

**Untersuchung der Funktionalität alternativer *Plasmodium*
Export Elemente anhand ausgewählter Proteine des
Malariaerregers *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften, der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jana Schulze

aus Hamburg

Hamburg im Januar 2015

Tag der Disputation: 10.03.2015

Folgende Gutachter haben die Dissertation zur Annahme empfohlen:

1. Gutachter: Prof. Dr. Thorsten Burmester
2. Gutachterin: Prof. Dr. Iris Bruchhaus

Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung.....	VI
II Abkürzungsverzeichnis	VIII

1 Einleitung	1
1.1 Malariaerreger.....	1
1.2 Klinik der Malaria.....	3
1.2.1 Krankheitsbild.....	3
1.2.2 Malariatherapie- und prophylaxe	3
1.2.3 Vektorkontrolle	5
1.3. Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	5
1.3.1 Geschlechtliche Vermehrung in der <i>Anopheles</i> -Mücke	6
1.3.2 Ungeschlechtliche Vermehrung im Menschen	7
1.3.2.1 Das Leberstadium.....	7
1.3.2.2 Das Blutstadium	8
1.4. Wirtszellmodifikationen	9
1.4.1 Modifikationen am Hepatozyten	10
1.4.2 Modifikationen am Erythrozyten durch <i>P. falciparum</i>	10
1.4.2.1 Modifikationen in mit Gametozyten-infizierten Erythrozyten durch <i>P. falciparum</i>	12
1.5 Proteinexport	13
1.5.1 Das PEXEL-Motiv.....	13
1.5.2 Der Transportmechanismus	14
1.5.3 Die Plastizität des PEXEL-Motivs	16
1.5.4 PNEPs.....	17
1.6 Zielsetzung.....	18
2 Material & Methoden	20
2.1 Materialien	20
2.1.1 Verwendete Chemikalien	20
2.1.2 Verwendete Geräte	20
2.1.3 Enzyme	23
2.1.4 Kommerzielle Kits	23
2.1.5 Vektoren	24
2.1.6 Antikörper.....	24
2.1.7 DNA- und Proteinstandards	25
2.1.8 Oligonukleotide	25
2.1.9 Verwendete Stämme.....	27
2.1.10 Nährmedien und Agarplatten	28
2.1.11 Übernachtkulturen	28

2.1.12 Dauerkulturen	28
2.1.13 Programme.....	28
2.1.14 Datenbanken	29
2.2 Molekularbiologische Methoden	29
2.2.1 Isolierung von genomischer DNA	29
2.2.2 Isolierung von RNA	29
2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure	30
2.2.4 Reverse Transkription.....	30
2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
2.2.5.1 Overlap-Extension-PCR (OE-PCR)	32
2.2.6 Nukleinsäure-Gelelektrophorese	33
2.2.6.1 DNA-Gelelektrophorese	33
2.2.6.2 RNA-Gelelektrophorese.....	33
2.2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	34
2.2.7.1 Aufreinigung mit dem Gelextraktions-Kit.....	34
2.2.7.2 Ethanolfällung	34
2.2.8 Restriktionsverdau.....	34
2.2.9 Klonierung	35
2.2.9.1 Ligation	36
2.2.9.1.1 Ligation in pGEM-T	36
2.2.9.1.2 Ligation in pJET1.2/blunt.....	36
2.2.9.1.3 Ligation in pARL1a(-)	36
2.2.9.2 Transformation.....	37
2.2.9.3 Identifizierung positiver Klone mittels Kolonie-PCR.....	37
2.2.10 Präparation von Plasmid-DNA.....	37
2.2.11 Sequenzierung der Plasmid-DNA	38
2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	38
2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	38
2.3.2 Coomassie-Färbung.....	39
2.3.3 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen.....	40
2.3.4 Immunologische Detektion	40
2.4 Zellbiologische Methoden	41
2.4.1 Kultivierung von <i>P. falciparum</i>	41
2.4.2 Giemsa-Färbung von Blutausstrichen	41
2.4.3 Herstellung von Kryo-Dauerstabilaten	42
2.4.3 Auftauen von Kryo-Dauerstabilaten.....	42
2.4.4 Synchronisation von <i>P. falciparum</i> -Kulturen.....	42
2.4.5 Transfektion von <i>P. falciparum</i>	43

2.4.6 Saponinlyse.....	44
2.4.7 Percollgradient	44
2.4.8 Tetanolsynthese	45
2.4.9 Immunpräzipitation von GFP-Fusionsproteinen	46
2.4.10 Massenspektrometrie	46
2.5 Mikroskopische Methoden	47
2.5.1 Durchlichtmikroskopie	47
2.5.2 Fluoreszenzmikroskopie	47
2.5.2.1 Auswertung von Fluoreszenzbildern mit Hilfe des Programms „ImageJ“	47
2.5.3 Lebendfärbung mit Bodipy-TR-C ₅ -Ceramid	48
2.5.4 Immunfluoreszenzanalysen (IFA)	48
3 Ergebnisse.....	49
3.1 Überprüfung der Funktionalität alternativer PEXEL-Motive mit Hilfe der Proteine KAHRP, REX3 und GBP	49
3.1.1 Lokalisation der Reporterproteine KAHRP, REX3 und GBP	50
3.1.1.1 Lokalisation des Reporterproteins KAHRP	50
3.1.1.2 Lokalisation des Reporterproteins REX3	51
3.1.1.3 Lokalisation des Reporterproteins GBP.....	53
3.1.2 Quantifizierung des Exports der Reporterproteine KAHRP, REX3 und GBP.....	54
3.1.2.1 Quantifizierung des Exports des Reporterproteins KAHRP	55
3.1.2.2 Quantifizierung des Exports des Reporterproteins REX3	56
3.1.2.3 Quantifizierung des Exports des Reporterproteins GBP	58
3.1.3 Untersuchung der Funktionalität des K.L.E-Motivs anhand ausgewählter Reporterproteine mittels Massenspektrometrie	59
3.1.3.1 Massenspektrometrische Analyse von REX3 ¹⁻⁷⁰ -KQLSE-GFP	59
3.1.3.2 Massenspektrometrische Analyse von GBP ¹⁻¹⁰⁸ -KILAE-GFP und GBP ¹⁻¹⁰⁸ -AILAE-GFP	61
3.2 Untersuchung der Funktionalität alternativer PEXEL-Motive anhand von ausgewählten Proteinen <i>in vivo</i>	62
3.2.1 Charakterisierung von zwei Proteinen mit einem klassischen PEXEL-Motiv	64
3.2.2 Lokalisation der Kandidaten mit einem R.I.E- bzw. R.I.Q-Motiv	66
3.2.3 Lokalisation der Kandidaten mit einem K.L.E-Motiv	70
3.2.4 Lokalisation der Kandidaten mit einem K.L.D-Motiv.....	76
3.2.5 Lokalisation der Kandidaten mit einem K.L.Q-Motiv	78
3.2.6 Lokalisation der Kandidaten mit einem K.L.T -Motiv	82
3.2.7 Lokalisation des Kandidaten mit einem H.L.Q -Motiv	83
3.2.8 Lokalisation der Kandidaten mit einem K.I.E/D-Motiv	86
3.3 Überprüfung der Funktionalität des alternativen PEXEL-Motivs von PFC0085c, PFI1780w und PFL0045c.....	90
3.3.1 Überprüfung der Funktionalität des alternativen PEXEL-Motivs von PFC0085c.....	91

3.3.2 Überprüfung der Funktionalität des alternativen PEXEL-Motivs von PFI1780w.....	94
3.3.3 Überprüfung der Funktionalität des alternativen PEXEL-Motivs von PFL0045c	97
3.4 Charakterisierung der Aminosäureposition 2 und 4 des PEXEL-Motivs anhand des Reporterproteins REX3	99
4 Diskussion	100
4.1 Manche alternative PEXEL sind in den Reporterproteinen REX3 und GBP funktionell.....	101
4.2 Endogene <i>P. falciparum</i> -Proteine mit alternativem PEXEL-Motiv lokalisieren in unterschiedlichen Kompartimenten	104
4.2.1 Nicht exportierte Proteine lokalisieren im ER oder assoziieren mit der PV/PVM.....	104
4.2.2 Exportierte Proteine assoziieren mit wichtigen Virulenzstrukturen	107
4.3 Sind PEXEL-Motive mit geladenen Aminosäuren an Position 2 und 4 funktionell?	112
4.4 Handelt es sich bei den exportierten Proteinen wirklich um Proteine mit funktionellem alternativem PEXEL-Motiv oder um PNEPs?	113
4.5 Die Bedeutung des Sequenzumfeldes bei Proteinen mit alternativem PEXEL-Motiv.....	118
4.6 Fazit	119
5 Literaturverzeichnis	121
 Anhang	 142
Danksagung	156
Eidesstattliche Erklärung	157

I Zusammenfassung

Malaria ist eine durch einzellige Parasiten verursachte Infektionskrankheit, die bis zu 700.000 Todesfälle pro Jahr verursacht. Bis heute ist kein kommerzieller Impfstoff vorhanden und Resistenzen gegen gängige Malariamedikamente und Insektizide verbreiten sich. Als wichtigster humanpathogener Erreger gilt *Plasmodium falciparum*, da dieser für die meisten Todesfälle verantwortlich ist. Die hohe Pathogenität von *P. falciparum* ist auf die Modifikationen an der Wirtszelle während des intraerythrozytären Zyklus zurückzuführen. Für diese Modifikationen werden zahlreiche Proteine vom Parasiten in den Erythrozyten transportiert. Viele dieser Proteine besitzen ein für den Export verantwortliches pentameres Sequenzmotiv, das so genannte PEXEL-Motiv (engl. *Plasmodium Export Element*) (R.L.E/D/Q). Dieses Motiv wurde für die Vorhersage des *P. falciparum*-Exportoms verwendet, wobei über 350 putativ exportierte Proteine identifiziert werden konnten. Im ER des Parasiten wird das PEXEL-Motiv hinter dem Leucin durch die Protease Plasmepsin V gespalten und anschließend N-acetyliert. Sowohl phylogenetische Analysen als auch die Exportomvorhersage von Sargeant et al. (2006) deuten auf eine Funktionalität von alternativen PEXEL-Motiven hin. Diese sind durch die Aminosäuren Lysin oder Histidin an der PEXEL-Position 1 bzw. Isoleucin an der PEXEL-Position 3 gekennzeichnet (R/K/H.L/I.E/D/Q). Bisherige Untersuchungen von alternativen PEXEL-Motiven ließen jedoch vermuten, dass kein Export durch diese vermittelt wird. Daher war das primäre Ziel der Arbeit die Funktionalität von alternativen PEXEL-Motiven zu überprüfen.

Die Funktionalität wurde zum einen mit Hilfe der Reporterproteine KAHRP, REX3 und GBP untersucht. Das klassische PEXEL-Motiv dieser Proteine wurde durch alternative PEXEL ersetzt. Sowohl R.L.E-, K.L.E- als auch H.L.E-Motive sind in REX3 und GBP funktionell, wobei eine Prozessierung bei K.L.E zwischen der alternativen PEXEL-Position 3 und 4 und eine anschließende N-Acetylierung mit Hilfe der Massenspektrometrie nachweisbar war.

Des Weiteren sollte die Funktionalität mittels Lokalisationsstudien endogener *P. falciparum*-Proteine, welche ein alternatives-PEXEL besitzen, überprüft werden. Für die Lokalisationsstudien wurden GFP-Fusionsproteine verwendet. Dabei konnten neun exportierte Proteine mit alternativem PEXEL-Motiv identifiziert werden, die teilweise in den für die Virulenz von *P. falciparum* zugeschriebenen Kompartimenten in der Wirtszelle lokalisierten. Darunter waren drei exportierte Proteine, die löslich in der Wirtszelle vorlagen (PFA0135w, PFL0040c und PFL0070c), zwei Maurer'sche Spalten-Proteine (PF08_0004 und PFC0085c), zwei Erythrozytenmembran-assoziierte Proteine (PFA0610c und PFI1780w), ein Protein, welches eine J/K-Dot-ähnliche Lokalisation zeigte (PFL0045c), und ein Protein mit einer Lokalisation in nicht definierten Strukturen in der Wirtszelle (PFF0335c). Exemplarisch konnte sowohl für PFI1780w als auch für PFC0085c mit Hilfe von Mutationsstudien und massenspektrometrischen Analysen eine Funktionalität des alternativen PEXEL-Motivs bewiesen

werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass alternative PEXEL-Motive Export vermitteln. Vermutlich machen aber Proteine mit funktionellem alternativem PEXEL-Motiv nur einen kleinen Teil des Exportoms von *P. falciparum* aus.

II Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
3'(5')	3'(5') Ende des Nukleinsäurestranges
α	alpha, anti
Abb.	Abbildung
ad	addieren (auffüllen auf)
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AMA	Apical Membrane Antigen
AS	Aminosäure
ATS	Acidic Terminal Segment
BLAST	Basic Local Alignment Tool
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
<i>crt</i>	Gen des Chloroquin-Resistenz-Transporters
CSP	Circumsporozoite Protein
DBL	Duffy Binding Like
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
dest.	destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBA	Erythrocyte Binding Antigen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i> ; und andere
ETRAMP	Early Transcribed Membrane Protein
EXP	Exported Protein
fwd	forward
g	Erdbeschleunigung
GBP	Glycophorin Binding Protein
gDNA	genomische DNA
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Histidine Rich Protein
HSP	Heat Shock Protein
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
KAHRP	Knob Associated Histidine Rich Protein
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar
MAHRP	Membrane Associated Histidine Rich Protein
mg	Miligramm
min	Minute
ml	Mililiter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mM	Milimolar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MS	Maurer'sche Spalten
MSP	Merozoite Surface Protein
MSRP	Merozoite Surface Protein 7-related Protein
N ₂	Stickstoff
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NaCl	Natriumchlorid
NPP	New Permeability Pathways
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEXEL	<i>Plasmodium</i> Export Element
PfEMP1/3	<i>P. falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein 1/3
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHIST	<i>Plasmodium</i> Helical Interspersed Subtelomeric Family
PlasmoDB	Plasmodien-Datenbank
PM	Parasitenmembran
PNEP	PEXEL Negative Exported Protein
PTEX	<i>Plasmodium</i> Translocon of Exported Proteins
PV	parasitophore Vakuole
PVM	parasitophore Vakuolenmembran
rev	Reverse
Rh/RBL	Reticulocyte Binding Protein Homolog
RESA	Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen
REX	Ring Exported Protein
RIFIN	Repetitive Interspersed Family
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SBP	Skeleton Binding Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERA/SERP	Serine Repeat Antigen/Serine Rich Protein
SP	Signalpeptid
STEVAR	Subtelomeric Variable Open Reading Frame
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TVN	Tubovesikuläres Netzwerk
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE	Voll Entsalzt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
VTs	Vacuolar Transport Signal
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Malaria (vom lateinischen „mala aria“ – deutsch „schlechte Luft“) ist neben HIV/AIDS und Tuberkulose eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit. Viele Jahrhunderte glaubte man, dass die Erkrankung auf pathogene Sumpfausdünstungen zurückzuführen sei (Döngers, 1988; Cox, 2010). 1880 wurde der wahre Erreger in Blutaussstrichen mit Malaria erkrankter Soldaten vom französischen Militärarzt Charles Louis Alphonse Laveran entdeckt (Laveran, 1881) und in den 1890er Jahren wurde die Übertragung des Erregers mit Mücken in Verbindung gebracht (Ross, 1897; Grassi et al., 1899). Heute leben knapp 50% der Weltbevölkerung in Malariarisikogebieten, wobei Malaria hauptsächlich in den Tropen und Subtropen von Mittel- und Südamerika, Afrika und Asien vorkommt (vgl. Abb. 1.1). Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) kommt es jährlich zu etwa 300 bis 500 Mio. Neuerkrankungen mit im Jahr 2012 627.000 Todesfällen (WHO, 2013). 85% der Erkrankungen treten dabei in Afrika auf, wobei 90% der Todesfälle Kinder unter fünf Jahren betrifft.

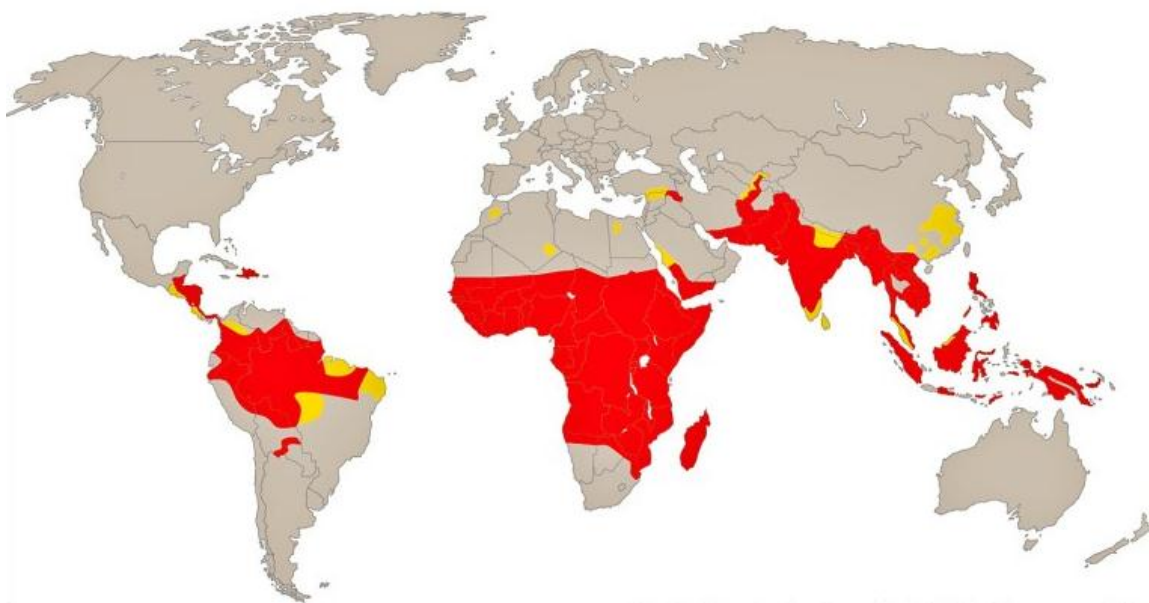


Abbildung 1.1: Verbreitung von Malaria. Gezeigt sind Gebiete ohne Malaria (grau), Gebiete mit mittlerer (gelb) und intensiver (rot) Malariaübertragung (<http://www.welt.de/wissenschaft/article115574947/Tropengeissel-Malaria-toetet-Kinder-im-Minutentakt.html>. 17.11.2014).

1.1 Malariaerreger

Bei den Malariaerregern handelt es sich um einzellige eukaryotische Parasiten der Gattung *Plasmodium*, welche in das Phylum der Apikomplexa gezählt werden. Diese sind nah mit Dinoflagellaten und Ciliaten verwandt, welche zusammen die taxonomische Gruppe der Alveolata bilden (Gould et al., 2008; Moore et al., 2008; Yoon et al., 2008). Dem Phylum der Apikomplexa gehören viele wichtige human- und tiermedizinische Parasiten der Gattungen *Toxoplasma*, *Theileria*,

Eimeria, *Babesia* und *Cryptosporidium* an (Cowman & Crabb, 2006). Charakteristisch für die Apikomplexa ist der so genannte apikale Komplex bei invasiven Stadien wie z.B. den Merozoiten (vgl. Abb. 1.2). Im apikalen Komplex sind sekretorische Organellen wie die paarweise angelegten birnenförmigen Rhoptrien, die Mikronemen und eine Anzahl von Vesikeln im Zytoplasma, die so genannten *Dense Granules*, lokalisiert (Preiser et al., 2000). Diese Organelle spielen eine zentrale Rolle bei der Invasion von Wirtszellen (vgl. Kap. 1.3.2.2) (Morrisette & Sibley, 2002; Cowman & Crabb, 2006; Dubremetz, 2007; Carruthers & Tomley, 2008; Counihan et al., 2013). Des Weiteren besitzen fast alle Apikomplexa einen so genannten Apikoplast, einen zusätzlichen essentiellen Plastiden, welcher vermutlich durch sekundäre Endosymbiose aufgenommen wurde (Kohler et al., 1997; McFadden & Waller, 1997; Wilson & Williamson, 1997; Striepen et al., 2000).

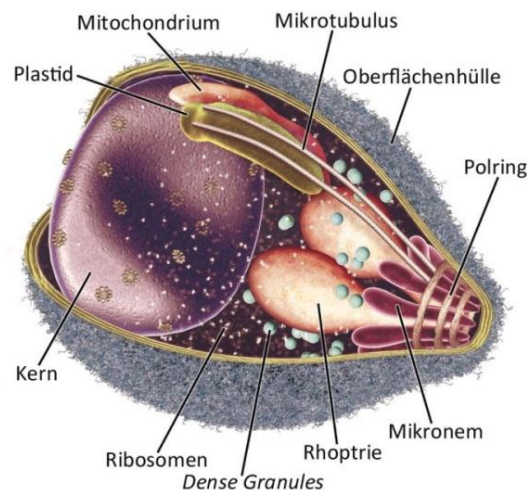


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Merozoiten und seiner Organelle. Am apikalen Pol befindet sich der apikale Komplex mit den paarweise angelegten Rhoptrien, den Mikronemen und den im Zytoplasma befindlichen *Dense Granules* (nach Cowman & Crabb, 2006; modifiziert).

Insgesamt sind zurzeit 450 Plasmodienarten beschrieben (Perkins & Schall, 2002). Neben den Reptilien-, Vögeln-, Affen- und Nagetier-befallenden Plasmodien gibt es fünf humanpathogene Plasmodienarten: den Erreger *Plasmodium knowlesi*, dessen natürlicher Wirt der Javaneraffe ist, aber ebenfalls den Menschen infizieren kann (Cox-Singh & Singh, 2008; Pain et al., 2008; Schottelius et al., 2010), *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. falciparum*. Die Erreger werden beim Stich einer weiblichen *Anopheles*-Mücke auf den Menschen übertragen. Insgesamt gibt es etwa 430 *Anopheles*-Spezies, wobei vermutlich 30 bis 40 Arten in der Lage sind humanpathogene Erreger zu übertragen (Hay et al., 2010). Neben *Anopheles stephensi* gilt dabei *Anopheles gambiae* als wichtigster Überträger. *Anopheles gambiae* kommt in Afrika vor und besitzt die höchste Transmissionseffizienz (Kiszewski, 2004).

1.2 Klinik der Malaria

1.2.1 Krankheitsbild

Je nach Plasmodienart können drei unterschiedliche Verlaufsformen der Malaria beim Menschen unterschieden werden: Malaria quartana (*P. malariae*), Malaria tertiana (*P. vivax*, *P. ovale*) und Malaria tropica (*P. falciparum*). Als wichtigster humanpathogener Erreger gilt dabei *P. falciparum*, da dieser für die meisten Krankheits- und Todesfälle verantwortlich ist (Garcia, 2010; WHO, 2013). Allen drei Verlaufsformen gemein sind die primären grippeähnlichen Symptome wie Fieber-, Kopf- und Gliederschmerzen, Schüttelfrost, Übelkeit und Erbrechen. Die klinischen Symptome wie beispielsweise die Fieberschübe sind auf den intraerythrozytären Zyklus (vgl. Kap. 1.3.2.2) zurückzuführen, in dem mit Parasiten infizierte Erythrozyten beim Platzen Antigene und Malariatoxine wie beispielsweise Hämozoine (kristallines Degradationsprodukt des Hämoglobins) oder Phospholipide freisetzen (Schofield et al., 1993; Arese & Schwarz, 1997; Schofield et al., 2002). Die Malariatoxine leiten eine Immunantwort ein, welche die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen hervorruft (Kwiatkowski et al., 1989; Playfair et al., 1990). Die Malaria quartana und tertiana zeichnen sich durch einen milden Krankheitsverlauf aus, wohingegen es bei der Malaria tropica zu schweren klinischen Krankheitsbildern kommen kann, welche durch Anämie, Atemnot, Splenomegalie (Vergrößerung der Milz), Nierenversagen, Hypoglykämie (Blutzuckerspiegelabfall) und pulmonale Ödeme gekennzeichnet sein können. Die Manifestation der Symptome ist dabei altersabhängig (Dondorp et al., 2008), so dass Anämie und Hypoglykämie häufig bei Kindern vorkommt. Zerebrale Malaria ist eine der schwerwiegendsten Verlaufsformen der Malaria tropica und ist nicht abhängig vom Alter. Diese Form der Malaria kann zu Bewusstseinsstörungen und Koma bis hin zum Tod führen (Medana & Turner, 2006).

1.2.2 Malariatherapie- und prophylaxe

Die Malariatherapie und -prophylaxe stellt ein großes Problem dar, weil immer häufiger Resistenzen gegen gängige Malariamedikamente auftreten (Mu et al., 2003) und sich multiresistente Plasmodienstämme entwickelt haben (Uhlemann & Krishna, 2005; Wongsrichanalai & Meshnick, 2008). So hat *P. falciparum* unter anderem gegen das effektive Malariamedikament Chloroquin eine Resistenz entwickelt. Normalerweise wird Chloroquin in der Nahrungsvakuole des Parasiten akkumuliert und inhibiert so den Abbau von Hämoglobin (Fitch et al., 1982; Fitch, 1986; Bray et al., 1996; Sullivan et al., 1996). Dadurch entstehen giftige Häm-Derivate, welche zu Membranschäden beim Parasiten führen (Fitch et al., 1982). Durch eine Mutation im *crt*-Gen (engl. *Chloroquine Resistance Transporter*) (Fidock et al., 2000) kann Chloroquin allerdings aus der Nahrungsvakuole heraustransportiert werden und der Abbau von Hämoglobin ist wie üblich möglich. Neben Chloroquin liegen auch Resistenzen gegen Sulphadoxin, Pyrimethamin, Atovaquon, Amodiaquin und

Mefloquin vor (Kumar et al., 2014). Derzeit wird Artemisinin als eines der wichtigsten Antimalariamedikamente angesehen und wird zur Vermeidung von Resistenzen hauptsächlich in Kombination mit anderen Wirkstoffen eingesetzt (WHO, 2013). Dabei wirkt Artemisinin nicht nur im Blut- sondern auch im sexuellen Stadium, wodurch die Übertragungsrate der Parasiten erheblich verringert wird (Kumar et al., 2014). In den letzten zehn Jahren konnte aber festgestellt werden, dass in Asien auch immer öfter Resistenzen gegen Artemisinin auftreten (Noedl et al., 2008; Dondorp et al., 2009; Phyo et al., 2012; Satimai et al., 2012; Miotto et al., 2013; WHO 2013). Aufgrund der sich häufenden Resistenzen gegen gängige Antimalariamedikamente ist es das primäre Ziel einen geeigneten Impfstoff zu entwickeln. Insgesamt werden gegenwärtig 27 putative Vakzinekandidaten in klinischen Tests untersucht, wobei bisher noch kein geeigneter Impfstoff zur Verfügung steht (Wang et al., 2003; Crompton et al., 2010; Moorthy et al., 2013; Cowman et al., 2014). So konnte bei potentiellen Vakzinekandidaten, welche sich gegen Parasitenproteine aus der Blutphase (vgl. Kap. 1.3.2.2) wie z.B. AMA1 (engl. *Apical Merozoite Antigen 1*) (Sagara et al., 2009), EBA-175 (engl. *Erythrocyte Binding Antigen 175*) (El Sahly et al., 2010), GLURP (engl. *Glutamat Rich Protein*) (Borre et al., 1991; Hermesen et al., 2007), MSP1-3 (engl. *Merozoite Surface Antigen 1-3*) (Ogutu et al., 2009) und SERA5 (engl. *Serine Repeat Antigen 5*) (Horii et al., 2010) richten, keine Effizienz in Phase II Studien festgestellt werden (Sagara et al., 2009; Ogutu et al., 2009). Ein vielversprechender Impfstoffkandidat ist hingegen RTS,S. RTS,S ist ein Vakzine, das aus einem N-terminalen Teilfragmente des *P. falciparum* Proteins CSP (engl. *Circumsporozoit Surface Protein*) (Aminosäure 210-398) und einem immunogenen Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus besteht (Gordon et al., 1995). RTS,S wirkt auf exoerythrozytäre Stadien, wobei es die Invasion von Sporozoiten in die Hepatozyten der Leber verhindert. Nach Durchlauf unterschiedlicher klinischer Tests (Alonso, 2006; Bojang, 2006; Agnandji et al., 2012) befindet sich RTS,S derzeit in der finalen Testphase und wird voraussichtlich 2015 als kommerzieller Impfstoff in ausgewählten Gebieten mit hoher Malariabelastung zum Einsatz kommen (Kumar et al., 2014). Ein Nachteil von RTS,S ist, dass sich die Immunität auf 18 Monate beschränkt (The RTS,S Clinical Trials Partnership, 2014). Auch in diesem Jahr wurden weitere neue Vakzinekandidaten identifiziert, die gegen die *P. falciparum*-Proteine MSP1 und SEA1 (engl. *Schizont Egress Antigen 1*) gerichtet sind und momentan in klinischen Studien getestet werden (Cowman et al., 2014; Raj et al., 2014). Neben der Entwicklung von Vakzinen gegen bestimmte Parasitenproteine gibt es auch Entwicklung so genannter Lebendimpfstoffe. Ein Lebendimpfstoff besteht dabei aus abgeschwächten (attenuierten) Erregern, welche immer noch metabolisch aktiv sind, aber keine Krankheit mehr auslösen können. Für eine Immunisierung werden die Malariaerreger, speziell die Sporozoiten (vgl. Kap. 1.3.1), Gammastrahlen ausgesetzt, welche dazu führen, dass diese nicht mehr Vermehrungsfähig sind (Hoffman et al., 2002). Bei klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Impfung mit den vermehrungsunfähigen Sporozoiten zu einer

Immunität der Testpersonen führte (Seder et al., 2013). Allerdings konnte noch nicht gezeigt werden wie lange diese Immunität anhält oder ob es zu Nebenwirkungen kommen kann.

1.2.3 Vektorkontrolle

Neben der direkten Bekämpfung des Malariaerregers gibt es auch immer mehr Bemühungen die Übertragung des Erregers von der Mücke auf den Menschen zu verhindern. Die heute gängigsten Maßnahmen zur Vektorkontrolle sind der Einsatz von so genannten Insektizid-behandelten Bettnetzen (INTs; engl. *Insecticide Treated Nets*) oder lang wirkende INTs (LLINs; engl. *Long Lasting Insecticidal Nets*) (López del Prado et al., 2014). Des Weiteren wird häufig eine Innenraumbesprühung (IRS; engl. *Indoor Residual Spraying*) der Wände, Gardinen und anderer Gegenstände durchgeführt (Agusto et al., 2013). Dabei werden Insektizide wie Organochlorin, Organophosphat, Carbamat, Pyrethroid oder DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan) eingesetzt. Diese binden an spannungsabhängige Ionenkanäle der Mücke, so dass eine neuronale Signalübertragung nicht mehr stattfinden kann. Problematisch ist, dass auch hier immer häufiger Resistenzen gegen gängige Insektizide auftreten (Riveron et al., 2014; Edi et al., 2014). Um eine Ausbreitung der Resistenz zu verhindern, werden daher die verwendeten Insektizide abwechselnd und nur über einen kurzen Zeitraum eingesetzt. Des Weiteren kommt es zum Einsatz von giftigen Lockstoffen, welche in Wohn- und Flussnähe aufgebaut werden (Jawara et al., 2009; Okumu et al., 2010; Smithuis et al., 2013). Auch molekularbiologische Methoden zur Abwehr der *Anopheles*-Mücke bzw. zur Reduktion der Transmissionseffizienz des Malariaerregers sollen zukünftig zum Einsatz kommen (Bian et al., 2013). Unter anderem wurden dazu sowohl Mücken der Art *Aedes aegypti*, Überträger des Denguefiebers, als auch *Anopheles gambiae* mit einer mit Bakterien der Gattung *Chromobacterium* angereicherten Zuckerlösung gefüttert, die zuvor aus *Aedes*-Mücken isoliert wurden (Ramirez et al., 2014). Eine Ansiedlung der Bakterien im Mitteldarm der Mücken führte zu einer reduzierten Lebensdauer der Mücke und zu einer verbesserten Immunität gegenüber typischen Krankheitserregern wie *P. falciparum*. Des Weiteren konnte bei *in vitro* Versuchen mit *Plasmodium* gezeigt werden, dass *Chromobacterium* sp. die Vermehrung von diesem hemmt. Dies sind gute Ansätze für eine verbesserte Vektorkontrolle.

1.3. Lebenszyklus von *P. falciparum*

Es liegt unter anderem an der hohen Komplexität des Lebenszyklus von *P. falciparum*, dass bisher kein geeigneter Impfstoff gegen Malaria gefunden wurde. Wie alle Plasmodien durchläuft *P. falciparum*, einen obligaten Wirtswechsel während seines Lebenszyklus, welcher in drei große Phasen unterteilt werden kann (Wirth & Pradel, 2012). 1) Die sexuelle Vermehrung mit der geschlechtlichen Gamogonie und ungeschlechtlichen Sporogonie im Endwirt einer Stechmücke der Gattung *Anopheles*. Und die asexuelle Vermehrung im humanen Zwischenwirt, welche in das 2)

Leber- und 3) Blutstadium unterteilt werden kann. Einen Überblick des Lebenszyklus gibt die Abbildung 1.3.

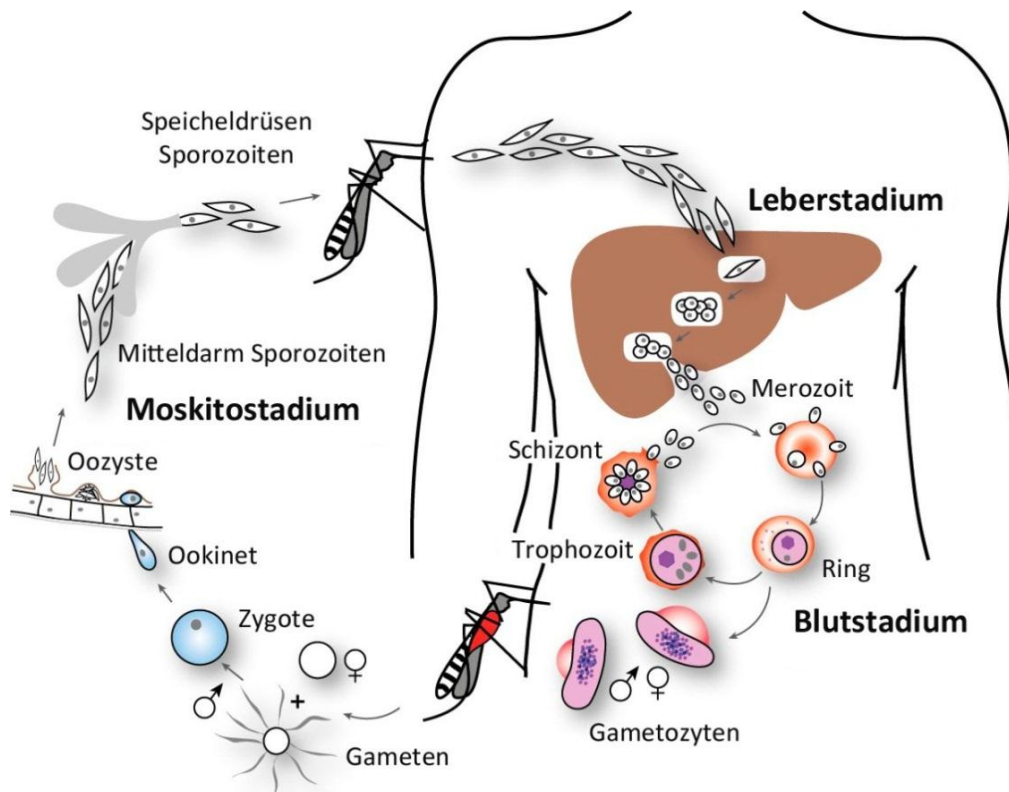


Abbildung 1.3: Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*. Die weibliche *Anopheles*-Mücke nimmt über die Blutmahlzeit Gametozyten auf, welche sich in der Mücke zu Gameten entwickeln. Nach der Befruchtung entsteht ein beweglicher Ookinet, welcher in den Mitteldarm wandert und sich zu einer sessilen Oozyste ausdifferenziert. In dieser reifen die Sporozoiten heran. Nach der Ruptur der Oozyste transferieren die Sporozoiten in die Speicheldrüsen und werden bei einer erneuten Blutmahlzeit in den Menschen injiziert, wobei diese über den Blutstrom in die Leber gelangen. In der Leber entwickeln sich die Sporozoiten zu Merozoiten und werden anschließend erneut in den Blutstrom entlassen. Dort befallen diese Erythrozyten. Merozoiten entwickeln sich während des Ring-, Trophozoiten- und Schizontenstadiums zu 16 bis 32 Tochtermerozoiten, welche den Erythrozyten wieder verlassen. Entweder können die freigelassenen Merozoiten neue Erythrozyten befallen oder entwickeln sich zu männlichen und weiblichen Gametozyten, welche bei einer Blutmahlzeit von einer *Anopheles*-Mücke aufgenommen werden können (nach Cowman et al., 2012; modifiziert).

1.3.1 Geschlechtliche Vermehrung in der *Anopheles*-Mücke

Während einer Blutmahlzeit der weiblichen *Anopheles*-Mücke werden sowohl weibliche als auch männliche Gametozyten (Mikro- bzw. Makrogametozyten) aufgenommen, welche sich im Gastrointestinaltrakt der Mücke ausdifferenzieren. Dort entwickeln sich die Gametozyten innerhalb von einer Stunde nach der Blutmahlzeit durch auf sie wirkende Reize wie pH-Wert- und Temperaturänderungen zu Gameten (Sinden, 1983; Vlachou et al., 2006). Bei den Makrogameten kommt es zum Prozess der Exflagellation, wobei acht haploide bewegliche Gameten entstehen (Ghosh et al., 2000; Tewari et al., 2005). Durch die Fusion eines Mikrogameten mit einem

Makrogameten entsteht die Zygote, welche sich im Mitteldarm der Mücke zu einem beweglichen Ookineten ausdifferenziert. Nach dem Durchdringen des Mitteldarmepithels entwickelt sich der Ookinet zwischen dem Epithel und der Basallamina zu einer sessilen Oozyte (Matuschewski, 2006), welche zahlreiche Kernteilungen durchläuft und einen so genannten Sporoblasten bildet (Vlachou et al., 2006). Etwa 10 bis 14 Tagen nach der Blutmahlzeit kommt es zur Ruptur des Sporoblasten und die entlassenen Sporozoiten gelangen in die Hämolymphe der Stechmücke (Ghosh & Jacobs-Lorena, 2009; Angrisano et al., 2012). In den Speicheldrüsen adhärieren die Sporozoiten über noch unbekannte Rezeptoren an die Basallamina, dringen in das Speicheldrüsenepithel ein und gelangen in den Speicheldrüsendrang. Durch eine erneute Blutmahlzeit der Stechmücke gelangen die Sporozoiten in den menschlichen Wirt.

1.3.2 Ungeschlechtliche Vermehrung im Menschen

Bei einer Blutmahlzeit einer Mücke werden etwa 50 bis 100 Sporozoiten auf den Menschen übertragen. Dabei wird ein Großteil der Sporozoiten nicht direkt in die Blutgefäße injiziert, sondern unter die Haut des Menschen (Beier et al., 1991; Ponnudurai et al., 1991; Sidjanski & Vanderberg, 1997; Matsuoka et al., 2002; Medica & Sinnis, 2005). Die Sporozoiten gelangen durch eine aktiv gleitende Bewegung mit Hilfe des Aktin-Myosin-Motors zu den Blutgefäßen (Sidjanski & Vanderberg, 1997; Menard, 2001; Yamauchi et al., 2007), wobei lediglich 35% der übertragenen Sporozoiten an den Blutgefäßen ankommen und in diese eindringen können (Amino et al., 2006; Amino et al., 2008).

1.3.2.1 Das Leberstadium

Mit dem Blutstrom gelangen die Sporozoiten zur Leber (Frevert, 2004) und durchqueren dort Kupfer- (spezialisierte Makrophagen) und Endothelzellen (Pradel & Frevert, 2001; Frevert et al., 2005). Im Leberparenchym angekommen werden zuerst einige Hepatozyten aktiv durchwandert bis ein geeigneter Hepatozyt unter der Ausbildung einer parasitophoren Vakuole (PV) infiziert wird (Mota et al., 2001; Frevert et al., 2005; Bano et al., 2007). Die Membran, welche die PV nach dem Eindringen umgibt, stammt dabei von der Wirtszellmembran ab und wird anschließend rasch durch parasitäre Proteine modifiziert (Bano et al., 2007). In einem Zeitraum von 10 bis 14 Tagen entwickelt sich der Parasit innerhalb des Hepatozyten durch Kernteilung (Schizogonie) zu tausenden Lebermerozoiten. Die reifen Lebermerozoiten werden in kleine Vesikel, so genannte Merosomen, geschleust, welche von den infizierten Hepatozyten portionsweise in den Blutstrom entlassen werden (Sturm et al., 2006; Tarun et al., 2006). Eine Verpackung der Lebermerozoiten in Merosomen dient dem Parasiten zum Schutz vor dem Immunsystem, so dass ein Passieren der Kupferzellen möglich ist ohne phagozytiert zu werden. Bevor die Merozoiten in den Blutstrom entlassen werden passieren sie immer noch verpackt in den Merosomen das Herz und gelangen anschließend in die

Lungenkapillaren, wo die Merosomen aufplatzen und die Merozoiten in die Blutbahn entlassen werden (Baer, 2007).

1.3.2.2 Das Blutstadium

Die in den Blutkreislauf entlassenen Merozoiten leiten damit die Blutphase ein und befallen die Erythrozyten. *P. falciparum* ist dabei im Vergleich zu anderen humanen Malariaerregern in der Lage alle Stadien der roten Blutzellen zu infizieren (Garcia, 2010). Die Invasion des Erythrozyten durch den Merozoiten ist ein stufenweiser Prozess. Der erste Kontakt mit der Zielzelle ist reversibel und geschieht über die gesamte Oberfläche des Merozoiten, so dass eine Unterscheidung unterschiedlicher Zelltypen möglich ist (Bannister & Dluzewski, 1990). Wird ein Erythrozyt als solcher erkannt kommt es zur Reorientierung des Merozoiten, so dass sich der apikale Pol zum Erythrozyten richtet. Während dieses Prozesses werden parasitäre Proteine wie beispielsweise AMA1 und Proteine der EBL/DBL-Superfamilie (engl. *Erythrocyte Binding Like/Duffy Binding Like*) und PfPRH-Proteinfamilie (engl. *Reticulocyte-binding Homologues*) aus den apikalen Organellen (Rhoptrien, Mikronemen) entlassen, die spezifisch an Rezeptoren auf der Erythrozytenoberfläche binden (Duraisingh et al., 2003; Cowman & Crabb, 2006; Boyle et al., 2013). AMA1 spielt dabei eine Rolle bei der Reorientierung des Merozoiten und ist essentiell für die Invasion des Erythrozyten (Triglia et al., 2000). Damit der Merozoit aktiv invadieren kann, kommt es zu der Entstehung einer so genannten „tight junction“ zwischen dem Parasiten und der Wirtszelle. An der Bildung der „tight junction“ sind sowohl Proteine aus der EBL/DBL-Superfamilie als auch der PfPRH-Proteinfamilie beteiligt (Iyer et al., 2007). Mit Hilfe eines Aktin-Myosin-Motors bewegt sich die „tight junction“ vom apikalen zum posterioren Pol des Merozoiten (Keeley & Soldati, 2004) und der Parasit dringt unter Ausbildung einer PV in die Wirtszelle ein. Zum Ende der Invasion ist der Parasit komplett von einer parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) umgeben.

Der intraerythrozytäre Zyklus bei *P. falciparum* dauert ca. 48 Stunden und kann in drei Entwicklungsstadien aufgeteilt werden: das Ring-, das Trophozoiten- und das Schizontenstadium. Innerhalb von wenigen Stunden entwickelt sich der Merozoit zu einem jungen Trophozoiten, dem so genannten Ringstadium (0-24 h), welches nach seiner siegelförmigen Struktur in Giemsaausstrichen benannt wurde (vgl. Abb. 1.4) (Bannister et al., 2000). Während des Ringstadiums wechselt der Parasit zwischen einer diskoidalen und einer amöboiden Form und bewegt sich frei im Erythrozyten (Grüning et al., 2011). Mit Hilfe des so genannten Zytostoms beginnt der Parasit sich sofort von der Wirtszelle zu ernähren, indem er kleine Portionen der PVM mit benachbarten Erythrozytenzytosol aufnimmt und in der Nahrungsvakuole verdaut (Aikawa et al., 1966; Yaron et al., 1984; Stenzel et al., 1989; Slomianny et al., 1990; Kohler et al., 1997). Nach 24 h erreicht der Parasit das

Trophozoitenstadium (24-36 h). In diesem Stadium bleibt der Parasit in einer festen Position im Erythrozyten und betreibt aktiven Metabolismus (Grüning et al., 2011). Charakteristisch für dieses Stadium ist das rasche Parasitenwachstum, bis nahezu der gesamte Erythrozyt ausgefüllt ist. Des Weiteren wird Hämoglobin als Nahrungsquelle verwendet. Dabei werden mehr als 80% des Hämoglobins abgebaut (Lazarus et al., 2008), was Aminosäuren für die Proteinbiosynthese bereitstellt (Sherman, 1977; Ginsburg, 1990) und Platz für das Wachstum des Parasiten schafft (Krugliak et al., 2002). Das giftige Häm des Hämoglobins kann allerdings nicht verwertet werden und akkumuliert als unlösliches Hämozoïn in der Nahrungsvakuole des Parasiten (Slater & Cerami, 1992; Pagola et al., 2000; Hempelmann & Egan, 2002; Scholl et al., 2005). In der letzten Phase, dem Schizontenstadium (40-48 h), entstehen durch vielerlei Kernteilungen bis zu 32 Merozoiten, welche durch Ruptur aus dem Erythrozyten in den Blutstrom entlassen werden und erneut Erythrozyten befallen können (Crabb et al., 1997; Cowman & Crabb, 2006).

Einige Merozoiten können sich nach der Invasion zu sexuellen Stadien so genannten Gametozyten entwickeln. Die Differenzierung zum reifen Gametozyten dauert insgesamt 10 Tage, wobei anhand der Morphologie fünf unterschiedliche Gametozytenstadien (Stadium I bis V) unterschieden werden (Hawking et al., 1971). Reife Gametozyten werden von weiblichen *Anopheles*-Mücken bei einer Blutmahlzeit aufgenommen, wodurch die sexuelle Vermehrung des Parasiten in der Mücke eingeleitet wird (vgl. Kap. 1.3.1).

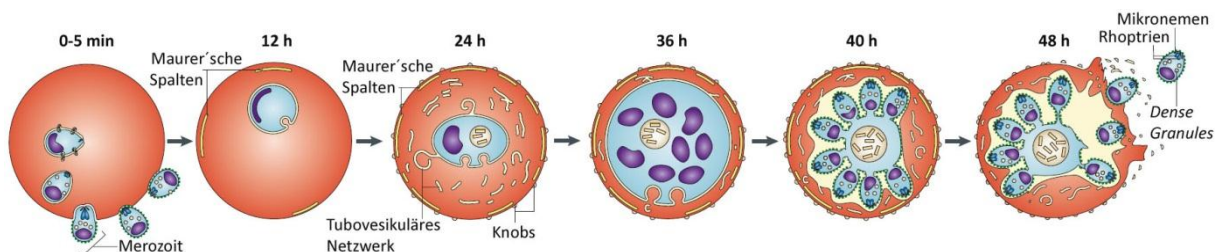


Abbildung 1.4: Intraerythrozytärer Zyklus von *Plasmodium falciparum* und dessen Charakteristika. Während der Entwicklung vom Ring- (0-24 h) über das Trophozoiten- (24-36 h) bis hin zum Schizontenstadium (40-48 h) des Parasiten finden zahlreiche Modifikationen des Erythrozyten statt. Wichtige Veränderungen beinhalten die Entstehung der Maurer'schen Spalten, des tubovesikulären Netzwerkes und knubbelige Ausstülpungen der Erythrozytenmembran, so genannte Knobs (nach Meier et al., 2009; modifiziert).

1.4. Wirtszellmodifikationen

Das Überleben des Parasiten innerhalb der PV in einer Wirtszelle ist von der Fähigkeit des Parasiten abhängig sich mit Nährstoffen zu versorgen und sich vor dem Immunsystem des Menschen zu schützen. Daher werden zahlreiche Modifikationen an der Wirtszelle vorgenommen. Dies umfasst sowohl Modifikationen am Hepatozyten als auch am Erythrozyten.

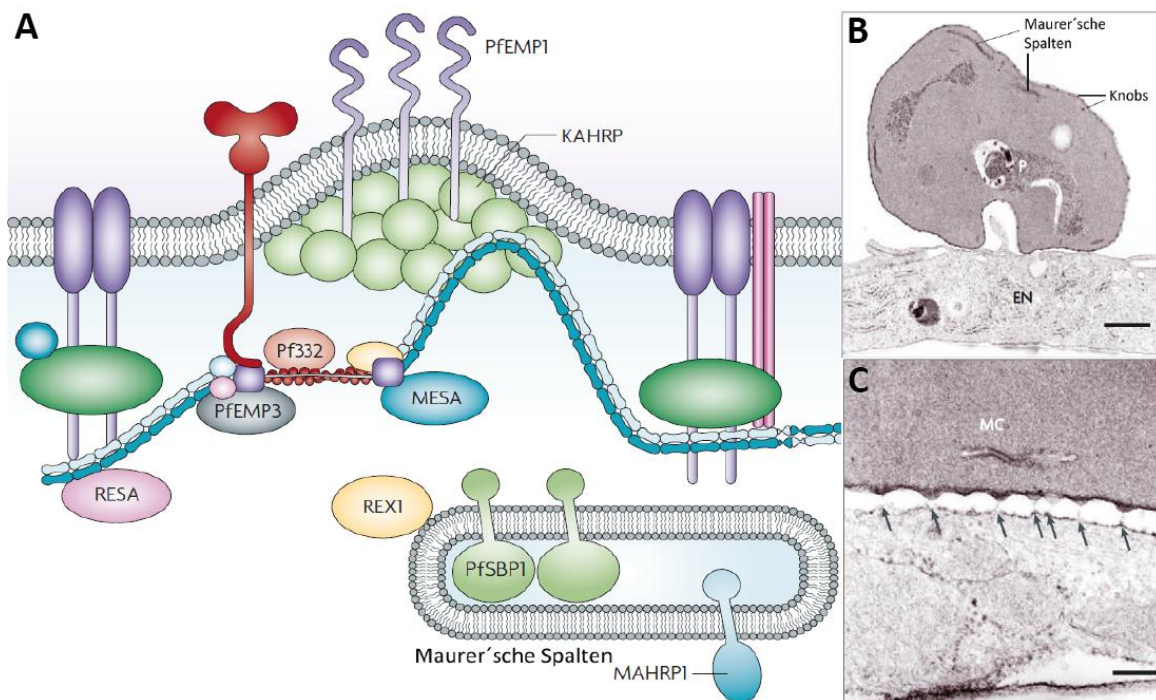
1.4.1 Modifikationen am Hepatozyten

Im Vergleich zum Erythrozyten sind Hepatozyten vorteilhafte Wirtszellen, da diese reich an Nährstoffen sind, detoxifizierende Enzyme exprimieren und eine immuntolerante Umgebung darstellen (Protzer et al., 2012; Ingmundson et al., 2014). Bisher ist wenig über Parasiten-generierte Strukturen in Hepatozyten bekannt. Erst kürzlich wurde eine von der PVM-ausgehende Membranstruktur identifiziert, welche als LSTVN (engl. *Liver Stage Tubovesicular Network*) bezeichnet wurde (Mueller et al., 2005; Ingmundson et al., 2012). LSTVN ist ein komplexes Netzwerk aus dynamischen Membranen, welches sowohl aus der Parasitenmembran (PM), der PVM als auch der Wirtszellmembran gebildet wird (Grützke et al., 2014). Einige parasitäre Proteine interagieren mit dem LSTVN (Mueller et al., 2005; Ishino et al., 2009; Ingmundson et al., 2012). Allerdings ist wenig über die Funktion des LSTVN bekannt.

1.4.2 Modifikationen am Erythrozyten durch *P. falciparum*

Der reife Erythrozyt besitzt weder einen Kern, intrazelluläre Organelle oder Membrantransporter, und ist nicht in der Lage Proteine bzw. Lipide *de novo* zu synthetisieren. Der Erythrozyt dient dem Transport von Sauerstoff im Organismus (Mohandas & Chasis, 1993). Sofort nach Invasion des Erythrozyten wird daher die Permeabilität, die Flexibilität und Adhärenz des Erythrozyten durch den Parasiten verändert (Maier et al., 2008), wodurch die Starre des Erythrozyten zunimmt und die Verformbarkeit abnimmt (Cooke et al., 2001; Maier et al., 2008). Eine Erleichterung der Nährstoffaufnahme findet durch den Einbau von neuen Kanälen für den Im- und Export von Nährstoffen und Abfallprodukten statt, so genannte NPPs (engl. *New Permeability Pathways*) (Ginsburg et al., 1983; Kirk, 2001). Des Weiteren sind 20-25 h nach der Invasion Erweiterung der PV-Membranstruktur zu erkennen, welche als tubovesikuläres Netzwerk (TVN) bezeichnet werden (vgl. Abb. 1.4) (Bannister et al., 2000), und ebenfalls am Import von Nährstoffen sowie Lipiden beteiligt ist (Lauer et al., 1997; Lauer et al., 2000; Haldar & Mohandas, 2007). Im Ringstadium kommt es ebenfalls zur Ausbildung eines weiteren Membransystems, den so genannten Maurer'schen Spalten (vgl. Abb. 1.4 und 1.5.). Diese sind flache scheibenförmige Strukturen, welche teilweise mit der Erythrozytenmembran und der PVM über dünne Halterungen (engl. *Tether*) verbunden sind (Hanssen et al., 2008b; Maier et al., 2009; Pachlatko et al., 2010). Die Anzahl der Maurer'schen Spalten wird schon im Ringstadium festgelegt, wobei diese hoch mobil sind und erst im Trophozoitenstadium eine feste Position in der Wirtszelle nahe der Erythrozytenmembran einnehmen (Grüning et al., 2011). Die Maurer'schen Spalten spielen eine Rolle beim Proteintransport vom Parasiten in die Wirtszelle, vor allem von virulenten Proteinen an die Wirtszelloberfläche (Lanzer et al., 2006; Bhattacharjee et al., 2008; Tilley & Hanssen, 2008). Erst kürzlich konnten neue punktförmige mobile Strukturen im infizierten Erythrozyten identifiziert werden, die je nach Proteinzusammensetzung als J- bzw. K-Dots

beschrieben wurden (Külzer et al., 2010; Külzer et al., 2012; Kats et al., 2014). Aus was diese Strukturen bestehen und welche Funktion sie in der Wirtszelle übernehmen ist bisher jedoch noch unklar. Etwa 16 h nach der Invasion kommt es zur Ausbildung von „knubbeligen“ Strukturen hoher Elektronendichte auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten, welche als Knob bezeichnet werden (vgl. Abb. 1.4 und 1.5) (Langreth et al., 1978; Kilejian, 1979; Gruenberg et al., 1983). Essentiell für die Knob-Ausbildung ist das Protein KAHRP (engl. *Knob Associated Histidine Rich Protein*) (Crabb et al., 1997), welches sich an die zytoplasmatische Seite der Erythrozytenmembran anlagert (vgl. Abb. 1.5A) (Taylor et al., 1987). Dort interagiert KAHRP mit Proteinen wie Spektrin und Aktin, welche sich im Zytoskelett des Erythrozyten befinden (vgl. Abb. 1.5A) (Kilejian et al., 1991; Chishti et al., 1992; Oh et al., 2000). Knobs agieren als Plattform für die Präsentation des in die Membran verankerten Proteins PfEMP1 (engl. *P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1*) (Baruch et al., 1995; Su et al., 1995; Maier et al., 2009). PfEMP1 wird durch die *var*-Multigenfamilie (engl. *Variant Gene Family*) mit insgesamt 60 Genen pro haploiden Genom kodiert, wobei jeder Parasit nur einen PfEMP1-Typ pro infizierten Erythrozyten präsentiert (Scherf et al., 2008). Dabei vermittelt PfEMP1 die Adhäsion an verschiedene Wirtszellmoleküle und -rezeptoren wie beispielsweise ICAM1, CD31, CD36 und Glykosaminoglykane (Magowan et al., 1988; Rogerson et al., 1995; Baruch et al., 1996), wodurch es zur Sequestrierung von infizierten Erythrozyten an den Blutgefäßen von Organen kommt (vgl. Abb. 1.5B und 1.5C).



← **Abbildung 1.5: Wirtszellmodifikationen an mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten sowie dessen Adhäsion an Endothelzellen (vorherige Seite).** A) Membran- und Zytoskelettmodifikationen infizierter Erythrozyten. Parasitäre Proteine wie RESA (engl. *Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen*), MESA (engl. *Mature-parasite-infected Erythrocyte Antigen*) PfEMP3 (engl. *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 3*) und Pf332 (engl. *Plasmodium falciparum Antigen of 332 kDa*) stabilisieren das Zytoskelett des Erythrozyten. Zur Knob-Ausbildung kommt es durch die Anlagerung von KAHRP (engl. *Knob Associated Histidine Rich Protein*) an die Erythrozytenmembran. KAHRP dient als Verankerung des Oberflächenproteins PfEMP1 (engl. *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1*). B) Transmissionselektronmikroskopische Aufnahme eines mit *P. falciparum* (P) infizierten Erythrozyten an Endothelzellen (EN). Deutlich sichtbar sind die Knobs sowie die Maurer'schen Spalten (MC). Längenmaßstab: 1 µm. C) Vergrößerung der Verbindung zwischen infizierten Erythrozyten und Endothelzellen mit elektrondichten Verbindungen an den Knobs (schwarze Pfeile). Längenmaßstab: 100 nm (nach Maier et al., 2009; modifiziert).

Die Adhärenz an das Gefäßendothel verhindert ein Durchwandern der infizierten Erythrozyten durch die Milz (Kyes et al., 2007) und bietet somit Schutz vor dem menschlichen Immunsystem. Allgemein werden in der Milz alte und deformierte Erythrozyten durch Makrophagen eliminiert. Ebenso werden infizierte Erythrozyten in der Milz aufgrund der veränderten Struktur und mit Hilfe von IgG-Antikörpern erkannt und gezielt entfernt (Looareesuwan et al., 1987; Ho et al., 1990; Anyona et al., 2006). Die Ausbildung der Knobs und das Protein PfEMP1 tragen zur erhöhten Pathogenität von *P. falciparum* bei, da die Sequestrierung von infizierten Erythrozyten an das Gefäßendothel in den Blutbahnen des Gehirns zur meist tödlich verlaufenden zerebralen Malaria führen (Newbold et al., 1997; Newbold et al., 1999). Neben der zerebralen Malaria kann die Sequestrierung infizierter Erythrozyten an die Blutgefäße der Plazenta eine plazentale Malaria bei schwangeren Frauen auslösen, die ein erhöhtes Risiko für die Mutter und das ungeborene Kind darstellt (Newbold et al., 1999; Fried & Duffy, 2007).

1.4.2.1 Modifikationen in mit Gametozyten-infizierten Erythrozyten durch *P. falciparum*

In mit Gametozyten-infizierten Erythrozyten finden ähnliche Modifikationen statt wie bei asexuellen Stadien. So konnten Maurer'sche Spalten-ähnliche Strukturen in der Wirtszelle beobachtet werden, welche als „*Laveran's bib*“ bezeichnet wurden (Petter et al., 2008; Tibúrcio et al., 2012). Des Weiteren entstehen so genannte STICs (engl. *Sexual-stage Tubular Intraerythrocytic Compartments*) (Eksi et al., 2002). Welche Funktionen diese Strukturen übernehmen ist unklar, wobei die „*Laveran's bib*“ wie die Maurer'schen Spalten am Proteintransport beteiligt sein könnten. Ebenfalls wurde beobachtet, dass Gametozyten-infizierte Erythrozyten (Gametozytenstadium I bis IV) an das Gefäßendothel im Knochenmark und in der Milz sequestrieren, jedoch nicht an andere Organe oder Gewebe (Bastianelli & Bignami, 1899; Thompson & Robertson, 1935; Smalley et al., 1981; Bachmann et al., 2009; Farfour et al., 2012). Allerdings differenziert sich der Mechanismus der Adhärenz an das Gefäßendothel zu asexuellen Stadien. So sind keine Knobs und nahezu keine Knob-assoziierten Proteine auf der Erythrozytenoberfläche mit Gametozyten-infizierten Erythrozyten vorhanden

(Sinden, 1982; Tibúrcio et al., 2013). Des Weiteren besteht nahezu keine Interaktion mit Wirtszellrezeptoren wie beispielsweise ICAM-1 oder CD36 (Rogers et al., 1996; Day et al., 1998; Rogers et al., 2000; Silvestrini et al., 2012). Daher wird angenommen, dass die Modifikationen durch den Gametozyten die Rigidität des Erythrozyten erhöhen, was zur Sequestrierung im Knochenmark und in der Milz beiträgt (Aingaran et al., 2012; Tibúrcio et al., 2012). Im Vergleich zu anderen Geweben und Organen liegt im Knochenmark und in der Milz ein geringer Blutfluss vor, so dass eine schwache Interaktion des infizierten Erythrozyten mit dem Gefäßendothel für eine Sequestrierung ausreichen würde (Sinden, 1982; Tibúrcio et al., 2013).

1.5 Proteinexport

Für die tiefgreifenden Veränderungen der Wirtszelle durch den Parasiten werden zahlreiche Proteine wie beispielsweise KAHRP oder PfEMP1 in *P. falciparum* vom Erreger in den Erythrozyten transportiert, wobei sowohl im Hepatozyten als auch im Erythrozyten in asexuellen Stadien sowie in Gametozyten Proteinexport stattfindet. Im Folgenden gehe ich nur noch auf den Proteinexport im Erythrozyten ein, wobei der Export von Proteinen im Hepatozyten wahrscheinlich analog ist (Vaughan et al., 2012; Matthews et al., 2013). Um in den Erythrozyten zu gelangen müssen exportierte Proteine die PM, die PV und die PVM durchqueren. In Plasmodien gibt es zwei Arten von exportierten Proteinen, die als PEXEL-Proteine (engl. *Plasmodium Export Element*) (vgl. Kap. 1.5.1) und als PNEPs (engl. *PEXEL Negative Exported Proteins*) (vgl. Kap. 1.5.4) bezeichnet werden. Wie die meisten sekretorischen Proteine besitzen fast alle exportierten Proteine ein Signalpeptid (SP), welches den Eintritt in das endoplasmatische Retikulum (ER) des Parasiten ermöglicht. Vom ER werden die Proteine in die PV transportiert (Tonkin et al., 2006a; Haase & de Koning-Ward, 2010). Im Anschluss erfolgt die Translokation durch die PVM in den Erythrozyten. Im Erythrozytenzytosol werden die Proteine zu ihrem finalen Zielort transportiert, wozu die Anreicherung in den Maurer'schen Spalten, die Insertion als Proteinkomplex unter die Erythrozytenmembran oder die Wirtszelloberfläche gehören (Boddey & Cowman, 2013).

1.5.1 Das PEXEL-Motiv

Die meisten exportierten Proteine sind durch die Anwesenheit einer zusätzlichen Signalsequenz neben dem SP charakterisiert, wobei bei diesen Proteinen das SP N-terminal oder in der Nähe des N-Terminus liegen kann. Das zusätzliche pentamere Sequenzmotiv mit dem Konsensus R.L.E/Q/D wurde als PEXEL (Marti et al., 2004) bzw. VTS (engl. *Vacuolar Transport Signal*) (Hiller et al., 2004) bezeichnet und ist für die Translokation durch die PVM notwendig. Die Position 1, 3 und 5 des Motivs sind weitestgehend konserviert. An der Position 2 und 4 können beliebige ungeladene Aminosäuren vorkommen. Nur einige wenige PEXEL-Motive besitzen nach der Position 3 zwei neutrale Aminosäuren wie z.B. RESA (RNLYGE) (engl. *Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen*) (Boddey et al.,

2013). Diese werden als „*relaxed*“ PEXEL bezeichnet. Die Position des PEXEL-Motivs innerhalb eines exportierten Proteins ist üblicherweise in der N-terminalen Region innerhalb der ersten 100 Aminosäuren (Hiller et al., 2004; Sargeant et al., 2006), meistens etwa 20-30 Aminosäuren hinter dem SP. Bioinformatische Vorhersagen des „Exportoms“ von *P. falciparum* identifizierten über 350 Proteine mit einem PEXEL-Motiv (Marti et al., 2004; Hiller et al., 2004; Sargeant et al., 2006; van Ooij et al., 2008; Boddey et al., 2013). Der Anteil an exportierten Proteinen macht somit etwa 5% des kodierenden Genoms von *P. falciparum* aus. Etwa 75% dieser exportierten Proteine gehören großen Proteinfamilien wie RIFINs (engl. *Repetitive Interspersed Family*), STEVORs (engl. *Subtelomeric Variable Open Reading Frame*), FIKK-Kinasen, PHISTs (engl. *Plasmodium Helical Interspersed Subtelomeric*) und DNAJs an (Sargeant et al., 2006). Ein Großteil dieser Proteine besitzt eine zwei Exon-Struktur und liegt in subtelomeren Regionen auf den Chromosomen (Sargeant et al., 2006; van Ooij et al., 2008). Diese Chromosombereiche sind dafür bekannt Gene zu besitzen, welche für die Modifikation der Wirtszelle verantwortlich sind (Haase & de Koning-Ward, 2010). Eine Beteiligung an der Modifikation des Erythrozyten durch PEXEL-Proteine konnte durch Maier und Kollegen bestätigt werden (Maier et al., 2008).

1.5.2 Der Transportmechanismus

Eine Erkennung des PEXEL-Motivs findet bereits im ER statt. Dort wird das PEXEL-Motiv proteolytisch durch die Protease Plasmepsin V am C-Terminus des konservierten Leucin gespalten (R.L ↓.E/Q/D) (Boddey et al., 2010; Russo et al., 2010) und anschließend N-acetyliert (Ac-.E/Q/D) (Chang et al., 2008; Boddey et al., 2009). Hierbei sind die Aminosäuren Arginin und Lysin des PEXEL-Motivs essentiell für die Erkennung und Prozessierung durch Plasmepsin V, wohingegen die Aminosäuren an Position 4 und 5 (E/Q/D) für den effizienten Export wichtig sind (Boddey et al., 2009; Boddey et al., 2010; Grüning et al., 2012; Boddey et al., 2013; Tarr et al., 2013; Sleebs et al., 2014). Welche Rolle die N-Acetylierung für den Export der Proteine spielt ist noch nicht geklärt. Neueste Studien zeigen, dass das PEXEL-Motiv vor der Prozessierung im ER mit dem Phospholipid Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) assoziieren soll (Bhattacharjee et al., 2012a; Bhattacharjee et al., 2012b). Dabei wird vermutet, dass PI3P in bestimmten Bereichen der ER-Membran angereichert ist und dadurch PEXEL-Proteine in spezifischen „Export-Zonen“ zurückhält, bevor sie durch Plasmepsin V prozessiert werden (Bhattacharjee et al., 2012b). Allerdings kommt PI3P normalerweise nicht im ER vor und es wird angenommen, dass eine Beteiligung von PI3P am Export von PEXEL-Proteinen eher unwahrscheinlich ist (Boddey & Cowman, 2013; Marti & Spielmann, 2013). Unterstützt wird diese Annahme durch eine Studie von Sleebs et al. (2014), die gezeigt haben, dass die Spaltung der Proteine durch Plasmepsin V kotranslational erfolgt. Somit ist die Idee einer Bindung von PEXEL-Proteinen an PI3P an der Membran nicht vereinbar.

Das durch Plasmeypsin V prozessierte Protein wird vermutlich durch Transportvesikel in die PV befördert und mit Hilfe des Translokons PTEX (engl. *Plasmodium Translocon of Exported Proteins*) durch die PVM in den Erythrozyten transportiert (vgl. Abb. 1.6) (Gehde et al., 2009; de Koning-Ward et al., 2009; Grüning et al., 2012; Matthews et al., 2013; Matz et al., 2013; Beck et al., 2014; Elsworth et al., 2014). PTEX ist ein membranassoziierter 1,2 MDa großer Komplex (Bullen et al., 2012a), wobei die Translokationsmaschinerie fünf Komponenten umfasst (vgl. Abb. 1.6) (de Koning-Ward et al., 2009; Matthews et al., 2013; Matz et al., 2013; Beck et al., 2014; Elsworth et al., 2014): das Chaperon HSP101 (engl. *Heat Shock Protein 101*), PTEX88, PTEX150, EXP2 (engl. *Exported Protein 2*) und Trx2 (engl. *Thioredoxin 2*). Die unterschiedlichen PTEX-Komponenten werden in *Dense Granules* von Merozoiten exprimiert und nach der Invasion des Erythrozyten in die PVM integriert (Bullen et al., 2012a). Durch eine Auto-Inhibitions-Strategie konnte für HSP101 gezeigt werden, dass dieses für den Export von Proteinen in die Wirtszelle wichtig ist und somit das PTEX tatsächlich für die Translokation von exportierten Proteinen verantwortlich ist (Beck et al., 2014). Dabei handelt es sich bei HSP101 um ein Chaperon, welches eine AAA+ATP-Domäne besitzt, und vermutlich an der Entfaltung von Proteinen beteiligt ist (de Koning-Ward et al., 2009). Zusätzlich werden eventuell andere Chaperone an der Entfaltung beteiligt sein, die aber keine Komponente des PTEX sind (Nyalwidhe & Lingelbach, 2006). Die Komponente EXP2 ist ein integrales Membranprotein, welches durch Oligomerisierung Poren in die PVM integriert (Mueller et al., 2009). Trx2, welches zur Thioredoxin-Superfamilie gehört (Nickel et al., 2006; Bullen et al., 2012b), wird eine regulatorische Funktion durch potentielle Redoxmechanismen zugeschrieben (Haase & de Koning-Ward, 2010; Sharma et al., 2011; Bullen et al., 2012b; Matthews et al., 2013). Eine Deletion des *trx2*-Gens in *P. falciparum* führte zu einem reduziertem Wachstum des Parasiten sowie einer Abschwächung der Virulenz in einem zerebralen Malariamodel (Matthews et al., 2013). Die Funktion von PTEX150 und PTEX88 ist noch unbekannt. Es konnte aber mit Hilfe eines induzierbaren Ribozymsystems für die Komponente PTEX150 in *P. falciparum* gezeigt werden, dass dieses Element des PTEXs für den Export von Proteinen essentiell ist (Elsworth et al., 2014). Somit übernehmen die PTEX-Komponenten HSP101, EXP2 und PTEX150 zentrale Rollen für den Export von Proteinen (Matz et al., 2013; Beck et al., 2014; Elsworth et al., 2014), wohingegen Trx2 und PTEX88 unterstützende Funktionen im PTEX besitzen (Matthews et al., 2013; Matz et al., 2013).

