisetzung von Zytokinen führen. Zytokine sind u.a. für die Entwicklung von Fieber und einer Absenkung des Blutzuckerspiegels (Hypoglykämie) verantwortlich. Der Stoffwechsel des Parasiten kann, zusätzlich zur Zytokinwirkung und verbunden mit einer Hypoglykämie, zu einer metabolischen Übersäuerung des Körpers (Laktatazidose) führen. Bei hoher Parasitenanzahl kann sich durch die Lyse der roten Blutkörperchen, dem vermehrten Abbau von infizierten Erythrozyten durch die Milz und eine durch die Zytokinfreisetzung einsetzende Hemmung der Erythropoese im Knochenmark (insbesondere durch den Tumornekrosefaktor-Alpha, TNF α) eine starke Anämie ausbilden.

Im Falle einer Malaria tropica (Infektion durch *P. falciparum*) kann es zu weiteren Komplikationen kommen. Die Adhäsion infizierter Erythrozyten an spezifischen Rezeptoren von Endothelzellen und uninfizierten Erythrozyten (diese Vorgänge werden als Sequestration und Rosettenbildung bezeichnet) können zu einer Verstopfung feiner Kapillaren im Gehirn und damit zu einer lokalen Sauerstoff-Unterversorgung mit schwerwiegenden Folgen (z.B. metabolisches Koma) führen. Auch in anderen Organen wie Herz, Lunge, Nieren und viszerale Organen kann es durch lokale und systemische Freisetzung von entzündungsauslösenden Molekülen (z.B. TNF) zu direkten und indirekten Folgen von Sequestration kommen. Die damit zusammenhängende Organunterversorgung kann insbesondere bei Kindern fatale Auswirkungen haben.

2.1.2 Medikamente, Vektorbekämpfung und Vakzine

Bis ins 17. Jahrhundert war eine Therapie der Malaria in der westlichen Welt nicht möglich. Erst dann wurde die therapeutische Wirkung von Chinin, ein Wirkstoff aus der Rinde der *Cinchona* (Chinarindenbaum), entdeckt. Die botanische Bezeichnung *Cinchona* geht auf eine angeblich erfolgreiche Heilung der Gräfin von Cinchon zurück, die 1639 erkrankte und durch ein Mittel, was Extrakte der Chinarinde enthielt, geheilt wurde. Der (neben Chinidin enthaltene) Wirkstoff Chinin wurde erstmals im Jahre 1820 isoliert. Bis nach dem zweiten Weltkrieg hatte das aus der Rinde gewonnene Chinin eine große wirtschaftliche und medizinische Bedeutung, allerdings wurde wegen der relativ hohen Toxizität und niedrigen Wirksamkeit nach der Herstellung neuer, synthetischer Derivate verlangt. Das in den 30er Jahren entstandene Chloroquin (Resochin®) zeichnete sich durch gute Wirksamkeit bei geringer Toxizität aus und wurde zum vorherrschenden Malariamittel der 50er und 60er Jahre. Der unkontrollierte Einsatz von Chloroquin führte bald darauf zur Ausbreitung von Chloroquin-resistenten Plasmodienstämmen, was im Hinblick auf fehlende oder suboptimale Ausweich- Therapeutika (wie z.B. Mefloquin [Lariam®] aufgrund seiner hohen Unverträglichkeit), schwerwiegende Folgen hatte und bis heute noch hat (Schlüter, 2006). Um weiteren Resistenzbildungen vorzubeugen, werden neue Wirkstoffe mittlerweile nur noch als Kombinationspräparate verabreicht, wie z.B. Atovaquon mit Proguanil in Malarone®. Die rasche Verbreitung von Chemotherapeutika-resistenten Parasitenstämmen, auch gegen Kombinationspräparate, hat zu multi-resistenten Plasmodienstämmen geführt, was die Entwicklung neuer Medikamente, oder eines Impfstoffes, dringend notwendig macht (Butler,

1997 und 2002).

Eine andere Möglichkeit der Malariabekämpfung ist die der Vektorkontrolle. In den 1940er Jahren galt DDT (kurz für 1,1- Bis [4- chlorphenyl]- 2,2,2- trichlorethan) in den USA als eine Wunderchemikalie gegen Schadinsekten aller Art. Es wurden tausende von Tonnen des Pestizids über Felder, Dörfer und Städte versprüht. Auch in Europa, Indien, Südamerika und Afrika vertraute die „Global Malaria Eradication Campaign“ auf dieses Mittel, mit dem Ergebnis, dass die USA 1949 Malaria-frei war und auch in den anderen Gebieten ein starker Rückgang der Infektionsraten zu beobachten war (Mandavilli, 2006). Leider blieb der Erfolg gerade in den am stärksten betroffenen Gebieten Lateinamerikas und Afrikas aufgrund von verschiedenen Faktoren, wie z.B. politische Instabilität oder fehlende Infrastruktur, im Vergleich zu dem der Industriestaaten aus. Unter Anderem entwickelten sich vor allem in Asien, Lateinamerika und Afrika DDT-resistente Mückenstämme, die Auslöser für erneute schwere Epidemien waren (Gilles, 1981). In den 70er Jahren startete eine Umweltkampagne gegen DDT. Sie machte auf langfristige Nebenwirkungen bei Mensch und Umwelt aufmerksam und bis zum heutigen Tag ist der Einsatz von DDT als Insektizid/Pestizid verboten. Mittlerweile wird wieder über einen Einsatz von DDT als Abwehrmittel gegen den Überträger *Anopheles* debattiert, mit dem Unterschied, dass es diesmal zum Imprägnieren von Zimmerwänden und nicht als flächendeckendes Insektizid eingesetzt werden soll (Mandavilli, 2006).

Eine erfolgreiche Vakzineentwicklung gegen Malaria ist trotz langjähriger Bemühungen bisher erfolglos geblieben. Die Invasion der Parasiten in die Wirtszelle (sowohl Sporoziten in die Hepatozyten, als auch Merozoiten in die Erythrozyten) ist ein schneller Prozess, was die extrazelluläre Phase des Parasiten sehr kurz hält und einer wirkungsvollen Immunantwort des Wirts entgegensteht. Hinzu kommen antigene Diversität und – Varianz, eine schnelle Re-Invasion neuer Erythrozyten durch den relativ kurzen Lebenszyklus und eine Inhibierung der T-Zell-Stimulation. Die Ausbildung einer sog. Teilimmunität ist äußerst langwierig und u.a. abhängig von einer konstanten Infektionsexposition und einem „erfahrenen“ Immunsystem, d.h. nur in Erwachsenen möglich. Schon saisonbedingte Veränderungen der Transmissionsintensität (z.B. Abklingen der Mückendichte am Ende der Trockenzeit) führen zu einem Verlust des immunologischen Gedächtnisses.

1967 konnte in einer Studie an Mäusen gezeigt werden, dass eine Vakzine aus γ -bestrahlten Sporoziten protektiven Schutz gegen eine Infektion mit lebenden Sporoziten bietet (Nussenzweig *et al.* 1967). Einige Jahre später konnte dasselbe Ergebnis an Menschen demonstriert werden (Clyde *et al.*, 1973; Rieckmann *et al.*, 1979). Der Nachteil ist, dass keine

lebenslange Immunität, sondern nur bis zu drei Monaten Schutz besteht. Gegenwärtig wird an der Aufklärung der molekularen Mechanismen einer protektiven Immunantwort und an der Identifizierung der dafür verantwortlichen Parasitenproteine gearbeitet (Hoffman *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2005).

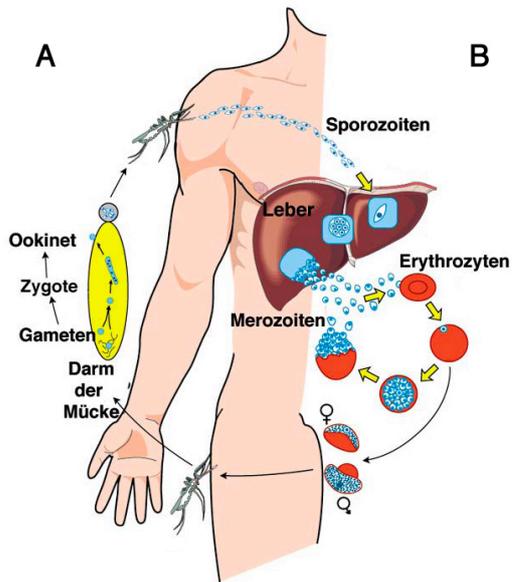
Im Jahr 2000 wurde eine Partnerschaft zwischen GlaxoSmithKline (GSK) Biologicals, der Universitätsklinik Barcelona, des Manhica Health Research Centre (CISM) und der PATH Malaria Vaccine Initiative (MVI) ins Leben gerufen, die derzeit eine der aufwendigsten Impfstudien im Kampf gegen die Malaria ausführt (Alonso *et al.*, 2006). Der Vakzine-Kandidat RTS,S/AS02A wurde speziell dafür entwickelt, eine Infektion durch *P. falciparum*-Sporozoitien zu verhindern. Er besteht aus einem rekombinant hergestellten Fusionsprotein eines Fragments von CSP (circumsporozoite protein) und einem Hepatitis-B Oberflächenantigen, in Kombination mit Immunstimulantien (Adjuvanz Monosphoryllipid A). In allen bisher durchgeführten Studien, in erster Linie bei Kindern unter 5 Jahren, erwies sich RTS,S/AS02A als sicher, gut verträglich und höchst immunogen. Hierbei zeigte sich, dass eine Impfung mit RTS,S/AS02A die Wahrscheinlichkeit einer Erstinfektion um 45%, einer klinische Erkrankung um 30% und einer Infektion mit Komplikationen um 58% reduziert. Es besteht allerdings wieder keine lebenslange Immunität, sondern nur bis zu 18 Monaten Schutz. In 2004 wurde die klinische Phase IIb „proof-of-concept“ abgeschlossen und der Weg für eine (finale) klinische Phase III eröffnet (Alonso *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2006).

2.2 Die Biologie des Parasiten

Systematisch gehören die *Plasmodium spp.* zur Ordnung der Hämosporidia, die zusammen mit den Coccidia (z.B. *Toxoplasma gondii*), Gregarinida und Piroplasmida den Stamm der Apikomplexa bilden (Storch und Welsch, 1994). Apikomplexa sind obligate Endoparasiten, die sich je nach Gattung intra- oder extrazellulär in einer Reihe unterschiedlicher Wirte entwickeln. Namensgebend für den Stamm ist ein elektronendichter Bereich am apikalen Pol der Zelle, der als Apikalapparat bezeichnet wird. In ihm sind eine Anzahl von Organellen zusammengefasst (sog. Rhoptrien, Mikronemen und Granula), die bei der Invasion von Wirtszellen eine wichtige Rolle spielen (vgl. Abschnitt 2.3.3 Sekretorische Organellen). Apikomplexa weisen einen haplohomophasischen Generationswechsel auf, der aus geschlechtlicher Fortpflanzung (Gamogonie) und ungeschlechtlichen Vielteilungen

(Sporogonie und/oder Schizogonie) besteht. Der Generationswechsel ist an einen Wirtswechsel geknüpft. Hauptwirt von *Plasmodium* sind Stechmücken der Gattung *Anopheles*. Die ungeschlechtliche Lebensphase im Menschen fängt mit dem Stich einer infizierten *Anopheles* Mücke an, wobei Sporozoiten aus der Speicheldrüse der Mücke in subkutanes Gewebe oder direkt in die Blutbahn des Menschen gelangen (Abb. 1). Ihr erstes Ziel ist die Leber. Sie dringen dort in Hepatozyten ein und durchlaufen eine Schizogonie. Daraus entstehen mehrere tausend Merozoiten, die in die Blutbahn entlassen werden. Merozoiten invadieren und entwickeln sich in den roten Blutkörperchen. Der Invasionsvorgang in die Erythrozyten ist komplex und noch nicht vollständig verstanden (Cowman und Crabb, 2006). Nach mehreren Wochen der „erythrozytären Schizogonie“ kommt es zur Ausbildung von Geschlechtsformen (Mikro- und Makrogamonten), die vom Hauptwirt aufgenommen werden müssen, um den Entwicklungszyklus des Parasiten zu schließen (Abb. 1). Im Darm der Mücke verwandeln sich die sexuell differenzierten Gamonten in Gameten um und entwickeln sich, nach der Befruchtung, aus der Zygote zum Ookinet. Dieser wandert aus dem Darmlumen ins Darmepithel ein und enzystiert sich dort. In der anschließenden Sporogonie entwickelt sich an der Darmaußenseite aus dem Ookineten eine Oozyste. Nach einer Reduktionsteilung werden tausende Sporozoiten entlassen. Diese gelangen über die Hämolymphe zur Speicheldrüse der Mücke und während einer Blutmahlzeit zusammen mit dem blutgerinnungshemmenden Speichel zurück in den Menschen.

Abb. 1 Lebenszyklus von *P. falciparum*



A) Sexuelle Lebensphase in *Anopheles spp.*: Durch die Blutmahlzeit werden Mikro- und Makrogamonten in die Mücke aufgenommen und wandeln sich im Darm in Gameten um. Es kommt zur Befruchtung und Zygotenbildung. Diese wandelt sich in einen Ookineten und anschließend in eine Oozyste um, woraus zahlreiche Sporozoiten entlassen werden und in die Speicheldrüse der Mücke wandern. Mit dem Speichel der Mücke gelangen Sporozoiten bei der Blutmahlzeit in den Blutkreislauf des Menschen. **B)** Asexuelle Lebensphase im Menschen: Sporozoiten dringen zunächst in die Leber ein und entwickeln sich über ungeschlechtliche Vielteilungen zu Merozoiten

(hepatozytäre Schizogonie). Diese invadieren und entwickeln sich in Erythrozyten, aus denen, unter Zerstörung der Wirtszelle, weitere invasive Merozoiten hervorgehen (erythrozytäre Schizogonie). Einige Merozoiten bilden Geschlechtsformen aus, die von der Mücke aufgenommen werden müssen, um den Zyklus zu schließen. Diese Abbildung wurde von Prof. A. Cowman zur Verfügung gestellt.

Die erythrozytäre Entwicklung dauert bei *P. falciparum* ungefähr 48 Stunden. Der Parasit durchläuft dabei eine Reihe unterschiedlicher Stadien (Abb. 2).

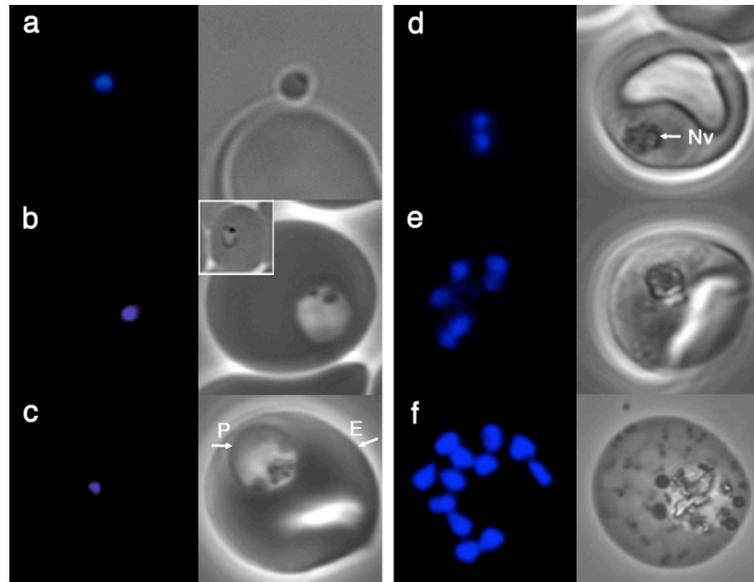


Abb. 2 Erythrozytärer Lebenszyklus von *P. falciparum*

Während der ungeschlechtlichen Entwicklung durchläuft der Parasit unterschiedliche Stadien. Der Merozoit ist die invasive Form des Parasiten (a). Nach Eintritt in den Erythrozyten entwickelt sich der Parasit über das Ringstadium (b) zum Trophozoiten (c). Durch den Hämoglobin-Abbau fällt unlösliches Hämozoin an, was in der Nahrungsvakuole gespeichert wird (d). Im Laufe der Schizogonie können sich 16-32 Tochtermerozoiten ausbilden, die unter Zerplatzen des Erythrozyten in die Blutbahn entlassen werden (e-f). E: Erythrozyt, P: Parasit, Nv: Nahrungsvakuole, 2b kleines Bild: Giemsa gefärbte Parasiten sehen unter dem Lichtmikroskop wie ein Siegelring aus. In blau: Zellkerne mit DAPI gefärbt.

Neben den invasiven und extrazellulären Merozoiten unterscheidet man Ringstadien, Trophozoiten und Schizonten, wobei Ringstadien genau genommen kein eigenes Stadium darstellen, sondern eine "Ringform" des Trophozoiten sind (Bannister *et al.*, 2000). Dieses Stadium wird deshalb als Ring bezeichnet, weil Giemsa-gefärbte Parasiten unter dem Lichtmikroskop wie ein Siegelring aussehen (Abb. 2b kleines Bild; Bannister *et al.*, 2000). Der Übergang zum Trophozoiten ist willkürlich gesetzt und abhängig von Form und Größe des Parasiten. Die Oberfläche von *P. falciparum* in diesem Stadium wächst ungleichmäßig heran und bildet tubuläre Invaginationen aus, die ins Wirtszytoplasma reichen. Durch das Zytostom wird umgebendes Wirtszytoplasma in die Zelle aufgenommen und in der Nahrungsvakuole verdaut. Durch den Hämoglobin-Katabolismus fallen toxische

Eisenderivate an, die in unlösliche Hämazoin-Kristalle umgewandelt und gespeichert werden. Hämoglobin-Abbau findet noch bis ins späte Schizonten-Stadium statt, bis nahezu das gesamte Wirtsprotein aufgebraucht ist. Ein Schizont ist ein intraerythrozytärer Parasit, der sich wiederholenden Kernteilungen unterzieht oder schon unterzogen hat (Bannister *et al.*, 2000). Es schnüren sich bis zu 32 invasive Tochtermerozoiten im Schizonten ab und werden unter Zerstörung des Erythrozyten in die Blutbahn entlassen.

P. falciparum ist in der Lage, die Oberfläche seiner Wirtszelle zu modifizieren. Im Trophozoiten-Stadium werden parasitäre Proteine sekretiert, die charakteristische „knobs“ ausbilden, welche eine rezeptorvermittelte Zytoadhärenz an Endothelzellen verursachen, was zur zerebralen Manifestation der Malaria führen kann (vgl. Abschnitt 2.1.1) . Der Parasit sichert sich dadurch gegen eine vorzeitige Ausschleusung durch die Milz.

2.3 Die Zellbiologie des Parasiten

Eukaryotische Zellen besitzen eine Vielzahl von membranumschlossenen, subzellulären Funktionseinheiten, die als Organellen bezeichnet werden. Die damit einhergehende funktionale Kompartimentierung ermöglicht es der Zelle biochemische bzw. nicht-kompatible Stoffwechselwege zeitgleich nebeneinander herlaufen zu lassen. Zellkern, endoplasmatisches Retikulum, Golgi Apparat und verschiedenste Vesikel (Endosome, sekretorische Vesikel) sind Komponenten der subzellulären Ausstattung einer eukaryotischen Zelle.

2.3.1 Das endoplasmatische Retikulum

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein komplexes und dynamisches Membransystem aus Netzwerken von Röhren, Zisternen und Tubuli. Es ist Ort der Translokation, Integration, Faltung und Modifizierung von Proteinen, sowie der Phospholipid- und Steroidbiosynthese. Im Lumen der Organelle wird Kalzium gespeichert und die Ausschüttung von Ca^{2+} Ionen ins Zytoplasma reguliert. Das ER lässt sich strukturell und funktional in verschiedene Regionen unterteilen: rauhes ER (rER), glattes ER (sER), transitorisches ER (tER) und Kernhülle. Das rER ist mit zahlreichen Ribosomen besetzt, was ihm seine charakteristisch „rauhe“ Struktur gibt, und kommt in allen eukaryotischen Zellen vor, die eine Proteinsynthese betreiben (Shimizu und Hendershot, 2007). Sekretorische Proteine mit einem Signalpeptid werden ko-

translational in das Lumen des ERs transportiert, während Membranproteine mit Signalanker oder internem Signalpeptid in die ER-Membran integriert werden (Spiess, 1995). Das rER geht in das ribosomenfreie, glatte sER (s für smooth) über, wo u.a. die Lipidbiosynthese stattfindet (Baumann und Walz, 2001). Das Verhältnis von rER zu sER in einer Zelle ist abhängig von Zelltyp und –aufgabe. Von Ribosomen besetztes ER kommt vorwiegend bei sekretorischen Zellen, z.B. in der Bauchspeicheldrüse von Organismen vor, während das sER in Leberzellen (zur Detoxifikation) oder in Muskelzellen (zur Kalziumspeicherung) stark ausgeprägt ist (Shimizu und Hendershot, 2007). Eine spezialisierte Subdomäne des sERs ist das transitorische ER (tER; auch ER „exit sites“ [ERES] genannt). ERES sind spezialisierte, Export-kompetente Regionen, die durch das Vorkommen von Hüllproteinen der COPII Untergruppe (vgl. nächster Abschnitt) definiert werden (Kühn and Schekman, 1997). Die ER-Membran geht direkt in die Kernmembran über und wird deshalb auch als „perinukleäre“ Hülle bezeichnet. Ein Austausch von RNA und Protein zwischen Zytosol und Nukleus findet über sog. Kernporen statt (Heese-Peck und Raikhel, 1998).

Sekretorische Proteine werden „standardmäßig“ aus dem ER zur Plasmamembran hin transportiert (Pfeffer und Rothman, 1987). Die Primärsequenz zahlreicher löslicher ER-Proteine besitzt ein Signal, was ihnen ermöglicht im Organell zu verbleiben. Man unterscheidet Retentionssignale von einem rezeptorvermittelten Rücktransport (engl. retrieval), wobei ersteres Proteine durch ein Ausschlussverfahren (z.B. durch Transmembrandomänen und ihre flankierenden Regionen oder Oligomerisationen von Domänen; Nilsson *et al.*, 1994) davon abhält, in Transportvesikel verpackt und so weitertransportiert zu werden; letzteres vermittelt einen Rücktransport aus sekretorisch stromabwärts gelegenen Organellen zurück ins ER (Nilsson und Warren, 1994). Die für einen Rücktransport zuständigen Rezeptoren müssten zwischen zwei Kompartimenten pendeln: aus dem Zuständigkeitsbereich des Rezeptors zum eigentlichen Standort des entkommenen Proteins. Luminale ER-Proteine besitzen an ihrem C-Terminus eine vier-Aminosäure-Abfolge (XDEL), mit denen ein Rücktransport aus post-ER Kompartimenten vermittelt wird (Rothman, 1981; Munro und Pelham, 1997). Der dazugehörige XDEL- Rezeptor ERD2 wurde in zahlreichen Organismen identifiziert und charakterisiert (Lewis *et al.*, 1990; Semenza *et al.*, 1990; Lewis und Pelham, 1990; Tang *et al.*, 1993).

Der Transport von Proteinen aus dem ER in den Golgi Apparat, bzw. in die „exozytotische Laufbahn“ einer Zelle, beginnt an den ER exit sites (Bannykh *et al.*, 1996). Je nach Zelllinie und Gewebe, beschränken sich Export-kompetente Regionen auf definierte, dem *cis*-Golgi gegenüberliegenden Bereich des ER, oder kommen im gesamten Zytoplasma auch in

größeren subzellulären Entfernungen zum Golgi Apparat vor (Palade, 1975; Bannykh *et al.*, 1996). Rossanese *et al.* (1999) konnten in Hefezellen zeigen, dass die Morphologie der ERES einen Einfluss auf die Morphologie des Golgi Apparates hat. So besitzt *Pichia pastoris* definierte ERES gegenüber dem *cis*-Golgi. In Anlehnung an ihre Hypothese weist der Golgi-Apparat eine klassisch gestapelte, polarisierte Struktur auf. In *Saccharomyces cerevisiae* hingegen schnüren sich COPII-umhüllte Transportvesikel über die gesamte ER-Membran ab und es kommen einzelne, ungestapelte Golgi-Zisternen im gesamten Zytoplasma verstreut vor.

Das „immunoglobulin binding protein“ (BiP) ist ein Chaperon im Lumen des ER und ist an der Faltung sekretorischer Proteine nach deren ko-translationalen Insertion beteiligt. Es gehört zur Familie der „heat shock“ Proteine (hsp), die als Reaktion auf Umwelteinflüsse (z.B. Temperaturerhöhung oder Einwirkung von Schwermetallen) vermehrt von der Zelle produziert werden (Kumar *et al.*, 1991). Ebenfalls ein Mitglied dieser Proteinfamilie sind sog. „glucose related proteins“ (grp), die als Antwort auf Glukose- oder Sauerstoffmangel synthetisiert werden. Sie kommen im Zytoplasma und Nukleus (hsp70), sowie im Lumen des ER vor (grp78). Zusätzlich zu Stress-bedingten Stoffwechselprozessen wird die Beteiligung an der Faltung, Zusammensetzung und Sortierung sekretorischer Proteine postuliert.

