

Plasmodium falciparum:
**Funktionsanalysen von Proteinen des
sekretorischen Transportweges in transfizierten Zellen**

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sabine Wiek
aus Duisburg

Marburg/ Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 23. Februar 2004 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. K. Lingelbach

Zweitgutachter: Prof. Dr. U.G. Maier

Tag der Disputation am: 27. Februar 2004

Aus der vorliegenden Arbeit ist folgende Publikation entstanden:

Baumgartner, F., Wiek, S., Paprotka, K., Zauner, S., and Lingelbach, K. (2001) A point mutation in an unusual Sec7 domain is linked to brefeldin A resistance in a *Plasmodium falciparum* line generated by drug selection. *Mol Microbiol* **41**: 1151-1158.

1. Zusammenfassung

2. Einleitung

2.1	<i>Der Parasit Plasmodium falciparum</i>	2
2.2	<i>Invasion der Erythrozyten und Formation der parasitophoren Vakuole</i>	3
2.3	<i>Pathogenitätsmechanismen</i>	4
2.4	<i>Der sekretorische Weg des Parasiten</i>	6
2.5	<i>Alternative Sekretionswege</i>	8
2.6	<i>„Trafficking Signals“</i>	9
2.7	<i>Proteintransport in den Apikoplast</i>	13
2.8	<i>„Default Pathway“</i>	15
2.9	<i>Transport innerhalb des Erythrozytenzytosols (EZ)</i>	19
2.10	<i>Inhibierung des Proteintransports durch Brefeldin A (BFA)</i>	20
2.11	<i>Die Sec7 Domäne von Plasmodium falciparum</i>	23
2.12	<i>Ziele dieser Arbeit</i>	24

3. Material und Methoden

3.1	Material	26
3.1.1	<i>Geräte</i>	26
3.1.2	<i>Chemikalien</i>	26
3.1.3	<i>Sonstige Materialien</i>	28
3.1.4	<i>Medien, Puffer und sonstige Zusätze</i>	28
3.1.5	<i>Enzyme</i>	32
3.1.6	<i>Antikörper und Seren</i>	32
3.1.7	<i>Fertige Reagenziensätze und Marker</i>	32
3.1.8	<i>Plasmide</i>	33
3.1.9	<i>Synthetische Oligonukleotide</i>	33
3.1.10	<i>Zellen und Organismen</i>	34
3.2	Methoden	35
3.2.1	<i>Arbeiten mit Bakterien (Escherichia coli)</i>	35
3.2.1.1	<i>Mini, Midi, Maxi Präparation von Plasmid DNA aus E. coli</i>	35
3.2.1.2	<i>Herstellung elektrokompenter Bakterien</i>	35
3.2.1.3	<i>Transformation von E. coli (Elektroporation)</i>	35
3.2.2	<i>Arbeiten mit Hefen (Saccharomyces cerevisiae)</i>	36
3.2.2.1	<i>Transformation von Hefen & Alternatives Protokoll</i>	36
3.2.2.2	<i>Kolonie-PCR von Hefen</i>	36
3.2.2.3	<i>Hefe-Zell-Lyse und Vorbereitung von Hefen für SDS-PAGE</i>	37
3.2.2.4	<i>Plasmid-DNA-Isolation aus Hefen</i>	37
3.2.2.5	<i>Transformation von Hefe-Plasmiden in Bakterien und M9 Selektion</i>	37
3.2.3	<i>Arbeiten mit Plasmodium falciparum Blutstadien</i>	38
3.2.3.1	<i>Kultivierung von Plasmodium falciparum Blutstadien</i>	38
3.2.3.2	<i>Ernte und Anreicherung von Plasmodium falciparum Trophozoiten-/ Schizontenstadien</i>	38