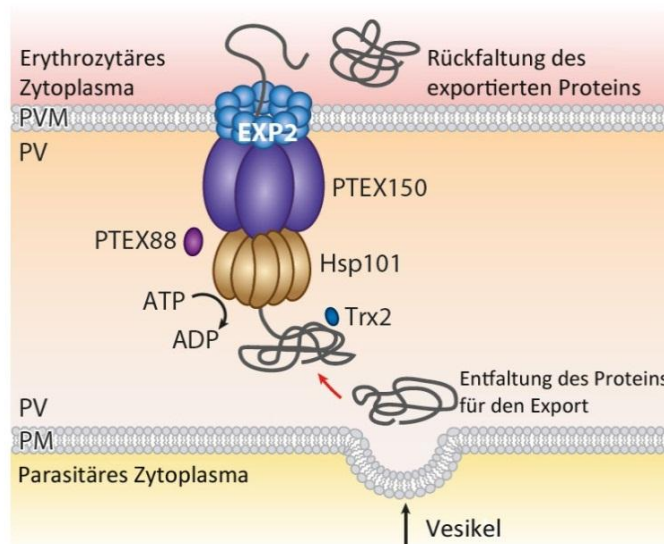


Abbildung 1.6: Model zum Proteinexport mit Hilfe des Translokons PTEX (engl. *Plasmodium Translocon of Exported Proteins*). Mit Hilfe von Transportvesikeln gelangen zu exportierende Proteine in die parasitophore Vakuole (PV). Das Protein wird wahrscheinlich in der PV durch das Chaperon HSP101 entfaltet und anschließend durch den HSP101-PTEX150-Komplex zu EXP2 geschleust. EXP2 bildet vermutlich durch Oligomerisierung eine Pore in der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM), so dass Proteine in das erythrozytäre Zytoplasma gelangen. PTEX88 und Trx2 übernehmen regulatorische Funktionen. Im Zytoplasma der Wirtszelle findet eine Rückfaltung des exportierten Proteins statt (nach Boddey & Cowman, 2013; modifiziert).

Der Transport von Proteinen von der PVM durch das Zytosol des Erythrozyten bis hin zur Wirtszelloberfläche ist noch nicht eindeutig geklärt. Bekannt ist, dass die Maurer'schen Spalten am Transport von Parasitenproteinen auf die Oberfläche des Erythrozyten beteiligt sind (Lanzer et al., 2006; Bhattacharjee et al., 2008; Tilley & Hanssen, 2008). Während lösliche Proteine nach der Translokation durch die PVM, die Maurer'schen Spalten durch Diffusion erreichen können, ist die Situation für Proteine mit Transmembrandomänen weitaus komplizierter (Marti & Spielmann, 2013). Zum einen wäre ein vesikulärer Transport von Transmembranproteinen zu den Maurer'schen Spalten denkbar (Trelka et al., 2000; Spycher et al., 2006). Zum anderen gibt es zunehmend Hinweise, dass Transmembranproteine ebenfalls in löslicher Form zu den Maurer'schen Spalten gelangen (Papakrivos et al., 2005; Grüning et al., 2011; Grüning et al., 2012).

1.5.3 Die Plastizität des PEXEL-Motivs

Das PEXEL-Motiv ist bei allen Plasmodienspezies konserviert, kommt aber nicht bei entfernt verwandten Apikomplexa vor (Sargeant et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass das PEXEL-Motiv ausgewählter *P. falciparum*-Proteine Export in anderen Plasmodienspezies vermittelt und reziprok die PEXEL-Sequenz unterschiedlicher Plasmodienspezies in *P. falciparum* funktionell ist (Marti et al., 2004; MacKenzie et al., 2008). Weiterhin konnte Plasmepsin V, und die an der

Exportmaschinerie beteiligten Komponenten des PTEX, bei anderen Arten der Gattung *Plasmodium* nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass bei allen Plasmodienspezies die gleichen Transportmechanismen verwendet werden (de Koning-Ward et al., 2009; Boddey et al., 2010; Russo et al., 2010; Elsworth et al., 2014). Allerdings wurden im Vergleich zu *P. falciparum* in anderen Plasmodienspezies 5-10 mal weniger PEXEL-Proteine vorhergesagt: So konnte Sargeant et al. (2006) 396 putativ exportierte Proteine in *P. falciparum* identifizieren, aber lediglich 32 in *P. vivax*, 30 in *P. knowlesi*, 11 in *P. chabaudi*, 57 in *P. yoelii* und 37 in *P. berghei*. Sicher ist, dass alle Plasmodienspezies Wirtszellmodifikation vornehmen und daher zahlreiche Proteine exportiert werden müssen. Eine Erklärung für die niedrige Anzahl vorhergesagter putativ exportierter Proteine in anderen Malariaspezies könnte auf die evolutionäre Plastizität des PEXEL-Motivs zurückzuführen sein (Pick et al., 2011). So besitzen beispielsweise einige zu *P. falciparum* orthologe PEXEL-Proteine an erster Position des Motivs die Aminosäure Lysin anstelle eines Arginins bzw. an dritter Position anstelle der Aminosäure Leucin ein Isoleucin. Bisher ist aber noch nicht sicher, ob diese alternativen PEXEL-Motive auch funktionell sind. So konnte bei den Virulenzproteinen PfEMP1 ebenso ein PEXEL-ähnliches Motiv mit der Konsensussequenz R/K.L/V/M.E/D identifiziert werden (Goldberg & Cowman, 2010). Obwohl dieses Motiv für den Export des Proteins wichtig zu sein scheint (Marti et al., 2004), findet keine Prozessierung durch Plasmeypsin V statt und PfEMP1 wurde als PNEP definiert (vgl. Kap. 1.5.4) (Boddey et al., 2013). Weiterhin zeigten Untersuchungen des Proteins KAHRP, bei dem das klassische PEXEL-Motiv (RTLAQ) durch alternative PEXEL-Motive ersetzt wurde (RTIAQ; KTLAQ), nur eine geringe bzw. gar keine Prozessierung dieser Motive durch Plasmeypsin V und in diesem Zusammenhang auch einen nur geringen bzw. gar keinen Export (Boddey et al., 2013). Boddey und Kollegen gehen daher davon aus, dass alternative PEXEL-Motive keinen Export vermitteln. Ob und welchen Anteil alternative PEXEL-Motive vom Exportom von *P. falciparum* bzw. anderer Plasmodienarten ausmacht ist somit nicht sicher und muss daher noch eindeutig geklärt werden.

1.5.4 PNEPs

Neben PEXEL-Proteinen gibt es eine zweite Gruppe von exportierten Proteinen, welche kein PEXEL-Motiv besitzen und daher als PNEP bezeichnet werden (Spielmann & Gilberger, 2010). Bekannte PNEPs sind unter anderem SBP1 (engl. *Skeleton Binding Protein 1*) (Blisnick et al., 2000), MAHRP1 (engl. *Membrane Associated Histidine Rich Protein 1*) (Spycher et al., 2003), MAHRP2 (Pachlatko et al., 2010), REX1 (engl. *Ring Exported Protein 1*) (Hawthorne et al., 2004) und REX2 (Spielmann et al., 2006b). Eine Gemeinsamkeit dieser PNEPs ist die Lokalisation an den Maurer'schen Spalten (vgl. Abb. 1.5A) bzw. assoziierten Strukturen wie den „Tethern“. Dabei spielen die Proteine MAHRP1, SBP1 und REX1 eine wichtige Rolle beim Export des Virulenzfaktors PfEMP1 an die Erythrozytenoberfläche

(Cooke et al., 2006; Maier et al., 2007; Spycher et al., 2008; Dixon et al., 2011). REX1 übernimmt zusätzlich eine Funktion bei der Formgebung von Maurer'schen Spalten (Hanssen et al., 2008a). Neben den schon bekannten PNEPs konnten erst kürzlich mehr als zehn weiterer PNEPs in *P. falciparum* identifiziert werden (Heiber et al., 2013). Die Vorhersage und Identifizierung von PNEPs im Vergleich zu PEXEL-Proteinen ist aufgrund des fehlenden gemeinsamen Sequenzmotivs (Spycher et al., 2006; Haase et al., 2009; Saridaki et al., 2009; Pachlatko et al., 2010) sehr schwer, so dass davon auszugehen ist, dass PNEPs einen größeren Anteil des vorhandenen Exportoms ausmachen als bisher angenommen wurde (Heiber et al., 2013).

Der Transport von PNEPs ist wie der von PEXEL-Proteinen Brefeldin-A sensitiv (Spycher et al., 2006; Dixon et al., 2008; Haase et al., 2009; Saridaki et al., 2009). Brefeldin A ist ein Inhibitor, welcher den Transport von Proteinen vom ER zum Golgi verhindert (Fujiwara et al., 1988). Ebenso konnte gezeigt werden, dass für einen Export in die Wirtszelle die Entfaltung sowohl löslicher als auch unlöslicher PNEPs notwendig ist (Grüning et al., 2012; Heiber et al., 2013). Hinzu kommt, dass zwar keine Prozessierung durch Plasmeypsin V stattfindet (Boddey et al., 2013), aber der N-Terminus von PNEPs dennoch funktionell dem von prozessierten PEXEL-Proteinen ähnelt (Grüning et al., 2012). Neuste Studien konnten bestätigen, dass eine Translokation von PNEPs in die Wirtszelle über die PVM durch das PTEX geschieht (Beck et al., 2014; Elsworth et al., 2014).

1.6 Zielsetzung

Viele exportierte Proteine übernehmen essentielle Funktionen bei der Modifikation der Wirtszelle und sind für die hohe Pathogenität von *P. falciparum* verantwortlich. Um die Mechanismen der Modifikation der Wirtszelle durch den Parasiten zu verstehen ist es daher wichtig das gesamte Exportom von *P. falciparum* und anderer Malariaerreger zu kennen. Aufgrund unterschiedlicher Untersuchungen besteht die derzeitige Annahme, dass alternative PEXEL-Motive keinen Export von Proteinen vom Parasiten in die Wirtszelle vermitteln und wurden daher im aktuellen Exportom nicht berücksichtigt (Boddey et al., 2013). Phylogenetische Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass orthologe PEXEL-Proteine Abweichungen in der Zusammensetzung des Motivs aufweisen, welche durch den Austausch der Position 1 bzw. 3 durch die Aminosäuren Lysin, Histidin oder Isoleucin gekennzeichnet sind (Pick et al., 2011). Um eine Aussage treffen zu können, ob alternative PEXEL-Proteine einen Teil des Exportoms von *P. falciparum* ausmachen, sollte daher im Rahmen dieser Arbeit die Funktionalität von alternativen PEXEL-Motiven getestet werden. Unter anderem sollte dies anhand des Austauschs des klassischen PEXEL-Motivs der Reporterproteine KAHRP, REX3 (engl. *Ring Exported Protein 3*) und GBP (engl. *Glycophorin Binding Protein*) durch alternative PEXEL-Motive geschehen. Des Weiteren sollten endogene alternative PEXEL-Proteine in *P. falciparum* mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen identifiziert und charakterisiert werden. Die Charakterisierung von

alternativen PEXEL-Motiven könnte dazu beitragen, dass neue exportierte Proteine identifiziert und die Exportome von *P. falciparum* und anderer Malariaerreger erweitert werden. Die Identifizierung von neuen exportierten Proteinen ist wichtig, damit wirksame Medikamente bzw. ein geeigneter Impfstoff entwickelt werden kann.

2 Material & Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verwendete Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden während dieser Arbeit verwendet:

AlbumaxII	Gibco, Auckland (Neuseeland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Ampicillin	Roche, Mannheim
BODIPY-TR-C ₅ Ceramid	Life technologies, Darmstadt
Complete Mini, Proteaseinhibitorcocktailtabletten	Roche, Mannheim
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg
4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Roche, Mannheim
Entwicklerlösung G150	Agfa, Bonn
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Fixierlösung G334	Agfa, Bonn
Gentamycin	Ratiopharm, Ulm
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)- ethansulfonsäure (HEPES)	Roche, Mannheim
Hypoxanthin	Biomol, Hamburg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Percoll	GE Healthcare, Uppsala (Schweden)
RPMI-1640	Life technologies, Darmstadt
Saponin	Serva, Heidelberg
Tetanolysin	List biological laboratories, Campbell (USA)
Triton-X-100	Biomol, Hamburg
Trizol	Life technologies, Darmstadt
WR99210	Jacobus Pharmaceuticals, Maryland (USA)

Alle für die Versuche genutzten Chemikalien, deren Bezugsquelle nicht aufgeführt ist, wurden von Carl-Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

2.1.2 Verwendete Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Geräte verwendet:

Agarosegelkammern	Horizontal-Elektrophoresekammer (A. Hartenstein, Würzburg)
-------------------	---

	PerfectBlue Gelsystem (Peqlab, Erlangen)
Autoklav	3850 ELV (Tuttnauer, Breda, Niederlande)
Brutschränke	Innova 4200 und 4230 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, Nürtingen)
	B6200 (Heraeus, Hannover)
Elektroblotter	Phase (Bio-Rad, München)
Elektroporator	X-Cell (Bio-Rad, München)
Eismaschine	AF-10 (Scotsman, Venron Hills, USA)
	GB-1555 (Brema Ice Makers, Villa Cortese, Italien)
Entwickler	Curix60 (AGFA-Gevaert, Mortsel, Belgien)
Entwicklerkassette	Cronex Quanta III (Dupont, Neu-Isenburg)
Geldokumentation	Fusion Fx7 (Peqlab, Erlangen)
Hamamatsu-Digitalkamera	Orca C4743-95 (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan)
Heizblöcke	Bio TDB-100 (A. Hartenstein, Würzburg)
	TB-1 Thermoblock (Biometra, Göttingen)
Magnetrührer	19R3001 (Heidolph, Schwabach)
	L32 (Labinco, Breda, Niederlande)
Mikroskope	Durchlicht-Mikroskop Standard 20 (Zeiss, Jena)
	Fluoreszenz-Mikroskop Axio Imager M1 (Zeiss, Jena)
Mikrowelle	Grill (LG, Seoul, Korea)
pH-Messgerät	InoLab pH 720 (WTW, Weilheim)
Reinstwasseranlage	Mili-Q (Milipore, Bedford, USA)
	211 Microprocessor (Hanna Instruments, Kehl)
Photometer	BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
	Nanodrop 1000 (Peqlab, Erlangen)
Rollermixer	SRT6 (Bibby Scientific, Staffordshire, USA)
Schüttler	Stuart See Saw Rocker SSL4 (Barloworld Scientific, Staffordshire, GB)
	GFL-3005 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)

SDS-Gelkammer	Mini-PROTEAN Electrophoresis System (Bio-Rad, München)
Spannungsgeber	Consort EV 243 (Jencons, Bedfordshire, GB)
Sterilbank	Sterigard III Advance (Baker, Stanford, USA)
Thermocycler	Lab Cycler Gradient (SensoQuest GmbH, Göttingen) T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen) Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
Vortexer	REAX2000 (Heidolph, Kelheim) Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)
Waagen	Sartorius BP210S (Sartorius AG, Göttingen) ISO 9001 (Scaltec, Göttingen) MC1 Laboratory LC 2200P (Sartorius AG, Göttingen) SE 622 (VWR, Darmstadt)
Wasserbad	3047 (Köttermann, Hannover) 1004 (GFL, Burgwedel)
Westernblot	Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, München) Elektroblotter Kammer Typ SD 18 (A. Hartenstein, Würzburg)
Zentrifugen	Sigma 1-14 Mikrozentrifuge (Sigma, Osterode am Harz) Speed Vac SC110 (Thermo/Savant, Dreieich) Heraeus Labofug 400R (Heraeus, Hanau) Zentrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg) J2-M1 Ultrazentrifuge (Beckman, München)

Verwendete Gebrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml) sowie Zentrifugenröhrchen („Falcons“; 15 ml und 50 ml), Pipettenspitzen, Petrischalen, Kryoröhrchen, Transfektionsküvetten, Glasobjektträger, Deckgläser und Röntgenfilme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Agfa Healthcare (Bonn), Carl Roth (Karlsruhe), Bio-Rad (München), Greiner (Frickhausen), R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik (Emmendingen), Nunc (Langenselbold), Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf) und Starlab (Ahrensburg) bezogen.

2.1.3 Enzyme

Folgende Enzyme (Polymerasen, Ligasen und Restriktionsendonukleasen) wurden verwendet:

Polymerasen

AccuPrime Taq Polymerase	Life technologies, Darmstadt
MolTaq	Molzym, Bremen
Pfu-Polymerase	Promega, Mannheim
Super Script III	Life technologies, Darmstadt

Ligasen

T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim
---------------	-------------------

Restriktionsendonukleasen

<i>Apal</i>	(GGGCC [^] C)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>AvrII/BlnI</i>	(C [^] CTAGG)	Takara, Shiga (Japan)
<i>BglII</i>	(A [^] GATCT)	NEB, Ipswich (USA)
<i>DpnI</i>	(GA[-CH ₃] [^] TC)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>KpnI</i>	(GGTAC [^] C)	NEB, Ipswich (USA)
<i>PstI</i>	(CTGCA [^] G)	Fermentas, St- Leon-Rot

2.1.4 Kommerzielle Kits

Folgende Kits wurden verwendet:

AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity Kit	Life technologies, Darmstadt
Crystal Gel-Extraktionskit	Biolap Products, Bebensee
GFP-Trap_A	Chromotek, Planegg-Martinsried
peqGOLD Plasmid Mini Prep Kit	Peqlab, Erlangen
peqGOLD XChange Plasmid Midi Kit	Peqlab, Erlangen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Life technologies, Darmstadt
Western Blot ECL-Detection Kit	Pierce, Rockford (USA)
	GE Healthcare, Uppsala (Schweden)
	Bio-Rad, München

2.1.5 Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren (Vektorkarte vgl. Anhang B) befinden sich in der Tabelle 2.1.

Tabelle 2.1: Verwendete Vektoren.

Bezeichnung	Verwendung	Resistenz	Hersteller/Quelle
pGEM-T	Linearer Klonierungsvektor	Ampicillin	Promega, Mannheim
pJET1.2/blunt	Linearer Klonierungsvektor	Ampicillin	Fermentas, St. Leon-Rot
pARL1a(-)	Expression Epitop-markierter Proteine im <i>P. falciparum</i> -Stamm 3D7	Ampicillin	Crabb et al., 2004; Heiber et al., 2013

2.1.6 Antikörper

Die verwendeten Erstantikörper sind in der Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.2: Verwendete primäre Antikörper.

Name	Gen	Tier	WB	IFA	Referenz
αGFP	-	Maus	1:1000	1:500	Roche, Mannheim
αGFP	-	Kaninchen	1:1000	1:500	Open Biosystems, Huntsville (USA)
αKAHRP	PFB0100c	Kaninchen	-	1:500	Prof. Dr. Brian Cooke, Monash University, Melbourne (Australien)
αMAHRP2	PF13_0276	Kaninchen	-	1:250	Pachlatko et al., 2010
αMSRP6	PF13_0192	Maus	-	1:500	Heiber et al., 2013
αMSP7 ₂₂	PF13_0197	Kaninchen	1:2000		Pachebat et al., 2007
αREX2	PFI1740c	Maus	-	1:500	Spielmann et al., 2006b
αREX3	PFI1755c	Maus	1:1000	-	Spielmann et al., 2006b
αSBP1	PFE0065w	Kaninchen	-	1:375	Cooke et al., 2006
αSERP	PFB0340c	Kaninchen	1:2000	-	Knapp et al., 1989

Aufgeführt sind die jeweiligen Verdünnungen der verwendeten Antikörper im Westernblot (WB) bzw. in der Immunfluoreszenzanalyse (IFA).

Für die Versuche wurden Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte (HRP) oder Alexa-488- bzw. Alexa-594-gekoppelte Zweitantikörper verwendet, welche in der Tabelle 2.3 aufgeführt sind.

Tabelle 2.3: Verwendete sekundäre Antikörper.

Name	Tier	Konjugat	WB	IFA	Referenz
α Maus	Kaninchen	HRP	1:3000	-	Dianova, Hamburg
α Kaninchen	Esel	HRP	1:2500	-	Dianova, Hamburg
α Kaninchen		Alexa-488	-	1:2000	Life technologies, Darmstadt
α Kaninchen		Alexa-594	-	1:2000	Life technologies, Darmstadt
α Maus		Alexa-488	-	1:2000	Life technologies, Darmstadt
α Maus		Alexa-594	-	1:2000	Life technologies, Darmstadt

Aufgeführt sind die jeweiligen Verdünnungen der verwendeten Antikörper im Westernblot (WB) bzw. in der Immunfluoreszenzanalyse (IFA).

2.1.7 DNA- und Proteinstandards

Folgende DNA- und Proteinstandards wurden benutzt:

GeneRuler DNA Ladder Mix (#SM0331)	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler Prestained Protein Ladder (#SM26616)	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg) synthetisiert. Eine Lagerung fand bei einer Konzentration von 100 pmol/ μ l statt, wobei zum Einsatz in der PCR (vgl. Kap. 2.2.5) eine Gebrauchslösung von 10 pmol/ μ l hergestellt wurde. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5'-3')
KAHRP ¹⁻⁷⁸ -X-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAAAAGTTTTAAGAACAAAAATACTTTG
KAHRP ¹⁻⁷⁸ -RTLAQ-GFP rev	GCGTACCTAGGTGGAGCTTGGTGTGGT
KAHRP ¹⁻⁷⁸ -RTIAQ-GFP rev	GCGTACCTAGGTGGAGCTTGGTGTGGTGTGATGTTGATGGTGATGG TGGTGATGGTGTTTCATGTTGCTTTTGTGCTATAGTTCT
KAHRP ¹⁻⁷⁸ -KTLAQ-GFP rev	GCGTACCTAGGTGGAGCTTGGTGTGGTGTGATGTTGATGGTGATGG TGGTGATGGTGTTTCATGTTGCTTTTGTGCTAAAGTTTCTT
KAHRP ¹⁻⁷⁸ -HTLAQ-GFP rev	GCGTACCTAGGTGGAGCTTGGTGTGGTGTGATGTTGATGGTGATGG TGGTGATGGTGTTTCATGTTGCTTTTGTGCTAAAGTGTGCT
KAHRP ¹⁻⁷⁸ -ATLAQ-GFP rev	GCGTACCTAGGTGGAGCTTGGTGTGGTGTGATGTTGATGGTGATGG TGGTGATGGTGTTTCATGTTGCTTTTGTGCTAAAGTTGCCT
REX3 ¹⁻⁷⁰ -X-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGCAAACCCGTAAATATAATA
REX3 ¹⁻⁷⁰ -RQLAE-GFP rev	GCGTACCTAGGTGCTTCTATATGTGATGACT
REX3 ¹⁻⁷⁰ -RQIAE-GFP rev	GCGTACCTAGGTGCTTCTATATGTGATGACTCTGCATTTGTTTTTTTT AAATCCTGTTCTTCTACAACTGGTTCAGATATTTGCCT
REX3 ¹⁻⁷⁰ -KQLAE-GFP rev	GCGTACCTAGGTGCTTCTATATGTGATGACTCTGCATTTGTTTTTTTT AAATCCTGTTCTTCTACAACTGGTTCAGATAATTGCTT
REX3 ¹⁻⁷⁰ -KQIAE-GFP rev	GCGTACCTAGGTGCTTCTATATGTGATGACTCTGCATTTGTTTTTTTT AAATCCTGTTCTTCTACAACTGGTTCAGATATTTGCTTGA
REX3 ¹⁻⁷⁰ -HQLAE-GFP rev	GCGTACCTAGGTGCTTCTATATGTGATGACTCTGCATTTGTTTTTTTT AAATCCTGTTCTTCTACAACTGGTTCAGATAATTGGTGAAACT
REX3 ¹⁻⁷⁰ -HQIAE-GFP rev	GCGTACCTAGGTGCTTCTATATGTGATGACTCTGCATTTGTTTTTTTT AAATCCTGTTCTTCTACAACTGGTTCAGATATTTGGTGAAACT
REX3 ¹⁻⁷⁰ -AQLAE-GFP rev	GCGTACCTAGGTGCTTCTATATGTGATGACTCTGCATTTGTTTTTTTT

REX3 ¹⁻⁷⁰ -RKLKE-GFP rev	AAATCCTGTTCTTCTACAACCTGGTTCAGATAATTGCGCGAAACT GCGTACCTAGGTGCTTCTATATGTGATGACTCTGCATTTGTTTTTTTTTAAAT CCTGTTCTTCTACAACCTGGTCTTTTAATTTTCCT
GBP ¹⁻¹⁰⁸ -X-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGCGACTTTCTAAAGTATCT
GBP ¹⁻¹⁰⁸ -RILAE-GFP rev	GCGTACCTAGGTGTTTTCTGCTTACTTTTTCT
GBP ¹⁻¹⁰⁸ -RIIAE-GFP rev	GCGTACCTAGGTGTTTTCTGCTTACTTTTTCTTAATGTAGTCTTTTTCT TTTCGTGCACACGTATCTTCTCCTTCAGCTATAAATTCT
GBP ¹⁻¹⁰⁸ -KILAE-GFP rev	GCGTACCTAGGTGTTTTCTGCTTACTTTTTCTTAATGTAGTCTTTTTCT TTTCGTGCACACGTATCTTCTCCTTCAGCTAAAATCTT
GBP ¹⁻¹⁰⁸ -KIIEAE-GFP rev	GCGTACCTAGGTGTTTTCTGCTTACTTTTTCTTAATGTAGTCTTTTTCT TTTCGTGCACACGTATCTTCTCCTTCAGCTATAATTTT
GBP ¹⁻¹⁰⁸ -HILAE-GFP rev	GCGTACCTAGGTGTTTTCTGCTTACTTTTTCTTAATGTAGTCTTTTTCT TTTCGTGCACACGTATCTTCTCCTTCAGCTAAAATGTGGC
GBP ¹⁻¹⁰⁸ -HIIEAE-GFP rev	GCGTACCTAGGTGTTTTCTGCTTACTTTTTCTTAATGTAGTCTTTTTCT TTTCGTGCACACGTATCTTCTCCTTCAGCTATAATGTGGC
GBP ¹⁻¹⁰⁸ -AILAE-GFP rev	GCGTACCTAGGTGTTTTCTGCTTACTTTTTCTTAATGTAGTCTTTTTCT TTTCGTGCACACGTATCTTCTCCTTCAGCTAAAATTGCG
PFE0050w-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGATGAATAAAAAATCAATGCAAAAC
PFE0050w-GFP rev	GCGTACCTAGGTTTATTTGATTCTTGTTTCGTTACG
PFI1750c-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGTTAACTGTTATTTTAAAAATATTAG
PFI1750c-GFP rev	GCGTACCTAGGATTAGGTATCTCATCTTGGTC
PF07_0087-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGTCGAGACTTTTCTCTTTC
PF07_0087-GFP rev	GCGTACCTAGGTTCAGTCACATAACATACTGG
PF08_0004-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAAGAATAAACTTTCTACATTATTT
PF08_0004-GFP rev	GCGTACCTAGGAAGCATCCATACGCGG
PF08_0015-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAGAAAAGAATCCTTTTTAT
PF08_0015-GFP rev	GCGTACCTAGGTATTTTCGTATAGTGTATCGC
PF11_0055 ¹⁻²⁵² -GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAAAACAAATATCTTCTCATGC
PF11_0055 ¹⁻²⁵² -GFP rev	GCGTACCTAGGTTCAGAGTATACATTAAGCCAA
PF11_0349 ¹⁻¹⁸⁰ -GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAAAGTAGTTCAGAGTATAAT
PF11_0349 ¹⁻¹⁸⁰ -GFP rev	GCGTACCTAGGTTCGTTTCATCCATTGTTTTA
PF13_0032 ¹⁻¹⁹⁰ -GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAAATTATCGCTAGTAATTTTTTG
PF13_0032 ¹⁻¹⁹⁰ -GFP rev	GCGTACCTAGGGTTGCTTTTCTTCGTTGGT
PF13_0125-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAAAGTAAAAAATTAGTAAAATTC
PF13_0125-GFP rev	GCGTACCTAGGAGAACAAGCACTTGGTAA
PF13_0193-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGATAAAAGGACTTATTTTTTAT
PF13_0193-GFP rev	GCGTACCTAGGACTATATAAAACCATACATTACC
PF13_0197-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAAGAGTAATATCATATTTTTAT
PF13_0197-GFP rev	GCGTACCTAGGCATTGTGTTTAGTAAATTAAATGA
PF13_0218a-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGATAATAATTATTATTATTCTAC
PF13_0218a-GFP rev	GCGTACCTAGGATTATCACTGTAATATTTATGG
PF13_0331-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGGAGGATAAAATACGAAAGTATG
PF13_0331-GFP rev	GCGTACCTAGGTTTCCATACGTCAGCTTGTTG
PF14_0105-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGTCCCAACTATATTTGGTG
PF14_0105-GFP rev	GCGTACCTAGGGAAAATAAATTCACGCTTTAATGT
PF14_0275-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAAAGATATTGCTCTTTT
PF14_0275-GFP rev	GCGTACCTAGGTTCCTTTGTCTTATGCAA
PF14_0325-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAAATTATCTCATCTTAT
PF14_0325-GFP rev	GCGTACCTAGGTATATATGTGATAAATAGAAAG
PFA0135w-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGATATTTTCATAAATGCTTTAAAAAT
PFA0135w-GFP rev	GCGTACCTAGGTTTAGCTAGCTGTTTCCAC
PFA0610c-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAAAAAATCATATACTTTTATAAATG
PFA0610c-GFP rev	GCGTACCTAGGTCTTTTATTTTTTATAAAACAATTCTAG
PFC0085c-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGGCAAAAGATAGTCAAAAG
PFC0085c-GFP rev	GCGTACCTAGGATTTTTTTTTTGATTTTTTATTATTATTGTTG
PFC0085c ¹⁻²²⁰ -KSLAE-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGGCAAAAGATAGTCAAAAG

PFC0085c ¹⁻²²⁰ -KSLAE-GFP rev	GCGTACCTAGGAATGAAATCCACAAAATGTC
PFC0085c ¹⁻²²⁰ -ASLAE-GFP fwd	AAGAATTAATGCATCCTTAGCCGAAATGGATCATA
PFC0085c ¹⁻²²⁰ -ASLAE-GFP rev	TATGATCCATTTTCGGCTAAGGATGCATTAATTCTT
PFC0085c ¹⁻²²⁰ -ESLAE-GFP fwd	AAGAATTAATGAATCCTTAGCCGAAATGGATCATA
PFC0085c ¹⁻²²⁰ -ESLAE-GFP rev	TATGATCCATTTTCGGCTAAGGATTCATTAATTCTT
PFD0144c-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAAAATCCTATTTTTTTTTTTT
PFD0144c-GFP rev	GCGTACCTAGGCGAATTATAGTTTAAAATTGTTG
PFD1205w-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAATTTTTGTTTCATTTATTTT
PFD1205w-GFP rev	GCGTACCTAGGTTGTTTCATGTGTTTCGT
PFD1205w ¹⁻¹¹⁰ -GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAATTTTTGTTTCATTTATTTT
PFD1205w ¹⁻¹¹⁰ -GFP rev	GCGTACCTAGG ATTTTCATAATTATACGATTCTAC
PFE0645w-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAATTTTCGTATTTATTTATATCGTC
PFE0645w-GFP rev	GCGTACCTAGGAATAAGGTATATTTGAAAATTGGA
PFE0725c-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGTATTTGTTTAAAAATGCAA
PFE0725c-GFP rev	GCGTACCTAGGAAATAAAAAATTCATATCTTTTTTC
PFF0335c-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGATGCATATTTTTTGCAAGTT
PFF0335c-GFP rev	GCGTACCTAGGCTTGAAGTATGCAGAGTGTC
PFF0335c ¹⁻⁷⁷ -GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGATGCATATTTTTTGCAAGTT
PFF0335c ¹⁻⁷⁷ -GFP rev	GCGTACCTAGGTATGTCTGAAAGATTTGGTAGG
PFI1530c-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAATATCTTATACCTAATTAATAC
PFI1530c-GFP rev	GCGTACCTAGGTATTTGTGCTTCCTTATTTTT
PFI1780w-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGGCTGTTAGTACATATAATAATAC
PFI1780w-GFP rev	GCGTACCTAGGATTTTTCTTTAACTTGTTTCCTTTG
PFI1780w ¹⁻⁹⁰ -KSLAE-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGGCTGTTAGTACATATAATAATAC
PFI1780w ¹⁻⁹⁰ -KSLAE-GFP rev	GCGTACCTAGGTATTTTCGTCACCTTAATGATTTC
PFI1780w ¹⁻⁹⁰ -ASLAE-GFP fwd	AAGACATTTTGCAAGTTTAGCTGAAGCAAGTCCAG
PFI1780w ¹⁻⁹⁰ -ASLAE-GFP rev	CTGGACTTGCTTCAGCTAAACTTGCAAAATGTCTT
PFI1780w ¹⁻⁹⁰ -ESLAE-GFP fwd	AAGACATTTTGAAAGTTTAGCTGAAGCAAGTCCAG
PFI1780w ¹⁻⁹⁰ -ESLAE-GFP rev	CTGGACTTGCTTCAGCTAAACTTTCAAAATGTCTT
PFL0040c ¹⁻⁸⁰ -GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGTATATTTTGAGAAATATGTTCTG
PFL0040c ¹⁻⁸⁰ -GFP rev	GCGTACCTAGGAACATCACACTTATTTATGTTTC
PFL0045c-KMLCE-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGAATGGTGAAAATGTTAAG
PFL0045c-KMLCE-GFP rev	GCGTACCTAGGTTTTTTATAAACTTTTGAAATGAATGC
PFL0045c-AMLCE-GFP fwd	AAAATATTCAGCAATGTTATGTGAATTGTATACAT
PFL0045c-AMLCE-GFP rev	ATGTATACAATTCACATAACATTGCTGAATATTTT
PFL0045c-EMLCE-GFP fwd	AAAATATTCAGAAATGTTATGTGAATTGTATACAT
PFL0045c-EMLCE-GFP rev	ATGTATACAATTCACATAACATTTCTGAATATTTT
PFL0070c ¹⁻¹⁸⁵ -GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGGAATTATTTGTATTAGTACGG
PFL0070c ¹⁻¹⁸⁵ -GFP rev	GCGTACCTAGGTACTTCTCCCATTATATCACTAC
MAL13P1.129-GFP fwd	GCGTAGGTACCAAACATGGAAAAGAATGTGAATGTC
MAL13P1.129-GFP rev	GCGTACCTAGGTGCCATTTTGGACATAATAG

KpnI- (GGTACC) und *AvrII*- (CCTAGG) Schnittstellen sind unterstrichen.

2.1.9 Verwendete Stämme

Escherichia coli JM109 (Derivat des Stammes K12) endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_k^- , m_k^*)
relA1, supE44, Δ (lac-proAB), [F' traD36, proAB, laq^qΔM15] (Promega, Mannheim)

Neben Bakterienstämmen wurde folgender *P. falciparum*-Stamm verwendet:

P. falciparum-Stamm 3D7

MR4, Manassas (USA), Ursprung Afrika

2.1.10 Nährmedien und Agarplatten

Zur Anzucht und Selektion der Bakterien wurden die verwendeten Nährmedien mit vollentsalztem (VE) Wasser angesetzt und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Zur Herstellung von Nährplatten wurde zusätzlich Agar hinzugefügt. Nach Abkühlung der Medien wurde zur Selektion von Bakterienstämmen und Vektoren 100 mg/l Ampicillin bzw. IPTG und X-Gal zugefügt.

LB-Medium (pro Liter)	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt pH 7,5
LB-Agar-Platten	20 g Agar-Agar auf 1 Liter LB-Medium
L-Medium (pro Liter)	5 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt pH 7,5

2.1.11 Übernachtskulturen

Für die Anzucht von einzelnen Bakterienklonen wurde eine Übernachtskultur angesetzt. Hierzu wurde eine Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte in 5-8 ml LB-Medium überführt. Das LB-Medium wurde zuvor mit Ampicillin versehen. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 125 rpm inkubiert.

2.1.12 Dauerkulturen

Zur langfristigen Lagerung eines Klons wurden Dauerkulturen angelegt. Diese enthielten 300 µl Glycerin und 700 µl einer bewachsenen Übernachtskultur. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.1.13 Programme

Adobe Photoshop V.12.0.4	Adobe Systems, Kalifornien (USA)
Axio Vision 40 V4.7.0.0	Zeiss, Jena
CorelDraw X5 V.15.2.0.695	Corel, Ontario (Kanada)
FinchTV V1.4.0	Geospiza Inc. (www.geospiza.com/finchtv)
GeneDoc V2.7.000	www.psc.edu/biomed/genedoc
ImageJ V1.48	Open Source (http://imagej.nih.gov/ij)

2.1.14 Datenbanken

Die in dieser Arbeit verwendeten Datenbanken sind in der Tabelle 2.5 zusammengefasst.

Tabelle 2.5: Verwendete Datenbanken.

Bezeichnung	Adresse	Verwendung
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Sequenzvergleich gegen Datenbanken
SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP	Vorhersage von Signalpeptiden
MAFFT	http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/	Erstellung von Alignments
OligoAnalyzer	http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/	Überprüfung von Oligonukleotiden
PlasmoDB	http://plasmodb.org/plasmo/	Plasmodiendatenbank
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/	Literaturrecherche
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	Vorhersage von Transmembrandomänen
Compute pI/MW	http://web.expasy.org/compute_pi/	Vorhersage des Molekulargewichts

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von genomischer DNA

Die genomische DNA (gDNA) des *P. falciparum*-Stammes 3D7 wurde mit Hilfe des „QIAamp DNA Mini Kits“ (Qiagen) isoliert. Dazu wurden 10 ml einer asynchronen *P. falciparum*-Kultur mit einer Parasitämie von ca. 10% bei 1800 g für 5 min sedimentiert und die Blutzellen für die Extraktion der gDNA eingesetzt. Die Isolation wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. 200 µl des Blutpellets wurden mit 20 µl Proteinkinase K und 200 µl AL-Puffer für 15 s gevortext und anschließend bei 56 °C für 10 min inkubiert. Das Lysat wurde mit 100%igem Ethanol vermengt, um eine Bindung der DNA an eine Silikamembran einer Säule zu gewährleisten. Auf dieser Säule wird die gDNA gebunden und durch Waschen von anderen Substanzen befreit. Die gDNA wurde mit 50 µl HPLC-H₂O von der Säule eluiert und anschließend die Konzentration und Qualität photometrisch bestimmt (vgl. Kap. 2.2.3). Bis zur weiteren Verwendung wurde die gewonnene gDNA bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Isolierung von RNA

Für die Isolierung von RNA wurden 10 ml einer asynchronen *P. falciparum*-Kultur mit einer Parasitämie von ca. 10% eingesetzt. Die Extraktion fand nach einem Protokoll von Kyes et al. (2000) statt. 10 ml einer *P. falciparum*-Kultur wurden bei 1800 g abzentrifugiert und das Pellet zweimal in 1x PBS gewaschen, anschließend in 20-fachen Volumen vorgewärmten Trizol (Life technologies) resuspendiert und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Bis zur weiteren Aufreinigung erfolgte eine Lagerung

bei -80 °C. Zur RNA-Isolierung wurde das gleiche Volumen Chloroform hinzugefügt, gut gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation bei max. Geschwindigkeit für 45 min wurde die wässrige Phase von der Phenolphase getrennt, mit der im Anschluss weitergearbeitet wurde. Für die Fällung der RNA wurden zur wässrigen Phase 0,8 Volumen Isopropanol zugefügt, gemischt und bei max. Geschwindigkeit bei 4 °C für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 75%igem Ethanol gewaschen und anschließend für 20 min bei RT und max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und in 20 µl RNase freiem Wasser gelöst. Die Konzentration und Qualität wurde photometrisch und mittels Gelelektrophorese bestimmt. Eine Lagerung der isolierten RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

10x PBS	1,37 M NaCl
	26,8 mM KCl
	80,6 mM Na ₂ HPO ₄
	14,7 mM KO ₂ PO ₄
	Ad 1 L dest. H ₂ O
	pH 7,4

2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure

Eine Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäurelösung fand mit Hilfe des Spektralphotometers NanoDrop ND-1000 statt. Nukleinsäuren haben ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 260 nm, wofür die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich sind. Das Verhältnis von OD₂₆₀/OD₂₈₀ (OD = optische Dichte) ist ein Maß für die Reinheit von Nukleinsäure. Dieses verschiebt sich, wenn eine Kontamination mit Proteinen oder Phenolen vorliegt. Bei reiner DNA bzw. RNA sollte der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Unter den gegebenen Messbedingungen entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer DNA-Lösung einer Konzentration von 50 ng/µl bzw. einer RNA-Lösung aufgrund der einzelsträngigen Nukleinsäure von 40 ng/µl.

2.2.4 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA in cDNA (engl. *Complementary DNA*) umgeschrieben. Für die Herstellung von cDNA aus der zuvor isolierten RNA (vgl. Kap. 2.2.2) wurde 1 µg RNA eingesetzt. Das Umschreiben erfolgte durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase und wurde mittels der „SuperScript III reversen Transkriptase“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei für die cDNA-Erststrang-Synthese Oligo(dT)₁₈-Primer verwendet wurden. Der Reaktionsansatz wurde für 3 h bei 50 °C inkubiert und die Reaktion bei 70 °C abgestoppt. Eine Lagerung der cDNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*) nach Mullis & Falcoona (1987) und Saiki et al. (1988) ist eine *in vitro* Methode um einen bestimmten DNA-Abschnitt zu vermehren, vorgeben durch Oligonukleotide (Primer). Die Amplifikation von DNA-Fragmenten geschieht in drei aufeinanderfolgenden Schritten: der Denaturierung, dem Annealing und der Elongation. Der erste Schritt ist die Denaturierung von DNA bei einer Temperatur von 94 °C. Die Primeranlagerung geschieht in der Annealingphase, wobei die optimale Temperatur der Anlagerung zwischen 50-65 °C liegt und abhängig vom GC-Gehalt und der damit resultierenden Schmelztemperatur der verwendeten Primer ist. Die erforderlichen Informationen für die Sequenzen der in dieser Arbeit erstellten Primer wurden aus der Plasmodiendatenbank „PlasmoDB“ entnommen und deren Schmelztemperatur, Selbstkomplementarität, Homo- und Heterodimerisierungsenergie wurden mit dem Programm „OligoAnalyzer“ berechnet und überprüft. Im letzten Schritt der DNA-Synthese, der Elongation, synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase anhand des Matrizenstranges den komplementären DNA-Strang. In dieser Arbeit wurde je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments und Anwendungsgebiet entweder die Taq- (*Thermus aquaticus*) oder die Pfu-Polymerase (*Pyrococcus furiosus*) verwendet. Die Elongationsdauer richtet sich nach der erwarteten Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments, wobei die Taq-Polymerase im Schnitt 1 kb und die Pfu-Polymerase 2 kb pro Minute amplifiziert. Nach etwa 25-35 Zyklen liegt in der Regel genügend PCR-Produkt für weitere Analysen vor. Eine Übersicht der verwendeten Polymerasen, deren Anwendungsgebiet, Reaktionsansätze und Programme sind in der Tabelle 2.6 zusammengefasst.

Tabelle 2.6: PCR-Programme und Reaktionskomponenten der verwendeten Polymerasen und deren Anwendungsbereich.

Polymerase	PCR-Ansatz	PCR-Programm	
AccuPrime (Life technologies) Anwendung: Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Klonierung	5 µl Puffer (I bis 200 bp, II von 0,2-4 kb)	94 °C	3 min
	1 µl Primer fwd (10 pmol/µl)	94 °C	30 s
	1 µl Primer rev (10 pmol/µl)	X °C	30 s
	1 µl Accu Taq	68 °C	1 min/kb
	1 µl DNA-Template (gDNA oder cDNA)	68 °C	10 min
	41 µl HPLC-H ₂ O	14 °C	∞
Pfu-Polymerase (Promega) Anwendung: Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Klonierung	5 µl 10 x Puffer	94 °C	3 min
	2 µl dNTP-Mix (10 mM)	94 °C	30 s
	1 µl Primer fwd (10 pmol/µl)	X °C	30 s
	1 µl Primer rev (10 pmol/µl)	62 °C	2 min/kb
	0,75 µl Pfu-Polymerase	62 °C	10 min
	1 µl DNA-Template (gDNA oder cDNA)	14 °C	∞
	39,25 µl HPLC-H ₂ O		
MolTaq (Molzym) Anwendung: Kolonie-PCR	1 µl 10x Puffer	94 °C	5 min
	0,1 µl pARL-fwd (10 pmol/µl)	94 °C	30 s
	0,1 µl genspezifisch rev (10 pmol/µl)	50 °C	30 s
	0,2 µl MolTaq	72 °C	1 min/kb
	0,2 µl MgCl ₂ (50 mM)	72 °C	10 min
	0,1 µl dNTP-Mix (10 mM)	14 °C	∞
	8,3 µl HPLC-H ₂ O		

X °C: Die Temperatur ist abhängig von der Primerlänge und –Sequenz und musste je nach Oligonukleotid gewählt werden.

2.2.5.1 Overlap-Extension-PCR (OE-PCR)

Für die zielgerichtete Mutation bestimmter Aminosäuren eines Proteins wurde die Overlap-Extension-PCR nach Ho et al. (1988) verwendet. Dies ist eine Methode, mit der zielgerichtete Punktmutationen in einer DNA-Sequenz erzeugt werden können, welche anschließend im translatierten Protein zu Mutationen in der Aminosäuresequenz führen. Insgesamt werden vier Primer benötigt: zwei gen-spezifische zueinander komplementäre Primer, welche die gewünschte Punktmutation tragen, und zwei flankierende gen-spezifische Primer. Die erste PCR-Reaktion beinhaltet zwei Ansätze (PCR-Reaktion I und II), bei der jeweils ein Mutagenese-Primer und ein flankierender Primer eingesetzt werden. Die in der PCR-Reaktion I und II erzeugten Fragmente dienen als Template in der dritten PCR (PCR-Reaktion III). In dieser hybridisieren die amplifizierten Produkte aus der PCR-Reaktion I und II an ihren komplementären Enden und werden am 3'-Ende durch die verwendete Polymerase verlängert. Durch Zugabe der flankierenden gen-spezifischen Primer kann das gesamte DNA-Fragment mit der eingeführten Punktmutation amplifiziert werden. Als Template-DNA wurden in dieser Arbeit Plasmide eingesetzt, welche das entsprechende Gen enthielten, in das die gewünschte Mutation eingeführt werden sollte. Für die Amplifikation wurde die

„AccuPrime Taq Polymerase“ unter den in der Tabelle 2.6 angegebenen Bedingungen benutzt. Die verwendeten Primer befinden sich in der Tabelle 2.4.

2.2.6 Nukleinsäure-Gelelektrophorese

Die Nukleinsäure-Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Aufgrund der negativen Ladung der Nukleinsäure wandern diese in einem elektrischen Feld in Richtung Kathode. Nukleinsäurefragmente trennen sich durch eine definierte Porengröße eines Agarosegels nach ihrer Länge auf, wobei kurze Fragmente schneller durch das Gel wandern als lange. Mit Hilfe eines Längenstandards kann die entsprechende Größe eines Fragments bestimmt werden.

2.2.6.1 DNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale 1%ige Agarosegele verwendet. Als Laufpuffer diente 1x TBE. DNA-Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit 6x Loading Dye (Fermentas) versetzt und zusammen mit einem geeigneten Standard in die Gelkammer pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung zwischen 90 und 130 Volt durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 5 min in einer Ethidiumbromid-Färbelösung (10 mg/l) gefärbt. Ethidiumbromid ist eine interkalierende Substanz, welche sich zwischen die Basen der doppelsträngigen DNA einlagert. Eine Detektion des Gels fand mit der Fusion Fx7 Geldokumentation (PqLab) statt.

10x TBE-Laufpuffer	890 mM Tris
	890 mM Borsäure
	500 mM Na ₂ EDTA, pH 8,0
	Ad 1 l H ₂ O bidest.

Ethidiumbromid-Färbelösung	360 mM Tris
(pro Liter)	300 mM NH ₂ PO ₄
	100 mM Na ₂ EDTA
	10 mg Ethidiumbromid

2.2.6.2 RNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung des Extraktionserfolges und der Qualität der erhaltenen RNA-Probe (vgl. Kap. 2.2.2) wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Eine Auftrennung fand dabei in einem horizontalen 1%igem Agarosegel statt. Dazu wurden 22,5 ml bidest. H₂O auf 0,3 g Agarose gegeben, durch Aufkochen gelöst und mit 3 ml 10x MOPS-Puffer und 4,5 ml Formaldehyd versetzt. Das zum Gel zugefügte Formaldehyd blockiert die Wasserstoffbrückenbindungen der zuvor durch Hitze (10 min bei 65 °C) denaturierten RNA, so dass eine Ausbildung von Sekundärstrukturen in der RNA weitestgehend verhindert wird. Vor der Denaturierung der RNA wurde diese mit dem gleichen

Volumen Ethidiumbromid-haltigem 2x RNA-Loading Dye (Fermentas) versetzt. Die Elektrophorese lief konstant bei 120 V in 1x MOPS-Puffer. Das Gel wurde anschließend mit dem Geldokumentationssystem Fusion Fx7 (Peglab) fotografiert.

10x MOPS-Puffer	200 mM MOPS (3-(N-Morpholino)-2-Hydroxypropansulfonsäure-Natriumsalz)
	50 mM Natriumacetat
	10 mM EDTA
	pH 7,0

2.2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für eine spätere Klonierung der PCR-Produkte ist eine Entfernung der Primer, Salze, Nukleotide und anderer unterschiedlicher Enzyme notwendig. Auch eine Aufreinigung von Vektoren oder DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau ist für eine spätere Ligation wichtig. Abhängig von dem für die Klonierung verwendeten Vektor wurde entweder das „Crystal Gel Extraktionskit“ (Biolabs) für die Aufreinigung benutzt oder eine Ethanolfällung durchgeführt.

2.2.7.1 Aufreinigung mit dem Gelextraktions-Kit

Für eine spätere Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pGEM-T (Promega) oder pJET (Fermentas) wurde für die Aufreinigung das „Crystal Gel Extraktionskit“ (Biolabs) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden dabei elektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechenden Banden nach Anfärbung mit Ethidiumbromid mit einem Skapel aus dem Gel geschnitten. Eine Bindung der DNA an eine Silikamembran und die anschließende Aufreinigung fand nach Herstellerprotokoll statt. Die DNA wurde mit 10 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die erhaltene DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.7.2 Ethanolfällung

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten, und dem mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *AvrII* geschnittene Vektor pARL1a(-), wurde eine Ethanolfällung durchgeführt. Dazu wurde zu der entsprechenden Nukleinsäure 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat pH 5,4 und das 3 fache Volumen 100% Ethanol zugefügt und gut gemischt. Die Probe wurde entweder für mindestens 1 h oder über Nacht bei -80 °C inkubiert und anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation bei max. Geschwindigkeit für 10 min bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Nach Trocknung wurde das Pellet in HPLC-H₂O resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.8 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind prokaryotische Enzyme, die spezifische Basensequenzen an einem DNA-Doppelstrang erkennen und in beiden Strängen an diesen Stellen bestimmte

Phosphordiesterbindungen spalten. In Prokaryoten dienen Restriktionsenzyme zur Abwehr von Fremd-DNA. In dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen zur Überprüfung des Klonierungserfolges (vgl. Kap. 2.2.9) verwendet. Zur Überprüfung der Klonierung in pGEM-T wurden *Apal* (Fermentas) und *SpeI* (Fermentas) in einem Doppelverdau eingesetzt. Bei pJET1.2 wurde die Restriktionsendonuklease *BglIII* (NEB) verwendet.

Restriktionsansatz pGEM-T	6 µl Plasmidlösung 2 µl 10x Reaktionspuffer (Tango) 1 µl <i>Apal</i> 1 µl <i>SpeI</i>
Restriktionsansatz pJET1.2/blunt	5 µl Plasmidlösung 3 µl HPLC-H ₂ O 1 µl 10x Reaktionspuffer (Puffer 3) 1 µl <i>BglIII</i>

Der Restriktionsansatz wurde kurz anzentrifugiert und dann für 2-3 h bei 37 °C inkubiert. Die Größenermittlung der isolierten und linearisierten Plasmid-DNA fand anschließend mit einem 1%igem Agarosegel statt.

Neben dieser Anwendung wurden der Vektor pARL1a(-) und aufgereinigte PCR-Produkte mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* (NEB) und *AvrII* (Takara) verdaut, so dass komplementäre Enden im verdauten PCR-Produkt und Vektor vorlagen und diese miteinander ligiert werden konnten. Die PCR-Produkte erhielten die spezifischen Schnittstellen durch Primer, welche durch Anhänge die nötigen Schnittstellen aufwiesen (vgl. Tab. 2.4).

Restriktionsansatz <i>KpnI</i>	15 µl PCR-Produkt/Plasmidlösung 2 µl 10x Reaktionspuffer (Puffer 1) 3 µl <i>KpnI</i>
Restriktionsansatz <i>AvrII</i>	15 µl PCR-Produkt/Plasmidlösung 2 µl 10x Reaktionspuffer (Puffer K) 3 µl <i>AvrII</i>

Die Ansätze wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert, aber nicht länger als 16 h, und anschließend mittels Ethanolfällung (vgl. Kap. 2.2.7.2) aufgereinigt.

2.2.9 Klonierung

Die Klonierung ist eine Methode DNA-Abschnitte in Vektoren (extrachromosomale DNA) einzuführen und diese anschließend selektiv in Bakterien zu vermehren. In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Vektorsysteme verwendet.

2.2.9.1 Ligation

2.2.9.1.1 Ligation in pGEM-T

Für eine spätere Sequenzierung wurden Amplifikate, welche mit der Taq-Polymerase hergestellt wurden, in den Vektor pGEM-T ligiert. Diese anschließend sequenzierten Inserts dienten als Template-DNA für unterschiedliche PCRs. Dabei handelt es sich bei pGEM-T um einen linearisierten Vektor mit Thymin-Überhängen. Das bei der PCR entstandene Amplifikat erhält hingegen, durch die terminale Transferaseaktivität der Taq-Polymerase, Adenosin-Überhänge, so dass bei der Ligation durch Zugabe einer T4-DNA-Ligase der Vektor und das PCR-Produkt ungerichtet miteinander verbunden werden. Für die Klonierung wurde das „pGEM-T Vektor System“ (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Ligationsansatz	5 µl 2x Rapid Ligation Buffer
	1 µl pGEM-T (50 ng)
	3 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
	1 µl T4 DNA Ligase (3U/µl)

2.2.9.1.2 Ligation in pJET1.2/blunt

Der Vektor pJET1.2/blunt diente zur Sequenzierung von aufgereinigten PCR-Produkten (vgl. Kap. 2.2.7), welche mit der Pfu-Polymerase amplifiziert wurden. Dieser linearisierte Vektor besitzt an den 5'-Enden Phosphatgruppen, so dass eine Phosphorylierung des PCR-Produkts nicht notwendig ist. Die T4-DNA-Ligase ermöglicht es durch die Phosphodiesterbindungen die beiden DNA-Moleküle miteinander zu verbinden, so dass ein rekombinantes DNA-Molekül entsteht. Für die Klonierung wurde das „CloneJET PCR Cloning Kit“ (Fermentas) nach Protokoll des Herstellers benutzt.

Ligationsansatz	10 µl 2x Reaction Buffer
	1 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
	1 µl pJET1.2/blunt Klonierungsvektor (50 ng)
	1 µl T4 DNA-Ligase
	7 µl HPLC-H ₂ O

2.2.9.1.3 Ligation in pARL1a(-)

Für eine gerichtete Klonierung und die anschließende Expression unterschiedlicher GFP-Fusionsproteine im *P. falciparum*-Stamm 3D7 wurde der Vektor pARL1a(-) verwendet. pARL1a(-) ist ein Vektor, welcher sowohl in Prokaryoten als auch Eukaryoten eingesetzt werden kann. Über die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *AvrII* und *KpnI* kann das gewünschte Insert in pARL1a(-) kloniert werden, so dass C-terminal zum Insert das *gfp*-Gen liegt. Durch eine Transfektion in den *P. falciparum*-Stamm 3D7 kann eine Expression des entsprechenden GFP-markierten Proteins unter der Kontrolle des *crt*-Promotors konstitutiv stattfinden. Eine Selektion transgener Parasiten erfolgt

mit Hilfe des Antifolats WR99210, welches die endogene DHFR (Dehydrofolatreduktase) von *P. falciparum* inhibiert, aber nicht die vektor-kodierte humane DHFR. Dadurch sind transgene Parasiten resistent gegen WR99210. Für die Ligation wurden mit *KpnI*/*AvrII* verdauter Vektor und PCR-Produkt (vgl. Kap. 2.2.8) in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt, wobei 300 ng Vektor und die entsprechende Menge PCR-Produkt pro 10 µl Ligationsansatz verwendet wurden. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Ligationsansatz	300 ng pARL1a(-)
	X ng PCR-Produkt
	1 µl 10x Reaktionspuffer (Promega)
	1 µl T4 DNA-Ligase (Promega)
	Mit HPLC-H ₂ O auf 10 µl aufgefüllt

2.2.9.2 Transformation

Transformation beschreibt einen Prozess, bei dem Fremd-DNA wie z.B. Plasmide in kompetente Bakterienzellen aufgenommen wird. Für die Transformation wurde der Klonierungsstamm *E. coli* JM109 (Promega) verwendet. 25 µl der kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Ligationsansatz versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 50 s. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurde den Zellen des Transformationsansatzes 290 µl LB-Medium zugefügt. Die Zellen wurden zur Regeneration für 1,5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert. Eine Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht im Brutschrank.

2.2.9.3 Identifizierung positiver Klone mittels Kolonie-PCR

Gewachsene Bakterienkolonien wurden auf Anwesenheit des gewünschten Inserts mittels Kolonie-PCR überprüft. Für die PCR-Reaktion wurde jeweils ein vektor-spezifischer und ein Insert-spezifischer Primer verwendet. Dies verhindert die Amplifikation von überschüssiger DNA, welche sich auf der Selektionsplatte befinden kann. Für die Kolonie-PCR wurde die „MolTaq“ (Molzym) in 10 µl Reaktionsansätzen (vgl. Tab. 2.6) benutzt. Dabei wurde eine einzelne Bakterienkolonie einer Selektionsplatte mit einer sterilen Pipettenspitze in den Reaktionsansatz überführt und durch auf und ab pipettieren gut gemischt. Die Größe des PCR-Produktes wurde mittels einer Gelelektrophorese (vgl. Kap. 2.2.6.1) überprüft und positive Klone wurden in einer Übernachtskultur (vgl. Kap. 2.1.11) angereichert.

2.2.10 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen erfolgte für kleine Ansätze (5-8 ml) mit dem „peqGOLD Plasmid Mini Prep Kit“ (PeqLab). Für die Transfektion von Plasmid-DNA in den *P. falciparum*-Stamm 3D7, wo größere Mengen Plasmid-DNA benötigt werden, wurde das „peqGOLD

XChange Plasmid Midi Kit“ (PeqLab) nach Angaben des Herstellers verwendet. Beide Kits beruhen auf der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Die Plasmid-DNA wird dabei reversibel an eine Silikamembran gebunden und kann, nachdem sie gewaschen wurde, eluiert werden. Die an die Silikamembran gebundene Plasmid-DNA wurde mit 50 µl HPLC-H₂O von der Säule („peqGOLD Plasmid Mini Prep Kit“) bzw. mit 5 ml Elutionspuffer („peqGOLD XChange Plasmid Midi Kit“) eluiert. Die mit dem „peqGold XChange Plasmid Midi Kit“ isolierte Plasmid-DNA wurde anschließend nach Herstellerangaben präzipitiert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt und die Plasmid-DNA wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.11 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Durch die DNA-Sequenzierung kann die Gensequenz der Klonierungsprodukte ermittelt und mit anderen Sequenzen einer Datenbank verglichen werden. Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977). Die in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (Konstanz) ausgeführt. Nach Firmenprotokoll wurden 250-300 ng Plasmid-DNA und 5 pmol/µl Primer eingesetzt. Für die Sequenzierung wurden die in der Tabelle 2.7 aufgeführten Vektor-spezifischen Primer benutzt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit der Software „FinchTV“ ausgewertet und bearbeitet. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den bekannten Sequenzen aus der Plasmodiendatenbank „PlasmoDB“ im Programm „MAFFT“ über die Erstellung eines Alignments auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

Tabelle 2.7: In der Sequenzierung verwendete Primer.

Vektor	Primer-Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
pGEM-T	SP6	GATTTAGGTGACACTATA
	T7	AATACGACTCACTATAGG
pJET1.2/blunt	pJET1 fwd	ACTACTCGATGAGTTTTCGG
	pJET rev	TGAGGTGGTTAGCATAGTTC
pARL1a(-)	pARL fwd	CTATAGATTATTTTCATTGTCTTCACA
	pARL rev	TTCCGTATGTTGCATCAC

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren, um ein Gemisch aus Proteinen elektrophoretisch nach ihrer jeweiligen Größe aufzutrennen. In dieser Arbeit wurden Polyacrylamidgele von 10% und 12% mit Hilfe der Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur „Mini-PROTEAN Elektrophoresis System“ (Bio-Rad) hergestellt. Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele ist in der Tabelle 2.8 zusammengefasst.

Tabelle 2.8: Pipettierschema für zwei Polyacrylamidgele.

Komponente	10% Trenngel	12% Trenngel	3,9% Sammelgel
Acrylamid-Bisacrylamid	2,66 ml	3,2 ml	0,45 ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,75 ml	2 ml	-
0,5 M Tris pH 6,8	-	-	0,8 ml
10% SDS	80 µl	80 µl	30 µl
dest H ₂ O	3,42 ml	2,64 ml	2 ml
10% APS	80 µl	80 µl	30 µl
TEMED	8 µl	8 µl	3 µl

Proteinproben wurden mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5-10 min bei 95 °C aufgeköcht. Das im SDS-Probenpuffer enthaltene DTT (Dithiothreitol) spaltet vorhandene Disulfidbrücken auf, wohingegen das zugefügte SDS nicht kovalente Bindung der Sekundär-, der Tertiär- sowie der Quartärstruktur des Proteins aufbricht. Zur Bestimmung der Größe der Proteinproben wurde zusätzlich zu den Proben ein definierter Molekulargewichtsstandard (Page Ruler Prestained Protein Ladder) auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstant 120 V in 1x SDS-Laufpuffer.

6x SDS-Probenpuffer 375 mM Tris/HCl pH 6,8
 12% (w/v) SDS
 60% (v/v) Glycerin
 0,6 M DTT
 0,06% (w/v) Bromphenolblau

1x SDS-Laufpuffer 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 0,1% (w/v) SDS
 In dest. H₂O

2.3.2 Coomassie-Färbung

Die Visualisierung der Proteine in einem Polyacrylamidgel geschah über die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250. Der Farbstoff interagiert unspezifisch mit den kationischen und hydrophoben Seitenketten der Proteine. Die Nachweisempfindlichkeit dieser Methode liegt bei ca. 200 bis 400 ng Protein pro Bande. Direkt nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung wurden die SDS-Gele für 1 h oder über Nacht in Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde mit Entfärbelösung entfärbt und die Gele bis zur weiteren Verwendung in Aufbewahrungslösung gelagert.

Coomassie-Färbelösung	2 g Coomassie Brilliant Blue R250 400 ml Methanol 175 ml 60% (v/v) Essigsäure 425 ml dest. H ₂ O Vor Gebrauch sterilfiltriert
Entfärbelösung	10% (v/v) Essigsäure 25% (v/v) Isopropanol In dest. H ₂ O
Aufbewahrungslösung	7,5% (v/v) Essigsäure In dest. H ₂ O

2.3.3 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen

Für einen immunologischen Nachweis wurden elektrophoretisch getrennte Proteine mit Hilfe des Wet-Blot-Verfahrens in 1x Transferpuffer auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman) übertragen. Die Proteine bleiben durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran gebunden. Für den Transfer wurde die Membran in Transferpuffer äquilibriert und auf drei Lagen feuchtes Chromatographiepapier gelegt. Das Gel, welches ebenfalls für 5 min in Transferpuffer inkubiert wurde, wurde auf die Membran gelegt und mit drei Lagen feuchtem Chromatographiepapier bedeckt. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei 4 °C konstant bei 100 V für 1 h.

10x Transferpuffer	250 mM Tris 1,92 M Glycin 0,37% (w/v) SDS In dest. H ₂ O
--------------------	--

2.3.4 Immunologische Detektion

Ein Nachweis, der auf die Membran transferierten Proteine, erfolgte mit spezifischen Antikörpern (vgl. Tab. 2.2). Um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen wurde diese in Blockinglösung für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Blockinglösung verworfen, der Primärantikörper in frischer Blockinglösung verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS für je 10 min wurde der HRP-konjugierte Sekundärantikörper (vgl. Tab. 2.3), welcher ebenfalls in Blockinglösung verdünnt wurde, auf die Membran gegeben und für 1 h bei RT rollend inkubiert. Nach wiederholten Waschschritten fand eine Detektion über Elektrochemilumineszenz (ECL) nach Herstellerangaben statt. Dabei wird das in der ECL-Lösung vorhandene Luminol oxidiert, so dass sich dieses in einem angeregten Zustand befindet. Eine Oxidation des Luminols wird in Gegenwart von H₂O₂ durch die HRP katalysiert. Fällt Luminol in den Grundzustand zurück wird Licht ausgesendet. Eine Visualisierung des Chemilumineszenz-Signals wurde mit Hilfe eines Röntgenfilms (Agfa Healthcare) erbracht. In

einigen Fällen erfolgte eine Quantifizierung des Westernblots, wobei die relative Bandenintensität mit Hilfe des Programms „ImageJ“ bestimmt wurde. Diese Intensität wurde in einen prozentualen Wert umgewandelt.

Blockinglösung 5% (w/v) Milchpulver in 1x PBS

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung von *P. falciparum*

Eine Kultivierung vom *P. falciparum*-Stamm fand nach der Methode von Trager & Jensen (1976) statt. Dabei wurden Blutstadien von *P. falciparum* in 5 ml oder 10 ml Petrischalen bzw. in 75 cm² Zellkulturflaschen mit RPMI-Komplettmedium und humanen Erythrozyten der Blutgruppe 0⁺ bei einem Hämatokrit von 5% unter sauerstoffarmer Atmosphäre (5% CO₂, 1% O₂, 94% N₂) in separaten Kulturboxen in einem Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte in der Regel täglich, wobei die Kultur, wenn es nötig war, mit frischem Blut und Medium so verdünnt wurde, dass eine Parasitämie von 10% nicht überschritten wurde. Eine Bestimmung der Parasitämie fand mittels Blutaussstrichen (vgl. Kap. 2.4.2) statt. Zur Selektion transgener Parasitenkulturen wurde zusätzlich das Antifolat WR99210 (4 nm) zur Kultur hinzugefügt. Alle Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Sicherheitswerkbank in Laboren der Schutzstufe S3* durchgeführt.

RPMI-Komplettmedium 1,587% (w/v) RPMI 1640
 12 mM NaHCO₃
 6 mM D-Glukose
 0,5% (v/v) AlbumaxII
 0,2 mM Hypoxanthin
 0,4 mM Gentamycin
 pH 7,2; steril filtriert

Selektionsmittel WR99210 Stammlösung: 20 mM in 1 ml DMSO, steril filtriert
 Arbeitslösung: 10 µM in RPMI-Komplettmedium

2.4.2 Giemsa-Färbung von Blutaussstrichen

Zur Bestimmung der Parasitämie der Plasmodienkulturen wurden Blutaussstriche angefertigt. Dazu wurde 1 µl sedimentiertes Blut einer Kultur auf einen Objektträger gegeben und mit Hilfe der Kante eines zweiten Objektträgers dünn ausgestrichen. Nach anschließender Trocknung wurde der Ausstrich in Methanol fixiert und für 10 bis 20 min in 10%iger Giemsa-Färbelösung inkubiert. Durch die Färbung erscheint das Zytoplasma der Erythrozyten bläulich, wohingegen die Parasiten rötlich und die DNA der Parasiten dunkelblau anfärben. Die Parasitämie wurde mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops bei 1000-facher Vergrößerung ermittelt.