P. falciparum besitzt einen klassischen sekretorischen Transportweg. Der Eintritt wird Proteinen mit N-terminalen Signalpeptiden gewährt, die im Lumen des ERs von spezifischen Endopeptidasen abgespalten werden (Waller *et al.*, 2000). Fehlen (vom Signalpeptid abgesehen) den sekretorischen Proteinen weitere Sequenzinformationen, werden die Proteine aus dem ER, entlang des exozytotischen Flusses in die parasitophore Vakuole, bzw. deren Membran gebracht (Waller *et al.*, 2000). Ein ERD2-abhängiger Rücktransport von entkommenen löslichen ER Proteinen ist in *P. falciparum* beschrieben worden (Elmendorf und Haldar *et al.*, 1993). Ausserdem konnte PfBiP identifiziert, kloniert und lokalisiert werden (Kumar *et al.*, 1991 und 1992).

2.3.2 Der Golgi Apparat

Der Golgi Apparat ist nach Camillo Golgi (1843-1926) benannt und ist das zentrale Organell des sekretorischen Transportweges. Im Zuge dessen werden Proteine modifiziert, prozessiert und sortiert (Short *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Morphologisch betrachtet besteht der Golgi aus einer Reihe abgeflachter Membranstapel, die funktional in drei Regionen unterteilt

werden können: *cis*-Golgi (Eintrittsregion für ER-Proteine), der mediale Bereich und *trans*-Golgi (Austrittsfläche für Proteine mit anderem Bestimmungsort; Rothman und Orci, 1992; Becker und Melkonian, 1996; Wang *et al.*, 2005). Den jeweiligen Seiten vorausgeschaltet sind komplexe Netzwerke, die als *cis*-Golgi Netzwerk (CGN) und *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) bezeichnet werden. Am *cis*-Golgi werden Proteine aus dem ER aufgenommen, schrittweise von der *cis*- zur *trans*-Seite durch den Stapel transportiert und dabei O-glykosyliert, phosphoryliert, sulfatiert oder proteolytisch gespalten. Am *trans*-Golgi werden fertige Proteine anhand vorhandener Sortiersignale spezifisch in Transportvesikel verpackt und zu ihren endgültigen Bestimmungsorten gebracht, bei fehlenden Sortiersignalen exozytotisch im „Massenstrom“ zur Plasmamembran geführt. Jede Zisterne ist durch eine individuellen Enzymkomposition charakterisiert und es wird vermutet, dass dieser geordneten Kompartimentstruktur eine optimale Leistungsfähigkeit, Transportgeschwindigkeit und -Effizienz zugrunde liegen (Wang *et al.*, 2003). Form und Anzahl der Zisternen können nicht nur in verschiedenen Organismen variieren, sondern sich auch innerhalb eines Organismus in unterschiedlichen Geweben unterscheiden. Tierische Zellen können mehrere Golgi Stapel in einer Zelle besitzen, von denen die Zisternen verschiedener Stapel miteinander in Verbindung stehen. Die Zisternenenden sind teilweise erweitert, so dass von einer „Golgi-Schleife“ (engl. Golgi ribbon) die Rede ist. Das Organell ist größtenteils in der Nähe des Kerns lokalisiert, was ebenfalls charakteristisch für tierische Zellen ist. In Pflanzen hingegen sind Golgi Stapel frei im Zytoplasma verteilt und die Zisternen verschiedener Stapel stehen nicht miteinander in Verbindung. Beispiele morphologisch unterschiedlicher Golgi Apparate sind in Abb. 3 dargestellt. Ebenfalls abgebildet ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme des Golgi Apparates einer tierischen Zelle, in der filamentöse Brücken zwischen verschiedenen Zisternen sichtbar ist (Abb. 3c; Franke *et al.*, 1972; Cluett und Brown, 1992).

Vor einigen Jahren wurde das GRASP Protein (engl. für **G**olgi **R**e-**A**ssembly **S**tacking **P**rotein) als Hauptbestandteil interzisterner Brückenbildung und Brefeldin A (BFA) -resistenten Golgi Matrix identifiziert und charakterisiert (Barr *et al.*, 1997; Barr *et al.*, 1998; Shorter *et al.*, 1999; Seemann *et al.*, 2000). GRASP gehört zur Familie der „coiled-coil“ Proteine, deren Hauptstrukturmerkmal die Ausbildung von langen, spirillenförmig aufgedrehten Proteininteraktionsdomänen ist (Burkhard *et al.*, 2001). Es sind periphere Membranproteine, die über Myristat an der Golgi-Membran verankert werden. Sie sind relativ gut konserviert und kommen in den meisten eukaryotischen Zellen, nicht aber in Pflanzen vor. Säugetiere besitzen zwei GRASP Proteine, die sich anhand ihres Molekulargewichtes unterscheiden (Barr *et al.*, 1997; Shorter *et al.*, 1999). GRASP65 ist an *cis*-Golgi Membranen

lokalisiert und interagiert mit dem Vesikelbindungsfaktor („vesicle tethering factor“) GM130 (Barr *et al.*, 1998). GRASP55 lokalisiert an medialen Golgi-Kompartimenten und interagiert mit dem Vesikelbindungsfaktor Golgin45 (Shorter *et al.*, 1999).

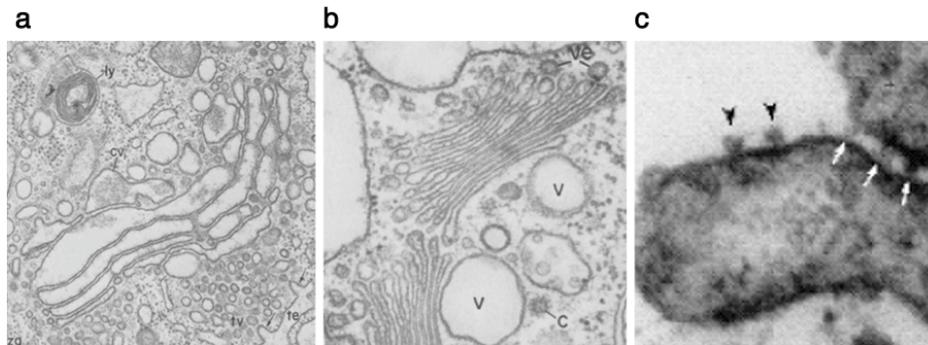


Abb. 3 Morphologische Unterschiede des Golgi Apparates

a) Der Golgi Apparat aus der Bauchspeicheldrüse eines Meerschweinchens. Es sind 4-5 Zisternen vorhanden, die leicht erweiterte Seiten besitzen. **b)** Ein Golgi Apparat (auch Dictyosom genannt) der Grünalge *Chlamydomonas*. Es sind zwei Stapel mit je 9 Zisternen zu sehen. Beide Abbildungen wurden aus Farquhar und Palade (1981) entnommen. **c)** Visualisierung proteinöser Brücken zwischen Golgi Zisternen (Pfeile). Diese Abbildung wurde aus Cluett und Brown (1992) entnommen.

GRASP hat eine klare Domänstruktur. Der N-terminale Bereich ist nicht nur zwischen GRASP55 und 65, sondern auch zwischen GRASP Proteinen unterschiedlicher Organismen gut konserviert. Innerhalb dessen liegt die Proteininteraktionsdomäne, die nicht nur eine Interaktion mit jenen Vesikelbindungsfaktoren erlaubt, sondern auch die Fähigkeit vermittelt, *trans*-Oligomere auszubilden (Barr *et al.*, 1998). *Trans*-Oligomere zwischen GRASP Proteinen unterschiedlicher Zisternen führen zu der charakteristisch gestapelten Struktur eines Golgi Apparates. Der weniger gut konservierte C-Terminus ist angereichert an Serin und Prolin, welche bei einsetzender Mitose von Kinasen phosphoryliert werden. Dadurch kommt es zur Inhibierung der Oligomerisierung und führt zur „Entstapelung“ bzw. Fragmentierung des Golgi Apparates (Wang *et al.*, 2003). Nach der Zellteilung ermöglicht eine Dephosphorylierung des C-Terminus eine Wiederausbildung der Oligomere und dadurch eine Re-Stapelung der Zisternen.

Bei Protisten ist vergleichsweise wenig über den sekretorischen Transportweg und den Golgi Apparat bekannt. *Toxoplasma gondii* ist ein enger Verwandter von *Plasmodium* und besitzt einen Golgi Apparat mit klassisch eukaryotischer Morphologie (Joiner und Roos, 2002; Pelletier *et al.*, 2002). Golgi-Markerproteine wie z.B. GRASP55 und N-

Acetylglucosaminyltransferase I, (NAGT I; ein Enzym was an der Glykosylierung von Proteinen beteiligt ist) wurden mit fluoreszierenden Reporterproteinen markiert und über den gesamten Lebenszyklus hindurch verfolgt. Die Biogenese des Golgi Apparates konnte so in der lebenden Zelle visualisiert werden (Pelletier *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zum wohl definierten und klassischen Golgi-Apparat von *T. gondii* wurde ein ungewöhnliches Membransystem in *Giardia intestinalis*, einem anderen protozoischen Parasiten, beschrieben (Marti *et al.*, 2003 und 2003b). *Giardia spp.* gelten als phylogenetisch „ursprüngliche“ Organismen mit einer stark vereinfachten zellulären Struktur. Ihr „fehlen“ neben einem klassischen Golgi-Apparat z.B. auch Mitochondrien und Peroxisomen, Organellen die typisch für höhere Eukaryoten sind (Adam, 1991). Im Unterschied zu *Toxoplasma* und *Giardia* werden Morphologie, Organisation, Funktion und sogar Lokalisation des Golgi Apparates in *P. falciparum* kontrovers diskutiert (Lingelbach, 1993, 1997; Elmendorf und Haldar, 1993b; Banting *et al.*, 1995; Mattei *et al.*, 1999; Bannister *et al.*, 2000). Umfangreiche elektronenmikroskopische sowie immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an fixiertem Parasitenmaterial ergaben bisher kein schlüssiges Bild (Aikawa, 1971; Elmendorf und Haldar, 1993; Van Wye *et al.*, 1996, Albano *et al.*, 1999, Adisa *et al.*, 2001 und 2002).

2.3.3 Die sekretorischen Organellen

Merozoiten sind die invasive Form der erythrozytären Parasiten (Abb. 4A). Sie besitzen an ihrem apikalen Pol sekretorische Organellen, die bei der Invasion von Erythrozyten eine essentielle Rolle spielen. In ihnen sind die paarigen Rhoptrien, zahlreiche Mikronemen und elektronendichte Granula („dense granules“) zusammengefasst. Sie unterscheiden sich durch Form, Funktion, Inhalt und Rolle bei der Invasion (Bannister *et al.*, 2003). Die Organellen entwickeln sich erst spät in den jeweiligen Lebensphasen und kommen ausschließlich in den invasiven Stadien (bzw. auch bereits in reifen Schizonten) vor.

Die Invasion basiert auf dem zeitlich koordinierten Zusammenspiel von Protein-Protein-Interaktionen zwischen parasitären Proteinen und Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle. Es ist ein komplexer Vorgang, der noch nicht vollständig verstanden ist (Cowman und Crabb, 2006). Man unterscheidet vier Phasen (Abb. 4B): 1. Erkennung und erste reversible Interaktion zwischen Oberflächenproteinen des Merozoiten und des Erythrozyten, 2. Re-Orientierung des Parasiten, so dass das apikale Ende der Wirtszelle zugekehrt ist, 3. „Tight

junction“ (bzw. Brücken-) Formation, wobei eine stabile Verbindung zwischen Parasiten- und Wirtsmembran hergestellt wird. Hier formt sich eine sog. parasitophore Vakuole. Sie ist eine Invagination der Wirtsmembran und durch parasitäre Proteine modifiziert, 4. Eintritt des Parasiten in den Erythrozyten und „Versiegelung“ der parasitophoren Vakuole.

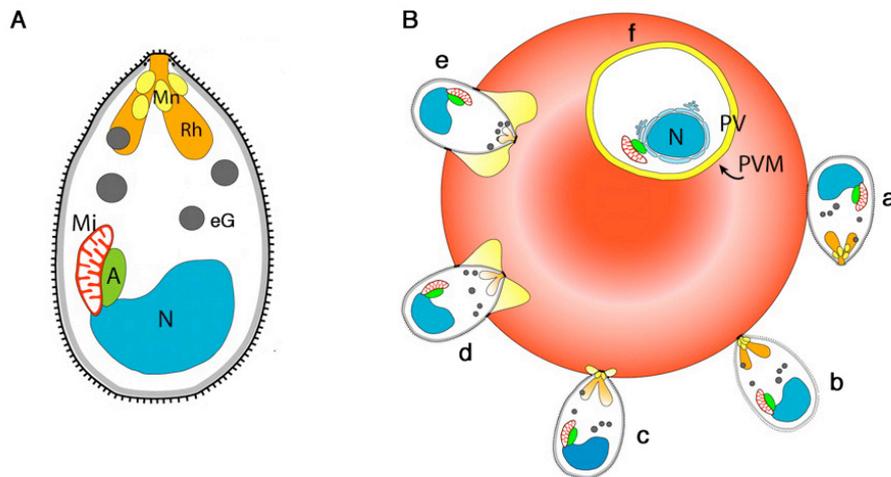


Abb. 4 Schemazeichnung eines Merozoiten und der Invasion

A) Mikronemen besitzen an ihrem apikalen Pol einen Penetrationsapparat. Es besteht aus paarigen Rhoptrien, zahlreichen Mikronemen und elektronendichten Granula.

B) Der Invasionsvorgang beginnt mit der reversiblen Interaktion zwischen Parasit und Wirtszelle (a). Der Parasit re-orientiert sich bildet eine „tight junction“ an der Kontaktstelle (b). Unter Eintritt des Merozoiten in den Erythrozyten schiebt sich die „tight junction“ am Parasiten entlang (c-e). Nach vollständiger Invasion wird die Eintrittsstelle versiegelt und der Parasit ist von einer parasitophoren Vakuole umgeben (f). A: Apikoplast, eG: elektronendichte Granula, Mi: Mitochondrium; Mn: Mikronemen; N: Nucleus; PV: parasitophore Vakuole; PVM: parasitophore Vakuolenmembran; Rh: Rhoptrien.

Diese Abbildung wurde aus Marti *et al.* (2005) entnommen.

An der Invasion beteiligte Proteine werden je nach Funktion (und zeitlichem Bedarf) in unterschiedlichen Kompartimenten untergebracht. Im *Plasmodium*-verwandten Erreger *Toxoplasma gondii* konnte gezeigt werden, dass die Proteinausschüttung aus den sekretorischen Organellen zeitlich kurz hintereinander folgt: Zuerst entleeren sich die Mikronemen, kurz darauf die Rhoptrien und nach vollzogener Invasion die Granula (Kats *et al.*, 2006; Carruthers und Sibley, 1997).

Mikronemen sind membranumhüllte, ovale Strukturen, die (je nach Spezies) mehr oder weniger zahlreich im apikalen Bereich vorkommen. Hier werden adhäsive Proteine, wie z.B. das „apical membrane antigen 1“ (AMA-1) und das „erythrocyte binding antigen 175“ (EBA-

175) gelagert, die eine Verbindung zwischen Wirtszelle und Parasiten herstellen. Die erste reversible Interaktion zwischen Parasit und Wirt führt über einen Kalzium-Ausstoß zur Entleerung der Mikronemen in den Apex des Parasiten (Carruthers und Sibley, 1991; Carruthers *et al.*, 1999). Das Protein AMA-1 ist zum einen für die Re-Orientierung der Parasiten nach initialer Bindung an die Erythrozyten verantwortlich, zum anderen auch, über einen unbekanntem Mechanismus, direkt am Invasionsvorgang beteiligt (Bannister *et al.*, 2003; Kats *et al.*, 2006). Die EBA-Proteinfamilie (z.B. EBA-140/165/175/181) ist einer der best untersuchten Liganden von *Plasmodium*. Sie werden zunächst in den Mikronemen gelagert und gelangen bei der Invasion auf die Oberfläche der Merozoiten. Über ihre adhäsiven Domänen binden EBAs mit hoher Affinität an die Sialinsäure bestimmter Glykoproteine der Erythrozytenoberfläche (Sim *et al.* 1990; Adams *et al.*, 2001; Thompson *et al.* 2001; Gilberger *et al.* 2003; Chattopadhyay *et al.*, 2006). Unterschiede der EBAs innerhalb ihrer Proteinfamilie manifestieren sich anhand ihrer Größe (175, 181, und 140 stehen für ihre jeweiligen atomare Massen in Da) und Bindungseigenschaften, die auch ihre biologische Funktion ausmachen. Während EBA-175 vornehmlich mit Glykophorin A interagiert, bindet EBA-140 an Glykophorin C und EBA-181 an einen noch unbekanntem Bindungspartner (Orlandi *et al.* 1992; Maier *et al.* 2003; Gilberger *et al.* 2003). Der Parasit ist durch seine multiplen Liganden in der Lage, unterschiedliche Oberflächenproteine der Erythrozyten zu benutzen und verfügt damit über eine Anzahl redundanter Invasionswege (Duraisingh *et al.*, 2003; Baum *et al.*, 2005). Bislang sind 12 Mikronemenproteine identifiziert und charakterisiert worden, es wird allerdings vermutet, dass die Anzahl vorhandener Adhäsionsproteine noch weitaus höher liegt.

Rhoptrien sind membranumhüllte, birnenförmige Organellen, deren röhrenförmigen Kanäle am extremen apikalen Ende der (formenden) Merozoiten ineinander zusammenlaufen (Kats *et al.*, 2006; Bannister *et al.*, 2000). Sie entleeren ihren Inhalt erst, nachdem eine stabile Verbindung zwischen Wirtsrezeptor und Parasitenligand besteht, und sind maßgeblich an Aufbau und Formation der parasitophoren Vakuole beteiligt. Viele der zahlreichen Rhoptrienproteine, wie z.B. das „rhoptry associated membrane antigen“ (RAMA) und „rhoptry associated protein“ (RAP), werden über Glykosylphosphatidylinositol-Anker (kurz: GPI) an der Merozoitenoberfläche verankert (Cowman und Crabb, 2006). Vermutlich liegt auch hier die Anzahl der bekannten Rhoptrienproteine weit unterhalb der tatsächlich vorhandenen.

Elektronendichte Granula sind sphärische Organellen, die im Gegensatz zu den Rhoptrien und Mikronemen nicht nur im apikalen Bereich des Merozoiten, sondern im Gesamtbereich der

Parasitenzelle vorkommen. Funktionale Erkenntnisse konnten bisher hauptsächlich bei *Toxoplasma gondii* gewonnen werden. Unter anderem konnte hier gezeigt werden, dass die Granula ihre Proteine erst nach vollständiger Invasion und Ausbildung der parasitophoren Vakuole sezernieren (Carruthers and Sibley, 1997). Es sind in *Toxoplasma* zahlreiche Granula-Proteine bekannt (GRA 1-9). Entweder erhöhen sie die Permeabilität der parasitophoren Vakuolenmembran und beteiligen sich an der Durchschleusung kleiner Moleküle (GRA 4-8), oder sind mehr oder weniger fest mit dem membranösen Netzwerk der parasitophoren Vakuolenmembran assoziiert (GRA 2 und 3), oder kommen löslich in der Vakuole selbst vor (GRA-1; De Souza, 2005; Kats *et al.*, 2006). In *Plasmodium* ist das „ring-infected erythrocyte surface antigen“ (RESA) ein Beispiel für ein gut untersuchtes Granula-Protein (Culvenor *et al.*, 1991; Rug *et al.*, 2004). Es wird erst relativ spät im Lebenszyklus synthetisiert und in die Organellen transportiert. Während oder nach der Invasion gelangt RESA in den Erythrozyten und interagiert dort mit dem Zytoskelett der Wirtszelle (Culvenor *et al.*, 1991). Der stabilisierende Effekt könnte der Ausbesserung, bzw. Reparatur des Erythrozyten nach der Invasion dienen (Foley *et al.*, 1991; Da Silva *et al.*, 1994).

2.3.4 Der Apikoplast

Plastide sind membranumhüllte Organellen mit eigenem Genom. Die photosynthetisch aktiven Plastiden reichen von den (grünen) Chloroplasten der Pflanzen und Grünalgen über die (roten) Rhodoplasten der Rotalgen zu den (goldbraunen) Chromoplasten von Algen, wie z.B. Diatomeen und Dinoflagellaten. Photosynthetisch inaktive Formen kommen z.B. in bestimmten unterirdischen pflanzlichen Geweben vor und sind u.a. als Leukoplasten oder Amyloplasten bekannt. Vor einiger Zeit fand man innerhalb der Apikomplexa ein Relikt eines Plastids, das „Apikoplast“ getauft wurde (Wilson *et al.*, 1994; McFadden *et al.*, 1996; Köhler *et al.*, 1997). Dieses photosynthetisch inaktive Organell ist essentiell für das Überleben des Parasiten. Trotz Zuordnung einiger bestimmter Stoffwechselwege ist die genaue Funktion noch unbekannt (Gardner *et al.*, 2002b; Ralph *et al.*, 2004). Der Apikoplast besitzt ein eigenes, zirkuläres Genom von 35 kb. Die Replikation erfolgt nach dem „rolling-circle-Mechanismus“, ähnlich wie in den Chloroplasten höherer Pflanzen (Wilson *et al.*, 1996; Williamson *et al.*, 2002). Das Genom des Apikoplasten ist im Vergleich zu dem der Chloroplasten (120-160 kb) durch den Verlust der photosynthetischen Gene stark reduziert. 60 der identifizierten 68 Gene kodieren ausschließlich für die eigene DNA-Replikation,

Transkription und Translation im Organell. Etwa 10% der im Kern kodierten Proteine werden post-translational in einem zielgerichteten Transport zum Apikoplasten gebracht (Gardner *et al.*, 2002b).

Alle Plastiden stammen aus einer Endosymbiose zwischen einem Cyanobakterium und einem Eukaryoten. Im Prozess der primären Endosymbiose wurde ein photoautotropher Prokaryot von einem phagotrophen Eukaryoten aufgenommen, aber nicht weiter verdaut (Gray, 1992). Es entstand eine Symbiose zwischen den Beteiligten. Sie hat aller Wahrscheinlichkeit nach ein einziges Mal in der gesamten Evolution stattgefunden (Liaud *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 2000). Plastide von Pflanzen, Glaukozystophyceen, Rot- und Grünalgen sind aus einer primären Endosymbiose entstanden. Sie werden von zwei Membranen umgeben und deshalb als "einfache" Plastide bezeichnet. Im Prozess der sekundären Endosymbiose nahm ein heterotropher Eukaryot einen phototrophen Eukaryoten auf, der schon aus vorangegangener (primärer) Endosymbiose ein einfaches Plastid besaß (Gibbs, 1978; McFadden, 1999). Die sekundäre Endosymbiose fand sowohl bei den Grün- als auch bei den Rotalgen unabhängig voneinander statt, allerdings ist noch ungeklärt, wie oft sie im Einzelnen stattgefunden hat (Archibald und Keeling, 2002). Plastide dieser Herkunft sind von mehr als zwei Membranen umgeben und werden deshalb als "komplexe" Plastide bezeichnet. In beiden Fällen verlor der Endosymbiont im Laufe der Koevolution seine Autonomie. Essentielle Gene wurden auf das Wirtsgenom übertragen, andere Gene gingen verloren oder wurden reduziert. Die Anzahl der umgebenden Membranen und das Vorkommen eines Nukleomorphs sind abhängig von Art und Ausprägung der Reduktion. Der Apikoplast von *P. falciparum* ist von vier Membranen umgeben und gehört zu den komplexen Plastiden.

Stoffwechselwege, die sich grundlegend zwischen Wirt und Parasit unterscheiden, sind hoffnungsvolle Kandidaten für eine rationale Medikamentenentwicklung. Eine gegen den Parasiten wirksame, aber für den Wirt unschädliche Therapie kann dadurch besser gewährleistet werden. Der prokaryotische Ursprung des Apikoplasten birgt für eine Reihe von Enzymen und Metaboliten, die sich stark von denen des Menschen unterscheiden und deshalb neue Angriffspunkte für Medikamente liefern. In den Chloroplasten von Pflanzen und Algen werden neben der Photosynthese Fettsäuren, Isoprenoide, Häm, Stärke und aromatische Aminosäuren produziert, von denen einige Metabolite, z.B. Fettsäuren, aus dem Organell ins Zytoplasma oder andere Kompartimente der Zelle transportiert werden. Im Genom des Apikoplasten von *P. falciparum* fand man wenig Aufschluss über die Funktion des Organells. Alle Proteine für die im Apikoplasten stattfindenden Vorgänge werden im Kern kodiert und post-translational in das Organell transportiert. Durch vergleichende bioinformatische

Sequenzanalysen mit „neural networks“, bzw. „prediction tools“ (Computerprogramme, die das putative Zielort eines Proteins vorhersagen) konnten potentielle Apikoplastproteine identifiziert und daraus gefolgert werden, dass neben der *de novo* Fettsäuresynthese (Waller *et al.*, 1998), eine Isoprenoidbiosynthese (Jomaa *et al.*, 1999), eine Hämbiosynthese (Surolia *et al.*, 1991) und ein ferredoxinabhängiger Elektronentransport (Vollmer *et al.*, 2001) im Apikoplasten stattfindet.