3.2.3.3	<i>Giemsa-Färbung</i>	39
3.2.3.4	<i>Synchronisation von P. falciparum Blutzellkulturen mit Sorbitol</i>	39
3.2.3.5	<i>Aufschluss von infizierten Erythrozyten</i>	39
3.2.3.6	<i>Stabile Transfektion von Plasmodium falciparum Blutstadien (nach T. Triglia)</i>	40
3.2.4	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	
3.2.4.1	<i>Restriktionsverdau von DNA</i>	41
3.2.4.2	<i>Elektrophorese von DNA in Agarosegelen</i>	41
3.2.4.3	<i>Klonierung von PCR-Produkten</i>	42
3.2.4.4	<i>Reinigung von Nukleinsäuren</i>	42
3.2.4.5	<i>Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration</i>	43
3.2.4.6	<i>Genomischer Screen von E. coli Kolonien</i>	43
3.2.4.7	<i>Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1988)</i>	44
3.2.4.8	<i>Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)</i>	45
3.2.4.9	<i>RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends)</i>	46
3.2.4.10	<i>Deletion von DNA-Sequenzbereichen</i>	46
3.2.4.11	<i>Markierung von DNA-Fragmenten</i>	47
3.2.4.12	<i>Southern Blot (upward-capillar-transfer)</i>	48
3.2.4.13	<i>Sequenz-spezifische Mutagenese</i>	49
3.2.4.14	<i>Präparation von Gesamt RNA aus Plasmodium falciparum</i>	49
3.2.4.15	<i>Aufreinigung von mRNA aus Gesamt RNA</i>	49
3.2.4.16	<i>Präparation von genomischer DNA aus Plasmodium falciparum</i>	49
3.2.4.17	<i>Elektrophorese von RNA im Formaldehydgel</i>	50
3.2.4.18	<i>Northern Blot</i>	50
3.2.5	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	
3.2.5.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Lämmli, 1970)</i>	51
3.2.5.2	<i>Westernimmunoblot</i>	52
3.2.5.3	<i>Proteinfärbung auf dem Blot</i>	52
3.2.5.4	<i>Immunfärbung</i>	52
3.2.5.5	<i>Proteinfärbung in SDS-Polyacrylamidgelen</i>	53
3.2.5.6	<i>Dialyse von Proteinlösungen</i>	53
3.2.5.7	<i>Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen durch Bradford-Test</i>	54
3.2.5.8	<i>Aufreinigung von GST-markierten Proteinen mittels Affinitätschromatographie</i>	54
3.2.5.9	<i>In-vitro Invertase-Aktivitätstest</i>	55
3.2.6	<i>Generierung spezifischer Antiseren aus Kaninchen</i>	
3.2.6.1	<i>Überprüfung der Präimmunsereen</i>	56
3.2.6.2	<i>Herstellung von Antiseren</i>	56

4. Ergebnisse

4.1	<i>Gbp130 - ein sezerniertes Parasitenprotein mit ungewöhnlicher Signalsequenz?</i>	57
4.1.1	<i>Analyse des genomischen Aufbaus einiger sezernierter Parasitenproteine</i>	57
4.1.2	<i>Analyse des gbp130 Transkripts</i>	58
4.1.3	<i>Signal Sequence Trap</i>	63
4.1.4	<i>Berechnung der Wahrscheinlichkeiten für Signalsequenzen</i>	69
4.1.5	<i>Fazit 1</i>	71

4.2	<i>Der Arf-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (Arf-Gef) des Parasiten P. falciparum</i>	72
4.2.1	<i>Konserviertheit der Sec7 Domäne</i>	73
4.2.2	<i>Expression des Pf arf-gef Gens bzw. der Sec7 Domäne</i>	75
4.2.3	<i>Struktur der Pf Sec7 Domäne im Modell</i>	77
4.2.4	<i>Transfektionen von Saccharomyces cerevisiae und Plasmodium falciparum</i>	78
4.2.5	<i>Plasmid-Transfektionen von Plasmodium falciparum Blutstadien</i>	79
4.2.6	<i>Verwendung des Plasmodium falciparum 3D7 Stammes für Transfektionen</i>	79
4.2.7	<i>Konstruktion der Transfektionsplasmide</i>	82
4.2.8	<i>Selektionsstrategie mit transfizierten Parasiten</i>	83
4.2.9	<i>Sequenz-Analyse des transgenen 3D7^{BFA} Stammes</i>	88
4.2.10	<i>Transfektion von Plasmodium falciparum mit PCR Fragmenten</i>	92
4.2.11	<i>Fazit 2</i>	92
4.2.12	<i>Komplementation einer Sec7 Domäne in Saccharomyces cerevisiae</i>	93
4.2.13	<i>Fazit 3</i>	98