10%ige Giemsa-Färbelösung	10 ml Giemsa Azur-Eosin-Methylenblau
	90 ml dest. H ₂ O

2.4.3 Herstellung von Kryo-Dauerstabilaten

Zur dauerhaften Lagerung von *P. falciparum*-Kulturen wurden 10 ml Kulturen mit einer Parasitämie von mindestens 5% bei 500 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Blutpellet in 1 ml Malaria-Einfrier-Lösung resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Stabilisate wurden bei -80 °C eingefroren, wobei die Stabilisate für eine langfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Malaria-Einfrier-Lösung	4,2% (w/v) D-Sorbitol
	0,9% (w/v) NaCl
	28% (v/v) Glycerin
	Steril filtriert

2.4.3 Auftauen von Kryo-Dauerstabilaten

Kryo-Dauerstabilisate wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Blutpellet in 1 ml Malaria-Auftau-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Blutpellet mit 1 ml RPMI-Komplettmedium gewaschen, anschließend in 10 ml frischem Medium aufgenommen und unter den in Kapitel 2.4.1 aufgeführten Bedingungen kultiviert.

Malaria-Auftau-Lösung	3,5% (w/v) NaCl in dest. H ₂ O
	Steril filtriert

2.4.4 Synchronisation von *P. falciparum*-Kulturen

Eine Synchronisation einer *P. falciparum*-Kultur fand nach der Methode von Lambros & Vanderberg (1979) statt. Dabei wurde für die Synchronisation Sorbitol verwendet. Sorbitol lysiert lediglich Trophozoiten und Schizonten, wohingegen mit dem Ringstadium infizierte und uninfizierte Erythrozyten intakt bleiben. 10 ml einer asynchronen *P. falciparum*-Kultur wurden bei 1800 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Blutpellet in 5 Pelletvolumen Synchronisationslösung resuspendiert und für 5 bis 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen, die Erythrozyten in frischem Medium gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 10 ml RPMI-Komplettmedium resuspendiert. Eine Kultivierung erfolgte unter den im Kapitel 2.4.1 aufgeführten Bedingungen.

Synchronisationslösung	5% (w/v) Sorbitol in dest. H ₂ O
	Steril filtriert

2.4.5 Transfektion von *P. falciparum*

Eine Transfektion der Plasmid-DNA in den *P. falciparum*-Stamm 3D7 fand nach der Methode von Wu et al. (1985), Crabb & Cowman (1996), Fidock & Wellens (1997) und Crabb et al. (2004) statt. Als Transfektion bezeichnet man den Prozess des Einbringens von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Bei *P. falciparum* ist die Transfektion von DNA besonders schwierig, da insgesamt vier Membranen von der DNA überwunden werden müssen. Zum Einschleusen der DNA hat sich dabei die Elektroporation als einzige und bewährteste Methode herausgestellt. Bei der Elektroporation wird die Membran aufgrund eines elektrischen Feldes reversibel permeabilisiert, so dass die DNA in die Zelle aufgenommen werden kann. Dabei wurde im Rahmen dieser Arbeit die DNA nicht in das Genom von *P. falciparum* integriert, sondern es fand eine episomale Expression statt.

Für die Transfektion wurden 10 ml einer im Ringstadium befindlichen synchronen *P. falciparum*-Kultur des Stammes 3D7 mit einer Parasitämie von 5-10% verwendet und mittels Zentrifugation bei 1800 g für 5 min sedimentiert. Zwischenzeitlich wurden 100 µg Plasmid-DNA mittels Ethanol-fällung (vgl. Kap. 2.2.7.2) präzipitiert, das Pellet getrocknet, in 15 µl TE-Puffer gelöst und mit 385 µl Transfektionspuffer gemischt. Die DNA-Lösung wurde zum Blutpellet gegeben und alles in eine 20 mm Elektroporationsküvette (Bio-Rad) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 310 V und 950 µF bei einem Zeitintervall von 7-15 ms. Die frisch transfizierten Parasiten wurden in neue Petrischalen überführt und mit 12 ml frischem Medium versetzt. 5 h nach der Transfektion wurde das Medium erneut gewechselt und zur Selektion der transgenen Parasiten das Antifolat WR99210 zugefügt. Anschließend erfolgte innerhalb der ersten 10 Tage täglich ein Mediumwechsel, danach jeden zweiten Tag. Etwa 18 Tage nach der Transfektion wurde zum ersten Mal in Giemsa gefärbten Blutaussstrichen überprüft, ob transgene Parasiten zu sehen waren. Dies war in der Regel nach drei bis fünf Wochen der Fall.

TE-Puffer	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8,0
Transfektionspuffer	120 mM KCl 150 µM CaCl ₂ 2 mM EGTA 5 mM MgCl ₂ 10 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 25 mM Hepes pH 7,6, steril filtriert

2.4.6 Saponinlyse

Die Lyse mit Saponin nach Umlas & Fallon (1971), modifiziert durch Burghaus et al. (2001), ist eine Methode um Parasiten aus einer Blutkultur zu isolieren. Saponin permeabilisiert dabei selektiv die Erythrozytenmembran, die parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) und die Membran der Maurer'schen Spalten, wohingegen die Parasitenmembran (PM) intakt bleibt. Für eine Isolation der Parasiten wurden 10 ml einer Kultur bei 1800 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Blutpellet in 4 ml Saponinlysepuffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat bei 16000 g für 1 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet so lange in 1x PBS gewaschen bis der Überstand klar war. Das Pellet wurde mit 2 µl 25x Proteaseinhibitorcocktail (Roche) versetzt und je nach Pelletgröße in 50-200 µl Parasitenlysepuffer resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte eine Lagerung bei -20 °C.

Saponinlysepuffer 0,03% (w/v) Saponin in 1x PBS

Parasitenlysepuffer 4% (w/v) SDS
 0,5% Triton-X-114
 0,5x PBS

2.4.7 Percollgradient

Eine Trennung uninfizierter Erythrozyten und unterschiedlicher Entwicklungsstadien einer *P. falciparum*-Kultur fand mittels eines Percollgradienten statt. Dabei entstehen durch Zentrifugation des mit einem Blutpellet überschichteten Percollgradienten verschiedene Phasen (vgl. Abb. 2.1): Ganz oben befinden sich Merozoiten und Zelltrümmer in einem klaren Bereich. In der Mitte sind 1-2 bräunliche Phasen vorhanden, bei denen es sich um mit Schizonten bzw. Trophozoiten infizierte Erythrozyten handelt. Und am Boden befindet sich ein großes Pellet aus infizierten Erythrozyten mit Ringstadien und uninfizierten Erythrozyten.

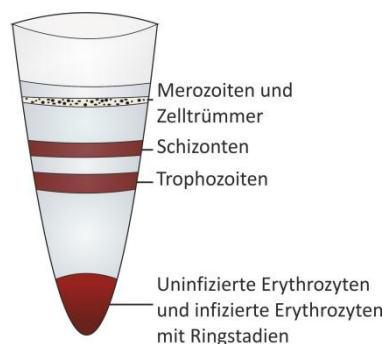


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Auftrennung unterschiedlicher Stadien in der Blutphase von *Plasmodium falciparum* mittels Percollgradient. Nach Zentrifugation befinden sich Zelltrümmer und Merozoiten in der oberen Phase, mit Schizonten bzw. Trophozoiten infizierte Erythrozyten in den mittleren Phasen, und infizierte Erythrozyten mit Ringstadien sowie uninfizierten Erythrozyten in der unteren Phase.

Für eine Isolation eines Entwicklungsstadiums wurden entweder 10 ml oder 200 ml einer *P. falciparum*-Kultur bei 1800 g für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Blutpellet in 1x PBS gewaschen. Zwischenzeitlich wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß je 500 µl 80% Percoll-, 60% Percoll- und 40% Percoll-Lösung übereinander geschichtet. Für große Kulturansätze wurden jeweils 12 ml der Percoll-Lösungen in einem 50 ml „Falcon“ übereinander geschichtet. Der Überstand wurde vom Blutpellet verworfen, dieses in mindestens einem Pelletvolumen 1x PBS resuspendiert und auf den Percollgradienten überschichtet. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 16000 g wurde die gewünschte Stadiumbande, in diesem Fall mit Trophozoiten infizierte Erythrozyten, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und so lange mit 1x PBS gewaschen bis kein Percoll mehr vorhanden war. Die über den Percollgradienten aufgereinigten Erythrozyten mit Trophozoitenstadien wurden entweder in einer Tetanolysin- (vgl. Kap. 2.4.8) oder Saponinlyse (vgl. Kap. 2.4.10) eingesetzt.

90% Percoll-Stammlösung	45 ml Percoll 5 ml 10x PBS
80% Percoll-Lösung	0,8 g D-Sorbitol 8,9 ml 90% Percoll-Stammlösung 1,1 ml RPMI-Komplettmedium
60% Percoll-Lösung	0,8 g D-Sorbitol 6,7 ml 90% Percoll-Stammlösung 3,3 ml RPMI-Komplettmedium
40% Percoll-Lösung	0,8 g D-Sorbitol 4,4 ml 90% Percoll-Stammlösung 5,6 ml RPMI-Komplettmedium Alles steril filtriert

2.4.8 Tetanolysinlyse

Die selektive Lyse mit Tetanolysin ist eine Methode nach Hiller et al. (2003). Tetanolysin ist ein von Bakterien produziertes Toxin, welches selektiv die Erythrozytenmembran permeabilisiert, wobei die Membran der PV und die der Maurer'schen Spalten intakt bleiben. Mittels eines Percollgradienten angereicherter Erythrozyten mit Trophozoiten (vgl. Kap. 2.4.7) wurden in 99 µl 1x PBS resuspendiert, mit 1 µl Tetanolysin (1 U/ml) versetzt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat bei 500 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet in Parasitenlysepuffer resuspendiert. Sowohl der Überstand als auch das Pellet wurden mittels Westernblotanalyse untersucht.

2.4.9 Immunpräzipitation von GFP-Fusionsproteinen

Eine Anreicherung und Isolierung von GFP-Fusionsproteinen für eine spätere massenspektrometrische Analyse (vgl. Kap. 2.4.10) fand mit Hilfe von GFP-Beads (Chromotek) statt. GFP-Beads sind durch eine monovalente Matrix gekennzeichnet, an die GFP-bindende Proteine gekoppelt sind. Somit können spezifisch GFP-Proteine aus einem Proteingemisch aufgereinigt werden. Nach der Bindung an die GFP-Beads und wiederholten Waschschritten können die GFP-Proteine gezielt von den GFP-Beads eluiert werden. Für die Isolierung der GFP-Fusionsproteine wurden bei löslichen GFP-Fusionsproteinen 200 ml einer transgenen *P. falciparum*-Kultur über einen Percollgradienten aufgetrennt und infizierte Erythrozyten mit Trophozoiten isoliert (vgl. Kap. 2.4.7). Diese wurden mit 1x PBS gewaschen und mit Saponinlysepuffer für 10 min auf Eis inkubiert. Lagen unlösliche GFP-Fusionsproteine vor, wurden 200 ml einer transgenen *P. falciparum*-Kultur direkt in Saponinlysepuffer auf Eis inkubiert, abzentrifugiert und das Pellet anschließend in eiskaltem RIPA-Puffer lysiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 16000 g für 1 min wurde der Überstand der jeweiligen Lysate mit 30 µl zuvor in Dilutionspuffer äquilibrierten GFP-Beads gemischt. Der Ansatz wurde für 1 h bei RT rollend inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 2500 g und 4 °C für 2 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die sedimentierten GFP-Beads fünf Mal mit kaltem Waschpuffer gewaschen. Zum Eluieren der GFP-Fusionsproteine wurden die GFP-Beads mit 50 µl 2x SDS-Probenpuffer versehen, für 10 min bei 95 °C inkubiert und 2 min bei 4 °C und 2500 g zentrifugiert. Das Eluat wurde von den sedimentierten GFP-Beads abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die Massenspektrometrie (vgl. Kap. 2.4.10) verwendet.

Dilutionspuffer	10 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA pH 7,5
RIPA-Puffer	10 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 5 mM EDTA 0,1% SDS 1% Triton-X-100 1% Deoxycholat
Waschpuffer	1x PBS 0,1% Triton-X-100

2.4.10 Massenspektrometrie

Die zuvor mittels GFP-Beads aufgereinigten GFP-Fusionsproteine (vgl. Kap. 2.4.9) wurden elektrophoretisch in einem 4-15%igen Mini-Protean TXG Precast Gel (Bio-Rad) aufgetrennt und mit

Coomassie angefärbt (vgl. Kap. 2.3.2). Die zu analysierenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten. Die Durchführung der Massenspektrometrie erfolgte in der Abteilung der massenspektrometrischen Proteomanalytik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf und wurde dort von Marcel Kwiatkowski durchgeführt. Dabei fand ein In-Gel-Verdau mit Trypsin nach der Methode von Shevchenko et al. (2006) statt. Die dadurch extrahierten Peptide wurden eingeeengt und in 10 µl 0,1% Essigsäure gelöst. Die Proben wurden mittels Elektronensprayionisations-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (ESI-LC-MS) analysiert, wobei die Analyse entweder in einem LC-ESI-QTOF-Massenspektrometer (engl. *Liquid-Chromatography-Electrospray-Ionization-Quadrupole-Time-of-Flight-Mass-Spectrometer*) oder in einem LC-ESI-OT-Massenspektrometer (engl. *Liquid-Chromatography-Electrospray-Ionization-Orbitrap-Fusion-Tribrid-Mass-Spectrometer*) durchgeführt wurde. Anhand der generierten Spektren konnten Sequenzen ermittelt werden, welche mit einer *P. falciparum*-Datenbank abgeglichen wurden. So konnten Peptide und eventuelle Modifikationen an den Peptidsequenzen identifiziert werden.

2.5 Mikroskopische Methoden

2.5.1 Durchlichtmikroskopie

Eine Analyse Giemsa-angefärbter Blutaussstriche (vgl. Kap. 2.4.2) erfolgte mit Hilfe der Durchlichtmikroskopie. Diese wurden in 1000-facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl betrachtet.

2.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse transgener Parasiten wurden 500 µl einer *P. falciparum*-Kultur abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Blutpellet in 500 µl frischem Medium aufgenommen, mit DAPI (1 µg/ml) versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden 1-5 µl des Blutpellets auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas versehen und sofort mikroskopisch betrachtet. Dabei wurde das Zeiss Axioskop M1 Mikroskop mit einer 100x/1,4 Immersionsölinse, eine Hamamatsu Orca C4742-95 Kamera und das Zeiss Axiovision Programm benutzt. Eine Bearbeitung der Aufnahmen fand mit „Adobe Photoshop“ statt.

2.5.2.1 Auswertung von Fluoreszenzbildern mit Hilfe des Programms „ImageJ“

Um eine Videosequenz oder Zeitreihe von Fluoreszenzaufnahmen zu erstellen wurde das Programm „ImageJ“ verwendet. Aufgenommene Fluoreszenzbilder wurden als TIF-Datei im Programm „ImageJ“ geöffnet, als Bilderreihe zusammengefügt und anschließend als Video oder Zeitreihe abgespeichert.

2.5.3 Lebendfärbung mit Bodipy-TR-C₅-Ceramid

Bodipy-TR-C₅-Ceramid ist ein roter Fluoreszenzfarbstoff, welcher sich aufgrund seiner stark hydrophoben Wechselwirkungen in Membranen einlagern kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Bodipy-TR-C₅-Ceramid zur Kolo-kalisation von GFP-Fusionsproteinen transgener Parasiten mit Membranen verwendet. Zur mikroskopischen Analyse wurden 500 µl einer transgenen *P. falciparum*-Kultur bei 500 g für 1 min sedimentiert, der Überstand verworfen und das Blutpellet mit 1x PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Blutpellet in 100 µl Bodipy-TR-C₅-Ceramid (5 µM) resuspendiert, ebenfalls mit DAPI versetzt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Eine mikroskopische Betrachtung fand unter den in Kapitel 2.5.2 angegebenen Bedingungen statt.

2.5.4 Immunfluoreszenzanalysen (IFA)

Eine Kolo-kalisation von GFP-Fusionsproteinen mit parasitären und/oder erythrozytären Strukturen fand mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse (IFA) statt. Dazu wurden 500 µl einer *P. falciparum*-Kultur abzentrifugiert, in 1x PBS gewaschen auf einen Hämatokrit von ca. 1% verdünnt. Davon wurden je 3,5 µl in eine Vertiefung eines 10 Well Glasobjektträgers gegeben, getrocknet und in 100% Aceton für 20 min fixiert. Zur Rehydratisierung wurden die fixierten Parasiten für 10 min in 1x PBS inkubiert und gewaschen. Anschließend wurden die Vertiefungen mit primärem Antikörper (vgl. Tab. 2.2) beladen. Dieser wurde in 1x PBS/3%BSA verdünnt. Nach einstündiger Inkubation des primären Antikörpers bei RT in einer Feuchtkammer wurden die Vertiefungen 5 mal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Dunkeln mit sekundärem Antikörper (vgl. Tab. 2.3) und DAPI (1 mg/ml) (Roche) für 1 h bei RT. Nach erneutem fünfmaligem Waschen mit 1x PBS wurde der Objektträger mit „Dako Fluorescent Mounting Medium“ (Dako) überschichtet und mit einem Deckglas versehen. Das Deckglas wurde mit Nagellack fixiert. Eine Analyse fand mittels Fluoreszenzmikroskopie (vgl. Kap. 2.5.2) statt. Die Fluoreszenzbilder wurden mit Hilfe des Programms „Adobe Photoshop“ bearbeitet und ausgewertet.

3 Ergebnisse

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Analyse der Funktionalität alternativer PEXEL-Motive beim Malariaerreger *P. falciparum*. Dabei fand eine Charakterisierung möglicher alternativer PEXEL mit Hilfe von den Reporterproteinen KAHRP, REX3 und GBP statt. Des Weiteren wurden 28 endogene Proteine von *P. falciparum* ausgewählt, die ein putatives alternatives PEXEL-Motiv besitzen. Diese wurden mit Hilfe von GFP-Fusionen auf Export getestet und gegebenenfalls näher charakterisiert.

3.1 Überprüfung der Funktionalität alternativer PEXEL-Motive mit Hilfe der Proteine KAHRP, REX3 und GBP

Zur Überprüfung, ob alternative PEXEL-Motive Export vermitteln, wurden Reporterkonstrukte der Proteine KAHRP, REX3 und GBP hergestellt. Alle drei Proteine besitzen ein klassisches PEXEL-Motiv (vgl. Tab. 3.1), welches einen effizienten Export dieser Proteine, sowohl als Vollängenprotein als auch von N-terminal verkürzten Versionen, vom Parasiten in die Wirtszelle vermittelt (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004; Spielmann et al., 2006b; Grüning et al., 2012; Boddey et al., 2013). Von diesen Proteinen wurde die kodierende Sequenz eines N-terminalen Teilfragments (vgl. Tab. 3.1) mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pARL1a(-) (Crabb et al., 2004) kloniert. Für die Amplifikation wurde cDNA des *P. falciparum*-Stammes 3D7 verwendet. Um zu testen, ob auch alternative PEXEL-Motive toleriert werden, wurden die vorhandenen klassischen PEXEL der Proteine KAHRP, REX3 und GBP mutiert. Dabei wurde entweder die Aminosäure Arginin (R) an Position 1 des Motivs mit der Aminosäure Lysin (K) oder Histidin (H) und/oder die Aminosäure Leucin (L) an Position 3 des Motivs durch Isoleucin (I) ausgetauscht. Als Kontrolle wurde zusätzlich Arginin durch Alanin (A) ausgetauscht, da in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass durch die Mutation ein Export des Proteins in die Wirtszelle effektiv verhindert wird (Marti et al., 2004; Przyborski et al., 2005; Boddey et al., 2009; Russo et al., 2010). Ein gerichteter Nukleotidaustausch im PEXEL-Motiv wurde mit Hilfe von definierten Oligonukleotiden eingeführt, die die jeweilige Nukleotidsubstitution tragen. Die Amplifikate wurden ebenfalls in den Vektor pARL1a(-) kloniert. Eine Übersicht über die amplifizierte kodierende Sequenz der Proteine KAHRP, REX3 und GBP sowie die verwendeten alternativen PEXEL-Motive gibt die Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: Übersicht der Reporterproteine KAHRP, REX3 und GBP und für die Analyse verwendete alternative PEXEL-Motive.

Proteinname	SP [AS]	amplifizierte kodierende Sequenz [bp]	Verwendeter N- terminaler Bereich [AS]	PEXEL-Motiv und dessen Position [AS]	Verwendete PEXEL- Varianten
KAHRP	1-35	234	1-78	RTLAQ 54-58	RTIAQ KTLAQ HTLAQ ATLAQ
REX3	19-38	210	1-70	RQLSE 46-50	RQISE KQLSE KQISE HQLSE HQISE AQLSE
GBP	51-68	324	1-108	RILAE 84-88	RIIAE KILAE KIIEAE HILAE HIIEAE AILAE

AS: Aminosäure; bp: Basenpaare; SP: Signalpeptid

Zur Lokalisation der drei unterschiedlichen Reporterproteine fand eine Transfektion aller Reporterkonstrukte in Blutstadien des *P. falciparum*-Stammes 3D7 statt. Der Vektor pARL1a(-) ermöglicht eine episomale Expression der klonierten Gene als GFP-Fusionsprotein (engl. *Green Fluorescent Protein*) unter der Kontrolle des *crt*-Promotors (engl. *Chloroquine Resistance Transporter*), so dass mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie diese in lebenden Zellen lokalisiert werden konnten. Eine Etablierung aller Zelllinien war nach Selektion mit dem Antifolat WR innerhalb von drei bis fünf Wochen nach Transfektion möglich. Für die jeweiligen Zelllinien sind im Folgenden repräsentative Fluoreszenzaufnahmen dargestellt.

3.1.1 Lokalisation der Reporterproteine KAHRP, REX3 und GBP

3.1.1.1 Lokalisation des Reporterproteins KAHRP

KAHRP besitzt ein N-terminales SP. Das PEXEL-Motiv startet 19 Aminosäuren hinter diesem. Für KAHRP wurden fünf unterschiedliche Zelllinien etabliert, welche jeweils die ersten 78 Aminosäuren des N-terminalen Bereichs des Proteins mit unterschiedlichen Varianten des PEXEL-Motivs exprimierten: KAHRP¹⁻⁷⁸-RTLAQ-GFP, KAHRP¹⁻⁷⁸-RTIAQ-GFP, KAHRP¹⁻⁷⁸-KTLAQ-GFP, KAHRP¹⁻⁷⁸-HTLAQ-GFP und KAHRP¹⁻⁷⁸-ATLAQ-GFP (vgl. Tab. 3.1). Dabei wiesen die mit Fluoreszenzmikroskopie analysierten Zelllinien für KAHRP unterschiedliche Phänotypen auf (vgl. Abb. 3.1). Das Fusionsprotein des Wildtyps mit dem klassischen PEXEL-Motiv KAHRP¹⁻⁷⁸-RTLAQ-GFP konnte löslich in der Wirtszelle lokalisiert werden. Im Vergleich dazu resultierte die Mutation des PEXEL-Motivs von Leucin zu

Isoleucin in einem deutlich reduzierten Export des GFP-Fusionsproteins (KAHRP¹⁻⁷⁸-RTIAQ-GFP), wobei das Fusionsprotein hauptsächlich ringförmig um den Kern des Parasiten lokalisierte, was typisch für eine Lokalisation im ER ist (vgl. Abb. 3.1) (van Dooren et al., 2005). Zusätzlich war eine ringförmige Lokalisation um den Parasiten zu beobachten, was für eine Akkumulation des Fusionsproteins in der PV oder an der PVM spricht. Bei den Zelllinien KAHRP¹⁻⁷⁸-KTLAQ-GFP, KAHRP¹⁻⁷⁸-HTLAQ-GFP und KAHRP¹⁻⁷⁸-ATLAQ-GFP war der Export der Fusionsproteine in die Wirtszelle blockiert. Die Fusionsproteine akkumulierten hingegen im ER des Parasiten sowie in der PV/PVM (vgl. Abb. 3.1).

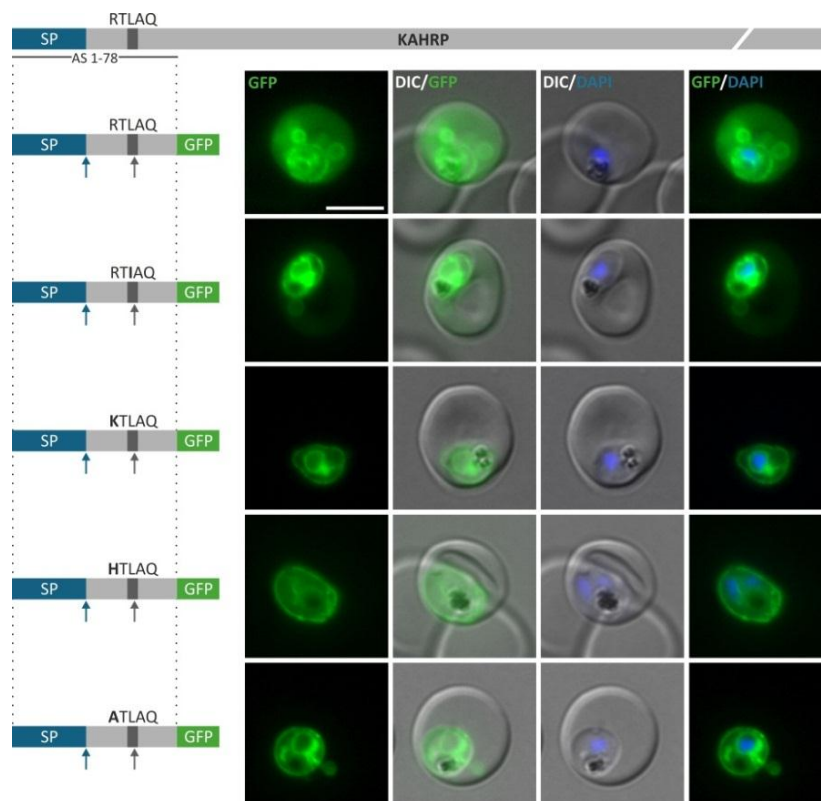


Abbildung 3.1: Lokalisation von KAHRP¹⁻⁷⁸-X-GFP. Die Struktur des Vollängenproteins KAHRP ist über den Aufnahmen dargestellt. Die schematische Struktur der als GFP-Fusionsprotein exprimierten verkürzten Versionen (Aminosäure (AS) 1-78) sind links von den exemplarischen Fluoreszenzaufnahmen der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten abgebildet (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Putative Schnittstellen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet (Signalpeptidaseschnittstelle: blau; Plasmepsin V-Schnittstelle: dunkelgrau). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm.

3.1.1.2 Lokalisation des Reporterproteins REX3

Das PEXEL-Motiv von REX3 startet 8 Aminosäuren hinter dem N-Terminus nahen SP (vgl. Tab. 3.1). Die Zelllinien für REX3 exprimierten die ersten 70 Aminosäuren des N-terminalen Bereichs, wobei insgesamt sieben Zelllinien mit unterschiedlichen PEXEL-Motiven analysiert wurden: REX3¹⁻⁷⁰-RQLSE-GFP, REX3¹⁻⁷⁰-RQISE-GFP, REX3¹⁻⁷⁰-KQLSE-GFP, REX3¹⁻⁷⁰-KQISE-GFP, REX3¹⁻⁷⁰-HQLSE-GFP, REX3¹⁻⁷⁰-HQISE-GFP und REX3¹⁻⁷⁰-AQLSE-GFP. Eine Übersicht der unterschiedlichen Zelllinien und dessen

Phänotypen gibt die Abbildung 3.2. REX3¹⁻⁷⁰-RQLSE-GFP konnte löslich im Wirtszellzytosol lokalisiert werden. Ebenfalls einen deutlichen Export zeigte das Fusionsprotein REX3¹⁻⁷⁰-RQISE-GFP, wohingegen bei REX3¹⁻⁷⁰-KQLSE-GFP und REX3¹⁻⁷⁰-HQLSE-GFP der Export des Fusionsproteins leicht reduziert war (vgl. Abb. 3.2). Bei allen drei Reporterkonstrukten akkumulierte das GFP-Fusionsprotein in der PV/PVM. Eine Doppelmutation des PEXEL-Motivs (REX3¹⁻⁷⁰-KQISE-GFP und REX3¹⁻⁷⁰-HQISE-GFP) führte zu einer Inhibition des Exports in die Wirtszelle und einer Anreicherung der GFP-Fusionsproteine im ER und in der PV/PVM. Das Kontrollreporterprotein REX3¹⁻⁷⁰-AQLSE-GFP wurde nicht exportiert. Es konnte jedoch eine starke Akkumulation des GFP-Fusionsproteins im ER und eine geringe in der PV/PVM detektiert werden (vgl. Abb. 3.2).

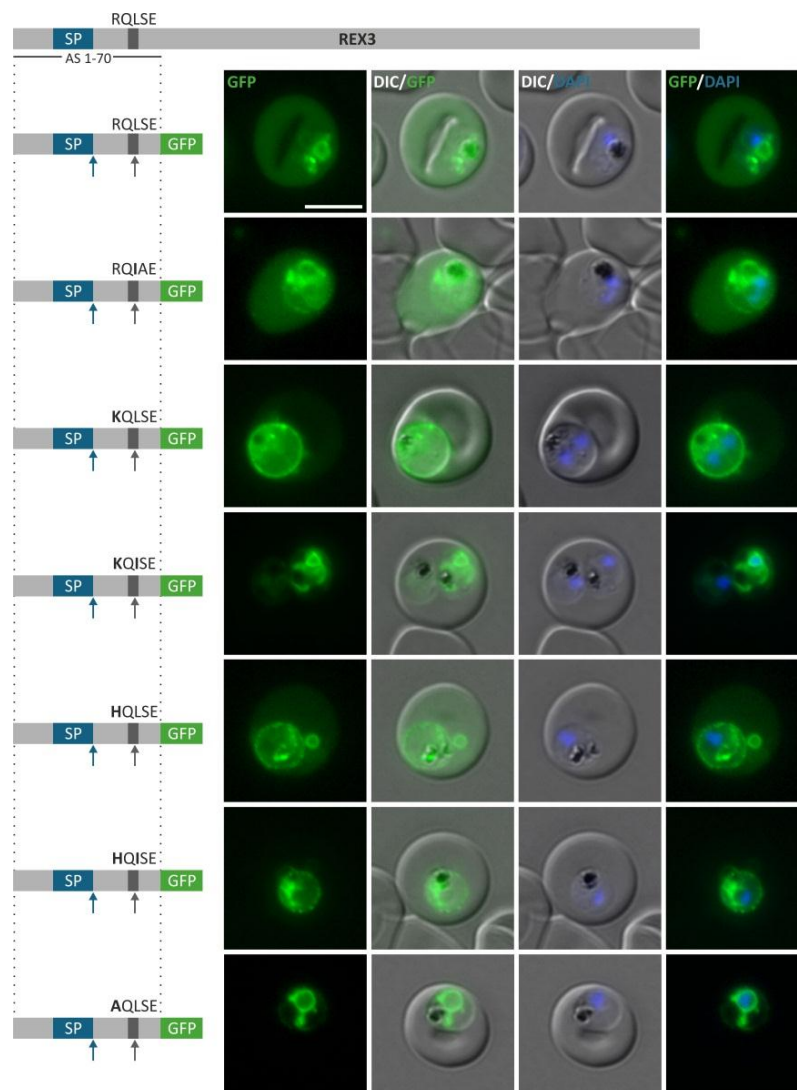
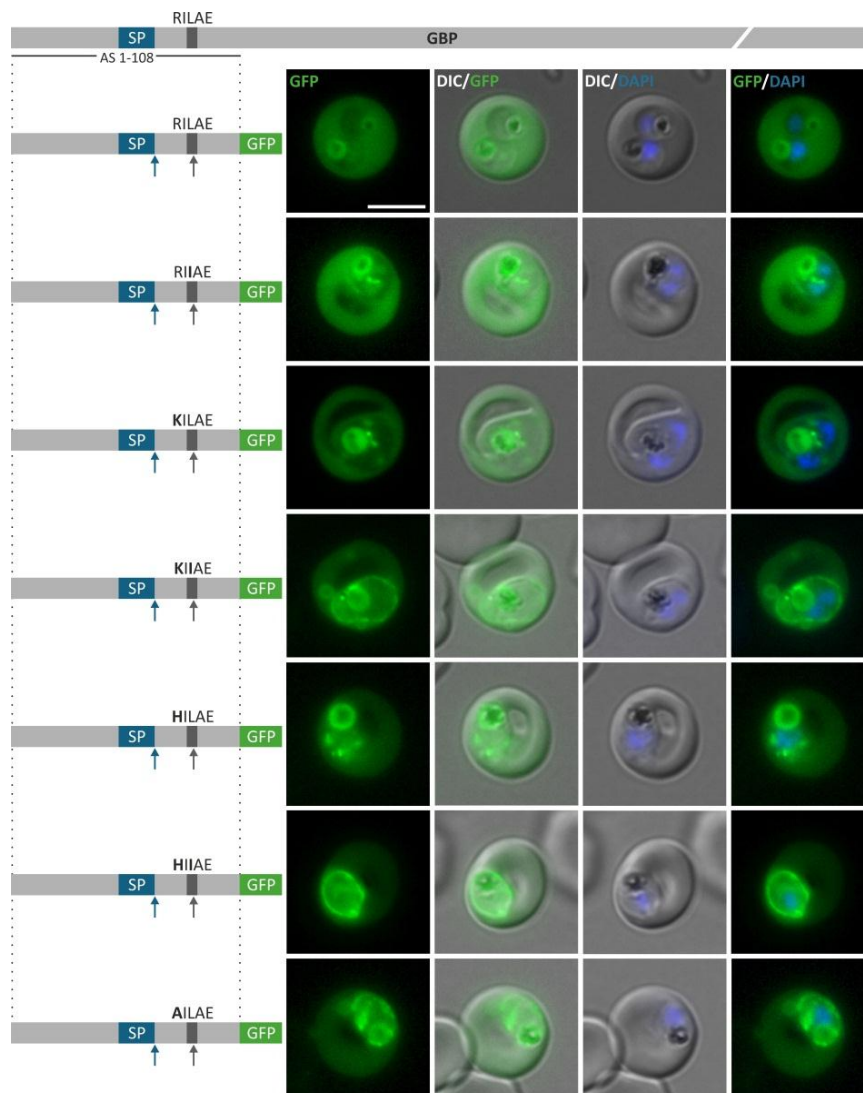


Abbildung 3.2: Lokalisation von REX3¹⁻⁷⁰-X-GFP. Die Struktur des Vollängenproteins REX3 ist über den Aufnahmen dargestellt. Die schematische Struktur der als GFP-Fusionsprotein exprimierten verkürzten Versionen (Aminosäure (AS) 1-70) sind links von den exemplarischen Fluoreszenzaufnahmen der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten abgebildet (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Putative Schnittstellen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet (Signalpeptidaseschnittstelle: blau; Plasmeypsin V-Schnittstelle: dunkelgrau). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm.

3.1.1.3 Lokalisation des Reporterproteins GBP

GBP besitzt ein N-Terminus nahes SP, welches die Aminosäuren 51 bis 68 umfasst. Das PEXEL-Motiv beginnt 16 Aminosäuren hinter dem SP. Insgesamt wurden von GBP sieben Fusionsproteine exprimiert, welche die Aminosäuren eins bis 108 umfassten und unterschiedliche PEXEL-Motive aufwiesen: GBP¹⁻¹⁰⁸-RILAE-GFP, GBP¹⁻¹⁰⁸-RIIAE-GFP, GBP¹⁻¹⁰⁸-KILAE-GFP, GBP¹⁻¹⁰⁸-KIIE-GFP, GBP¹⁻¹⁰⁸-HILAE-GFP, GBP¹⁻¹⁰⁸-HIIE-GFP und GBP¹⁻¹⁰⁸-AILAE-GFP (vgl. Tab. 3.1). Die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie der unterschiedlichen GBP-Zelllinien zeigte bei allen GFP-Fusionsproteinen einen ähnlichen Phänotyp mit lediglich geringen Abweichungen bei den verschiedenen PEXEL-Varianten (vgl. Abb. 3.3). So lokalisierte das GFP-Fusionsprotein aller Zelllinien löslich im Erythrozyten. Zusätzlich konnten die Fusionsproteine innerhalb des Parasiten in der Nahrungsvakuole detektiert werden. Bei den Zelllinien GBP¹⁻¹⁰⁸-KIIE-GFP und GBP¹⁻¹⁰⁸-HIIE-GFP akkumulierte das Fusionsprotein zusätzlich in der PV/PVM. Ebenfalls zu einer Anreicherung in der PV/PVM kam es beim Fusionsprotein der Kontrolle GBP¹⁻¹⁰⁸-AILAE-GFP, wobei auch hier ein deutlicher Export sichtbar war (vgl. Abb. 3.3).



←**Abbildung 3.3: Lokalisation von GBP¹⁻¹⁰⁸-X-GFP (vorherige Seite).** Die Struktur des Volllängenproteins GBP ist über den Aufnahmen dargestellt. Die schematische Struktur der als GFP-Fusionsprotein exprimierten verkürzten Versionen (Aminosäure (AS) 1-108) sind links von den exemplarischen Fluoreszenzaufnahmen der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten abgebildet (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Putative Schnittstellen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet (Signalpeptidaseschnittstelle: blau; Plasmepsin V-Schnittstelle: dunkelgrau). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm.

3.1.2 Quantifizierung des Exports der Reporterproteine KAHRP, REX3 und GBP

Die unterschiedlichen Zelllinien für KAHRP, REX3 und GBP wurden weiterhin mit Hilfe der Westernblotanalyse näher charakterisiert. Zum einen konnte so eine Quantifizierung des Exports stattfinden. Zum anderen erlaubt der Westernblot eine Aussage darüber zu treffen, ob eine Prozessierung am alternativen PEXEL-Motiv bei den verschiedenen PEXEL-Varianten stattfindet und lässt somit Rückschlüsse auf die Funktionalität zu. Für die Westernblotanalyse wurden Proteinfaktionen der GFP-Fusionsproteine mit Hilfe der Tetanolysinlyse (vgl. Kap. 2.4.8) hergestellt. Durch die selektive Lyse mit Tetanolysin wird die Erythrozytenmembran permeabilisiert. Die Membran der PV und die PM bleiben hingegen intakt. Durch die Anwendung dieser Methode gelangen lösliche Parasitenproteine, die in die Wirtszelle exportiert wurden, durch Zentrifugation in den Überstand. Diese Fraktion wird im Folgenden als Wirtszellfraktion bezeichnet. Parasitäre Proteine, sowie Membran-assoziierte Proteine und diese, die in der PV vorliegen, sind hingegen im Pellet zu finden (vgl. Abb.3.4). Das Pellet wird im Folgenden als Parasitenfraktion bezeichnet.

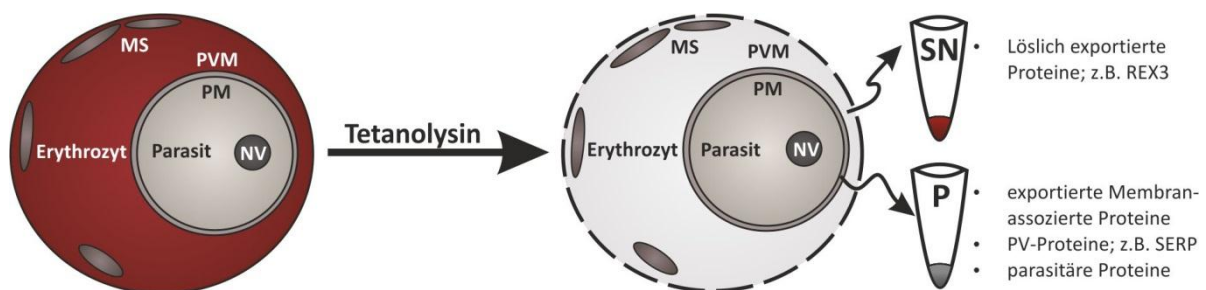


Abbildung 3.4: Überblick der selektiven Lyse mit Tetanolysin. Bei der Fraktionierung mit Tetanolysin wird die Erythrozytenmembran permeabilisiert, wodurch alle im Zytoplasma des Erythrozyten löslichen Proteine durch Zentrifugation in den Überstand (SN; Wirtszellfraktion) gelangen. Die parasitophore Vakuolenmembran (PVM), die Membran der Maurer'schen Spalten (MS) und die Parasitenmembran (PM) bleiben intakt und gelangen durch Zentrifugation in das Pellet (P; Parasitenfraktion).

Die unterschiedlichen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die separierten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Für den immunologischen Nachweis wurde ein GFP-spezifischer Antikörper verwendet. Eine korrekte Fraktionierung der unterschiedlichen Lysate wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen das lösliche PV-Protein SERP (engl. *Serine Rich Protein/Serine Repeat Antigen*) (Knapp et al., 1989) durch An- bzw. Abwesenheit des Proteins in den

unterschiedlichen Fraktionen bestätigt. Die Vollständigkeit der Lyse wurde mit Antikörpern gegen das parasitäre Protein REX3, welches löslich in der Wirtszelle vorliegt (Spielmann et al., 2006b), überprüft. Eine Quantifizierung des Exports fand weiterhin mit Hilfe des Programms „ImageJ“ statt. Dabei wurde die Intensität der einzelnen Banden bestimmt und diese in einen prozentualen Zahlenwert umgerechnet.

Abhängig von der untersuchten Zelllinie der Reporterproteine KAHRP, REX3 und GBP konnten nach der selektiven Lyse mit Tetanolsin jeweils eine Bande in der Wirtszellfraktion und bis zu vier Banden unterschiedlicher Größe in der Parasitenfraktion detektiert werden. Die Banden in der Wirtszellfraktion stimmen entweder in etwa mit der Größe des am/nahe dem SP oder am PEXEL prozessierten GFP-Fusionsproteins überein. Die in der Parasitenfraktion detektierten Banden entsprechen in etwa dem Molekulargewicht des Volllängenfusionsproteins, dem Fusionsprotein, welches am/nahe dem SP oder am PEXEL prozessiert wurde, oder GFP allein. Eine Übersicht der erwarteten Molekulargewichte der unterschiedlichen Reportproteine KAHRP, REX3 und GBP gibt die Tabelle 3.2.

Tabelle 3.2: Übersicht der Molekulargewichte der unterschiedlichen GFP-Fusionsproteine von KAHRP, REX3 und GBP.

Zelllinie	Volllängenprotein [kDa]	Prozessierung an der SPase-Schnittstelle [kDa]	Prozessierung am PEXEL [kDa]	GFP allein [kDa]
KAHRP	36,5	32,4	30	26,7
REX3	35,3	31,2	29,4	26,7
GBP	39,3	31,6	29,5	26,7

SPase: Signalpeptidase

3.1.2.1 Quantifizierung des Exports des Reporterproteins KAHRP

In Abbildung 3.5 ist eine Übersicht der Westernblotanalyse der selektiven Lyse für die unterschiedlichen Zelllinien von KAHRP dargestellt. Die GFP-Fusionsproteine KAHRP¹⁻⁷⁸-RTLAQ-GFP und KAHRP¹⁻⁷⁸-RTIAQ-GFP wiesen eine deutliche Bande in der Wirtszellfraktion auf, welche ebenfalls schwach in der Parasitenfraktion nachweisbar war (vgl. Abb. 3.5A). Zusätzlich waren bei beiden Zelllinien Abbauprodukte mit der Größe von GFP allein vorhanden, sowie bei KAHRP¹⁻⁷⁸-RTIAQ-GFP eine schwache Bande in der Größe des am/nahe dem SP prozessierten Fusionsproteins. Aufgrund der Bandenintensität konnte für KAHRP¹⁻⁷⁸-RTLAQ-GFP und für KAHRP¹⁻⁷⁸-RTIAQ-GFP ein prozentualer Anteil an exportiertem Fusionsprotein von 88% bzw. 82% ermittelt werden (vgl. Abb. 3.5B). Bei den nicht in die Wirtszelle exportierten Fusionsproteinen der Zelllinien KAHRP¹⁻⁷⁸-KTLAQ-GFP, KAHRP¹⁻⁷⁸-HTLAQ-GFP und KAHRP¹⁻⁷⁸-ATLAQ-GFP (vgl. Kap. 3.1.1) konnte in der Wirtszellfraktion keine Bande detektiert werden. In der Parasitenfraktion waren deutliche Banden nachweisbar, die

vermutlich dem Volllängenprotein, dem am/nahe dem SP prozessierten Fusionsprotein und GFP allein entsprechen (vgl. Abb. 3.5A). Dabei entspricht der Anteil am/nahe dem SP prozessierten Fusionsproteins für KAHRP¹⁻⁷⁸-KTLAQ-GFP 62%, für KAHRP¹⁻⁷⁸-HTLAQ-GFP 77% und für die Kontrolle KAHRP¹⁻⁷⁸-ATLAQ-GFP 100% (vgl. Abb. 3.5B). Bei allen Zelllinien konnte die Intaktheit der PV nach selektiver Lyse mit Hilfe des Proteins SERP, welches ausschließlich im Pellet detektiert werden konnte, bestätigt werden. REX3 konnte hingegen nur im Überstand nachgewiesen werden, so dass von einer vollständigen Lyse ausgegangen werden kann.

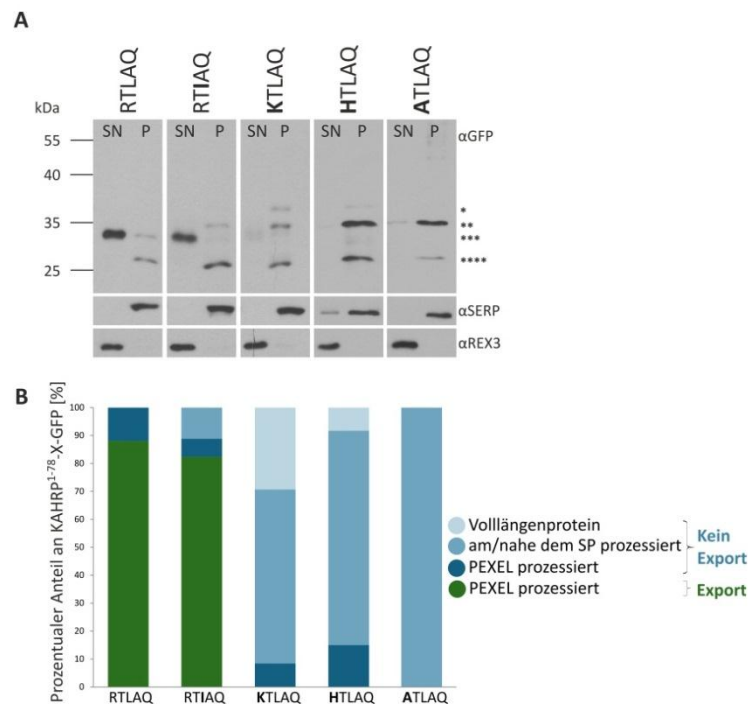
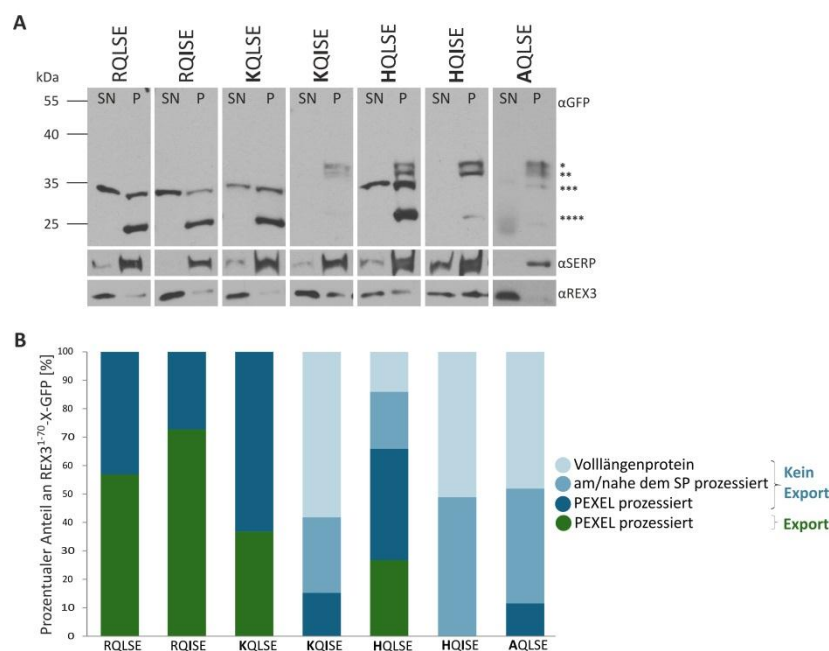


Abbildung 3.5: Quantifizierung des Exports von KAHRP¹⁻⁷⁸-X-GFP. A) Westernblotanalyse der mit Tetanolsin fraktionierten mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Aufgetragen wurde jeweils die Wirtszellfraktion (SN; Überstand) und die Parasitenfraktion (P; Pellet). Die korrekte und vollständige Fraktionierung wurde mit Antikörpern gegen die Proteine SERP und REX3 überprüft. Anhand des Molekulargewichts konnte Volllängenfusionsprotein (*), am/nahe dem SP prozessiertes Fusionsprotein (**) und am PEXEL prozessiertes Fusionsprotein (***) sowie GFP allein (****) identifiziert werden. B) Bestimmung des prozentualen Anteils an KAHRP¹⁻⁷⁸-X-GFP anhand der Bandenintensität mit Hilfe des Programms „ImageJ“. Die Bande, welche GFP allein repräsentiert, wurde in die Auswertung nicht mit einbezogen.

3.1.2.2 Quantifizierung des Exports des Reporterproteins REX3

Der Westernblot der selektiven Lyse der unterschiedlichen GFP-Fusionsproteine von REX3 ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Bei den GFP-Fusionsproteinen für REX3 waren die einzelnen Banden im Westernblot größer als das berechnete Molekulargewicht mit Ausnahme von GFP allein (vgl. Tab. 3.2 und Abb. 3.6). Dieses Phänomen kommt bei *P. falciparum*-Proteinen nicht selten vor (Coppel et al., 1994; Tarr et al., 2014) und konnte für REX3 schon in früheren Studien beobachtet werden (Spielmann et al., 2006b). Trotz der Abweichung des Molekulargewichts konnte eine Zuordnung der jeweiligen Banden stattfinden. Die GFP-Fusionsproteine der Zelllinien REX3¹⁻⁷⁰-RQLAE-GFP, REX3¹⁻⁷⁰-

RQIAE¹⁻⁷⁰-GFP, REX3¹⁻⁷⁰-KQLAE-GFP und REX3¹⁻⁷⁰-HQLAE-GFP konnten sowohl in der Wirtszell- als auch in der Parasitenfraktion detektiert werden, wobei die Größe dem am PEXEL prozessierten Fusionsprotein entspricht (vgl. Abb. 3.6A). Dabei war die Bande bei REX3¹⁻⁷⁰-RQLAE-GFP, REX3¹⁻⁷⁰-RQIAE-GFP und REX3¹⁻⁷⁰-KQLAE-GFP in der Wirtszellfraktion stärker als in der Parasitenfraktion, was einem prozentualen Anteil von 57%, 73% und 37% an exportiertem Protein ausmacht (vgl. Abb. 3.6B). Bei REX3¹⁻⁷⁰-HQLAE-GFP waren in der Parasitenfraktion zusätzlich drei weitere Banden sichtbar, welche vermutlich GFP allein, dem Fusionsprotein prozessiert am/nahe dem SP sowie dem GFP-Volllängenprotein entsprechen (vgl. Abb. 3.6A). Dabei macht das am PEXEL prozessierte Fusionsprotein mit 39% den größten Anteil aus (vgl. Abb. 3.6B). In der Wirtszellfraktion der Fusionsproteine REX3¹⁻⁷⁰-KQIAE-GFP, REX3¹⁻⁷⁰-HQIAE-GFP sowie der Kontrolle REX3¹⁻⁷⁰-AQLAE-GFP konnte das GFP-Fusionsprotein nicht detektiert werden. In der Parasitenfraktion waren hingegen mehrere Banden nachweisbar, die bei REX3¹⁻⁷⁰-KQIAE-GFP und REX3¹⁻⁷⁰-HQIAE-GFP vermutlich mit der Größe des GFP-Volllängenproteins (51% und 48%), dem Fusionsprotein prozessiert am/nahe dem SP (49% und 40%) und GFP allein übereinstimmen. Bei REX3¹⁻⁷⁰-KQIAE-GFP und der Kontrolle REX3¹⁻⁷⁰-AQLAE-GFP war weiterhin eine schwache Bande sichtbar, welche vermutlich dem am PEXEL-Motiv prozessierten Fusionsprotein entspricht (15%, 12%) (vgl. Abb. 3.6A und 3.6B). Die Korrektheit der Fraktionierung konnte mit Hilfe der Proteine SERP und REX3 bestätigt werden, wobei bei den Fusionsproteinen REX3¹⁻⁷⁰-HQLAE-GFP und REX3¹⁻⁷⁰-HQIAE-GFP die PVM bei der Lyse mit Tetanolsin leicht beschädigt wurde.



←**Abbildung 3.6: Quantifizierung des Exports von REX3¹⁻⁷⁰-X-GFP (vorherige Seite).** A) Westernblotanalyse der mit Tetanolysin fraktionierten mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Aufgetragen wurde die Wirtszellfraktion (SN; Überstand) und die Parasitenfraktion (P; Pellet). Die korrekte und vollständige Fraktionierung wurde mit Antikörpern gegen die Proteine SERP und REX3 überprüft. Anhand des Molekulargewichts konnte Vollängenfusionsprotein (*), am/nahe dem SP (***) und am PEXEL prozessiertes Fusionsprotein (***) sowie GFP allein (****) identifiziert werden. B) Bestimmung des prozentualen Anteils an REX3¹⁻⁷⁰-X-GFP anhand der Bandenintensität mit Hilfe des Programms „ImageJ“. Die Bande, welche GFP allein repräsentiert, wurde in die Auswertung nicht mit einbezogen.

3.1.2.3 Quantifizierung des Exports des Reporterproteins GBP

Bei allen sieben unterschiedlichen GBP-Zelllinien konnten im Westernblot in der Wirtszellfraktion eine Bande detektiert werden (vgl. Abb. 3.7). In der Parasitenfraktion war lediglich bei GBP¹⁻¹⁰⁸-KILAE-GFP, GBP¹⁻¹⁰⁸-HIIAE-GFP und der Kontrolle GBP¹⁻¹⁰⁸-AILAE-GFP eine Bande nachweisbar, welche nur einen geringen prozentualen Anteil an nicht exportiertem Protein ausmacht (zwischen 12% und 33%) (vgl. Abb. 3.7A und 3.7B). Die bei diesen Fusionsproteinen nachgewiesene Bande wies sowohl in der Wirtszell- als auch in der Parasitenfraktion ein höheres Molekulargewicht auf als bei GBP¹⁻¹⁰⁸-RILAE-GFP, GBP¹⁻¹⁰⁸-RIIAE-GFP, GBP¹⁻¹⁰⁸-KILAE-GFP und GBP¹⁻¹⁰⁸-HILAE-GFP. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich hier vermutlich um am/nahe dem SP prozessiertes Fusionsprotein handelt, wohingegen bei den anderen Zelllinien eine Prozessierung am klassischen/alternativen PEXEL des Fusionsproteins vorliegt (vgl. Abb. 3.7A und 3.7B).

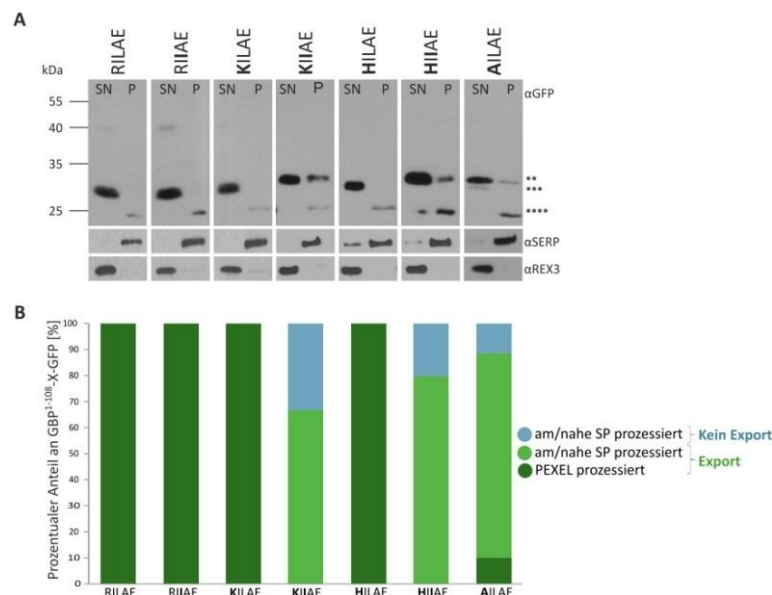


Abbildung 3.7: Quantifizierung des Exports von GBP¹⁻¹⁰⁸-X-GFP. A) Westernblotanalyse der mit Tetanolysin fraktionierten mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Aufgetragen wurde die Wirtszellfraktion (SN; Überstand) und die Parasitenfraktion (P; Pellet). Die korrekte und vollständige Fraktionierung wurde mit Antikörpern gegen die Proteine SERP und REX3 überprüft. Anhand des Molekulargewichts konnte am/nahe dem SP (**) und am PEXEL prozessiertes Fusionsprotein (***) sowie GFP allein (****) identifiziert werden. B) Bestimmung des prozentualen Anteils an GBP¹⁻¹⁰⁸-X-GFP anhand der Bandenintensität mit Hilfe des Programms „ImageJ“. Die Bande, welche GFP allein repräsentiert, wurde in die Auswertung nicht mit einbezogen.

3.1.3 Untersuchung der Funktionalität des K.L.E-Motivs anhand ausgewählter Reporterproteine mittels Massenspektrometrie

Die Reporterproteine REX3 und GBP wurden mit dem alternativen PEXEL-Motiv K.L.E exportiert. Um nachzuweisen, dass sowohl REX3¹⁻⁷⁰-KQLAE-GFP als auch GBP¹⁻¹⁰⁸-KILAE-GFP, wie die Westernblotanalyse vermuten lässt, am alternativen PEXEL-Motiv prozessiert werden, wurde der N-Terminus dieser Proteine mit Hilfe der Massenspektrometrie näher charakterisiert. Eine Prozessierung am alternativen PEXEL wäre ein Hinweis auf dessen Funktionalität. Um die eventuelle Prozessierungsstelle von GBP¹⁻¹⁰⁸-AIIAE-GFP zu ermitteln, wurde ebenfalls der N-Terminus des Reporterproteins mit Hilfe der Massenspektrometrie untersucht. Dazu wurden über einen Percollgradienten aufgereinigte infizierte Erythrozyten mit Trophozoitenstadien der unterschiedlichen Zelllinien mit Saponin lysiert. Durch die Lyse mit Saponin wird sowohl die Erythrozytenmembran als auch die PVM permeabilisiert, so dass exportierte Proteine, die löslich vorliegen, durch Zentrifugation in den Überstand gelangen. Die mit Hilfe von GFP-Beads aus dem Überstand aufgereinigten GFP-Reporter wurden mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt, die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und zur weiteren massenspektrometrischen Analyse an die Abteilung der massenspektrometrischen Proteomanalytik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf übergeben. Dort wurden die Reporterproteine tryptisch verdaut. Bei einem Verdau mit Trypsin wird die Peptidbindung spezifisch am Carboxyende der Aminosäuren Arginin und Lysin gespalten. Die entstandenen Peptide wurden mit Hilfe der Elektronensprayionisations-Flüssigkeitschromatographie (ESI-LC) separiert und anschließend mit einem LC-ESI-QTOF- (GBP¹⁻¹⁰⁸-KILAE-GFP) bzw. LC-ESI-OT-Massenspektrometer (REX3¹⁻⁷⁰-KQLAE-GFP und GBP¹⁻¹⁰⁸-AIIAE-GFP) analysiert. Durch einen Abgleich mit einer *P. falciparum* Datenbank konnten die Peptidsequenzen ermittelt und zum jeweiligen Reporterprotein zugeordnet werden.

3.1.3.1 Massenspektrometrische Analyse von REX3¹⁻⁷⁰-KQLSE-GFP

Die Aufreinigung von REX3¹⁻⁷⁰-KQLSE-GFP über die GFP-Beads wurde mittels Westernblot mit GFP-spezifischen Antikörpern überprüft. Nach Lyse mit Saponin konnte das GFP-Fusionsprotein im Überstand detektiert werden (vgl. Abb. 3.8A). Nach Inkubation mit den GFP-Beads lag das Fusionsprotein angereichert im Eluat vor. Bei der massenspektrometrischen Analyse wurden insgesamt 21 Peptide identifiziert (vgl. Abb. 3.8B). Dies umfasst sowohl Peptide, die im Protein REX3 lagen (zwei Peptide) als auch im GFP-Tag (19 Peptide). Eine Liste aller identifizierten Peptide befindet sich im Anhang D (vgl. Tab. D.1). Es konnte im N-Terminus von REX3¹⁻⁷⁰-KQLSE-GFP das Peptid SEPVEEQDLKK identifiziert werden (vgl. Abb. 3.8B, grüner Kasten und 3.8C), welches mit der PEXEL-Position 4 des alternativen PEXEL-Motivs (KQL↓SE) beginnt. Dieses ist ein semi-tryptisches Peptid, welches im Vergleich zu den anderen nachgewiesenen Peptiden keine zwei Trypsin-Schnittstellen

aufweist. Dies deutet auf einen am alternativen PEXEL prozessierten N-Terminus von REX3¹⁻⁷⁰-KQLSE-GFP hin. In Abbildung 3.8C ist das Spektrum mit einer komplementären y- und b-Ion Serie des identifizierten N-terminalen Peptids dargestellt. Das Spektrum umfasst die gesamte Peptidsequenz, wobei die m/z-Werte der b²- und b³-Ionen eine N-Acetylierung anzeigen (vgl. Abb. 3.8C). Somit konnte mit Hilfe der Massenspektrometrie bestätigt werden, dass das alternative PEXEL K.L.E des Reporterproteins REX3 zwischen der Position 3 und 4 prozessiert und der N-Terminus acetyliert wird.

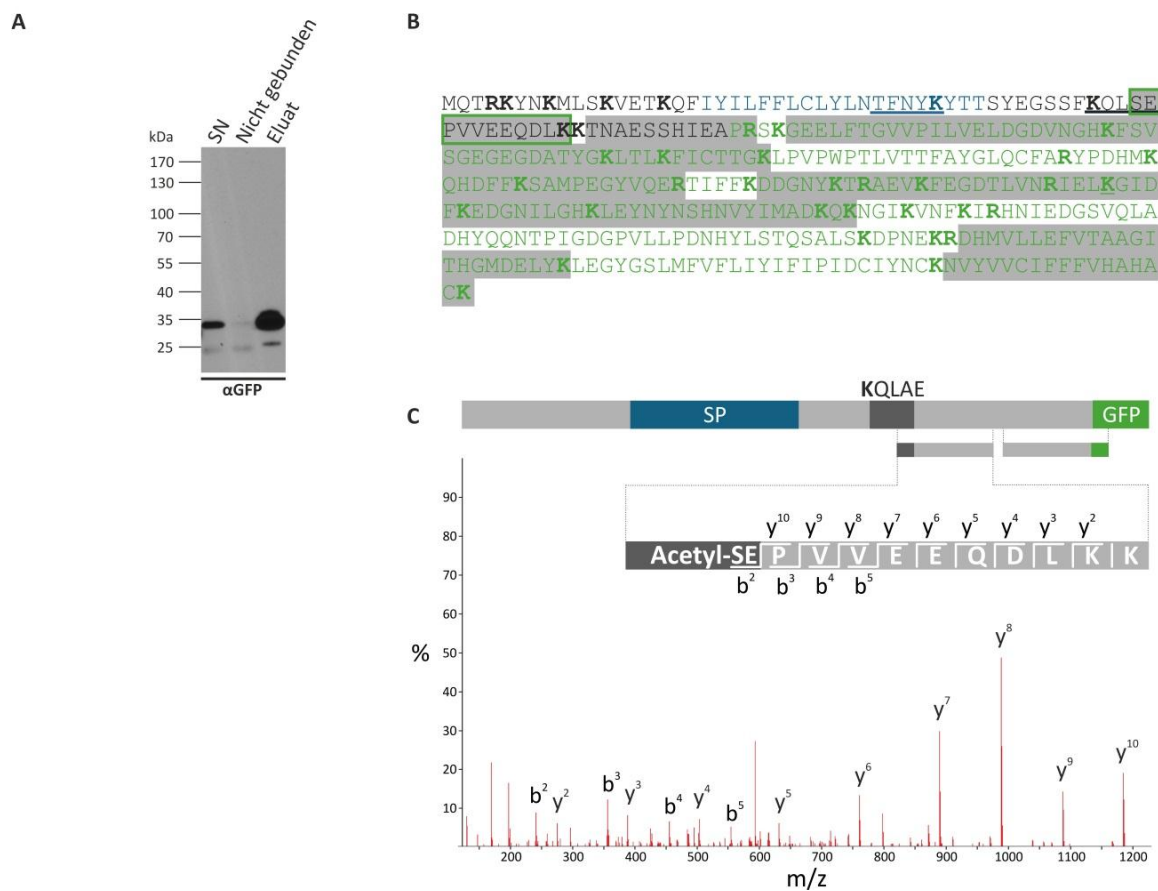


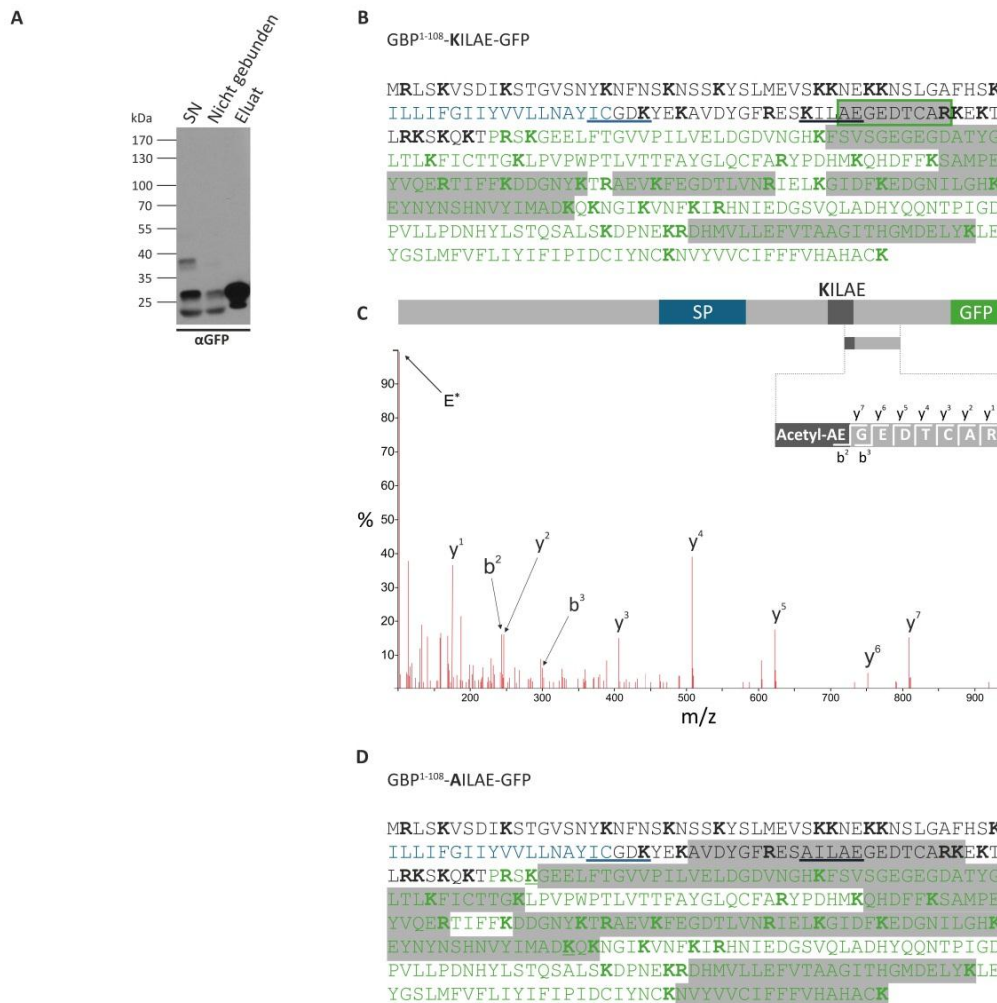
Abbildung 3.8: Massenspektrometrische Analyse von REX3¹⁻⁷⁰-KQLAE-GFP. A) Westernblotanalyse der Aufreinigung des Fusionsproteins über GFP-Beads. Dargestellt sind der Überstand (SN) nach Lyse mit Saponin, nicht an die GFP-Beads gebundenes Fusionsprotein, sowie das Eluat des Fusionsproteins nach Inkubation mit den GFP-Beads. B) Sequenz von REX3¹⁻⁷⁰-KQLAE-GFP (REX3: schwarz; SP: blau; GFP-Tag: grün). Durch die Massenspektrometrie identifizierte Peptide sind grau hinterlegt. Trypsinschnittstellen sind fett dargestellt. Putative Schnittstelle der Signalpeptidase sowie das PEXEL-Motiv sind unterstrichen. C) MS/MS Fragmentierungsspektrum des semi-tryptischen Peptids SEPVEEQDLK (grüner Kasten in B). Die X-Achse zeigt die Masse (m/z) und die Y-Achse zeigt die Intensität der y- und b-Ionen an. Eine N-Acetylierung am Peptid konnte mittels Massenspektrometrie ermittelt werden.