Als Beispiel für einen erfolgversprechenden Angriffspunkt für eine Medikamentenentwicklung ist die Isoprenoidbiosynthese zu nennen. Isoprenoide sind essentielle Stoffwechselprodukte aller Lebewesen. Zu ihren bekannteren Vertretern zählen Sterole, Carotinoide, Chlorophyll-Teilstrukturen und Terpene als Bestandteile ätherischer Öle. Der Aufbau von Isoprenoiden erfolgt aus Isopren-Einheiten, die wiederum aus dem C₅-Vorläufermolekül Isopentenylidiphosphat (IPP) und seinem Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) bestehen. Es gibt zwei verschiedene Stoffwechselwege, um die Isoprenoid-Vorläufermoleküle zu synthetisieren. Zum einen gibt es den sog. Mevalonat-abhängigen Weg, der in Tieren, Pilzen und einigen Bakterien stattfindet, und zum anderen den Mevalonat-unabhängigen (oder auch Deoxyxylulosephosphat, DOXP) Weg, der in den Plastiden von Pflanzen und Algen vorkommt. Jomaa *et al.* (1999) konnten zeigen, dass ein Mevalonat-unabhängiger Biosyntheseweg im Apikoplasten von *Plasmodium* stattfindet und dass sich eine Inhibierung des Stoffwechselweges durch das Antibiotikum Fosmidomycin letal auf *P. falciparum in vitro* und *P. vinckeii* im Mausmodell auswirkt. Gegenwärtig befindet sich Fosmidomycin in der klinischen Phase II und wird aufgrund von früh aufgetretenen Rezidiven nur noch in Kombination mit anderen Antibiotika eingesetzt. Die besten Resultate wurden in Kombination mit Clindamycin erzielt (Borrmann *et al.*, 2004).

2.4 Proteintransport und Proteinprozessierung

Zur Etablierung und Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionalen Identität verschiedener subzellulärer Kompartimente bzw. Organellen ist ein gezielter und kontrollierter (Vesikel-) Transport von Proteinen notwendig. Der Transportmechanismus einer eukaryotischen Zelle verläuft über eine Anzahl membrangebundener Kompartimente, auf deren wichtigste Vertreter im folgenden Abschnitt genauer eingegangen wird.

2.4.1 Vesikelabhängiger Proteintransport

Das endoplasmatische Retikulum und der Golgi Apparat stehen über einen Vesikeltransport in enger Verbindung zueinander. Der anterograde Vesikeltransport führt vom ER über den Golgi Apparat und TGN zur Plasmamembran hin, der retrograde Transportweg von der Plasmamembran über dem TGN und Golgi Apparat zum ER. Im Allgemeinen werden je nach Hüllprotein und Einsatzort drei verschiedene Vesikeltypen unterschieden: Clathrin-, COPI- und COPII-umhüllte Transportvesikel.

Clathrin-Vesikel bestehen aus polymerisierten Clathrin-Untereinheiten und schnüren sich von der Plasmamembran und dem *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) ab, wo sie einen Transport zu Endo- und Lysosomen vermitteln (Robinson *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu verfügen sog. COP (engl. für coat protein complex) -umhüllte Vesikel über eine komplexe Hüllstruktur (Barlowe, 2000). Der **COPI** Komplex (auch „coatomer“ genannt) besteht aus sieben konservierten Untereinheiten (Ret1p, Ret2p, Ret3p, Sec21p, Sec26p, Sec27p und Sec28p) und der GTPase ARF1 (ADP- ribosylation factor 1). Die COPI Komponenten werden *en bloc* aus dem Zytosol an Golgi Membranen rekrutiert, wo sie einen Transport vom Golgi Apparat zum ER und innerhalb des Golgi Apparates vermitteln (Waters *et al.*, 1991; Serafini *et al.*, 1991; Barlowe, 2000). **COPII**-umhüllte Vesikel bestehen aus zwei Proteinkomplexen (Sec23p/Sec24p und Sec13p/Sec31p) und der GTPase Sar1p (Novick *et al.*, 1980; Baker *et al.*, 1988; Barlowe *et al.*, 1994 and 2000). Die zytosolischen Komponenten ordnen sich nacheinander an den ERES an, schnüren sich als COPII- Vesikel ab und transportieren ihre Proteinladung zum Golgi Apparat (Barlowe, 2000 und 2002). Die Regeneration von COPII Untereinheiten am ER wird durch einen COPI-vermittelten retrograden Transport vermittelt (Barlowe, 2000 und 2002).

In *P. falciparum* wurden zahlreiche Bestandteile des COPII-vermittelten Vesikeltransports im Genom des Parasiten identifiziert und eine Anzahl davon charakterisiert (Albano *et al.*, 1999; Adisa *et al.*, 2001 und 2002). Einige Bestandteile wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern im Zytosol des Erythrozyten nachgewiesen, was zu zahlreichen Spekulationen hinsichtlich der Organisation von Golgi Apparat und Proteintransport führte (Elmendorf und Haldar, 1993 und 1994; Albano *et al.*, 1999; Adisa *et al.*, 2001 und 2002). Untersuchungen mit unfixiertem Parasitenmaterial und detaillierte biochemische Analysen widersprechen dieser Theorie und lassen vermuten, dass es sich bei der Lokalisation von COPII Komponenten im Erythrozyten um Artefakte handelt (Struck *et al.*, 2005; Frankland *et al.*, 2006).

2.4.2 „Targeting“-Signale in *P. falciparum*

Sekretorische Proteine besitzen N-terminale Signalpeptide, mit denen eine ko-translationale Einschleusung in das ER möglich ist (von Heinje, 1984). Alle Proteine werden aus dem ER entlang des endozytotischen Transportweges durch den Golgi Apparat geführt. An der *trans*-Seite erfolgt die Erkennung von weiteren Sequenzmotiven, was eine Sortierung und Verpackung in Transportvesikel bedingt.

In *P. falciparum* erfolgt ein Weitertransport aus dem ER in mindestens 12 verschiedene subzelluläre Bestimmungsorte. Innerhalb der Parasiten erfolgt sie u.a. in die sekretorischen Organellen, Apikoplasten, Mitochondrien, Nahrungsvakuole, parasitophore Vakuole und – Membran und, jenseits des Parasiten, in das Zytosol der Wirtszelle und deren Membran (zusammengefasst in Tonkin *et al.*, 2006).

Adhäsive Proteine in den Mikronemen von *P. falciparum*, wie z.B. die EBA-Proteine, sind integrale Membranproteine vom Typ I. Diese werden relativ spät im Lebenszyklus synthetisiert und in die Mikronemen transportiert (Cowman und Crabb, 2006). Die dafür notwendigen Sequenzmotive sind größtenteils noch unbekannt. EBA-175 besitzt neben einem klassischen, N-terminalen Signalpeptid noch eine Transmembran- und eine kurze zytoplasmatische Domäne. Es konnte anhand von Deletionsmutanten gezeigt werden, dass der Transport in die Mikronemen unabhängig vom zytoplasmatischen Teil des Proteins ist, eine Invasion jedoch von diesem Bereich abhängt (Gilberger *et al.*, 2003).

Über essentielle Sequenzmotive für einen Proteintransport in die Rhoptrien von *P. falciparum* ist relativ wenig bekannt. In *Toxoplasma* existiert ein C-terminales, Tyrosin-basierendes YXXZ -Motiv, wobei X eine variable und Z eine „sperrige“, hydrophobe Aminosäure ist (Hoppe *et al.*, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Rhoptrien-Transmembranproteine über jenes Tyrosin-Motiv mit einer Untereinheit der Clathrin-Vesikelhüllstruktur interagieren und so weitertransportiert werden (Ngo *et al.*, 2003). In *Plasmodium* besitzen viele Rhoptrienproteine an ihrem C-Terminus ein Tyrosin-basierendes Motiv und es existieren ebenfalls homologe Bestandteile des Clathrin-abhängigen Vesikeltransports. Ob es sich tatsächlich um funktionale Tyrosinmotive handelt und ob eine Interaktion mit Clathrin-Vesikeln stattfindet ist bisher noch ungeklärt (Gardner *et al.*, 2002).

Das RESA Protein in den elektronendichten Granula besitzt ein internes Signalpeptid (Aminosäure 52-64). Die Sequenzinformation für einen Transport aus dem ER in die elektronendichten Granula befindet sich sehr wahrscheinlich innerhalb der N-terminalen Domäne (bis Aminosäure 117), allerdings sind notwendige Aminosäuren, bzw. putative

Transportmotive noch nicht bekannt. Für einen korrekten Transport ist zusätzlich zur Sequenzinformation eine zeitliche Regulierung der Proteinexpression notwendig. So gelangt RESA unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors in die parasitophore Vakuole anstatt in die Granula (Rug *et al.*, 2004).

Die meisten Gene (ca. 85%) der Apikoplastproteine werden im Kern kodiert und nach ihrer Translation im Zytosol in einem zielgerichteten Transport in das Organell geführt. Signalpeptide vermitteln den ersten Teil des Transports durch Einschleusung (oder „Export“) in das Endomembransystem. Das Exportsystem ist prokaryotischen Ursprungs und wird deshalb so bezeichnet, weil Proteine aus dem Zytosol in extrazytosolische Kompartimente transportiert wurden (Schatz und Dobberstein, 1996). Der Transport aus dem ER in den Apikoplasten von *Plasmodium* wird durch Transitpeptide vermittelt. Transitpeptide von *P. falciparum* stimmen funktional mit den pflanzlichen Transitpeptiden überein. Sie besitzen ebenfalls eine positive Nettoladung, die im Falle von *Plasmodium* durch die basische AS Lysin vermittelt wird. Im Gegensatz zu den Pflanzen kommen wenig hydroxylierte AS vor. Im Stroma des Apikoplasten werden Transitpeptide von einer „stromal processing Peptidase“ nahe des C-terminalen Endes abgespalten (van Dooren *et al.*, 2002). Wie genau der Translokationsmechanismus der Proteine durch die einzelnen Membranen ist, wird derzeit noch debattiert, allerdings wird vermutet, dass der Importmechanismus durch die innersten beiden Membranen analog zu dem TOC/TIC-Mechanismus der Chloroplasten ist (McFadden, 1999).

Der Proteintransport in die Mitochondrien von *Plasmodium* wird, analog zum Transport in den Apikoplasten, von Transitpeptiden vermittelt (Bender *et al.*, 2003). Der Unterschied zwischen mitochondrialer und Apikoplast-Signalsequenz besteht u.a. darin, dass die Mitochondrien kein vorgeschaltetes Signalpeptid besitzen und daher nicht in den sekretorischen Transportweg gelangen, sondern Proteine direkt aus dem Zytosol in das Organell geführt werden. Der Importmechanismus in *Plasmodium* ähnelt dem allgemeinen TOM/TIM Mechanismus höherer eukaryotischer Zellen (Neupert und Brunner, 2002; Bender *et al.*, 2003). Allgemein ist die funktional wichtigste Eigenschaft mitochondrialer Transitpeptide die Ausbildung von amphipatischen α -Helices (Hammen und Weiner, 1998).

P. falciparum ist in der Lage, seine Wirtszelle zu modifizieren. Darauf basieren die Komplikationen einer Malaria tropica, z.B. durch cerebrale Malaria, mit möglichen fatalen Folgen. Die Identifizierung von Sequenzmotiven involvierter Virulenzfaktoren stellt ein zentrales Forschungsfeld für eine Medikamentenentwicklung dar. Unlängst wurde ein Sequenzmotiv für den Transport von Proteinen über die pVM hinaus gefunden (Marti *et al.*,

2004; Hiller *et al.*, 2004). Dieses sog. „*Plasmodium* export element“, bzw. „vacuolar targeting signal“ (PEXEL/VTS) besteht aus einer Abfolge von fünf Aminosäuren, die innerhalb des N-Terminus hinter einer hydrophoben Region liegen. Die Suche nach diesem Motiv identifizierte 400 putative Proteine im Genom des Parasiten, die in unterschiedlicher Weise an der Modifikation des Erythrozyten beteiligt sein sollen (Marti *et al.*, 2004).

2.4.3 Proteolytische Prozessierung sekretorischer Proteine

N-terminale Signalpeptide vermitteln eine ko-translationale Translokation in das ER. Im Lumen des Organells werden sie durch Proteasen, bzw. spezielle „Signalpeptidasen“ abgespalten. Proteasen sind proteolytische Enzyme, die unter Einbau eines Wassermoleküls Peptidbindungen spalten. Sie übernehmen im Organismus im Allgemeinen vielfältige Aufgaben, u.a. die Inaktivierung und Aktivierung anderer Proteasen, Enzyme, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone und Rezeptoren, sowie die generelle Bereitstellung einzelner Aminosäuren, z.B. für die Neusynthese von Proteinen. Proteasen werden je nach Bestandteil des aktiven Zentrums in Serin-, Aspartat-, Threonin-, Cystein- oder Metalloproteasen eingeteilt.

Im Genom des Parasiten konnten bisher 93 verschiedene Proteasen identifiziert werden (Wu *et al.*, 2003), von denen einige, z.B. Plasmepsine, Falcipaine und Subtilisine, generell gut untersuchte Enzyme sind (Whiters-Martinez *et al.*, 2002; Greenbaum *et al.*, 2003; Esmark *et al.*, 2006). Für die sekretorischen Proteine AMA1 und MSP1 sind eine Anzahl von proteolytischen Aktivierungsschritten dokumentiert (Healer *et al.*, 2003; Harris *et al.*, 2005b). Eine spezielle Familie innerhalb der Serinproteasen sind die sog. Rhomboid Proteasen. Es sind Serinproteasen, die in der Lage sind, innerhalb der TMD ihrer Substrate Peptidbindungen zu spalten. Rhomboids werden über 6 (in eukaryotischen Zellen 7) TMD in der Membran verankert. Sie spalten ihre Substrate in der TMD, genauer innerhalb der ersten fünf Aminosäuren ihrer TMD und entlassen dadurch einen Teil des Substrats in die Umgebung (Urban und Freeman, 2002). Obwohl Rhomboids durch das gesamte Organismenreich hindurch gut konserviert sind, besitzen sie mit 5% Identität innerhalb ihrer (konstanten Anzahl von 6) TMD eine hohe Divergenz auf Proteinebene (Urban *et al.*, 2001; Koonin *et al.*, 2003). Dennoch existieren grundlegende biochemische Merkmale und ein allgemein konserviertes Substratmotiv (Urban und Freeman, 2003).

In *Toxoplasma gondii* werden zahlreiche Mikronemenproteine (MICs) in ihrer TMD durch eine „microneme processing protease“ (MPP1, Carruthers *et al.*, 2000) prozessiert, wobei sich in jüngster Zeit herausstellte, dass es sich hierbei um eine Rhomboid Protease handelt (Dowse und Soldati, 2005).

3 ZIELSETZUNG

Zielsetzung dieser Arbeit ist eine Charakterisierung des sekretorischen Transportweges in *P. falciparum*, mit Schwerpunkt auf die morphologische Charakterisierung des Golgi Apparates während der erythrozytären Lebensphase. Im Rahmen dessen ist i) die Identifizierung eines Golgi-definierenden Markerproteins im Genom des Parasiten, ii) die Expression desselben als GFP-Fusionsprotein durch transiente Transfektion und iii) die Evaluierung des putativen Markers mit bereits charakterisierten (*cis*- und *trans*-) Golgi-Markern notwendig. Der Vergleich verschiedener Golgi-Markerproteine im Parasiten soll Aufschluss über Art und Ausmaß der Organell-Kompartimentierung, die GFP-Zelllinie Informationen über die Dynamik und Biogenese des Organells während der Schizogonie geben.

Untersuchungen zur Charakterisierung des sekretorischen Transportsystems im Parasiten umfassen zielgerichtete Proteintransporte in die Mikronemen und den Apikoplasten. In Hinblick auf den Apikoplasten ist von Interesse, ob sekretorische Proteine grundsätzlich über den Golgi Apparat an ihren Zielort gelangen, oder ob ein direkter und Golgi-unabhängiger Transportweg existiert. Damit sollen Erkenntnisse über die räumliche Lage des Apikoplasten im sekretorischen Transportweg, bzw. die Beteiligung des Golgi Apparates am Proteintransport in das Organell gewonnen werden.

Konzeptionell angegliedert sind Untersuchungen zum Proteintransport in die sekretorischen Organellen von *P. falciparum*. Die für diesen Transport notwendigen Sequenzabschnitte im Mikronemenprotein EBA-175 sollen identifiziert und über ein speziell entwickeltes Reportersystem funktional überprüft werden. Zusätzlich zu einem zielgerichteten Proteintransport soll die Relevanz einer zeitlich geregelten Proteinexpression und die Funktion eines putativen Prozessier-Erkennungsmotivs innerhalb der Transmembrandomäne untersucht werden. Untersuchungen zur proteolytischen Prozessierung von EBA-175 umfassen die Identifikation und Lokalisation beteiligter Proteasen im Parasiten, sowie die biologische Relevanz der ermittelten Daten.

4 FORSCHUNGSBERICHT

4.1 Untersuchungen des Golgi Komplexes in *P. falciparum*

4.1.1 Struck *et al.*, 2005

Zur morphologischen Charakterisierung des Golgi Apparates im Malariaerreger sollten zunächst Golgi-definierende Markerproteine im Genom identifiziert, als GFP-Fusionsprotein in transgenen Parasiten exprimiert und dann im infizierten Erythrozyten lokalisiert werden.

Es konnte im Genom von *P. falciparum* ein Homolog zum Golgi Re-Assembly Stacking Protein (GRASP) identifiziert werden. GRASP Proteine sind konservierte, periphere Golgi-Membranproteine, die über Homo-Dimerisierungen benachbarte Zisternen miteinander verknüpfen (Barr *et al.*, 1997). Sie verfügen über eine konservierte, N-terminale GRASP Domäne und eine nicht konservierte C-terminale Domäne, die aufgrund ihres hohen Prolin- und Serin-Anteils als „Prolin-Serine rich“ (PSR) bezeichnet wird. Die Membranverankerung erfolgt über eine Myristoilisierung am N-Terminus. Das identifizierte *grasp* Gen umfasst 1869 bp und besteht aus zwei Exons. Das 33 bp umfassende Exon 1 kodiert für ein putatives Myristoilisierungsmotiv („Myristoylator“: www.expasy.org/tools/myristoylator). Das Protein hat ein Molekulargewicht von 69 kDa und zeigt eine 22%ige Identität zum GRASP Protein der Ratte (*Rattus norvegicus*, AF110267), wobei sich die Homologie auf die N-terminale GRASP Domäne beschränkt. Der unkonservierte C-Terminus ist angereichert an Serinen und besitzt 20 putative Serin-Phosphorylierungsstellen („NetPhos“: www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/). Das Transkriptionsprofil des *grasp* Gens wurde mit Hilfe der quantitativen Real time RT PCR und spezifischen Oligonukleotiden analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine konstitutive Transkription durch die gesamte erythrozytäre Lebensphase erfolgt. Eine konstitutive Expression des Proteins durch die asexuelle Lebensphase konnte mit GRASP-spezifischen Antikörpern ebenfalls bestätigt werden. Zur Lokalisierung des GRASP Proteins in *P. falciparum* wurde eine *Pf*GRASP-GFP exprimierende Parasitenlinie hergestellt. Die Markierung mit dem Reporterprotein ermöglicht eine Lokalisierung in lebenden Parasiten, wodurch Fixierartefakte umgangen werden. Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass das *Pf*GRASP-GFP Fusionsprotein in der Nähe des Zellkerns in einer fokussierten Struktur akkumuliert (Abb. 5).

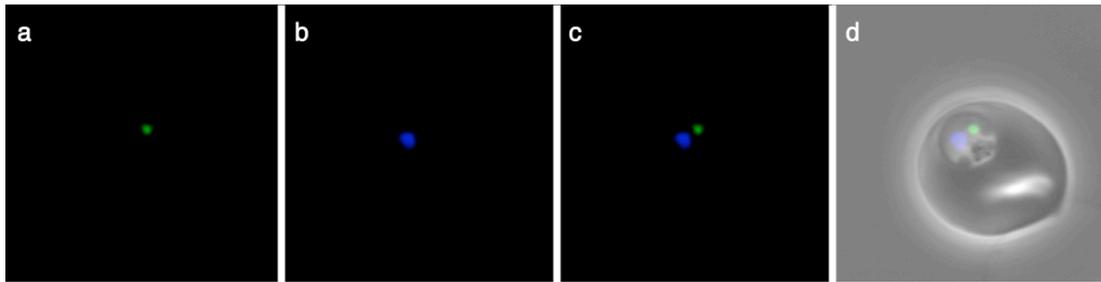


Abb. 5 Lokalisation des *Pf*GRASP-GFP Fusionsproteins in unfixierten Parasiten

*Pf*GRASP-GFP (grün) akkumuliert in einer fokussierten Struktur (a) in der Nähe des Zellkerns (blau, b-c). Übereinanderlagerung der Fluoreszenzbilder mit Phasenkontrast-Abbildung (d). Der Zellkern ist mit DAPI angefärbt.

Zur Evaluierung von GRASP als putativen Golgi-Marker in *P. falciparum* wurden Ko-Lokalisierungen mit weiteren subzellulären Markerproteinen durchgeführt. Dazu wurden infizierte Erythrozyten mit einer verbesserten, immunfluoreszenz-basierenden Methode zur Ko-Lokalisierung von Proteinen eingesetzt, die eine höhere Konservierung der membranösen Ultrastruktur mit gleichzeitiger Erhaltung der Antigenität und Präservierung der GFP Fluoreszenz gewährleistet (Tonkin *et al.*, 2004). Hierbei zeigt der *cis*-Golgi-Marker ERD2 (Elmendorf und Haldar, 1993) in Immunfluoreszenzstudien mit ERD2 spezifischen Antikörpern eine vollständige Überlappung mit dem *Pf*GRASP-GFP definierten Kompartiment (Abb. 6A). Das ER-Markerprotein *Pf*BiP färbt in Immunfluoreszenzstudien die Kernmembran und eine bis mehrere membranöse Ausstülpungen an (Abb. 6B). In Ko-Lokalisierungsstudien konnte gezeigt werden, dass das ER des Parasiten eng mit der GRASP-definierten Struktur assoziiert, aber nicht identisch damit ist (Abb. 6B). Das GRASP-definierte Kompartiment in *P. falciparum* liegt folglich in der Nähe der Kernmembran, ist jedoch deutlich unterscheidbar von membranösen Ausstülpungen des ERs.

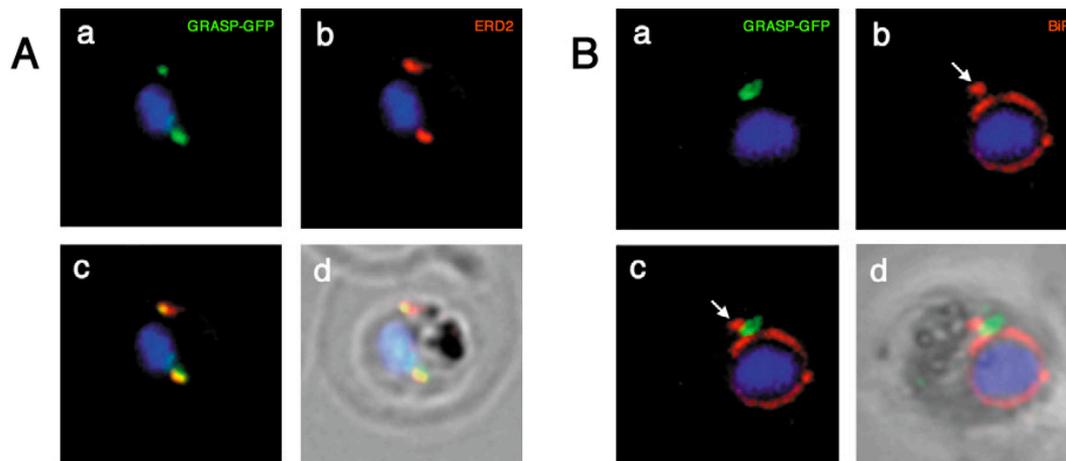


Abb. 6 Ko-Lokalisierungsstudien von *Pf*GRASP-GFP mit den Markerproteinen ERD2 und BiP

A) GRASP-GFP (grün, a) und der Golgi-Marker ERD2 (rot, b) ko-lokalisieren (c). Übereinanderlagerung mit Phasenkontrast (d). **B)** GRASP-GFP (grün) ist in der Nähe des Zellkerns lokalisiert (a). Das ER-Markerprotein BiP (rot) stellt das ER des Parasiten als perinukleäre Hülle mit membranösen Ausstülpungen an (b, mit Pfeil gekennzeichnet). Die Übereinanderlagerung der Fluoreszenzbilder verdeutlicht die räumliche Trennung der beiden Kompartimente (c). Übereinanderlagerung mit Phasenkontrast (d). In blau: DAPI gefärbter Zellkern.

Jeder Zellteilung geht eine Verdopplung, bzw. Vermehrung der subzellulären Organellen voraus. Der Parasit durchläuft in den Blutstadien eine Schizogonie, welche eine Vielteilung aller zellulären Bestandteile innerhalb von 48 Stunden erfordert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Multiplikation des Golgi Apparates in *P. falciparum* stattfindet, bis jeder Merozoit paritätisch mit einem Organell ausgestattet werden kann (Abb. 7). Die initiale Duplikation des Kompartiments setzt noch vor der Kernteilung ein (Abb. 7). Zu keinem Zeitpunkt innerhalb der asexuellen Lebensphase konnte ein Export von *Pf*GRASP-GFP in den Erythrozyten beobachtet werden.