5. Diskussion

5.1	<i>Sezernierte Proteine von Plasmodium falciparum</i>	99
5.2	<i>Funktionelle Analyse von Plasmodium falciparum Antigenen in homologen bzw. heterologen Expressionssystemen</i>	100
5.2.1	<i>Signal Sequence Trap</i>	101
5.3	<i>Der Arf-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (Arf-Gef) von Plasmodium falciparum</i>	103
5.4	<i>Komplementiert die P. falciparum Sec7 Domäne die S. cerevisiae Gea1 Sec7 Domäne?</i>	105
5.5	<i>Welche Rolle spielt die Sec7-Insertionssequenz im Arf-Gef für den Parasiten?</i>	106
5.6	<i>Ausblick</i>	108
I.	Abbildungsverzeichnis	110
II.	Tabellenverzeichnis	113
III.	Abkürzungsverzeichnis	114
IV.	Literaturverzeichnis	117
V.	Danksagung	131

1. Zusammenfassung

In erythrozytären Entwicklungsstadien von *Plasmodium falciparum* werden Parasitenproteine zu verschiedenen Kompartimenten innerhalb des Parasiten transportiert sowie in die Wirtszelle exportiert und stehen in direktem Zusammenhang mit der schweren klinischen Symptomatik der Malaria tropica. Der Transport der meisten Parasitenproteine wird durch die Gegenwart von Brefeldin A (BFA) inhibiert. Die Zielstruktur von BFA ist die konservierte Sec7 Domäne der Arf-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (Arf-Gef), die für die Aktivierung von Arf (ADP-Ribosylierungsfaktor) und für die Ausbildung von COP I-Transportvesikeln notwendig ist. Über *double cross-over* Gen-Austausch in *P. falciparum* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Punktmutation innerhalb der Sec7 Domäne ausreichend ist, um BFA-Resistenz zu begründen. Es wurden Komplementations-Studien in der Hefe *S. cerevisiae* durchgeführt, die einen intermediären Phänotyp hervorbrachten und darauf hindeuten, dass das *P. falciparum* Arf-Gef möglicherweise als GDP-GTP-Austausch-Protein in ER-/Golgi-Transportprozessen funktioniert. In der Sec7 Region des PfArf-Gef existiert eine ungewöhnlich lange Einschubsequenz, deren Bedeutung in der Hefe und *in silico* untersucht wurde.

Exportierte Parasitenproteine, die in die Kompartimente des Apikalkomplexes oder in den Apikoplast transportiert werden, besitzen N-terminale ER-Signalsequenzen, während einige der in die Wirtszelle transportierten Proteine interne hydrophobe Regionen besitzen, von denen angenommen wird, dass sie als ungewöhnliche ER-Signalsequenzen fungieren könnten. Die interne hydrophobe Region von PfGbp130 (*glycophorine binding protein*) und verkürzte Varianten dieses Bereiches sowie die charakterisierte Signalsequenz von Exp-1 wurden in der Hefe *S. cerevisiae* als ER-Signalsequenzen getestet und erwiesen sich als nicht funktionell. Möglicherweise existieren ungewöhnliche oder verschiedene sekretorische Wege in *P. falciparum*, die in heterologen Systemen nicht rekonstituiert werden können.

In dieser Arbeit wurden zwei Teilaspekte der sekretorischen Prozesse in *P. falciparum* untersucht. Die Identifizierung und molekulare Analyse weiterer Mediatormoleküle im Proteintransport des Parasiten ist notwendig, um ein möglichst komplettes Bild über die sekretorischen Abläufe entwerfen zu können.

2. Einleitung

2.1 Der Parasit *Plasmodium falciparum*

Der einzellige Parasit *P. falciparum* ist der Erreger der für den Menschen lebensgefährlichen *Malaria tropica*. Dieser obligat intrazellulär lebende Parasit gehört der Gruppe der Apikomplexa an, die sich durch den sogenannten Apikalkomplex auszeichnet, der aus verschiedenen Organellen, den Rhoptrien, den Mikronemen und den dichten Granula, besteht. Er ermöglicht den Parasiten die Invasion ihrer Wirtszellen.

Die *Malaria tropica* ist die wichtigste durch Parasiten hervorgerufene Infektionskrankheit, an der jährlich 200 - 300 Millionen Menschen erkranken, von denen ca. zwei Millionen, insbesondere Kinder unter fünf Jahren, sterben. Diese hohe Sterblichkeit ist zum Einen auf eine - häufig ökonomisch begründete - unzureichende medizinische Versorgung in den Endemiegebieten zurückzuführen. Zum Anderen erschwert die Ausprägung von Resistenzen der Parasiten gegen zahlreiche, vor allem auch finanzierbare Medikamente Bemühungen diese Krankheit einzudämmen.