3.1.3.2 Massenspektrometrische Analyse von GBP¹⁻¹⁰⁸-KILAE-GFP und GBP¹⁻¹⁰⁸-AILAE-GFP

In Abbildung 3.9A ist die Aufreinigung des Fusionsproteins GBP¹⁻¹⁰⁸-KILAE-GFP exemplarisch für GBP¹⁻¹⁰⁸-KILAE-GFP und GBP¹⁻¹⁰⁸-AILAE-GFP dargestellt. Die Westernblotanalyse mit GFP-spezifischen Antikörpern zeigte, dass nach Lyse mit Saponin das lösliche Fusionsprotein im Überstand vorhanden war (vgl. Abb. 3.9A) und dieses nach der Inkubation mit den GFP-Beads angereichert im Eluat vorlag. Nur geringe Mengen der GBP-Reporterproteine haben nicht an die GFP-Beads gebunden. Insgesamt wurden bei GBP¹⁻¹⁰⁸-KILAE-GFP durch die massenspektrometrische Analyse zehn Peptide identifiziert, wobei ein Peptid im GBP-Protein und neun Peptide im GFP-Tag lagen. Eine Liste aller nachgewiesenen Peptide befindet sich im Anhang D (vgl. Tab. D.1). Bei dem im GBP-Protein nachgewiesenen Fragment handelt sich um das semi-tryptische Peptid AEGEDTCAR (vgl. Abb. 3.9B, grüner Kasten und 3.9D), welches mit der Position 4 des alternativen PEXEL-Motivs (KIL↓AE) startet. Das Spektrum mit einer komplementären y- und b-Ion Serie ist in Abbildung 3.9D dargestellt. Mit Hilfe des Spektrums konnte bestätigt werden, dass eine Prozessierung des PEXEL-Motivs bei dem GFP-Fusionsprotein GBP¹⁻¹⁰⁸-KILAE-GFP zwischen der Position 3 und 4 mit einer anschließenden Acetylierung stattgefunden hat (vgl. Abb. 3.9B).

Insgesamt konnten für GBP¹⁻¹⁰⁸-AILAE-GFP 21 Peptide identifiziert werden (vgl. Abb. 3.9C). Eine Liste aller Peptide befindet sich im Anhang D (vgl. Tab. D.1). 19 Peptide lagen im GFP-Tag und zwei Peptide, die sich aber jeweils überlappen, konnten im Protein GBP nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.9C). Die beiden Peptide (AVDYGFR und ESAILAEGEDTCARK) umfassen die Aminosäure 75 bis 96 und liegen kurz hinter der Signalpeptidaschnittstelle (IC/GDK). Dabei überspannen die beiden Peptide das mutierte PEXEL (A.L.E) (vgl. Abb. 3.9C). Es handelt sich hier um tryptische Peptide. Somit konnte durch die massenspektrometrische Analyse bestätigt werden, dass GBP¹⁻¹⁰⁸-AILAE-GFP nicht am alternativen PEXEL-Motiv prozessiert wird. Andere Prozessierungen wie beispielsweise an der Schnittstelle der Signalpeptidase können nicht ausgeschlossen werden.

→ **Abbildung 3.9: Massenspektrometrische Analyse von GBP¹⁻¹⁰⁸-KILAE-GFP und GBP¹⁻¹⁰⁸-AILAE-GFP (folgende Seite).** A) Westernblotanalyse der Aufreinigung des Fusionsproteins GBP¹⁻¹⁰⁸-KILAE-GFP über GFP-Beads. Dargestellt sind der Überstand (SN) nach Lyse mit Saponin, nicht an die GFP-Beads gebundenes Fusionsprotein, sowie das Eluat des Fusionsproteins nach Inkubation mit den GFP-Beads. B) und D) Sequenz von GBP¹⁻¹⁰⁸-KILAE-GFP bzw. GBP¹⁻¹⁰⁸-AILAE-GFP (GBP: schwarz; SP: blau; GFP-Tag: grün). Durch die Massenspektrometrie identifizierte Peptide sind grau hinterlegt. Trypsinschnittstellen sind fett dargestellt. Putative Schnittstelle der Signalpeptidase sowie das PEXEL-Motiv sind unterstrichen. C) MS/MS Fragmentierungsspektrum des semi-tryptischen Peptids AEGEDTCAR (grüner Kasten in B) des Fusionsproteins GBP¹⁻¹⁰⁸-KILAE-GFP. Die X-Achse zeigt die Masse (m/z) und die Y-Achse zeigt die Intensität der y- und b-Ionen an. Eine N-Acetylierung am Peptid konnte mittels Massenspektrometrie ermittelt werden. E*: Glutamat Immonium-ion.



3.2 Untersuchung der Funktionalität alternativer PEXEL-Motive anhand von ausgewählten Proteinen *in vivo*

Für die Proteine REX3 und GBP konnte gezeigt werden, dass PEXEL-Varianten offensichtlich funktionell sein können. Bisher konnte dies aber nicht für endogene *P. falciparum*-Proteine nachgewiesen werden. Um die Funktionalität *in vivo* zu testen wurden daher insgesamt 28 *P. falciparum*-Proteine mit unterschiedlichen alternativen PEXEL-Motiv aus einer Vorhersage alternativer PEXEL-Proteine ausgewählt (Schulze et al., in Vorbereitung) (vgl. Abb. 3.10). Deren Lokalisation wurde in infizierten Erythrozyten bestimmt. Zusätzlich wurden zwei Proteine mit einem klassischen PEXEL-Motiv als Positivkontrolle untersucht. Eine Liste von allen untersuchten Kandidaten befindet sich im Anhang E (vgl. Tab. E.1). Wichtige Kriterien zur Auswahl der Kandidaten waren das Vorhandensein eines alternativen PEXEL-Motivs, die Expression dieser im intraerythrozytären Zyklus, eine geringe Größe der zu untersuchenden Proteine, sowie das Vorkommen des alternativen PEXEL-Motivs innerhalb der ersten 100 Aminosäuren des Proteins. Um die unterschiedlichen Kandidaten in Bezug auf den Export zu vergleichen, sollten diese des Weiteren gewisse Unterschiede aufweisen, welche sich in der Anzahl der Exons, der Ab- bzw. Anwesenheit des

SPs und deren Lage innerhalb des Proteins, der Lage auf dem Chromosom wie beispielsweise subtelomer (subtelomer: Lage auf dem Chromosom am Telomerende, wobei diese Bereiche durch viele Proteine mit klassischem PEXEL-Motiv gekennzeichnet sind) und der Ladung der Aminosäuren an Position 2 und 4 des PEXEL-Motivs, sowie dessen Position hinter dem SP widerspiegeln. Diese Merkmale sind für die entsprechenden Kandidaten im jeweiligen Kapitel schematisch dargestellt.

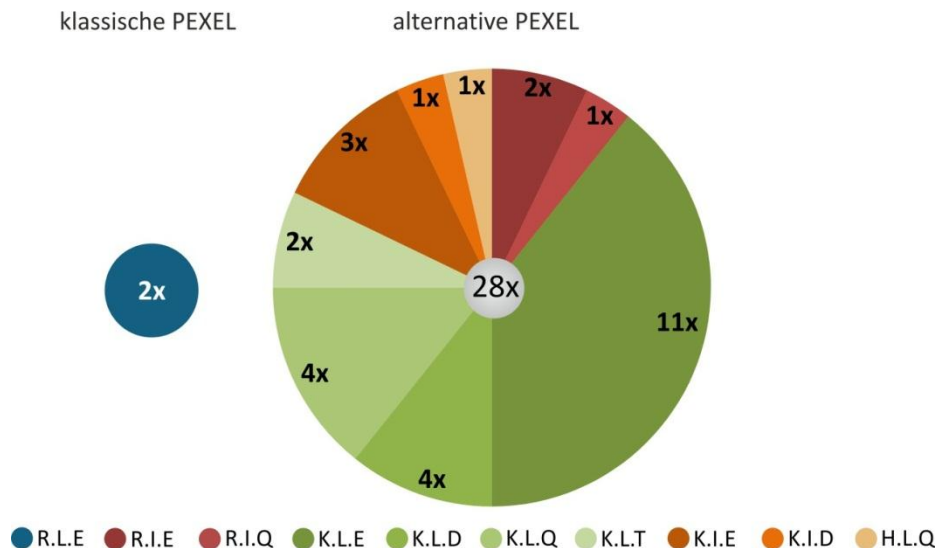


Abbildung 3.10: Mengen-Kreisdiagramm der 28 Kandidaten mit alternativem PEXEL-Motiv. Dargestellt sind die Anzahl der Kandidaten mit unterschiedlichem alternativem PEXEL-Motiv, die getestet wurden. Zwei Kandidaten mit klassischem PEXEL wurden als Kontrolle analysiert.

Ein Export in die Wirtszelle der ausgewählten Kandidaten wurde mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen in Blutstadien von *P. falciparum* 3D7 näher charakterisiert. Die zu untersuchenden Kandidaten wurden wie in Kapitel 3.1 beschrieben in den GFP-Vektor pARL1a(-) kloniert, der Vektor in Blutstadien von *P. falciparum* transfiziert und selektioniert bis eine GFP-Zelllinie für den jeweiligen Kandidaten etabliert werden konnte. Dabei wurde je nach Größe der entsprechenden Kandidaten entweder die gesamte kodierende Sequenz oder ein N-terminales Teilfragment für die Klonierung in pARL1a(-) verwendet. Da sich bei PEXEL-Proteinen die Export-vermittelnde Sequenz fast immer im N-terminalen Bereich innerhalb der ersten 100 Aminosäuren befindet (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004; Sargeant et al., 2006; van Ooij et al., 2008), kann man davon ausgehen, dass die N-terminalen Teilfragmente in Bezug auf den Export eine korrekte Lokalisation anzeigen. Die Lokalisation der unterschiedlichen GFP-Reporterproteine fand mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie statt. Um auszuschließen, dass die Lokalisation der GFP-Signale bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse auf Degradationsprodukte der GFP-Fusionsproteine zurückzuführen ist, wurde die Integrität aller GFP-Fusionsproteine mittels Saponinlyse (vgl. 2.4.6) und anschließender Westernblotanalyse mit GFP-spezifischen Antikörpern überprüft. Für alle GFP-Fusionsproteine konnte eine distinkte Bande detektiert werden, wobei bei einigen Fusionsproteinen zusätzlich das Abbauprodukt GFP

nachweisbar war (vgl. Abb. F.1 und F.2 im Anhang F). Bei einigen GFP-Fusionsproteinen wie beispielsweise PF14_0275-GFP (vgl. Kap. 3.2.8), PFC0085c-GFP (vgl. Kap. 3.3.1) und PFL0045c-GFP (vgl. Kap. 3.3.3) war die detektierte Bande größer als das erwartete Molekulargewicht (vgl. Abb. F.1 und F.2 im Anhang F). Dieses Phänomen der Größenabweichung ist nichts Ungewöhnliches und konnte schon häufig für *P. falciparum*-Proteine beobachtet werden (Spielmann et al., 2006b; Kalanon et al., 2009; Alexandre et al., 2011; Tarr et al., 2014).

3.2.1 Charakterisierung von zwei Proteinen mit einem klassischen PEXEL-Motiv

Als Kontrollen dienten zwei Kandidaten, welche ein klassisches PEXEL-Motiv aufwiesen. Für die Klonierung in den Vektor wurde die gesamte kodierende Sequenz verwendet. Wie für Proteine mit klassischem PEXEL-Motiv typisch (Sargeant et al., 2006), liegen die Kandidaten auf dem Chromosom subtelomer, bestehen aus zwei Exons und weisen neutrale Aminosäuren an Position 2 und 4 des PEXEL-Motivs auf (vgl. Abb. 3.11). Ein Kandidat besitzt ein klassisches SP, wobei der Andere ein N-Terminus nahes SP aufweist.

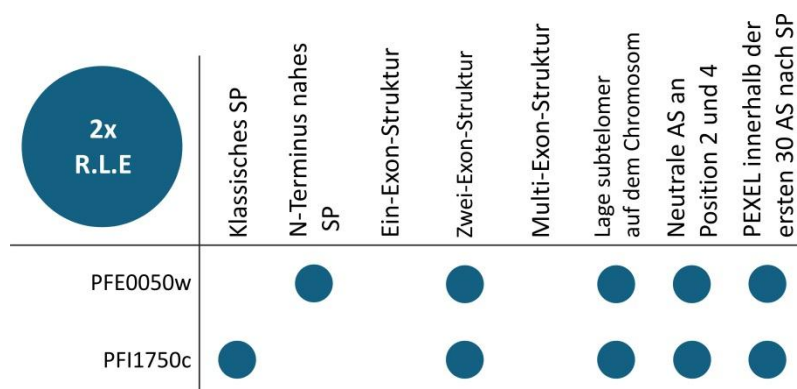


Abbildung 3.11: Übersicht der Kandidaten mit einem R.L.E-Motiv. Dargestellt sind die charakteristischen Merkmale der zwei Kandidaten.

Bei den zu untersuchenden Kandidaten handelt es sich um PFE0050w und PFI1750c, die bei unterschiedlichen Exportomvorhersagen identifiziert wurden (Sargeant et al., 2006; van Ooij et al., 2008; Boddey et al., 2013). Eine Übersicht über die beiden Kandidaten gibt die Tabelle 3.3.

Tabelle 3.3: Ausgewählte Kandidaten mit einem klassischen PEXEL-Motiv.

Gen ID (Annotation in PlasmoDB)	kodierende Sequenz [bp]	SP [AS]	TMD	PEXEL und dessen Position [AS]	Molekulargewicht [kDa]
PFE0050w (<i>Plasmodium exported protein</i>)	783	44-61	-	RVLAE 89-93	31 (20)*
PFI1750c (<i>Plasmodium exported protein (hyp11)</i>)	579	1-22	-	RILSE 49-53	24 (18)*

AS: Aminosäure; bp: Basenpaare; SP: Signalpeptid; TMD: Transmembrandomäne; (*) : Molekulargewicht bei einer Prozessierung am PEXEL-Motiv

Sowohl PFE0050w-GFP als auch PFI1750c-GFP wurden exportiert, wiesen aber unterschiedliche Phänotypen auf (vgl. Abb. 3.12 und 3.13). PFE0050w-GFP zeigte eine punktförmige Verteilung in der Wirtszelle (vgl. Abb. 3.12A), welche charakteristisch für eine Assoziation mit den Maurer'schen Spalten ist (Spielmann et al., 2006b; Heiber et al., 2013). Eine Assoziation mit den Maurer'schen Spalten konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse und spezifischen Antikörpern gegen den Maurer'schen Spalten-Marker REX2 (Spielmann et al., 2006b) bestätigt werden (vgl. Abb. 3.12B).

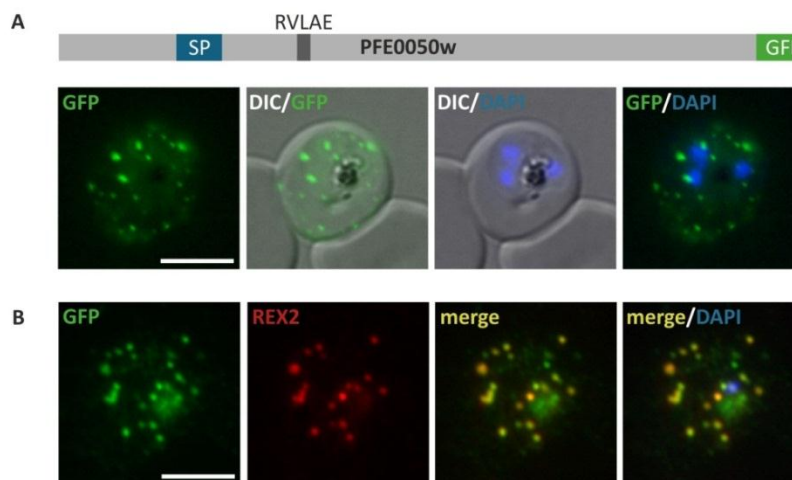
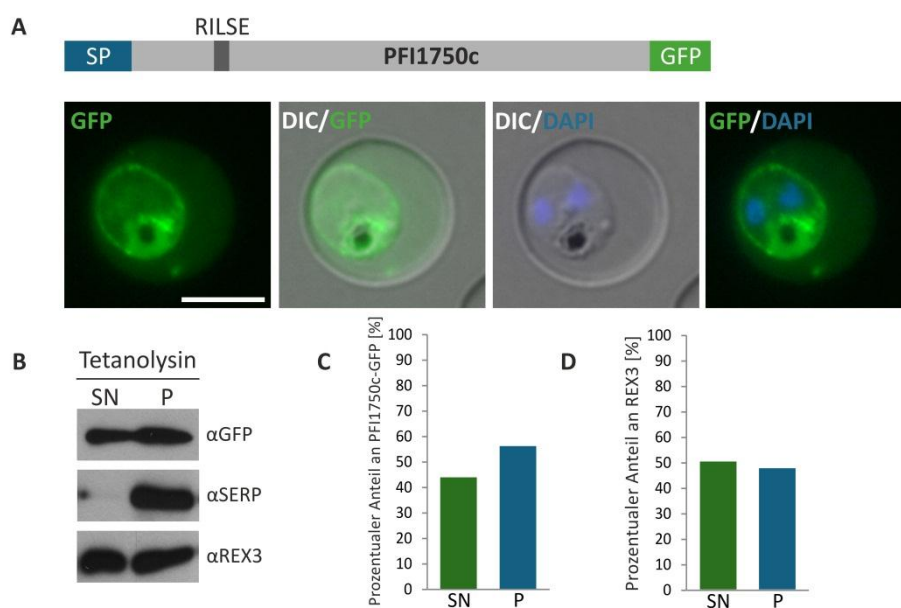


Abbildung 3.12: Lokalisation von PFE0050w-GFP. A) Exemplarische Fluoreszenzaufnahme der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur des Volllängenproteins ist über der Aufnahme dargestellt (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 μ m. B) Immunfluoreszenzanalyse Aceton-fixierter transgener Parasiten. PFE0050w-GFP kolokalisiert mit dem Maurer'schen Spalten-Protein REX2. Längenmaßstab: 5 μ m.

Das Fusionsprotein PFI1750c-GFP lag löslich in der Wirtszelle vor (vgl. Abb. 3.13A). Neben diesen Export war das Fusionsprotein zusätzlich ringförmig um den Parasiten lokalisiert, was für eine Lokalisation in der PV/PVM spricht. Ein löslicher Export konnte mit Hilfe der selektiven Lyse bestätigt werden (vgl. Abb. 3.15B), wobei von PFI1750c-GFP 45% löslich in der Wirtszelle und 55% in der PV/PVM vorlag (vgl. Abb. 3.13C). Es lag eine korrekte Fraktionierung vor (vgl. Abb. 3.13B, SERP). Anhand von REX3 konnte jedoch gezeigt werden, dass die Lyse nicht vollständig war und zu ca. 50% unterschätzt wurde (vgl. Abb. 3.13D). Somit ist der Anteil an tatsächlich exportiertem Protein wahrscheinlich deutlicher größer.

→ **Abbildung 3.13: Lokalisation von PFI1750c-GFP (folgende Seite).** A) Exemplarische Fluoreszenzaufnahme der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur des Volllängenproteins ist über der Aufnahme dargestellt (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 μ m. B) Westernblotanalyse der mit Tetanolsin fraktionierten mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Aufgetragen wurde die Wirtszellfraktion (SN; Überstand) und die Parasitenfraktion (P; Pellet). Die korrekte und vollständige Fraktionierung wurde mit Antikörpern gegen die Proteine SERP und REX3 überprüft. C) und D) Bestimmung des prozentualen Anteils an PFI1750-GFP und REX3 anhand der Bandenintensität mit Hilfe des Programms „ImageJ“.



3.2.2 Lokalisation der Kandidaten mit einem R.I.E- bzw. R.I.Q-Motiv

Um die Funktionalität des R.I.E/Q-Motivs zu testen, wurden drei Kandidaten mit einem R.I.E/Q-Motiv ausgewählt und deren Lokalisation bestimmt (vgl. Abb. 3.14). Dabei handelt es sich um PFA0610c, welches von Sargeant et al. (2006) vorhergesagt wurde, PF13_0032 und PFA0135w. Alle drei Kandidaten weisen an Position 2 und 4 des alternativen PEXEL-Motivs eine neutrale Aminosäure auf (vgl. Abb. 3.14). PF13_0032 und PFA0135w besitzen ein klassisches SP und PFA0610c ein N-Terminus nahes SP. Des Weiteren liegt bei PFA0610c und PFA0135w eine Zwei-Exon-Struktur vor, wohingegen PF13_0032 nur aus einem Exon besteht. Lediglich PFA0135w weist eine subtelomere Lokalisation auf dem Chromosom auf.

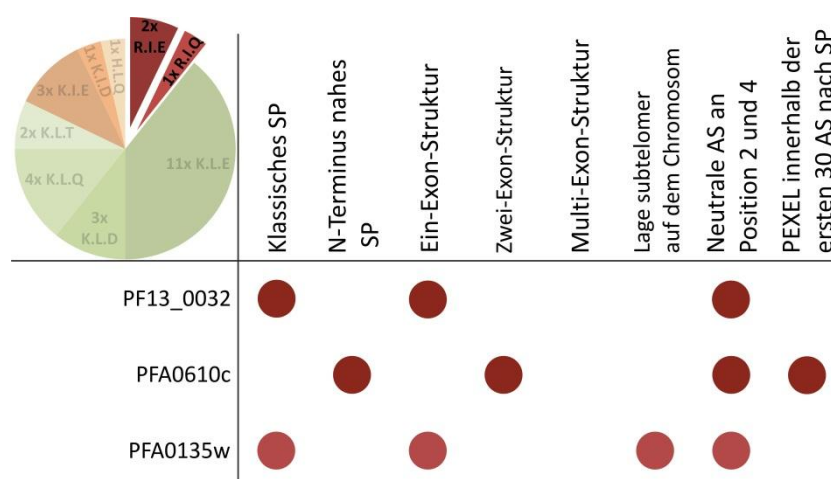


Abbildung 3.14: Übersicht der Kandidaten mit einem R.I.E/Q-Motiv. Dargestellt sind die charakteristischen Merkmale der drei Kandidaten.

Für PF13_0032 konnte aufgrund der Größe von 1437 bp nur eine verkürzte Version mit einer Länge von 570 bp (190 Aminosäuren) hergestellt werden. Weitere Charakteristika der Kandidaten PFA0610c, PF13_0032 und PFA0135w sind in der Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: Ausgewählte Kandidaten mit einem R.I.E- oder R.I.Q-Motiv.

Gen ID (Annotation in PlasmoDB)	kodierende Sequenz [bp]	SP [AS]	TMD	alternatives PEXEL und dessen Position [AS]	Molekulargewicht [kDa]
PFA0610c (<i>Plasmodium exported protein (hyp11)</i>)	612	5-27	-	RIIAE 48-52	25 (19)*
PF13_0032 (<i>conserved Plasmodium protein, unknown function</i>)	1437	1-21	-	RYIQE 70-74	57 (48)*
PFA0135w (<i>merozoite-associated-tryptophan-rich antigen, putative</i>)	831	1-22	-	RNLIQ 82-86	35 (24)*

AS: Aminosäure; bp: Basenpaare; SP: Signalpeptid; TMD: Transmembrandomäne; (*): Molekulargewicht bei einer Prozessierung am PEXEL-Motiv

In der Zelllinie PF13_0032¹⁻¹⁹⁰-GFP wurde das Fusionsprotein nicht exportiert, sondern lokalisierte PV/PVM-typisch ringförmig um den Parasiten (vgl. Abb. 3.15). Somit ist das alternative PEXEL-Motiv von PF13_0032 nicht funktionell.

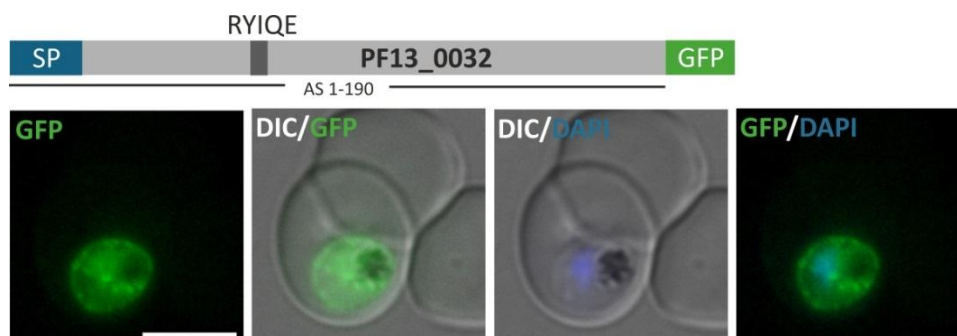


Abbildung 3.15: Lokalisation von PF13_0032¹⁻¹⁹⁰-GFP. Exemplarische Fluoreszenzaufnahme der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur der verkürzten Version (Aminosäure (AS) 1-190) ist über der Aufnahme dargestellt (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm.

Das GFP-Fusionsprotein PFA0610c wurde effizient in die Wirtszelle exportiert und zeigte folgenden Phänotyp: PFA0610c-GFP lokalisierte ringförmig um den Erythrozyten, was charakteristisch für eine Lokalisation in der Erythrozytenperipherie ist (vgl. Abb. 3.16A). Zusätzlich lokalisierte das Fusionsprotein in punktuellen Strukturen in der Wirtszelle und in der Nahrungsvakuole im Parasiten. Um eine Assoziation mit der Peripherie des Erythrozyten zu bestätigen, wurde eine Membranfärbung lebender Zellen mit dem Sphingolipid-Farbstoff Bodipy-TR-C₅-Ceramid durchgeführt. Dieser färbt alle erythrozytären als auch parasitären Membranen wie die Parasitenmembran, die PVM, das TVN und

vermutlich auch die Maurer'schen Spalten rot an. Dabei kolokalisierte PFA0610c-GFP mit der Erythrozytenmembran (vgl. Abb. 3.16B). Mittels selektiver Lyse mit Tetanolysin wurde bestätigt, dass PFA0610c-GFP membrangebunden und nicht löslich in der Wirtszelle vorliegt, da das Fusionsprotein lediglich in der Parasitenfraktion nachweisbar war (vgl. Abb. 3.16D). Mit Hilfe eines IFAs mit GFP- und REX2-spezifischen Antikörpern wurde eine Lokalisation in den Maurer'sche Spalten überprüft (vgl. Abb. 3.16C). Das GFP-Fusionsprotein PFA0610c kolokalisierte jedoch nicht mit den Maurer'schen Spalten. Ebenfalls kolokalisierte PFA0610c nicht mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein KAHRP (vgl. Abb. 3.16C).

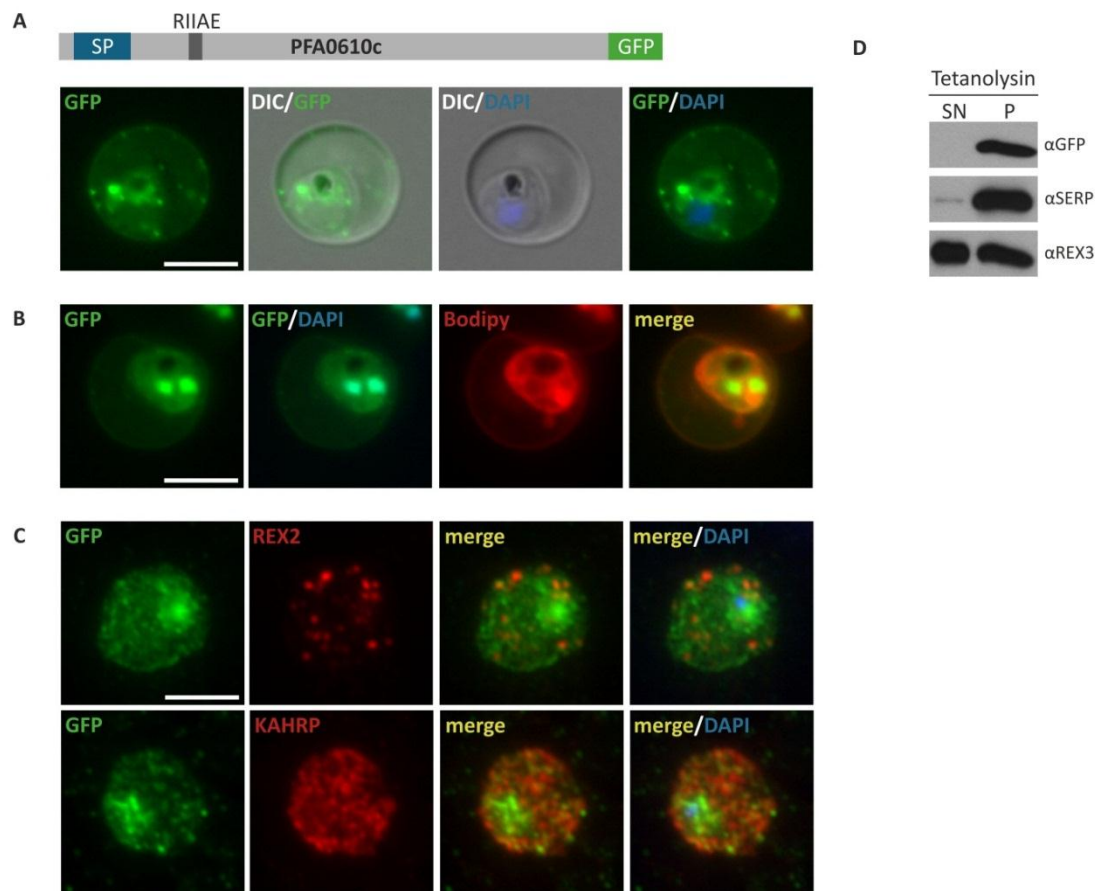
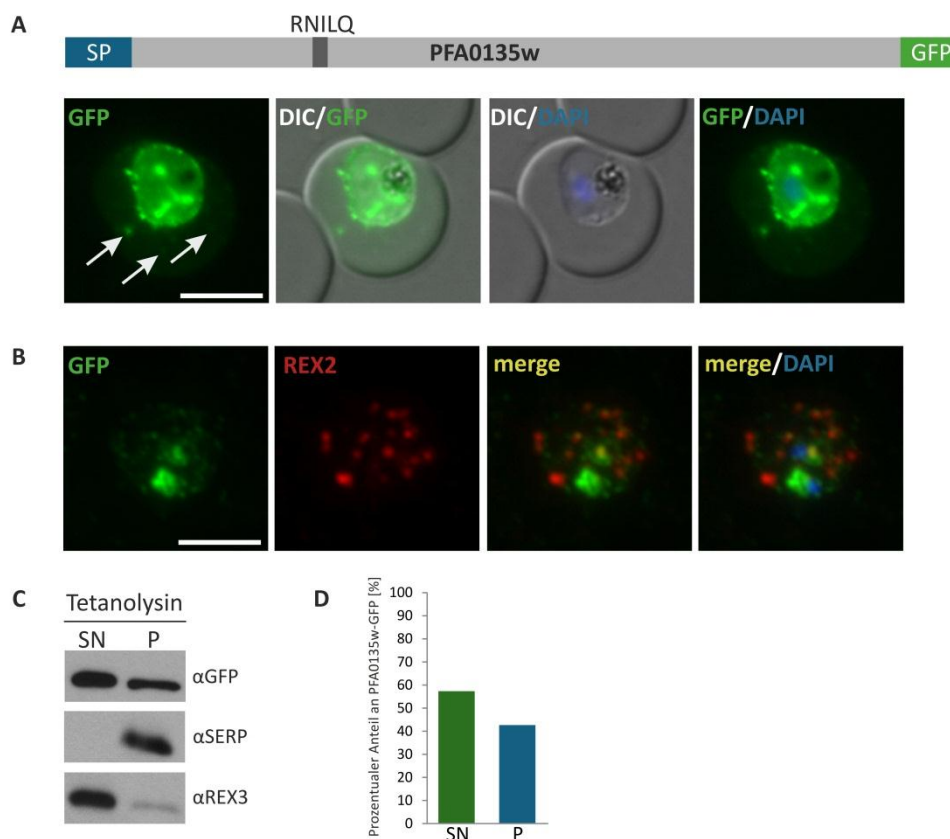


Abbildung 3.16: Lokalisation von PFA0610c-GFP. A) Exemplarische Fluoreszenzaufnahme der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur des Volllängenproteins ist über der Aufnahme dargestellt (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 μ m. B) Exemplarische Fluoreszenzaufnahme Bodipy-TR-C₅-Ceramid angefärbter mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Längenmaßstab: 5 μ m. C) Immunfluoreszenzanalysen Aceton-fixierter transgener Parasiten. Überprüfung der Kolokalisation mit dem Maurer'schen Spalten-Protein REX2 und mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein KAHRP. Längenmaßstab: 5 μ m. D) Westernblotanalyse der mit Tetanolysin fraktionierten mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Aufgetragen wurde die Wirtszellfraktion (SN; Überstand) und die Parasitenfraktion (P; Pellet). Die korrekte und vollständige Fraktionierung wurde mit Antikörpern gegen die Proteine SERP und REX3 überprüft.

PFA0135w-GFP wies neben einer starken PV/PVM-Lokalisation einen schwachen Export des Fusionsproteins auf (vgl. Abb. 3.17A). Dabei lag PFA0135w-GFP löslich im Erythrozyten vor, wobei zusätzlich eine schwache Lokalisation in punktuellen Strukturen nachweisbar war (vgl. Abb. 3.17A, Pfeile). Mit Hilfe des Maurer'schen Spalten-Markers REX2 konnte aber keine Lokalisation in den Maurer'schen Spalten bestätigt werden (vgl. Abb. 3.17B). PFA0135w-GFP konnte mittels IFA jedoch im Parasiten nachgewiesen werden. Bei der Fixierung mit Aceton wird die Erythrozytenmembran teilweise permeabilisiert, so dass Proteine, die löslich in der Wirtszelle vorliegen, ausgewaschen werden und im IFA nicht mehr detektiert werden können. Somit handelt es sich bei PFA0135w vermutlich um ein exportiertes Protein, welches löslich im Zytoplasma der Wirtszelle vorliegt. Dass PFA0135w löslich im Erythrozyten vorkommt, konnte durch die selektive Lyse bekräftigt werden, wobei PFA0135w-GFP sowohl in der Wirtszellfraktion als auch in der Parasitenfraktion vorhanden war (vgl. Abb. 3.17C). Bei der Überprüfung der Fraktionierung war SERP ausschließlich im Pellet und REX3 im Überstand nachweisbar, was auf eine korrekte und vollständige Lyse hindeutet. Bei der Bestimmung der Intensität der Banden konnte festgestellt werden, dass ca. 57% von PFA0135w-GFP in die Wirtszelle exportiert wurde (vgl. Abb. 3.17D). Der nachgewiesene exportierte Anteil in der Wirtszellfraktion scheint im Vergleich mit dem durch Fluoreszenzmikroskopie beobachteten Anteil deutlich höher zu sein. Dies ist auf die Verteilung des löslichen Fusionsproteins im Zytoplasma des Erythrozyten zurückzuführen.



←Abbildung 3.17: Lokalisation von PFA0135w-GFP (vorherige Seite). A) Exemplarische Fluoreszenzaufnahme der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur des Volllängenproteins ist über der Aufnahme dargestellt (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm. B) Immunfluoreszenzanalyse Aceton-fixierter transgener Parasiten. Überprüfung der Kolo­kalisation mit dem Maurer'schen Spalten-Protein REX2. Längenmaßstab: 5 µm. C) Westernblotanalyse der mit Tetanolsin fraktionierten mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Aufgetragen wurde die Wirtszellfraktion (SN; Überstand) und die Parasitenfraktion (P; Pellet). Die korrekte und vollständige Fraktionierung wurde mit Antikörpern gegen die Proteine SERP und REX3 überprüft. D) Bestimmung des prozentualen Anteils an PFA0135w-GFP anhand der Bandenintensität mit Hilfe des Programms „ImageJ“.

3.2.3 Lokalisation der Kandidaten mit einem K.L.E-Motiv

Es wurden insgesamt elf Kandidaten mit einem K.L.E-Motiv untersucht (vgl. Abb. 3.18). Sechs Kandidaten wurden bei der Exportomvorhersage von Sargeant et al. (2006) identifiziert (PFL0040c, PFL0045c, PFL0070c, PFC0085c, PFI1780w und PF13_0193). Mit Ausnahme von PF13_0193 bestehen fünf dieser Kandidaten aus zwei Exons, liegen subtelomer auf dem Chromosom und besitzen neutrale Aminosäuren an Position 2 und 4 des putativen alternativen PEXEL-Motivs. Fast alle der elf Kandidaten besitzen ein N-Terminus nahes SP, wobei PF13_0218a und PF14_0325 kein SP und PFD0144c ein klassisches SP besitzen. Weitere Merkmale der Kandidaten können der Abbildung 3.18 entnommen werden.

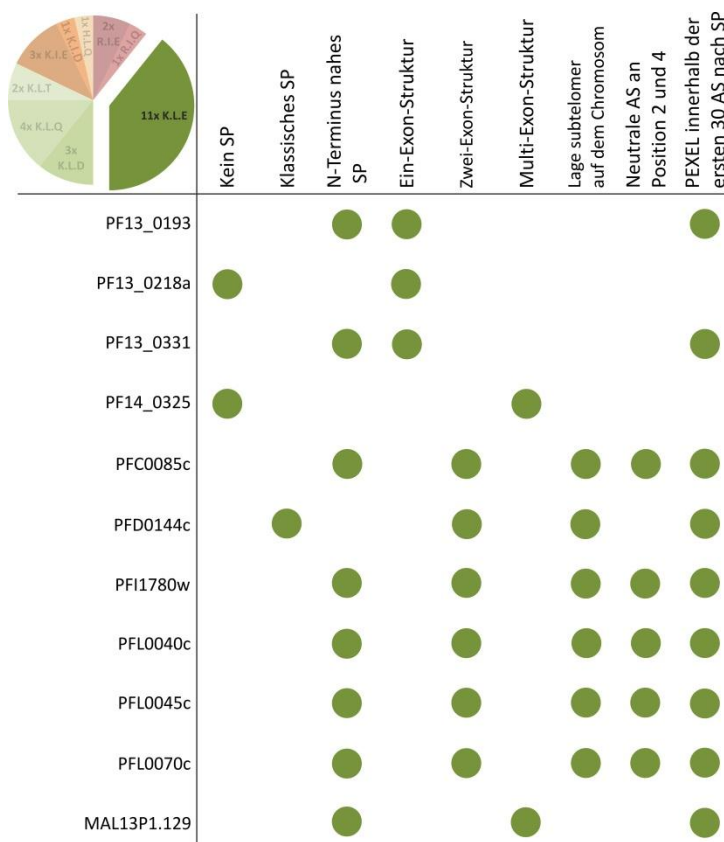


Abbildung 3.18: Übersicht der Kandidaten mit einem K.L.E-Motiv. Dargestellt sind die charakteristischen Merkmale der elf Kandidaten.

Da eine vollständige Amplifikation von PFL0040c und PFL0070c nicht möglich war, wurde eine verkürzte Version mit den ersten 240 bp für PFL0040c bzw. 555 bp für PFL0070c der kodierenden Sequenz hergestellt. Weitere wichtige Merkmale aller Kandidaten mit einem K.L.E-Motiv sind in der Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Tabelle 3.5: Ausgewählte Kandidaten mit einem K.L.E-Motiv.

Gen ID (Annotation in PlasmoDB)	kodierende Sequenz [bp]	SP [AS]	TMD	alternatives PEXEL und dessen Position [AS]	Molekulargewicht [kDa]
PF13_0193 (<i>MSP7-like protein (MSRP3)</i>)	897	5-22	-	KLLEE 39-43	35 (30)*
PF13_0218a (<i>conserved Plasmodium protein, unknown function</i>)	177	-	-	KELGE 46-50	7 (1)*
PF13_0331 (<i>conserved protein, unknown function</i>)	570	10-32	1	KKLNE 39-43	22 (17)*
PF14_0325 (<i>conserved Plasmodium membrane protein, unknown function</i>)	858	-	1	KKLQE 40-45	34 (19)*
PFC0085c (<i>Plasmodium exported protein, unknown function</i>)	954	42-61	1	KSLAE 86-90	37 (27)*
PFD0144c (<i>putative protein, unknown function</i>)	300	1-22	-	KDLEE 23-27	12 (9)*
PFI1780w (<i>Plasmodium exported protein (PHISTc), unknown function</i>)	1152	21-40	-	KSLAE 57-61	46 (39)*
PFL0040c (<i>Serin/Threonin protein kinase, FIKK family (FIKK12)</i>)	1704	7-29	-	KCLSE 46-50	66 (61)* 10 (4)*
PFL0045c (<i>Plasmodium exported protein (PHISTc), unknown function</i>)	1152	31-53	-	KMLCE 71-75	46 (38)*
PFL0070c (<i>Plasmodium exported protein, unknown function</i>)	3390	5-24	-	KILSE 51-55	132 (126)* 22 (15)*
MAL13P1.129 (<i>conserved Plasmodium protein, unknown function</i>)	792	5-27	2	KHLRE 41-45	30(25)*

AS: Aminosäure; bp: Basenpaare; SP: Signalpeptid; TMD: Transmembrandomäne; (*): Molekulargewicht bei einer Prozessierung am PEXEL-Motiv

Die transgene Zelllinie PF14_0325-GFP wies ein zu schwaches GFP-Signal auf, so dass eine Lokalisation mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops nicht möglich war. Von den weiteren zehn transgenen Zelllinien waren die fünf folgenden GFP-Fusionsproteine nicht exportiert: PF13_0193-GFP, PF13_0218a-GFP, PF13_0331-GFP, PFD0144c-GFP und MAL13P1.129 (vgl. Abb. 3.19). Durch das charakteristische ringförmige Signal um den Parasiten kann davon ausgegangen werden, dass die Fusionsproteine PF13_0193-GFP, PFD0144c-GFP und MAL13P1.129 in der PV/PVM lokalisiert sind. PF13_0218a-GFP und PF13_0331-GFP wiesen hingegen eine ringförmige Struktur um den Zellkern des Parasiten auf, was typisch für eine Lokalisation im ER ist. Bei diesen Proteinen kann ausgeschlossen werden, dass das alternative PEXEL-Motiv funktionell ist.

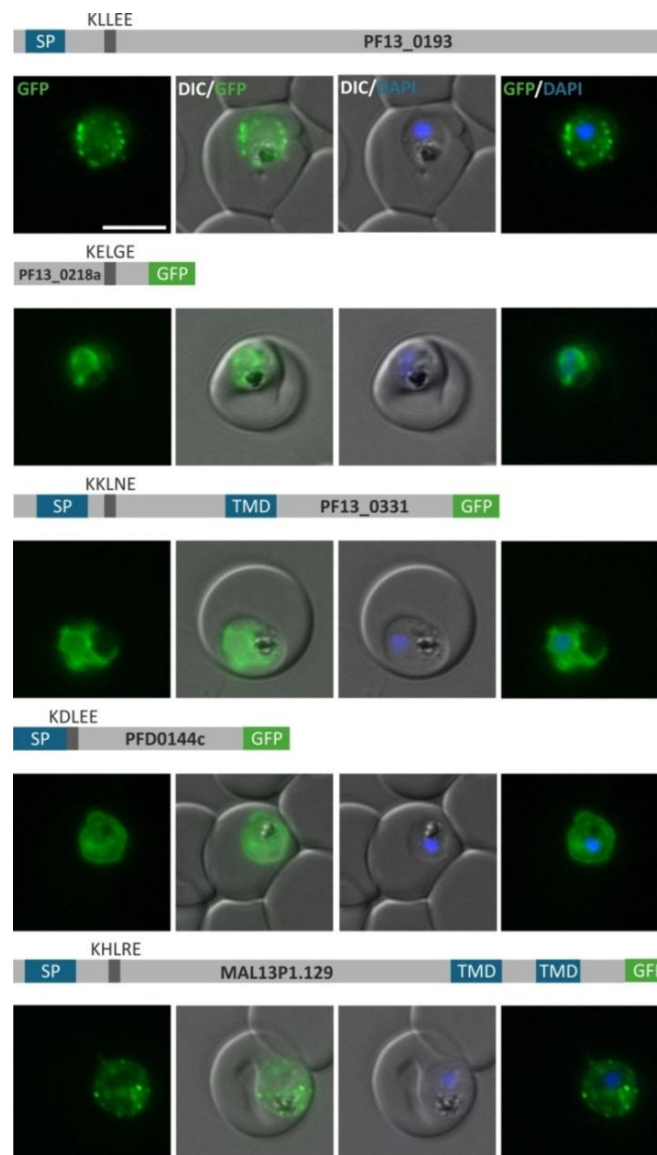


Abbildung 3.19: Lokalisation von PF13_0193-GFP, PF13_0218a-GFP, PF13_0331-GFP, PFD0144c-GFP und MAL13P1.129-GFP. Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur der Vollängenproteine ist über der jeweiligen Aufnahme dargestellt (SP/TMD: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm.

Die Fusionsproteine PFC0085c-GFP, PFI1780w-GFP, PFL0040c¹⁻⁸⁰-GFP, PFL0045c-GFP und PFL0070c¹⁻¹⁸⁵-GFP wurden exportiert. Dabei zeigten die Fusionsproteine unterschiedliche Phänotypen. PFL0070c¹⁻¹⁸⁵-GFP und das Fusionsprotein PFL0040c¹⁻⁸⁰-GFP lagen beide löslich in der Wirtszelle vor (vgl. Abb. 3.20A). Beide Fusionsproteine wurden nur schwach exportiert. Zusätzlich waren beide Fusionsproteine im Parasiten vorhanden. Dabei akkumulierte PFL0040c¹⁻⁸⁰-GFP im ER des Parasiten und der PV/PVM. Mit Hilfe der selektiven Lyse wurde bestätigt, dass beide GFP-Fusionsproteine löslich in der Wirtszelle vorlagen (vgl. Abb. 3.20B). So konnten die Fusionsproteine sowohl in der Wirtszell- als auch in der Parasitenfraktion detektiert werden, wobei PFL0040c¹⁻⁸⁰-GFP zu 25% und PFL0070c¹⁻¹⁸⁵-GFP zu 38% exportiert wurde (vgl. Abb. 3.20C). Der Nachweis einer nahezu vollständigen und korrekten Fraktionierung war mit Hilfe der Antikörper gegen die Proteine SERP und REX3 möglich.

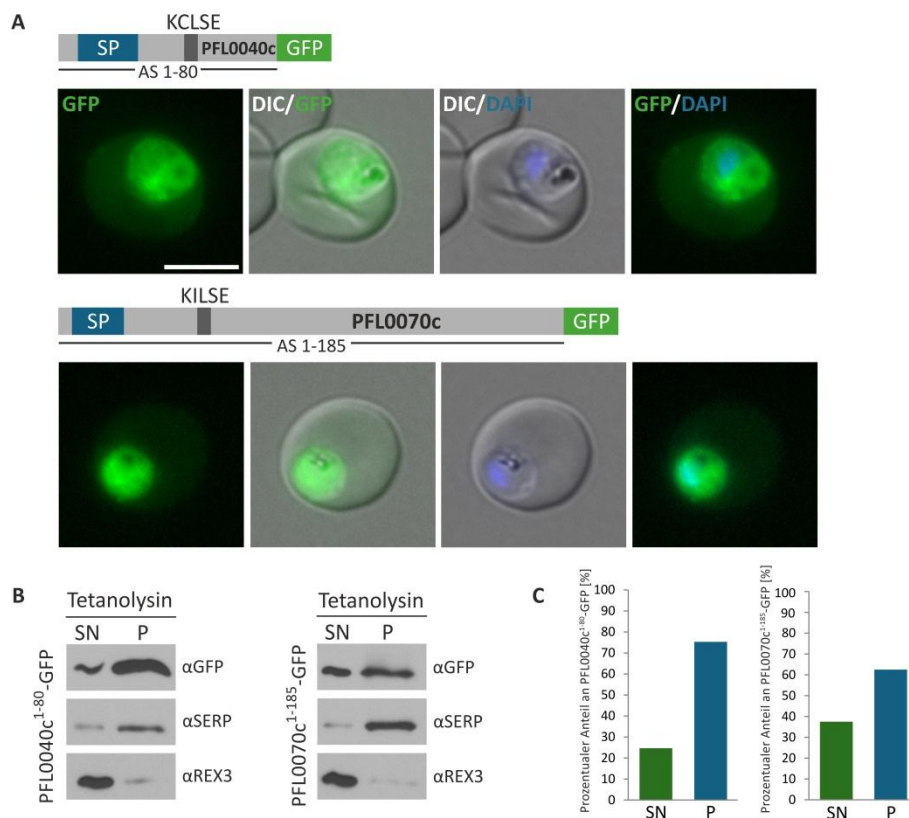
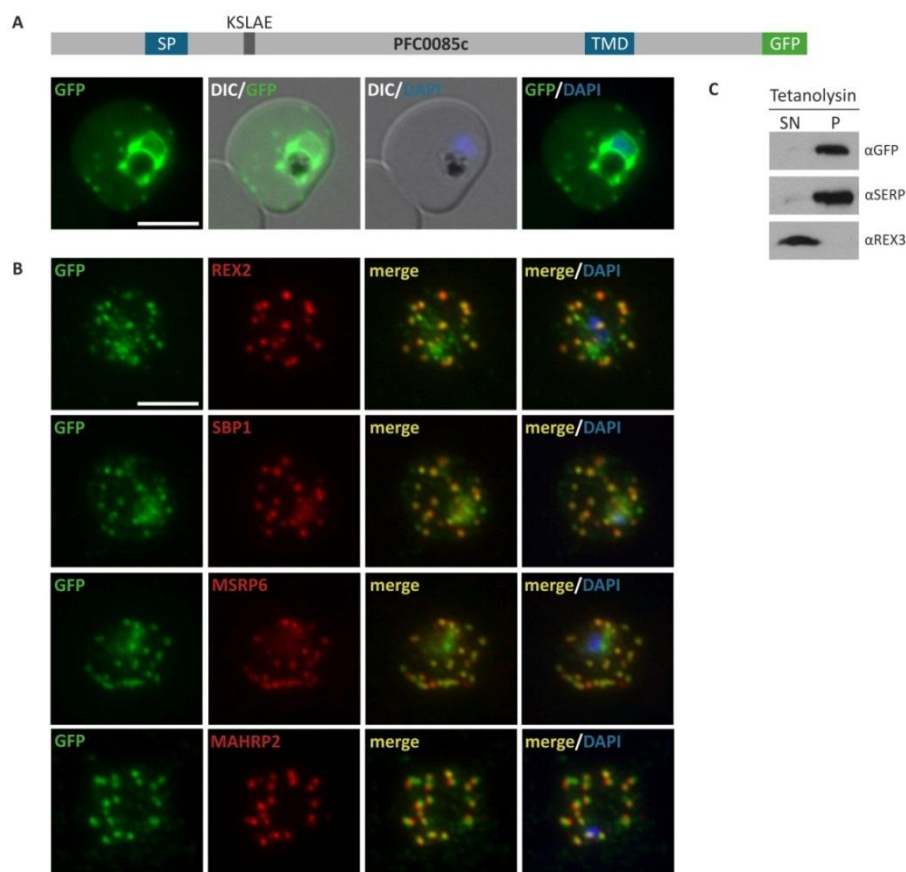


Abbildung 3.20: Lokalisation von PFL0040c¹⁻⁸⁰-GFP und PFL0070c¹⁻¹⁸⁵-GFP. A) Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur der verkürzten Version dieser Proteine (Aminosäure (AS) 1-80 für PFL0040c bzw. 1-185 für PFL0070c) ist über der jeweiligen Aufnahme dargestellt (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm. B) Westernblotanalyse der mit Tetanolysin fraktionierten mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Aufgetragen wurde die Wirtszellfraktion (SN; Überstand) und die Parasitenfraktion (P; Pellet). Die korrekte und vollständige Fraktionierung wurde mit Antikörpern gegen die Proteine SERP und REX3 überprüft. C) Bestimmung des prozentualen Anteils an PFL0040c¹⁻⁸⁰-GFP und PFL0070c¹⁻¹⁸⁵-GFP anhand der Bandenintensität mit Hilfe des Programms „ImageJ“.

PFC0085c-GFP zeigte neben einer starken Akkumulation im ER des Parasiten einen Export des Fusionsproteins in punktförmigen Strukturen, welche typisch für die Maurer'schen Spalten sind (vgl. Abb. 3.21A). Mit Hilfe der Maurer'schen Spalten-Marker REX2, SBP1 und MSRP6 (engl. *Merozoite Surface Protein 7-related Protein 6*) konnte eine Lokalisation in den Maurer'schen Spalten mittels IFA bestätigt werden, wobei keine vollständige Kolo­kalisierung von PFC0085c-GFP mit den unterschiedlichen Markern vorlag (vgl. Abb. 3.21B). Aufgrund der partiellen Kolo­kalisierung wurde überprüft, ob PFC0085c-GFP eventuell in den „Tether“ der Maurer'schen Spalten lokalisiert ist. Dazu wurde mit dem „Tether“-Marker MAHRP2 (Pachlatko et al., 2010) ebenfalls ein IFA durchgeführt (vgl. Abb. 3.21B). Es zeigte sich, dass das Fusionsprotein PFC0085c-GFP direkt neben MAHRP2 lokalisierte, es aber keine Überlappung der beiden Fluoreszenzsignale gab. Somit ist PFC0085c kein „Tether“-Protein. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass PFC0085c ein Maurer'schen Spalten-Protein ist, welches sich lediglich in anderen Bereichen als bekannte Maurer'schen Spalten-Proteine befindet.

Weiterhin schien das Fusionsprotein PFC0085c-GFP, neben einer Lokalisation in den Maurer'schen Spalten, löslich in der Wirtszelle vorzuliegen (vgl. Abb. 3.21A). Dies konnte mit Hilfe der selektiven Lyse mit Tetanolylin nicht bestätigt werden. Hier konnte das Fusionsprotein lediglich in der Parasitenfraktion nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.21C). Dies stimmt mit der Lokalisation von PFC0085c-GFP in den Maurer'schen Spalten überein, da diese durch Zentrifugation pelletieren.



←Abbildung 3.21: Lokalisation von PFC0085c-GFP (vorherige Seite). A) Exemplarische Fluoreszenzaufnahme der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur des Volllängenproteins ist über der Aufnahme dargestellt (SP/TMD: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm. B) Immunfluoreszenzanalysen Aceton-fixierter transgener Parasiten. Kolokalisation des Maurer'schen Spalten-Proteins REX2, SBP1 und MSRP6 mit PFC0085c-GFP. Das „Tether“-Protein MAHRP2 kolokalisiert nicht mit PFC0085c-GFP. Längenmaßstab: 5 µm C) Westernblotanalyse der mit Tetanolsin fraktionierten mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Aufgetragen wurde die Wirtszellfraktion (SN; Überstand) und die Parasitenfraktion (P; Pellet). Die korrekte und vollständige Fraktionierung wurde mit Antikörpern gegen die Proteine SERP und REX3 überprüft.

Das Protein PFI1780w gehört in die Proteinfamilie PHISTc (engl. *Plasmodium Helical Interspersed Subtelomeric*). Das Fusionsprotein PFI1780w-GFP lokalisierte ringförmig um den Erythrozyten (vgl. Abb. 3.22A), was typisch für eine Lokalisation an der Erythrozytenperipherie ist. Um eine Assoziation mit der Erythrozytenmembran zu bestätigen, wurde eine Membranfärbung lebender Zellen mit dem Sphingolipid-Farbstoff Bodipy-TR-C₅-Ceramid durchgeführt. Es lag eine Kolokalisation des GFP-Signals des Fusionsproteins mit der Bodipy angefärbten Erythrozytenmembran vor (vgl. Abb. 3.22B).

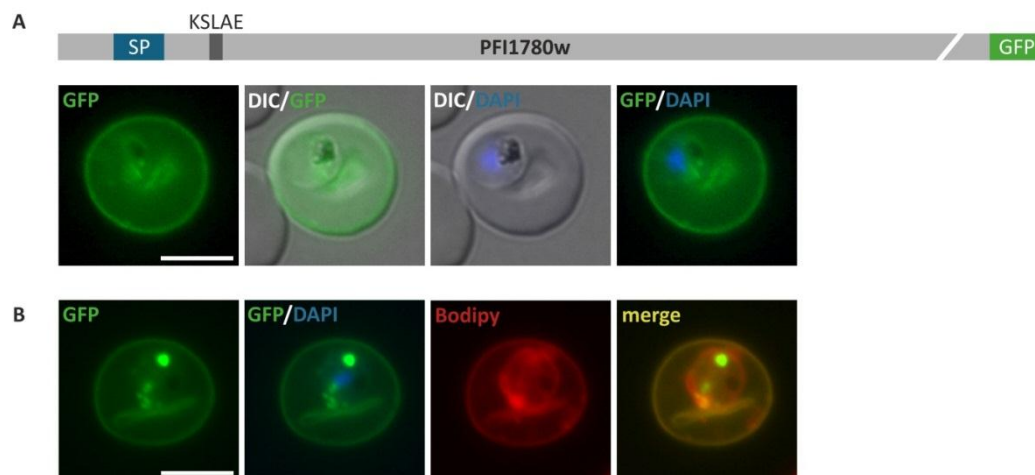


Abbildung 3.22: Lokalisation von PFI1780w-GFP. A) Exemplarische Fluoreszenzaufnahme der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur des Volllängenproteins ist über der Aufnahme dargestellt (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm. B) Exemplarische Fluoreszenzaufnahme Bodipy-TR-C₅-Ceramid angefärbter mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Längenmaßstab: 5 µm.

Ebenfalls ein Mitglied der PHIST-Proteinfamilie ist PFL0045c. Das Fusionsprotein PFL0045c-GFP lag in zahlreichen punktförmigen Strukturen in der Wirtszelle vor (vgl. Abb. 3.23A). Dieses Muster der punktuellen Verteilung ist untypisch für eine Lokalisation in den Maurer'schen Spalten. Um eine Lokalisation in den Maurer'schen Spalten auszuschließen wurde daher eine Immunfluoreszenzanalyse mit GFP- und REX2-spezifischen Antikörpern durchgeführt. In der Abbildung 3.23B ist zu sehen, dass PFL0045c-GFP nicht mit dem Maurer'schen Spalten-Protein REX2 kolokalisiert. Des Weiteren konnte bei der Fluoreszenzmikroskopie der lebenden transgenen Zellen

festgestellt werden, dass sich die punktuellen Strukturen, ähnlich wie Proteine die in J-Dots (Külzer et al., 2010) bzw. K-Dots (Kats et al., 2014) lokalisiert sind, schnell bewegen. Diese Bewegungen konnten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie in einem Zeitraum von 210 s (Aufnahmeintervall etwa 15 s) sichtbar gemacht werden (vgl. Abb. 3.23C).

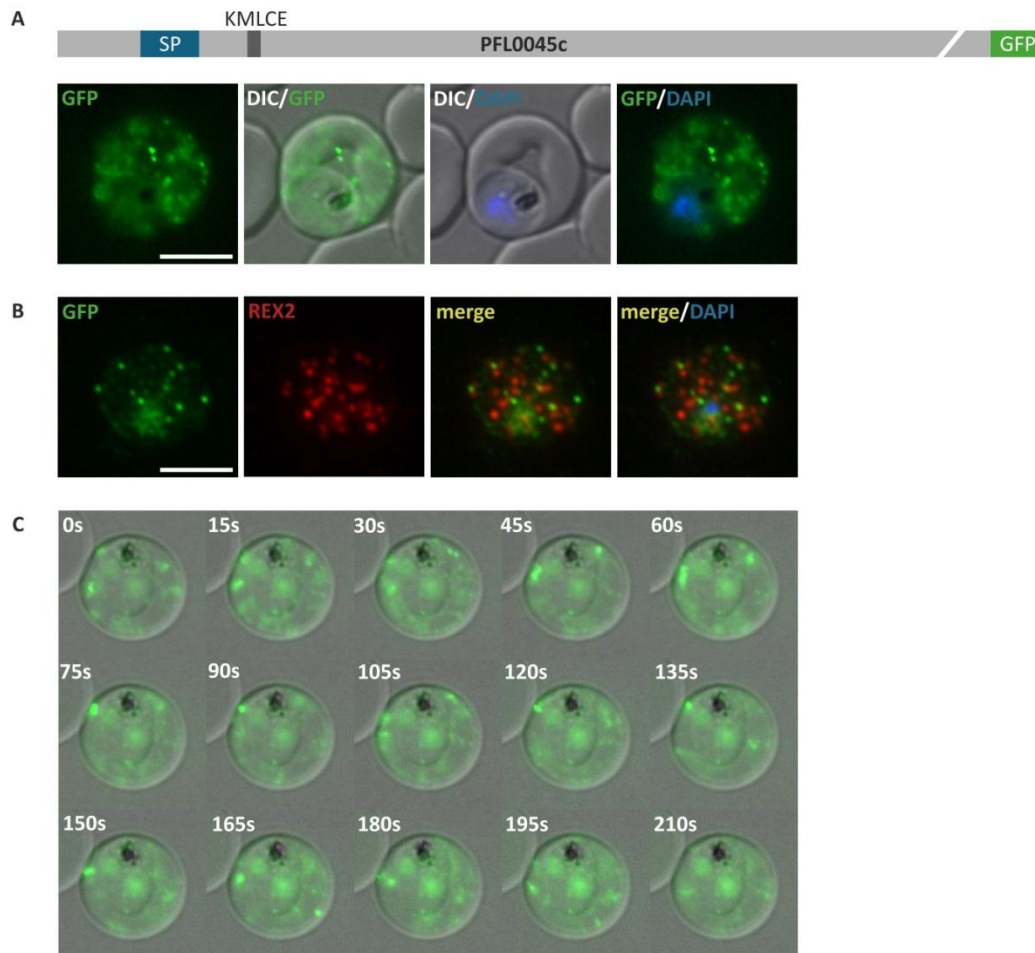


Abbildung 3.23: Lokalisation von PFL0045c-GFP. A) Exemplarische Fluoreszenzaufnahme der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur des Volllängenproteins ist über der Aufnahme dargestellt (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 μ m. B) Immunfluoreszenzanalysen Aceton-fixierter transgener Parasiten. PFL0045c-GFP kolokalisiert nicht mit dem Maurer'schen Spalten-Protein REX2. C) Exemplarische Fluoreszenzaufnahme einer Zeitreihe von PFL0045c-GFP. Gezeigt ist ein Zeitraum von insgesamt 210 s aufgezeichnet ca. alle 15 s.

Von den elf getesteten Kandidaten konnten somit fünf exportierte Proteine ermittelt werden. Eine Charakterisierung der Funktionalität des alternativen PEXEL-Motivs von PFI1780w, PFC0085c und PFL0045c wird in Kapitel 3.3 beschrieben.

3.2.4 Lokalisation der Kandidaten mit einem K.L.D-Motiv

Für die Untersuchung des alternativen PEXEL-Motivs K.L.D wurden insgesamt drei Kandidaten getestet. Bei den Kandidaten handelt es sich um PF08_0015, PF11_0349 und PF14_0105

(Abbildung 3.24 und der Tabelle 3.6). Die Kandidaten PF11_0349 und PF14_0105 weisen zwei Exons auf und besitzen ein klassisches SP. Bei PF08_0015 liegt hingegen eine Ein-Exon-Struktur mit einem N-Terminus nahen SP vor. Bei PF08_0015 sind des Weiteren die Aminosäuren an Position 2 und 4 des alternativen PEXEL-Motivs wie auch bei PF11_0349 neutral (vgl. Abb. 3.24). Bei allen Kandidaten liegt das alternative PEXEL innerhalb der ersten 30 Aminosäuren hinter dem SP.

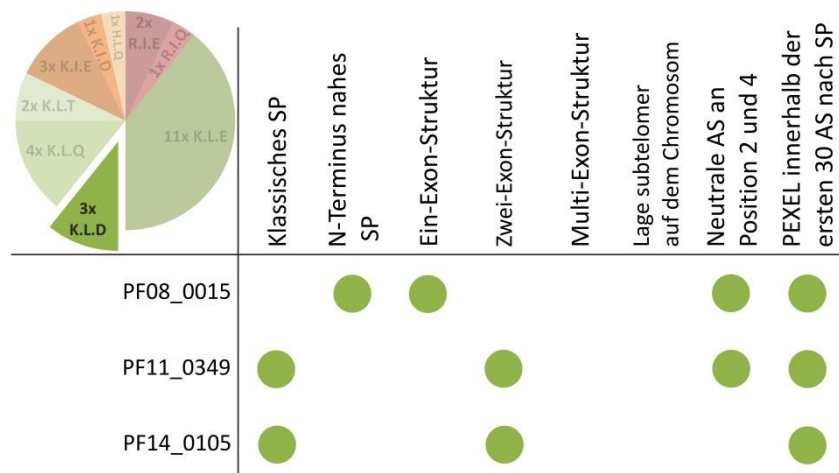


Abbildung 3.24: Übersicht der Kandidaten mit einem K.L.D-Motiv. Dargestellt sind die charakteristischen Merkmale der drei Kandidaten.

Aufgrund der Größe von fast 4000 bp wurde für PF11_0349 eine verkürzte Version mit den ersten 540 bp (Aminosäure 1-180) hergestellt. Weitere wichtige Merkmale der Kandidaten PF08_0015, PF11_0349 und PF14_0105 sind in der Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tabelle 3.6: Ausgewählte Kandidaten mit einem K.L.D-Motiv.

Gen ID (Annotation in PlasmoDB)	kodierende Sequenz [bp]	SP [AS]	TMD	alternatives PEXEL und dessen Position [AS]	Molekulargewicht [kDa]
PF08_0015 (<i>conserved Plasmodium protein, unknown function</i>)	657	5-27	-	KTLTD 38-42	26 (21)*
PF11_0349 (<i>conserved Plasmodium protein, unknown function</i>)	3696	1-20	-	KSLSD 33-37	146 (142)*
PF14_0105 (<i>conserved Plasmodium protein, unknown function</i>)	1005	1-20	-	KDLLD 38-42	40 (35)*

AS: Aminosäure; bp: Basenpaare; SP: Signalpeptid; TMD: Transmembrandomäne; (*): Molekulargewicht bei einer Prozessierung am PEXEL-Motiv

Die Fusionsproteine PF08_0015-GFP, PF11_0349¹⁻¹⁸⁰-GFP und PF14_0105 wurden nicht exportiert. Es konnten unterschiedliche Phänotypen beobachtet werden (vgl. Abb. 3.25): PF08_0015-GFP zeigte eine punktförmige Lokalisation in Kern nähe, ähnlich einer Lokalisation von Golgi-Proteinen

(Elmendorf & Haldar, 1993; Struck et al., 2005). Das Fusionsprotein PF11_0349¹⁻¹⁸⁰-GFP lokalisierte ringförmig um den Parasiten, was für eine Lokalisation in der PV/PVM spricht. PF14_0105-GFP zeigte hingegen eine ER-typisch kreisförmige Lokalisation um den Kern mit punktuellen Ausstülpungen (van Dooren et al., 2005). Die alternativen PEXEL-Motive dieser Proteine vermitteln somit kein Export.

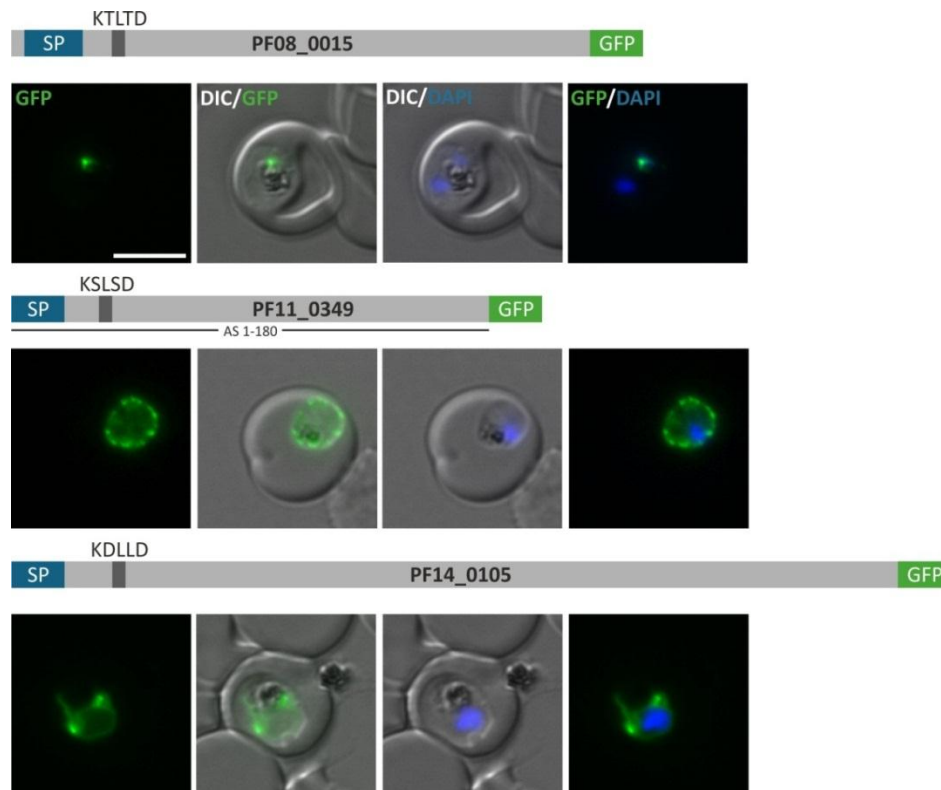


Abbildung 3.25: Lokalisation von PF08_0015-GFP, PF11_0349¹⁻¹⁸⁰-GFP und PF14_0105-GFP. Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur der Vollängenproteine bzw. der verkürzten Version ist über der jeweiligen Aufnahme dargestellt (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längsmaßstab: 5 µm.