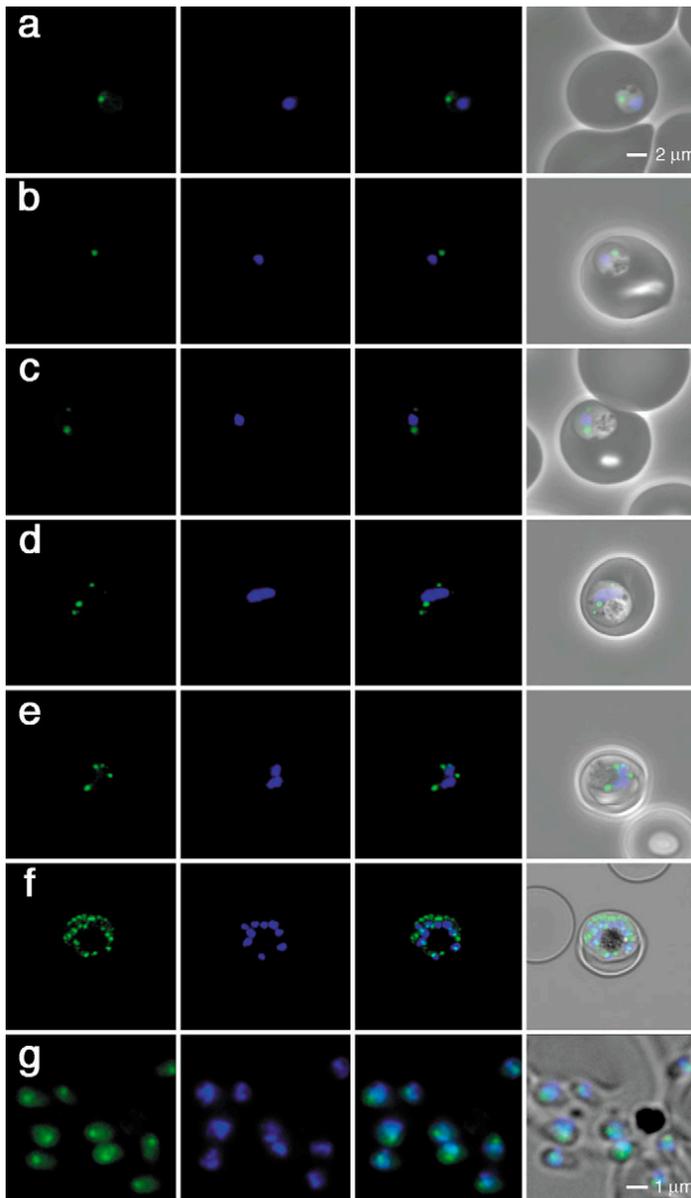


Abb. 7 Dynamik des Golgi Apparates während der erythrozytären Lebensphase von *P. falciparum*

GRASP-GFP wurde in fortschreitenden Entwicklungsstadien des Parasiten beobachtet. Junge Parasiten (< 24h pi) besitzen ein einzelnes Golgi Kompartiment in der Nähe des Zellkerns (a-b). Noch vor der Kernteilung hat sich das Organell dupliziert (c). Im Laufe der asexuellen Entwicklung kommt es zur Multiplizierung des Golgi Apparates (d-f) bis jeder Merozoit mit einem Organell ausgestattet werden kann (g).

Das putative Myristoilisierungsmotiv am N-Terminus von *Pf*GRASP wurde funktional über die Einführung einer Mutation überprüft. Klassische N-terminale Myristoilisierungsmotive besitzen ein konserviertes Glycin in der Aminosäuresequenz, das von der Myristyltransferase zur Anheftung der Fettsäurekette genutzt wird. Die Substitution der Aminosäure Glycin durch Alanin führte in *P. falciparum* zur funktionalen Inaktivierung des Myristoilisierungsmotivs und durch Aufhebung der Membranverankerung zu einer zytosolischen Variante des *Pf*GRASP-GFP Fusionskonstrukts.

Die Substanz „Brefeldin A“ (BFA) hat in allen eukaryotischen Zellen eine inhibierende Wirkung auf den anterograden vesikulären Proteintransport vom ER zum Golgi Apparat und führt zu einer Re-Lokalisierung der Golgi-Proteine zum ER (Nebenfuhr *et al.*, 2002). Im

Gegensatz zu luminalen Golgi-Proteinen werden Matrixproteine (wie z.B. GRASP) nicht von BFA inhibiert, bzw. re-lokalisiert (Seemann *et al.*, 2002). BFA zeigt keine Wirkung auf die Lokalisation von GRASP in *P. falciparum*, was auf eine Funktion als Golgi-Matrixprotein hindeuten könnte.

Der Golgi Apparat wurde mit Hilfe von ERD2-GFP exprimierenden Parasiten weiter analysiert. Bisher konnte in IFAs eine Ko-Lokalisierung von *PfERD2* mit *PfGRASP*-GFP gezeigt werden (Abb. 6A). *In vivo* Mikroskopie von *PfERD2*-GFP exprimierenden Parasiten zeigt das Fusionsprotein, im Gegensatz zu Immunfluoreszenzstudien an fixierten Parasiten, nicht nur in einem perinukleären (Golgi-) Kompartiment, sondern auch im ER (Abb. 8). Die Ko-Lokalisierung von *PfERD2*-GFP mit *PfERD2*-spezifischen Antikörpern bestätigt die Identität des perinukleären Kompartimentes. *PfERD*-GFP exprimierende Parasiten ermöglichen zusätzlich zur Darstellung des Golgi-Kompartiments und dessen Multiplikation eine Visualisierung der ER-Dynamik innerhalb des 48h Lebenszyklus. Die fortschreitende Entwicklung des Parasiten zeigt eine Vervielfachung des perinukleären Kompartiments, so dass am Ende jeder (formende) Merozoit mit einem ER und einem Golgi Apparat ausgestattet werden kann.

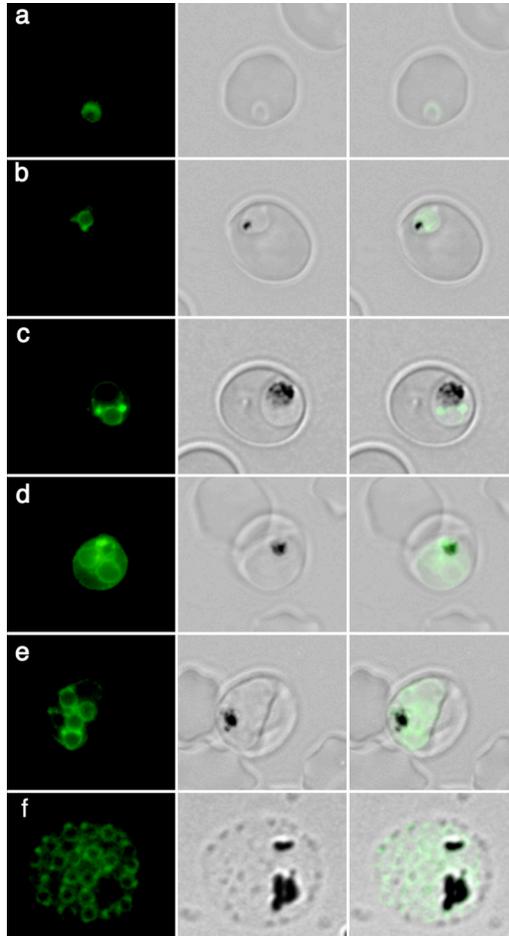


Abb. 8 Dynamik und Entwicklung von *PfERD2*-GFP exprimierenden Parasiten

Das Fusionsprotein ist in jungen Parasiten (< 16h pi) in der perinukleären Membran lokalisiert (a). In jungen Trophozoiten (< 24h pi) kommt zusätzlich eine membranöse Ausstülpung vor, welche mit antiERD2 Antikörpern ko-lokalisiert (b). Ca. 24h pi findet eine Duplikation des Kompartiments statt (c). Mit fortlaufender Entwicklung entstehen multiple Kernhüllen mit fokussierten Bereichen (d-e) bis schließlich jeder formende Merozoit mit einem Exemplar ausgestattet werden kann (f).

4.1.2 Struck *et al.*, 2007

Das *grasp* Gen in *P. falciparum* ist ein „single-copy“ Gen. Mit Hilfe von Northern Blot Analysen und *grasp* spezifischer Sonde konnten jedoch zwei RNA Populationen nachgewiesen werden (Fig. 9A). Aufgrund von (und für *P. falciparum* charakteristische) relativ großen 5'- und 3' nicht-translatierten Bereiche („untranslated regions“, UTR) sind die Transkripte mit 3,8 und 4 kb größer als die kodierende Gensequenz von 1,8 kb. Dieses Ergebnis konnte auf cDNA Ebene mit Hilfe von RT-PCR Analysen bestätigt werden (Fig. 9B). Reverse Transkription von RNA und anschließende PCR mit *grasp* spezifischen Oligonukleotiden erzeugen zwei Amplifikate mit einem Größenunterschied von ca. 150 bp. Eine Sequenzierung der beiden *grasp* cDNA Populationen weist neben einer gespleißten- auch eine ungespleißte Variante auf (Abb. 9D). Das gespleißte Genprodukt repräsentiert den bereits charakterisierten Golgi-Marker GRASP1 (*Pf*GRASP, Struck *et al.*, 2005), die ungespleißte Variante besitzt einen unterschiedlichen 5' Bereich. Innerhalb des Introns befindet sich ein offener Leserahmen von 63 bp und im gleichen Leserahmen wie ExonII. Das daraus resultierende GRASP Protein (GRASP2) verfügt über einen 21 AS langen alternativen N-Terminus bei einem theoretischen Größenunterschied zu GRASP1 von 1,5 Da. Interessanterweise weist GRASP2 kein phylogenetisch konserviertes, N-terminales Myristoilisierungsmotiv, sondern eine Membranankersequenz auf (Abb. 9D). In Parasitenextrakten können mit Hilfe von GRASP spezifischen Antikörpern in einem 13% SDS PAGE zwei Fragmente dargestellt werden, die sich nur geringfügig in ihrem Molekulargewicht unterscheiden (Abb. 9C).

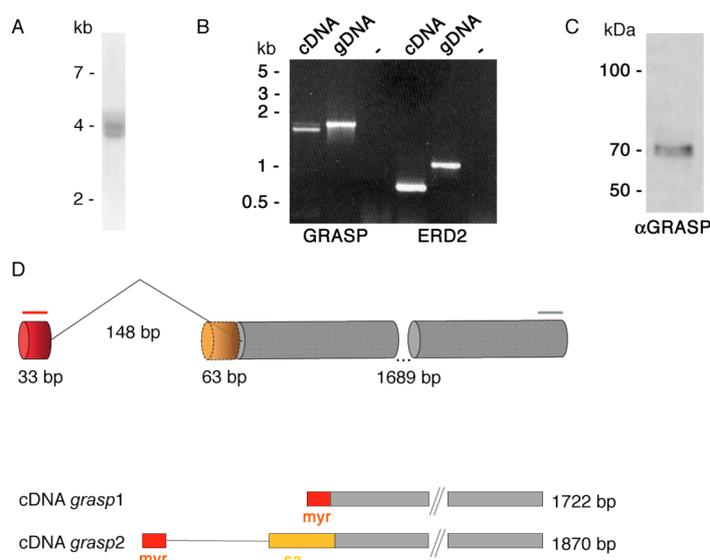


Abb. 9 Identifikation von zwei unterschiedlichen *grasp* Populationen

A) Auf einem Northern Blot mit *grasp* spezifischer Sonde sind zwei Transkripte zu sehen. Die P^{32} markierte *grasp* Sonde hybridisiert mit zwei RNA Populationen.

B) RT-PCR Analyse mit *grasp*- und *erd2* spezifischen Oligonukleotiden. *Grasp* spezifische Oligonukleotide führen auf cDNA zur Amplifikation von 2 Fragmenten. Ein Reaktionsansatz mit gDNA oder ohne DNA dient als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle. Eine Amplifikation mit

erd2 spezifischen Oligonukleotiden schliesst mögliche gDNA Kontaminationen in der cDNA Präparation aus. Das *erd2* Gen umfasst 966 bp mit und 666 bp ohne Intron. **C)** Western Blot Analysen auf Parasitenextrakt mit GRASP spezifischen Antikörpern detektieren zwei Proteine von ca. 70 kDa. **D)** Schemazeichnung der *grasp* Intron-Exon Struktur. Exon I kodiert für ein N-terminales Myristoilisierungsmotiv (rot). Das Intron beinhaltet einen offenen Leserahmen (gelb) und ein alternatives Start-ATG. Daraus resultieren zwei unterschiedliche cDNA Populationen (*grasp1* und *grasp2*), wobei das alternative 5'- Ende von *grasp2* für eine putative Signalankersequenz kodiert. bp: Basenpaare, kb: Kilobasen; cDNA: copy-DNA; gDNA: genomische DNA; - : Negativkontrolle; kDa: kilo Dalton; myr: Myristoilisierungsmotiv; sa: Signalanker Motiv.

Mit der episomalen Expression des *grasp* Gens sollte die Heterogenität der Transkripte und Genprodukte überprüft werden. Hierzu wurde die genomische *grasp* Sequenz einschließlich Intron in einen Transfektionsvektor kloniert (GRASP1/2) und i) ein HA-kodierender Bereich in Exon I und ii) ein cMyc-kodierender Bereich dem offenen Leserahmen innerhalb des Introns angefügt (Abb. 10A). Transgene, GRASP-1/2 exprimierende Parasiten wurden über RT-PCR auf Transkriptionsebene (nicht abgebildet) und mit Hilfe von Western Blot Analysen untersucht (Abb. 10B). GRASP-spezifische Antikörper detektieren endogenes GRASP bei ca. 70 kDa sowohl im Wildtyp, als auch in der transgenen Zelllinie. Zusätzlich zum endogenen Protein wird in GRASP1/2 exprimierenden Parasiten eine weitere Proteinbande von ungefähr 75 kDa angezeigt. Sowohl Myc- als auch HA-spezifische Antikörper erkennen ein Protein von ca. 75 kDa in transgenen, aber nicht Wildtyp Parasiten, wodurch die Translation von GRASP1 als HA-markiertes Protein, sowie die von GRASP1 als Myc-markiertes Protein im Parasiten nachgewiesen werden konnte.

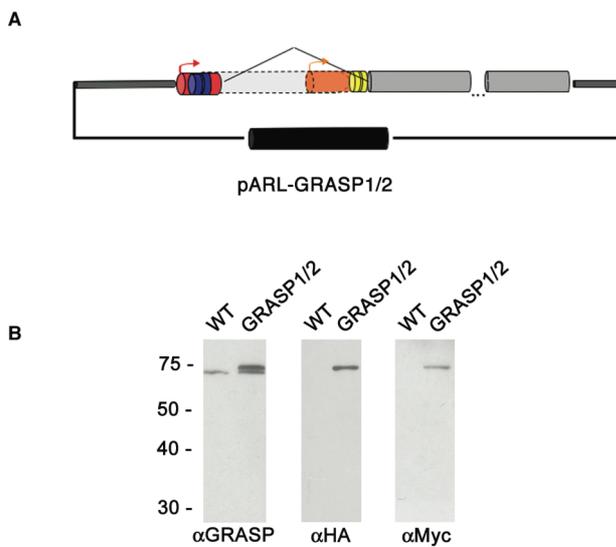


Abb. 10 Zwei GRASP Proteine werden in *P. falciparum* hergestellt

A) Schemazeichnung des GRASP1/2 Fusionskonstrukts. Die genomische *grasp* Sequenz wurde in den Transfektionsvektor pARL kloniert. Ein cMyc- kodierender Bereich (blau) wurde in Exon I (rot), ein HA-kodierender Bereich (gelb) in das alternative 5'-Ende (orange) eingefügt. **B)** Western Blot Analysen transgener GRASP1/2 Parasiten. Mit Hilfe spezifischer HA- und Myc-Antikörper konnte die Translation des alternativen GRASP Proteins (GRASP2 als HA-markiertes Protein) nachgewiesen werden.

Diese GRASP Heterogenität kann durch Mutation des 5' Spleißmotivs (GRASP1*/2, nicht abgebildet) aufgehoben werden. Dazu wurde die gesamte genomische *grasp* Sequenz einschließlich Intron in den Transfektionsvektor kloniert, bei der die 5'Splicestelle mutiert wurde.

Zur Charakterisierung von GRASP2 wurde eine GFP-markierte Zelllinie in *P. falciparum* hergestellt. Transgene Parasiten zeigen eine ähnliche subzelluläre Distribution des Fusionsproteins und Dynamik des GFP-markierten Kompartiments im Laufe der erythrozytären Lebensphase wie das bereits charakterisierte *Pf*GRASP1-GFP (vgl. Abb. 7 und 11A). Die Ko-Lokalisierung von GRASP2 mit dem ER-Marker BiP zeigt, analog zum Fluoreszenzmuster von GRASP1-GFP, ein ER-assoziiertes, aber nicht identisches Kompartiment (Abb. 11B). Vorläufige fluoreszenzmikroskopische Analysen des GRASP2-GFP definierten Kompartiments mit *Pf*ERD2 zeigen in Kontrast zu GRASP1-GFP keine komplette Überlappung (nicht gezeigt).

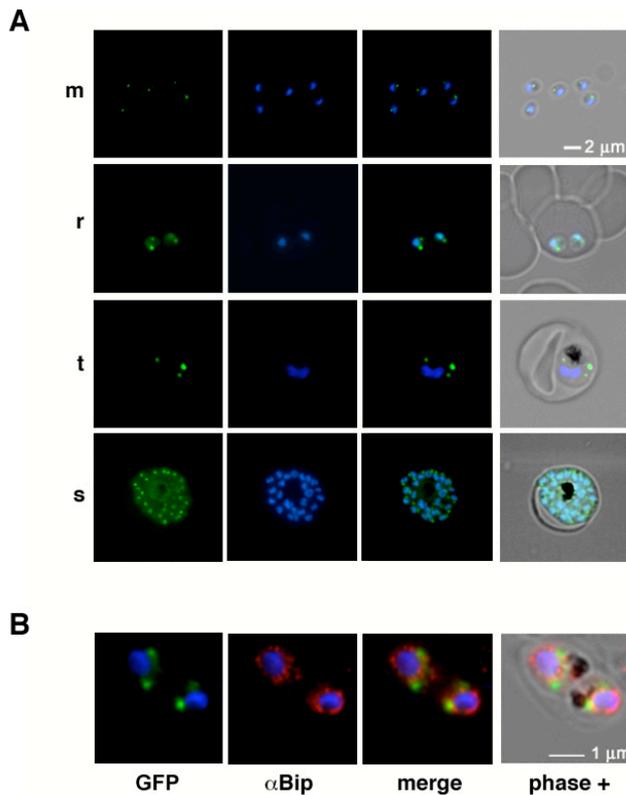


Abb. 11 Lokalisation und Dynamik von GRASP2-GFP in unfixierten Parasiten

A) In freien Merozoiten ist GRASP2-GFP (grün) im perinukleären Bereich fokussiert. Der Kern (blau) ist mit DAPI dargestellt. Schon in frühen Stadien (r) kommt es zu einer Duplikation des Organells. Während der fortschreitenden Reifung (t) und Schizogonie (s) kommt es zu einer weiteren Multiplikation des Kompartiments. **B)** Die Ko-Lokalisierung von GRASP2 (grün mit Nukleus in blau) mit dem ER-Marker BiP (rot) zeigt eine enge räumliche Assoziation der beiden Kompartimente.

Eine phylogenetische Analyse (nicht gezeigt) von GRASP zeigt, dass das Protein in den meisten großen taxonomischen Gruppen außer den Pflanzen zu finden ist. Auch phylogenetisch alte Taxa, wie die Gruppe der Discicristates und Excavata (Richards und Cavalier-Smith, 2005) verfügen über ein GRASP Homolog. In *Giardia lamblia* und *Entamoeba histolytica* allerdings konnten keine Homologe identifiziert werden, möglicherweise aufgrund einer sekundären Reduzierung oder extremen Modifikationen. Vertebraten zeichnen sich durch das Vorhandensein zweier *grasp* Gene (*grasp 55* und *grasp 65*) aus, vermutlich weil es während ihrer Evolution zu einer Genduplikation kam. In allen anderen Gruppen konnte nur ein *grasp* Gen identifiziert werden. Ein alternativer Translations-Start im Intron gefolgt von einem offenen Leserahmen kommt neben *P. falciparum* ausschließlich bei *P. vivax*, jedoch nicht bei Nagetier- (*P. yoelii* und *P. berghei*) oder Primatenparasiten (*P. knowlesi*) vor.

4.2 Analyse unterschiedlicher Transportwege, sowie essentieller Transport- und Prozessiersignale im sekretorischen Membransystem von *P. falciparum*

4.2.1 Tonkin *et al.*, 2006

Der Proteintransport in den Apikoplasten des Malariaerregers beginnt mit dem Eintritt in den sekretorischen Transportweg, was durch den ersten Teil einer zweiteiligen Signalsequenz, dem Signalpeptid, vermittelt wird (Waller *et al.*, 2000). Ein Weitertransport aus dem ER in den Apikoplasten erfolgt nach Abspaltung des Signalpeptids im Lumen des ER, mit Hilfe des stromabwärts liegenden Transitpeptids.

Eine Fragestellung dieser Arbeit war, ob der zielgerichtete Transport von Apikoplastproteinen durch besondere Informationen im Signalpeptid über einen spezialisierten sekretorischen Transportweg verläuft, oder ob alle Signalpeptide in einen generellen sekretorischen Transportweg hineinschleusen. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob der sekretorische Transportweg, analog zu dem der höheren Eukaryoten, vom ER zwangsläufig über den Golgi Apparat verläuft, oder ob ein direkter Transportweg aus dem ER in den Apikoplasten besteht. Hierzu wurden GFP-Fusionskonstrukte mit dem Apikoplastprotein ACP (acyl carrier protein) hergestellt, in denen das Signalpeptid durch die anderer sekretorischer Proteine ausgetauscht wurde. Es wurden hierzu die Signalpeptide von EBA-175 und des „knob associated histidin rich protein“ (KHARP; Wickham *et al.*, 2001) verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die chimären Fusionsproteine EBA(s)-ACP(t)-GFP und KAHRP(s)-ACP(t)-GFP (s für Signalpeptid und t für Transitpeptid) trotz substituiertem Signalpeptid in den Apikoplasten gelangen, was für die Eingliederung aller sekretorischen Proteine in einen allgemeinen sekretorischen Transportweg durch die Vermittlung funktional gleichwertiger Signalpeptide spricht (Abb. 12).

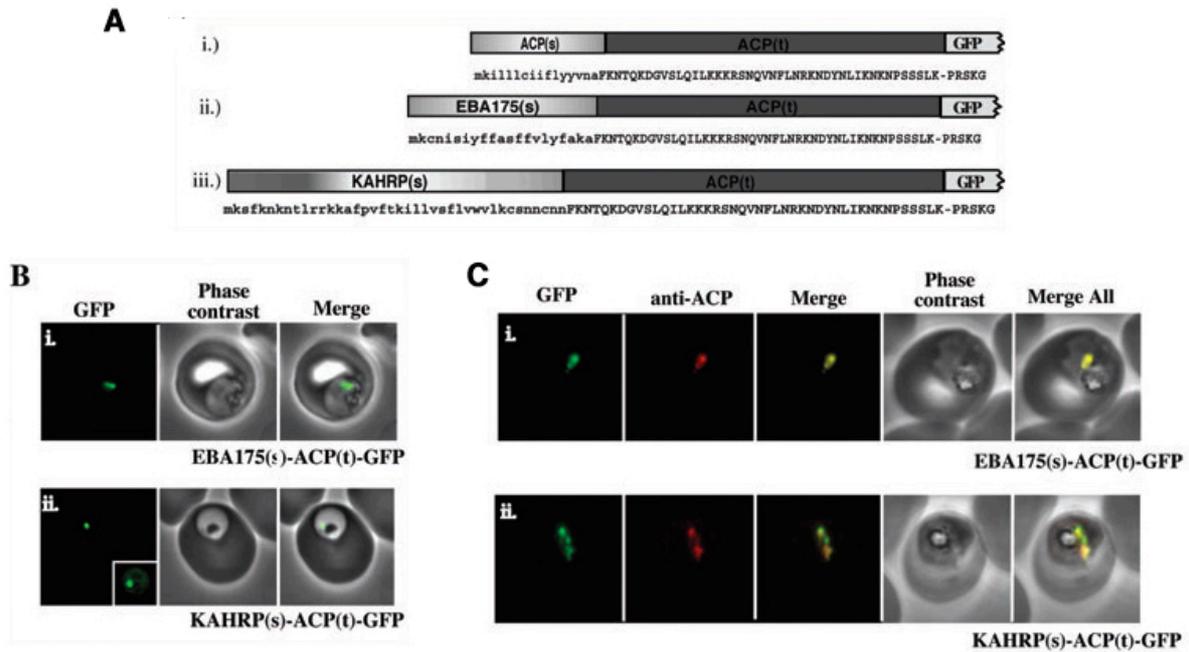


Abb. 12 Die Signalpeptide sekretorischer Proteine sind austauschbar

A) Schemazeichnung der GFP-Fusionskonstrukte, in denen das Signalpeptid des Apikoplastproteins ACP (i) gegen das von EBA-175 (ii) und KAHRP (iii) ausgetauscht wurde. **B)** Die Lokalisation des GFP-Fusionsproteins im Parasiten zeigt eine für den Apikoplasten charakteristische Struktur. Das KAHRP-ACP chimäre Protein weist zusätzlich noch Fluoreszenz im ER auf (B ii kleines Bild). **C)** Die Übereinanderlagerung von GFP-Fluoreszenz mit ACP-spezifischen Antikörpern zeigt eine Ko-Lokalisierung der Proteine und beweist einen korrekten Transport in das Organell.