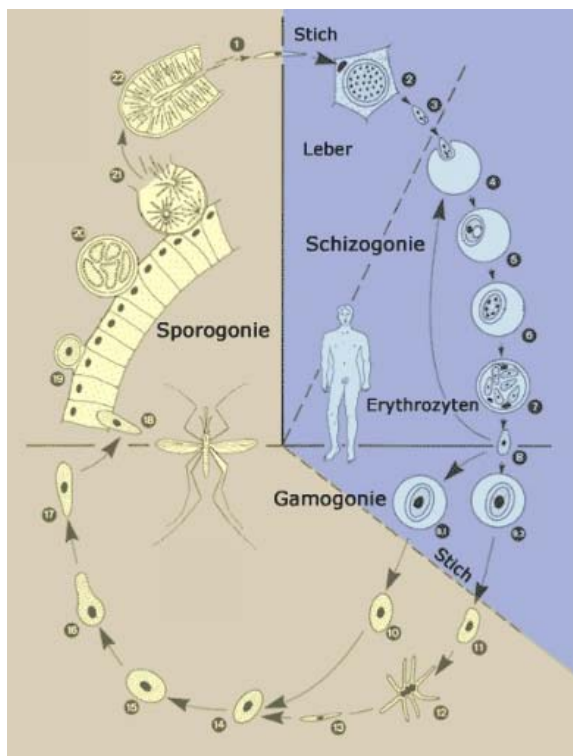


Abbildung 1: Die Infektion des Menschen mit *P. falciparum* erfolgt durch den Stich einer infizierten *Anopheles*-Mücke (1) und folgt dann einem festgelegten Fahrplan. Nachdem zunächst Leberzellen infiziert und zur Vermehrung genutzt werden (2), befallen die sogenannten Merozoiten menschliche Erythrozyten, in denen sie sich ebenfalls mehrfach teilen (4-8). Die Erythrozyten beherbergen die Parasiten für einen Zeitraum von 48 Stunden, in dem die Parasiten mehrere lichtmikroskopisch unterscheidbare Stadien durchlaufen (0-24 h Ringstadium, 24-36h Trophoziten-stadium, 36-48h Schizontenstadium) in denen sie sich teilen und danach freigesetzt werden. Nach kurzem extrazellulärem Aufenthalt können die freigesetzten Merozoiten erneut Erythrozyten befallen. Ein geringer Anteil der intraerythrozytären Stadien entwickelt

zu den sexuell differenzierten Mikro- und Makrogametozyten (8.1-8.2), die von einer blutsaugenden *Anopheles*-Mücke beim Stich aufgenommen werden (10-11). Im Mitteldarm der Mücke findet die sexuelle Vermehrung der Parasiten statt (20-21). Durch Reduktionsteilung und Mitosen entstandene infektiöse Sporozoiten gelangen in die Speicheldrüse der Mücke (21-22) und werden bei der nächsten Blutmahlzeit auf den Menschen übertragen (1). Quelle: www.infektionsbiologie.ch/parasitologie/

Die Krankheit äußert sich zunächst durch lang anhaltendes hohes Fieber. Eine häufig auftretende Komplikation im Krankheitsverlauf ist die sogenannte zerebrale Malaria, bei der die Blutzirkulation in Kapillaren des Gehirns durch infizierte Erythrozyten blockiert wird. Dies führt zunächst zu neurologischen Ausfällen und im späteren Stadium zum Koma. Das multiple Versagen innerer Organe kann schließlich zum Tode des Menschen führen.