3.2.5 Lokalisation der Kandidaten mit einem K.L.Q-Motiv

Insgesamt wurden vier Kandidaten mit einem K.L.Q-Motiv auf ihren Export hin untersucht. Dabei handelte es sich um PF07_0087, PF08_0004, PFE0725c und PFF0335c, wobei PF07_0087 bei der Exportomvorhersage von Sargeant et al. (2006) als Protein mit alternativem PEXEL-Motiv vorhergesagt wurde. Die Kandidaten PF07_0087, PF08_0004 und PFE0275c besitzen ein N-Terminus nahes SP, haben aber alle eine unterschiedliche Exon-Struktur (vgl. Abb. 3.26). Lediglich PF08_0004 hat eine subtelomere Lage auf dem Chromosom, weist aber wie die drei anderen Kandidaten keine neutrale Aminosäure an Position 2 und 4 des alternativen PEXEL-Motivs auf und liegt nicht innerhalb der ersten 30 Aminosäuren hinter dem SP.

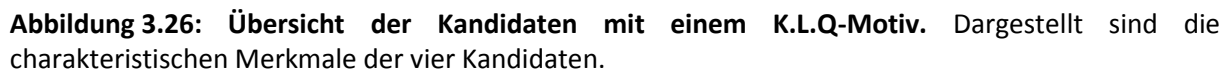


Tabelle 3.7: Ausgewählte Kandidaten mit einem K.L.Q-Motiv.

AS: Aminosäure; bp: Basenpaare; SP: Signalpeptid; TMD: Transmembrandomäne; (*)
Molekulargewicht bei einer Prozessierung am PEXEL-Motiv

79

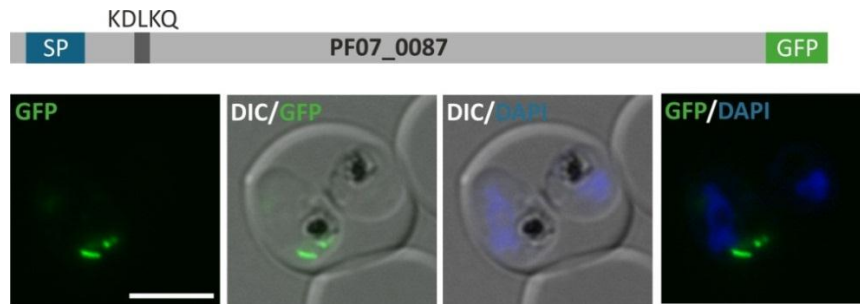


Abbildung 3.27: Lokalisation von PF07_0087-GFP. A) Exemplarische Fluoreszenzaufnahme der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur des Volllängenproteins ist über der Aufnahme dargestellt (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 μ m.

Die Fusionsproteine der transgenen Zelllinien PF08_0004-GFP und PFF0335c-GFP wurden exportiert (vgl. Abb. 3.28 und 3.29). Neben einer PV/PVM-Lokalisation wies das GFP-Fusionsprotein PF08_0004 eine Maurer'sche Spalten-ähnliche Verteilung in der Wirtszelle auf (vgl. Abb. 3.28) (Heiber et al, 2013).

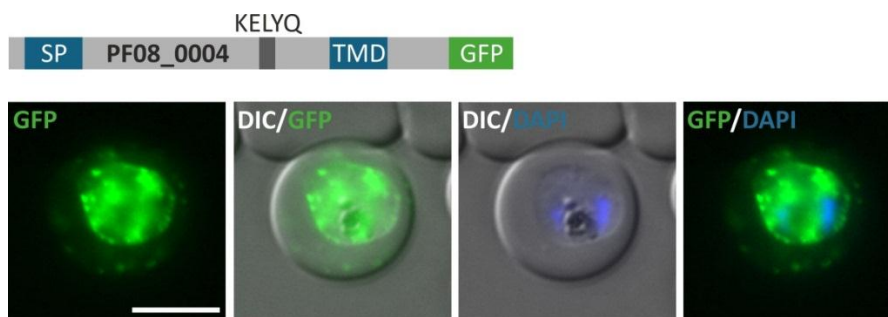
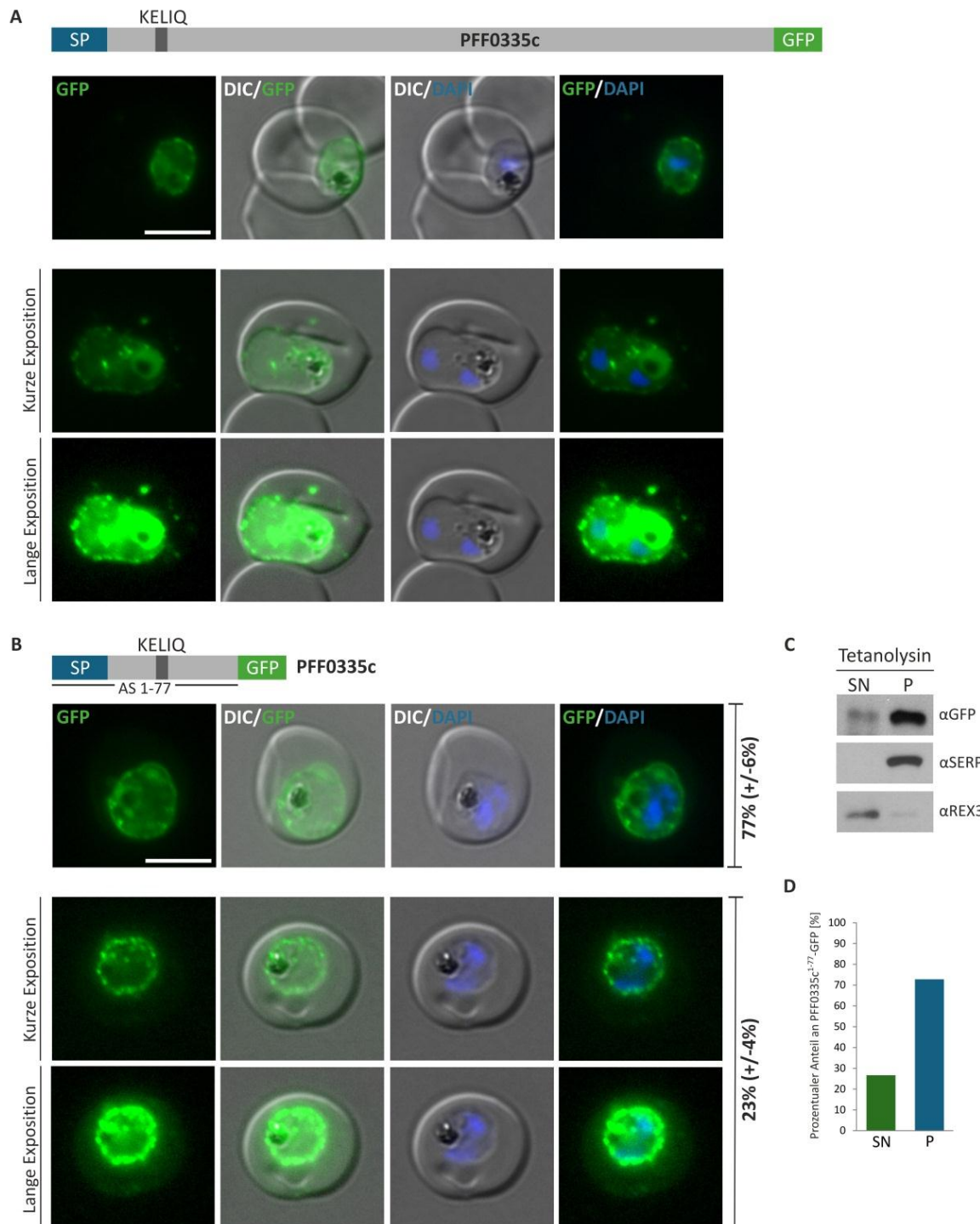


Abbildung 3.28: Lokalisation von PF08_0004-GFP. Exemplarische Fluoreszenzaufnahme der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur des Volllängenproteins ist über der Aufnahme dargestellt (SP/TMD: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 μ m.

Das Fusionsprotein der transgenen Zelllinie PFF0335c-GFP zeigte unterschiedliche Phänotypen. So konnte bei einem Großteil der Zellen festgestellt werden, dass PFF0335c-GFP in der PV/PVM lokalisierte (vgl. Abb. 3.29A). Zusätzlich war bei einigen transgenen Zellen ein Export des Fusionsproteins zu beobachten, wobei PFF0335c-GFP in punktuellen Strukturen in der Wirtszelle vorlag. Diese konnten häufig nur durch eine längere Expositionsdauer gut sichtbar gemacht werden (vgl. Abb. 3.29A, Aufnahme 2 und 3). Aufgrund der geringen Exporteffizienz im Volllängenfusionsprotein wurde von PFF0335c eine verkürzte Version mit den ersten 231 bp (Aminosäure 1-77) generiert. Für PFF0335c¹⁻⁷⁷-GFP zeigte sich folgender Phänotyp (vgl. Abb. 3.29B): In 77% (Standardabweichung \pm 6%) aller Zellen lag eine PV/PVM-Lokalisation vor (vgl. Abb. 3.29B, Aufnahme 1). Daneben konnte bei 23% der transgenen Zellen ein Export von PFF0335c¹⁻⁷⁷-GFP in löslicher Form beobachtet werden, wobei auch hier der Export erst durch eine lange

Expositionsdauer gut sichtbar war (vgl. Abb. 3.29B, Aufnahme 2 und 3). Dass PFF0335c¹⁻⁷⁷-GFP löslich im Wirtszellzytosol vorlag, konnte durch die selektive Lyse mit Tetanolysin bestätigt werden (vgl. Abb. 3.29C). Dabei wurden eine schwache Bande in der Wirtszellfraktion und eine starke Bande in der Parasitenfraktion detektiert. Bei der Bestimmung der Intensität entspricht der Anteil der Bande von PFF0335c¹⁻⁷⁷-GFP in der Wirtszellfraktion 27% und in der Parasitenfraktion 73% (vgl. Abb. 3.29D). Mit Hilfe von SERP- und REX3-spezifischen Antikörpern konnte die korrekte und vollständige Fraktionierung nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.29C).



← **Abbildung 3.29: Lokalisation von PFF0335c-GFP und PFF0335c¹⁻⁷⁷-GFP (vorherige Seite).** A) und B) Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur des Volllängenproteins sowie eine verkürzte Version (Aminosäure (AS) 1-77) ist über der jeweiligen Aufnahme dargestellt (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Für Zellen mit einem exportierten GFP-Fusionsprotein sind sowohl eine kurze als auch eine lange Expositionsdauer gezeigt. Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm. C) Westernblotanalyse der mit Tetanolysin fraktionierten mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Aufgetragen wurde die Wirtszellfraktion (SN; Überstand) und die Parasitenfraktion (P; Pellet). Die korrekte und vollständige Fraktionierung wurde mit Antikörpern gegen die Proteine SERP und REX3 überprüft. D) Bestimmung des prozentualen Anteils an PFF0335c¹⁻⁷⁷-GFP anhand der Bandenintensität mit Hilfe des Programms „ImageJ“.

3.2.6 Lokalisation der Kandidaten mit einem K.L.T -Motiv

Für einige Proteine mit klassischem PEXEL-Motiv ist bekannt, dass auch eine Variabilität an der Position 5 möglich ist (Boddey et al., 2013; Haase et al., 2013). Daher wurden zwei Kandidaten getestet, die an Position 5 des Motivs anstatt der bekannten Aminosäuren Glutaminsäure (E), Asparaginsäure (D) oder Glutamin (Q) die Aminosäure Threonin (T) aufweisen. Die Kandidaten PF11_0055 und PFE0645w besitzen unterschiedliche Merkmale (vgl. Abb. 3.30). Beide Kandidaten haben neutrale Aminosäuren an Position 2 und 4 des alternativen PEXEL-Motivs. PF11_0055 liegt subtelomer auf dem Chromosom, besteht aus zwei Exons und hat ein N-Terminus nahes SP. PFE0645w hingegen weist kein Intron auf und besitzt ein klassisches SP. Beide putativen alternativen PEXEL liegen über 30 Aminosäuren hinter dem SP.

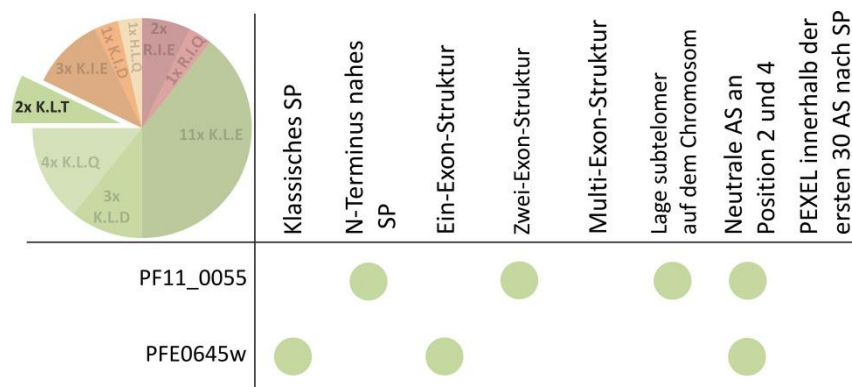


Abbildung 3.30: Übersicht der Kandidaten mit einem K.L.T-Motiv. Dargestellt sind die charakteristischen Merkmale der zwei Kandidaten.

Es konnte für PF11_0055 nur eine verkürzte Version mit den ersten 756 bp der kodierenden Sequenz (Aminosäure 1-252) für die Klonierung verwendet werden, da im C-terminalen Bereich eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *AvrII*, welche sowohl für den Verdau des Vektors pARL1a(-) als auch der PCR-Produkte verwendet wurde, vorlag. Eine Übersicht der Lage des SPs, des alternativen PEXEL-Motivs sowie der Molekulargewichte gibt die Tabelle 3.8.

Tabelle 3.8: Ausgewählte Kandidaten mit einem K.L.T-Motiv.

Gen ID (Annotation in PlasmODB)	kodierende Sequenz [bp]	SP [AS]	TMD	alternatives PEXEL und dessen Position [AS]	Molekulargewicht [kDa]
PF11_0055 (<i>conserved protein, unknown function</i>)	1275	5-27	-	KGILT 83-87	49 (39)*
PFE0645w (<i>conserved Plasmodium protein, unknown function</i>)	810	1-20	-	KPLVT 72-76	31 (23)*

AS: Aminosäure; bp: Basenpaare; SP: Signalpeptid; TMD: Transmembrandomäne; (*) : Molekulargewicht bei einer Prozessierung am PEXEL-Motiv

Die Fusionsproteine der transgenen Zelllinien PF11_0055¹⁻²⁵²-GFP und PFE0645w-GFP waren nicht exportiert (vgl. Abb. 3.31). PF11_0055¹⁻²⁵²-GFP war PV/PVM-typisch ringförmig um den Parasiten lokalisiert. Das GFP-Fusionsprotein PFE0645w wies hingegen eine Lokalisation im ER auf, wobei zusätzliche eine schwache Assoziation mit der PV/PVM vorlag. Somit sind die alternativen PEXEL-Motive von PF11_0055¹⁻²⁵²-GFP und PFE0645w-GFP nicht funktionell.

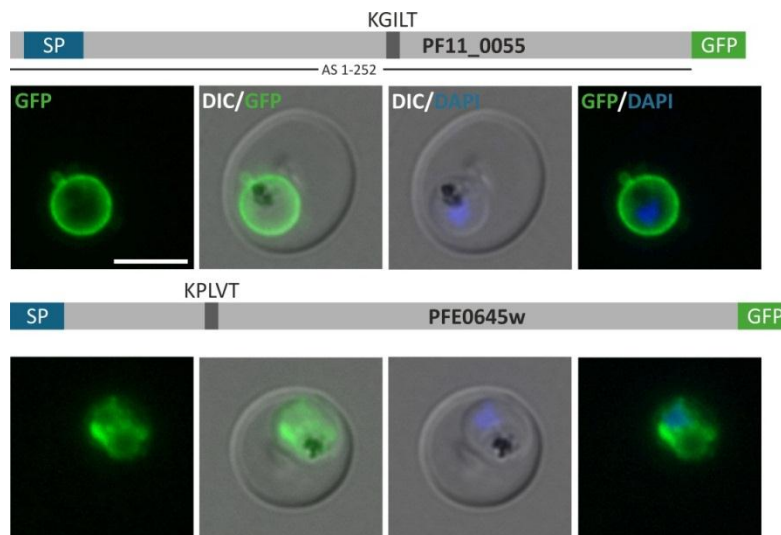


Abbildung 3.31: Lokalisation von PF11_0055¹⁻²⁵²-GFP und PFE0645w-GFP. Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur des Volllängenproteins bzw. der verkürzten Version ist über der jeweiligen Aufnahme dargestellt (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm.

3.2.7 Lokalisation des Kandidaten mit einem H.L.Q-Motiv

Da für die Reporterproteine REX3 und GBP gezeigt werden konnte, dass auch ein H.L.E-Motiv funktionell sein kann (vgl. Kap. 3.1), wurde ein Kandidat mit einem H.L.Q-Motiv ausgewählt und die Lokalisation dieses Kandidaten näher charakterisiert. Bei dem Kandidaten handelt es sich um PFD1205w, welcher ein klassisches SP besitzt (vgl. Abb. 3.32). Des Weiteren besteht dieser aus zwei

Exons und liegt subtelomer auf dem Chromosom. Das alternative PEXEL liegt innerhalb der ersten 30 Aminosäuren hinter dem SP.

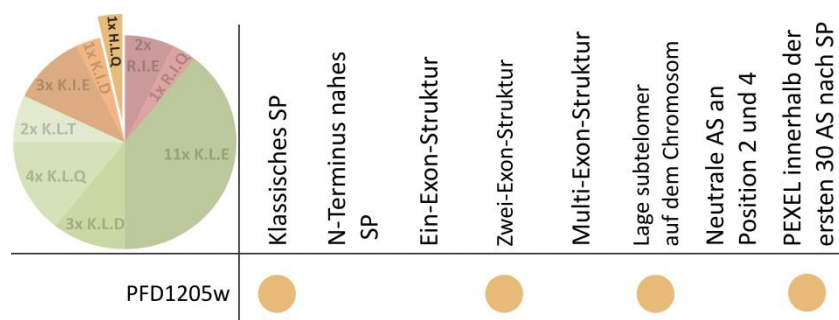


Abbildung 3.32: Übersicht des Kandidaten mit einem H.L.Q-Motiv. Dargestellt sind die charakteristischen Merkmale des Kandidaten.

Weitere Merkmale von PFD1205w sind in der Tabelle 3.9 zusammengefasst.

Tabelle 3.9: Ausgewählte Kandidaten mit einem H.L.Q-Motiv.

Gen ID (Annotation in PlasmoDB)	kodierende Sequenz [bp]	SP [AS]	TMD	alternatives PEXEL und dessen Position [AS]	Molekulargewicht [kDa]
PFD1205w (<i>Plasmodium exported protein (hyp15), unknown function</i>)	693	1-20	2	HELSQ 50-54	27 (21)*

AS: Aminosäure; bp: Basenpaare; SP: Signalpeptid; TMD: Transmembrandomäne; (*): Molekulargewicht bei einer Prozessierung am PEXEL-Motiv

Die transgene Zelllinie zeigte in den meisten Fällen kein Export des Fusionsproteins PFD1205w-GFP in die Wirtszelle, sondern einen ER-typischen Ring um den Kern des Parasiten (vgl. Abb. 3.33A, Aufnahme 1). Zusätzlich lag eine PV/PVM-Lokalisation vor. In seltenen Fällen (ca. 1%) konnte ein Export von PFD1205w-GFP beobachtet werden, wobei das Fusionsprotein punktuell in der Wirtszelle vorlag (vgl. Abb. 3.33A, Aufnahme 2). Eine Maurer'sche Spalten-Lokalisation konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenz und des Maurer'schen Spalten-Markers REX2 jedoch nicht bestätigt werden (vgl. Abb. 3.33B). PFD1205w-GFP konnte lediglich im Parasiten detektiert werden.

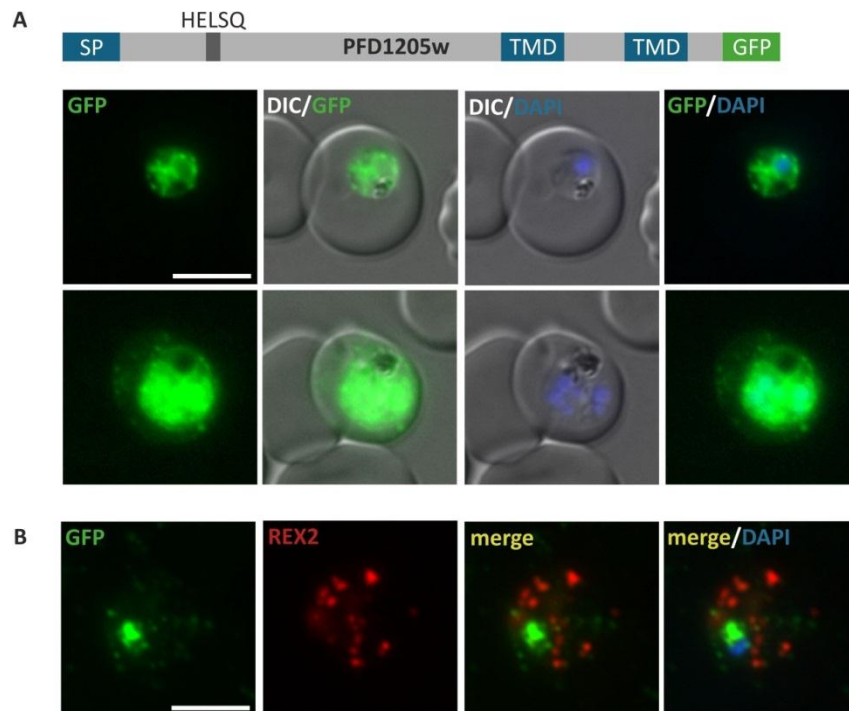


Abbildung 3.33: Lokalisation von PFD1205w-GFP. A) Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur des Volllängenproteins ist über der Aufnahme dargestellt (SP/TMD: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 μ m. B) Immunfluoreszenzanalyse Acetonfixierter transgener Parasiten. PFD1205w-GFP kolokalisiert nicht mit dem Maurer'schen Spaltenprotein REX2. Längenmaßstab: 5 μ m.

Da eine Beeinflussung des Exports von PFD1205w-GFP durch die zwei C-terminal gelegenen Transmembrandomänen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde für PFD1205w eine verkürzte Version mit den ersten 330 bp (Aminosäure 1-110) hergestellt. Das Fusionsprotein der transgenen Zelllinie PFD1205w¹⁻¹¹⁰-GFP wurde wie PFD1205w-GFP in den meisten Zellen nicht exportiert und zeigte eine charakteristische PV/PVM-Lokalisation (vgl. Abb. 3.34A, Aufnahme 1). In wenigen transgenen Zellen konnte ein Export von PFD1205w¹⁻¹¹⁰-GFP beobachtet werden (vgl. Abb. 3.34A, Aufnahme 2), wobei das Fusionsprotein löslich im Zytoplasma des Erythrozyten vorlag. Bei der Überprüfung der Integrität mittels Westernblotanalyse mit GFP-spezifischen Antikörpern wurde neben dem Volllängenfusionsprotein und dem Abbauprodukt GFP eine Doppelbande in der Größe von ca. 34 kDa detektiert (vgl. Abb. F.2 im Anhang F). Dieses Molekulargewicht entspricht dem am alternativen PEXEL-Motiv prozessierten PFD1205w¹⁻¹¹⁰-GFP. Um zu bestätigen, dass PFD1205w¹⁻¹¹⁰-GFP löslich in die Wirtszelle vorliegt, wurde eine selektive Lyse mit Tetanolysin durchgeführt (vgl. Abb. 3.34B). In der Wirtszellfraktion wurde lediglich eine schwache Bande in der Größe der Doppelbande (~ 34 kDa) detektiert (vgl. Abb. 3.34B, grüner Kasten). In der Parasitenfraktion war sowohl das Volllängenfusionsprotein als auch eine der beiden Doppelbanden vorhanden, wobei das detektierte Signal deutlich stärker war als in der Wirtszellfraktion. Bei der Bestimmung der Intensität

der Banden im Westernblot entspricht der Anteil von PFD1205w¹⁻¹¹⁰-GFP in der Wirtszellfraktion 14% (vgl. Abb. 3.34C). Die vollständige und korrekte Fraktionierung konnte mit REX3- und SERP-spezifischen Antikörpern bestätigt werden, wobei SERP ausschließlich im Pellet und REX3 im Überstand vorlag. Anhand der Ergebnisse lässt sich nicht eindeutig schließen, ob PFD1205w ein funktionelles alternatives PEXEL-Motiv besitzt.

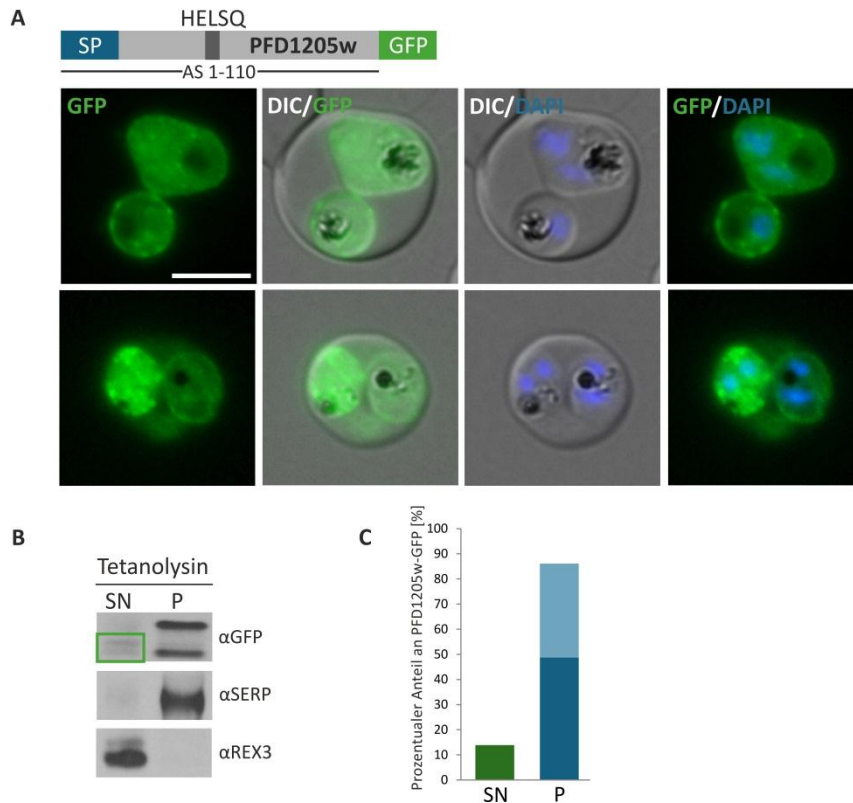


Abbildung 3.34: Lokalisation von PFD1205w¹⁻¹¹⁰-GFP. A) Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur der verkürzten Version (Aminosäure (AS) 1-110) ist über der Aufnahme dargestellt (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm. B) Westernblotanalyse der mit Tetanolysin fraktionierten mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Aufgetragen wurde die Wirtszellfraktion (SN; Überstand) und die Parasitenfraktion (P; Pellet). Die korrekte und vollständige Fraktionierung wurde mit Antikörpern gegen die Proteine SERP und REX3 überprüft. C) Bestimmung des prozentualen Anteils an PFD1205w¹⁻¹¹⁰-GFP anhand der Bandenintensität mit Hilfe des Programms „ImageJ“. Dunkelblau: prozentualer Anteil in der Parasitenfraktion der oberen Bande im Westernblot; Blau: prozentualer Anteil in der Parasitenfraktion der unteren Bande im Westernblot; grün: prozentualer Anteil in der Wirtszellfraktion der beiden Banden im Westernblot.

3.2.8 Lokalisation der Kandidaten mit einem K.I.E/D-Motiv

Insgesamt wurden drei Kandidaten mit einem K.I.E- und ein Kandidat mit einem K.I.D-Motiv getestet (vgl. Abb. 3.35). Bei den Kandidaten handelt es sich um PF13_0197, PF13_0125, PF14_0275 und PFI1530c (vgl. Abb. 3.35 und Tabelle 3.10). PF14_0275 wurde von Sargeant et al. (2006) hervorgesagt, jedoch mit einem anderen alternativen PEXEL-Motiv (RLLCT). Alle Kandidaten mit einem K.I.E-Motiv bestehen aus einem Exon, wobei PF13_0125 und PF13_0197 ein klassisches SP aufweisen. Keiner der

Kandidaten mit einem K.I.E-Motiv liegt subtelomer auf dem Chromosom und besitzt eine neutrale Aminosäure an Position 2 und 4 des alternativen PEXEL-Motivs. PFI1530c weist hingegen klassische PEXEL-Eigenschaften auf. Es besitzt neutrale Aminosäuren an Position 2 und 4 des Motivs und das alternative PEXEL-Motiv liegt innerhalb der ersten 30 Aminosäuren hinter dem SP.

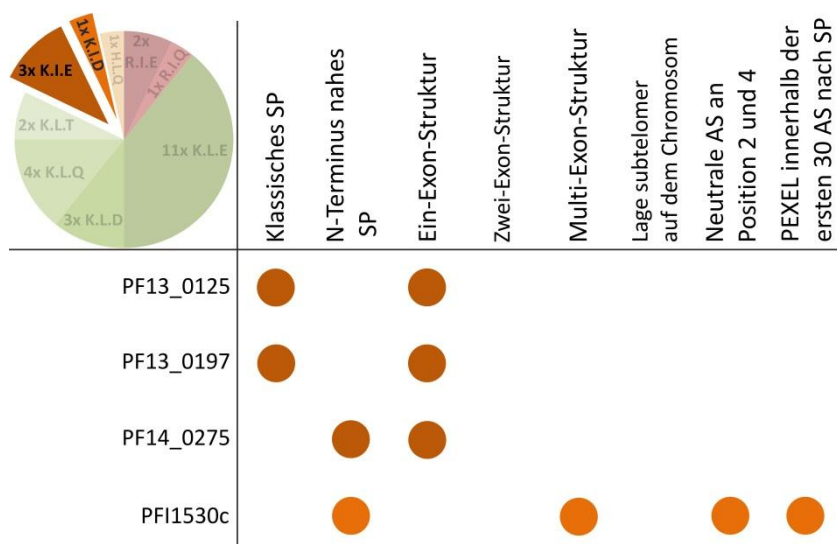


Abbildung 3.35: Übersicht der Kandidaten mit einem K.I.E/D-Motiv. Dargestellt sind die charakteristischen Merkmale der vier Kandidaten.

Eine Übersicht über die Lage des alternativen PEXEL-Motivs im Protein und weitere Merkmale gibt die Tabelle 3.10.

Tabelle 3.10: Ausgewählte Kandidaten mit einem K.I.E- oder K.I.D-Motiv.

Gen ID (Annotation in PlasmoDB)	kodierende Sequenz [bp]	SP [AS]	TMD	alternatives PEXEL und dessen Position [AS]	Molekulargewicht [kDa]
PF13_0125 (<i>conserved Plasmodium protein, unknown function</i>)	879	1-20	-	KSIRE 73-77	33 (24)*
PF13_0197 (<i>merozoite surface protein 7 (MSP7)</i>)	1056	1-28	-	KKIEE 70-74	41 (33)*
PF14_0275 (<i>conserved Plasmodium protein, unknown function (GEXP03)</i>)	660	4-26	1	KEIYE 77-81	26 (17)*
PFI1530c (<i>conserved Plasmodium protein, unknown function</i>)	660	12-31	-	KQILD 53-57	27 (20)*

AS: Aminosäure; bp: Basenpaare; SP: Signalpeptid; TMD: Transmembrandomäne; (*): Molekulargewicht bei einer Prozessierung am PEXEL-Motiv

Die Fusionsproteine der Zelllinien PF13_0125-GFP, PF14_0275-GFP und PFI1530c-GFP wurden nicht exportiert (vgl. Abb. 3.36). Alle drei Fusionsproteine waren ringförmig um den Kern des Parasiten

verteilt, was typisch für eine Lokalisation im ER ist. Zusätzlich war PF13_0125-GFP in der Nahrungsvakuole lokalisiert. PF14_0275-GFP wies weiterhin eine punktförmige Lokalisation in Kernnähe auf, ähnlich zu einer Lokalisation von Golgi-Proteinen (Elmendorf & Haldar, 1993; Struck et al., 2005).

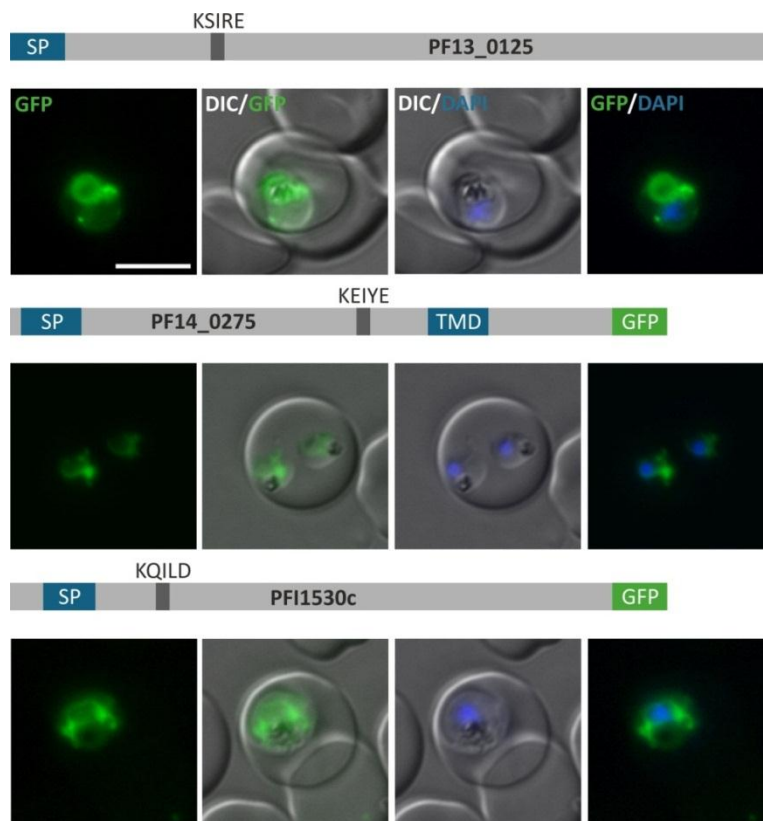
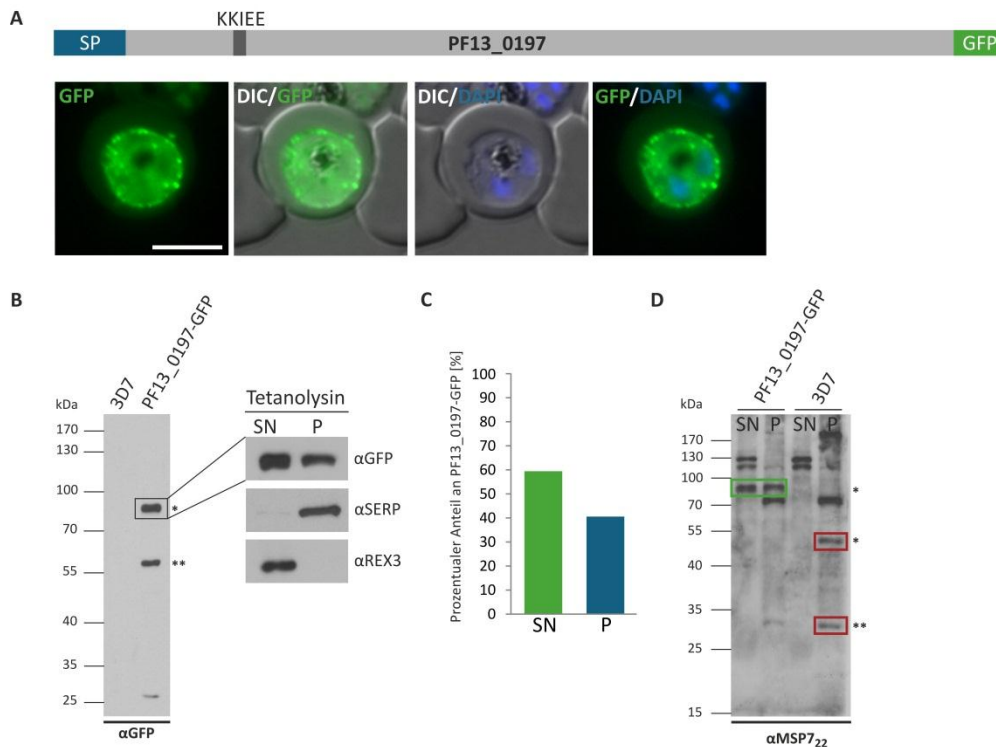


Abbildung 3.36: Lokalisation von PF13_0125-GFP, PF14_0275-GFP und PFI1530c-GFP. Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur der Vollängenproteine ist über der jeweiligen Aufnahme dargestellt (SP/TMD: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm.

Bei der Auswahl der Kandidaten wurde auch PF13_0197 mit einbezogen, obwohl es sich bei diesem Protein um MSP7 (engl. *Merozoite Surface Protein 7*) handelt. MSP7 lokalisiert auf der Oberfläche von Merozoiten und ist wie andere MSPs an der ersten Interaktion der Merozoiten mit dem Erythrozyten beteiligt (Boyle et al., 2013; Boyle et al., 2014). Dabei interagiert das Precursor-Protein PF13_0197 mit MSP1 (engl. *Merozoite Surface Protein 1*) und wird anschließend zwei Mal proteolytisch gespalten (Pachebat et al., 2007). Bei der ersten Prozessierung entsteht ein 33 kDa Fragment (MSP7₃₃) und nach der zweiten Spaltung ein 22 kDa Fragment (MSP7₂₂). Die zweite Spaltung findet in der Endphase des Schizontenstadiums statt (Pachebat et al., 2007). Obwohl eine Beteiligung von PF13_0197 während der Invasion der Merozoiten in die Blutzellen feststeht, gibt es in einer Studie von Kadakoppala und Holder (2010) Hinweise, dass PF13_0197 ebenfalls in die Wirtszelle transportiert wird. Da PF13_0197 ein alternatives PEXEL-Motiv besitzt, sollte daher der

Export dieses Proteins näher charakterisiert werden. Das GFP-Fusionsprotein PF13_0197 zeigte neben einer PV/PVM-Lokalisation einen Export in die Wirtszelle in löslicher Form (vgl. Abb. 3.37A). Die Westernblotanalyse mit GFP-spezifischen Antikörpern detektierte das Volllängenfusionsprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa (vgl. Abb. 3.37B). Dieses stimmt mit dem in vorherigen Publikationen ermittelten Molekulargewicht für PF13_0197 überein, obwohl für PF13_0197 ein geringeres Molekulargewicht vorhergesagt wird (Pachebat et al., 2007; Kadekoppala & Holder, 2010). Neben dem Volllängenfusionsprotein und dem Abbauprodukt GFP konnte für PF13_0197-GFP eine weitere Bande nachgewiesen werden, welche dem Molekulargewicht von MSP7₃₃ entspricht. Mittels der Tetanolysinlyse konnte ein Export des Volllängenfusionsproteins PF13_0197-GFP bestätigt werden (vgl. Abb. 3.37B). PF13_0197-GFP konnte sowohl in der Wirtszellfraktion als auch in der Parasitenfraktion nachgewiesen werden, wobei bei der Bestimmung der Intensität 60% von PF13_0197-GFP in der Wirtszellfraktion und 40% in der Parasitenfraktion nachweisbar waren (vgl. Abb. 3.37C). Ein Nachweis der korrekten und vollständigen Fraktionierung war mit Hilfe der spezifischen Antikörper gegen SERP und REX3 möglich (vgl. Abb. 3.37B). Zur Überprüfung, ob es sich bei dem Export von PF13_0197 um ein Artefakt der transgenen Zelllinie handelt, wurde eine Westernblotanalyse mit MSP7₂₂-spezifischen Antikörpern (Pachebat et al., 2007) durchgeführt. Dabei wurden die Wirtszell- und Parasitenfraktion nach Lyse mit Tetanolysin sowohl von der transgenen Zelllinie PF13_0197-GFP als auch von dem *P. falciparum*-Stamm 3D7 untersucht (vgl. Abb. 3.37D). Das Volllängenprotein PF13_0197 war lediglich in der transgenen Zelllinie PF13_0197-GFP in der Wirtszellfraktion nachweisbar (vgl. Abb. 3.37D, grüner Kasten). In dem Wildtypstamm 3D7 konnte das Volllängenprotein zusätzlich zum prozessierten MSP₃₃ nur in der Parasitenfraktion detektiert werden (vgl. Abb. 3.37D, roter Kasten). Somit ist davon auszugehen, dass es sich bei dem Export des Fusionsproteins PF13_0197-GFP bei der Zelllinie um ein Artefakt handelt und es kann ausgeschlossen werden, dass das alternative PEXEL von PF13_0197 funktionell ist.

→Abbildung 3.37: Lokalisation von PF13_0197-GFP (folgende Seite). A) Exemplarische Fluoreszenzaufnahme der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Die schematische Struktur des Volllängenproteins ist über der Aufnahme dargestellt (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm. B) Überprüfung der Integrität von PF13_0197-GFP mittels Westernblotanalyse. Als Kontrolle dienten Erythrozyten infiziert mit dem *P. falciparum*-Stamm 3D7. Der Westernblot der mit Tetanolysin fraktionierten mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten ist rechts daneben dargestellt. Aufgetragen wurde die Wirtszellfraktion (SN; Überstand) und die Parasitenfraktion (P; Pellet). Die korrekte und vollständige Fraktionierung wurde mit Antikörpern gegen die Proteine SERP und REX3 überprüft. C) Bestimmung des prozentualen Anteils an PF13_0197-GFP anhand der Bandenintensität mit Hilfe des Programms „ImageJ“. D) Westernblotanalyse der mit Tetanolysin fraktionierten mit transgenen Parasiten infizierten und uninfizierten Erythrozyten.



3.3 Überprüfung der Funktionalität des alternativen PEXEL-Motivs von PFC0085c, PFI1780w und PFL0045c

Bei der Untersuchung endogener *P. falciparum*-Proteine mit alternativem PEXEL-Motiv konnten neun exportierte Proteine identifiziert werden (PFA0610c, PFA0135w, PFC0085c, PFI1780w, PFL0040c, PFL0045c, PFL0070c, PF08_0004 und PFF0335c). PFA0610c, PFC0085c, PFI1780w und PFL0045c wurden effizient exportiert, wohingegen PFA0135w, PFL0040c, PFL0070c, PF08_0004 und PFF0335c nur schwach exportiert wurden und zusätzlich mit der PV/PVM assoziierten (vgl. Kap. 3.2). Zwei der Proteine mit alternativem PEXEL-Motiv assoziierten mit den Maurer'schen Spalten, ein Protein mit einer J/K-Dot-ähnlichen Struktur, zwei Proteine mit der Erythrozytenmembran und drei Proteine lagen löslich in der Wirtszelle vor (vgl. Abb. 4.2). Um eine Aussage über die Funktionalität der alternativen PEXEL treffen zu können, wurden die Proteine PFC0085c, PFL0045c und PFI1780w näher charakterisiert. Dazu wurde das jeweilige alternative PEXEL-Motiv an Position 1 mutiert. Die Aminosäure Lysin wurde durch Alanin ausgetauscht. Da bei GBP gezeigt werden konnte, dass trotz des Austauschs durch Alanin ein Export des Proteins stattfindet, wurde die Position 1 ebenfalls durch die saure Aminosäure Glutaminsäure ersetzt. Ein gerichteter Nukleotidaustausch im alternativen PEXEL-Motiv wurde mit Hilfe der Overlap-Extension-PCR (OE-PCR) erzielt, wobei für PFC0085c und PFI1780w die kodierende Sequenz als N-terminales Teilfragment amplifiziert wurde. Die Amplifikate wurden in den Vektor pARL1a(-) kloniert und nach Transfektion episomal im *P. falciparum*-Stamm 3D7 exprimiert. Der Export der Reporterproteine wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie, der selektiven Lyse mit Tetanolysin und anschließenden Westernblot (Ausnahme PFL0045c) bestimmt

(vgl. Kap. 2.4.8). Des Weiteren wurde der N-Terminus der Wildtypreporterproteine PFC0085c, PFI1780w und PFL0045c durch massenspektrometrische Analysen näher charakterisiert (vgl. Kap. 2.4.10). Eine Übersicht der erwarteten Molekulargewichte der unterschiedlichen Reporterproteine PFC0085c, PFI1780w und PFL0045c gibt die Tabelle 3.11.

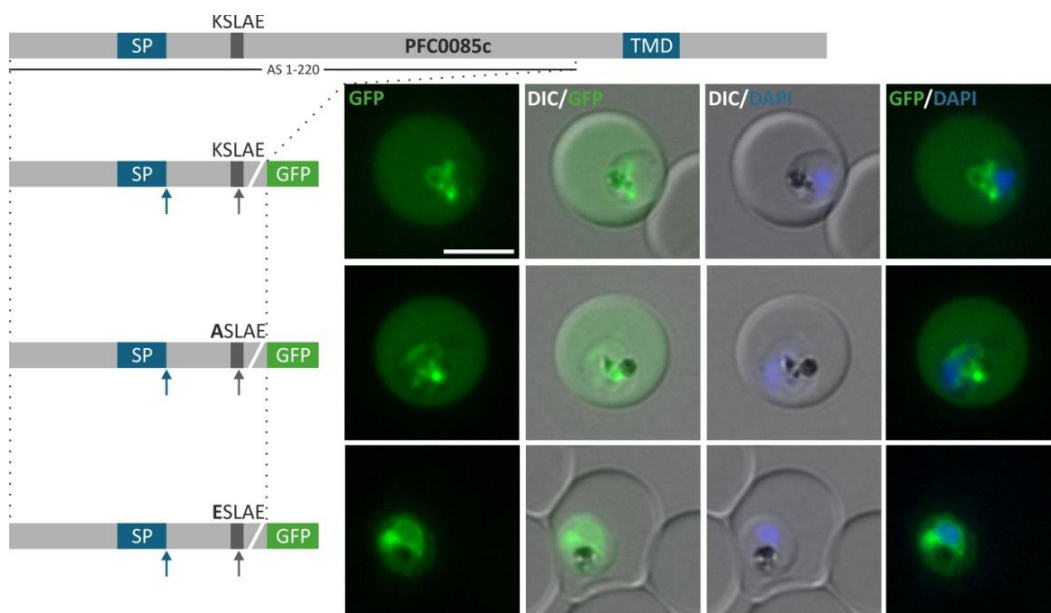
Tabelle 3.11: Übersicht der Molekulargewichte der unterschiedlichen GFP-Fusionsproteine von PFC0085c, PFI1780w und PFL0045c.

Zelllinie	Volllängenprotein [kDa]	Prozessierung an der SPase-Schnittstelle [kDa]	Prozessierung am alternativen PEXEL [kDa]	GFP allein [kDa]
PFC0085c	53,3	46,7	43,1	26,7
PFI1780w	37,6	33,3	30,7	26,7
PFL0045c	73,5	67,3	64,8	26,7

Spase: Signalpeptidase

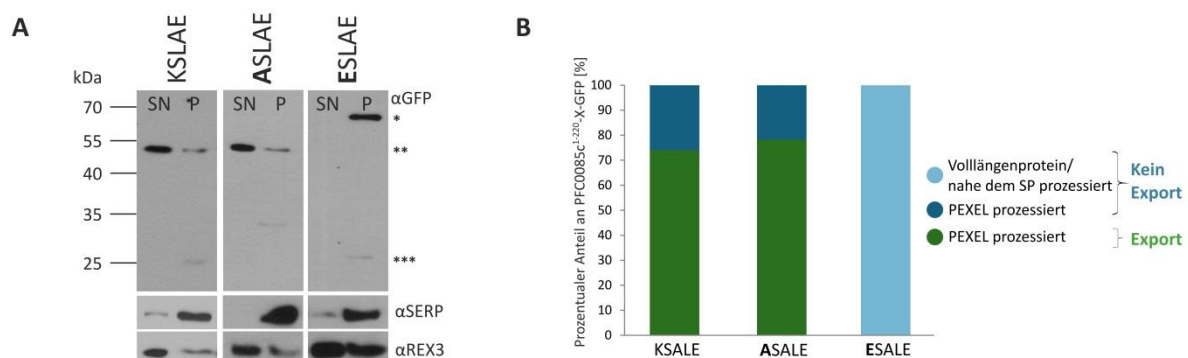
3.3.1 Überprüfung der Funktionalität des alternativen PEXEL-Motivs von PFC0085c

Insgesamt wurden drei weitere unterschiedliche Zelllinien für PFC0085c etabliert, welche jeweils die ersten 220 Aminosäuren des N-terminalen Bereichs des Proteins exprimierten: PFC0085c¹⁻²²⁰-KSLAE-GFP, PFC0085c¹⁻²²⁰-ASLAE-GFP und PFC0085c¹⁻²²⁰-ESLAE-GFP. Die mit Fluoreszenzmikroskopie untersuchten Zelllinien wiesen unterschiedliche Phänotypen auf (vgl. Abb. 3.38). Die Fusionsproteine der Zelllinien PFC0085c¹⁻²²⁰-KSLAE-GFP und PFC0085c¹⁻²²⁰-ASLAE-GFP wurden in die Wirtszelle exportiert, wobei beide löslich im Zytoplasma der Wirtszelle vorlagen. Bei PFC0085c¹⁻²²⁰-ESLAE-GFP hingegen war der Export blockiert und das Fusionsprotein lokalisierte ringförmig um den Kern des Parasiten, was typisch für eine Lokalisation im ER ist (vgl. Abb. 3.38, Aufnahme 3).



←Abbildung 3.38: Lokalisation von PFC0085c¹⁻²²⁰-X-GFP (vorherige Seite). Die Struktur des Volllängenproteins PFC0085c ist über den Aufnahmen dargestellt. Die schematische Struktur der als GFP-Fusionsprotein exprimierten verkürzten Versionen (Aminosäure (AS) 1-220) sind links von den exemplarischen Fluoreszenzaufnahmen der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten abgebildet (SP/TMD: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Putative Schnittstellen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet (Signalpeptidaseschnittstelle: blau; Plasmepsin V-Schnittstelle: dunkelgrau). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm.

Die Westernblotanalyse der selektiven Lyse mit Tetanolysin der unterschiedlichen Reporterproteine von PFC0085c ist in Abbildung 3.39 dargestellt. Die Fusionsproteine PFC0085c¹⁻²²⁰-KSLAE-GFP und PFC0085c¹⁻²²⁰-ASLAE-GFP konnten sowohl in der Wirtszell- als auch in der Parasitenfraktion nachgewiesen werden, wobei der Anteil in der Wirtszellfraktion deutlich höher war (vgl. Abb. 3.39A). Bei der Bestimmung der Intensität entspricht dies einem Anteil von 74% bzw. 78% für PFC0085c¹⁻²²⁰-KSLAE-GFP und PFC0085c¹⁻²²⁰-ASLAE-GFP an exportiertem Fusionsprotein (vgl. Abb. 3.39B). Bei der Überprüfung auf die Korrektheit der selektiven Lyse mittels Antikörper gegen die Proteine SERP und REX3 konnte festgestellt werden, dass die Fraktionierung nicht vollständig war. Somit wird der Anteil an exportiertem PFC0085c¹⁻²²⁰-KSLAE und PFC0085c¹⁻²²⁰-ASLAE-GFP leicht unterschätzt. PFC0085c¹⁻²²⁰-ESLAE-GFP wurde lediglich in der Parasitenfraktion detektiert (vgl. Abb. 3.39A). Dies bestätigt eine Blockierung des Exports in dieser Zelllinie. Die detektierten Banden der Fusionsproteine PFC0085c¹⁻²²⁰-KSLAE-GFP und PFC0085c¹⁻²²⁰-ASLAE-GFP wiesen ein deutlich niedrigeres (ca. 10 kDa) Molekulargewicht auf als die nachgewiesene Bande für PFC0085c¹⁻²²⁰-ESLAE-GFP. Somit handelt es sich bei der Bande für PFC0085c¹⁻²²⁰-KSLAE-GFP und PFC0085c¹⁻²²⁰-ASLAE-GFP vermutlich um am PEXEL prozessiertes Fusionsprotein, wohingegen es sich bei der detektierten Bande für PFC0085c¹⁻²²⁰-ESLAE-GFP wahrscheinlich um das Volllängenfusionsprotein oder am/nahe dem SP geschnittenes Fusionsprotein handelt. Es muss darauf hingewiesen werden, dass die tatsächlichen Molekulargewichte nicht den erwarteten Molekulargewichten (vgl. Tab. 3.11) entsprechen (vgl. Kap. 3.2), sondern deutlich größer sind.



←**Abbildung 3.39: Quantifizierung des Exports von PFC0085c¹⁻²²⁰-X-GFP (vorherige Seite).** A) Westernblotanalyse der mit Tetanolysin fraktionierten mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Aufgetragen wurde die Wirtszellfraktion (SN; Überstand) und die Parasitenfraktion (P; Pellet). Die korrekte und vollständige Fraktionierung wurde mit Antikörpern gegen die Proteine SERP und REX3 überprüft. Anhand des Bandenmusters konnte vermutlich Volllängenprotein bzw. am/nahe dem SP (*) und am PEXEL prozessiertes Fusionsprotein (**) sowie GFP allein (***) identifiziert werden. B) Bestimmung des prozentualen Anteils an PFC0085c¹⁻²²⁰-X-GFP anhand der Bandenintensität mit Hilfe des Programms „ImageJ“. Die Bande, welche GFP allein repräsentiert, wurde in die Auswertung nicht mit einbezogen.

Für die massenspektrometrische Analyse wurde das GFP-Fusionsprotein PFC0085c¹⁻²²⁰-KSALE-GFP über GFP-Beads aufgereinigt. Bei der Überprüfung der Aufreinigung mittels Westernblotanalyse mit GFP-spezifischen Antikörpern war nach Lyse mit Saponin das lösliche Fusionsprotein im Überstand vorhanden (vgl. Abb. 3.40A). Nach der Elution von den GFP-Beads lag dieses angereichert vor. Insgesamt konnten von PFC0085c¹⁻²²⁰-KSLAE-GFP bei der massenspektrometrischen Analyse 26 Peptide nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.40B). Eine Liste aller identifizierten Peptide befindet sich im Anhang D (vgl. Tab. D.1). Acht von diesen Peptiden lagen in PFC0085c, wobei diese Peptide teilweise überlappten (vgl. Abb. 3.40B und 3.40C). Die restlichen 18 Peptide kamen im GFP-Tag vor (vgl. Abb. 3.40B und 3.40C). Die in PFC0085c nachgewiesenen Peptide umfassen die Aminosäuren 126 bis 220 und liegen alle hinter dem alternativen PEXEL. Dabei handelt es sich bei allen um tryptische Peptide. Durch die massenspektrometrische Analyse konnte somit keine Prozessierung am N-Terminus von PFC0085c festgestellt werden. Da aber alle detektierten Peptide hinter dem alternativen PEXEL-Motiv liegen, kann eine Prozessierung zumindest an diesem nicht ausgeschlossen werden.

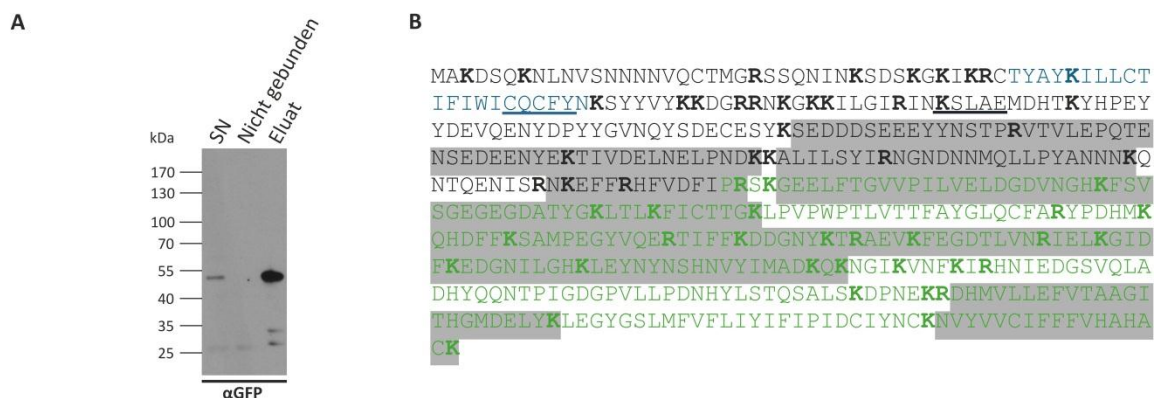


Abbildung 3.40: Massenspektrometrische Analyse von PFC0085c¹⁻²²⁰-KSLAE-GFP. A) Westernblotanalyse der Aufreinigung des Fusionsproteins über GFP-Beads. Dargestellt sind der Überstand (SN) nach Lyse mit Saponin, nicht an die GFP-Beads gebundenes Fusionsprotein sowie das Eluat des Fusionsproteins nach Inkubation auf den GFP-Beads. B) Sequenz von PFC0085c¹⁻²²⁰-KSLAE-GFP (PFC0085c: schwarz; SP: blau; GFP-Tag: grün). Durch die Massenspektrometrie identifizierte Peptide sind grau hinterlegt. Trypsinschnittstellen sind fett dargestellt. Die Signalpeptidaschnittstelle sowie das alternative PEXEL-Motiv sind unterstrichen.

3.3.2 Überprüfung der Funktionalität des alternativen PEXEL-Motivs von PFI1780w

Zur Bestimmung der Funktionalität des alternativen PEXELMotivs, wurden drei unterschiedliche Zelllinien für PFI1780w etabliert, die jeweils die ersten 90 Aminosäuren des N-terminalen Bereichs exprimierten: PFI1780w¹⁻⁹⁰-KSLAE-GFP, PFI1780w¹⁻⁹⁰-**AS**LAE-GFP und PFI1780w¹⁻⁹⁰-**ES**LAE-GFP. Mittels der Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass sowohl PFI1780w¹⁻⁹⁰-KSLAE-GFP als auch PFI1780w¹⁻⁹⁰-**AS**LAE-GFP effizient in die Wirtszelle exportiert wurden (vgl. Abb. 3.41, Aufnahme 1 und 2). Im Gegensatz dazu war der Export beim Fusionsprotein PFI1780w¹⁻⁹⁰-**ES**LAE-GFP in 71% (Standardabweichung \pm 4%) der Zellen deutlich reduziert und in 29% der Zellen vollkommen blockiert (vgl. Abb. 3.41, Aufnahme 3 und 4). Bei allen drei Zelllinien lag das Fusionsprotein löslich im Zytoplasma der Wirtszelle vor.

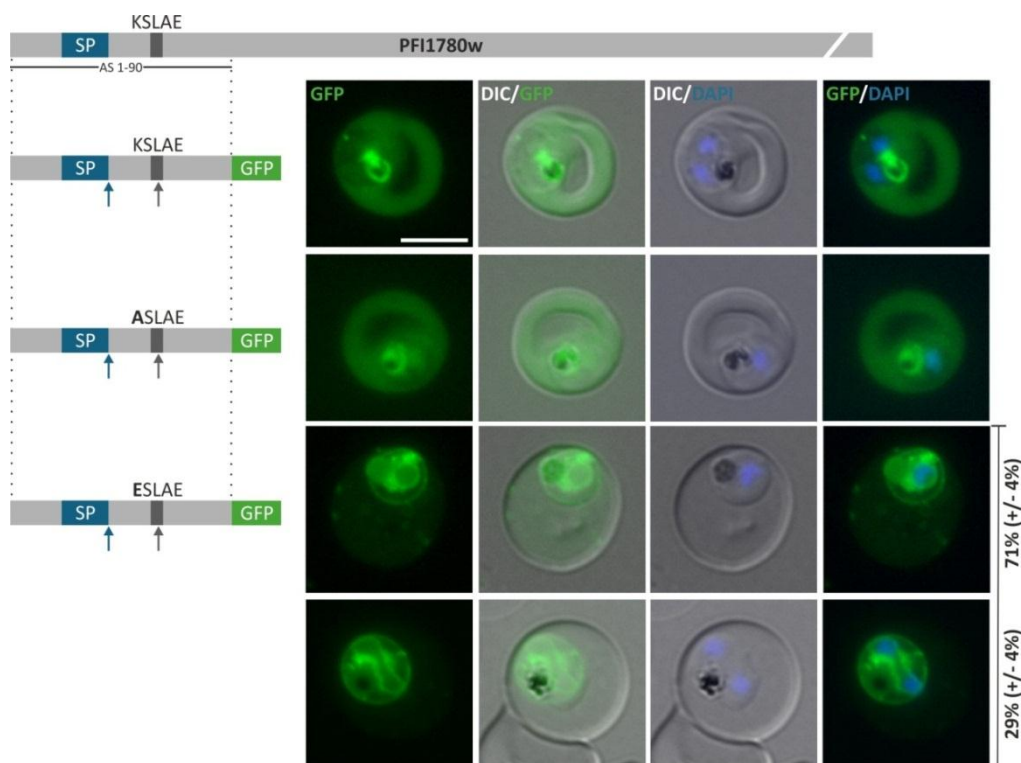


Abbildung 3.41: Lokalisation von PFI1780w¹⁻⁹⁰-X-GFP. Die Struktur des Volllängenproteins PFI1780w ist über den Aufnahmen dargestellt. Die schematische Struktur der als GFP-Fusionsprotein exprimierten verkürzten Versionen (Aminosäure (AS) 1-90) sind links von den exemplarischen Fluoreszenzaufnahmen der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten abgebildet (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Putative Schnittstellen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet (Signalpeptidaseschnittstelle: blau; Plasmepsin V-Schnittstelle: dunkelgrau). Für PFI1780w¹⁻⁹⁰-ESLAE-GFP sind zwei repräsentative Aufnahmen dargestellt. Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm.

In Abbildung 3.42A ist die Westernblotanalyse der selektiven Lyse mit Tetanolsin der Zelllinien PFI1780w¹⁻⁹⁰-KSLAE-GFP, PFI1780w¹⁻⁹⁰ASLAE-GFP und PFI1780w¹⁻⁹⁰-ESLAE-GFP dargestellt. Das Fusionsprotein PFI1780w¹⁻⁹⁰-KSLAE-GFP wurde lediglich in der Wirtszellfraktion detektiert (vgl. Abb. 3.42A), was einem exportiertem Anteil von 100% entspricht (vgl. Abb. 3.42B). Mit Hilfe von

Antikörpern gegen SERP und REX3 konnte für PFI1780w¹⁻⁹⁰-KSLAE-GFP eine korrekte und vollständige Lyse bestätigt werden. Bei dem Fusionsprotein PFI1780w¹⁻⁹⁰-ASLAE-GFP wurde sowohl in der Wirtszell- als auch in der Parasitenfraktion eine Bande detektiert, die ein niedrigeres Molekulargewicht aufwies als die für PFI1780w¹⁻⁹⁰-KSLAE-GFP nachgewiesene Bande. Die Intensität der Bande entspricht einem Anteil von 56% an exportiertem Fusionsprotein (vgl. Abb. 3.42B). Da für PFI1780w¹⁻⁹⁰-ASLAE-GFP zwar eine korrekte (vgl. SERP), aber keine vollständige (vgl. REX3) Lyse vorlag, wird der Anteil an exportiertem Protein vermutlich um 50% unterschätzt (vgl. Abb. 3.42C). Für das GFP-Fusionsprotein PFI1780w¹⁻⁹⁰-ESLAE konnte in der Wirtszell- und in der Parasitenfraktion jeweils eine Bande detektiert werden, welche sich im Molekulargewicht deutlich unterscheiden (vgl. Abb. 3.42A), wobei die detektierte Bande in der Wirtszellfraktion das gleiche Molekulargewicht aufweist wie die nachgewiesene Bande für PFI1780w¹⁻⁹⁰-KSLAE-GFP. Der Anteil an exportiertem PFI1780w¹⁻⁹⁰-ESLAE-GFP lag bei ca. 64% (vgl. Abb. 3.42B). Eine korrekte und vollständige Fraktionierung konnte mit Hilfe von SERP und REX3 bestätigt werden. Anhand des Bandenmusters und des Molekulargewichts von ca. 32 kDa (erwartetes Molekulargewicht vgl. Tab. 3.11) handelt es sich bei den in der Wirtszellfraktion vorhandenen Banden bei PFI1780w¹⁻⁹⁰-KSLAE-GFP und PFI1780w¹⁻⁹⁰-ESLAE-GFP vermutlich um am alternativen PEXEL prozessiertes Fusionsprotein. In der Parasitenfraktion von PFI1780w¹⁻⁹⁰-KSLAE-GFP wurde wahrscheinlich das Volllängenfusionsprotein oder am/nahe dem SP geschnittenes Fusionsprotein nachgewiesen. Das Fusionsprotein PFI1780w¹⁻⁹⁰-ASLAE-GFP wurde wahrscheinlich C-terminal hinter dem alternativen PEXEL an einer unbekannten Schnittstelle prozessiert.

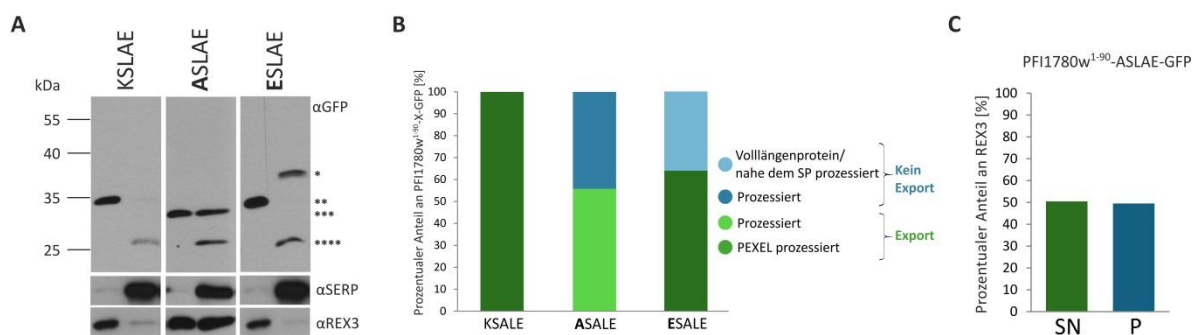
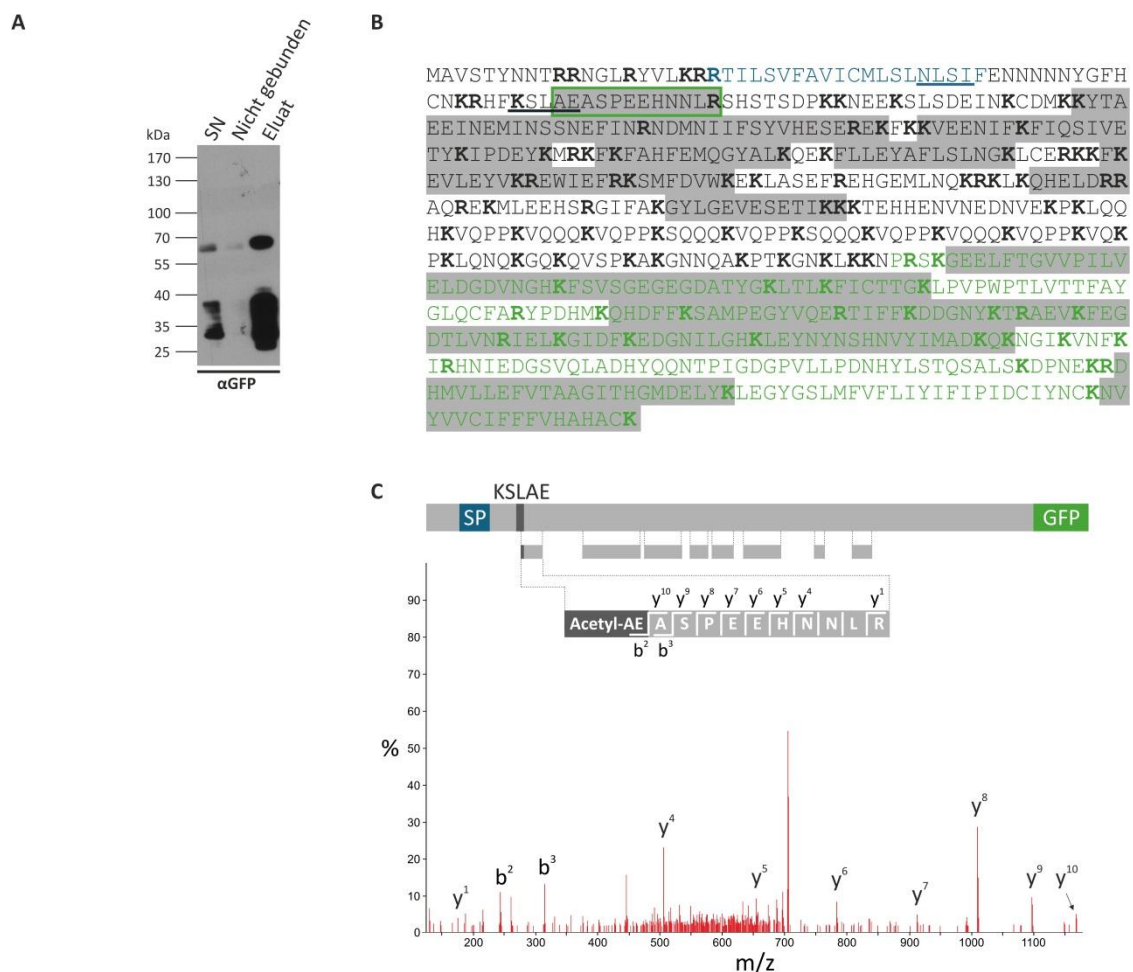


Abbildung 3.42: Quantifizierung des Exports von PFI1780w¹⁻⁹⁰-X-GFP. A) Westernblotanalyse der mit Tetanolsin fraktionierten mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Aufgetragen wurde die Wirtszellfraktion (SN; Überstand) und die Parasitenfraktion (P; Pellet). Die korrekte und vollständige Fraktionierung wurde mit Antikörpern gegen die Proteine SERP und REX3 überprüft. Anhand des Bandenmusters konnte vermutlich Volllängenfusionsprotein oder am/nahe dem SP prozessiertes Fusionsprotein (*), am PEXEL prozessiertes Fusionsprotein (**), hinter dem PEXEL prozessierte Fusionsprotein (***) sowie GFP allein (****) identifiziert werden. B) und C) Bestimmung des prozentualen Anteils an PFI1780w¹⁻⁹⁰-X-GFP und REX3 für PFI1780w¹⁻⁹⁰-ASLAE-GFP anhand der Bandenintensität mit Hilfe des Programms „ImageJ“. Die Bande, welche GFP allein repräsentiert, wurde in die Auswertung nicht miteinbezogen.