Zur Untersuchung, ob der sekretorische Transportweg grundsätzlich über den Golgi Apparat verläuft, wurde am C-Terminus des ACP ein ER-Rücktransportsignal (SDEL) eingefügt. Dieses Signal wird in eukaryotischen Zellen in *cis*-Golgi Kompartimenten erkannt und verursacht einen Rücktransport in das ER. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ACP-SDEL Fusionsproteine mit intakten zweiteiligen Signalsequenzen keine Veränderung der Transportroute aufweisen und in den Apikoplasten gelangen. Erst eine funktionale Inaktivierung des Transitpeptids, etwa durch die Veränderung der positiven Nettoladung (Foth *et al.*, 2003), führt zu einem Weitertransport entlang des sekretorischen Transportweges und zu einem Rücktransport aus dem Golgi Apparat in das ER (Abb. 13). Umfangreiche mikroskopische Analysen zeigen im Einlang dazu eine Positionierung des Apikoplasten dicht am ER, bzw. stets mit einer membranösen Ausstülpung assoziiert (nicht gezeigt).

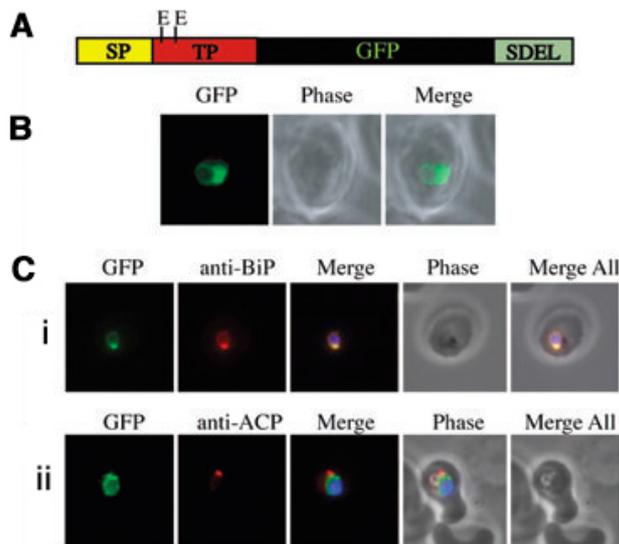


Abb. 13 Apikoplastproteine können über den Golgi Apparat zurück in das ER geführt werden

A) Schemazeichnung des GFP-Fusionskonstruktes nach Einführung saurer Aminosäuren und ER-Signal SDEL. Die negative Ladung verursacht eine funktionale Inaktivierung des Transitpeptids. **B)** Lokalisation von ACP_{EE}-GFP-SDEL im Parasiten. Die funktionale Inaktivierung des Transitpeptids und die Einführung des ER-Signals SDEL bewirkt eine deutlich Apikoplast-abweichende Fluoreszenz. **C)** Ko-Lokalisierung von ACP_{EE}-GFP-SDEL mit dem ER-Marker BiP (i, rot) und dem Apikoplast-Marker ACP (ii, rot). Das GFP-Fusionsprotein überlappt

vollständig mit dem ER-Marker (i, merge), was auf einen Rücktransport in das ER hindeutet. Die Ko-Lokalisierung mit ACP zeigt keine Überlappung der Proteine (ii, merge).

Damit konnte gezeigt werden, dass der Transport von Apikoplastproteinen im ER zwar durch klassische Signalpeptide initiiert wird, jedoch unabhängig vom Golgi Apparat stromaufwärts im sekretorischen Transportweg erfolgt. Dieses Ergebnis konnte mit BFA Experimenten bestätigt werden. Eine Inhibierung des anterograden Vesikeltransports zwischen ER und Golgi Apparat durch BFA zeigte, anders als bei typischen sekretorischen Proteinen, keine Inhibierung, sondern lediglich eine Verlangsamung des Proteintransportes in den Apikoplasten (nicht gezeigt).

4.2.2 Treeck *et al.*, 2006

Alle bekannten Proteine der sekretorischen Organellen werden erst spät in der erythrozytären Lebensphase exprimiert (Bozdech *et al.*, 2003b). Diese Proteine verfügen über ein klassisches Signalpeptid, was ihnen den Eintritt in den sekretorischen Transportweg ermöglicht. EBA-175, sowie EBA181 und EBA140 gehören zur Familie der „erythrocyte binding like“ (EBL) Proteine und sind gut untersuchte Mikronemenproteine. EBL Proteine verfügen über ein N-terminales Signalpeptid, eine adhäsiven Domäne („F1/F2“, bindet mit hoher Affinität an Glykoproteine an der Oberfläche von Erythrozyten), eine, innerhalb der EBL Familie

konservierten cysteinreichen Domäne („3' cytsin-rich region“), eine Transmembrandomäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne (Abb. 14A). Die Fragestellung dieser Arbeit war, welche Sequenzinformation für einen Transport von EBL Proteinen in die Mikronemen notwendig ist. Dazu wurden Deletionsmutanten in *P. falciparum* hergestellt, die ihre endogenen EBL Proteine ohne zytoplasmatische oder zytoplasmatische und Transmembrandomäne exprimieren. Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurden die Deletionsmutanten in transgenen Parasiten analysiert und mit Mikronemen-Markern kolo-kalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Transport von EBA-175, 181 und 140 in die Mikronemen unabhängig sowohl von der zytoplasmatischen als auch der Transmembrandomäne ist. Um den exportvermittelnden Bereich weiter einzuengen, wurden in *P. falciparum* EBA-175-GFP Minigene hergestellt, die verschiedene EBA-175 Domänen-Kombinationen als GFP Fusionsprotein exprimieren (Abb. 14B).

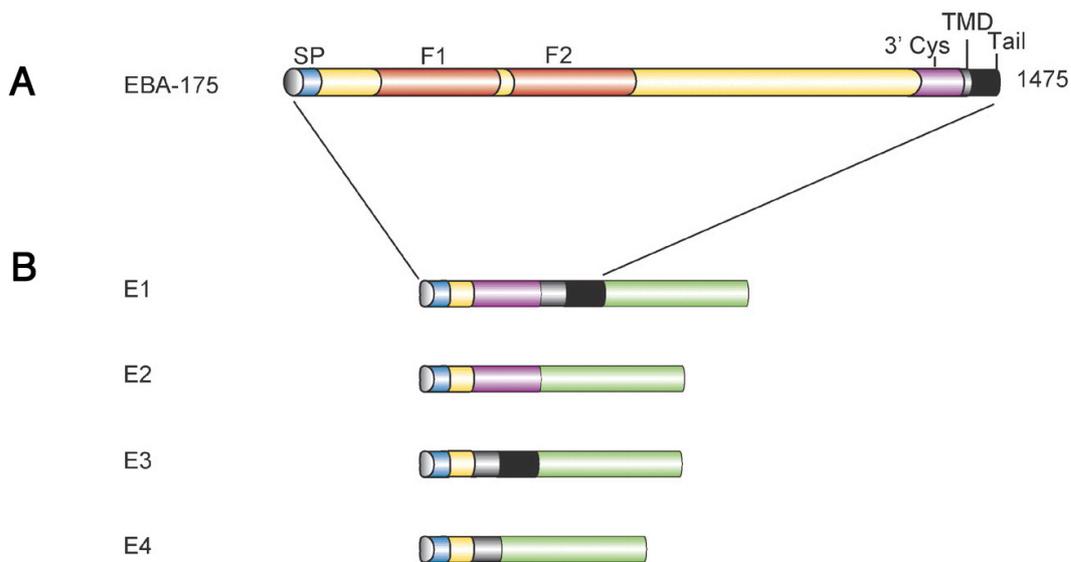


Abb. 14 Domänenstruktur von EBA-175 und Schemazeichnung der EBA-175-GFP Fusionskonstrukte („Minigene“)

A) EBA-175 besitzt ein N-terminales Signalpeptid (SP), eine adhäsive Domäne (F1/F2), eine cysteinreiche Domäne (3' Cys), eine Transmembrandomäne (TMD) und eine kurze zytoplasmatische Domäne (Tail). **B)** Die GFP-Minigene exprimieren unterschiedliche Domänenkombinationen. E1 besitzt alle Domänen außer F1/2, E2 keine Transmembran- und zytoplasmatische Domäne, E3 keine cysteinreiche- und E4 keine cysteinreiche- und Transmembrandomäne.

Es konnte gezeigt werden, dass die notwendigen Sequenzinformationen für einen Weitertransport des Fusionsproteins aus dem ER, bzw. Golgi Apparat in die Mikronemen

innerhalb des 3' cysteinreichen Bereichs liegt. Eine Deletion der 3' cysteinreichen Domäne führt zum Verbleiben der Proteine im Golgi Apparat und Teilen des ER (Abb. 15A und B). Interessanterweise hängt ein zielgerichteter Transport in die Mikronemen nicht nur von bestimmten Sequenzinformationen, sondern auch von einer zeitlich abgestimmten Proteinexpression ab. So gelangen Proteine unter einem konstitutiv aktiven Promotor nicht in die Mikronemen, sondern, entlang des sekretorischen Transportweges, in die parasitophore Vakuole (Abb. 15C).

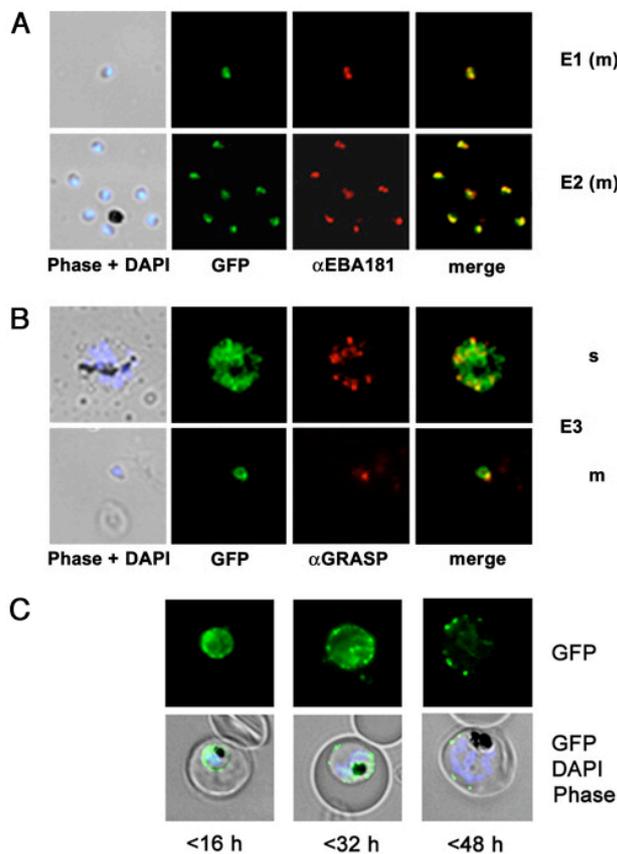


Abb. 15 Lokalisation der EBA-175-GFP Minigene

A) In den transgenen Parasiten E1 und E2 ko-lokalisieren das EBA-175-GFP Fusionsprotein (grün) mit dem Mikronemen-Marker EBA-181 (rot), was in der Überlagerung beider Abbildungen sichtbar wird (merge). Die Zellkerne sind in blau (DAPI) dargestellt.

B) In den transgenen Parasiten E3 (und E4, aber nicht abgebildet) kommt es zu einer Akkumulation des Fusionsproteins im ER und Golgi Apparat. Das GFP-markierte Protein (grün) wurde mit dem Golgi-Marker GRASP (rot) ko-lokalisiert (merge).

C) Unter der Kontrolle eines konstitutiven (*crt*) Promotors bleibt der Transport von E1 (oder E2, nicht abgebildet) in die Mikronemen aus. Es erfolgt eine Ausschleusung entlang des sekretorischen Transportweges in die parasitophore Vakuole. m: Merozoit, s: Schizont, <16h - <48h: vergangene Stunden nach Invasion.

4.2.3 O'Donnell *et al.*, 2006

Das Mikronemenprotein EBA-175 bindet mit hoher Affinität an Glykophorin A, was wiederum der häufigste Oberflächenrezeptor von Erythrozyten ist. Während oder nach der Invasion muss es zu einer proteolytischen Spaltung von EBA-175 kommen, da ein ca. 150 kDa großes Fragment im Überstand von *in vitro* Parasitenkulturen nachgewiesen werden kann

(Reed *et al.*, 2000). Dieser Prozess wird als „shedding“ (engl. für abwerfen) von Oberflächenproteinen bezeichnet (zusammengefasst in O'Donnell und Blackman, 2005).

EBL Proteine weisen wie andere Mikronemenproteine eine Rhomboid Erkennungssequenz innerhalb ihrer TMD auf. Das Ziel dieses Projekts sollte i) die Ermittlung der C-terminalen Sequenz des EBA-175 Fragments aus dem Kulturüberstand, ii) eine Identifikation der für die Prozessierung verantwortlichen Protease, iii) die funktionale Überprüfung der identifizierten Protease in einem heterologen Expressionssystem und iv) die Analyse der biologischen Relevanz der proteolytischen Prozessierung von EBA-175 sein.

Es konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Spaltung von EBA-175 unabhängig von Kalzium ist, jedoch sensitiv auf die Serinprotease-Inhibitoren PMSF und Dichloroisocoumarin reagiert. Aus dem Kulturüberstand wurde EBA-175 aufgereinigt und der C-Terminus des Proteins mit Hilfe der Massenspektrometrie bestimmt.

Es konnte ermittelt werden, dass der C-Terminus innerhalb der EBA-175 TMD liegt und mit den Aminosäuren YYA endet, was auf eine proteolytische Spaltung durch Rhomboid Proteasen hindeutet.

Im Genom des Parasiten konnten acht Gene identifiziert werden, die für Rhomboid-ähnliche Proteine kodieren. Die Genprodukte *PfROM1* und *PfROM4* wurden aufgrund ihres Expressionsprofils für eine weitere Untersuchung ausgewählt und als HA-Fusionsprotein in *Plasmodium* exprimiert. In Immunofluoreszenzuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass *PfROM1* exklusiv in den Mikronemen vorhanden ist, jedoch *PfROM4* auf der Oberfläche von Merozoiten lokalisiert werden kann. Aufgrund dessen wurde *PfROM4* als mögliche „Sheddase“ von EBA-175 weiter untersucht. Dazu wurde *PfROM4* simultan mit einer Reihe unterschiedlicher (verkürzter und mutierter) EBA-175 Minigene in COS-7 Zellen exprimiert. Es konnte mit diesem System gezeigt werden, dass EBA-175 durch *PfROM4* prozessiert wird und das „GA“- Rhomboid-Sequenzmotiv in der TMD von EBA-175 hierfür entscheidend ist. Die biologische Relevanz dieser Rhomboid-Erkennungssequenz wurde durch eine Mutationsanalyse in *P. falciparum* überprüft. Die Mutation eines nicht-funktionalen GA-Motivs in der TMD von EBA-175 hatte keine phänotypische Auswirkung auf die Parasiten, jedoch war die Mutation der Rhomboid-Erkennungssequenz lethal für den Parasiten. Hier kam es (auch nach mehreren Selektionszyklen) nicht zu einer Integration des mutierten Konstruktes in den endogenen *eba-175* Locus, was für die essentielle Natur einer *PfROM4*-abhängigen Prozessierung von EBA-175 für die Invasion spricht.

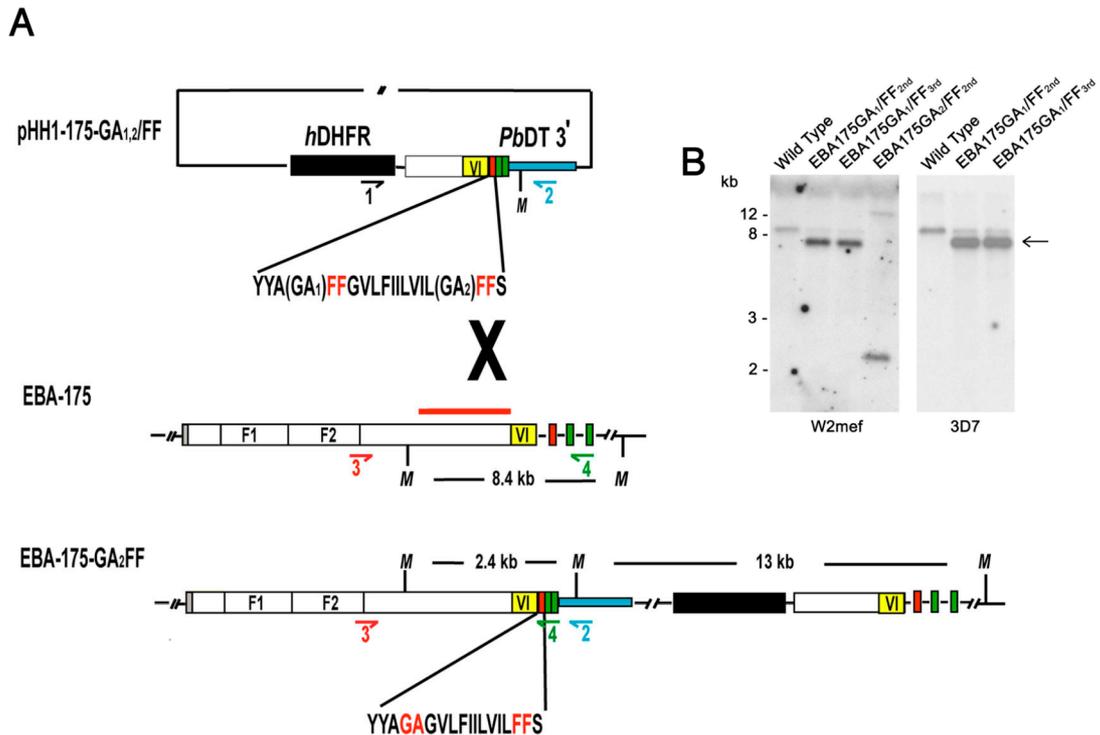


Abb. 16 Mutation des Protease-Erkennungsmotivs in der Transmembrandomäne von EBA-175

A) Schemazeichnung des Transfektionskonstrukts pHH1-175-GA₁/FF und pHH1-175-GA₂/FF. Integration des jeweiligen Vektors in den *eba-175* Locus durch homologe Rekombination führt zum Austausch des 3'-Endes des Gens und zur Insertion der Mutation. Durch diese Strategie konnte die transgene Parasitenlinie pHH1-175-GA₂/FF in zwei verschiedenen Parasitenstämmen (W2mef und 3D7), jedoch nicht pHH1-175-GA₁/FF hergestellt werden. **B)** Mit Hilfe der Southern Blot Analyse konnte die Integration von pHH1-175-GA₂/FF in den *eba-175* Locus gezeigt werden, nicht jedoch von pHH1-175-GA₁/FF. DNA von WT und transgenen Parasiten aus verschiedenen Selektionszyklen (2nd, 3rd) wurden mit *MfeI* verdaut (Schnittstellen sind mit M gekennzeichnet). In WT Parasiten, bzw. ohne Integration des Plasmids wird endogenes *eba-175* durch ein 8,4 kb großes DNA Fragment repräsentiert (W2mef Bahn 1-3 und 3D7 Bahn 1-3). Bei Integration des Plasmids verschwindet die WT Bande und es erscheinen Integrationsbanden von 2,4 und 13 kb (W2mef, Bahn 4). Episomale Plasmidpopulationen stellen sich als 7,5 kb Fragmente dar. hDHFR: humanes Dihydrofolatreduktase-Gen, PbDT 3': 3' Nicht-translatierter Bereich (UTR) des *P. berghei* Dihydrofolatreduktase-Gens. Gelb: 3' cysteinreicher Bereich, rot: TMD, grün: zytoplasmatische Domäne, die Pfeile stehen für Bindungsstellen bestimmter Oligonukleotide, die in RT-PCR Analysen (nicht abgebildet) eingesetzt wurden.

5 DISKUSSION

5.1 Untersuchungen des Golgi Komplexes in *P. falciparum*

5.1.1 Struck *et al.*, 2005

GRASP Proteine sind an der Stapelung von Golgi-Zisternen und an der Zellzyklusregulation beteiligt (Barr *et al.*, 1997; Shorter *et al.*, 1999). Sie werden als Golgi-definierende Matrix-Proteine bezeichnet und wurden schon für die Identifikation und Charakterisierung der Golgi Apparate anderer Protisten genutzt (Short und Barr, 2000; Seemann *et al.*, 2000; Pelletier *et al.*, 2002; He *et al.*, 2004). Durch die Interaktion von GRASP Proteinen mit „coiled-coil“ Proteinen aus der Familie der Golgine bilden sie ein Exoskelett für dieses Organell.

Bisher sind in Säugetierzellen zwei GRASP Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten und Interaktionspartnern beschrieben worden. GRASP65 kommt an *cis*-Golgi Membranen vor und interagiert mit dem Golgin GM130, GRASP55 lokalisiert an medialen Zisternen und bindet Golgin45 (Barr *et al.*, 1997 und 2001).

Wir konnten ein GRASP Homolog im Genom von *P. falciparum* identifizieren, ein Expressionsprofil erstellen und anschließend das putative Golgi Matrix-Protein zur Analyse der Golgi Morphologie und –Dynamik im Parasiten nutzen. Im Gegensatz zu GRASP Proteinen anderer Organismen ist *Pf*GRASP durch die (für *Plasmodium* charakteristischen) Sequenz-Insertionen größer und hat ein Molekulargewicht von 70 kDa. Das Protein weist eine konservierte Domänstruktur und ein N-terminales Myristoilisierungsmotiv auf.

Die GM130 Bindungsdomäne von GRASP65 ist von Hefe- bis zu Säugetierzellen sehr gut konserviert und der genaue Interaktionsbereich konnte als $_{194}\text{GYGXXHRI}_{201}$ identifiziert werden (Barr *et al.*, 1998). Interessanterweise ist diese Region in *P. falciparum* zu $_{205}\text{AYGXXHKI}_{212}$ mutiert, was für veränderte GRASP-interagierende Proteine sprechen könnte. Durch vergleichende Sequenzanalysen in der Genomdatenbank von *P. falciparum* sind im Einklang dazu keine Homologe Proteine von GM130 und Golgin45 zu finden.

Über die Phosphorylierung des Prolin-Serin-reichen C-Terminus von GRASP ist das Protein an der Regulation der Zellteilung beteiligt und ein Substrat von Kaspasen in der Apoptose (Wang *et al.*, 2005; Lane *et al.*, 2002). In *Plasmodium* sind mitotische Kinasen, wie z.B. Cdc-2 verwandte Enzyme, bereits identifiziert und charakterisiert worden (Kappes *et al.*, 1999; LeRoch *et al.*, 2000). Es sind 20 putative Serin-Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von *Pf*GRASP vorhanden. Diese könnten von Kinasen erkannt werden und dem Protein zusätzlich

zur strukturellen auch eine regulative Funktion in *Plasmodium* geben. Eine Inhibierung der GRASP-Phosphorylierung, etwa über cdc2-Cyclin B Kinase Inhibitoren, führte, vermutlich aufgrund der nicht ausreichend spezifischen Inhibierung, zu keinem eindeutigen Ergebnis.

GFP-markierte Fusionsproteine erlauben eine Lokalisierung des Reporters *in vivo*. Dieser transgene Ansatz umgeht eine Fixierung der Zellen und damit auch eventuelle Zerstörungen der Ultrastruktur. Über fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an *PfGRASP-GFP* konnten wir das Fusionsprotein in deutlich fokussierten Bereichen innerhalb des Parasiten visualisieren. Geringe Fluoreszenzmengen im Hintergrund weisen zusätzlich zur membranassoziierten Form auf eine zytoplasmatische Fraktion, was auch schon für Säugetier-GRASP beschrieben worden ist (Ward *et al.*, 2001). Demzufolge befinden sich ca. 30% des endogenen GRASP65 und bis zu 55% des transgenen Proteins im Zytoplasma (Ward *et al.*, 2001). Die Evaluierung des *PfGRASP-GFP* Fusionsproteins erfolgte durch *PfGRASP*-spezifische Antikörper und etablierte *PfGRASP* als Golgi-Marker in *P. falciparum*. Um das Ausmaß der Kompartimentierung zu analysieren, wurden weitere Markerproteine in immunofluoreszenz-basierenden Ko-Lokalisierungsstudien eingesetzt. Die räumliche Beziehung zwischen ER und Golgi Apparat wurde mit dem ER-Marker BiP untersucht. Dieser Antikörper färbt die Kernhülle mit 1-2 Ausstülpungen in jungen (< 24h pi) Parasiten an. Die Vermutung, dass es sich bei den Ausstülpungen um ER Export-kompetente Regionen handelt (ERES), konnte in Ko-Lokalisierungsstudien mit dem ERES-Marker Sec13p ausgeschlossen werden. Das GRASP-GFP definierte Kompartiment ist nicht identisch mit den membranösen Ausstülpungen des ER, allerdings sind sie räumlich dicht miteinander assoziiert. Weitere Untersuchungen zur strukturellen und funktionale Beziehung von ER und Golgi Apparat werden interessante Einblicke über Aufbau und Organisation des sekretorischen Transportweges in *Plasmodium* geben.

Der XDEL-Rezeptor ERD2 erkennt das C-terminale Motiv an „entkommenen“, löslichen ER Proteinen im *cis*-Golgi, bindet sie und transportiert sie zurück ins ER (Lewis und Pelham, 1992; Wilson *et al.*, 1993). Durch die Lokalisation von ERD2 sowohl zum Golgi Apparat, als auch zum ER, wird der Einsatz von ERD2 als Golgi-Marker kontrovers diskutiert (Lingelbach, 1997). Das Protein wird dennoch als *cis*-Golgi-Marker eingesetzt und bereits in *P. falciparum* und *P. yoelii* als fokussierte Strukturen in der Nähe des Zellkerns beschrieben (Elmendorf und Halder, 1993; Noe *et al.*, 2000). Ko-Lokalisierungsstudien mit *PfGRASP-GFP* und *PfERD2*-spezifischen Antikörpern zeigen eine vollständige Überlappung der beiden Kompartimente, was für eine funktionale Ähnlichkeit von *PfGRASP* zu GRASP65 spricht. Die Proteinsequenz weist allerdings eine größere Homologie zum Säugetier GRASP55 (34%

gegenüber 30% zu GRASP65) auf, was entweder an einer limitierten Golgi Kompartimentierung des Parasiten liegt, oder aber tatsächliche funktionale Identität von *PfGRASP* zu GRASP65 widerspiegelt. Die Identifikation eines medialen Golgi-Markers in *P. falciparum* und eine Evaluierung gegen das *PfGRASP*-definierte Kompartiment könnte Aufschluß zu dieser Frage geben.