2.2 Invasion der Erythrozyten und Formation der parasitophoren Vakuole

Die Invasion der Erythrozyten durch Merozoiten ist ein schneller und komplexer Vorgang, der auf Interaktionen zwischen den Parasiten und den Wirtszellen beruht und Anlagerung, Reorientierung und Penetration der roten Blutzelle einschließt (Chitnis and Blackman, 2000). Der Parasit bedient sich bei der Invasion einer Anzahl von Rezeptormolekülen auf der Wirtszelloberfläche (Dolan *et al.*, 1990; Dolan *et al.*, 1994; Reed *et al.*, 2000). Die initiale Interaktion mit der Wirtszelle wird vermutlich von Merozoiten-Oberflächenproteinen wie MSP1 und Rhoprienproteinen wie AMA1 und MAEBL vermittelt (Blair *et al.*, 2002a; Ghai *et al.*, 2002; Noe and Adams, 1998; Triglia *et al.*, 2000). Nachdem der Parasit sich mit seinem apikalen Pol zur Wirtszelloberfläche orientiert hat, erfolgt die Ausschüttung des Mikronemen- und Rhoprieninhalts. Dadurch wird möglicherweise eine festere Bindung an die Wirtszelle vermittelt (zusammengefasst in Chitnis and Blackman, 2000; Cowman and Crabb, 2002). Die Interaktion von Mikronemenproteinen der *ebf*-Superfamilie (EBA 140, EBA 165, EBA175, EBA181, EBL1) mit Oberflächenmolekülen der Erythrozyten (Glycophorin A, Glycophorin C und unbekannte Oberflächenmoleküle) vermittelt Invasionswege in die Wirtszelle (Adams *et al.*, 1992; Camus and Hadley, 1985; Sim, 1990; Orlandi *et al.*, 1992; Sim *et al.*, 1994; Gilberger *et al.*, 2003; Maier *et al.*, 2003). Es wird eine feste Verbindung zwischen der Parasitenplasmamembran und der Wirtszellmembran („*tight junction*“) hergestellt (zusammengefasst in Cowman and Crabb, 2002). Entlang dieser Verbindung dringt der Parasit in den Erythrozyten ein, wobei er wahrscheinlich durch einen Aktin-Myosinmotor angetrieben wird (Bergman *et al.*, 2003; Pinder *et al.*, 2000; Pinder *et al.*, 1998). Während der Penetration des Erythrozyten werden die Erythrozyten-bindenden Proteine wie MSP1 durch Proteolyse und *shedding* prozessiert (Guevara Patino *et al.*, 1997; Holder *et al.*, 1992).

Der Parasit bildet während des Invasionsprozesses eine parasitophore Vakuole (PV) aus, in welcher er während seines gesamten Entwicklungsprozesses in der Wirtszelle verbleibt. Die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) besteht aus einer Doppellipidschicht, deren Lipide hauptsächlich von der Wirtszellmembran stammen (Pouvelle *et al.*, 1994a; Ward

et al., 1993) - dies gilt auch für die PVM anderer Apikomplexa wie *Toxoplasma gondii* (Suss-Toby *et al.*, 1996). Während der Invasion von *P. falciparum* und Ausbildung der PVM werden Proteine der Wirtszellplasmamembran von der PVM ausgeschlossen (Dluzewski *et al.*, 1989; Ward *et al.*, 1993). Die PVM bildet eine Barriere zwischen Parasit und Wirtszellzytosol, die allerdings unselektive Poren enthält, durch die Moleküle bis zu 1400 Da frei diffundieren können (Desai *et al.*, 1993; Nyalwidhe *et al.*, 2002). Während der Entwicklung des Parasiten in der Wirtszelle wird die PVM erweitert und zu einem tubovesikulären Netzwerk (TVN), das sich in verzweigter Form durch das Wirtszellzytosol spannt, ausgebildet (Elford & Ferguson, 1993; Elmendorf and Haldar, 1994). Die sogenannten Maurer'schen Spalten sind Membranstrukturen, die im Zytoplasma des Erythrozyten entstehen und wahrscheinlich aus dem TVN hervorgehen (Bannister *et al.*, 2000; Behari and Haldar, 1994). Das TVN dehnt sich stellenweise bis zur Erythrozytenplasmamembran (EPM) aus (Elmendorf and Haldar, 1994) und könnte so der Aufnahme und dem Transport von für den Parasiten essentiellen Nährstoffen – wie beispielsweise monosaccharide Zucker, Nucleoside, Aminosäuren und Vitamine - aus dem extrazellulären Milieu dienen. Von Pouvelle *et al.* wurde das Vorliegen eines offenen „Kanals“ propagiert, der den Parasiten direkt mit der EPM verbindet (Pouvelle *et al.*, 1991). Die Existenz eines solchen Dukts ist allerdings sehr umstritten (Hibbs *et al.*, 1997; Kirk, 2001). Die erhöhte Aufnahme von Molekülen aus der Umgebung könnte alternativ durch parasiteninduzierte Permeabilitätsänderungen der EPM und Diffusion durch die Poren der PVM zum Parasiten bewerkstelligt werden (Ginsburg *et al.*, 1994; Saliba *et al.*, 1998; Kirk *et al.*, 1999). Proteine in der EPM sind höchstwahrscheinlich direkt an der Aufnahme der löslichen Moleküle beteiligt (Baumeister *et al.*, 2003). Ob diese Proteine vom Parasiten synthetisiert und eingelagert werden oder von der Wirtszelle stammen und modifiziert werden, ist unbekannt (Huber *et al.*, 2002; Baumeister *et al.*, 2003; Cohn *et al.*, 2003).