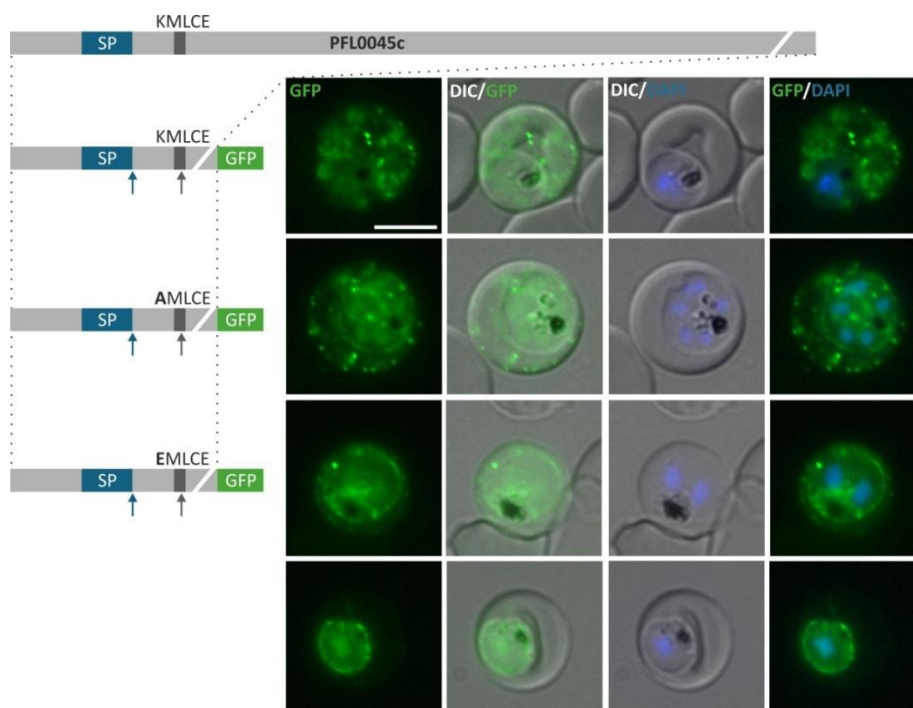
Mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse wurde eine potentielle Prozessierung des alternativen PEXEL-Motivs von PFI1780w näher charakterisiert. Für die Massenspektrometrie wurde das Volllängenprotein PFI1780w-KSLAE-GFP (vgl. Kap. 3.2.3) aufgereinigt (vgl. Abb. 3.43A). Nach der Aufreinigung über die GFP-Beads konnte eine starke Bande des Fusionsproteins im Eluat detektiert werden, wobei auch Abbauprodukte nachweisbar waren. In der massenspektrometrischen Analyse wurde lediglich die distinkte Bande analysiert. Insgesamt wurden dabei 36 Peptide identifiziert (vgl. Abb. 3.43B). Eine Liste aller nachgewiesenen Peptide befindet sich im Anhang D (vgl. Tab. D.1). 18 Peptide lagen in PFI1780w und 18 Peptide im GFP-Tag. Als einziges semi-tryptisches Peptid konnte im N-Terminus von PFI1780w-KSLAE-GFP das Peptid AEASPEEHNNLR identifiziert werden (vgl. Abb. 3.43B, grüner Kasten und 3.43C), welches mit der alternativen PEXEL-Position 4 (KSL↓AE) beginnt. Das Spektrum des Peptids AEASPEEHNNLR mit einer komplementären y- und b-Ion Serie ist in der Abbildung 3.43C dargestellt. Die m/z-Werte der b²- und b³-Ionen zeigen eine Acetylierung dieses Peptids an (vgl. Abb. 3.43C). Mit Hilfe der Massenspektrometrie wurde bestätigt, dass PFI1780w proteolytisch gespalten und anschließend acetyliert wird. Bei PFI1780w handelt sich somit um ein Protein mit alternativem PEXEL-Motiv, welches funktionell ist.



←Abbildung 3.43: Massenspektrometrische Analyse von PFI1780w-KSLAE-GFP (vorherige Seite). A) Westernblotanalyse der Aufreinigung des Fusionsproteins über GFP-Beads. Dargestellt sind der Überstand (SN) nach Lyse mit Saponin, nicht an die GFP-Beads gebundenes Fusionsprotein sowie das Eluat des Fusionsproteins nach Inkubation mit den GFP-Beads. B) Sequenz von PFI1780w-KSLAE-GFP (PFI1780w: schwarz; GFP-Tag: grün). Durch die Massenspektrometrie identifizierte Peptide sind grau hinterlegt. Trypsinschnittstellen sind fett dargestellt. Signalpeptidaseschnittstelle sowie das alternative PEXEL-Motiv sind unterstrichen. C) MS/MS Fragmentierungsspektrum des semi-tryptischen Peptids AEASPEEHNNLR (grüner Kasten in B). Die X-Achse zeigt die Masse (m/z) und die Y-Achse zeigt die Intensität der y - und b -Ionen an. Eine N-Acetylierung am Peptid konnte mittels Massenspektrometrie ermittelt werden.

3.3.3 Überprüfung der Funktionalität des alternativen PEXEL-Motivs von PFL0045c

Eine Untersuchung der Funktionalität des alternativen PEXEL-Motivs fand ebenfalls bei PFL0045c statt. Es wurden für das Volllängenprotein PFL0045c drei Zelllinien etabliert: PFL0045c-KMLCE-GFP, PFL0045c-AMLCE-GFP und PFL0045c-EMLCE-GFP. PFL0045c-KMLCE-GFP lag in zahlreichen punktuellen Strukturen in der Wirtszelle vor, welche sich schnell bewegten (vgl. Abb. 3.44, Aufnahme 1; vgl. Kap. 3.2.3). Das Fusionsprotein PFL0045c-AMLCE-GFP wurde ebenfalls effizient exportiert (vgl. Abb. 3.44, Aufnahme 2) und wies den gleichen Phänotyp auf wie PFL0045c-KMLCE-GFP. Im Gegensatz dazu war der Export des Fusionsproteins PFL0045c-EMLCE-GFP im gleichen Maß reduziert bzw. blockiert wie bei PFI1780w-ESLAE-GFP (vgl. Kap. 3.3.2; vgl. Abb. 3.44, Aufnahme 3 und 4). Bei dem ineffizient exportierten PFL0045c-EMLCE-GFP, lokalisierte dieses wie PFL0045c-KMLCE-GFP und PFL0045c-AMLCE-GFP in sich schnell bewegenden punktuellen Strukturen. Zusätzlich akkumulierte das Fusionsprotein in der PV/PVM (vgl. Abb. 3.44, Aufnahme 3). Wenn der Export des Fusionsproteins vollkommen blockiert war, konnte eine Lokalisation in der PV/PVM beobachtet werden (vgl. Abb. 3.44, Aufnahme 4).



←**Abbildung 3.44: Lokalisation von PFL0045c-X-GFP (vorherige Seite).** Die Struktur des Volllängenproteins PFL0045c ist über den Aufnahmen dargestellt. Die schematische Struktur der Volllängenproteine sind links von den exemplarischen Fluoreszenzaufnahmen der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten abgebildet (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Putative Schnittstellen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet (Signalpeptidaseschnittstelle: blau; Plasmepsin V-Schnittstelle: dunkelgrau). Für PFL0045c-EMLCE-GFP sind zwei repräsentative Aufnahmen dargestellt. Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm.

Eine Analyse der unterschiedlichen Fusionsproteine von PFL0045c war mit Hilfe der selektiven Lyse nicht möglich, da die Strukturen mit denen PFL0045c assoziiert durch Zentrifugation pelletierten und somit die Fusionsproteine nur in der Parasitenfraktion nachweisbar waren (Ergebnisse nicht gezeigt).

Ob ein prozessierter N-Terminus bei PFL0045c vorliegt wurde mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse überprüft. Die Aufreinigung des Volllängenfusionsproteins PFL0045c-KMLCE-GFP über die GFP-Beads war erfolgreich (vgl. Abb. 3.45A). Eine starke Bande wurde von dem über die GFP-Beads aufgereinigten PFL0045c-KMLCE-GFP im Eluat detektiert. Zusätzlich konnten im Eluat Abbauprodukte nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.45A). Im angefärbten Coomassie-Gel war lediglich eine distinkte Bande vorhanden, welche ausgeschnitten und für die weitere Analyse verwendet wurde. Bei der massenspektrometrischen Analyse wurden insgesamt 41 Peptide identifiziert, wobei 23 Peptide in PFL0045c lagen. Eine Liste aller Peptide befindet sich im Anhang D (vgl. Tab. D.1). Diese Peptide überlappen teilweise und umfassen die Aminosäuren 88 bis 371, wobei alle Peptide sowohl N- als auch C-terminal tryptisch verdaut waren (vgl. Abb. 3.45B). Auffällig ist, dass alle identifizierten Peptide hinter dem alternativen PEXEL liegen. Somit kann eine Prozessierung am alternativen PEXEL nicht ausgeschlossen werden.

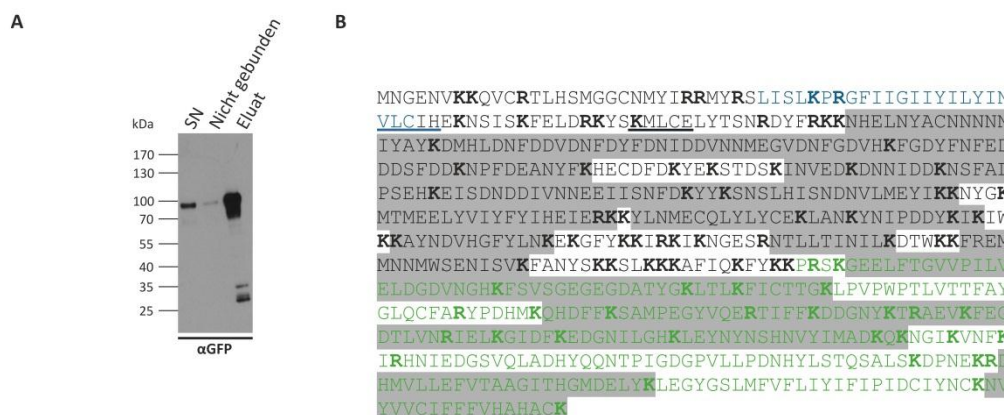


Abbildung 3.45: Massenspektrometrische Analyse von PFL0045c-KMLCE-GFP. A) Westernblotanalyse der Aufreinigung des Fusionsproteins über GFP-Beads. Dargestellt sind der Überstand (SN) nach Lyse mit Saponin, nicht an die GFP-Beads gebundenes Fusionsprotein sowie das Eluat des Fusionsproteins nach Inkubation mit den GFP-Beads. B) Sequenz von PFL0045c-KMLCE-GFP (PFL0045c: schwarz; SP: blau; GFP-Tag: grün). Durch die Massenspektrometrie identifizierte Peptide sind grau hinterlegt. Trypsinschnittstellen sind fett dargestellt. Die Signalpeptidaseschnittstelle sowie das alternative PEXEL-Motiv sind unterstrichen.

3.4 Charakterisierung der Aminosäureposition 2 und 4 des PEXEL-Motivs anhand des Reporterproteins REX3.

Lediglich zwei (PFF0335c und PF08_0004) der elf identifizierten exportierten Proteine besitzen keine neutralen Aminosäuren an Position 2 oder 4 des PEXEL-Motivs (vgl. Kap.3.2.5). Bisher ist weitestgehend unbekannt ob und welchen Einfluss geladene Aminosäuren auf den Export von Proteinen mit PEXEL-Motiv haben. Anhand des Reporterproteins REX3 wurde dies überprüft. Dazu wurden mit Hilfe der OE-PCR die Aminosäuren an Position 2 (Glutamin) und 4 (Serin) durch Lysin ersetzt. Die Lokalisation wurde durch ein GFP-Fusionsprotein wie unter Kapitel 3.1 beschrieben untersucht.

Das Fusionsprotein der Zelllinie REX3¹⁻⁷⁰-RKLKE-GFP wurde nicht exportiert und lokalisierte PV/PVM-typisch ringförmig um den Parasiten (vgl. Abb. 3.46A). Eine Blockierung des Exports konnte mittels selektiver Lyse mit Tetanolysin bestätigt werden (vgl. Abb. 3.46B). Für REX3¹⁻⁷⁰-RKLKE-GFP wurde lediglich eine Bande in der Parasitenfraktion detektiert. Diese Bande wies das gleiche Molekulargewicht auf wie die Bande des exportierten und am klassischen PEXEL-Motiv prozessierten Fusionsprotein REX3¹⁻⁷⁰-RQLSE-GFP (vgl. Abb. 3.46B). Eine korrekte und vollständige Fraktionierung konnte mit Hilfe von SERP und REX3 bestätigt werden. Somit wird REX3¹⁻⁷⁰-RKLKE-GFP am alternativen PEXEL prozessiert aber nicht exportiert.

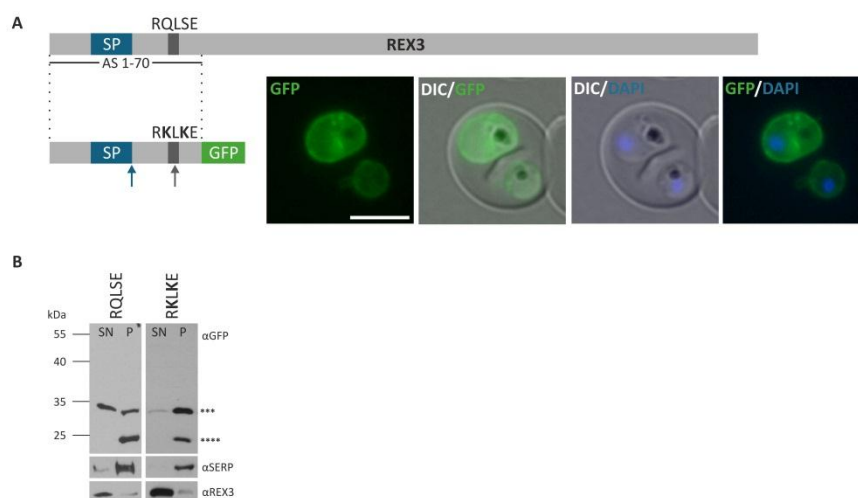


Abbildung 3.46: Lokalisation von REX3¹⁻⁷⁰-RKLKE-GFP. A) Die Struktur des Volllängenproteins REX3 ist über der Aufnahme dargestellt. Die schematische Struktur des als GFP-Fusionsprotein exprimierten verkürzten Version (Aminosäure (AS) 1-70) ist links von der exemplarischen Fluoreszenzaufnahme der mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten abgebildet (SP: blau; PEXEL: dunkelgrau; GFP: grün). Putative Schnittstellen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet (Signalpeptidaseschnittstelle: blau; Plasmepsin V-Schnittstelle: dunkelgrau). Die Kerne der Parasiten wurden mit DAPI angefärbt. Längenmaßstab: 5 µm. B) Westernblotanalyse der mit Tetanolysin fraktionierten mit transgenen Parasiten infizierten Erythrozyten. Aufgetragen wurde die Wirtszellfraktion (SN; Überstand) und die Parasitenfraktion (P; Pellet). Die korrekte und vollständige Fraktionierung wurde mit Antikörpern gegen die Proteine SERP und REX3 überprüft. Anhand des Molekulargewichts konnte am PEXEL prozessiertes Fusionsprotein (***) sowie GFP allein (****) identifiziert werden.

4 Diskussion

Malariaparasiten besitzen einen komplexen Lebenszyklus. Während des intraerythrozytären Stadiums durchläuft der Parasit Zyklen des Wachstums und der Teilung. Damit Malariaparasiten im metabolisch inaktiven Erythrozyten überleben und sich vermehren können, müssen diverse Modifikation an diesem vorgenommen werden. Hierfür werden zahlreiche Proteine vom Parasiten über die PVM in die Wirtszelle exportiert. Diese Proteine übernehmen vielfältige Aufgaben und sind unter anderem für die hohe Pathogenität des Malariaerregers *P. falciparum* verantwortlich (Maier et al., 2008). Die Identifizierung des PEXEL-Motivs (R.L.E/D/Q) im Jahr 2004 (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004) hat zu einer Vorhersage von über 350 putativ exportierten *P. falciparum*-Proteinen geführt (Sargeant et al., 2006; van Ooij et al., 2008; Boddey et al., 2013). Für eine große Anzahl der vorhergesagten Proteine konnte der Export bestätigt werden (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004; Przyborski et al., 2005; Sargeant et al., 2006; Nunes et al., 2007; Maier et al., 2009) und gezeigt werden, dass tatsächlich das PEXEL-Motiv für den Export verantwortlich ist (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004; Sargeant et al., 2006; van Ooij et al., 2008; Boddey et al., 2013). Seit der Entdeckung des PEXEL-Motivs wurde das Exportom von *P. falciparum* und anderer Malariaerreger durch verbesserte Vorhersagemodelle beständig erweitert und modifiziert (Sargeant et al., 2006; van Ooij et al., 2008; Boddey et al., 2013). Das aus dem Jahr 2006 stammende Vorhersagemodell (Algorithmus „Exportpred v1.1“) von Sargeant et al. (2006) hat unter anderem eine kleine Anzahl an Proteinen (23) mit alternativem PEXEL-Motiv (R/H/K.L/I.E/D/Q) in *P. falciparum* identifiziert (vgl. Tab. 4.1). Anhand der Annotation in PlasmoDB kann für acht dieser Proteine, wie z.B. für PFF0540c (Lokalisation im Golgi des Parasiten), ein Export und somit die Funktionalität des alternativen PEXEL-Motivs ausgeschlossen werden (vgl. Tab. 4.1). Die zentrale Frage ist: Werden die restlichen 15 Proteine exportiert? Und falls diese Proteine exportiert werden: Ist das alternative PEXEL-Motiv dieser Proteine funktionell oder handelt es sich bei den Proteinen wohlmöglich um PNEPs?

Aufgrund unterschiedlicher Analysen, welche im Folgenden diskutiert werden (vgl. Kap. 4.1), wurde der Algorithmus („Exportpred v2.0“) so modifiziert, dass im aktuellen Exportom mit insgesamt 463 putativ exportierten Proteinen keine mit alternativem PEXEL-Motiv vorhergesagt wurden (Boddey et al., 2013). Bisher ist somit nicht eindeutig geklärt, ob alternative PEXEL Export vermitteln. Daher wurde in der vorliegende Arbeit die Funktionalität alternativer PEXEL-Motive näher charakterisiert. Eine Charakterisierung fand mit Hilfe der Reporterproteine KAHRP, REX3 und GBP statt. Des Weiteren wurde die Funktionalität alternativer PEXEL-Motive in *P. falciparum*-Proteinen, welche ein alternatives PEXEL-Motiv besitzen, überprüft. Die entsprechenden Proteine wurden mittels Lokalisationsstudien näher charakterisiert. Bei einigen dieser Proteine wurde weiterhin überprüft, ob eine Prozessierung am alternativen PEXEL-Motiv stattgefunden hat.

Tabelle 4.1: Vorhergesagte Proteine mit alternativem PEXEL-Motiv (R/K/H.L/I.E/D/Q) von Sargeant et al. (2006).

Gen ID	Annotation in PlasmoDB V12.0	alternatives PEXEL
PF11_0052	syntaxin, Qa-SNARE family (SYN13)	RNITE
PF11_0106	apicoplast ribosomal protein L36e precursor, putative	REITG
PFA0225w	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (LytB)	RSILQ
PFA0610c	<i>Plasmodium</i> exported protein (hyp11), unknown function	RIIAE
PFD0495c	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	RIIAE
PFL1045w	FbpA domain protein, putative	RIILQ
PF07_0009	chitinase precursor fragment, truncated	KSLSH
PF10_0021	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTc), unknown function	KILCE
PF10_0189	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	KELFS
PF11_0261	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	KSLIK
PF11_0343	LEM3/CDC50 family protein, putative	KNLKE
PF13_0193	MSP7-like protein (MSRP3)	KLLEE
PFA0295c	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	KKLIS
PFA0385w	conserved <i>Plasmodium</i> membrane protein, unknown function	KLLNK
PFA0550w	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function (GEXP19)	KRICK
PFC0085c	<i>Plasmodium</i> exported protein, unknown function	KSLAE
PFD1035w	steroid dehydrogenase, putative	KNLKS
PFF0540c	SNARE associated Golgi protein, putative	KILYD
PFI1780w	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTc), unknown function	KSLAE
PFL0040c	serine/threonine protein kinase, FIKK family (FIKK12)	KCLSE
PFL0045c	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTc), unknown function	KMLCE
PFL0070c	<i>Plasmodium</i> exported protein, unknown function	KILSE
PFD1205w	<i>Plasmodium</i> exported protein (hyp15), unknown function	HELSQ

Grün: Proteine, die in dieser Arbeit in Bezug auf die Funktionalität von alternativen PEXEL-Motiven untersucht wurden

4.1 Manche alternative PEXEL sind in den Reporterproteinen REX3 und GBP funktionell

Um die Funktionalität alternativer PEXEL-Motive zu testen, wurden die Reporterproteine KAHRP, REX3 und GBP, welche ein klassisches PEXEL besitzen, verwendet. Für diese Proteine konnte zuvor bestätigt werden, dass diese sowohl als Volllängenprotein als auch N-terminal verkürzte Version vom Parasiten in die Wirtszelle exportiert werden (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004; Spielmann et al., 2006b; Grüning et al., 2011; Boddey et al., 2013). Tatsächlich waren die alternativen PEXEL-Motive in KAHRP, REX3 und GBP teilweise funktionell. Interessanterweise zeigten die Reporterproteine beim Austausch des klassischen PEXEL-Motivs durch alternative PEXEL unterschiedliche Toleranzen gegenüber den alternativen Aminosäuren. Dies zeigte sich in der Exporteffizienz der jeweiligen Reporter und spiegelte sich wie folgt wieder (vgl. Abb. 4.1): KAHRP tolerierte lediglich den Austausch der Aminosäure Leucin durch Isoleucin, wobei auch hier der Export effizient war. Andere alternative PEXEL führten zu einer Blockierung des Exports (vgl. Abb. 4.1). Die alternativen PEXEL-Motive R.I.E, K.L.E und H.L.E vermittelten einen schwachen (K/H.L.E) bzw. moderaten (R.L.E; R.I.E) Export im

Reporter REX3 und einen effizienten Export bei den GBP-Reporterproteinen. Der lediglich moderate Export des Reporterproteins REX3 mit R.L/I.E-Motiv könnte auf den GFP-Tag zurückzuführen sein. Schon in früheren Untersuchungen von REX3 konnte beobachtet werden, dass das GFP-Fusionsprotein REX3 im Vergleich zum endogenen Protein schwächer exportiert wird (Spielmann et al., 2006b). Die alternativen PEXEL K.I.E und H.I.E sind in REX3 nicht funktionell, wohingegen GBP beim Vorhandensein dieser Motive trotzdem moderat exportiert wurde (vgl. Abb. 4.1).

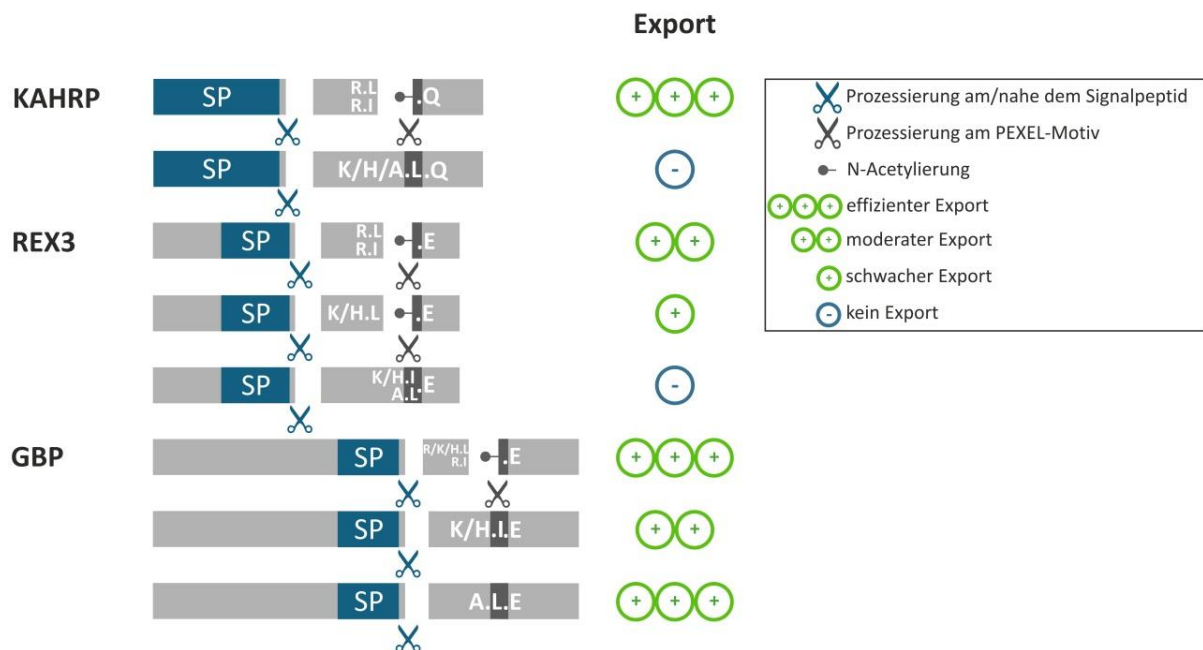


Abbildung 4.1: Toleranz der Reporterproteine KAHRP, REX3 und GBP gegenüber alternativen PEXEL-Motiven. Schematische Darstellung der Reporterproteine (grau) mit Signalpeptid (SP) (blau) und unterschiedlichen alternativen PEXEL-Motiven (grau und weiß). „Putative“ Prozessierungen sind durch eine Schere gekennzeichnet. Effizient exportierte (+++; Anteil an exportiertem Reporterprotein in der Wirtszelle >75%), moderat exportierte (++; Anteil an exportiertem Reporterprotein in der Wirtszelle >50%) und schwach exportierte (+; Anteil an exportiertem Reporterprotein in der Wirtszelle <50%) Reporterproteine sind mit einer unterschiedlichen Anzahl von Pluszeichen markiert. Nicht exportierte Reporterproteine sind durch ein Minus (-) gekennzeichnet.

Die Toleranzdifferenz der Reporterproteine KAHRP, REX3 und GBP gegenüber alternativer PEXEL könnte auf die Sequenzumgebung vom jeweiligen PEXEL zurückzuführen sein. Für einen effizienten Export von GFP-Reporterproteinen muss ein Abstand zwischen PEXEL-Motiv und GFP-Tag bestehen (Knuepfer et al., 2005; Przyborski et al., 2005; Bhattacharjee et al., 2006). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die C-terminale Sequenz hinter dem PEXEL-Motiv wichtige Exportinformationen enthält (Grüning et al., 2012; Boddey et al., 2013). Ebenso übernehmen die PEXEL-Positionen 4 und 5 nach Prozessierung eine wesentliche Rolle beim Export von Proteinen (Boddey et al., 2009; Grüning et al., 2012; Boddey et al., 2013; Tarr et al., 2013). Mutationen an der PEXEL-Position 4 und 5 blockieren den Export von Proteinen, jedoch nicht eine Prozessierung durch Plasmepsin V (Tarr et al.,

2013). KAHRP besitzt an Position 5 die neutrale Aminosäure Glutamin, REX3 und GBP hingegen die negativ geladene Aminosäure Glutaminsäure. Möglicherweise beeinflusst die Ladung an Position 5 die Toleranz gegenüber alternativen Aminosäuren an Position 1 und 3. Analysen von Boddey und Kollegen bestätigen die niedrige Toleranz gegenüber alternativen PEXEL-Motiven in KAHRP (Boddey et al., 2013). Des Weiteren werden alternative PEXEL (R.I.Q; K.L.Q) in KAHRP nicht durch aufgereinigtes Plasmepsin V prozessiert (Boddey et al., 2013). Die Protease Plasmepsin V ist für die Prozessierung des PEXEL-Motivs im ER des Parasiten verantwortlich (Klemba & Goldberg, 2005; Russo et al., 2010; Boddey et al., 2010). Mutation im PEXEL-Motiv von Proteinen führen zu einer ineffizienten Prozessierung durch Plasmepsin V und damit einhergehend einem reduzierten Export und einem Verbleib der Proteine im ER oder der PV (Marti et al., 2004; Przyborski et al., 2005; Boddey et al., 2009; Russo et al., 2010; Boddey et al., 2010; Boddey et al., 2013). Basierend auf den Ergebnissen hatten Boddey et al. (2013) den Schluss gezogen, dass alternative PEXEL nicht funktionell wären. Ähnliche Rückschlüsse haben Sleebs et al. (2014) aus ihren Analysen gezogen. Aspartylproteasen wie Plasmepsin V können durch Isostere gehemmt werden (Drag & Salvesen, 2010). Daher wurden Isostere erstellt, welche sowohl natürliche PEXEL- (RVL-Statin) als auch alternative PEXEL-Motive (KVL-Statin und RVI-Statin) nachahmten. Bei *in vitro* Versuchen mit RVL-Statin wurde Plasmepsin V inhibiert, bei KVL-Statin und RVI-Statin hingegen nicht (Sleebs et al., 2014). Daraus wurde gefolgert, dass alternative PEXEL nicht durch Plasmepsin V erkannt und somit nicht prozessiert werden. Anhand der Reporterproteine REX3 und GBP konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch eine Funktionalität für die alternativen PEXEL-Motive R.I.E und K/H.L.E belegt werden. Unter anderem konnte mittels Massenspektrometrie für das K.L.E-Motiv der jeweiligen Reporter REX3 und GBP eine Prozessierung zwischen der PEXEL-Position 3 und 4 und eine anschließende Acetylierung bestätigt werden. Interessanterweise wurden GBP-Reporter mit den alternativen PEXEL-Motiven K/H.I.E ebenfalls exportiert. Auch der Austausch der Aminosäure Arginin durch Alanin (A.L.E) führte nicht zu einer Blockade des Exports, wie dies bei Proteinen mit klassischem PEXEL-Motiv üblich ist (Marti et al., 2004; Przyborski et al., 2005; Boddey et al., 2009; Russo et al., 2010). Allerdings findet bei GBP sowohl bei den PEXEL-Motiven K/H.I.E als auch A.L.E ein PEXEL-unabhängiger Transport statt. So war unter anderem durch massenspektrometrische Analysen keine Prozessierung an diesen Motiven im GBP-Reporter nachweisbar. Schlussfolgernd reicht eine Prozessierung beispielsweise am/nahe dem SP bei GBP aus um Export zu vermitteln (vgl. Abb. 4.1). Generell scheint GBP sowohl Veränderungen am PEXEL-Motiv als auch der PEXEL-folgenden Sequenz zu tolerieren. So wurde der Export bei GBP im Vergleich zu KAHRP nicht inhibiert wenn die PEXEL-folgende Sequenz durch zehn Alanine ersetzt wurde (Boddey et al., 2013). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alternative Aminosäuren im PEXEL-Motiv an der Position 1 und 3 abhängig von der

Protein-spezifischen Sequenzumgebung und der jeweiligen Zusammensetzung des PEXEL-Motivs in Reporterproteinen funktionell sind.

4.2 Endogene *P. falciparum*-Proteine mit alternativem PEXEL-Motiv lokalisieren in unterschiedlichen Kompartimenten

Eine Funktionalität alternativer PEXEL-Motive konnte in den Reporterproteinen REX3 und GBP bestätigt werden. Bisher konnte jedoch nicht bewiesen werden, dass alternative PEXEL-Motive in endogenen *P. falciparum*-Proteinen Export vermitteln. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 30 Proteine, zwei mit einem klassischen PEXEL- und 28 mit einem alternativen PEXEL-Motiv, durch Lokalisationsstudien näher charakterisiert. Bei den Lokalisationsstudien der GFP-Fusionen der untersuchten Kandidaten konnten elf exportierte Proteine, die in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisierten, identifiziert werden (vgl. Abb. 4.2). Alle anderen Proteine lokalisierten entweder im ER/Golgi des Parasiten, in unbekannten Strukturen oder assoziierten mit der PV/PVM. Anhand der Lokalisation der untersuchten Proteine lassen sich Rückschlüsse auf die putativen Funktionen ziehen, welche im Folgenden diskutiert werden.

4.2.1 Nicht exportierte Proteine lokalisieren im ER oder assoziieren mit der PV/PVM

Insgesamt sieben der untersuchten Kandidaten lokalisierten im ER oder Golgi des Parasiten (vgl. Abb. 4.2). ER-residente Proteine in *P. falciparum* übernehmen Funktionen bei der Proteinfaltung, dem Schutz vor oxidativen Stress und der Kalziumregulation (Külzer et al., 2009). Bekannte ER-residente Proteine von *P. falciparum* sind beispielsweise das Protein ERC (engl. *Endoplasmic Resident Calcium-binding Protein*), welches für die Kalziumregulation zuständig ist (La Greca et al., 1997), Mitglieder aus der HSP70-Proteinfamilie (Külzer et al., 2009) und unterschiedliche Proteindisulfidisomerasen (Mahajan et al., 2006; Mouray et al., 2007). Basierend auf der Annotation in PlasmoDB kann für die in dieser Arbeit im ER lokalisierten Proteinen auf keine mögliche Funktion geschlossen werden. Interessanterweise ist PF14_0275 in PlasmoDB beruhend auf der Studie von Silvestrini et al. (2010) als GEXP (engl. *Gametocyte Exported Protein*) annotiert. Der Proteinexport vom Parasiten in den Erythrozyten spielt auch während der Gametogenese des Parasiten eine wichtige Rolle (Silvestrini et al., 2010; Beck et al., 2014), wobei der Export von Proteinen gleich zu dem von asexuellen Stadien zu sein scheint. So werden während der Gametogenese exportierte Proteine vermutlich am PEXEL-Motiv prozessiert, anschließend N-acetyliert (Silvestrini et al., 2010) und über das PTEX in den Erythrozyten transportiert (Matthews et al., 2013; Beck et al., 2014).

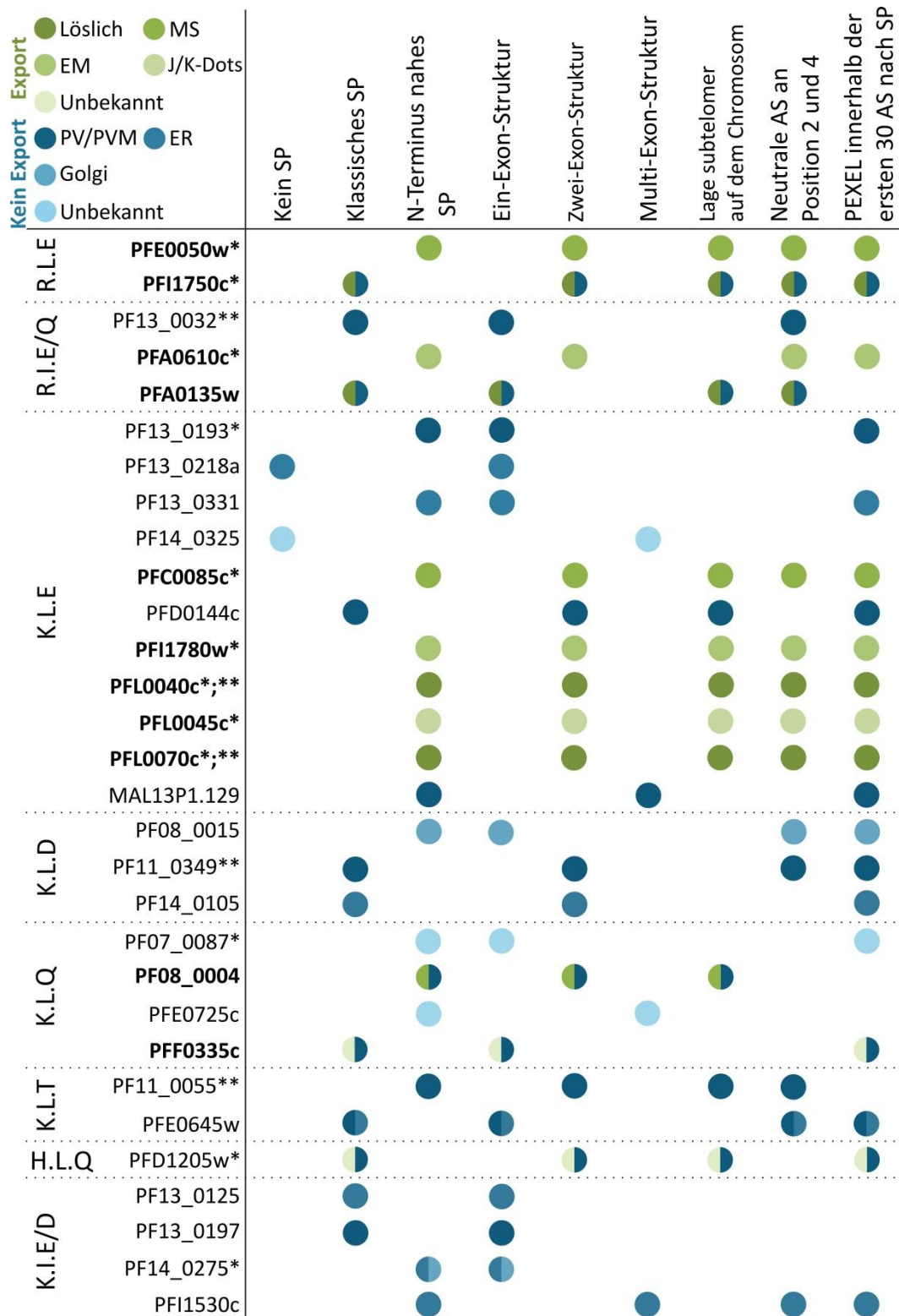


Abbildung 4.2: Übersicht der untersuchten Kandidaten mit klassischem und alternativem PEXEL-Motiv und deren Lokalisation. Entsprechende PEXEL-Motive sind Links angegeben. Die jeweilige Lokalisation ist durch Farben gekennzeichnet (MS: Maurer'sche Spalten; EM: Erythrozytenmembran; J/K-Dot: J/K-Dot-ähnlich; PV: parasitophore Vakuole; PVM: parasitophore Vakuolenmembran; ER: endoplasmatisches Retikulum). Exportierte Proteine sind dick hervorgehoben. Mit einem Stern * gekennzeichnete Kandidaten stammen aus der Exportomvorhersage von Sargeant et al. (2006). Mit zwei Sternen ** markierte Proteine wurden als verkürzte Version exprimiert. Charakteristische Merkmale sind oben angegeben.

Bei der Untersuchung des Proteoms früher Gametogenesestadien mittels Massenspektrometrie wurden insgesamt 26 putativ exportierte Proteine mit klassischem PEXEL-Motiv identifiziert, unter anderem auch PF14_0275. Ein Export aus den Gametozyten in die Wirtszelle konnte bereits für einige dieser Proteine bestätigt werden (Eksi et al., 2005; Silvestrini et al., 2010; Morahan et al., 2011). Dabei scheint der Export von parasitären Proteinen in die Wirtszelle für die Reifung der Gametozyten essentiell zu sein (Ilkadar et al., 2013; Beck et al., 2014). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PF14_0275 in asexuellen Stadien nicht in den Erythrozyten exportiert wird, sondern im ER des Parasiten lokalisiert. Eine Lokalisation in den Gametozyten wurde jedoch nicht untersucht. Es ist somit möglich, dass PF14_0275 nur während der Gametogenese in den Erythrozyten exportiert wird. Dieser Gametozyt-spezifische Export konnte beispielweise für PfGECO (engl. *P. falciparum* *Gametocyte Erythrocyte Cytosolic Protein*) gezeigt werden (Morahan et al., 2011).

Wie in fast allen Eukaryoten ist das SP von *P. falciparum* für eine Sekretion der Proteine in das ER zuständig. Für den Transport zum finalen sub- bzw. extrazellulären Zielort findet eine Spaltung des SPs durch eine Signalpeptidase statt (van Dooren et al., 2000; van Dooren et al., 2001). Es sind unterschiedliche Motive und Domänen bekannt, die die Sekretion zum jeweiligen weiteren Zielort bestimmen (Waller et al., 2000; Foth et al., 2003; Gilberger et al., 2003; Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004; van Dooren et al., 2005; Tonkin et al., 2006b; Eksi & Williamson, 2011). Für den Verbleib im ER besitzen *P. falciparum*-Proteine ein spezifisches Retentionssignal (.DEL) (Elmendorf & Haldar, 1993), welches die letzten vier Aminosäuren am C-Terminus des jeweiligen Proteins umfasst (Munro & Pelham, 1987; Nilsson & Warren, 1994). Das Sequenzmotiv wird durch das membrangebundene Golgi-Protein ERD2 (engl. *ER Lumen Retaining Receptor*) erkannt, welches den Transport von ER-Proteinen vom cis-Golgi in das Lumen des ERs bewirkt (Lewis et al., 1990; Semenza et al., 1990; Elmendorf & Haldar, 1993). In den in dieser Arbeit ER-lokalisierten Proteinen wurde dieses Motiv jedoch nicht gefunden. Das .DEL-Motiv vermittelt allerdings den Rücktransport von löslichen Proteinen in das ER. Somit könnte es sich bei den Proteinen, die eine Transmembrandomäne besitzen (PF13_0331 und PF14_0275), um membrangebundene ER-Proteine handeln, bei denen das ER-Retentionssignal bisher weniger gut untersucht ist (Külzer et al., 2009). Interessanterweise konnte für PF11_0055, das in dieser Arbeit mit der PV/PVM assoziierte, ein ER-Retentionssignal (KDEL) identifiziert werden. Für die Lokalisationsstudien von PF11_0055 wurde eine verkürzte Version verwendet, die somit nicht die Information für den finalen Zielort des Proteins enthielt. Das Vorhandensein einer Thioredoxin-ähnlichen Domäne im Protein spricht für eine Lokalisation von PF11_0055 im ER. Somit könnte PF11_0055 an Prozessen wie der Proteinfaltung und dem Schutz vor oxidativen Stress im ER beteiligt sein.

Insgesamt lokalisierten acht der getesteten Kandidaten in der PV oder an der PVM. PV- oder PVM-residente Proteine können voneinander mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgrund der Nähe der PVM zur Parasitenplasmamembran nicht unterschieden werden. Eine zweifelsfreie Lokalisation im jeweiligen Kompartiment wäre nur unter der Anwendung unterschiedlicher Techniken wie beispielsweise der Immunelektronenmikroskopie oder mittels Löslichkeitsprofil möglich (Spielmann et al., 2012). Im Vergleich zu PV-Proteinen sind bisher nur wenige PVM-Proteine bekannt. Dies beinhaltet beispielweise Proteine der Multigen-Familie ETRAMPs (engl. *Early Transcribed Membrane Proteins*) sowie Komponenten des PTEXs (Spielmann et al., 2003; Spielmann et al., 2006a; de Koning-Ward et al., 2009; MacKellar et al., 2011; Bullen et al., 2012a). PV- und PVM-Proteine übernehmen unterschiedliche Funktionen, die sich in der Nährstoffaufnahme aus dem Zytosol der Wirtszelle, dem Transport von Proteinen in die Wirtszelle und dem Austritt des Parasiten aus der Wirtszelle widerspiegeln. Erst kürzlich wurde eine putative Sequenzdomäne für PVM-Proteine identifiziert, welche für den Transport und die Bindung der Proteine an die PVM verantwortlich sein soll (Eksi & Williamson, 2011). Diese Domäne kommt sowohl bei Mitgliedern der Proteinfamilie ETRAMP als auch bei dem PVM-residenten Protein Pfs16 vor. Bei einer Vorhersage konnte allerdings nur eine geringe Anzahl an putativen PVM-Proteinen identifiziert werden (Eksi & Williamson, 2011), wobei keiner der in dieser Arbeit getesteten Kandidaten enthalten war.

4.2.2 Exportierte Proteine assoziieren mit wichtigen Virulenzstrukturen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten insgesamt elf exportierte Proteine identifiziert und charakterisiert werden (vgl. Abb. 4.2). Darunter waren vier exportierte Proteine, die löslich in der Wirtszelle vorlagen (PFL0040c, PFL0070c, PFA0135w und PFI1750c), drei Maurer'sche Spalten-Proteine (PF08_0004, PFE0050w und PFC0085c), zwei Erythrozytenmembran-assoziierte Proteine (PFA0610c und PFI1780w), ein Protein, welches eine J/K-Dot-ähnliche Lokalisation zeigte (PFL0045c) und ein Protein, welches mit nicht definierten Strukturen assoziierte (PFF0335c). Das schwach exportierte PFA0135w, welches löslich in der Wirtszelle vorlag, assoziierte zusätzlich mit der PV/PVM. Dieses Protein gehört der Tryptophan/Threonin-reichen Proteinfamilie, mit vier Paralogen in *P. falciparum* und 15 oder mehr Orthologen in anderen Plasmodienspezies wie *P. vivax* oder *P. knowlesi*, an (Ntumngia et al., 2005). Neben PFA0135w konnte für das Paraloge PF08_0003 bereits gezeigt werden, dass es exportiert wird und in den Maurer'schen Spalten in der Wirtszelle lokalisiert (Heiber et al., 2013). PypAg-3 ist homolog zu PFA0135w. Dieses Protein wird aus dem Nagetier-befallenden Malariaerreger *P. yoelii* in die Wirtszelle exportiert und assoziiert dort mit der Erythrozytenmembran (Burns et al., 2000). Des Weiteren konnte pypAg-3 in Kulturüberständen gefunden werden und bindet *in vitro* an uninfizierte Mauserythrozyten (Burns et al., 2000). Aufgrund der Bindung an uninfizierte Erythrozyten wurde eine Funktion bei der Invasion von Merozoiten oder der Interaktion

mit einem Rezeptor an einen anderen Zelltyp oder Gewebe vorgeschlagen (Burns et al., 2000). In PlasmoDB ist PFA0135w als putatives Merozoit-assoziiertes Tryptophan-reiches Antigen annotiert. Diese Annotation beruht auf einer Studie von Ntumngia und Kollegen, welche mit Hilfe von Affinitäts-aufgereinigten polyklonalen Menschenserum, PFA0135w auf der Merozoitenoberfläche lokalisiert haben (Ntumngia et al., 2004). In Westernblotanalysen mit dem Humanserum wurde PFA0135w, welches ein erwartetes Molekulargewicht von 35 kDa besitzt, jedoch in einer Größe von 50 kDa detektiert. Dies konnte für das Fusionsprotein PFA0135w-GFP nicht beobachtet werden (vgl. Abb. F.1 im Anhang F), da dieses bei der Überprüfung der Integrität im Westernblot mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa nachweisbar war (vgl. Abb. F1 im Anhang F). Dies entspricht in etwa dem vorhergesagten Molekulargewicht (62 kDa) von PFA0135w-GFP. Aufgrund dessen ist nicht sicher, ob das von Ntumngia et al. (2004) verwendete Antiserum spezifisch gegen PFA0135w ist. Eine genaue Lokalisation von endogenem PFA0135w müsste daher noch mal mit neuen spezifischen Antikörpern überprüft werden.

Neben PFA0135w lagen PFL0040c und PFL0070c löslich in der Wirtszelle vor. Da beide Proteine als verkürzte GFP-Fusione exprimiert wurden, ist eine andere Lokalisation des Volllängenproteins in der Wirtszelle möglich. Dies konnte für PFL0040c bereits gezeigt werden, wobei dieses in Ringstadien in Maurer'schen Spalten und in Trophozoiten an der Erythrozytenmembran lokalisiert (Nunes et al., 2007). Maurer'sche Spalten dienen als intermediäres Kompartiment und sind am Transport und der Sortierung von Proteinen zu ihrem finalen Zielort, wie beispielsweise für PFL0040c zur Erythrozytenmembran, beteiligt (Lanzer et al., 2006; Bhattacharjee et al., 2008; Tilley & Hanssen, 2008; Mundwiler-Pachlatko & Beck, 2013). PFL0040c gehört zur FIKK-Kinase Multigenfamilie mit insgesamt 20 Paralogen in *P. falciparum* (Ward et al., 2004; Kooij et al., 2005; Schneider & Mercereau-Puijalon, 2005; Nunes et al., 2007). Namensgebend für die FIKK-Kinasen ist ein konserviertes Sequenzmotiv, bestehend aus einem Phenylalanin (F), einem Isoleucin (I) und zwei Lysinen (K) (Ward et al., 2004; Kooij et al., 2005). Kinasen sind für die Phosphorylierung von Proteinen zuständig. Dabei spielen Phosphorylierungsprozesse in unterschiedlichen Stadien des Lebenszyklus von Plasmodien, wie beispielsweise bei der Merozoitinvasion von Erythrozyten (Rangachari et al., 1986), der Regulation der Exflagellation bei männlichen Gametozyten (Billker et al., 2004; Rangarajan et al., 2005) oder im intraerythrozytären Zyklus (Yuthavong & Limpai boon, 1987; Cohen & Gascard, 1992), eine wichtige Rolle. Die FIKK-Kinase 4.1 (PFD1165w) ist zum Beispiel an der Phosphorylierung von Dematin, einem Zytoskelett-Protein, beteiligt (Brandt & Bailey, 2013). PFL0040c besitzt ebenfalls eine Kinaseaktivität (Nunes et al., 2007). Aufgrund der Lokalisation an der Erythrozytenmembran und der Kinaseaktivität könnte PFL0040c somit eine Funktion in der Phosphorylierung Erythrozytenmembran bzw. -Skelett-assoziiierter Proteine wie z.B. Protein 4.1 oder RESA besitzen. Unterstützt wird diese Annahme durch Versuche mit einer PFL0040c-KO-Zelllinie. In

dieser KO-Zelllinie war die Starre des Erythrozyten im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Nunes et al., 2010). Des Weiteren war das Phosphorylierungsmuster bei einem 80 kDa großen Protein verändert. Um welches Protein es sich hier handelt und ob dieses ebenfalls mit der Erythrozytenoberfläche assoziiert, müsste jedoch geklärt werden.

Weitere Proteine, die mit den Maurer'schen Spalten assoziierten, sind PF08_0004 (Heiber et al., 2013), PFE0050w und PFC0085c. Keines dieser Maurer'schen Spalten-Proteine lokalisierte an der Erythrozytenmembran wie das oben erwähnte PFL0040c. Das deutet darauf hin, dass die Maurer'schen Spalten in diesem Fall nicht als Intermediat dienen, sondern vermutlich der finale Zielort dieser Proteine sind. Maurer'sche Spalten-residente Proteine übernehmen dort entweder eine stabilisierende Funktion, wie beispielsweise MAHRP1 (Spycher et al., 2008), oder haben eine Funktion bei der Translokation von PfEMP1 oder anderer Proteine an die Erythrozytenoberfläche (Maier et al., 2008). PFC0085c und PFL0040c besitzen im Vergleich zu PFE0050w eine Transmembrandomäne. Diese könnte für die Interaktion mit der Membran der Maurer'schen Spalten wichtig sein.

Zusätzlich zur Maurer'schen Spalten-Lokalisation wies PF08_0004 eine Assoziation mit der PV/PVM auf (Heiber et al., 2013). Auch PFA0135w und PFI1750c zeigten neben einem Export des GFP-Fusionsproteins eine Anreicherung der Fusionsproteine in der PV oder an der PVM. Für diese duale Lokalisation dieser Proteine gibt es zwei Möglichkeiten: 1) Die Anreicherungen wie z.B. in der PV/PVM sind auf eine Überexpression der Fusionsproteine zurückzuführen, wobei es beim Export der Proteine zu einer Akkumulation in den für den Export wichtigen Kompartimenten wie der PV/PVM kam. Eine Akkumulation von GFP-Fusionsproteinen im ER oder der PV/PVM konnte schon häufig in früheren Studien beobachtet werden (Wickham et al., 2001; Treeck et al., 2006; Heiber et al., 2013). 2) Die Proteine besitzen mehr als einen Lokalisationsort. D.h. die hier aufgeführten Proteine könnten sowohl eine Funktion in der PV/PVM als auch in der Wirtszelle besitzen. Solche multifunktionalen Proteine, die abhängig von ihrer Lokalisation, der Substratkonzentration oder den vorhandenen Liganden unterschiedliche Funktionen im Organismus übernehmen, werden als „*Moonlighting-Proteine*“ bezeichnet (Jeffery, 1999). Bisher sind nur wenig „*Moonlighting-Proteine*“ in *Plasmodium* beschrieben. Unter anderem zählt dazu die Enolase (Pal-Bhowmick et al., 2007), welche sowohl im Kern, im Zytosol, in der Nahrungsvakuole und auf der Zelloberfläche des Parasiten lokalisiert (Bhowmick et al., 2009; Das et al., 2011; Shevade et al., 2013). Dabei könnte die Enolase Funktionen bei der Invasion des Parasiten in den Mitteldarm der Mücke übernehmen (Ghosh et al., 2011; Hernández-Romano et al., 2011) und am Hämoglobinabbau bzw. der Detoxifizierung der Hämoglobinabbauprodukte in der Nahrungsvakuole beteiligt sein (Das et al., 2011; Shevade et al., 2013).

Zwei der untersuchten Kandidaten (PFL0045c und PFI1780w) gehören in die in *P. falciparum* 72 Mitglieder umfassende PHIST-Proteinfamilie (engl. *Plasmodium Helical Interspersed Subtelomeric*) (Sargeant et al., 2006; Oakley et al., 2007). Orthologe sind auch in anderen Plasmodien vorhanden (Sargeant et al., 2006; Carlton et al., 2008; Pain et al., 2008). Alle Mitglieder besitzen eine konservierte ca. 150 Aminosäure lange PHIST-Domäne, auch als PRESAN-Domäne (engl. *Plasmodium RESA N-terminal*) bezeichnet, die aus vier alpha-Helices in einer Tandemstruktur besteht. Anhand der Position von ein bzw. zwei konservierten Tryptophanen, wurde die PHIST-Proteinfamilie in die drei Unterfamilien PHISTa, PHISTb und PHISTc eingeteilt (Sargeant et al., 2006). PFL0045c und PFI1780w zählen zu den PHISTc-Proteinen. PFL0045c konnte in sich schnell bewegenden punktuellen Strukturen in der Wirtszelle detektiert werden. Ein ähnlicher Phänotyp wurde bereits für zwei Mitglieder der HSP40-Familie (engl. *Heat Shock Protein 40*) (PFE0055c, PFA0660w), einem Mitglied der HSP70-Familie (MAL7P1.228) sowie einem Mitglied der FIKK-Kinase-Familie (PFD1175w; FIKK 4.2) beschrieben (Külzer et al., 2010; Külzer et al., 2012; Kats et al., 2014). PFE0055c, PFA0660w (HSP40) und MAL7P1.228 (HSP70-x) kolokalisieren in den gleichen punktuellen Strukturen, die aufgrund des Vorhandenseins einer J-Domäne in den Proteinen als J-Dots bezeichnet wurden (Külzer et al., 2010; Külzer et al., 2012). FIKK 4.2 hingegen lokalisiert nicht in den J-Dots und die Strukturen wurden nach der Kinaseaktivität von FIKK 4.2 als K-Dots benannt (Kats et al., 2014). Ob PFL0045c mit Proteinen in J- oder K-Dots kolokalisiert konnte in dieser Arbeit nicht überprüft werden, da keine spezifischen Antikörper gegen die oben genannten Proteine vorlagen. Aufgrund des Expressionsprofils von PFL0045c in späten Ring- bis frühen Trophozoitenstadien, dem Zeitpunkt an dem auch andere bekannte virulente Proteine exprimiert und exportiert werden, kann vermutet werden, dass PFL0045c ebenfalls wichtige Funktionen bei der Modifikation oder dem Transport von Proteinen an die Erythrozytenoberfläche übernimmt. Dies wird durch die Tatsache bekräftigt, dass viele bereits untersuchte PHISTc-Proteine essentielle Funktionen besitzen und unter anderem an der Translokation von PfEMP1 an die Erythrozytenoberfläche beteiligt sind (Maier et al., 2008; Oberli et al., 2014). Ebenfalls konnte durch KO-Zelllinien für PFA0660w und FIKK4.2 gezeigt werden, dass diese bedeutende Aufgaben wie beispielsweise bei der Ausbildung der Knobs übernehmen (Külzer et al., 2010; Kats et al., 2014). Um mögliche Funktionen von PFL0045c zu untersuchen, könnte auch für dieses eine KO-Zelllinie etabliert werden.

Das PHISTc-Protein PFI1780w lokalisierte an der Erythrozytenmembran. Somit könnte PFI1780w eine mögliche Funktion bei der Stabilisierung des Zytoskeletts oder dem Transport von anderen exportierten Proteinen an die Erythrozytenoberfläche übernehmen. Eine größere Anzahl von PHIST-Proteinen interagiert ebenfalls mit der Erythrozytenperipherie und im speziellen mit dem Zytoskelett (Foley et al., 1991; Ruangjirachuporn et al., 1991; Foley et al., 1994; LaCount et al., 2005; Parish et al.,

2013; Tarr et al., 2014). So interagiert beispielsweise das PHIST-Protein RESA mit Spektrin des Zytoskeletts (Foley et al., 1991; Ruangjirachuporn et al., 1991; Foley et al., 1994) und wirkt stabilisierend durch den Schutz gegenüber thermisch-induzierter Denaturierung und Dissoziation (Da Silva et al., 1994; Silva et al., 2005; Pei et al., 2007). Für eine stabilisierende Funktion von PFI1780w spricht die im Rahmen einer Bachelorarbeit gezeigte Interaktion mit dem Zytoskelett des Erythrozyten (Steinfurth, 2014). Ebenso interagiert PFI1780w mit der ATS-Domäne (engl. *Acidic Terminal Segment*) von PfEMP1 (Mayer et al., 2012; Oberli et al., 2014) und könnte somit ein Bindeglied zwischen PfEMP1 und dem Zytoskelett darstellen. Ähnliche Interaktionen wurden ebenfalls für das PHISTb-Protein PFE1605w gezeigt (Oberli et al., 2014; Proellocks et al., 2014). Da für eine große Anzahl an PHIST-Proteinen eine Assoziation mit der Erythrozytenperipherie bestätigt wurde, könnte die generelle Funktion dieser PHIST-Proteine in der Verknüpfung von Zytoskelett- oder Zytoskelett-assoziierten Proteinen liegen. PFA0610c, welches in dieser Arbeit als exportiertes Protein identifiziert wurde, hat einen ähnlichen Phänotyp wie PFI1780w. Inwiefern PFA0610c mit dem Zytoskelett oder mit PfEMP1 interagiert und welche Funktionen es in der Wirtszelle übernimmt müsste jedoch noch geklärt werden.

Die Fusionsproteine PFF0335c und PFD1205w wurden nur im geringen Maß in die Wirtszelle exportiert. Beide Proteine zeigten als Vollängenfusionsprotein eine Maurer'sche Spalten-ähnliche Verteilung im Erythrozyten, wobei sowohl für PFD1205w als auch PFF0335c eine Assoziation mit den Maurer'schen Spalten nicht bestätigt werden konnte. Aufgrund dieser Ergebnisse ist nicht sicher, ob die beiden Proteine wirklich in die Wirtszelle exportiert werden. Dies müsste mit spezifischen Antikörpern gegen das jeweilige endogene Protein überprüft werden. Interessanterweise gibt es Hinweise, dass PFF0335c ein gutes Antigen für einen potentiellen Malariaimpfstoff darstellen könnte (Osier et al., 2014). Dabei waren Antikörper gegen PFF0335c im Blut kenianischer Kinder nachweisbar, welche eine Semiimmunität gegenüber Malaria besaßen. Damit Antikörper gegen Proteine gebildet werden können, muss das entsprechende Protein wiederholt und direkt dem humoralen Immunsystem präsentiert werden. Somit könnte PFF0335c zum einen auf der Oberfläche von Merozoiten oder Erythrozyten lokalisieren. Zum anderen wäre es möglich, dass PFF0335c in der PV akkumuliert und erst beim Aufplatzen der Erythrozyten in die Blutbahn gelangt und dem menschlichen Immunsystem präsentiert wird. Dadurch könnte PFF0335c an einem so genannten „*smoke-screen*“ beteiligt sein. Nach der „*smoke-screen-Hypothese*“ wird die Immunantwort auf niedrigaffine, weniger effiziente Antigene des Parasiten, welche im Überschuss vorliegen, gelenkt. Dadurch wird die Ausbildung hochaffiner schützender Antikörper gegen funktionell wichtige Epitope behindert (Anders, 1986; Kemp et al., 1987; Schofield & Uadia, 1990).

4.3 Sind PEXEL-Motive mit geladenen Aminosäuren an Position 2 und 4 funktionell?

Anhand der Lokalisationen konnten somit Rückschlüsse auf die putativen Funktionen der jeweiligen Proteine gezogen werden. Auffällig ist, dass ein Großteil (19) der untersuchten Proteine mit alternativem PEXEL-Motiv nicht exportiert wurde. Dies stimmt jedoch mit statistischen Analysen überein, wobei bei Vorhersagen von Proteinen mit alternativem PEXEL-Motiv ein relativ hoher Anteil an Falsch-Positiven Proteinen identifiziert wurde (Schulze et al., in Vorbereitung). Des Weiteren besitzen einige nicht exportierte und zwei exportierte Proteine (PFF0335c und PF08_0004) geladene Aminosäuren an Position 2 und/oder 4 des alternativen PEXEL-Motivs. Zu diesen Proteinen gehört das vermutlich nicht exportierte PFD1205w (vgl. Kap. 4.2.2), welches der mit drei Mitgliedern umfassenden Proteinfamilie Hyp15 angehört (Sargeant et al., 2006). Die anderen beiden Mitglieder (PFB0953w und PF14_0743) besitzen im Vergleich zu PFD1205w ein klassisches PEXEL-Motiv mit neutralen Aminosäuren an Position 2 und 4, wobei diese zum alternativen PEXEL von PFD1205w konserviert sind (vgl. Abb. 4.3). Die Lokalisation von PFB0953w und PF14_0743 wurde bisher nicht bestimmt. Dabei wäre es interessant, ob diese exportiert werden. Falls diese exportiert werden, würde es stark darauf hindeuten, dass PFD1205w die Fähigkeit zum Export verloren und eine neue Funktion erlangt hat.

Hyp15

```

PFB0953w : MKFFYINIFLLFVSLRHFISLYKDYNKKYNYKNEIYN----SFFNLNITRSLAEYGK-- : 53
PFD1205w : MNFCSE-IFLFTVTLRVILATKKNIHKKDLYKDNNKNSSRVKCATKEPVYHELSQN---- : 55
PF14_0743 : MNFFYVKIFSLFVLRICEVFHTSEINILKYKHGKKM----CAEKFI FVRSLS EEVKEK : 55
          * *      **      **              **              * *
PFB0953w : -----EEFMKHTLTNSSLRNETILNDKLRKRNDGINNRYNVNQMDENLQDRQ : 100
PFD1205w : -----DILYENFVKYDKEKNKKNVDKGINDKNYSRN--ILNNENSEDIFESIKRVE : 104
PF14_0743 : NLNTKIAECDLIYDILEKFKSLKYRNLI NNREIDSYHKRK--KQKEKKLQDKIIRQKMKKE : 113
                      *                      *      *

```

Abbildung 4.3 : Ausschnitt des Sequenzalignments der Mitglieder der Proteinfamilie Hyp15. Das in dieser Arbeit untersuchte Protein PFD1205w ist grün hervorgehoben. Das Signalpeptid ist blau und die putativen PEXEL dunkelgrau dargestellt. Identische Aminosäuren sind durch einen Stern * gekennzeichnet.

Die Frage ist nun, ob die geladene Aminosäure (Glutaminsäure (E)) an Position 2 des alternativen PEXEL-Motivs von PFD1205w Einfluss auf den Export des Proteins in die Wirtszelle hat? In dieser Arbeit konnte anhand des Reporterproteins REX3 gezeigt werden, dass geladene Aminosäuren wie Lysin an den Positionen 2 und 4 des PEXEL-Motivs den Export blockieren können. Dabei findet zwar eine Erkennung des veränderten PEXEL-Motivs durch Plasmepsin V statt und dieses wird gespalten, aber das prozessierte Protein wird nicht exportiert. Dies stimmt mit Ergebnissen von Tarr und Kollegen (2013) überein, die gezeigt haben, dass die PEXEL-Position 4 wichtig für den Export von Proteinen ist. Auch diese haben die PEXEL-Position 4 in unterschiedlichen Reporterproteinen durch eine geladene Aminosäure (Asparaginsäure (D)) ausgetauscht, was zu einer Blockierung des Exports

geführt hat, aber nicht zu einer Inhibition der Prozessierung durch Plasmepsin V (vgl. Kap. 4.1) (Tarr et al., 2013). Ob ein Austausch durch eine ungeladene Aminosäure an dieser PEXEL-Position denselben Effekt zeigen würde ist jedoch unklar. Da in dieser Arbeit bei dem Reporterprotein REX3 sowohl die Position 2 als auch 4 des Motivs gleichzeitig durch die Aminosäure Lysin ersetzt wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, welchen Einfluss die Aminosäureposition 2 für den Export hat. Daher müsste die PEXEL-Position 2 unabhängig von der Position 4 untersucht und charakterisiert werden. Hinzu kommt, dass geladene Aminosäuren an der PEXEL-Position 2 oder 4 bei Proteinen mit klassischem PEXEL-Motiv nicht selten vorkommen. Etwa 10% der Proteine mit klassischem PEXEL-Motiv aus dem aktuellen Exportom von Boddey et al. (2013) besitzen eine geladene Aminosäure an Position 2 oder 4 (vgl. Tab. G.1 im Anhang G). Viele dieser Proteine werden exportiert (Hiller et al., 2004; Kilili & LaCount, 2011; Brandt & Bailey, 2013; Oberli et al., 2014) (vgl. Tab. 4.2). Für HRPII und PFE1615c konnte die Funktionalität des PEXEL-Motivs bestätigt werden (Hiller et al., 2004). Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Funktionalität des PEXEL-Motivs bei einigen Proteinen, welche geladene Aminosäuren an der PEXEL-Position 2 oder 4 besitzen, aufgrund der Annotation in PlasmoDB und deren Lokalisation, wie zum Beispiel von Plasmepsin IV in der Nahrungsvakuole (Banerjee et al., 2002), ausgeschlossen werden kann (vgl. Tab. G.1 im Anhang G). Letztendlich ist eine Funktionalität von Proteinen mit alternativem PEXEL-Motiv, welche eine geladene Aminosäure an Position 2 oder 4 aufweisen, durchaus denkbar.

Tab. 4.2: Ausgewählte klassische PEXEL-Proteine mit geladenen Aminosäuren an Position 2 oder 4 aus dem aktuellen Exportom (Boddey et al., 2013), für die ein Export bestätigt ist.

Gen ID	Annotation in PlasmoDB V12.0	PEXEL	Lokalisation	Referenz
PF10_0378	RESA-like protein with PHIST and DnaJ domain	RKLYS	Zytoskelett des Erythrozyten	Kilili & LaCount, 2011
PFD0095c	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTb), unknown function	RKLYHE	Zytoskelett des Erythrozyten	Kilili & LaCount, 2011
PFD1165w	serine/threonine protein kinase, FIKK family	RHLTE	Zytoskelett des Erythrozyten	Brandt & Bailey, 2013
PFE1605w	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTb), unknown function	RKLCE	Zytoskelett des Erythrozyten	Oberli et al., 2014
PFE1615c	<i>Plasmodium</i> exported protein, unknown function	RILKQ	Erythrozytzytoplasma	Hiller et al., 2004
MAL7P1.231	Histidine Rich Protein II (HRPII)	RLLHE	Erythrozytzytoplasma	Hiller et al., 2004

4.4 Handelt es sich bei den exportierten Proteinen wirklich um Proteine mit funktionellem alternativem PEXEL-Motiv oder um PNEPs?

Allein anhand des Exports der in dieser Arbeit charakterisierten Proteine kann nicht sicher gesagt werden, dass das alternative PEXEL-Motiv funktionell ist. Eine Funktionalität eines PEXEL-Motivs ist

durch die Tatsache gekennzeichnet, dass es durch Plasmepsin V prozessiert und anschließend N-acetyliert wird (vgl. Abb. 4.4) (Boddey et al., 2013). Erst nach der Prozessierung am PEXEL-Motiv wird das Protein exportiert.