Eine interessante Beobachtung anderer Arbeitsgruppen ist die Lokalisation des Golgi-Markers Sphingomyelin-Synthase und zwei Homologen des COPII Proteinkomplexes, *PfSar1p* und *PfSec31p*, jenseits des Parasiten, im Zytosol der Wirtszelle (Elmendorf und Halder, 1994; Albano *et al.*, 1999; Adisa *et al.*, 2001; Adisa *et al.*, 2002). Diese Beobachtung wurde für eine Erklärung einer ungewöhnlichen Golgi Struktur im Parasiten genutzt, in denen Bestandteile des COPII Vesikeltransportsystems ins Wirtszellzytoplasma exportiert werden und sich ein parasitärer Proteintransport bis in den Erythrozyten ausbreitet. Beobachtungen von GRASP- und ERD2-GFP exprimierenden Zelllinien zeigen zu keiner Zeit im Lebenszyklus den Reporter im Erythrozyten und sprechen gegen die Existenz eines Golgi Apparates in der Wirtszelle. Das Ausbleiben eines Exports von Sec13p (ein weiterer Bestandteil des COPII Vesikeltransports und gleichzeitig ERES-Marker) über die parasitären Grenzen hinaus und eine komplett fehlende GTPase Aktivität in der Wirtszelle sprechen ebenfalls gegen eine gezielte Ausweitung des Proteintransports in die Wirtszelle (Herrmann *et al.*, Manuskript in Bearbeitung; Frankland *et al.*, 2006).

GRASP Proteine werden über eine N-terminale Myristoilisierung in Golgi Membranen verankert (Barr *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2003). Durch die Mutation des putativen Myristoilisierungsmotivs am N-Terminus von *PfGRASP* konnten wir eine zytoplasmatische Variante erzeugen und somit eine Membranassoziation über N-terminal verknüpftes Myristat zeigen. Eine Verstärkung der Membranverankerung zusätzlich zur Myristoilisierung über Palmitat wurde in Säugetier GRASP55 gezeigt (Kuo *et al.*, 2000). Die Identifizierung von 13 putativen Palmitoyl-Transferasen im Rahmen des Genomprojekts von *Plasmodium* lassen Spekulationen über die Palmitoilierung als Transportsignal oder zur zusätzlichen Membranverankerung zu (Seydel *et al.*, 2005).

Brefeldin A ist ein wichtiges Hilfsmittel, um den Proteintransport im Endomembransystem zu untersuchen (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989 und 1990). Es inhibiert spezifisch den Proteintransport zu post-Golgi Kompartimenten durch Blockierung des anterograden COPII Vesikeltransports zwischen ER und Golgi Apparat. Durch den konstitutiven COPI-vermittelten retrograden Transport vom Golgi zurück zum ER kommt es zur charakteristischen Re-Lokalisierung löslicher Golgi Proteine auf das ER (Tamaki und

Yamashina, 2002; Nebenfuhr *et al.*, 2002), wobei unlösliche Matrix Proteine wie z.B. GRASP durch BFA nicht beeinflusst werden (Nakamura *et al.*, 1997; Pelletier *et al.*, 2002; Seemann *et al.*, 2002). In *P. falciparum* konnte eine Redistribution von ERD2 durch BFA gezeigt, aber keinerlei Auswirkung auf PfGRASP beobachtet werden. Die Möglichkeit der subzellulären Fraktionierung von Bestandteilen des Golgi Apparates in *Plasmodium* erfolgt nicht nur im Einklang zu höheren Eukaryoten, sondern unterstreicht überdies eine potentielle Funktion von PfGRASP als Golgi Matrix Protein.

Die Biogenese des Golgi Apparates wurde mit Hilfe von Zeitraffer Videomikroskopie in *T. gondii* und *T. brucei* beobachtet (Pelletier *et al.*, 2002; He *et al.*, 2004). In *Toxoplasma* folgt auf eine generelle Vergrößerung des Organells eine Zweiteilung, während in Trypanosomen die Biogenese *de novo* erfolgt. In *P. falciparum* setzt eine Duplikation des Golgi Apparates noch vor der Mitose (zwischen 16-24h pi) ein und eine Vervielfachung im Laufe der Schizogonie ermöglicht jedem (formenden) Merozoiten, mit einem Organell ausgestattet zu werden. Ob nun eine Multiplikation des Golgi's wie in *Toxoplasma* durch Zweiteilung (und zwischenzeitlichem Überschuss an Golgi Kompartimenten), oder analog zu den Trypanosomen durch eine *de novo* Biosynthese erfolgt, ist mit dieser Art der Mikroskopie nicht zu beantworten. Die Unempfindlichkeit von PfGRASP gegenüber Mikrotubuli-Depolymerisierern wie z.B. Nocodazole, sowie die Lokalisation des Proteins in die Nähe der ERES sprechen für eine *de novo* Generierung des Organells in *P. falciparum*. Mikroskopische Aufnahmen zeigen jedoch häufig Kompartimente dicht beieinander und im Begriff der Teilung erscheinend (Abb. 17, gelbe Pfeile). Allerdings kann mit dieser Art statischer Bilder eine Teilung nicht wirklich von einer Fusion *de novo* generierter Golgi-Matrix Partikel unterschieden werden, so dass letztlich keine konkreten Aussagen gemacht werden können. Auch ob es sich bei den kleinen vesikulären Strukturen (Abb. 17, weiße Pfeile) im Zytoplasma um neues Material an Export-kompetenten Regionen des ERs handelt bleibt unklar. Möglich wäre, analog zu *Pichia pastoris* (Bevis *et al.*, 2002), die Anwendung beider Mechanismen zur Multiplikation des Golgi Apparates.

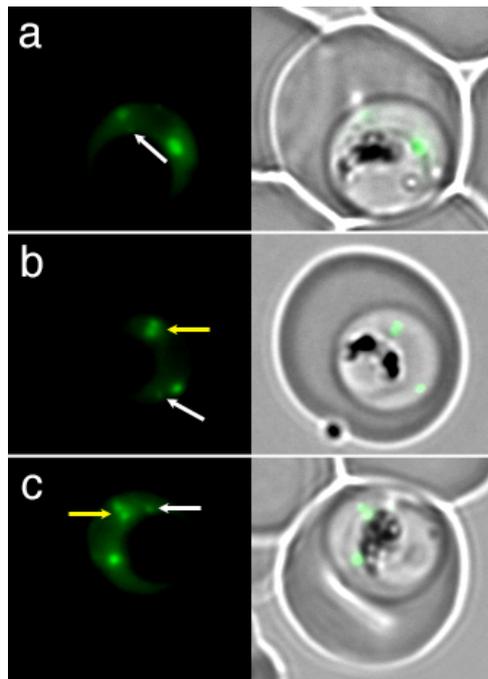


Abb. 17 Biogenese des Golgi Apparates in *P. falciparum*

*Pf*GRASP-GFP exprimierende Parasiten sind in verschiedenen Golgi-Multiplikationsstadien zu sehen (a-c). Zwei fluoreszierende Kompartimente liegen dicht beieinander (b-c, gelbe Pfeile), entweder im Prozess der Teilung oder Fusion. Kleinere Partikel in der Umgebung könnten auf eine *de novo* Biogenese hindeuten (a-c, weiße Pfeile).

5.1.2 Struck *et al.*, 2007

Im Rahmen dieser Arbeit wurde *Pf*GRASP weiter analysiert. Vor einiger Zeit konnte ein Homolog des *grasp* Gens in *P. falciparum* (chr10.phat_187) identifiziert und charakterisiert werden (Struck *et al.*, 2005). Entgegen der ein-Gen-Struktur sind zwei Transkripte vorhanden, die für Proteine mit unterschiedlichem N-Terminus kodieren (*Pf*GRASP1 / *Pf*GRASP2, wobei es sich bei *Pf*GRASP1 um das bereits charakterisierte Protein handelt). Es konnte für *Pf*GRASP1 eine Membranverankerung über N-terminales Myristat gezeigt werden, im Falle von *Pf*GRASP2 bildet ein hydrophober Bereich den N-Terminus, was in bioinformatischen Analysen als Signalankersequenz identifiziert wird.

Alternative Translationsinitiation, bzw. alternatives Spleißen sind gut untersuchte Mechanismen für die Herstellung einer Transkript- bzw. Proteinvielfalt. Es ist ein Weg, um Sequenzen im Genom vielseitiger nutzen zu können. In *Plasmodium* konnte alternatives Spleißen für zahlreiche Gene gezeigt werden (z.B. für die „cyclin dependent kinase“ *Pf*PK6, Bracchi *et al.*, 2000; die „stromal processing peptidase“ *Pf*SPP1, van Dooren *et al.*, 2002, die „adenylyl cyclase“ *Pf*ACalpha, Muhia *et al.*, 2003 oder das mit Invasion zusammenhängende Protein MAEBL, Singh *et al.*, 2004) und auch das *Pfgrasp* Gen führt über eine Spleißvariation (bzw. ein ungepleißtes Transkript) zu zwei Proteinen.

Das GFP-Fusionsprotein GRASP2 ist wie GRASP1 deutlich vom ER abgegrenzt und kommt als perinukleäres Kompartiment vor. Diese Lokalisation wird (im Gegensatz zu GRASP1)

ohne funktionales Myristoilisierungsmotiv erreicht. Eine plausible Erklärung ist der alternative N-Terminus, der durch seine Hydrophobizität eine Membranverankerung vermittelt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der N-Terminus von GRASP2 eine Interaktion mit einem anderen Golgi-ständigen Protein bewirkt und dadurch eine (periphere) Membranlokalisation entsteht. Die biologischen und möglicherweise differentiellen Funktionen von GRASP1 und GRASP2 im Parasiten werden ein interessantes Forschungsgebiet für die Zukunft sein.

Ein wichtiger Bestandteil der tierischen Golgi Matrix sind GRASP Proteine (Short *et al.*, 2005). Daraus können wir schließen, dass nicht nur die eukaryotische Urzelle einen Golgi Apparat besaß, sondern auch schon eine Organisation des Golgi Apparates durch GRASP Proteine stattfand. Das Fehlen von GRASP in Pflanzen ist entweder durch einen evolutiven Genverlust, oder durch starke Modifikation entstanden.

Auch wenn der Golgi Apparat als zentrales Organell des sekretorischen Transportweges in allen eukaryotischen Zellen vorkommt, ist dessen Morphologie dennoch sehr variabel (Farquhar und Palade, 1981; Becker und Melkonian, 1996; Shorter und Warren, 2002; He, 2007). So besitzen Säugetierzellen zahlreiche miteinander verbundene Stapel in der Nähe des Zellkerns (Ladinsky *et al.*, 1999; Mogelsvang *et al.*, 2004) und Pflanzen diskrete Stapel im Zytoplasma verteilt (Da Silva *et al.*, 2004). Der Golgi Apparat von *Saccharomyces cerevisiae* hingegen birgt ungestapelt angeordnete Zisternen im Zytoplasma (Preuss *et al.*, 1992). Parasitische Einzeller wie z.B. *Toxoplasma* und *Trypanosoma* weisen ebenfalls stark abweichende Golgi Morphologien auf. So kommt im ersteren ein einzelnes Golgi Kompartiment, im Erreger der Schlafkrankheit ein einzelner Stapel aus durchschnittlich sechs Zisternen vor (Shorter und Warren, 2002; He, 2007).

5.2 Analyse unterschiedlicher Transportwege, sowie essentieller Transport- und Prozessiersignale im sekretorischen Membransystem von *P. falciparum*

5.2.1 Tonkin *et al.*, 2006

Es sind mindestens 12 verschiedene sub- und extrazelluläre Bestimmungsorte im sekretorischen Transportsystem von *P. falciparum* identifiziert und für einige dieser Transportwege auch essentielle Sequenzmotive beschrieben worden (van Dooren *et al.*, 2000; Waller *et al.*, 2000; Foth *et al.*, 2003, Gilberger *et al.*, 2003; Marti *et al.*, 2004; van Dooren *et*

al., 2005). Signalpeptide vermitteln im Allgemeinen einen ko-translationalen Eintritt in das ER. Im Endomembransystem angelangt, werden Proteine ohne weitere Sequenzmotive entlang des sekretorischen Transportweges an die Plasmamembran transportiert.

In *Plasmodium* vermitteln Signalpeptide ebenfalls eine Translokation durch die ER Membran und dadurch eine Einschleusung ins Endomembransystem. Ohne weitere Sequenzinformationen werden Proteine in einem standardisierten Transportfluss über die Plasmamembran in die parasitophore Vakuole gebracht.

In dieser Studie wurde zunächst untersucht, ob Signalpeptide zusätzliche Informationen enthalten, die möglicherweise einen Eintritt in unterschiedliche sekretorische Transportwege vermitteln können. Proteine, die z.B. in die Erythrozyten exportiert werden, besitzen ungewöhnlich strukturierte Signalpeptide, in denen der hydrophobe Bereich stromabwärts vom N-Terminus abgesetzt ist. Sie werden deshalb als „recessed“ (engl. vertagtes) Signalpeptide bezeichnet, wobei der genaue Funktionsmechanismus noch unbekannt ist. Das Signalpeptid des Apikoplastproteins ACP wurde durch die anderer sekretorischer Proteine ausgetauscht und als GFP-Fusionskonstrukt transfiziert. Verwendet wurden das Signalpeptid des Mikronemenproteins EBA-175 und KAHRP, ein Protein mit abgesetztem („recessed“) Signalpeptid (Crabb *et al.*, 1997; Wickham *et al.*, 2001). Die Lokalisation der resultierenden Fusionsproteine EBA(s)-ACP(t)-GFP und KAHRP(s)-ACP(t)-GFP war trotz substituiertem Signalpeptid unverändert im Apikoplasten vorhanden. Die Tatsache, dass Signalpeptide unterschiedlicher Proteine austauschbar sind und gleichermaßen effizient (Apikoplast-) Proteine an ihr Ziel bringen können, spricht gegen die Existenz unterschiedlicher sekretorischer Transportwege im Parasiten, sondern für einen allgemeinen, anterograden Vesikeltransport aller löslichen sekretorischen Proteine. Das sekretorische Membransystem von *Plasmodium* ist trotz allem eine „abgespeckte“ Version der „klassischen“ eukaryotischen Form. Im Parasiten besteht das ER aus einer Kernhülle und einer ungewöhnlich einfachen Golgi Struktur ohne gestapelte Zisternen (van Wye *et al.*, 1996; Struck *et al.*, 2005; van Dooren *et al.*, 2005). Auch konnten bisher weder ein endosomaler Transportweg beschrieben, noch konventionelle Peroxisomen dargestellt werden (Klemba *et al.*, 2004; McIntosh *et al.*, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte immunfluoreszenz-mikroskopische Analysen demonstrieren eine enge räumliche Beziehung zwischen dem Apikoplasten und dem ER. Der Vergleich mit jüngst durchgeführten elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *P. falciparum* und *T. gondii* konnten dieses Bild bestätigen (Hopkins *et al.*, 1999; McFadden und Roos, 1999). Eine enge Assoziation zwischen komplexen Plastiden und dem ER wurde

bereits in anderen Organismen nachgewiesen. In Heterokonten, Haptophyten und Cryptomonaden z.B. ist die äußerste der vier umhüllenden Membranen fortlaufend mit dem ER und übersät mit Ribosomen. Es erscheint hier, als säße der Plastid im Lumen des ERs.

In *Plasmodium* ist die äußerste Apikoplastenmembran nicht mit Ribosomen besetzt und demnach auch kein Fortlauf des rauen ER, dennoch besteht eine enge räumliche Beziehung, die sich auch funktional, etwa über einen konstitutiven Vesikeltransport oder Membranverbindungen, erweitern könnte.

In *P. falciparum* konnten sowohl ein SDEL-, als auch ein IDEL-Rezeptor identifiziert und charakterisiert werden (Elmendorf und Haldar, 1993; La Greca *et al.*, 1997). Mit dieser Arbeit sollte die Lokalisation des Apikoplasten innerhalb des sekretorischen Transportsystems von *P. falciparum* und in Bezug auf den Golgi Apparat untersucht werden. Dazu wurde zunächst die Transportdominanz des Transitpeptids über das SDEL-Signal analysiert. Es wurden hierfür GFP-markierte Apikoplastproteine hergestellt, in denen ein C-terminales SDEL-Motiv angefügt wurde. Im Falle eines Transportweges über den Golgi Apparat zum Apikoplasten erkennt der SDEL-Rezeptor dieses Motiv noch bevor ein Import in das Organell stattfindet und führt das Fusionskonstrukt zurück zum ER. In diesem Fall säße das Organell im sekretorischen Fluss post-Golgi. Die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine zeigte allerdings keine Veränderung des Transports durch Anfügen des SDEL-Signals, was auf eine „Abzweigung“ zum Apikoplasten vor dem Golgi Apparat, bzw. einen prä-Golgi Standort des Organells schließen lässt. Im Falle von funktionsunfähigen Transitpeptiden, in denen Fusionsproteine ohne SDEL-Signal in die parasitophore Vakuole sekretiert werden (Waller *et al.*, 2000; Foth *et al.*, 2003), kommt es zur Erkennung des Motivs im (*cis*-) Golgi und zu einem Rücktransport des Reporters in das ER. Es konnten allerdings geringe Mengen an Rest-Fluoreszenz im ER und Apikoplasten von jungen, ACP-GFP-SDEL (und KAHRPs-ACPt-GFP) exprimierenden Parasiten, sowohl in *Plasmodium*, als auch in *Toxoplasma* (DeRocher *et al.*, 2005) beobachtet werden. Dieses Phänomen ist am ehesten durch einen verlangsamten anterograden Transport der Fusionsproteine durch transiente Interaktionen mit ER-lokalisiertem ERD2 zu erklären (DeRocher *et al.*, 2005). Gegen ein Lokalisationsartefakt dieser Fusionskonstrukte spricht die Tatsache, dass GFP-Reporterproteine generell erst nach Akkumulierung im Zielorganell mikroskopisch detektierbar sind und nicht bereits während des Transportweges.

Brefeldin A wird in eukaryotischen Zellen eingesetzt, um den sekretorischen Proteintransport zu untersuchen. Dieser Metabolit bindet die Sec7 Domäne der ARF GTPase GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) und hat dadurch einen blockierenden Effekt auf die COPI-

Vesikelbildung am Golgi Apparat. Dies bedingt die Akkumulation bestimmter Faktoren (z.B. v-SNAREs) an Golgi Membranen, was eine kontrollierte und spezifische Fusion von Vesikeln mit ihrer Zielmembran aufhebt und zu einer unkontrollierten Fusion benachbarter ER- und Golgi Membranen führt (Nebenführ *et al.*, 2002). Der Phänotyp dieser physiologischen Aufhebung der ER bzw. Golgi Identität zeigt sich als Transportblockierung löslicher Proteine und einer Re-Distribution dieser Golgi Proteine auf das ER. In *Plasmodium* hat BFA keinen inhibierenden Effekt auf den Proteintransport in den Apikoplasten. Obwohl der Proteintransport in das Organell durch den Inhibitor sichtlich verlangsamt wird, findet trotz allem eine Prozessierung des Transitpeptids im Lumen des Organells statt. Die Lokalisation von GFP-Fusionskonstrukten mit mutierter Signalsequenz (ACPs-GFP und ACPIK_{18/22}E), was ohne BFA zu einem Transport des Reporters in die parasitophore Vakuole führt, zeigt ein Fluoreszenzprofil ähnlich dem postulierten kollabierten Golgi-ER Komplex (Wickham *et al.*, 2001). Untersuchungen zum Transportweg von Apikoplastproteinen im verwandten Organismus *T. gondii* zeigen auch hier, dass die Funktion von Transitpeptiden noch vor denen des ER-Rücktransportsignals in Aktion tritt (Brydges und Carruthers, 2003; DeRocher *et al.*, 2005). Der Proteintransport in den Apikoplasten reagiert, analog zu *Plasmodium*, unempfindlich auf BFA, allerdings findet unter Einfluss der Droge keine proteolytische Prozessierung mehr im Organell statt (DeRocher *et al.*, 2005). DeRocher und Mitarbeiter postulieren, dass zusätzlich zu den ARF-GEF-insensitiven Molekülen andere BFA-abhängige Bestandteile innerhalb des Transportweges für Apikoplastproteine vorhanden sind. Eine Möglichkeit hierfür wäre ein zusätzlicher, vesikelabhängiger Transport, z.B. innerhalb der vier Außenmembranen des Organells (DeRocher *et al.*, 2005). Eine Blockierung innerhalb dieser Membranen würde einen Import in das Lumen und deshalb eine Prozessierung verhindern. Die Akkumulation von Apikoplastproteinen in der Peripherie des Organells bzw. innerhalb der vier Außenmembranen konnte bereits für diverse (mutierte) Fusionskonstrukte in *Toxoplasma* gezeigt werden (He *et al.*, 2001; Harb *et al.*, 2004).

Es konnten im Rahmen dieser Arbeit sowohl eine funktionale, als auch räumliche Assoziation zwischen Apikoplast und ER, und eine Unabhängigkeit zum Golgi Apparat nachgewiesen werden. Im Einklang dazu zeigen immunofluoreszenz-basierende Untersuchungen das Organell stets mit einer membranösen Ausstülpung des ERs assoziiert. Ob es sich bei dieser Ausstülpung um eine Export-kompetente Region des ERs handelt, bzw. sich dort COPII-umhüllte Vesikel abschnüren und dann spezifisch in den Apikoplasten transportiert werden, sind nur einige der zahlreichen Fragen, die es noch zu beantworten gibt.

5.2.2 Treeck *et al.*, 2006

Während der Invasion in die Wirtszelle vermitteln die sekretorischen Organellen des Apikalapparates (Rhoptrien und Mikronemen) eine exozytische Freisetzung von Proteinen. Der zielgerichtete Proteintransport dieser Proteine in die sekretorischen Organellen, sowie die koordinierte Entleerung der Organellen in den Apex bzw. die Umgebung des Merozoiten, sind für den Invasionsvorgang essentiell. Die für einen Transport notwendigen Sequenzinformationen werden vermutlich am Golgi Apparat und TGN des Parasiten erkannt (Bannister *et al.*, 2000; Struck *et al.*, 2005; Haldar und Holder, 1993; Taraschi *et al.*, 1998; Noe *et al.*, 2000) und anschließend spezifisch sortiert, bzw. auf den richtigen subzellulären Transportweg gebracht. Im Rahmen dieser Arbeit (und für EBA-175 bereits gezeigt: Gilberger *et al.*, 2003), konnte ermittelt werden, dass die zytoplasmatische Domäne von EBA140 und 181 nicht für einen Transport in die Mikronemen notwendig ist. Es wurde in erster Linie vermutet, dass die TMD der Proteine am zielgerichteten Transport beteiligt ist, was auch schon für andere Proteine beschrieben worden ist. Z.B. ist die TMD des „proleaurain-binding protein“ (BP80) in Pflanzen notwendig und ausreichend um das Protein in die lytische Vakuole zu transportieren (Jiang und Rogers, 1998). Das GRA4 Protein in den elektronendichten Granula von *Plasmodium* benötigt ebenfalls die Transmembrandomäne für einen korrekten zielgerichteten Transport (Karsten *et al.*, 2004).

Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der zielgerichtete Transport von EBA-175 in die Mikronemen unabhängig von der Membranassoziation des Proteins ist. Die Expression einer luminalen Form des Fusionsproteins (E2) hat den Proteintransport nicht beeinflusst. Das Signalpeptid in Kombination mit dem 3' cysteinreichen Bereich ist notwendig und ausreichend für einen Transport in die Mikronemen. Die Expression des GFP-Minigens ohne einen cysteinreichen Bereich führt zur Aufhebung der Mikronemen-Lokalisation von EBA-175 (und 140/181). Eine ähnliche Situation ist für das lösliche MIC3 Protein (micronemal protein 3) von *T. gondii* beschrieben worden. Der cysteinreiche Bereich des Proteins spielt hier ebenfalls eine zentrale Rolle für den Weitertransport aus dem sekretorischen Transportweg zu den Mikronemen (Striepen *et al.*, 2001).

Obwohl der genaue Funktionsmechanismus hierfür noch unbekannt ist, lässt ein Vergleich der molekularen Interaktionen anderer sekretorischer Proteine während des Sortierungsvorganges eine homo- oder heterophile Protein-Protein-Interaktionen der konservierten Region mit potentiellen Eskorterproteinen, bzw. die Entstehung von Aggregationen vermuten. Als

heterophile Interaktion wird z.B. die Assoziation sekretorischer Proteine mit Organellspezifischen Eskorterproteinen bezeichnet und ist gut beschrieben in Säugetier-, Pflanzen- und Hefezellen (Reiss *et al.*, 2001; Sato und Nakano, 2003; Lefrancois *et al.*, 2003; Humair *et al.*, 2001; Deloche *et al.*, 2001; Meissner *et al.*, 2002; Topolska *et al.*, 2004). Eine homophile Interaktion ist z.B. eine Assoziation mit sich selbst. Solche Mechanismen kommen im luminalen Milieu des sekretorischen Transportweges vor und sollen eine Abgrenzung zwischen der regulierten- und konstitutiven Proteinexpression schaffen (Chanat und Huttner, 1991; Robinson *et al.*, 2005). Die Deletion des cysteinreichen Bereichs könnte die Fähigkeit zur Interaktion oder Aggregation des Proteins zerstören, was zur Inhibierung des Transports führt. Obwohl der cysteinreiche Bereich innerhalb der EBL-Proteinfamilie hoch konserviert ist, besitzen andere Mikronemenproteine, wie z.B. AMA1, mTRAP (merozoite specific TRAP homologue, Baum *et al.*, 2005) oder SUB2 (subtilisin-like protease, Harris *et al.*, 2005) keine solchen Bereiche. Dies könnte auf multiple Mechanismen, Rezeptoren oder Eskorter für den Transport in die Mikronemen hindeuten.