2.3 Pathogenitätsmechanismen

Eine Infektion mit *P. falciparum* unterscheidet sich maßgeblich von anderen humanen Plasmodien-Infektionen durch die hohe Sterblichkeitsrate der Betroffenen. Die schweren klinischen Symptome der Malaria tropica sind durch parasiteninduzierte Veränderungen der infizierten Erythrozyten begründet. Am auffälligsten sind elektronenmikroskopisch erkennbare Modifikationen der *P. falciparum*-infizierten Zellen, wie die Entstehung von Membranstrukturen im Zytoplasma des Erythrozyten und elektronendichte Ausstülpungen an

der Erythrozytenplasmamembran, die man aufgrund ihres Erscheinungsbildes als *knobs* bezeichnet.

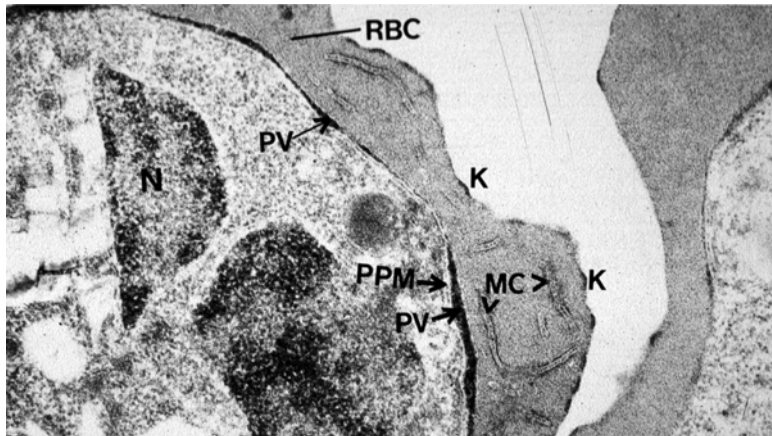


Abbildung 2: Der Parasit induziert die Ausbildung der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM), die den parasitophoren Vakuolenraum (PV) umschließt. Im Erythrozytenzytosol (RBC) werden Maurer'sche Spalten (MC) und unter der Erythrozytenmembran knobs (K) ausgebildet (Baumeister et al., 1999)

Da menschliche Erythrozyten weder Proteine noch Lipide synthetisieren, müssen diese Strukturen vom Parasiten selbst gebildet werden. Die *knobs* sind ein komplexes Aggregat aus spezifischen Parasitenproteinen, die in das Zytoskelett des Erythrozyten, das unmittelbar unterhalb der Membran liegt, eingelagert werden. Die *knobs* sind aus den Parasitenproteinen KAHRP (*knob-associated histidine rich protein*) und Mitgliedern der PfEMP1-Familie (*erythrocyte membrane protein*) aufgebaut. Die Interaktion zwischen PfEMP1 Molekülen auf der Oberfläche der infizierten roten Blutzellen (iRBCs) und verschiedenen Endothelzell-Rezeptoren - wie beispielsweise ICAM 1 (*intercellular adhesion molecule 1*), PECAM 1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*) und CD36 - führen zur Anheftung der iRBCs an die Kapillarwände sowie zu Verklumpungen von iRBCs untereinander (Autoagglutination) beziehungsweise mit nicht-infizierten Erythrozyten („*rosetting*“) (Chen et al., 2000; Fernandez and Wahlgren, 2002). PfEMP1 besitzt einen variablen extrazellulären Teil, der aus zwei bis sieben DBL (*duffy-binding-like*) Domänen aufgebaut ist und mit einer Vielzahl von Endothelzellrezeptoren, Normal-Serum Immunglobulinen (IgM, IgG) und Komplement-Rezeptoren (CR1/CD35) interagiert (Baruch et al., 1997; Rowe et al., 1997). *P. falciparum* besitzt ca. 50 PfEMP1 kodierende *var*-Gene pro haploidem Genom (Su et al., 1997), die variabel exprimiert werden können und es dem Parasiten erlauben durch Variation der Oberflächenantigene der Immunantwort zu entgehen (Noviyanti et al., 2001; Peters et al., 2002)