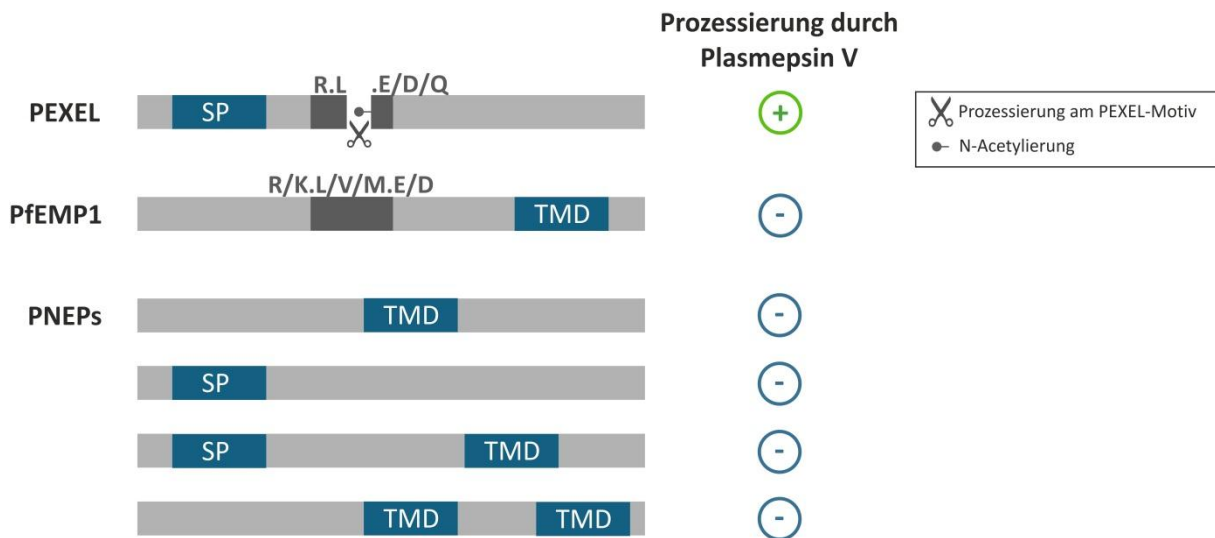


Abbildung 4.4: Vergleich zwischen Proteinen mit PEXEL-Motiv, PfEMP1-Proteinen und PNEPs. Schematische Darstellung der unterschiedlichen Typen an exportierten Proteinen (grau). Signalpeptide (SP) und Transmembrandomänen (TMD) sind blau dargestellt. Eine Prozessierung durch Plasmepsin V ist durch eine Schere bzw. durch ein Plus (+) gekennzeichnet. Nicht durch Plasmepsin V prozessierte Proteine sind mit einem Minus (-) markiert.

Bei den in dieser Arbeit identifizierten exportierten Proteinen ist es ebenso denkbar, dass es sich um PNEPs handeln könnte. So konnte bereits für zwei Mitglieder der SURFIN-Proteinfamilie (engl. *Surface-associated Interspersed*) (Winter et al., 2005), welche ein alternatives PEXEL-Motiv (RKIFE; KQLWE) besitzen, bestätigt werden, dass dieses nicht am Export der Proteine beteiligt ist (Alexandre et al., 2011; Zhu et al., 2013). Obwohl die genaue Zahl der PNEPs nicht bekannt ist, machen sie vermutlich einen beachtlichen Anteil des Exportoms von *P. falciparum* und anderer Malariaerreger aus (Spielmann et al., 2006b; Alexandre et al., 2011; Heiber et al., 2013; Zhu et al., 2013). Ein Großteil der bisher bekannten PNEPs wie z.B. SBP1, REX1, REX2, MAHRP1 und MAHRP2 besitzen eine konservierte Proteinstruktur mit einer einzelnen internen Transmembrandomäne (vgl. Abb. 4.4). PNEPs können aber auch andere Proteinstrukturen aufweisen (vgl. Abb. 4.4) (Külzer et al., 2012; Heiber et al., 2013). Eines der wichtigsten Merkmale, welche PNEPs von Proteinen mit PEXEL-Motiv unterscheidet ist, dass diese nicht durch Plasmepsin V prozessiert werden (Boddey et al., 2013). Bei einigen PNEPs spielt hingegen der N-Terminus und eine spezifische Transmembrandomäne (wenn vorhanden) für den Export eine Rolle (Haase et al., 2009; Spielmann & Gillberger, 2010; Grüning et al., 2012; Heiber et al., 2013; Zhu et al., 2013). Interessanterweise scheinen PfEMP1-Proteine ein „Bindeglied“ zwischen PNEPs und Proteinen mit PEXEL-Motiv

darzustellen (vgl. Abb. 4.4). Die PfEMP1-Proteine besitzen entweder ein klassisches oder ein alternatives PEXEL-Motiv (R/K.L/V/M.E/D) (vgl. Abb. 4.4) (Goldberg & Cowman, 2010), welches für den Export von PfEMP1 notwendig zu sein scheint (Marti et al., 2004; Knuepfer et al., 2005). Sie besitzen allerdings kein SP, aber alle PfEMP1-Proteine weisen eine C-terminal gelegene Transmembrandomäne auf. Diese Transmembrandomäne ist am Transport von PfEMP1 involviert (Knuepfer et al., 2005; Melcher et al., 2010). Somit weist PfEMP1 eine Strukturähnlichkeit zu bekannten PNEPs wie SBP1, REX1, REX2, MAHRP1 und MAHRP2 auf (vgl. Abb. 4.4). Eine weitere Ähnlichkeit zu PNEPs ist, dass PfEMP1-Proteine nicht durch Plasmeypsin V prozessiert werden (Melcher et al., 2010; Boddey et al., 2013). Daher wurden PfEMP1-Proteine als PNEPs definiert (Boddey et al., 2013). Aufgrund der Merkmale von Proteinen mit PEXEL-Motiv und PNEPs sprechen drei wesentliche Punkte dafür, dass es sich bei den in dieser Arbeit identifizierten exportierten Proteinen um Proteine mit funktionellem alternativem PEXEL-Motiv handelt:

1) Ein Großteil der exportierten Proteine (PFA0610c, PFA0135w, PFC0085c, PFI1780w, PFL0040c, PFL0045c und PFL0070c) weist typische Eigenschaften von Proteinen mit klassischem PEXEL-Motiv auf (Sargeant et al., 2006; van Ooij et al., 2008). So besitzen alle diese Proteine ein SP mit einem im kurzen Abstand folgendem alternativem PEXEL-Motiv (vgl. Abb. 4.4). Dabei besitzen die Gene der exportierten Proteine eine Zwei-Exon-Struktur mit dem SP im ersten Exon und dem alternativen PEXEL-Motiv im zweiten Exon, was typisch für Proteine mit klassischem PEXEL-Motiv ist (Sargeant et al., 2006; van Ooij et al., 2008). Wie bei den meisten bekannten exportierten Proteinen befindet sich das PEXEL, mit Ausnahme von PFA0135w, innerhalb der ersten 30 Aminosäuren hinter dem SP. Allerdings gibt es auch hier Ausnahmen bei Proteinen mit klassischem PEXEL-Motiv. So beginnt beispielweise das PEXEL-Motiv (RLLVD) von PIESP1 (engl. *Parasite-infected Erythrocyte Surface Protein 1*) 66 Aminosäuren hinter dem SP. Ein Export konnte für dieses bereits bestätigt werden (Florens et al., 2004).

2) Einige exportierte Proteine gehören Proteinfamilien wie Hyp11, PHISTc oder FIKK-Kinasen an, die hauptsächlich Proteine mit einem klassischen PEXEL-Motiv besitzen (vgl. Abb. 4.5). So sind die alternativen PEXEL-Motive der PHISTc-Proteine PFI1780w und PFL0045c und der FIKK-Kinase PFL0040c zu den klassischen PEXEL-Motiven paraloger PHISTc-Proteine bzw. FIKK-Kinasen konserviert (vgl. Abb. 4.5B und 4.5C). Ähnliches konnte für PFA0610c beobachtet werden. Dieses gehört neben drei weiteren Proteinen und dem in dieser Arbeit untersuchten PFI1750c in die Proteinfamilie Hyp11 (Sargeant et al., 2006). Zwei Mitglieder besitzen ein klassisches PEXEL- (PFB0110w und PFI1750c) und drei Mitglieder ein alternatives PEXEL-Motiv (PF11_0504, PF11_0041 und PFA0610c). Die PEXEL-Motive der unterschiedlichen Mitglieder sind auch in der Hyp11-Proteinfamilie konserviert (vgl. Abb. 4.5A).

A Hyp11

```

PF11_0504 : MKV-LNISFLNEKFRSI--NNILKNNCFFKEQYVYIK----LYINKKTFNLSLLLRILL : 53
PFA0610c : MK-----KSYTFIN-----VTILLFL : 16
PF11_0041 : MK-----KQYELITPSWVLKICRKYK--HTIKKIILI : 30
PFB0110w : MHILLNMCFHNDICRKTCKKQLCNIFFFFTPFLYIITLNVDIDKKKNIFKDYIYSILL : 60
PFI1750c : ML-----TVILKILVV : 11
*
PF11_0504 : IIMILKFSLLY-----NKKNVVMYFIEEKQLYYPFNETCSRYRRIVAEEQHEIELDE : 105
PFA0610c : TLLLFLTYNY--DTFSKTKFNNNIKIDI-----NRFKRIAEASEEQKYP- : 60
PF11_0041 : TNLFFVVFIS--NDFSLHHVKNINKYGIN-NKLYQHNI--TRYDRILTEHVKHL---- : 81
PFB0110w : LILLWRNNYSYSDNFYVKKSIKNITREKK-----YMYQRIIVEREDVI---- : 103
PFI1750c : SLLIWKLSYSN--DTRQLDSFSSIQK----NFLSYDMLI--IRNERILSEQHDEND--- : 59
* *

```

B PHISTc

```

PFI1780w : M-----AVSTYNNTRNGLRYVL---KRRTI-LSVFAVICMLSLSNLSI--- : 39
PF10_0022 : M-----DKTNYSIKMFTYSS---SKPKI-LSFLGIVLICIMNLWI--- : 37
PFD1140w : M-----YSNCLRHRPHLSLCVFLLCIFYVFFKP--- : 29
MAL13P1.4 : ME--YLKK---TLFISEKNKLWMKKERQYKK-YRSRNYI-GYRCLIVSLLIFYLIIQLS : 52
PFL0045c : MNGENVKKQVCRTLHSMGGCNMYIRRM---YRSLISLKPR--GFIIGIYIYILYNVLC--- : 53
*
PFI1780w : -----FENNNNNYGFHCNKRHFKSLAE----- : 61
PF10_0022 : -----YKNKGT-SNFHEGKVHRTLSLSD----- : 58
PFD1140w : -----TAYHKSS--GSCVNSLWSRNLSE-PNNSRNSNLYNNKLKSNPYDSKFRNDI-- : 78
MAL13P1.4 : YDNFGENTYNSNDS----IIRNRDSRILYEFLSNSYEDHYNDYVNVEEFN-DFSNDILE : 107
PFL0045c : -----IHEKNSISKFELDRKYSKMLCE-LYTS-NRDYFRKKNHENYACNNNNNIYA : 103
*

```

C FIKK-Kinase

```

PFL0040c : M-----YILRNM----- : 7
PFC0060c : M--FNFILYDLNLTP--KKNLIYKSKYIKEYTYNYFNYVISNKEPKYFLCEF----- : 48
PF11_0510c : M----- : 1
PF10_0160c : MTLIN-----RSYVLFGEKLK-----INYINIKKKKKFLSDYSCRKKGNC : 41
PFI0100c : MSFYNCSDYNFNKDQLCNKNVYSEIKI IAPFHKN---VEESKKINYNLKTW----- : 48
*
PFL0040c : ---FCIKFMLYFLWL---LYLLFLNIEFIKFTFQSLVSYDR-PSKCLSENSKHVNND : 59
PFC0060c : ---LTHRCTVTF---LGILYFILIFSGTFNHTSVSSYQIKEKAYCRFLSEHDYVKDCSD : 101
PF11_0510c : ---IYIKLRLYIFWF---LFLILNLTLTDRKIFEYIRLIDI-YFRILYEYNGINKLCG : 53
PF10_0160c : KYGMSTVHTLYFIWFLVGLTYFFLSIFDKDGMKSVSDLVIIQR-YNRCLAEFGSVRNIFN : 100
PFI0100c : ---LSRCLIIAQ---TIILVYTYLPHNLVLSNINSDSISCKGIIRNLSEPCVKNEKSH : 101
* *

```

Abbildung 4.5: Ausschnitte von Sequenzalignments der Mitglieder der Hyp11-Proteinfamilie (A) bzw. ausgewählter Mitglieder der Proteinfamilien PHISTc (B) und FIKK-Kinase (C). Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine sind grün hervorgehoben. Signalpeptide sind blau und putative PEXEL dunkelgrau dargestellt. Identische Aminosäuren sind durch einen Stern * gekennzeichnet.

3) Wie schon oben erwähnt ist eines der wichtigsten Merkmale, welches Proteine mit PEXEL-Motiv von PNEPs unterscheidet, die Eigenschaft, dass diese am PEXEL-Motiv durch die Protease Plasmepsin V prozessiert und anschließend acetyliert werden (Boddey et al., 2013). Exemplarisch konnte für drei Proteine (PFC0085c, PFI1780w und PFL0045c) die Prozessierung am alternativen PEXEL mit Hilfe von Mutationsstudien und teilweise mittels Massenspektrometrie bewiesen werden. Für die Mutationsstudien wurde das alternative PEXEL-Motiv von PFC0085c, PFI1780w und PFL0045c an der Aminosäureposition 1 durch Alanin und Glutaminsäure ersetzt. Es lag eine unterschiedliche Toleranz der GFP-Fusionsproteine, ähnlich wie bei KAHRP, REX3 und GBP, gegenüber den ausgetauschten Aminosäuren im PEXEL-Motiv vor (vgl. Kap. 4.1 und Abb. 4.6). Bei allen drei Reporterproteinen fand beim Austausch des Lysins durch Alanin (A.L.E) immer noch ein effizienter bzw. moderater Export des Fusionsproteins statt (vgl. Abb. 4.6). Dies konnte ebenfalls bei dem

Reporterprotein GBP beobachtet werden, nicht jedoch für REX3 (vgl. Kap. 4.1) Bei dem E.L.E-Motiv war der Export des GFP-Fusionsproteins bei PFI1780w und PFL0045c reduziert oder blockiert, wohingegen der Export bei PFC0085c in allen Zellen vollkommen blockiert war (vgl. Abb. 4.6). Hinzu kommt, dass die Bandenmuster im Westernblot vermuten lassen, dass sowohl PFC0085c als auch PFI1780w am alternativen PEXEL-Motiv (K.L.E) prozessiert werden (vgl. Abb. 4.6). Die Mutationsstudien waren der erste eindeutige Beleg, dass das alternative PEXEL-Motiv dieser Proteine funktionell ist.



Abbildung 4.6: Funktionalität der alternativen PEXEL-Motive von PFC0085c, PFI1780w und PFL0045c. Schematische Darstellung der Proteine (grau) mit Signalpeptid (SP) (blau) und alternativen PEXEL-Motiven (grau und weiß). „Putative“ Prozessierungen sind durch eine Schere gekennzeichnet. Effizient exportierte (+++; Anteil an exportiertem Reporterprotein in der Wirtszelle >75%), moderat exportierte (++; Anteil an exportiertem Reporterprotein in der Wirtszelle >50%) und schwach exportierte (+; Anteil an exportiertem Reporterprotein in der Wirtszelle <50%) Reporterproteine sind mit einer unterschiedlichen Anzahl von Pluszeichen markiert. Nicht exportierte Reporterproteine sind durch ein Minus (-) gekennzeichnet. *K.L.D: Zweites alternatives PEXEL-Motiv in PFI1780w, welches bei der Mutation des ersten alternativen PEXEL-Motivs (K.L.E→A.L.E) vermutlich prozessiert wird.

Der zweite und wohl wichtigste Beleg für die Funktionalität von alternativen PEXEL-Motiven in endogenen *P. falciparum*-Proteinen war der Nachweis, dass PFI1780w tatsächlich am alternativen PEXEL-Motiv (K.L.E) prozessiert wird. Mittels Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass dieses zwischen der PEXEL-Position 3 und 4 vermutlich durch Plasmeypsin V proteolytisch gespalten und anschließend N-acetyliert wird. Für die Funktionalität des alternativen PEXEL-Motivs von PFI1780w gab es schon in früheren Studien Hinweise, wobei durch Massenspektrometrie am alternativen PEXEL-Motiv prozessierte Peptide von PFI1780w in infizierten Erythrozyten nachweisbar

waren (Boddey et al., 2009; Silvestrini et al., 2010). Interessant ist, dass Silvestrini et al. (2010) Gametozyten untersucht hat, was neben einer Funktion im asexuellen Stadium auf eine Funktion von PFI1780w in der Gametogenese hindeutet. Ebenfalls konnten Peptide von PFC0085c im Erythrozyten identifiziert werden, bei denen eine Spaltung und N-Acetylierung am alternativen PEXEL-Motiv vorlag (Boddey et al., 2009). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass exemplarisch für PFI1780w und PFC0085c gezeigt werden konnte, dass diese am alternativen PEXEL-Motiv prozessiert werden. Auch das alternative PEXEL von PFL0045c scheint Export zu vermitteln, wobei der Nachweis einer Prozessierung am diesem noch aussteht. Aufgrund dieser Eigenschaften kann somit davon ausgegangen werden, dass es sich bei einem Großteil der hier identifizierten exportierten Proteine um Proteine mit funktionellem alternativen PEXEL-Motiv handelt und nicht um PNEPs.

4.5 Die Bedeutung des Sequenzumfeldes bei Proteinen mit alternativem PEXEL-Motiv

Auffällig bei den Analysen der Reporterproteine PFC0085c, PFI1780w und PFL0045c war, dass trotz des Austauschs der PEXEL-Position 1 durch Alanin bzw. Glutaminsäure ein Export der Fusionsproteine in die Wirtszelle vermittelt wurde. Die Exporteffizienz war dabei abhängig vom jeweiligen Reporter (vgl. Abb. 4.6). Generell scheint das Sequenzumfeld bei Proteinen mit alternativem PEXEL-Motiv wichtiger für den Export zu sein als bei Proteinen mit klassischem PEXEL-Motiv (vgl. Kap. 4.1 und Abb. 4.7), was sich im speziellen in der Toleranz gegenüber der Aminosäure Alanin bzw. Glutaminsäure an der alternativen PEXEL-Position 1 zeigte (vgl. Abb. 4.7).

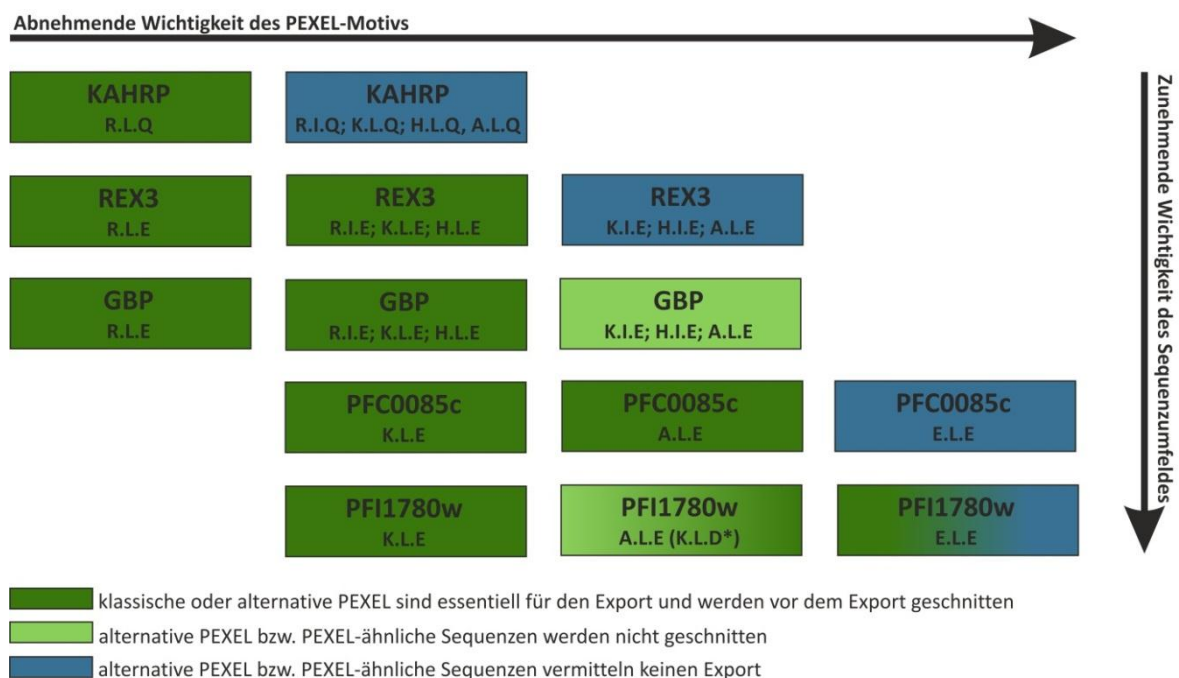


Abbildung 4.7: Einfluss des Sequenzumfeldes bei Proteinen mit alternativem PEXEL-Motiv. Zu- bzw. abnehmende Wichtigkeiten sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. K.L.D*: Zweites alternatives PEXEL in PFI1780w.

So wurde lediglich GBP mit einem A.L.E-Motiv exportiert, nicht jedoch KAHRP oder REX3 (vgl. Kap. 4.1 und Abb. 4.7). Hinzu kommt, dass GBP nicht am A.L.E-Motiv prozessiert wurde, sondern vermutlich am oder nahe dem SP. In diesem Fall fand ein PEXEL-unabhängiger Export von GBP statt (vgl. Kap. 4.1). Im Gegensatz dazu wurde PFC0085c mit A.L.E-Motiv effizient exportiert und vermutlich an diesem prozessiert (vgl. Abb. 4.6 und 4.7). Auch bei PFI1780w lag eine Prozessierung am E.L.E-Motiv vor. Im Vergleich dazu wurde PFI1780w mit A.L.E-Motiv hinter dem alternativen PEXEL prozessiert. Interessanterweise besitzt PFI1780w 22 Aminosäuren hinter dem ersten alternativen PEXEL- ein weiteres putatives PEXEL-Motiv (KSLSD) (vgl. Abb. 4.6 und Abb. 4.7). Dieses könnte für den Export von PFI1780w mit A.L.E-Motiv verantwortlich sein und anstatt des ersten alternativen PEXEL-Motivs prozessiert worden sein. Dies zeigt, dass Veränderungen am alternativen PEXEL-Motiv durch das Sequenzumfeld ausgeglichen werden können. Es kann nur spekuliert werden, dass das Sequenzumfeld Einfluss auf die Erkennung des alternativen PEXEL-Motivs durch die Protease Plasmepsin V hat. So konnte bereits in früheren Studien beobachtet werden, dass das alternative PEXEL-Motiv von PFA0610c (RIIAE) nur im geringen Maße durch aufgereinigtes Plasmepsin V geschnitten wird (Boddey et al., 2013). Das klassische PEXEL-Motiv von KAHRP wurde jedoch effizient durch Plasmepsin V prozessiert. Für die Untersuchungen wurden ca. 20 Aminosäuren lange Peptide des jeweiligen Proteins benutzt, welche das klassische bzw. alternative PEXEL und eine entsprechende Anzahl Aminosäuren vor und hinter dem jeweiligen PEXEL umfassten. Dabei war das Peptid von PFA0610c etwas kürzer als von KAHRP. Zum einen könnte es sein, dass die Protease Plasmepsin V gar nicht für die Prozessierung von Proteinen mit alternativem PEXEL-Motiv zuständig ist. Tatsächlich konnte auch in dieser Arbeit nicht direkt gezeigt werden, dass PFC0085c und PFI1780w durch die Protease Plasmepsin V geschnitten werden, sondern es war lediglich eine Prozessierung am alternativen PEXEL-Motiv nachweisbar. Eventuell werden alternative PEXEL-Motive durch eine andere Protease erkannt und prozessiert. Zum anderen ist es möglich, dass die fehlenden Sequenzinformationen für PFA0610c dazu geführt haben, dass das alternative PEXEL nicht durch Plasmepsin V erkannt und dadurch auch nicht prozessiert wurde. Bei den Proteinen mit klassischem PEXEL-Motiv, wie z.B. KAHRP, ist das Sequenzumfeld nicht im gleichen Maße wichtig, so dass trotz der Kürze des Peptides das PEXEL-Motiv erkannt und geschnitten wird. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass das Sequenzumfeld bei alternativen PEXEL-Motiven im Vergleich zum klassischen PEXEL-Motiv an Bedeutung gewinnt, so dass Abweichungen in der Aminosäurezusammensetzung des PEXEL-Motivs vom Sequenzumfeld ausgeglichen werden können.

4.6 Fazit

In dieser Arbeit wurde das erste Mal der Beweis erbracht, dass es Proteine mit alternativen PEXEL-Motiven in *P. falciparum* gibt. Des Weiteren konnte die Funktionalität dieser alternativen Motive

bestätigt werden. Dabei machen Proteine mit alternativem PEXEL-Motiv jedoch nur einen relativ kleinen Teil des Exportoms aus. Durch den Export und der Lokalisation in unterschiedlichen Kompartimenten in der Wirtszelle kann diesen Proteinen eine vermutlich essentielle Funktion bei der Modifikation des Erythrozyten und damit der Virulenz von *P. falciparum* zugeschrieben werden. Dies zeigt wie wichtig es ist, dass gesamte Exportom von *P. falciparum* und anderer Malariaerreger zu kennen, damit physiologische Prozesse und Funktionen verstanden und geeignete Medikamente und Impfstoffe entwickelt werden können.

5 Literaturverzeichnis

Anders, R.F. (1986) Multiple cross-reactivities amongst antigens of *Plasmodium falciparum* impair the development of protective immunity against malaria. *Parasite Immunol*, 8: 529-539.

Agnandji, S.T., Lell, B., Fernandes, J.F., Abossolo, B.P., Methogo, B.G., Kabwende, A.L., Adegnik, A.A., Mordmüller, B., Issifou, S., Kremsner, P.G., et al. (2012) A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med*, 367: 2284-2295.

Agusto, F.B. del Valle, S.Y., Blayneh, K.W., Ngonghala, C.N., Goncalves, M.J., Li, N. Zhao, R. and Gong, H. (2013) The impact of bed-net use on malaria prevalence. *J Theor Biol*, 320: 58-60.

Aikawa, M., Helper, P.K., Huff, C.G. and Sprinz, H. (1966) The feeding mechanism of avian malarial parasites. *J Cell Biol*, 28: 355-373.

Aingaran, M., Zhang, R., Law, S.K., Peng, Z., Undisz, A., Meyer, E., Diez-Silva, M., Burke, T.A., Spielmann, T., Lim, C.T., et al. (2012) Host cell deformability is linked to transmission in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell Microbiol*, 14: 983-993.

Alexandre, J.S., Yahata, K., Kawai, S., Torii, M. and Kaneko, O. (2011) PEXEL-independent trafficking of *Plasmodium falciparum* SURFIN4.2 to the parasite-infected red blood cell and Maurer's clefts. *Parasitol Int*, 60: 313-320.

Alonso, P.R. (2006) Malaria: deploying a candidate vaccine (RTS,S/AS02A) for an old scourge of humankind. *Int Microbiol*, 9: 83-93.

Amino, R., Giovannini, D. Thiberge, S., Gueirard, P., Boisson, B., Dubremetz, J.F., Prevost, M.C., Ishino, T., Yuda, M. and Menard, R. (2008) Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe*, 3: 88-96.

Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F. and Menard, R. (2006) Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature medicine*, 12: 220-224.

Angrisano, F., Tan, Y-H., Sturm, A., McFadden, G.I. and Baum, J. (2012) Malaria parasite colonisation of the mosquito midgut – Placing the *Plasmodium* ookinete centre stage. *Int J Parasitol*, 42: 519-527.

Anyona, S.B., Schrier, S.L., Gichuki, C.W. and Waitumbi, J.N. (2006) Pitting of malaria parasites and spherocyte formation. *Malar J*, 5: 64.

Arese, P. and Schwarzer, E (1997) Malaria pigment (haemozoin): a very active “inert” substance. *Ann Trop Med Parasitol*, 91: 501-516.

Bachmann, A., Esser, C., Petter, M., Predehl, S., von Kalckreuth, V. Schmiedel, S., Bruchhaus, I. and Tannich, E. (2009) Absence of erythrocyte sequestration and lack of multicopy gene family expression in *Plasmodium falciparum* from a splenectomized malaria patient. *PLoS One*, 4: e7459.

Baer, K., Klotz, C., Kappe, S.H., Schnieder, T. and Frevert, U. (2007) Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog*, 3: e171.

Banerjee, R., Liu, J., Beatty, W., Pelosof, L., Klemba, M. and Goldberg, D.E. (2002) Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 990-995.

Bannister, L.H. and Dluzewski, A.R. (1990) The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells*, 16: 257-292.

- Bannister, L.H., Hopkins, J.M., Fowler, R.E., Krishna, S. and Mitchell, G.H. (2000)** A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol Today*, 16: 427-433.
- Bano, N., Romano, J.D., Jayabalasingham, B. and Coppens, I. (2007)** Cellular interactions of *Plasmodium* liver stage with its host mammalian cell. *Int J Parasitol*, 37: 1329-1341.
- Baruch, D.I., Gormely, J.A., Ma, C., Howard, R.J. and Pasloske, B.L. (1996)** *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intracellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 3497-3502.
- Baruch, D.I., Pasloske, B.L., Singh, H.B., Bi, X., Ma, X.C., Feldman, M., Taraschi, T.F. and Howard, R.J. (1995)** Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*, 82: 77-87.
- Bastianelli, G. and Bignami, A. (1899)** Sulla struttura dei parassiti malarici, e in specie dei gamete dei parassiti estivo-autunnali. *Atti della Società per gli studi della malaria*, 1: 1-13.
- Beck, J.R., Muralidharan, V., Oksman, A. and Goldberg, D.E. (2014)** PTEX component HSP101 mediates export of diverse malaria effectors into host erythrocytes. *Nature*, 511: 592-595.
- Beier, J.C., Davis, J.R., Vaughan, J.A., Noden, B.H. and Beier, M.S. (1991)** Quantitation of *Plasmodium falciparum* sporozoites transmitted *in vitro* by experimentally infected *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Am J Trop Med Hyg*, 44: 564-570.
- Bhattacharjee, S., Hiller, N.L., Liolios, K., Win, J., Kanneganti, T.D., Young, C., Kamoun, S. and Haldar, K. (2006)** The malaria host-targeting signal is conserved in the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathog*, 2: e50.
- Bhattacharjee, S., Speicher, K.D., Stahelin, R.V., Speicher, D.W. and Haldar, K. (2012a)** PI(3)P-independent and -dependent pathways function together in a vacuolar translocation sequence to target malarial proteins to the host erythrocyte. *Mol Biochem Parasitol*, 185: 106-113.
- Bhattacharjee, S., Stahelin, R.V., Speicher, K.D., Speicher, D.W. and Haldar, K. (2012b)** Endoplasmic reticulum PI(3)P lipid binding targets malaria proteins to the host cell. *Cell*, 148: 201-212.
- Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Balu, B., Adams, J.H. and Haldar, K. (2008)** Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum* are secretory organelles that concentrate virulence protein reporters for delivery to the host erythrocyte. *Blood*, 111: 2418-2426.
- Bhowmick, I.P., Kumar, N., Sharma, S., Coppens, I. and Jarori, G.K. (2009)** *Plasmodium falciparum* Enolase: stage-specific expression and subcellular localization. *Malar J*, 8: 179.
- Bian, G., Joshi, D., Dong, Y., Lu, P., Zhou, G., Pan, X., Xu, Y., Dimopoulos, G. and Xi, Z. (2013)** Wolbachia invades *Anopheles stephensi* population and induces refractoriness to *Plasmodium* infection. *Science*, 304: 748-751.
- Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B. and Brinkmann, V. (2004)** Calcium and calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell*, 117: 503-514.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 24: 1513-1523.
- Blisnick, T., Morales Betoulle, M.E., Barale, J.C., Uzureau, P., Berry, L., Desroses, S., Fujioka, H., Mattei, D. and Braun Breton, C. (2000)** Pfsbp1, a Maurer's Cleft *Plasmodium falciparum* protein, is associated with the erythrocyte skeleton. *Mol Biochem Parasitol*, 111: 107-121.

- Boddey, J.A., Carvalho, T.G., Hodder, A.N., Sargeant, T.J., Sleebs, B.E., Marapana, D., Lopaticki, S., Nebl, T. and Cowman, A.F. (2013)** Role of Plasmeprin V in export of diverse protein families from the *Plasmodium falciparum* exportome. *Traffic*, 14: 532-550.
- Boddey, J. and Cowman, A.F. (2013)** *Plasmodium* nesting: Remaking the erythrocyte from the inside out. *Annu Rev Microbiol*, 67:243-269.
- Boddey, J.A., Hodder, A.N., Günther, S., Gilson, P.R., Patsiouras, H., Kapp, E.A., Pearce, J.A., de Koning-Ward, T.F., Simpson, R.J., Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (2010)** An aspartyl protease directs malaria effector proteins to the host cell. *Nature*, 463: 627-631.
- Boddey, J.A., Moritz, R.L., Simpson, R.J. and Cowman, A.F. (2009)** Role of the *Plasmodium* export element in trafficking parasite proteins to the infected erythrocyte. *Traffic*, 10: 285-299.
- Bojang, K.A. (2006)** RTS,S/AS02A for malaria. *Expert Rev Vaccines*, 5: 611-615.
- Borre, M.B., Dziegiel, B., Hogg, B., Petersen, E., Rieneck, K., Riley, E., Meis, J.F., Aikawa, M., Nakamura, K., Harada, M., et al. (1991)** Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Mol Biochem Parasitol*, 49: 119-131.
- Boyle, M.J., Langer, C., Chan, J.A., Hodder, A.N., Coppel, R.L., Anders, R.F. and Beeson, J.G. (2014)** Sequential processing of merozoite surface proteins during and after erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*, 82: 924-936.
- Boyle, M.J., Wilson, D.W. and Beeson, J.G. (2013)** New approaches to studying *Plasmodium falciparum* merozoite invasion and insights into invasion biology. *Inter J Parasitol*, 43: 1-10.
- Brandt, G.S. and Bailey, S. (2013)** Dematin, a human erythrocyte cytoskeletal protein, is a substrate for a recombinant FIKK kinase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 191: 20-23.
- Bray, P.G., Hawley, S.R., Mungthin, M. and Ward, S.A. (1996)** Physicochemical properties correlated with drug resistance and the reversal of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Pharmacol*, 50: 1559-1566.
- Bullen, H.E., Charnaud, S.C., Kalanon, M., Riglar, D.T., Dekiwadia, C., Kangwanrangsang, N., Torii, M., Tsuboi, T., Baum, J., Ralph, S.A., et al. (2012a)** Biosynthesis, localization and macromolecular arrangement of the *Plasmodium falciparum* translocon of exported proteins (PTEx). *J Biol Chem*, 287: 7871-7884.
- Bullen, H.E., Crabb, B.S. and Gilson, P.R. (2012b)** Recent insights into the export of PEXEL/HTS-motif containing proteins in *Plasmodium* parasites. *Curr Opin Microbiol*, 15: 699-704.
- Burghaus, P.A. and Lingelbach, K. (2001)** Luciferase, when fused to an N-terminal signal peptide, is secreted from transfected *Plasmodium falciparum* and transported to the cytosol of infected erythrocytes. *J Biol Chem*, 276: 26838-26845.
- Burns, J.M., Adeeku, E.K., Belk, C.C. and Dunn, P.D. (2000)** An unusual tryptophan-rich domain characterizes two secreted antigens of *Plasmodium yoelii*-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*, 110: 11-21.
- Carlton, J.M., Adams, J.H., Silva, J.C., Bidwell, S.L., Lorenzi, H., Caler, E., Crabtree, J., Angiuoli, S.V., Merino, E.F., Amedeo, P., et al. (2008)** Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature*, 455: 757-763.
- Carruthers, V.B. and Tomley, F.M. (2008)** Microneme proteins in apicomplexans. *Subcell Biochem*, 47: 33-45.

- Chang, H.H., Falick, A.M., Carlton, P.M., Sedat, J.W., DeRisi, J.L. and Marletta, M.A. (2008)** N-terminal processing of proteins exported by malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 160: 107-115.
- Chishti, A.H., Andrabi, K.I., Derrick, L.H., Palek, J. and Liu, S.C. (1992)** Isolation of skeleton-associated knobs from human red blood cells infected with malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 52: 283-287.
- Cohen, C.M. and Gascard, P. (1992)** Regulation and post-translational modification of erythrocytes membrane and membrane-skeletal proteins. *Semin Hematol*, 29: 244-292.
- Cooke, B.M., Buckingham, D.W., Glenister, F.K., Fernandez, K.M., Bannister, L.H., Marti, M., Mohandas, N. and Coppel, R.L. (2006)** A Maurer's cleft-associated protein is essential for expression of the major malaria virulence antigen on the surface of infected red blood cells. *J Cell Biol*, 172: 899-908.
- Cooke, B.M., Mohandas, N. and Coppel, R.L. (2001)** The malaria-infected red blood cell: Structural and functional changes. *Adv Parasitol*, 50: 1-86.
- Coppel, R.L., Daverb, K.M. and McConville, M.J. (1994)** Immunochemistry of parasites antigens. In *Immunochemistry*, ed C.J. van Oss and M.H.V. van Regenmortel, New York, Marcel Dekker: 475-532.
- Counihan, N.A., Kalanon, M., Coppel, R.L. and de Koning-Ward, T.F. (2013)** *Plasmodium* rhoptry proteins: why order is important. *Trends Parasitol*, 29: 228-236.
- Cowman, G.J.M., Bockau, U., Eleni-Muus, J., Aldag, I., Samuel, K., Creasey, A.M., Hartmann, M.W.W. and Cavanagh, D.R. (2014)** A novel malaria vaccine candidate antigen expressed in *Tetrahymena thermophile*. *PLoS One*, 9: e87198.
- Cowman, A.F. and Crabb, B.S. (2006)** Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 124: 755-766.
- Cox, F.E. (2010)** History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors*, 3: 5.
- Cox-Singh, J. and Singh, B. (2008)** *Knowlesi* malaria: newly emergent and public health importance? *Trends Parasitol*, 24: 406-410.
- Crabb, B.S., Cooke, B.M., Reeder, J.C., Waller, R.F., Caruana, S.R., Davern, K.M., Wickham, M.E., Brwon, G.V., Coppel, R.L. and Cowman, A.F. (1997)** Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell*, 89: 187-196.
- Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (1996)** Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 7289-7294.
- Crabb, B.S., Rug, M., Gilberger, T.W., Thompson, J.K., Triglia, T., Maier, A.G. and Cowman, A.F. (2004)** Transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods Mol Biol*, 270: 263-276.
- Crompton, P.D., Pierce, S.K. and Miller, L.H. (2010)** Advances and challenge in malaria vaccine development. *J Clin Invest*, 120: 4168-4178.
- Das, S., Shevade, S., LaCount, D.J. and Jarori, G.K. (2011)** *Plasmodium falciparum* enolase complements yeast enolase functions and associates with the parasite food vacuole. *Mol Biochem Parasitol*, 179: 8-17.
- Da Silva, E., Foley, M., Dluzewski, A.R., Murray, L.J. and Tilley, L. (1994)** The *Plasmodium falciparum* protein RESA interacts with the erythrocyte cytoskeleton and modifies erythrocyte thermal stability. *Mol Biochem Parasitol*, 66: 59-69.

- Day, K.P., Hayward, R.E., Smith, D. and Culvenor, J.G. (1998)** CD36-dependent adhesion and knob expression of the transmission stages of *Plasmodium falciparum* is stage specific. *Mol Biochem Parasitol*, 93: 167-177.
- De Koning-Ward, T.F., Gilson, P.R., Boddey, J.A., Rug, M., Smith, B.J., Papenfuss, A.T., Sanders, P.R., Lundie, R.J., Maier, A.G., Cowman, A.F. and Crabb, B.S. (2009)** A newly discovered protein export machine in malaria parasites. *Nature*, 459: 945-949.
- Dixon, M.W., Hawthorne, P.L., Spielmann, T., Anderson, K.L., Trenholme, K.R. and Gardiner, D.L. (2008)** Targeting of the ring exported protein 1 to the Maurer's cleft is mediated by a two-phase process. *Traffic*, 9: 1316-1326.
- Dixon, M.W., Kenny, S., McMillan, P.J., Hanssen, E., Trenholme, K.R., Gardiner, D.L. and Tilley, L. (2011)** Genetic ablation of a Maurer's cleft protein prevents assembly of the *Plasmodium falciparum* virulence complex. *Mol Microbiol*, 81: 982-993.
- Dondorp, A.M., Lee, S.J., Faiz, M.A., Mishra, S., Price, R., Titra, E., Than, M., Htut, Y., Mohanty, S., Yunus, E.B., Rahman, R., Nosten, F., Anstey, N.M., Day, N.P. and White N.J. (2008)** The relationship between age and the manifestation of and mortality associated with severe malaria. *Clin Infect Dis*, 47: 151-157.
- Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A.P., Tarning, J., Lwin, K.M., Arie, F., Hanpithakpong, W. and Lee, S.J. (2009)** Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*, 361: 455-467.
- Duraisingh, M.T., Triglia, T., Ralph, S.A., Rayner, J.C., Barnwell, J.W., McFadden, G.I. and Cowman, A.F. (2003)** Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *EMBO J*, 22: 1047-1057.
- Döngers, J. (1988)** Parasitologie. *Thieme Verlag*, Stuttgart, 350 p.
- Drag, M. and Salvesen, G.S. (2010)** Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 9: 690-701.
- Dubremetz, J.F. (2007)** Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cellular Microbiol*, 9: 841-848.
- Edi, C.V., Djogbenou, L., Jenkins, A.M., Regna, K., Muskavitch, M.A., Poupardin, R., Jones, C.M., Essandoh, J., Kéto, G.K., Painer, M.J., et al. (2014)** CYP6P450 enzymes and ACE-1 duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Genet*, 10: e1004236.
- Eksi, S., Haile, Y., Furuya, T., Ma, L., Su, X. and Williamson, K.C. (2005)** Identification of subtelomeric gene family expressed during asexual-sexual stage transition in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 143: 90-99.
- Eksi, S., Stump, A., Fanning, S.L., Shenouda, M.I., Fujioka, H. and Williamson, K.C. (2002)** Targeting and sequestration of truncated Pfs230 in an intraerythrocytic compartment during *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis. *Mol Microbiol*, 44: 1507-1516.
- Eksi, S. and Williamson, K.C. (2011)** Protein targeting to the parasitophorous vacuole membrane of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell*, 10: 744-752.
- Elmendorf, H.G. and 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: 4763-4773.

- El Sahly, H.M., Patel, S.M., Atmar, R.L., Lanford, T.A., Dube, T., Thompson, D., Sim, B.K., Long, C. and Keitel, W.A. (2010)** Safety and immunogenicity of recombinant nonglycosylated erythrocyte binding antigen 175 Region II malaria vaccine in healthy adults living in an area where malaria is not endemic. *Clin Vaccine Immunol*, 17: 1552-1559.
- Elsworth, B., Matthews, K., Nie, C.Q., Kalanon, M., Charanaud, S.C., Sanders, P.R., Chisholm, S.A., Counihan, N.A., Shaw, P.J., Pino, P., et al. (2014)** PTEX is an essential nexus for protein export in malaria parasites. *Nature*, 511: 587-591.
- Farfour, E., Charlotte, F., Settegrana, C., Miyara, M. and Buffet, P. (2012)** The extravascular compartment of bone marrow a niche of *Plasmodium falciparum* gametocyte maturation? *Malar J*, 11: 285.
- Fidock, D.A., Nomura, T., Talley, A.K., Cooper, R.A., Dzekunov, S.M., Ferdig, M.T., Ursos, L.M., Sidhu, A.B., Naude, B., Deitsch, K.W., et al. (2000)** Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*, 6: 861-871.
- Fidock, D.A. and Wellems, T.E. (1997)** Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR9920 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 10931-10936.
- Fitch, C.D. (1986)** Antimalarial schizontocides: ferriprotoporphyrin IX interaction hypothesis. *Parasitol Today*, 2: 330-331.
- Fitch, C.D., Cheyli, R., Banyal, H.S., Philips, G., Pfaller, M.A. and Krogstad, D.J. (1982)** Lysis of *Plasmodium falciparum* by ferriprotoporphyrin IX and a chloroquine-ferriprotoporphyrin IX complex. *Antimicrob Agents Chemother*, 21: 819-822.
- Florens, L., Liu, X., Wang, Y., Yang, S., Schwartz, O., Peglar, M., Carucci, D.J., Yates, J.R. and Wu, Y. (2004)** Proteomics approach reveals novel proteins on the surface of malaria-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*, 135: 1-11.
- Foley, M., Corcoran, L., Tilley, L. and Anders, R. (1994)** *Plasmodium falciparum*: mapping the membrane binding domain in the ring-infected erythrocyte surface antigen. *Exp Parasitol*, 79: 340-350.
- Foley, M., Tilley, L., Sawyer, W.H. and Anders, R.F. (1991)** The ring-infected erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum* associates with spectrin in the erythrocyte membrane. *Mol. Biochem Parasitol*, 46: 137-147.
- Foth, B.J., Ralph, S.A., Tonkin, C.J., Struck, N.S., Fraunholz, M., Roos, D.S., Cowman, A.F. and McFadden, G.I. (2003)** Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 299: 705-708.
- Frevert, U. (2004)** Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol*, 20: 417-424.
- Frevert, U., Engelmann, S., Zougbede, S., Stange J., Ng, B., Matuschewski, K., Liebes, L. and Yee, H. (2005)** Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol*, 3: e192.
- Fried, M. and Duffy, P.E. (2007)** Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science*, 272: 1502-1504.
- Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A. and Ikehara, Y. (1988)** Brefeldin A causes disassembly of the Golgi Complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 263: 18545-18552.

Garcia, L.S. (2010) Malaria. Clin Lab Med, 30: 93-129.

Gehde, N., Hinrichs, C., Montilla, I., Charpian, S., Lingelbach, K. and Przyborski, J.M. (2009) Protein unfolding is an essential requirement for transport across the parasitophorous vacuolar membrane of *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol, 71: 613-628.

Ghosh, A.K., Coppens, I., Gårdsvoll, H., Ploug, M. and Jacobs-Lorena, M. (2011) *Plasmodium* ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. Proc Natl Acad Sci USA, 108: 17153-17158.

Ghosh, A., Edwards, M.J. and Jacobs-Lorena, M. (2000) The journey of the malaria parasite in the mosquito: Hopes for the new century. Parasitol Today, 16: 196-201.

Ghosh, A. and Jacobs-Lorena, M. (2009) *Plasmodium* sporozoite invasion of the mosquito salivary gland. Microbiol, 12: 394-400.

Gilberger, T.W., Thompson, J.K., Reed, M.B., Good, R.T. and 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: 317-327.

Ginsburg, H. (1990) Some reflection concerning host erythrocyte-malarial parasite interrelationships. Blood Cell, 16: 225-235.

Ginsburg, H., Krugliak, M., Eidelman, O. and Cabantchik, Z.I. (1983) New permeability pathways induced in membranes of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. Mol Biochem Parasitol, 8: 177-190.

Goldberg, D.E. and Cowman, A.F. (2010) Moving in and renovating: exporting proteins from *Plasmodium* into host erythrocytes. Nat Rev Microbiol, 8: 617-621.

Gordon, D.M., McGovern, T.W., Krzych, U., Cohen, J.C., Schneider, I., LaChance, R., Heppner, D.G., Yuan, G., Hollingdale, M., Slaoui, M., et al. (1995) Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. J Infect Dis, 171: 1576-1585.

Gould, S.B., Tham, W.H., Cowman, A.F., McFadden, G.I. and Waller, R.F. (2008) Alveolins, a new family of cortical proteins that define the protist infrakingdom Alveolata. Mol Biol Evol, 25: 1219-1230.

Grassi, B., Bignami, A. and Bastianelli, G. (1899) Ulteriori ricerche sul ciclo dei parassiti malarici umani nel corpo del zanzarone. Atti R Accad Lincei, 8: 21-28.

Gruenberg, J., Allred, D.R. and Sherman, I.W. (1983) Scanning electron microscope-analysis of the protrusions (knobs) present on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. J Cell Biol, 97: 795-802.

Grüning, C., Heiber, A., Kruse, F., Flemming, S., Franci, G., Colomb, S.F., Fasana, E., Schoeler, H., Borgese, N., Stunnenberg, H.G., et al. (2012) Uncovering common principles in protein export of malaria parasites. Cell Host Microbe, 12: 717-729.

Grüning, C., Heiber, A., Kruse, K., Ungefehr, J., Gilberger, T.W. and Spielmann, T. (2011) Development and Host cell modifications of *Plasmodium falciparum* blood stages in 4D. Nature commun, 2: 165.

Grützke, J., Rindte, K., Goosmann, C., Silvie, O., Rauch, C., Heuer, D., Lehmann, M.J., Mueller, A.K., Brinkmann, V., Matuschewski, K., et al. (2014) The spatiotemporal dynamics and membranous features of the *Plasmodium* liver stage tubovesicular network. Traffic, 15: 362-382.

- Haase, S. and de Koning-Ward, T.F. (2010)** New insights into protein export in malaria parasites. *Cell Microbiol*, 12: 580-587.
- Haase, S., Hanssen, E., Matthews, K., Kalanon, M. and de Koning-Ward, T.F. (2013)** The exported protein PbCP1 localises to cleft-like structures in the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *PLoS One*, 26: e61482.
- Haase, S., Herrmann, S., Grüning, C., Heiber, A., Jansen, P.W., Langer, C., Treeck, M., Cabrera, A., Bruns, C., Struck, N.S., et al. (2009)** Sequence requirements for the export of the *Plasmodium falciparum* Maurer's cleft protein REX2. *Mol Microbiol*, 71: 1003-1017.
- Haldar, K. and Mohandas, N. (2007)** Erythrocyte remodeling by malaria parasites. *Curr Opin Hematol*, 14: 203-209.
- Hanssen, E., Hawthorne, P., Dixon, M.W., Trenholme, K.R., McMillan, P.J., Spielmann, T., Gardiner, D.L. and Tilley, L. (2008a)** Targeted mutagenesis of the ring-exported protein-1 of *Plasmodium falciparum* disrupts the architecture of Maurer's clefts organelles. *Mol Microbiol*, 69: 938-953.
- Hanssen, E., Sougrat, R., Frankland, S., Deed, S., Klonis, N., Lippincott-Schwartz, J. and Tilley, L. (2008b)** Electron tomography of the Maurer's cleft organelles of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte reveals novel structural features. *Mol Microbiol*, 67: 703-718.
- Hawking, F., Wilson, M.E. and Gammage, K., (1971)** Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 65: 549-559.
- Hawthorne, P.L., Trenholme, K.R., Skinner-Adams, T.S., Spielmann, T., Fischer, K., Dixon, M.W., Ortega, M.R., Anderson, K.L., Kemp, D.J. and Gardiner, D.L. (2004)** A novel *Plasmodium falciparum* ring stage protein, REX, is located in Maurer's clefts. *Mol Biochem Parasitol*, 136: 181-189.
- Hay, S.I., Sinka, M.E., Okara, R.M., Kabaria, C.W., Mbithi, P.M., Tago, C.C., Benz, D., Gething, D.B., Howes, R.E., Patil, A.P., et al. (2010)** Developing global maps of the dominant *Anopheles* vectors of human malaria. *PLoS Med*, 7: e1000209.
- Heiber, A., Kruse, F., Pick, C., Grüning, G., Flemming, S., Oberli, A., Schöler, H., Retzlaff, S., Hiss, J.A., Kadekoppala, M., et al. (2013)** Identification of new PNEPs indicates a substantial non-PEXEL exportome and underspins common features in *Plasmodium falciparum* protein export. *PLoS Pathog*, 9: e1003546.
- Hempelmann, E. and Egan, T.J. (2002)** Pigment biocrystallization in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*, 18: 11.
- Hermesen, C.C., Verhage, D.F., Telgt, D.S.C., Teelen, K., Bousema, J.T., Roestenberg, M., Bolad, A., Berzins, K., Corradin, G., Leroy, O., Theisen, M. and Sauerwein, R.W. (2007)** Glutamate-rich protein (GLURP) induces antibodies that inhibit *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* in a phase 1 malaria vaccine trial. *Vaccine*, 25: 2930-2940.
- Hernández-Romano, J., Rodríguez, M.H., Pando, V., Torres-Monzón, J.A., Alvarado-Delgado, A., Lecona Valera, A.N., Ramos, R.A., Martínez-Barneteche, J. and Rodríguez, M.C. (2011)** Conserved peptide sequences bind to actin and enolase on the surface of *Plasmodium berghei* ookinetes. *Parasitology*, 138: 1341-1353.
- Hiller, N.L., Akompong, T., Morrow, J.S., Holder, A.A. and Haldar, K.K. (2003)** Identification of stomatin orthologue in vacuoles induced in human erythrocytes by malaria parasites. A role for microbial raft proteins in apicomplexan vacuole biogenesis. *J Biol Chem*, 278: 48413-48421.
- Hiller, N.L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estrano, C. and Haldar, K. (2004)** A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection, *Science*, 306: 1934-1937.

- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1988)** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77: 51-59.
- Ho, M., White, N.J., Looareesuwan, S., Wattanagoon, Y., Lee, S.H., Walport, M.J., Bunnag, D. and Harinasuta, T. (1990)** Splenic Fc receptor function in host defense and anemia in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*, 161: 555-561.
- Hoffman, S.L., Goh, L.M., Luke, T.C., Schneider, I., Le, T.P., Doolan, D.L., Sacci, J., de la Vega, P., Dowler, M., Paul, C., et al. (2002)** Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis*, 185: 1155-1164.
- Horii, T., Shirai, H., Jie, L., Ishii, K.J., Palacpac, N.Q., Tougan, T., Hato, M., Ohta, N., Bobogare, A., Arakaki, N., et al. (2010)** Evidences of protection against blood-stage infection of *Plasmodium falciparum* by the novel protein vaccine SE36. *Parasitol Int*, 59: 380-386.
- Ilkadei, H., Shaw Saliba, K., Kanzok, S.M., McLean, K.J., Tanaka, T.Q., Cao, J., Williamson, K.C. and Jacobs-Lorena, M. (2013)** Transposon mutagenesis identifies genes essential for *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: E1676-E1684.
- Ingmundson, A., Alano, P., Matuschewski, K. and Silvestrini, F. (2014)** Feeling at home from arrival to departure: protein export and host cell remodeling during *Plasmodium* liver stage and gametocyte maturation. *Cell Microbiol*, 16: 324-333.
- Ingmundson, A., Nahar, C., Brinkmann, V., Lehmann, M.J. and Matuschewski, K. (2012)** The exported *Plasmodium berghei* protein IBIS delineates membranous structures in infected red blood cells. *Mol Microbiol*, 83: 1229-1243.
- Ishino, T., Boisson, B., Orito, Y., Lacroix, C., Bischoff, E., Loussert, C., Janse, C., Ménard, R., Yuda, M. and Baldacci, P. (2009)** LISP1 is important for egress of *Plasmodium berghei* parasites from liver cells. *Cell Microbiol*, 11: 1329-1339.
- Iyer, J., Grüner, A.C., Rénia, L., Snounou, G. and Presier, P.R. (2007)** Invasion of host cells by malaria parasites: a tale of two protein families. *Mol Microbiol*, 65: 231-249.
- Jawara, M., Smallegange, R.C., Jeffries, D., Nwakanma, D.C., Awolola, T.S., Knols, B.G.J., Takken, W. and Conway, D.J. (2009)** Optimizing odor-baited trap method for collecting mosquitoes during the malaria season in the Gambia. *PLoS One*, 4: e8167.
- Jeffery, C.J. (1999)** Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci*, 24: 8-11.
- Kalanon, M., Tonkin, C.J. and McFadden, G.I. (2009)** Characterization of two putative protein translocation components in the apicoplast of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell*, 8: 1146-1154.
- Kadekoppala, M. and Holder, A.A. (2010)** Merozoite surface proteins of the malaria parasite: the MSP1 complex and the MSP7 family. *Int J Parasitol*, 40: 1155-1161.
- Kats, L.M., Fernandez, K.M., Glenister, F.K., Hermann, S., Buckingham, D.W., Siddiqui, G., Sharma, L., Bamert, R., Lucet, I., Guillotte, M., et al. (2014)** An exported kinase (FIKK4.2) that mediates virulence-associated changes in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Int J Parasitol*, 44: 319-328.
- Keeley, A. and Soldati, D. (2004)** The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol*, 14: 528-232.
- Kemp, D.J., Coppel, R.L. and Anders, R.F. (1987)** Repetitive proteins and genes of malaria. *Annu Rev Microbiol*, 41: 181-208.

- Kilejian, A. (1979)** Characterization of a protein correlated with the production of knob-like protrusions on membranes of erythrocyte infected with *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci USA, 76: 4650-4653.
- Kilejian, A., Rashid, M.A., Aikawa, M., Aji, T. and Yang, Y.F. (1991)** Selective association of fragment of the knob protein with spectrin, actin in the red cell membrane. Mol Biochem Parasitol, 44: 175-181.
- Kilili, G.K. and LaCount, D.J. (2011)** An erythrocyte cytoskeleton-binding motif in exported *Plasmodium falciparum* proteins. Eukaryot Cell, 10: 1439-1447.
- Kirk, K. (2001)** Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. Physiol Rev, 81: 495-537.
- Kiszewski, A., Mellinger, A., Spielman, A., Malaney, P., Sachs, S.E. and Sachs, J. (2004)** A global index representing the stability of malaria transmission. Am J Trop Med Hyg, 70: 486-498.
- Klemba, M. and Goldberg, D.E. (2005)** Characterization of Plasmepsin V, a membrane-bound aspartic protease homolog in the endoplasmic reticulum of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol, 143: 183-191.
- Knapp, B., Hundt, E., Nau, U. and Küppler, H.A. (1989)** Molecular cloning, genomic structure and localization in blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by serine stretch. Mol Biochem Parasitol, 32: 73-83.
- Knuepfer, E., Rug, M. and Cowman, A.F. (2005)** Function of the *Plasmodium* export element can be blocked by green fluorescent protein. Mol Biochem Parasitol, 142: 258-262.
- Kohler, S., Delwiche, C.F., Denny, P.W., Tilney, L.G., Webster, P., Wilson, R.J., Palmer, J.D. and Roos, D.S. (1997)** A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. Science, 275: 1485-1489.
- Kooij, T.W., Carlton, J.M., Bidwell, S.L., Hall, N., Ramesar, J., Janse, C.J. and Waters, A.P. (2005)** A *Plasmodium* whole-genome synteny map: indels and synteny breakpoints as foci for species-specific genes. PLoS Pathog, 1: e44.
- Krugliak, M., Thang, J. and Ginsburg, H. (2002)** Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. Mol Biochem Parasitol, 19: 249-256.
- Kumar, S., Kumari, R. and Pandey, R. (2014)** New insight-guided approaches to detect, cure, prevent and eliminate malaria. Protoplasma: DOI 10.1007/s00709-014-0697-x
- Külzer, S., Charnaud, S., Dagan, T., Riedel, J., Mandal, P., Pesce, E.R., Blatch, G.L., Crabb, B.S., Gilson, P.R. and Przyborski, J.M. (2012)** *Plasmodium falciparum*-encoded exported hsp70/hsp40 chaperone/co-chaperone complexes within the host erythrocyte. Cell Microbiol, 14: 1784-1795.
- Külzer, S., Gehde, N. and Przyborski, J.M. (2009)** Return to sender: use of *Plasmodium* ER retrieval sequences to study protein transport in the infected erythrocyte and predict putative ER protein families. Parasitol Res, 104: 1535-1541.
- Külzer, S., Rug, M., Brinkmann, K., Cannon, P., Cowman, A., Lingelbach, K., Blatch, G.L., Maier, A.G. and Przyborski, J.M. (2010)** Parasite-encoded Hsp40 proteins define novel mobile structures in the cytosol of the *P. falciparum*-infected erythrocyte. Cell Microbiol, 12: 1398-1420.
- Kwiatkowski, D., Cannon, J.G., Manogue, K.R., Cerami, A., Dinarello, C.A. and Greenwood, B.M. (1989)** Tumour necrosis factor production in *Falciparum* malaria and its association with schizont rupture. Clin Exp Immunol, 77: 361-366.

- Kyes, S.A., Kraemer, S.M. and Smith, J.D. (2007)** Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: gene organization and regulation of the var multigene family. *Eukaryot Cell*, 6: 1511-1520.
- Kyes, S., Pinches, R. and Newbold, C. (2000)** A simple RNA analysis method shows var and rif multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 105: 311-315.
- LaCount, D.J., Vignali, M., Chettier, R., Phansalkar, A., Bell, R., Hesselberth, J.R., Schoenfeld, L.W., Ota, I., Sahasrabudhe, S., Kurschner, S., et al. (2005)** A protein interaction network of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 438: 103-107.
- 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.
- Lambros, C. and Vanderberg, J.P. (1979)** Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*, 65: 418-420.
- Langreth, S.G., Jensen, J.B., Reese, R.T. and Trager, W. (1978)** Fine structure of human malaria *in vitro*. *J Protozool*, 25: 443-452.
- Lanzer, M., Wickert, H., Krohne, G., Vincensini, L. and Breton, C.B. (2006)** Maurer's cleft: A novel multi-functional organelle in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Inter J Parasitol*, 36: 23-36.
- Lauer, S.A., Rathod, P.K., Ghori, N. and Haldar, K. (1997)** A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science*, 276: 1122-1125.
- Lauer, S., Vanwyke, J., Harrison, T., McManus, H., Samuel, B.U., Hiller, N.L., Mohandas, N. and Haldar, K. (2000)** Vacuolar uptake of host components and a role for cholesterol and sphingomyelin in malaria infection. *EMBO J*, 19: 3556-3564.
- Laveran, A. (1881)** Un nouveau parasite trouvé dans le sang des maladies atteints de fièvre palustre: origine parasitaire des accidents de l'impaludisme. *Mull Mem Soc Med Hop Paris*, 17: 158-164.
- Lazarus, M.D., Schneider, T.G. and Taraschi, T.F. (2008)** A new model for hemoglobin ingestion and transport by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Cell Science*, 121: 1937-1949.
- Lewis, M.J., Sweet, D.J. and Pelham, H.R. (1990)** The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell*, 61: 1359-1363.
- López del Prado, G.R., Hernán García, C., Moreno Cea, L., Fernández Espinilla, V., Muñoz Moreno, M.F., Delgado Márquez, A., Polo Polo, M.J. and Andrés García, I. (2014)** Malaria in developing countries. *J Infect Dev Ctries*, 15: 1-4.
- Looareesuwan, S., Ho, M., Wattanagoon, Y., White, N.J., Warrell, D.A., Bunnag, D., Hariasuta, T. and Wyler, D.J. (1987)** Dynamic alteration in splenic function during acute *falciparum* malaria. *N Engl J Med*, 317: 675-679.
- MacKellar, D.C., Vaughan, A.M., Aly, A.S.I., DeLeon, S. and Kappe, S.H.I. (2011)** A systematic analysis of the early transcribed membrane protein family throughout the life cycle of *Plasmodium yoelii*. *Cell Microbiol*, 13: 1755-1767.
- MacKenzie, J.J., Gomez, N.D., Bhattacharjee, S., Mann, S. and Haldar, K. (2008)** A *Plasmodium falciparum* host-targeting motif functions in export during blood stage infection of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *PLoS One*, 3: e2405.
- Maier, A.G., Cooke, B.M., Cowman, A.F. and Tilley, L. (2009)** Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nature*, 7: 341-354.

- Maier, A.G., Cooke, B.M., Cowman, A.F. and Tilley, L. (2009)** Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat Rev Microbiol*, 7: 341-354.
- Maier, A.G., Rug, M., O'Neill, M.T., Beeson, J.G., Marti, M., Reeder, J. and Cowman, A.F. (2007)** Skeleton-binding protein 1 functions at the parasitophorous vacuole membrane to traffic PfEMP1 to the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte surface. *Blood*, 109: 1289-1297.
- Maier, A.G., Rug, M., O'Neil, M.T., Brown, M., Chakravorty, S., Szeszak, T., Chesson, J., Wu, Y., Hughes, K., Coppel, R.L., et al. (2008)** Exported proteins required for virulence and rigidity of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Cell*, 134, 48-61.
- Magowan, C., Wollish, W., Anderson, L. and Leech, J. (1988)** Cytoadherence by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is correlated with the expression of a family of variable proteins on infected erythrocytes. *J Exp Med*, 168: 1307-1320.
- Mahajan, B., Noiva, R., Yadava, A., Zheng, H., Majam, V., Mohan, K.V., Moch, J.K., Haynes, J.D., Nakhasi, H. and Kumar, S. (2006)** Protein disulfide isomerase assisted protein folding in malaria parasites. *Int J Parasitol*, 36: 1037-1048.
- Marti, M., Good, R.T., Rug, M., Knuepfer, E. and Cowman, A.F. (2004)** Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science*, 206: 1930-1933.
- Marti, M. and Spielmann, T. (2013)** Protein export in malaria parasites: many membranes to cross. *Curr Opin Microbiol*, 16: 445-451.
- Matsuoka, H., Yoshida, S., Hirai, M. and Ishii, A. (2002)** A rodent malaria, *Plasmodium berghei*, is experimentally transmitted to mice by merely probing of infective mosquito, *Anopheles stephensi*. *Parasitol Int*, 51: 17-23.
- Matthews, K., Kalanon, M., Chisholm, S.A., Sturm, A., Goodman, C.D., Dixon, M.W., Sanders, P.R., Nebl, T., Fraser, F., Haase, S., et al. (2013)** The *Plasmodium* translocon of exported protein (PTEx) component thioredoxin-2 is important for maintaining normal blood-stage growth. *Mol Microbiol*, 89: 1167-1186.
- Matuschewski, K. (2006)** Getting infectious: formation and maturation of *Plasmodium* sporozoites in the *Anopheles* vector. *Cell Microbiol*, 8: 1547-1556.
- Matz, J.M., Matuschewski, K. and Kooij, T.W. (2013)** Two putative protein export regulators promote *Plasmodium* blood stage development *in vivo*. *Mol Biochem Parasitol*, 191: 44-52.
- Mayer, C., Slater, L., Erat, M.C., Konrat, R. and Vakonakis, I. (2012)** Structural analysis of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) intracellular domain reveals a conserved interaction epitope. *J Biol Chem*, 287: 7182-7189.
- McFadden, G.L. and Waller, R.F. (1997)** Plastids in parasites of humans. *Bioessays*, 19: 1033-1040.
- Medana, I.M. and Turner, G.D. (2006)** Human cerebral malaria and the blood brain barrier. *Int J Parasitol*, 36: 555-568.
- Medica, D.L. and Sinnis P. (2005)** Quantitative dynamics of *Plasmodium yoelii* sporozoite transmission by infected anopheline mosquitoes. *Infect Immun*, 73: 4363-4369.
- Melcher, M., Muhle, R.A., Henrich, P.P., Kraemer, S.M., Avril, M., Vigan-Womas, I., Mercereau-Puijalon, O., Smith, J.D. and Fidock, D.A. (2010)** Identification of a role for the PfEMP1 semi-conserved headstructure in protein trafficking to the surface of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *Cell Microbiol*, 12: 1446-1462.
- Menard, R. (2001)** Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite. *Cell Microbiol*, 3: 63-73.

- Miotto, O., Almagro-Garcia, J., Manske, M., MacInnis, B., Campino, S., Rockett, K.A., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., et al. (2013)** Multiple populations of artemisinin-resistance *Plasmodium falciparum* in Cambodia. *Nat Genet*, 45: 648-655.
- Mohandas, N. and Chasis, J.A. (1993)** Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol*, 30: 171-192.
- Moore, R.B., Obomik, M., Janouskovec, J., Chrudimsky, T., Vancova, M., Green, D.H., Wright, S.W., Davies, N.W., Bolch, C.J.S., Heimann, K., et al. (2008)** A photosynthetic alveolata closely related to apicomplexan parasites. *Nature*, 451: 959-963.
- Moorthy, V.S., Newman, R.D. and Okwo-Bele, J.M. (2013)** Malaria vaccine technology road map. *Lancet*, 382: 1700-1701.
- Morahan, B.J., Strobel, C., Hasan, U., Czesny, B., Mantel, P.Y., Marti, M., Eksi, S. and Williamson, K.C. (2011)** Functional analysis of the exported type IV HSP40 protein PfGECO in *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Eukaryot Cell*, 10: 1492-1503.
- Morrisette, N. and Sibley, L. (2002)** Cytoskeleton of Apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol*, 66: 21-38.
- Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V. and Rodriguez, A. (2001)** Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, 291: 141-144.
- Mouray, E., Moutiez, M., Girault, S., Sergheraert, C., Florent, I. and Grellier, P. (2007)** Biochemical properties and cellular localization of *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase. *Biochimie*, 89: 337-346.
- Mu, J., Ferdig, M.T., Feng, X., Joy, D.A., Duan, J., Furuya, T., Subramanian, G., Aravind, L., Cooper, R.A., Wootton, J.J., et al. (2003)** Multiple transporters associated with malaria response to chloroquine and quinine. *Mol Microbiol*, 49: 977-989.
- Mueller, A.K., Camargo, N., Kaiser, K., Andorfer, C., Frevert, U., Matuschewski, K. and Kappe, S.H. (2005)** *Plasmodium* liver stage development arrest by depletion of a protein at the parasite-host interface. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 3022-3027.
- Mueller, M., Grauschopf, U., Maier, T., Glockshuber, R. and Ban, N. (2009)** The structure of a cytosolic alpha-helical toxin pore reveals its assembly mechanism. *Nature*, 459: 726-730.
- Mullis, K.B. and Faloan, F.A. (1987)** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155: 335-350.
- Mundwiler-Pachlatko, E. and Beck, H.P. (2013)** Maurer's clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 19987-19994.
- Munro, S. and Pelham, H.R. (1987)** A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, 48: 899-907.
- Newbold, C., Craig, A., Kyes, S., Rowe, A., Fernandez-Reyes, D. and Fagan, T. (1999)** Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*, 29: 927-937.
- Newbold, C., Warn, P., Black, G., Berendt, A., Craig, A., Snow, B., Msobo, M., Peshu, N. and Marsh, K. (1997)** Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, 57: 389-398.
- Nickel, C., Rahlfs, S., Deponte, M., Koncarevic, S. and Becker, K. (2006)** Thioredoxin networks in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Antiox Redox Signal*, 8: 1227-123.