Die Expression der modifizierten Formen E3 und E4 (beide ohne cysteinreichen Bereich) führt zur Akkumulierung des Fusionsproteins im Golgi Apparat und Teilen des ERs. Fehlende zusätzliche Transportsignale, wie z.B. das ER-Rückkehrsignal XDEL (Teasdale und Jackson, 1996) oder andere Retentionssignale (Sonnichsen *et al.*, 1994) führen vermutlich aufgrund einer ineffizienten Rekrutierung in entsprechende Transportvesikel zur Lokalisation im falschen Kompartiment. Außerdem liegen in diesen Konstrukten die hydrophoben Bereiche exponiert vor. Möglicherweise führt eine Qualitätskontrolle im ER dazu, dass diese Konstrukte nicht für einen Weitertransport in Frage kommen und im Lumen degradiert werden (Arvan *et al.*, 2002; Ellgaard *et al.*, 1999; Nehls *et al.*, 2000; Vashist *et al.*, 2001).

Zusammengefasst ist der zielgerichtete Proteintransport von EBA-175 in die Mikronemen von *Plasmodium* zum einen von dem 3'cysteinreichen Bereich, zum anderen von einer entsprechenden stadienspezifischen Expression des Proteins abhängig. Weder der zytoplasmatische- noch die Transmembrandomäne sind für einen Transport notwendig. Es bleibt zu klären, mit welchem Mechanismus die EBL Proteine in die Mikronemen transportiert werden (ist der Transport abhängig von einem Eskorter?) und wie Proteine ohne homologe EBL Domäne in die Mikronemen transportiert werden.

5.2.3 O'Donnell *et al.*, 2006

Zahlreiche Mikronemenproteine werden an die Oberfläche der Merozoiten sekretiert, wo sie eine zentrale Rolle bei der Invasion in die Wirtszelle spielen. Diese Liganden treten anfangs vermutlich als membrangebundene Form auf und interagieren über ihre adhäsiven Domänen mit den Rezeptoren an der Oberfläche ihrer Wirtszelle. Der Invasionsvorgang erfordert eine Prozessierung der Liganden, so dass ein Eintritt in die Zelle nur unter „Abstreifen“ der äußeren Proteinhülle möglich ist. Dieser Vorgang findet für EBA-175 bzw. alle Mitgliedern der DBL-EBPs Proteinfamilie statt.

Im Überstand von *in vitro Plasmodium* Kulturen tritt eine verkürzte bzw. prozessierte Form von EBA-175 auf; das Resultat einer physiologisch wichtigen und präzisen Spaltung innerhalb der TMD durch die Rhomoid Protease PfROM4. Interessanterweise konnte in Invasionsassays eine Prozessierung von EBA-175 gezeigt werden, auch wenn der Parasit dieses nicht als dominanten Liganden für den Eintritt in die Erythrozyten benutzt. Prozessiertes EBA-175 enthält noch den cysteinreichen Bereich (Region VI). Dies erinnert an und steht in Übereinstimmung zu Arbeiten mit *T. gondii* (Brossier *et al.*, 2005; Dowse *et al.*, 2005), in denen gezeigt werden konnte, dass (ROM1) ROM4 und 5 auf der Oberfläche von Tachyzoiten exprimiert werden, wobei ausschließlich TgROM5 eine proteolytische Aktivität gegen Mikronemenproteine besitzt. Damit ist PfROM4 funktional homolog zu TgROM5. Weiterhin konnte eine Konzentrierung der Protease am hinteren Pol des Parasiten gezeigt werden, was vermutlich einer optimalen Lokalisation für die Prozessierung von Transmembranproteinen der Mikronemen entspricht, da diese sich im Laufe der Invasion zum hinteren Ende der Zelle verlagern (Brossier *et al.*, 2005). Es wurde postuliert, dass es sich bei TgROM5 um das „microneme protein protease“ (MPP1, Opitz *et al.*, 2002) handelt, ein Enzym was für die Invasions-abhängige Prozessierung adhäsiver Proteine zuständig ist. Für PfROM4 in *P. falciparum* ist keine besondere Positionierung innerhalb der Plasmamembran erkennbar, obwohl Zeitpunkt der Expression und subzelluläre Lokalisation auf eine mögliche Beteiligung an der EBA-175 Prozessierung hindeuten. Frühzeitige Untersuchungen der Enzymaktivität von Rhomboid Proteasen ergaben, dass die Substraterkennung lediglich ein Helix-unterbrechendes Motiv (GA oder GG) an der luminalen Seite innerhalb der Transmembrandomäne erfordert (Urban und Freeman, 2003). Im Laufe der Zeit zeigten sich zusätzliche Strukturen an der N- (Opitz *et al.*, 2002; Brossier *et al.*, 2003; Pascall und Brown, 2004) oder C-terminalen (Lohi *et al.*, 2004) Seite der TMD, die wichtig für die Substraterkennung sind. Um essentielle Sequenzelemente für eine EBA-175 Prozessierung

innerhalb der TMD zu erfassen, wurde die cysteinreiche und zytoplasmatische Domäne in einem „Minigen“-Ansatz verwendet und simultan mit Rhomboid Proteasen in einem heterologen Expressionssystem exprimiert. Von drei getesteten Proteasen konnte nur PfROM4 das Substrat EBA-175 erkennen und prozessieren. Dieses impliziert eine gewisse Substratspezifität. Eine Substitution der Aminosäure Alanin des GA Motivs oder das Entfernen des Motivs selbst (GA₁) führt zur Aufhebung der Prozessierung, obwohl gewisse Ergebnisse (etwa die fehlende Prozessierung von PfROM1 oder *Drosophila*-Rho1) darauf hinweisen, dass das Motiv alleine für eine Substraterkennung nicht ausreicht.

Eukaryotische Rhomboids lassen sich in zwei Gruppen einteilen: RHO (verkörpert durch *Drosophila melanogaster* Rho-1) und PARL (verkörpert durch mitochondriale „presenilins-associated rhomboid-like protein“, Koonin *et al.*, 2003). PfROM1 und 4 ähneln beide mehr dem *Drosophila* Rho-1, allerdings unterscheidet sich PfROM4 strukturell sowohl von Rho-1, als auch von PfROM1, durch die (vorhergesagte) Ausbildung von ungewöhnlich großen Schleifenstrukturen („loops“) zwischen der 1. und 2., sowie 6. und 7. TMD, und allgemein verlängerten N- bzw. C-Termini (Dowse und Soldati, 2005). Diese Strukturen könnten für die Erkennung von EBA-175 von Bedeutung sein. Region VI von EBA-175 ist wichtig sowohl für die strukturelle Integrität des Proteins, als auch dem zielgerichteten Proteintransport in die Mikronemen (Reed *et al.*, 2000) und könnte gleichermaßen für die Erkennung durch PfROM4 eine wichtige Rolle spielen.

EBA-175 ist der dominante DBL-EBP Ligand in W2mef Parasiten. Die Auswirkungen von Mutationen innerhalb der EBA-175 TMD auf das Invasionsverhalten, bzw. auf die PfROM4-vermittelte Prozessierung wurden deshalb in diesem Parasiten-Stamm untersucht. W2mef Parasiten exprimieren bereitwillig einen GA₂ (ein nicht funktionales GA-Motiv) Knockout, wobei die Herstellung lebensfähiger GA₁ Sequenzmutanten, sowohl in W2mef, als auch in 3D7, nicht möglich war. Eine Inaktivierung von EBA-175 durch Entfernung der zytoplasmatischen Domäne (Gilberger *et al.*, 2003) oder TMD (Reed *et al.*, 2000) ist allerdings sowohl in 3D7 als auch in W2mef Parasiten möglich, obwohl dadurch in W2mef ein Umschalten auf einen EBA-175-unabhängigen Invasionsweg bewirkt wird. Möglicherweise muß membrangebundenes EBA-175 von der Oberfläche des Merozoiten abgestreift werden, auch wenn es sich nicht um den dominanten, invasionsvermittelnden Liganden handelt. Eine Hypothese besagt, dass eine Dimerisierung von EBA-175 funktional notwendig ist (Tolia *et al.*, 2005). Im Falle einer Heterodimer-Ausbildung mit Liganden anderer DBL-EBPs, könnte die Unfähigkeit einer Abstreifung von der Merozoitenoberfläche einen dominant-negativen Effekt auf die Invasion selbst ausüben. Eine alternative

Möglichkeit ist, dass ein Defekt in der EBA-175 Prozessierung zu einem (unüberbrückbaren) physikalischen Hindernis der Invasion wird. Unprozessiertes EBA-175 könnte an der definierten „moving junction“ akkumulieren und somit eine Rekrutierung weiterer DBL-EBPs an diese Region und einen gleitenden Eintritt in die Wirtszelle verhindern. In Einklang dazu wirkt sich eine Verhinderung der Prozessierung von *TgMIC6* in *Toxoplasma* durch Mutation von MPP1 ebenfalls letal auf die Parasiten *in vitro* aus, obwohl dieser Ligand nicht essentiell für die Invasion der Parasiten ist (Opitz *et al.*, 2002).

Eine Inaktivierung des *Pfrom4* Gens durch homologe Rekombination ist nicht gelungen, was auf eine essentielle Funktion in der erythrozytären Lebensphase weist. Wir konnten im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass eine Invasion in die Erythrozyten von mindestens zwei Serinproteasen abhängig ist, *PfSUB2* und *PfROM4*. Frühere Studien mit Proteaseinhibitoren demonstrierten im Einklang dazu eine Abhängigkeit der Invasion von mehr als nur einer Serinprotease (Hadley *et al.*, 1983). Damit ist ein neuer Angriffspunkt für die Medikamentenentwicklung gegen Malaria, basierend auf Proteaseinhibitoren, definiert.

6 LITERATUR

- Abu-Raddad**, L.J., Patnaik, P., Kublin, J.G. (2006). Dual infection with HIV and malaria fuels the spread of both diseases in sub-Saharan Africa. *Science* **314**: 1603-6.
- Adam**, R.D. (1991). The biology of *Giardia spp.* *Microbiol Rev.* **55**: 706-32.
- Adams**, J.H., Blair, P.L., Kaneko, O., Peterson, D.S. (2001). An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* **17**: 297-9.
- Adisa**, A., Albano, F.R., Reeder, J., Foley, M., Tilley, L. (2001). Evidence for a role for a *Plasmodium falciparum* homologue of Sec31p in the export of proteins to the surface of malaria parasite-infected erythrocytes. *J Cell Sci.* **114**: 3377-86.
- Adisa**, A., Rug, M., Foley, M., Tilley, L. (2002). Characterisation of a delta-COP homologue in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* **123**: 11-21.
- Aikawa**, M. (1971). Parasitological review. *Plasmodium*: the fine structure of malarial parasites. *Exp Parasitol.* **30**: 284-320.
- Albano**, F.R., Berman, A., La Greca, N., Hibbs, A.R., Wickham, M., Foley, M., Tilley, L. (1999). A homologue of Sar1p localises to a novel trafficking pathway in malaria-infected erythrocytes. *Eur J Cell Biol.* **78**: 453-62.
- Alonso**, P.L., Sacarlal, J., Aponte, J.J., Leach, A., Macete, E., Milman, J., Mandomando, I., Spiessens, B., Guinovart, C., Espasa, M., *et al.* (2004). Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* **364**: 1411-20.
- Alonso**, P.L. (2006). Malaria: deploying a candidate vaccine (RTS,S/AS02A) for an old scourge of humankind. *Int Microbiol.* **9**: 83-93.
- Archibald**, J.M. und Keeling, P.J. (2002). Recycled plastids: a 'green movement' in eukaryotic evolution. *Trends Genet.* **18**: 577-584.
- Arvan**, P., Zhao, X., Ramos-Castaneda, J., and Chang, A. (2002). Secretory pathway quality control operating in Golgi, plasmalemmal, and endosomal systems. *Traffic* **3**: 771-780.
- Baker**, D., Hicke, L., Rexach, M., Schleyer, M., Schekman, R. (1988). Reconstitution of SEC gene product-dependent intercompartmental protein transport. *Cell* **54**: 335-44.
- Bannister**, L.H., Hopkins, J.M., Fowler, R.E., Krishna, S., Mitchell, G.H. (2000). A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol Today* **16**, 427-433.
- Bannister**, L.H., Hopkins, J.M., Dluzewski, A.R., Margos, G., Williams, I.T., Blackman, M.J., Kocken, C.H., Thomas, A.W., Mitchell, G.H. (2003). *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *J Cell Sci.* **116**: 3825-34.
- Bannykh**, S.I., Rowe, T., Balch, W.E. (1996). The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J Cell Biol.* **135**: 19-35.
- Barlowe**, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**: 895-907.
- Barlowe**, C. (2000). Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic* **1**: 371-7.
- Barlowe**, C. (2002). COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol.* **14**: 417-22.
- Barr**, F.A., Puype, M., Vandekerckhove, J., Warren, G. (1997). GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell* **91**: 253-62.
- Barr**, F.A., Nakamura, N., Warren, G. (1998). Mapping the interaction between GRASP65 and GM130, components of a protein complex involved in the stacking of Golgi cisternae. *EMBO J.* **17**: 3258-68.
- Barr**, F. A., Preisinger, C., Kopajtich, R. and Korner, R. (2001). Golgi matrix proteins interact with p24 cargo receptors and aid their efficient retention in the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **155**: 885-891.
- Baum**, J., Maier, A.G., Good, R.T., Simpson, K.M., Cowman, A.F. (2005). Invasion by *P. falciparum* merozoites suggests a hierarchy of molecular interactions. *PLoS Pathog.* **1**: e37.
- Baumann**, O., Walz, B. (2001). Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol.* **205**: 149-214.
- Becker**, B., Melkonian, M. (1996). The secretory pathway of protists: spatial and functional organization and evolution. *Microbiol Rev.* **60**: 697-721.

- Bender, A., van Dooren, G.G., Ralph, S.A., McFadden, G.I, Schneider, G. (2003).** Properties and prediction of mitochondrial transit peptides from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* **132**: 59-66.
- Bevis, B. J., Hammond, A. T., Reinke, C. A. and Glick, B. S. (2002).** *De novo* formation of transitional ER sites and Golgi structures in *Pichia pastoris*. *Nat. Cell Biol.* **4**: 750-756.
- Borrmann, S., Adegnik, A.A., Matsiegui, P.B., Issifou, S., Schindler, A., Mawili-Mboumba, D.P., Baranek, T., Wiesner, J., Jomaa, H., Kremsner, P.G. (2004).** Fosmidomycin-clindamycin for *Plasmodium falciparum* Infections in African children. *J Infect Dis.* **189**: 901-8.
- Bozdech, Z., Llinas, M., Pulliam, B.L., Wong, E.D., Zhu, J., DeRisi J.L. (2003).** The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol.* **1**: E5.
- Bozdech, Z., Zhu, J., Joachimiak, M.P., Cohen, F.E., Pulliam, B., DeRisi, J.L. (2003b).** Expression profiling of the schizont and trophozoite stages of *Plasmodium falciparum* with a long-oligonucleotide microarray. *Genome Biol.* **4**: R9.
- Bracchi-Ricard, V., Barik, S., Delvecchio, C., Doerig, C., Chakrabarti, R., Chakrabarti, D. (2000).** *Pf*PK6, a novel cyclin-dependent kinase/mitogen-activated protein kinase-related protein kinase from *Plasmodium falciparum*. *Biochem J.* **347**: 255-63.
- Brossier, F., Jewett, T.J., Lovett, J.L., Sibley, L.D. (2003).** C-terminal processing of the *Toxoplasma* protein MIC2 is essential for invasion into host cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 6229–6234.
- Brossier, F., Jewett, T.J., Sibley, L.D., Urban, S. (2005).** A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 4146–4151.
- Brydges, S.D., and Carruthers, V.B. (2003).** Mutation of an unusual mitochondrial targeting sequence of SODB2 produces multiple targeting fates in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* **116**: 4675–4685.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., Strelkov, S.V. (2001).** Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* **11**: 82-8.
- Butler, D., Maurice, J., O'Brien, C. (1997).** Time to put malaria control on the global agenda. *Nature* **386**: 535-6.
- Butler, D. (2002).** What difference does a genome make? *Nature* **419**: 426-428.
- Carlton, J.M., Angiuoli, S.V., Suh, B.B., Kooij, T.W., Pertea, M., Silva, J.C., Ermolaeva, M.D., Allen, J.E., Selengut, J.D., et al. (2002).** Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature* **419**: 512-519.
- Carruthers, V.B., Sibley, L.D. (1991).** Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol.* **31**: 421-8.
- Carruthers, V.B., Sibley, L.D. (1997).** Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* **73**: 114-23.
- Carruthers, V.B., Giddings, O.K., Sibley, L.D. (1999).** Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell Microbiol.* **1**: 225-35.
- Carruthers, V.B., Sherman, G.D., Sibley, L.D. (2000).** The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. *J Biol Chem.* **275**: 14346-53.
- Chanat, E., and Huttner, W. B. (1991).** *J Cell Biol.* **115**: 1505-1519
- Chattopadhyay, D., Rayner, J., McHenry, A.M., Adams, J.H. (2006).** The structure of the *Plasmodium falciparum* EBA175 ligand domain and the molecular basis of host specificity. *Trends Parasitol.* **22**: 143-5.
- Cluett, E.B., Brown, W.J. (1992).** Adhesion of Golgi cisternae by proteinaceous interactions: intercisternal bridges as putative adhesive structures. *J Cell Sci.* **103**: 773-84.
- Cowman, A.F., Crabb, B.S. (2006).** Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* **124**: 755-66.
- Crabb, B.S., Cooke, B.M., Reeder, J.C., Waller, R.F., Caruana, S.R., Davern, K.M., et al. (1997).** Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell* **89**: 287–296.
- Culvenor, J.G., Day, K.P., 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.
- Da Silva, E., Foley, M., Dluzewski, A.R., Murray, L.J., Anders, R.F., Tilley, L. (1994).** The *Plasmodium falciparum* protein RESA interacts with the erythrocyte cytoskeleton and modifies erythrocyte thermal stability. *Mol Biochem Parasitol.* **66**: 59-69.
- Da Silva, L.L., Snapp, E.L., Denecke, J., Lippincott-Schwartz, J., Hawes, C., and Brandizzi, F. (2004).** Endoplasmic reticulum export sites and Golgi bodies behave as single mobile secretory units in plant cells. *Plant Cell* **16**: 1753–1771.
- De Souza, W. (2005).** Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochem Cell Biol.* **123**: 1-18.

- Deloche**, O., Yeung, B. G., Payne, G. S., and Schekman, R. (2001). Vps10p transport from the trans-Golgi network to the endosome is mediated by clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell* **12**: 475-485.
- DeRocher**, A., Gilbert, B., Feagin, J.E., and Parsons, M. (2005). Dissection of Brefeldin A-sensitive and -insensitive steps in apicoplast protein targeting. *J Cell Sci.* **118**: 565–574.
- Dowse**, T.J., Pascall, J.C., Brown, K.D., Soldati, D. (2005). Apicomplexan rhomboids have a potential role in microneme protein cleavage during host cell invasion. *Int. J. Parasitol.* **35**: 747–756.
- Dowse**, T.J., Soldati, D. (2005). Rhomboid-like proteins in Apicomplexa: phylogeny and nomenclature. *Trends Parasitol.* **21**: 254-8.
- Duraisingh**, M.T., Maier, A.G., Triglia, T., Cowman, A.F. (2003). Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 4796-801.
- Ellgaard**, L., Molinari, M., and Helenius, A. (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**: 1882-1888.
- Elmendorf**, H.G., Haldar, K. (1993). Identification and localization of ERD2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: separation from sites of sphingomyelin synthesis and implications for organization of the Golgi. *EMBO J.* **12**: 4763-73.
- Elmendorf**, H.G., Haldar, K. (1993b). Secretory transport in *Plasmodium*. *Parasitol Today* **9**: 98-102.
- Elmendorf**, H.G., 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.
- Farquhar**, M.G., Palade, G.E. (1981). The Golgi apparatus (complex) - (1954-1981) - from artifact to center stage. *J Cell Biol.* **91**: 77-103.
- 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., *et al.* (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* **419**: 520-6.
- Foley**, M., Tilley, L., Sawyer, W.H., Anders, R.F. (1991). The ring-infected erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum* associates with spectrin in the erythrocyte membrane. *Mol Biochem Parasitol.* **46**: 137-47.
- Foth**, B.J., Ralph, S.A., Tonkin, C.J., Struck, N.S., Fraunholz, M., Roos, D.S., Cowman, A.F., McFadden, G.I. (2003). Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* **299**: 705-8.
- Franke**, W.W., Kartenbeck, J., Krien, S., Vander-Woude, W.J., Scheer, U., Morre, D.J. (1972). Inter- and intracisternal elements of the Golgi apparatus. A system of membrane-to-membrane cross-links. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* **132**: 365-80.
- Frankland**, S., Adisa, A., Horrocks, P., Taraschi, T.F., Schneider, T., Elliott, S.R., Rogerson, S.J., Knuepfer, E., Cowman, A.F., Newbold, C.I., Tilley, L. (2006). Delivery of the malaria virulence protein PfEMP1 to the erythrocyte surface requires cholesterol-rich domains. *Eukaryot Cell.* **5**: 849-60.
- Gardner**, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, *et al.* (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**: 498-511.
- Gardner**, M.J., Shallom, S.J., Carlton, J.M., Salzberg, S.L., Nene, V., Shoaibi, A., Ciecko, A., Lynn, J., Rizzo, M., Weaver, *et al.* (2002b). Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14. *Nature* **419**: 531-534.
- Gibbs**, S.P. (1978). The chloroplasts of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. *Can. J. Bot.* **56**: 2882-2889.
- Gilberger**, T.W., Thompson, J.K., Reed, M.B., Good, R.T., Cowman, A.F. (2003). The cytoplasmic domain of the *Plasmodium falciparum* ligand EBA-175 is essential for invasion but not protein trafficking. *J Cell Biol.* **162**: 317-27.
- Gilles**, H.M. (1981). The six diseases of WHO. *Malaria. Br Med J Clin Res Ed.* **283**: 1382-5.
- Gray**, M.W. (1992). The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* **141**: 233 - 257.
- Hadley**, T., M. Aikawa, and L.H. Miller. (1983). *Plasmodium knowlesi*: studies on invasion of rhesus erythrocytes by merozoites in the presence of protease inhibitors. *Exp. Parasitol.* **55**: 306–311.
- Hall**, N., Pain, A., Berriman, M., Churcher, C., Harris, B., Harris, D., Mungall, K., Bowman, S., Atkin, R., Baker, S., *et al.* (2002). Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 1, 3-9 and 13. *Nature* **419**: 527-531.
- Hammen**, P.K., Weiner, H. (1998). Mitochondrial leader sequences: structural similarities and sequence differences. *J Exp Zool.* **282**: 280-3.