- Nilsson, T. and Warren, G. (1994)** Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol*, 6: 517-521.
- Noedl, H., Se, Y., Schaecher, K., Smith, B.L., Socheat, D. and Fukuda, M.M. (2008)** Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *New Engl J Med*, 359: 2619-2620.
- Ntumngia, F.B., Bahamontes-Rosa, N. and Kun, J.F.J. (2005)** Gene coding for tryptophan-rich proteins are transcribed throughout the asexual cycle of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res*, 96: 347-353.
- Ntumngia, F.B., Bouyou-Akotet, M.K., Uhlemann, A.C., Mordmüller, B., Kremsner, P.G. and Kun, J.F.J. (2004)** Characterisation of a Tryptophan-rich *Plasmodium falciparum* antigen associated with merozoites. *Mol Biochem Parasitol*, 137: 349-353.
- Nunes, M.C., Goldring, J.P., Doerig, C. and Scherf, A. (2007)** A novel protein kinase family in *Plasmodium falciparum* is differentially transcribed and secreted to various cellular compartments of the host cell. *Mol Microbiol*, 63: 391-403.
- Nunes, M.C., Okada, M., Scheidig-Benatar, C., Cooke, B.M. and Scherf, A. (2010)** *Plasmodium falciparum* FIKK kinase members target distinct components of the erythrocyte membrane. *PLoS One*, 5: e11747.
- Nyalwidhe, J. and Lingelbach, K. (2006)** Proteases and chaperons are the most abundant proteins in the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Proteomics*, 6: 1563-1573.
- Oakley, M.S.M., Kumar, S., Anantharamen, V., Zheng, H., Mahajan, B., Haynes, J.D., Moch, J.K., Fairhurst, R., McCutchan, T.F. and Aravind, L. (2007)** Molecular factors and biochemical pathways induced by febrile temperature in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* parasites. *Infect Immun*, 75: 2012-2025.
- Oberli, A., Slater, L.M., Cutts, E., Brand, F., Mundwiler-Pachlatko, E., Rusch, S., Masik, M.F.G., Erat, M.C., Beck, H.P. and Vakonakis, I. (2014)** A *Plasmodium falciparum* PHIST protein binds the virulence factor PfEMP1 and comigrates to knobs on the host cell surface. *FASEB J*, 28: 4420-4433.
- Ogutu, B.R., Apollo, O.J., McKinney, D., Okoth, W., Siangla, J., Dubovsky, F., Tucker, K., Waitumbi, J.N., Diggs, C., et al. (2009)** Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya. *PLoS One*, 4: e4708.
- Okumu, F.O., Madumla, E.P., John, A.N., Lwetoijera, D.W. and Sumaye, R.D. (2010)** Attracting, trapping and killing disease-transmitting mosquitoes using odor baited stations – the Ifakara odor-baited stations. *Parasite Vectors*, 3: 12.
- Osier, F.H., Mackinnon, M.J., Crosnier, C., Fegan, G., Kamuyu, G., Wanaguru, M., Ogada, E., McDade, B., Rayner, J.C., Wright, G.J., et al. (2014)** New antigens for multicomponent blood-stage malaria vaccine. *Sci Transl Med*, 6: 247ra102.
- Pachebat, J.A., Kadekoppala, M., Grainger, M., Dluzewski, A.R., Gunaratne, R.S., Scott-Finnigan, T.J., Ogun, S.A., Ling, I.T., Bannister, L.H., Taylor, H.M., et al. (2007)** Extensive proteolytic processing of the malaria parasite merozoite surface protein 7 during biosynthesis and parasite release from erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*, 151: 59-69.
- Pachlatko, E., Rusch, S., Muller, A., Hemphill, A., Tilley, L., Hanssen, E. and Beck, H.P. (2010)** MAHRP2, an exported protein of *Plasmodium falciparum*, is an essential component of Maurer's cleft tethers. *Mol Microbiol*, 77: 1136-1152.
- Pagola, S., Stephens, P.W., Bohle, D.S., Kosar, A.D. and Madsen, S.K. (2000)** The structure of malaria pigment β -haematin. *Nature*, 404: 307-310.

- Pain, A., Bohme, U., Berry, A.E., Mungall, K., Finn, R.D., Jackson, A.P., Mourier, T., Mistry, J., Pasini, E.M., Aslett, M.A., et al. (2008)** The genome of simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature*, 455: 799-803.
- Pal-Bhowmick, I., Vora, H.K. and Jarori, G.K. (2007)** Sub-cellular localization and post-translational modifications of the *Plasmodium yoelii* Enolase suggest moonlighting functions. *Malar J*, 6: 45.
- Papakrivos, J., Newbold, C.L. and Lingelbach, K. (2005)** A potential novel mechanism for the insertion of a membrane protein revealed by a biochemical analysis of the *Plasmodium falciparum* cytoadherence molecule PfEMP-1. *Mol Microbiol*, 55: 1272-1284.
- Parish, L.A., Mai, D.W., Jones, M.L., Kitson, E.L. and Rayner, J.C. (2013)** A member of the *Plasmodium falciparum* PHIST family binds to the erythrocyte cytoskeleton component band 4.1. *Malar J*, 12: 160.
- Pei, X., Guo, X., Coppel, R., Bhattacharjee, S., Haldar, K., Gratzer, W., Mohandas, N. and An, X. (2007)** The ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of *Plasmodium falciparum* stabilizes spectrin tetramers and suppresses further invasion. *Blood*, 110: 1036-1042.
- Perkins, S.L. and Schall, J.J. (2002)** A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *J Parasitol*, 88: 972-978.
- Petter, M., Bonow, I. and Klinkert, M.Q. (2008)** Diverse expression patterns of subgroups of the rif multigene family during *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis. *PLoS One*, 3: e3779.
- Phyo, A.P., Nkhoma, S., Stepniewska, K., Ashley, E.A., Nair, S., McGready, R., ler Moo, C., Al-Saai, S., Dondorp, A.M. and Lwin, K.M. (2012)** Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet*, 379: 1960-1966.
- Pick, C., Ebersberger, I., Spielmann, T., Bruchhaus, I. and Burmester, T. (2011)** Phylogenomic analyses of malaria parasites and evolution of their exported proteins. *BMC Evol Biol*, 11: 167.
- Playfair, J.H., Blackwell, J.M. and Miller, H.R. (1990)** Modern vaccines. *Parasitic diseases*. *Lancet*, 335: 1263-1266.
- Ponnudurai, T., Lensen, A.H., van Gemert, G.J., Bolmer, M.G. and Meuwissen, J.H. (1991)** Feeding behavior and sporozoite ejection by infected *Anopheles stephensi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85: 175-180.
- Pradel, G. and Frevert, U. (2001)** Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology*, 33: 1154-1165.
- Preisner, P., Kaviratne, M., Khan, S., Bannister, L. and Jarra, W. (2000)** The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes infect*, 2: 1461-1477.
- Proellocks, N.I., Herrmann, S., Buckingham, D.W., Hanssen, E., Hodges, E.K., Elsworth, B., Morahan, B.J., Coppel, R.L. and Cooke, B.M. (2014)** A lysine-rich membrane-associated PHISTb protein involved in alteration of the cytoadhesive properties of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *FASEB J*, 28: 3103-3013.
- Protzer, U., Maini, M.K. and Knolle, P.A. (2012)** Living in the liver: hepatic infection. *Nat Rev Immunol*, 12: 201-213.
- Przyborski, J.M., Miller, S.K., Pfahler, J.M., Henrich, P.P., Rohrbach, P., Crabb, B.S. and Lanzer, M. (2005)** Trafficking of STEVORs to the Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Embo J*, 24: 2306-2317.

- Oh, S.S., Voigt, S., Fisher, D., Yi, S.J., LeRoy, P.J., Derick, L.H., Liu, S. and Chishti, A.H. (2000)** *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is anchored to the actin-spectrin junction and knob-associated histidine-rich protein in the erythrocyte skeleton. *Mol Biochem Parasitol*, 108: 237-247.
- Raj, D.K., Nixon, C.P., Nixon, C.E., Dvorin, J.D., DiPetrillo, C.G., Pond-Tor, S., Wu, H.W., Jolly, G., Pischel, L., Lu, A., et al. (2014)** Antibodies to PfSEA-1 block parasites egress from RBCs and protect against malaria infection. *Science*, 344: 871-877.
- Ramirez, J.L., Short, S.M., Bahia, A.C., Saraiva, R.G., Dong, Y., Kang, S., Tripathi, A., Mlambo, G. and Dimopoulos, G. (2014)** *Chromobacterium* Csp_P reduces Malaria and Dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and *in vitro* anti-pathogen activities. *PLoS Pathogen*, 10: e1004398.
- Rangachari, K., Dluzewski, A., Wilson, R.J. and Gratzer, W.B. (1986)** Control of malarial invasion by phosphorylation of the host cell membrane cytoskeleton. *Nature*, 324: 364-365.
- Rangarajan, R., Bei, A.K., Jethwaney, D., Maldonado, P., Dorin, D., Sultan, A.A. and Doerig, C. (2005)** A mitogenactivated protein kinase regulates male gametogenesis and transmission of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO Rep*, 6: 464-469.
- Riveron, J.M., Yunta, C., Ibrahim, S.S., Djouaka, R., Irving, H., Menze, B.D., Ismail, H.M., Hemingway, J., Ranson, H., Albert, A. and Wondii, C.S. (2014)** A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically-based insecticide resistance in major malaria vector. *Genome Biol*, 15: R27.
- Rogers, N.J., Hall, B.S., Obiero, J., Targett, G.A. and Sutherland, C.J. (2000)** A model for sequestration of transmission stages of *Plasmodium falciparum*: adhesion of gametocyte-infected erythrocytes to human bone marrow cells. *Infect Immun*, 68: 3455-3462.
- Rogers, N.J., Targett, G.A. and Hall, B.S. (1996)** *Plasmodium falciparum* gametocyte adhesion to C32 cells via CD36 is inhibited by antibodies to modified band 3. *Infect Immun*, 64: 4261-4268.
- Rogerson, S.J., Chaiyaroj, S.C., Ng, K., Reeder, J.C. and Brown, G.V. (1995)** Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Exp Med*, 182: 15-20.
- Ross, R. (1897)** On some peculiar pigmented cells found in two mosquitos fed on malaria blood. *Br Med J*, 2: 1786-1788.
- RTS,S Clinical Trials Partnership (2014)** Efficacy and safety of the RTS,S/ASO1 malaria vaccine during 18 month after vaccination. A phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *PLoS Med*, 11: e1001685.
- Ruangjirachuporn, W., Udomsangpet, R., Carlsson, J., Drenckhahn, D., Perlmann, P. and Berzins, K. (1991)** *Plasmodium falciparum*: analysis of the interaction of antigen Pf155/RESA with the erythrocyte membrane. *Exp Parasitol*, 73: 62-72.
- Russo, I., Babbitt, S., Muralidharan, V., Butler, T., Oksman, A. and Goldberg, D.E. (2010)** Plasmepsin V licenses *Plasmodium* proteins for export into the host erythrocyte. *Nature*, 463: 632-636.
- Sagara, I., Dicko, A., Ellis, R.D., Fay, M.P., Diawara, S.I., Assadou, M.H., Sissoko, M.S., Kone, M., Diallo, A.I., Saye, R., et al. (2009)** A randomized controlled phase 2 trial of the blood stage AMA1-C1/Alhydrogel malaria vaccine in children in Mali. *Vaccine*, 27: 3090-3098.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. and Erlich, H. (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.

- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 5463-5467.
- Sargeant, T.J., Marti, M., Caler, E., Carlton, J.M., Simpson, K., Speed, T.P. and Cowman, A.F. (2006)** Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. *Genome Biol*, 7: R12.
- Saridaki, T., Frohlich, K.S., Braun-Breton, C. and Lanzer, M. (2009)** Export of PfSBP1 to the *Plasmodium falciparum* Maurer's clefts. *Traffic*, 10: 137-152.
- Satimai, W., Sudathip, P., Vijaykadga, S., Khamsiriwatchara, A., Sawang, S., Poithavoranan, T., Sangvichean, A., Delacollette, C., Singhasivanon, P. and Kaewkungwal et al. (2012)** Artemisinin resistance containment project in Thailand II: response to mefloquine-artesunate combination therapy among *falciparum* patients in provinces bordering Cambodia. *Malar J*, 11: 300.
- Scherf, A., Lopez-Rubio, J.J. and Riviere, L. (2008)** Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol*, 62: 445-470.
- Schneider, A.G. and Mercereau-Puijalon, O. (2005)** A new Apicomplexa-specific protein kinase family: multiple members in *Plasmodium falciparum*, all with an export signature. *BMX Genomics*, 6: 30.
- Schofield, L., Hewitt, M.C., Evans, K., Siomos, M.A. and Seeberger, P.H. (2002)** Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature*, 418: 785-789.
- Schofield, L. and Uadia, P. (1990)** Lack of Ir gene control in the immune response to malaria. I. A thymus-independent antibody response to the repetitive surface protein of sporozoites. *J Immunol*, 144: 2781-2788.
- Schofield, L., Vivas, L., Hackett, F., Gerold, P., Schwarz, R.T. and Tachado, S. (1993)** Neutralizing monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol, the dominant TNF-alpha-inducing toxin of *Plasmodium falciparum*: prospect for the immunotherapy of severe malaria. *Ann Trop Med Parasitol*, 87: 617-626.
- Scholl, P.F., Tripathi, A.K. and Sullivan, D.J. (2005)** Bioavailable iron and heme metabolism in *Plasmodium falciparum*. *Malaria: Drugs, Disease and Post-Genomic Biology* (ed. D.J. Sullivan and S. Krishna), pp. 293-324. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Schottelius, J., Gilberger, T.W., Ehrhardt, S. and Burchard, G. (2010)** *Plasmodium knowlesi*: ein neuer Malariaerreger des Menschen. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 135: 297-300.
- Seder, R.A., Chang, L.J., Enama, M.E., Zephir, K.L., Sarwar, U.N., Gordon, I.J., Holman, L.A., James, R.R., Bilingsley, P.F., Gunasekera, A., et al. (2013)** Protection against Malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science*, 341: 1359-1365.
- Semenza, J.C., Hardwick, K.G., Dean, N. and Pelham, H.R. (1990)** ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell*, 61: 1349-1357.
- Sharma, A., Sharma, A., Dixit, S. and Sharma, A. (2011)** Structural insights into thioredoxin-2: a component of malaria parasite protein secretion machinery. *Sci Rep*, 1: 179.
- Sherman, I.W. (1977)** Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites. *Bull WHO*, 55: 265-276.
- Shevade, S., Jindal, N., Dutta, S. and Jarori, G.K. (2013)** Food vacuole associated enolase in *Plasmodium* undergoes multiple post-translational modifications: evidence for atypical ubiquitination. *PLoS One*, 8: e72687.

- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V. and Mann, M. (2006)** In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteoms. *Nat Protoc*, 1: 1856-1860.
- Sidjanski, S. and Vanderberg, J.P. (1997)** Delayed migration of *Plasmodium* sporozoites from the mosquito bite site to the blood. *Am J Trop Med Hyg*, 57: 426-429.
- Silvestrini, F., Lasonder, E., Olivieri, A., Camarda, G., van Schaijk, B., Sanchez, M., Younis Younis, S., Sauerwein, R. and Alano, P. (2010)** Protein export marks the early phase of gametocytogenesis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Proteomics*, 9: 1437-1448.
- Silvestrini, F., Tibúrcio, M., Bertuccini, L. and Alano, P. (2012)** Differential adhesive properties of sequestered asexual and sexual stages of *Plasmodium falciparum* on human endothelial cells are tissue independent. *PLoS One*, 7: e31567.
- Sinden, R.E. (1982)** Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* *in vitro*: an electron microscopic study. *Parasitol*, 84: 1-11.
- Sinden, R.E. (1983)** Sexual development of malarial parasites. *Adv Parasitol*, 22: 153-216.
- Silva, M.D., Cooke, B.M., Guilotte, M., Buckingham, D.W., Sauzet, J.P., Le Scanf, C., Contamin, H., David, P., Mercereai-Puijalón, O. and Bonnefoy, S. (2005)** A role for the *Plasmodium falciparum* RESA protein resistance against heat shock demonstrated using gene disruption. *Mol Microbiol*, 56: 990-1003.
- Slater, A.F. and Cerami, A. (1992)** Inhibition by chloroquine of novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature*, 355: 167-169.
- Sleebs, B.E., Lopaticki, S., Marapana, D.S., O'Neill, M.T., Rajasekaran, P., Gazdik, M., Günther, S., Whitehead, L.W., Lowes, K.N., Barford, L., et al. (2014)** Inhibition of Plasmeprin V activity demonstrates its essential role in protein export, PfEMP1 display, and survival of malaria parasites. *PLoS Biol*, 12: e1001897.
- Slomianny, C. and Prensier, G. (1990)** A cytochemical study of the lysosomal system of different species of malaria parasites. *J. Protozol*, 37: 465-470.
- Smalley, M.E., Abdalla, S. and Brwon, J. (1981)** The distribution of *Plasmodium falciparum* in the peripheral blood and bone marrow of Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 75: 103-105.
- Smithuis, F.M., Kyaw, M.K., Phe, U.O., van der Broek, I., Katterman, N., Rogers, C., Almeida, P., Stepniewska, K., Lubell, Y., Simpson, J.A. and White, N.J. (2013)** The effect of insecticide-treated bed nets on the incidence and prevalence of malaria in children in an area of unstable seasonal transmission in western Myanmar. *Malar J*, 12: 263.
- Spielmann, T., Ferguson, D.J. and Beck, H.P. (2003)** *etramps*, a new *Plasmodium falciparum* gene family coding for developmentally regulated and highly charged membrane proteins located at the parasite-host cell interface. *Mol Biol Cell*, 14: 1529-1544.
- Spielmann, T., Gardiner, D.L., Beck, H.P., Trenholme, K.R. and Kemp, D.J. (2006a)** Organization of ETRAMP and EXP-1 at the parasite-host cell interface of malaria parasites. *Mol Microbiol*, 59: 779-794.
- Spielmann, T. and Gilberger, T.W. (2010)** Protein export in malaria parasites: do multiple export motifs add up to multiple export pathways? *Trends Parasitol*, 26: 6-10.
- Spielmann, T., Hawthorne, P.L., Dixon, M.W., Hannemann, M., Klotz, K., Kemp, D.J., Klonis, N., Tilley, L., Trenholme, K.R. and Gardiner, D.L. (2006b)** A cluster of ring stage-specific genes linked to a locus implicated in cytoadherence in *Plasmodium falciparum* codes for PEXEL-negative and PEXEL-positive proteins exported into the host cell. *Mol Biol Cell*, 17: 3613-3624.

- Spielmann, T., Montagna, G.N., Hecht, L. and Matuschewski, K. (2012)** Molecular make-up of the *Plasmodium* parasitophorous vacuolar membrane. *Int J Med Microbiol*, 302: 179-186.
- Spycher, C., Klonis, N., Spielmann, T., Kump, E., Steiger, S., Tilley, L. and Beck, H.P. (2003)** MAHRP-1, a novel *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein, binds ferriprotoporphyrin IX and localizes to the Maurer's clefts. *J Biol Chem*, 278: 35373-35383.
- Spycher, C., Rug, M., Klonis, N., Ferguson, D.J., Cowman, A.F., Beck, H.P. and Tilley, L. (2006)** Genesis of and trafficking to the Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol Cell Biol*, 26: 4074-4085.
- Spycher, C., Rug, M., Pachlatko, E., Hanssen, E., Ferguson, D., Cowman, A.F., Tilley, L. and Beck, H.P. (2008)** The Maurer's cleft protein MAHRP1 is essential for trafficking of PfEMP1 to the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol Microbiol*, 68: 1300-1314.
- Steinfurth, S. (2014)** Charakterisierung der Interaktion des PHISTc-Proteins PFI1780w (PF3D7_0936800) des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* mit dem Cytoskelett von Erythrozyten. Bachelorarbeit, Department Biologie, Universität Hamburg.
- Stenzel, D.J. and Kara, U.A. (1989)** Sorting of malarial antigens into vesicular compartments within the host cell cytoplasm as demonstrated by immunoelectron microscopy. *Eur J Cell Biol*, 49: 311-316.
- Striepen, B., Crawford, M.J., Shaw, M.K., Tilney, L.G., Seeber, F. and Roos, D.S. (2000)** The plastid of *Toxoplasma gondii* is divided by association with the centrosomes. *J Cell Biol*, 151: 1423-1434.
- Struck, N.S., de Souza Dias, S., Langer, C., Marti, M., Pearce, J.A., Cowman, A.F. and Gilberger, T.W. (2005)** Redefining the Golgi complex in *Plasmodium falciparum* using the novel Golgi marker PfGRASP. *J Cell Sci*, 118: 5603-5613.
- Sturm, A., Rogerio, A., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.M., Menrad, R. and Heussler, V.T. (2006)** Manipulation of host hepatocytes by the Malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, 313: 1287-1290.
- Su, X.Z., Heatwole, V.M., Wertheimer, S.P., Guinet, F., Herrfeldt, J.A., Peterson, D.S., Ravetch, J.A. and Wellems, T.E. (1995)** The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell*, 82: 89-100.
- Sullivan, D.J. Jr., Gluzman, I.Y., Russell, D.G. and Goldberg, D.E. (1996)** On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 11865-11870.
- Tarr, S.J., Cryar, A., Thalassinou, K., Haldar, K. and Osborne, A.R. (2013)** The C-terminal portion of the cleaved HT motif is necessary and sufficient to mediate export of proteins from the malaria parasite into its host cell. *Mol Microbiol*, 87: 835-850.
- Tarr, S.J., Moon, R.W., Hardege, I. and Osborne, A.R. (2014)** A conserved domain targets exported PHISTb family proteins to the periphery of *Plasmodium* infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*, 196: 29-40.
- Tarun, A.S., Baer, K., Dumpit, R.F., Gray, S., Lejarcegui, N., Frevert, U. and Kappe, S.H. (2006)** Quantitative isolation and *in vivo* imaging of malaria parasite liver stages. *Int J Parasitol*, 36: 1283-1293.
- Taylor, D.W., Parra, M., Chapman, G.B., Stearns, M.E., Renner, J., Aikawa, M., Uni, S., Aley, S.B., Panton, L.J. and Howard, R.J. (1987)** Localization of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 1 in the erythrocyte skeleton under knobs. *Mol Biochem Parasitol*, 25: 165-174.

- Tewari, R., Dorin, D., Moon, R., Doerig, C. and Billker, O. (2005)** An atypical mitogen-activated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite. *Mol Microbiol*, 58: 1253-1263.
- Thompson, J.G. and Robertson, A. (1935)** The structure and development of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the internal organs and in the peripheral circulation. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 29: 31-40.
- Tibúrcio, M., Niang, M., Deplaine, G., Perrot, S., Bischoff, E., Ndour, P.A., Silvestrini, F., Khattab, A., Milon, G., David, P.H., et al. (2012)** A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Blood*, 119: e172-180.
- Tibúrcio, M., Silvestrini, F., Bertuccini, L., Sander, A.F., Turner, L., Lavstsen, T. and Alano, P. (2013)** Early gametocytes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* specifically remodel the adhesive properties of infected erythrocyte surface. *Cell Microbiol*, 15: 647-659.
- Tilley, L. and Hanssen, E. (2008)** A 3D view of the host cell compartment in *P. falciparum*-infected erythrocytes. *Transfus Clin Biol*, 15: 72-81.
- Tonkin, C.J., Pearce, J.A., McFadden, G.I. and Cowman, A.F. (2006a)** Protein targeting to destinations of the secretory pathway in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Curr Opin Microbiol*, 9: 381-387.
- Tonkin, C.J., Struck, N.S., Mullin, K.A., Stimmler, L.M. and McFadden, G.I. (2006b)** Evidence for Golgi-independent transport from the early secretory pathway to the plastid in malaria parasites. *Mol Microbiol*, 61: 614-630.
- Trager, W. and Jensen, J.B. (1976)** Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193: 673-675.
- Trecek, M., Struck, N.S., Haase, S., Langer, C., Herrmann, S., Healer, J., Cowman, A.F. and Gilberger, T.W. (2006)** A conserved region in the EBL proteins is implicated in microneme targeting of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 281: 31995-312003.
- Trelka, D.P., Schneider, T.G., Reeder, J.C. and 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: 131-145.
- Triglia, T., Healer, J., Caruana, S.R., Hodder, A.N., Anders, R.F., Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (2000)** Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Mol Microbiol*, 38: 706-718.
- Van Dooren, G.G., Marti, M., Tonkin, C.J., Stimmler L.M., Cowman, A.F. and McFadden, G.I. (2005)** Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*, 57: 405-419.
- Van Dooren, G.G., Schwartzbach, S.D., Osafune, T. and McFadden, G.I. (2001)** Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. *Biochim Biophys Acta*, 1541: 34-53.
- Van Dooren, G.G., Waller, R.F., Joiner, K.A., Roos, D.S. and McFadden, G.I. (2000)** Traffic jams: protein transport in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*, 16: 421-427.
- Van Ooij, C., Tamez, P., Bhattacharjee, S., Hiller, N.L., Harrison, T., Liolios, K., Kooij, T., Ramesar, J., Balu, B., Adams, J., Waters, A., Janse, C. and Haldar, K. (2008)** The Malaria secretome: from algorithms to essential function in blood stage infection. *PLoS Pathogens*, 4: 1-15.
- Vaughan, A.M., Mikolajczak, S.A., Wilson, E.M., Grompe, M., Kaushansky, A., Camargo, N., Bial, J., Ploss, A. and Kappe, S.H. (2012)** Complete *Plasmodium falciparum* liver-stage development in liver-chimeric mice. *J Clin Invest*, 122: 3618-3628.

- Vlachou, D., Schlegelmilch, T., Runn, E., Mendes, A. and Kafatos, F.C. (2006)** The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Curr Opin Genet Dev*, 16: 384-391.
- Waller, R.F., Reed, M.B., Cowman, A.F. and McFadden, G.I. (2000)** Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. *EMBO J*, 19: 1794-1802.
- Wang, L., Kedzierski, L., Wesselingh, S.L. and Coppel, R.L. (2003)** Oral immunization with a recombinant malaria protein induces conformational antibodies and protects mice against lethal malaria. *Infect Immun*, 71: 2356-2364.
- Ward, P., Equinet, L., Packer, J. and Doerig, C. (2004)** Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics*, 5: 79.
- Wickham, M.E., Rug, M., Ralph, S.A., Klonis, N., McFadden, G.I., Tilley, L. and Cowman, A.F. (2001)** Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Embo J*, 20: 5636-5649.
- Wilson, R.J. and Williamson, D.H. (1997)** Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiol Mol Biol*, 61: 1-16.
- Winter, G., Kawai, S., Haeggstrom, M., Kaneko, O., von Euler, A., Kawazu, S., Palm, D., Fernandez, V. and Wahlgren, M. (2005)** SURFIN is a polymorphic antigen expressed on *Plasmodium falciparum* merozoites and infected erythrocytes. *J Exp Med*, 201: 1853-1863.
- Wirth, C.C. and Pradel, G. (2012)** Molecular mechanisms of host cell egress by malaria parasites. *Int J Med Microbiol*, 302: 172-178.
- Wongsrichanalai, C. and Meshnick, S.R. (2008)** Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis*, 14: 716-719.
- World Health Organization: World malaria report 2013.** Geneva 2013.
- Wu, Y., Sifri, C.D., Lei, H.H., Su, C.Z. and Wellems, T.E. (1995)** Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 973-977.
- Uhlemann, A.C. and Krishna, S. (2005)** Antimalarial multi-drug resistance in Asia: mechanisms and assessment. *Curr Top Microbiol Immunol*, 295: 39-53.
- Umlas, J. and Fallon, J.N. (1971)** New thick-film technique for malaria diagnosis. Use of saponin stromatolytic solution for lysis. *Am J Trop Med Hyg*, 20: 527-529.
- Yamauchi, L.M., Coppi, A., Snounou, G. and Sinnis, P. (2007)** *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol*, 9: 1215-1222.
- Yayon, A., Timberg, R., Friedman, S. and Ginsburg, H. (1984)** Effects of chloroquine on the feeding mechanism of the intraerythrocytic human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *J Protozool*, 31: 367-372.
- Yoon, H.S., Grant, J., Tekle, Y.I., Wu, M., Chaon, B.C., Cole, J.C., Logsdon, J.M., Patterson, D.J., Bhattacharya, D. and Katz, L. (2008)** Broadly sample multigene trees of eukaryotes. *BMC Evol Biol*, 8: 14.
- Yuthavong, Y. and Limpai boon, T. (1987)** The relationship of phosphorylation of membrane proteins with the osmotic fragility and filterability of *Plasmodium berghei*-infected mouse erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 929: 278-287.
- Zhu, X., Yahata, K., Alexandre, J.S., Tsuboi, T. and Kaneko, O. (2013)** The N-terminal segment of *Plasmodium falciparum* SURFIN4.1 is required for its trafficking to the red blood cell cytosol through the endoplasmic reticulum. *Parasitol Int*, 62: 215-229.

Anhang

A Iupac-Codes für Nukleotide und Aminosäuren

Tabelle A.1: Iupac-Abkürzungscode für Nukleotide.

Abkürzungen	Entsprechende Nukleotide
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Tabelle A.2: Iupac-Abkürzungscode für Aminosäuren.

Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode	Entsprechende Aminosäuren
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

B Vektorkarten und –sequenzen

B.1 Vektorkarte p-GEM-T

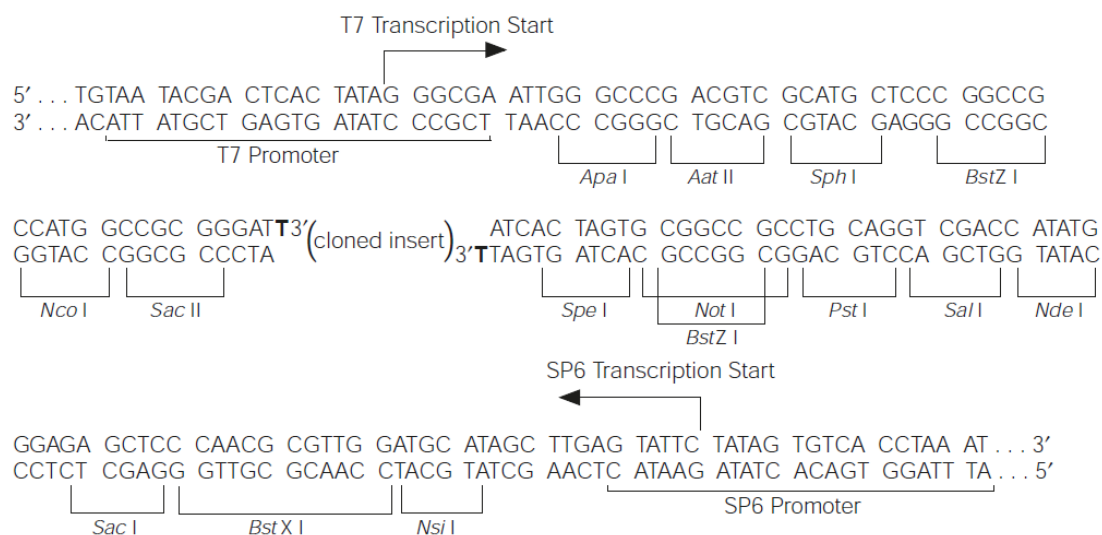
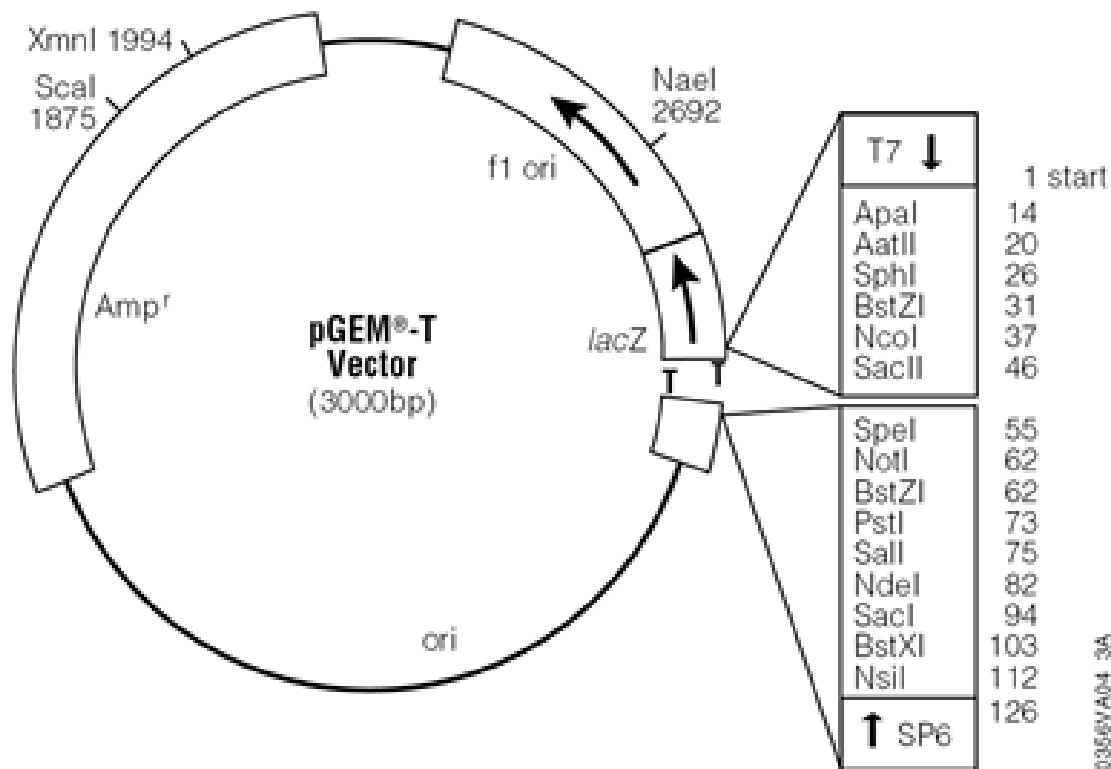


Abbildung B.1: Vektorkarte und –sequenz von pGEM-T.

B.2 Vektorkarte pJET1.2/blunt

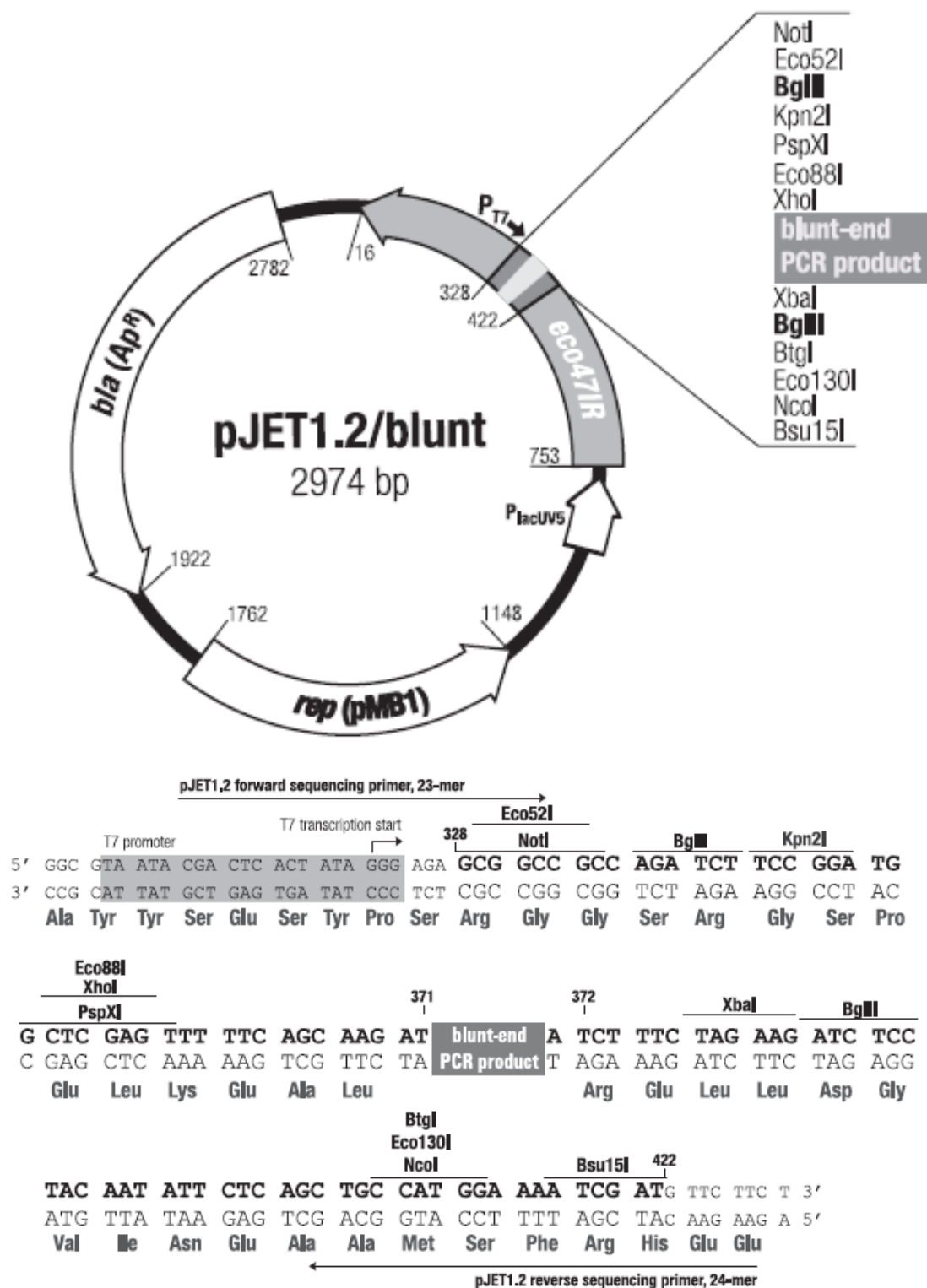


Abbildung B.2: Vektorkarte und –sequenz von pJET1.2/blunt.

B.3 Vektorkarte pARL1a(-)

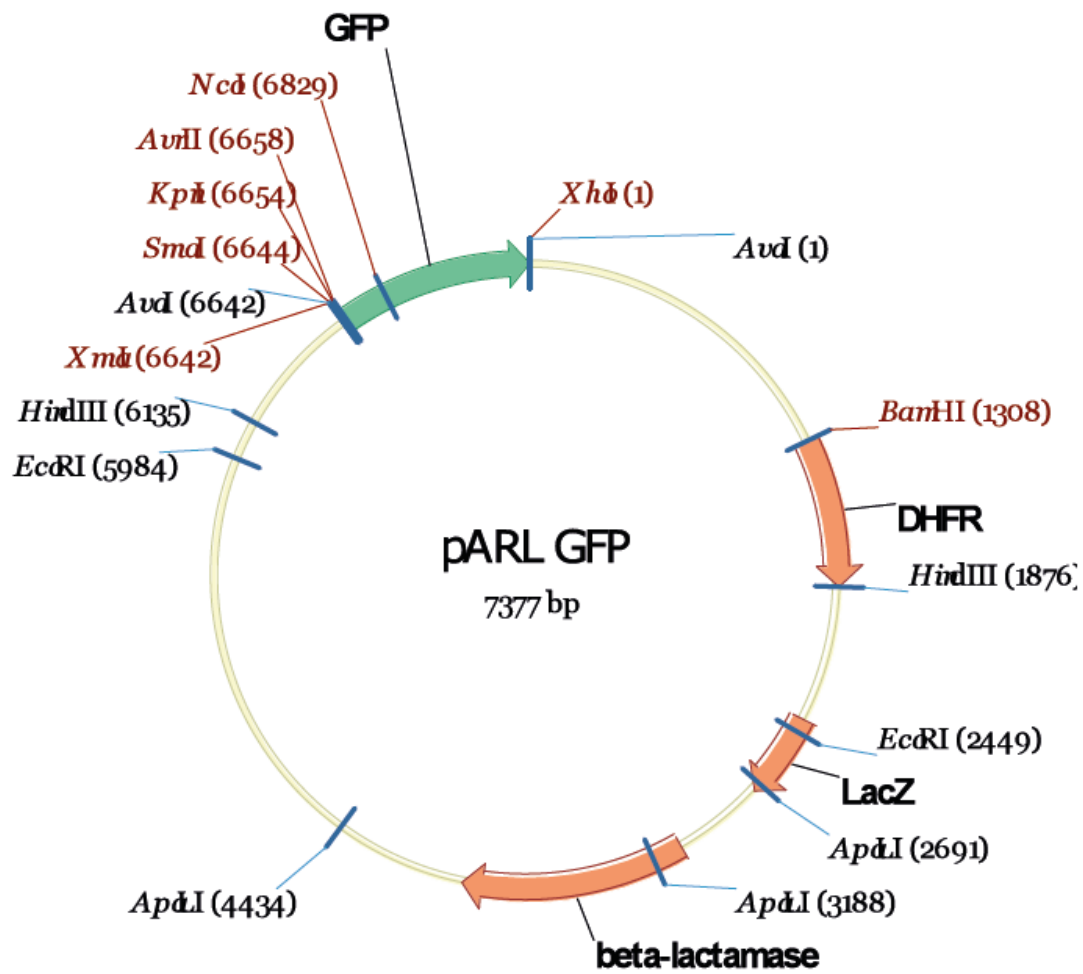


Abbildung B.3: Vektorkarte von pARL1a(-) (Crabb et al., 2004).

C Verwendete DNA- und Proteinmarker

C.1 DNA-Standardmarker

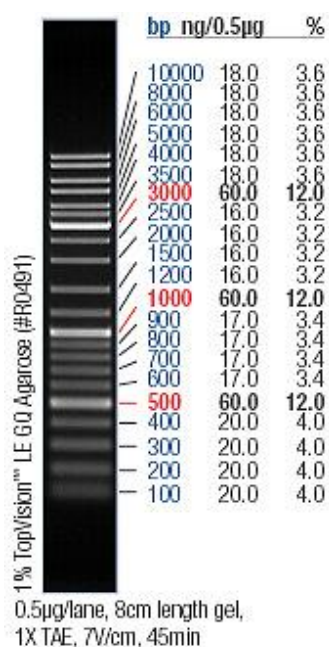


Abbildung C.1: GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, St. Leon-Rot)

C.2 Protein-Standardmarker

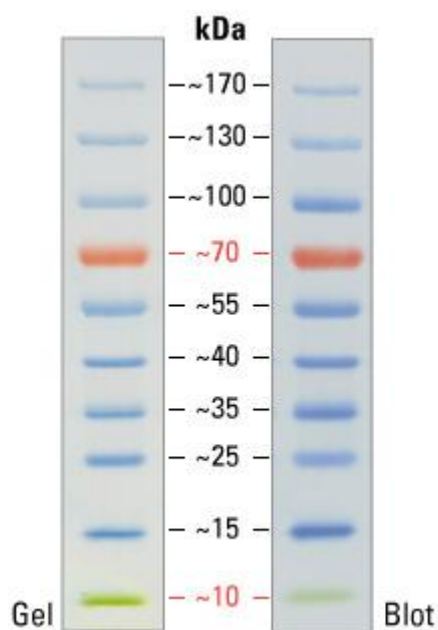


Abbildung C.2 PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)

D Mittels Massenspektrometrie identifizierte Peptide

Tabelle D.1: Liste der mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen identifizierten Peptide in den Reporterproteinen REX3, GBP, PFC0085c, PFI1780w und PFL0045c.

Identifizierte Peptide	Modifikationen
REX3¹⁻⁷⁰-KQLSE-GFP	
AEVKFEGDTLVNR	
AEVKFEGDTLVNRIELK	
DDGNYKTR	
DHMLLEFVTAAGITHGMDELYK	Oxidation (M3; M18)
EDGNILGHK	
FEGDTLVNR	
FEGDTLVNRIELK	
FICTTGK	Carbamidomethyl (C3)
FSVSGEGEGDATYGK	
FSVSGEGEGDATYGKLTk	
GEELFTGVVPILVELDGDVNGHK	
GIDFKEDGNILGHK	
LEYNYNShNVYIMADK	Oxidation (M13)
LEYNYNShNVYIMADKQK	Oxidation (M13)
NVYVVCIFFFVHAHACK	Carbamidomethyl (C16)
QHDFEK	
SAMPEGYVQER	Oxidation (M3)
SEPVVEEQDLK	Acetylierung (N-Terminus)
TIFFKDDGNYK	
TNAESSHIEAPR	
GBP¹⁻¹⁰⁸-KILAE-GFP	
AEGEDTCAR	Acetylierung (N-Terminus); Carbamidomethyl C (C7)
FSVSGEGEGDATYGK	
SAMPEGYVQER	Oxidation (M3)
TIFFKDDGNYK	
AEVKFEGDTLVNR	
FEGDTLVNR	
GIDFKEDGNILGHK	
EDGNILGHK	
LEYNYNShNVYIMADK	
DHMLLEFVTAAGITHGMDELYK	Oxidation (M3; M18)
GBP¹⁻¹⁰⁸-AILAE-GFP	
AEVKFEGDTLVNR	
AEVKFEGDTLVNRIELK	
AVDYGFR	
DDGNYKTR	
DHMLLEFVTAAGITHGMDELYK	Oxidation (M13; M18)
EDGNILGHK	
ESAILAEGEDTCAR	Carbamidomethyl (C12)
ESAILAEGEDTCARK	Carbamidomethyl (C12)
FEGDTLVNR	
FEGDTLVNRIELK	
FICTTGK	Carbamidomethyl (C3)
FSVSGEGEGDATYGK	
FSVSGEGEGDATYGKLTk	
GEELFTGVVPILVELDGDVNGHK	

GIDFKEDGNILGHK

LEYNYNShNVYIMADK	Oxidation (M13)
LEYNYNShNVYIMADKQK	Oxidation (M13)
NVYVVCIFFFVHAHACK	Carbamidomethyl (C16)
QHDFFK	
SAMPEGYVQER	Oxidation (M3)
TIFFKDDGNYK	

PFC0085c¹⁻²²⁰-KSLAE-GFP

AEVKFEGDTLVNR	
AEVKFEGDTLVNRIELK	
ALILSYIR	
DDGNYKTR	
DHMLLEFVTAAGITHGMDELYK	Oxidation (M3; M18)
EDGNILGHK	
FEGDTLVNR	
FEGDTLVNRIELK	
FICTTGK	Carbamidomethyl (C3)
FSVSGEGEGDATYGK	
FSVSGEGEGDATYGKLTk	
GEELFTGVVPILVELDGDVNGHK	
GIDFKEDGNILGHK	
HFVDFIPR	
LEYNYNShNVYIMADK	Oxidation (M13)
LEYNYNShNVYIMADKQK	Oxidation (M13)
NGNDNNMQLLPYANNK	Oxidation (M7)
NKEFFR	
NVYVVCIFFFVHAHACK	Carbamidomethyl (C16)
QHDFFK	
SAMPEGYVQER	Oxidation (M3)
SEDDDDSEEEYNSTPR	
TIFFKDDGNYK	
TIVDELNLPNDK	
TIVDELNLPNDKK	
VTVLEPQTENSEDEENYEK	

PFI1780w-KSLAE-GFP

AEASPEEHNLR	Acetylierung (N-Terminus)
AEVKFEGDTLVNR	
AEVKFEGDTLVNRIELK	
DDGNYKTR	
DHMLLEFVTAAGITHGMDELYK	Oxidation (M3; M18)
EDGNILGHK	
EWIEFR	
FAHFEMQGYALK	Oxidation (M6)
FEGDTLVNR	
FEGDTLVNRIELK	
FICTTGK	Carbamidomethyl (C3)
FIQSIVETYK	
FIQSIVETYKIPDEYK	
FKEVLEYVKR	
FLLEYAFLSLNGK	
FSVSGEGEGDATYGK	

FSVSGEGEGDATYGKLTlk	
GEELFTGVVPILVELDGDVNGHK	
GIDFKEDGNILGHK	
GYLGEVESETIK	
GYLGEVESETIKK	
KSMFDVWK	Oxidation (M3)
KVEENIFK	
KYTAEINEMINSSNEFINR	Oxidation (M10)
LEYNYNSHNVYIMADK	Oxidation (M13)
LEYNYNSHNVYIMADKQK	Oxidation (M13)
NDMNIIFSYVHESER	Oxidation (M3)
NDMNIIFSYVHESEREK	Oxidation (M3)
NVYVVCIFFFVHAHACK	Carbamidomethyl (C16)
QHDFFK	
QHELDRR	
SAMPEGYVQER	Oxidation (M3)
SMFDVWK	Oxidation (M2)
TIFFKDDGNYK	
VEENIFK	
YTAEINEMINSSNEFINR	Oxidation (M9)
PFL0045c-KMLCE-GFP	
AEVKFEGDTLVNR	
AEVKFEGDTLVNRIELK	
AYNDVHGFYLNK	
DDGNYKTR	
DHMLLEFVTAAGITHGMDELYK	Oxidation (M3; M18)
DMHLDNFDDVDNFDYFDNIDDVNNMEGVDF	Oxidation (M2; M25)
GDVHK	
DNNIDDKNSFALPSEHK	
EDGNILGHK	
EISDNDDIVNNEEISNFDK	
EISDNDDIVNNEEISNFDKYYK	
EMMNNMWSENISVK	Oxidation (M2; M3)
FEGDTLVNR	
FEGDTLVNRIELK	
FGDYFNFEDDDSFDDK	
FICTTGK	Carbamidomethyl (C3)
FREMMNNMWSENISVK	Oxidation (M4; M5)
FSVSGEGEGDATYGK	
FSVSGEGEGDATYGKLTlk	
GEELFTGVVPILVELDGDVNGHK	
GIDFKEDGNILGHK	
INVEDKDNNIDDK	
INVEDKDNNIDDKNSFALPSEHK	
KAYNDVHGFYLNK	
KYLNMECQLYLYCEK	Oxidation (M5); Carbamidomethyl (C7)
LANKYNIPDDYK	
LEYNYNSHNVYIMADK	Oxidation (M13)
LEYNYNSHNVYIMADKQK	Oxidation (M13)
MTMEELYVIIFYIHEIER	Oxidation (M1; M3)
NHELNYACNNNNNIYAYK	Carbamidomethyl (C8)
NPFDEANYFK	

NSFALPSEHK	
NTLLTINILK	
NVYVVCIFFFVHAHACK	Carbamidomethyl (C16)
QHDFFK	
SAMPEGYVQER	Oxidation (M3)
SNSLHISNDNVLMMEYIK	Oxidation (M13)
SNSLHISNDNVLMMEYIKK	Oxidation (M13)
TIFFKDDGNYK	
YLNMECQLYLYCEK	Oxidation (M4); Carbamidomethyl (C6)
YNIPDDYK	
YNIPDDYKIK	

Grau: Identifizierte Peptide im jeweiligen Protein; Grün: Identifizierte Peptide im GFP-Tag; Dick hervorgehoben: Semi-tryptische Peptide, die eine Prozessierung am alternativen PEXEL-Motiv des jeweiligen Reporterproteins anzeigen.

E Kandidatenliste von Proteinen mit klassischem/alternativem PEXEL-Motiv

Tabelle E.1: Proteine mit klassischem/alternativem PEXEL-Motiv, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Gen ID (neue GenID)	Annotation in PlasmoDB V12.0	klassisches/alternatives PEXEL-Motiv
PF07_0087 (PF3D7_0721100)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	KDLKQ (RKLLS)*
PF08_0004 (PF3D7_0830400)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	KELYQ
PF08_0015 (PF3D7_0827400)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	KTLTD
PF11_0055 (PF3D7_1104400)	conserved protein, unknown function	KGILT
PF11_0349 (PF3D7_1133900)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	KSLSD
PF13_0032 (PF3D7_1306200)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	RYIQE
PF13_0125 (PF3D7_1321900)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	KSIRE
PF13_0193 (PF3D7_1334600)	MSP7-like protein (MSRP3)	KLLEE
PF13_0197 (PF3D7_1335100)	merozoite surface protein 7 (MSP7)	KKIEE
PF13_0218a (PF3D7_1340200)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	KELGW
PF13_0331 (PF3D7_1362300)	conserved protein, unknown function	KKLNE
PF14_0105 (PF3D7_1410700)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	KDLLD
PF14_0275 (PF3D7_1429600)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function (GEXP03)	KEIYE
PF14_0325 (PF3D7_1434400)	conserved <i>Plasmodium</i> membrane protein, unknown function	KKLQE
PFA0135w (PF3D7_0102700)	merozoite-associated tryptophan-rich antigen, putative	RNIIQ

PFA0610c (PF3D7_0112800)	<i>Plasmodium</i> exported protein (hyp11), unknown function	RIIAE
PFC0085c (PF3D7_0301700)	<i>Plasmodium</i> exported protein, unknown function	KSLAE
PFD0144c (PF3D7_0402900)	probable protein, unknown function	KDLEE
PFD1205w (PF3D7_0425200)	<i>Plasmodium</i> exported protein (hyp15), unknown function	HELSQ
PFE0645w (PF3D7_0513000)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	KPLVT
PFE0725c (PF3D7_0514500)	conserved <i>Plasmodium</i> membrane protein, unknown function	KKLLQ
PFF0335c (PF3D7_0606800)	probable protein, unknown function	KELIQ
PFI1530c (PF3D7_0931500)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	KQILD
PFI1780w (PF3D7_0936800)	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTc), unknown function	KSLAE
PFL0040c (PF3D7_1200800)	serine/threonine protein kinase, FIKK family (FIKK12)	KCLSE
PFL0045c (PF3D7_1200900)	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTc), unknown function	KMLCE
PFL0070c (PF3D7_1201400)	<i>Plasmodium</i> exported protein, unknown function	KILSE
MAL13P1.129 (PF3D7_1322900)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	KHLRE

Grün: Proteine, die exportiert werden; (*): Alternatives PEXEL, hervorgesagt von Sargeant et al. (2006).

F Westernblotanalysen der GFP-Fusionsproteine

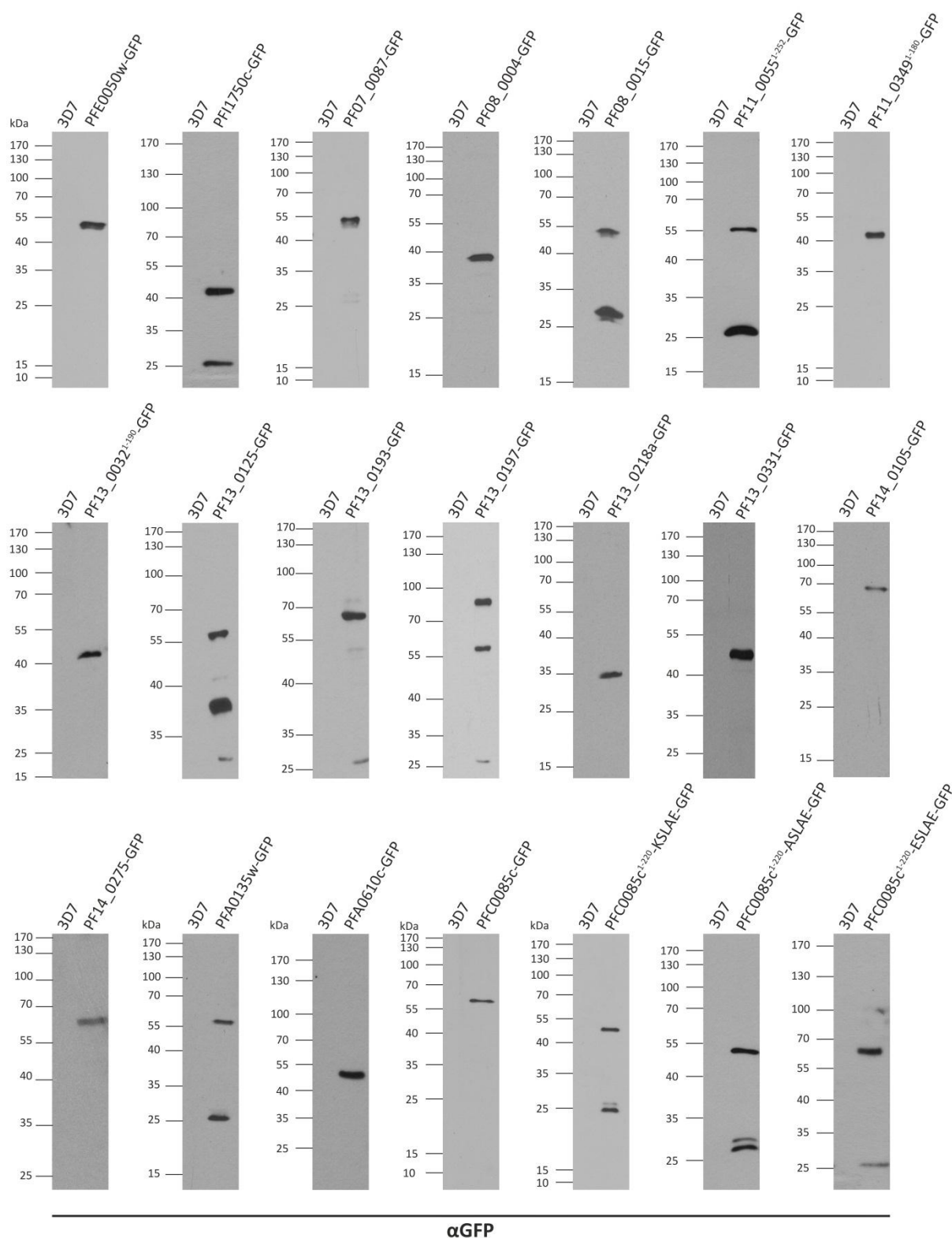


Abbildung F1: Überprüfung der Integrität der unterschiedlichen GFP-Fusionsproteine mittels Westernblotanalyse mit Hilfe von GFP-spezifischen Antikörpern. Als Kontrolle dienten Erythrozyten infiziert mit dem *P. falciparum*-Stamm 3D7. Neben dem GFP-Fusionsprotein konnte häufig das Abbauprodukt GFP mit einem Molekulargewicht von ca. 27 kDa detektiert werden.

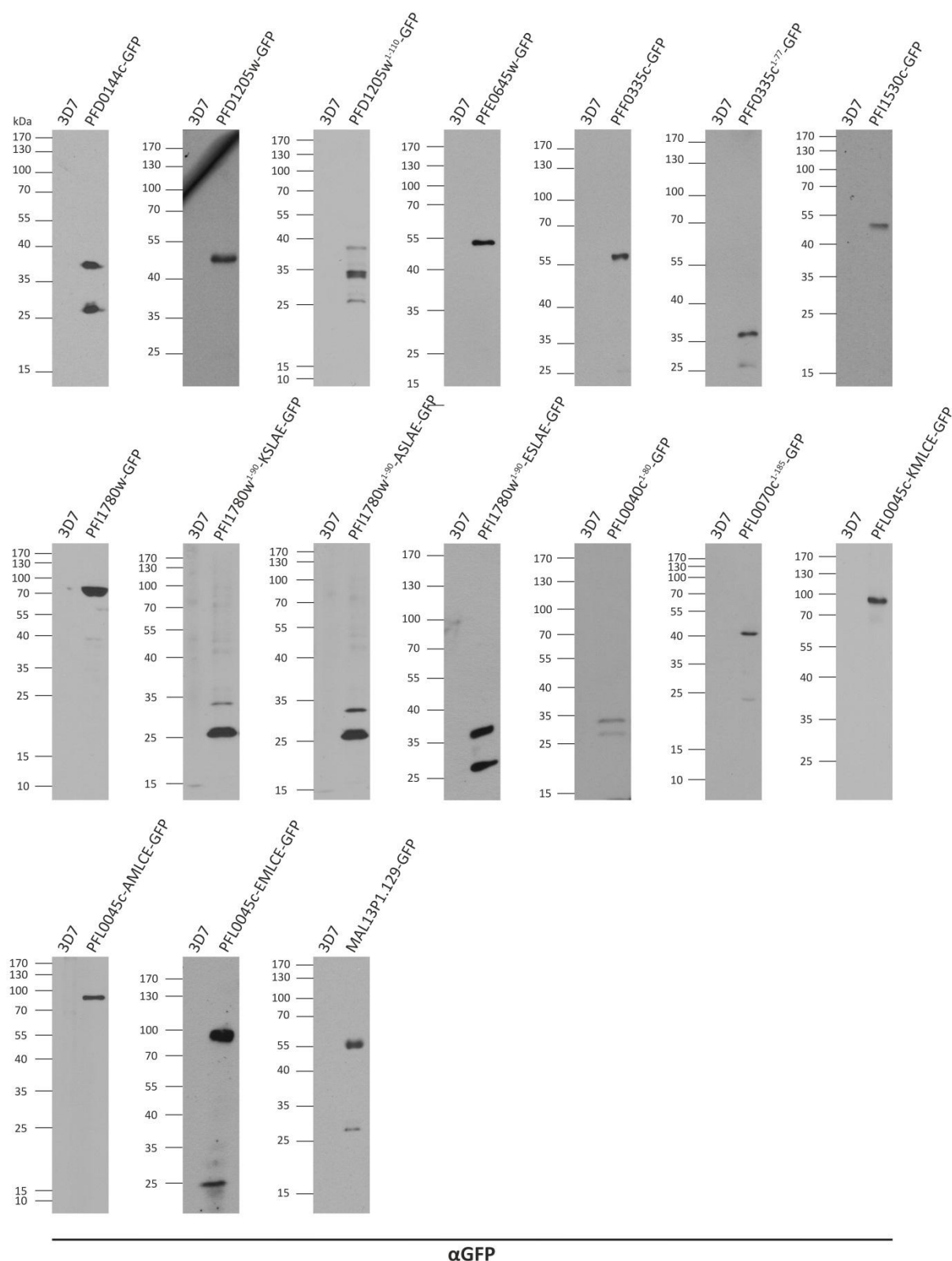


Abbildung F.2: Überprüfung der Integrität der unterschiedlichen GFP-Fusionsproteine mittels Westernblotanalyse mit Hilfe von GFP-spezifischen Antikörpern. Als Kontrolle dienten Erythrozyten infiziert mit dem *P. falciparum*-Stamm 3D7. Neben dem GFP-Fusionsprotein konnte häufig das Abbauprodukt GFP mit einem Molekulargewicht von ca. 27 kDa detektiert werden.

G Proteine mit klassischem PEXEL-Motiv mit geladenen Aminosäuren an Position 2 oder 4

Tabelle G.1: Proteine aus der Exportomvorhersage von Boddey et al. (2013), die an Position 2 oder 4 des klassischen PEXEL-Motivs eine geladenen Aminosäure besitzen.

Gen ID (neue GenID)	Annotation in PlasmoDB V12.0	PEXEL-Motiv
Geladene Aminosäure an Position 2 des PEXEL-Motivs		
PF11770w (PF3D7_0936600)	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTb), unknown function	RKLSE
PFL0060w (PF3D7_1201200)	<i>Plasmodium</i> exported protein, unknown function	RKLAD
PF10110c (PF3D7_0902300)	serine/threonine protein kinase, FIKK family	RKLAE
PF10_0381 (PF3D7_1039100)	DnaJ protein, putative	RRLYE
PFE0045c (PF3D7_0500900)	serine/threonine protein kinase, FIKK family	RKLNE
PF10_0378 (PF3D7_1038800)	RESA-like protein with PHIST and DnaJ domain	RKLYS
PF10_0380 (PF3D7_1039000)	serine/threonine protein kinase, FIKK family	RHLSD
PF11_0034 (PF3D7_1102200)	DnaJ protein, putative	RRLYE
PFD1165w (PF3D7_0424500)	serine/threonine protein kinase, FIKK family	RHLTE
PFE1605w (PF3D7_0532400)	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTb), unknown function	RKLCE
MAL8P1.163 (PF3D7_0800600)	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTa), unknown function	RKLYD
PFA0735w (PF3D7_0115100)	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTa), unknown function	RKLYD
MAL8P1.205 (PF3D7_0831300)	<i>Plasmodium</i> exported protein, unknown function	RKLSE
PFA0585w (PF3D7_0112100)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	RKLLS
PF10_0020 (PF3D7_1001600)	alpha/beta hydrolase, putative	RKLAE
PF14_0732 (PF3D7_1476300)	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTb), unknown function	RKLYE
PF08_0059 (PF3D7_0817500)	protein kinase c inhibitor-like protein, putative	RRLAK
PFE0030c (PF3D7_0500600)	stevor, pseudogene	RRLSE
PFD0095c (PF3D7_0402100)	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTb), unknown function	RKLYHE
PF07_0087 (PF3D7_0721100)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	RKLLS
PFL2395c (PF3D7_1249900)	apicoplast dimethyladenosine synthase, putative	RRLAT
PF10125c (PF3D7_0902600)	serine/threonine protein kinase, FIKK family	RHLNE
PF14_0075 (PF3D7_1407800)	Plasmepsin IV	RKLYQ

PFC0571a (PF3D7_0313700.1)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	RRLYK
PF14_0186 (PF3D7_1419200)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	RKLGY
PFC0571c (PF3D7_0313700.2)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	RRLYK
PFL2135c (PF3D7_1244500)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	RDLIK
PFL1540c (PF3D7_1232000)	phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain, putative	RKLNK
MAL13P1.268 (PF3D7_1352900)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	RKLAE
Geladene Aminosäure an Position 4 des PEXEL-Motivs		
PFI0130c (PF3D7_0902700)	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTb), unknown function	RNLHE
PF10_0331a (PF10_0331a)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	RVLKE
PF11_0099 (PF11_0099)	heat shock protein DnaJ homologue Pfj2	RQLAKE
MAL13P1.165 (PF3D7_1330700)	GPI transamid subunit PIG-U, putative	RELKE
MAL7P1.231 (PF3D7_0831800)	histidine-rich protein II	RLLHE
MAL13P1.480 (PF3D7_1372200)	histidine-rich protein III	RLLHE
PFE1615c (PF3D7_0532600)	<i>Plasmodium</i> exported protein, unknown function	RILKQ
PFL0600w (PF3D7_1212100)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	RILKE
PFA0210c (PF3D7_0104200)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	RILKE
PFB1040w (PFB1040w)	rifin	RVLRE
PFD0235c (PF3D7_0404800)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	RVLHN
PFE0360c (PF3D7_0507300)	conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	RILEE
PF10_0164 (PF3D7_1016900)	erly transcribed membrane protein 10.3	RTLEK
PFE0370c (PF3D7_0507500)	subtilisin-like protease 1	RFLEK
PF07_0035 (PF3D7_0709100)	Cg1 protein	RSLKY

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Thorsten Burmester für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Begutachtung meiner Doktorarbeit. Ein besonderes Dankeschön gebührt dabei Dr. Christian Pick. Vielen Dank für deine Betreuung, dein immer offenes Ohr und für deine hilfreichen Tipps und Ratschläge!

Bei Prof. Dr. Iris Bruchhaus möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Des Weiteren bedanke ich mich für die stetige Betreuung und Hilfestellungen im Laboralltag. Dabei geht mein Dank auch an Jenny Thiede.

Ein sehr großer Dank geht an Dr. Tobias Spielmann für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppen, den gestellten Arbeitsplatz, die Einführung in die Arbeit und den Umgang mit *P. falciparum* und die stets offene Bürotür. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe Spielmann und natürlich auch Gilberger bedanken. Danke für die Übernahme so mancher Parasitenfütterung und für die lustigen Frühstücksgespräche.

Ich bedanke mich bei allen ehemaligen und aktuellen Kollegen der AG Burmester. Vielen Dank für die interessanten, lustigen und ausgiebigen Mittagspausen sowie legendären Partys. Es war eine wirklich tolle Arbeitsatmosphäre, welche ich vermissen werde! Insbesondere danke ich Kim. Gemeinsam haben wir unsere Studium und unsere Doktorarbeit gemeistert.

Bei Marcel Kwiatkowski bedanke ich mich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen und den darauffolgenden Erklärungen der Spektren.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit bedanke ich mich bei der Universität Hamburg (Promotionsstipendium nach dem HmbNFG) und der DFG.

Zuletzt möchte ich meiner großartigen Familie danken. Danke, dass ihr mich immer unterstützt habt und für mich da seid!!!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Quellen – benutzt habe und die Arbeit von mir vorher nicht einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem Speichermedium.

Hamburg, Januar 2015

Jana Schulze

Jana Schulze