- Harb**, O.S., Chatterjee, B., Fraunholz, M.J., Crawford, M.J., Nishi, M., and Roos, D.S. (2004). Multiple functionally redundant signals mediate targeting to the apicoplast in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell* **3**: 663–674.
- Harris**, P.K., Yeoh, S., Dluzewski, A.R., O'Donnell, R.A., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Bannister, L.H., Mitchell, G.H., Blackman, M.J. (2005). Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. *PLoS Pathog.* **1**: 241-51.
- Harris**, K.S., Casey, J.L., Coley, A.M., Masciantonio, R., Sabo, J.K., Keizer, D.W., Lee, E.F., McMahon, A., Norton, R.S., Anders, R.F., Foley, M. (2005b). Binding hot spot for invasion inhibitory molecules on *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect Immun.* **73**: 6981-9.
- He**, C.Y., Shaw, M.K., Pletcher, C.H., Striepen, B., Tilney, L.G., and Roos, D.S. (2001). A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* **20**: 330–339.
- He**, C. Y., Ho, H. H., Malsam, J., Chalouni, C., West, C. M., Ullu, E., Toomre, D. and Warren, G. (2004). Golgi duplication in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.* **165**: 313-321.
- He**, C. (2007). Golgi biogenesis in simple eukaryotes. *Cell Microbiol.* **9**: 566-72.
- Heese-Peck**, A., Raikhel, N.V. (1998). The nuclear pore complex. *Plant Mol Biol.* **38**: 145-62.
- Hiller**, N.L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estrano, C., Haldar, K. (2004). A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* **306**: 1934-7.
- Hopkins**, J., Fowler, R., Krishna, S., Wilson, I., Mitchell, G., and Bannister, L. (1999). The plastid in *Plasmodium falciparum* asexual blood stages: a three-dimensional ultrastructural analysis. *Protist* **150**: 283–295.
- Hoppe**, H.C., Ngo, H.M., Yang, M., Joiner, K.A. (2000). Targeting to rhoptry organelles of *Toxoplasma gondii* involves evolutionarily conserved mechanisms. *Nat Cell Biol.* **2**: 449-56.
- Humair**, D., Hernandez Felipe, D., Neuhaus, J. M., Paris, N. (2001). Demonstration in yeast of the function of BP-80, a putative plant vacuolar sorting receptor. *Plant Cell* **13**: 781-792.
- Hyman** RW, F.E., Conway A, Kurdi O, Mao J, Miranda M, Nakao B, Rowley D, Tamaki T, Wang F. (2002). Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosome 12. *Nature* **419**: 534-537.
- Jiang**, L. and Rogers, J.C. (1998). Integral membrane protein sorting to vacuoles in plant cells: evidence for two pathways. *J Cell Biol* **143**: 1183-99.
- Joiner**, K.A., Roos, D.S. (2002). Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J Cell Biol.* **157**: 557-63.
- Jomaa**, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Turbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H.K. *et al.* (1999). Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285**: 1573-1576.
- Kappes**, B., Doerig, C. D. and Graeser, R. (1999). An overview of *Plasmodium* protein kinases. *Parasitol. Today* **15**: 449-454.
- Karsten**, V., Hegde, R. S., Sinai, A. P., Yang, M., and Joiner, K. A. (2004). Transmembrane domain modulates sorting of membrane proteins in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* **279**: 26052-26057.
- Kats**, L.M., Black, C.G., Proellocks, N.I., Coppel, R.L. (2006). *Plasmodium* rhoptries: how things went pear-shaped. *Trends Parasitol.* **22**: 269-76.
- Klemba**, M., Beatty, W., Gluzman, I., and Goldberg, D.E. (2004). Trafficking of plasmepsin II to the food vacuole of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Cell Biol.* **164**: 47–56.
- Koonin**, E.V., Makarova, K.S., Rogozin, I.B., Davidovic, L., Letellier, M.C., Pellegrini, L. (2003). The rhomboids: a nearly ubiquitous family of intramembrane serine proteases that probably evolved by multiple ancient horizontal gene transfers. *Genome Biol.* **4**: R19.
- Kumar**, N., Koski, G., Harada, M., Aikawa, M., Zheng, H. (1991). Induction and localization of *Plasmodium falciparum* stress proteins related to the heat shock protein 70 family. *Mol Biochem Parasitol.* **48**: 47-58.
- Kuo**, A., Zhong, C., Lane, W. S. and Derynck, R. (2000). Transmembrane transforming growth factor- α tethers to the PDZ domain-containing, Golgi membrane-associated protein p59/GRASP55. *EMBO J.* **19**: 6427-6439.
- Ladinsky**, M.S., Mastrorade, D.N., McIntosh, J.R., Howell, K.E., and Staehelin, L.A. (1999) Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J Cell Biol* **144**: 1135–1149.
- 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**: 283–293.

- Lane, J. D., Lucocq, J., Pryde, J., Barr, F. A., Woodman, P. G., Allan, V. J. and Lowe, M. (2002).** Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *J. Cell Biol.* **156**: 495-509.
- 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**: 537-542.
- Le Roch, K.G., Zhou, Y., Blair, P.L., Grainger, M., Moch, J.K., Haynes, J.D., De La Vega, P., Holder, A.A., Batalov, S., Carucci, D.J., Winzeler, E.A. (2003).** Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science*. **301**: 1487-8.
- Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A. J., Canuel, M., and Morales, C. R. (2003).** The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *Embo J.* **22**: 6430-6437.
- Lewis, M.J., Pelham, H.R. (1990).** A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* **348**: 162-3.
- Lewis, M.J., Sweet, D.J., Pelham, H.R. (1990).** The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell* **61**: 1359-63.
- Liaud, M.F., Valentin, C., Martin, W., Bouget, F.Y., Kloareg, B., Cerff, R. (1994).** The evolutionary origin of red algae as deduced from the nuclear genes encoding cytosolic and chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Chondrus crispus*. *J. Mol. Evol.* **38**: 319-327.
- Lingelbach, K.R. (1993).** *Plasmodium falciparum*: a molecular view of protein transport from the parasite into the host erythrocyte. *Exp Parasitol.* **76**: 318-27.
- Lingelbach, K. (1997).** Protein trafficking in the Plasmodium-falciparum-infected erythrocyte--from models to mechanisms. *Ann Trop Med Parasitol.* **91**: 543-9.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L. C., Bonifacino, J. S. and Klausner, R. D. (1989).** Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with Brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* **56**: 801-813.
- Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J. G., Schweizer, A., Berger, E. G., Hauri, H. P., Yuan, L. C. and Klausner, R. D. (1990).** Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of Brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* **60**: 821-836.
- Lohi, O., S. Urban, and M. Freeman. (2004).** Diverse substrate recognition mechanisms for rhomboids; thrombomodulin is cleaved by mammalian rhomboids. *Curr. Biol.* **14**: 236-241.
- Maier, A.G., Duraisingh, M.T., Reeder, J.C., Patel, S.S., Kazura, J.W., Zimmerman, P.A., Cowman, A.F. (2003).** *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. *Nat Med.* **9**: 87-92.
- Mandavilli, A. (2006).** Health agency backs use of DDT against malaria. *Nature* **443**: 250-1.
- Marti, M., Li, Y., Schraner, E.M., Wild, P., Kohler, P., Hehl, A.B. (2003).** The secretory apparatus of an ancient eukaryote: protein sorting to separate export pathways occurs before formation of transient Golgi-like compartments. *Mol Biol Cell.* **14**:1433-47.
- Marti, M., Regos, A., Li, Y., Schraner, E.M., Wild, P., Muller, N., Knopf, L.G., Hehl, A.B. (2003b).** An ancestral secretory apparatus in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *J Biol Chem.* **278**: 24837-48.
- Marti, M., Good, R.T., Rug, M., Knuepfer, E., Cowman, A.F. (2004).** Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* **306**: 1930-3.
- Marti, M., Baum, J., Rug, M., Tilley, L., Cowman, A.F. (2005).** Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte. *J Cell Biol.* **171**: 587-92.
- Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hansmann, S., Hasegawa, M., Kowallik K. (1998).** Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**: 162-165.
- Mattei, D., Berry, L., Couffin, S., Richard, O. (1999).** The transport of the histidine-rich protein I from *Plasmodium falciparum* is insensitive to Brefeldin A. *Novartis Found Symp.* **226**: 215-26.
- McFadden, G.I., Reith, M.E., Munholland, J., Lang-Unnasch, N. (1996).** Plastid in human parasites. *Nature* **381**: 482.
- McFadden, G.I. (1999).** Plastids and protein targeting. *J. Euk. Microbiol.* **46**: 339-346.
- McFadden, G.I., und Roos, D.S. (1999).** Apicomplexan plastids as drug targets. *Trends Microbiol.* **7**: 328-333.
- McIntosh, M.T., Elliott, D.A., and Joiner, K.A. (2005).** *Plasmodium falciparum*: discovery of peroxidase active organelles. *Exp Parasitol.* **111**: 133-136.
- Meissner, M., Reiss, M., Viebig, N., Carruthers, V.B., Toursel, C., Tomavo, S., Ajioka, J.W., Soldati, D. (2002).** A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorters. *J Cell Sci.* **115**: 563-574.

- Mogelsvang**, S., Marsh, B.J., Ladinsky, M.S., and Howell, K.E. (2004) Predicting function from structure: 3D structure studies of the mammalian Golgi complex. *Traffic* **5**: 338–345.
- Moreira**, D., Le Guyader, H., Philippe, H. (2000). The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. *Nature* **405**: 69-72.
- Muhia**, D.K., Swales, C.A., Eckstein-Ludwig, U., Saran, S., Polley, S.D., Kelly, J.M., Schaap, P., Krishna, S., Baker, D.A. (2003). Multiple splice variants encode a novel adenylyl cyclase of possible plastid origin expressed in the sexual stage of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. **278**: 22014-22.
- Munro**, S., Pelham, H.R. (1997). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**: 899-907.
- Nakamura**, N., Lowe, M., Levine, T. P., Rabouille, C. and Warren, G. (1997). The vesicle docking protein p115 binds GM130, a *cis*-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell* **89**: 445-455.
- Nebenfuhr**, A., Ritzenthaler, C. and Robinson, D. G. (2002). Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol*. **130**: 1102-1108.
- Nehls**, S., Snapp, E. L., Cole, N. B., Zaal, K. J., Kenworthy, A. K., Roberts, T. H., Ellenberg, J., Presley, J. F., Siggia, E., and Lippincott-Schwartz, J. (2000) *Nat Cell Biol* **2**, 288-295.
- Neupert**, W., Brunner, M. (2002). The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **3**: 555-65.
- Ngo**, H.M., Yang, M., Paprotka, K., Pypaert, M., Hoppe, H., Joiner, K.A. (2003). AP-1 in *Toxoplasma gondii* mediates biogenesis of the rhoptry secretory organelle from a post-Golgi compartment. *J Biol Chem*. **278**: 5343-52.
- Nilsson**, T., Hoe, M.H., Slusarewicz, P., Rabouille, C., Watson R, Hunte F, Watzele G, Berger EG, Warren G. (1994). Kin recognition between medial Golgi enzymes in HeLa cells. *EMBO J*. **13**:562-74.
- Nilsson**, T., Warren, G. (1994). Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol*. **6**: 517-21.
- 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**, 169-185.
- Novick**, P., Field, C., Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**: 205-15.
- O'Donnell**, R.A., Blackman, M.J. (2005). The role of malaria merozoite proteases in red blood cell invasion. *Curr Opin Microbiol*. **8**: 422-7.
- Opitz**, C., Di Cristina, M., Reiss, M., Ruppert, T., Crisanti, A., Soldati, D. (2002). Intramembrane cleavage of microneme proteins at the surface of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO J*. **21**: 1577–1585.
- Orlandi**, P.A., Klotz, F.W., Haynes, J.D. (1992). A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac(alpha 2-3)Gal- sequences of glycophorin A. *J Cell Biol*. **116**: 901-9.
- Palade** G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**: 347-58.
- Pascall**, J.C., Brown, K.D. (2004). Intramembrane cleavage of ephrinB3 by the human rhomboid family protease, RHBDL2. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **317**: 244–252.
- Pelletier**, L., Stern, C.A., Pypaert, M., Sheff, D., Ngo, H.M., Roper, N., He, C.Y., Hu, K., Toomre, D., Coppens, I., Roos, D.S., Joiner, K.A., Warren, G. (2002). Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Nature* **418**: 548-52.
- Pfeffer**, S.R., Rothman, J.E. (1987). Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu Rev Biochem*. **56**: 829-52.
- Preuss**, D., Mulholland, J., Franzusoff, A., Segev, N., and Botstein, D. (1992) Characterization of the *Saccharomyces* Golgi complex through the cell cycle by immunoelectron microscopy. *Mol Biol Cell* **3**: 789–803.
- Ralph**, S.A., van Dooren, G.G., Waller, R.F., Crawford, M.J., Fraunholz, M.J., Foth, B.J., Tonkin, C.J., Roos, D.S., McFadden, G.I. (2004). Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat Rev Microbiol*. **2**: 203-16.
- Reed**, M.B., Caruana, S.R., Batchelor, A.H., Thompson, J.K., Crabb, B.S., 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. USA*. **97**: 7509–7514.
- Reiss**, M., Viebig, N., Brecht, S., Fourmaux, M. N., Soete, M., Di Cristina, M., Dubremetz, J.F., Soldati, D. (2001). Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol*. **152**: 563-578.
- Richards**, T.A. und Cavalier-Smith, T. (2005). Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* **436**: 1113-8.

- Robinson, D.G.,** Hinz, G., Holstein, S.E. (1998). The molecular characterization of transport vesicles. *Plant Mol Biol.* **38**: 49-76.
- Robinson, D. G.,** Oliviusson, P., and Hinz, G. (2005). Protein sorting to the storage vacuoles of plants: a critical appraisal. *Traffic* **6**: 615-625.
- Rossanese, O.W.,** Soderholm, J., Bevis, B.J., Sears, I.B., O'Connor, J., Williamson, E.K., Glick, B.S. (1999). Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* **145**: 69-81.
- Rothman, J.E.** (1981). The golgi apparatus: two organelles in tandem. *Science* **213**: 1212-9.
- Rothman, J.E.,** Orci, L. (1992). Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* **355**: 409-15.
- Rug, M.,** Wickham, M.E., Foley, M., Cowman, A.F., Tilley, L. (2004). Correct promoter control is needed for trafficking of the ring-infected erythrocyte surface antigen to the host cytosol in transfected malaria parasites. *Infect Immun.* **72**: 6095-105.
- Sato, K.,** and Nakano, A. (2003). Endoplasmic reticulum quality control of unassembled iron transporter depends on Rer1p-mediated retrieval from the golgi. *Mol Biol Cell* **14**: 3065-3063.
- Schatz, G.,** Dobberstein, B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**: 1519-1526.
- Schlüter, K.** (2006). Prodrugs von Fosmidomycin-Derivaten (Dissertation). Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Universität Hamburg.
- Seemann, J.,** Jokitalo, E., Pypaert, M., Warren, G. (2000). Matrix proteins can generate the higher order architecture of the Golgi apparatus. *Nature* **407**: 1022-6.
- Seemann, J.,** Pypaert, M., Taguchi, T., Malsam, J., Warren, G. (2002). Partitioning of the matrix fraction of the Golgi apparatus during mitosis in animal cells. *Science* **295**: 848-51.
- Semenza, J.C.,** Hardwick, K.G., Dean, N., Pelham, H.R. (1990). ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* **61**: 1349-57.
- Serafini, T.,** Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R.A., Rothman, J.E. (1991). ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* **67**: 239-53.
- Seydel, K.B.,** Gaur, D., Aravind, L., Subramanian, G., Miller, L.H. (2005). *Plasmodium falciparum*: characterization of a late asexual stage golgi protein containing both ankyrin and DHHC domains. *Exp Parasitol.* **110**: 389-93.
- Shimizu, Y.,** Hendershot, L.M. (2007). Organization of the functions and components of the endoplasmic reticulum. *Adv Exp Med Biol.* **594**: 37-46.
- Short, B.,** Barr, F. A. (2000). The Golgi apparatus. *Curr. Biol.* **10**: R583- R585.
- Short, B.,** Haas, A., Barr, F.A. (2005). Golgins and GTPases, giving identity and structure to the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta.* **1744**: 383-95.
- Shorter, J.,** Watson, R., Giannakou, M.E., Clarke, M., Warren, G., Barr, F.A. (1999). GRASP55, a second mammalian GRASP protein involved in the stacking of Golgi cisternae in a cell-free system. *EMBO J.* **18**: 4949-60.
- Shorter, J.** und Warren, G. (2002). Golgi architecture and inheritance. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **18**: 379-420.
- Sim, B.K.,** Orlandi, P.A., Haynes, J.D., Klotz, F.W., Carter, J.M., Camus, D., Zegans, M.E., Chulay, J.D. (1990). Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion. *J Cell Biol.* **111**: 1877-84.
- Singh, N.,** Preiser, P., Renia, L., Balu, B., Barnwell, J., Blair, P., Jarra, W., Voza, T., Landau, I., Adams, J.H. (2004). Conservation and developmental control of alternative splicing in maebl among malaria parasites. *J Mol Biol.* **343**: 589-99.
- Snow RW, G.C.,** Noor AM, Myint HY, Hay SI. (2005). The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **434**: 214-217.
- Sonnichsen, B.,** Fullekrug, J., Nguyen Van, P., Diekmann, W., Robinson, D. G., and Mieskes, G. (1994). CaBP1, a calcium binding protein of the thioredoxin family, is a resident KDEL protein of the ER and not of the intermediate compartment. *J Cell Sci.* **107**: 2705-2717.
- Spiess, M.** (1995). Heads or tails - what determines the orientation of proteins in the membrane. *FEBS Lett.* **369**: 76-9.
- Storch, V.,** Welsch, U. (1994). Kurzes Lehrbuch der Zoologie. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg.
- Striepen, B.,** Soldati, D., Garcia-Reguet, N., Dubremetz, J. F., and Roos, D. S. (2001) *Mol Biochem Parasitol.* **113**: 45-53.

- Surolia**, N., Padmanaban, G. (1991). Chloroquine inhibits heme-dependent protein synthesis in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**: 4786-90.
- Tamaki**, H. and Yamashina, S. (2002). Structural integrity of the Golgi stack is essential for normal secretory functions of rat parotid acinar cells: effects of Brefeldin A and okadaic acid. *J. Histochem. Cytochem.* **50**: 1611-1623.
- Tang**, B.L., Wong, S.H., Qi, X.L., Low, S.H., Hong, W. (1993). Molecular cloning, characterization, subcellular localization and dynamics of p23, the mammalian KDEL receptor. *J Cell Biol.* **120**: 325-38.
- Taraschi**, T. F., Trelka, D., Schneider, T., and Matthews, I. (1998). *Plasmodium falciparum*: characterization of organelle migration during merozoite morphogenesis in asexual malaria infections. *Exp Parasitol.* **88**: 184-193.
- Taraschi**, T.F., O'Donnell, M., Martinez, S. Schneider, T., Trelka, D., Fowler, V.M., Tilley, L., Moriyama, Y. (2003). Generation of an erythrocyte vesicle transport system by *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Blood* **102**: 3420-6.
- Teasdale**, R. D., and Jackson, M. R. (1996). Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **12**: 27-54.
- Thompson**, J.K., Triglia, T., Reed, M.B., 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.
- Tolia**, N.H., E.J. Enemark, B.K. Sim, and L. Joshua-Tor. (2005). Structural basis for the EBA-175 erythrocyte invasion pathway of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell* **122**:183-193.
- Tonkin**, C.J., van Dooren, G.G., Spurck, T.P., Struck, N.S., Good, R.T., Handman, E., Cowman, A.F., McFadden, G.I. (2004). Localization of organellar proteins in *Plasmodium falciparum* using a novel set of transfection vectors and a new immunofluorescence fixation method. *Mol Biochem Parasitol.* **137**: 13-21.
- Tonkin**, C.J., Pearce, J.A., McFadden, G.I., Cowman, A.F. (2006b). Protein targeting to destinations of the secretory pathway in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Curr Opin Microbiol.* **9**: 381-7.
- Topolska**, A.E., Lidgett, A., Truman, D., Fujioka, H. and Coppel, R.L. (2004). Characterization of a membrane-associated rhoptry protein of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* **279**: 4648-4656.
- Trelka**, D.P., Schneider, T.G., Reeder, J.C., Taraschi, T.F. (2000). Evidence for vesicle-mediated trafficking of parasite proteins to the host cell cytosol and erythrocyte surface membrane in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol.* **106**: 131-45.
- Urban**, S., Lee, J.R., Freeman, M. (2001). *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* **107**: 173-82.
- Urban**, S., Lee, J.R., Freeman, M. (2002). A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all *Drosophila* membrane-tethered EGF ligands. *EMBO J.* **21**: 4277-86.
- Urban**, S., Freeman, M. (2003). Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Mol Cell.* **11**: 1425-34.
- Van Dooren**, G.G., Waller, R.F., Joiner, K.A., Roos, D.S., McFadden, G.I. (2000). Traffic jams: protein transport in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* **16**: 421-7.
- Van Dooren**, G.G., Su, V., DiOmbrain, M.C., McFadden, G.I. (2002). Processing of an apicoplast leader sequence in *Plasmodium falciparum*, and the identification of a putative leader cleavage enzyme. *J Biol Chem.* **277**: 23612-23619.
- Van Dooren**, G.G., Marti, M., Tonkin, C.J., Stimmler, L.M., Cowman, A.F., McFadden, G.I. (2005). Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* **57**: 405-19.
- Van Geertruyden**, J.P., Mulenga, M., Kasongo, W., Polman, K., Colebunders, R., Kestens, L., D'Alessandro, U. (2006). CD4 T-cell count and HIV-1 infection in adults with uncomplicated malaria. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **43**: 363-7.
- Van Wye**, J., Ghori, N., Webster, P., Mitschler, R.R., Elmendorf, H.G., Haldar, K. (1996). Identification and localization of rab6, separation of rab6 from ERD2 and implications for an 'unstacked' Golgi, in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* **83**: 107-20.
- Vashist**, S., Kim, W., Belden, W. J., Spear, E. D., Barlowe, C., and Ng, D. T. (2001). *J Cell Biol.* **155**: 355-368.
- Vollmer**, M., Thomsen, N., Wiek, S., Seeber, F. (2001). Apicomplexan Parasites Possess Distinct Nuclear-encoded, but Apicoplast-localized, Plant-type Ferredoxin- NADP⁺ Reductase and Ferredoxin. *J Biol Chem* **276**: 5483-5490.
- Waller**, R.F., Reed, M.B., Cowman, A.F., McFadden, G.I. (2000). Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. *EMBO J.* **19**: 1794-802.
- Wang**, Y., Seemann, J., Pypaert, M., Shorter, J., Warren, G. (2003). A direct role for GRASP65 as a mitotically regulated Golgi stacking factor. *EMBO J.* **22**: 3279-90.

- Wang, Y., Satoh, A., Warren, G. (2005).** Mapping the functional domains of the Golgi stacking factor GRASP65. *J Biol Chem.* **280**: 4921-8.
- Ward, T. H., Polishchuk, R. S., Caplan, S., Hirschberg, K. and Lippincott-Schwartz, J. (2001).** Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *J. Cell Biol.* **155**: 557-570.
- Waters, M.G., Serafini, T., Rothman, J.E. (1991).** 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* **349**: 248-51.
- Wickham, M.E., Rug, M., Ralph, S.A., Klonis, N., McFadden, G.I., Tilley, L., Cowman, A.F. (2001).** Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *EMBO J.* **20**: 5636-49.
- Williamson, D.H., Preiser, P.R., Moore, P.W., McCready, S., Strath, M., Wilson, R.J. (2002).** The plastid DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is replicated by two mechanisms. *Mol Microbiol.* **45**: 533-42.
- Wilson, D. W., Lewis, M. J. and Pelham, H. R. (1993).** pH-dependent binding of KDEL to its receptor *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **268**: 7465-7468.
- Wilson, R.J., Williamson, D.H., Preiser, P. (1994).** Malaria and other Apicomplexans: the "plant" connection. *Infect Agents Dis.* **3**: 29-37.
- Wilson, R.J., Denny, P.W., Preiser, P.R., Rangachari, K., Roberts, K., Roy, A., Whyte, A., Strath, M., Moore, D.J., Moore, P.W., Williamson, D.H. (1996).** Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol.* **261**: 155-72.

7 ANHANG

7.1 Anteile der Autorin an den Publikationen

- 7.1.1 Anteile der Autorin an der vorgelegten Veröffentlichung „Re-defining the Golgi complex in *Plasmodium falciparum* using the novel Golgi marker PfGRASP“ (Struck *et al.*, 2005).

Die dargestellten Fragestellungen, Methoden und Ergebnisse wurden von Frau Struck unter der Leitung von Dr. Gilberger ausgearbeitet, durchgeführt und ausgewertet. Technische Assistenz wurde von den Koautoren der Arbeitsgruppe Malaria II (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin) geleistet. Antikörper wurden von M. Marti und J.A. Pierce (Walter and Eliza Hall Institute for Medical Research, Melbourne, Australien) zur Verfügung gestellt. Der Artikel wurde von den Autoren gemeinsam verfasst.

- 7.1.2 Anteile der Autorin an der vorgelegten Veröffentlichung „GRASPing the Golgi – evidence of a GRASP splice variant in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*“ (Struck *et al.*, 2007, Manuskript eingereicht).

Die dargestellten Fragestellungen, Methoden und Ergebnisse wurden von Frau Struck unter der Leitung von Dr. Gilberger ausgearbeitet, durchgeführt und ausgewertet. Technische Assistenz wurde von den Koautoren der Arbeitsgruppe Malaria II (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin) geleistet. Konzeptionelle Beiträge wurden von M. Marti, A. Cowman (Walter and Eliza Hall Institute for Medical Research, Melbourne, Australien) und Bernardo Foth (Nanyang Technological University, School of Biological Sciences, Singapore) geliefert. Der Artikel wurde von den Autoren gemeinsam verfasst.

- 7.1.3 Anteile der Autorin an der vorgelegten Veröffentlichung „Evidence for Golgi-independent transport from the early secretory pathway to the plastid in malaria parasites“ (Tonkin *et al.*, 2006).

Die konzeptionelle Ausarbeitung zur Thematik der Golgi-Abhängigkeit von Apikoplastproteinen anhand der SDEL-Konstrukte, sowie die Klonierung, Transfektion und Mikroskopie von KAHRP(s)-ACP(t)-GFP wurde von Frau Struck durchgeführt.

7.1.4 Anteile der Autorin an der vorgelegten Veröffentlichung „A conserved region in the EBL-Proteins is implicated in Microneme targeting of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*“ (Treeck *et al.*, 2006).

Die Autorin war massgeblich an der konzeptionellen Ausarbeitung der EBA-175-GFP Deletionsmutanten („Minigene“) beteiligt. Die Mutagenese und Klonierung der EBA-175-GFP Fusionskonstrukte unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *crt* Promotors, sowie alle Transfektionen wurden von Frau Struck durchgeführt. Der Artikel wurde von den Autoren gemeinsam verfasst.

7.1.5 Anteile der Autorin an der vorgelegten Veröffentlichung „Intramembrane proteolysis mediates shedding of a key adhesin during erythrocyte invasion by the malaria parasite“ (O'Donnell *et al.*, 2006).

Die Autorin war an der konzeptionellen Ausarbeitung der *in vivo* Funktionsanalyse des Rhomboid-Erkennungsmotivs massgeblich beteiligt. Die transgenen Parasitenlinien wurden von ihr hergestellt.

7.2 Publikationen