Neben den *knob*-Proteinen werden andere Parasitenproteine wie z.B. Rifin (*repetitive interspersed family*), Sequestrin und CLAG (*cytoadherence-linked asexuelle gene*) in die

Erythrozytenmembran eingelagert und tragen teilweise zu veränderten Adhärenzeigenschaften der infizierten Blutzellen bei (Holt *et al.*, 1999; Ockenhouse *et al.*, 1991; Sherman *et al.*, 2003). Diese Vorgänge werden insgesamt als Zytoadhärenz bezeichnet und sind Schlüsselereignisse des schweren klinischen Verlaufs der Malaria tropica (Cooke *et al.*, 2000). Wenn Zellanheftung an die Endothelien, Autoagglutination und *rosetting* in den engen Kapillaren des Gehirns stattfinden, führt dies zur Sauerstoffunterversorgung des Gehirns (zerebrale Malaria) und schließlich zu Bewußtseinsstörungen, Koma und Tod (Carlson *et al.*, 1990; Newbold *et al.*, 1997; Rowe *et al.*, 1995).

Das Hämoglobin der Wirtszelle wird im Verlauf der Parasitenentwicklung zum größten Teil vom Parasiten abgebaut. *P. falciparum* phagozytiert Teile der PVM zusammen mit Hämoglobin durch sein Zytostom und baut es in der Nahrungsvakuole zu freien Aminosäuren und Häm (FeII) ab. Das Häm des Hämoglobins wird dabei schnell zu Ferriprotoporphirin IX oxidiert (Foley and Tilley, 1998a) und anschließend zu atoxischem Hämozoin kristallisiert (Hempelmann and Egan, 2002). Der „Verbrauch“ von Hämoglobin durch die Parasiten führt zu Anämie; die Ansammlung von Hämozoin („Malaria-Pigment“) in Niere, Leber und Gehirn führt zum Funktionsverlust der jeweiligen Organe.

2.4 Der sekretorische Weg des Parasiten

Während seiner intraerythrozytären Entwicklung modifiziert der Parasit *P. falciparum* das Zytoplasma und die Plasmamembran seiner Wirtszelle in dramatischer Weise. Parasitenproteine werden differentiell zu verschiedenen Bestimmungsorten innerhalb und außerhalb der Parasitengrenzen transportiert, wofür der Parasit eine Sekretionsmaschinerie benötigt. Um in den metabolisch inaktiven, reifen Erythrozyten zu überleben, müssen Protein-/Membran-Transportwege im Wirtszellzytosol, die dem Transport von Parasitenproteinen (z. B. der *knob*-Proteine) und der Aufnahme von Nährstoffen dienen, etabliert werden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit sekretorischen Parasitenproteinen und an Transportprozessen beteiligten Helferproteinen. Im Folgenden wird daher ein Überblick über die Ausstattung des Parasiten mit sekretorischen Kompartimenten und an Transportprozessen beteiligten Molekülen gegeben.

In eukaryotischen Zellen werden Proteine, die sezerniert werden sollen, entlang eines anterograden Weges transportiert, der das endoplasmatische Retikulum (ER), einen Golgi-Apparat aus mehreren Zisternen und das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) einschließt. In erythrozytären Entwicklungsstadien von *P. falciparum* wurde ein rauhes ER elektronenmikroskopisch beobachtet (Aikawa, 1971) und als diffuses Netzwerk von Vesikeln

beschrieben (Langreth *et al.*, 1978). Identifizierte ER-Marker-Proteine in *Plasmodium falciparum*, wie zum Beispiel das zur Hsp 70-Familie der Chaperone zählende PfBiP (*P. falciparum binding protein*) (Kumar *et al.*, 1991), ein Ionenporter aus der ER-Membran (PfATPase4) (Dyer *et al.*, 1996), die Komponente Pf α Sec61 der Translokationskanäle in der ER-Membran (Couffin *et al.*, 1998) sowie das PfERC (*endoplasmatic reticulum calcium-binding protein*) (La Greca *et al.*, 1997) weisen auf die Präsenz eines ER hin. Die Existenz eines klassischen, komplex aufgebauten Golgi-Apparates im Parasiten konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt der Golgi-Apparat im Parasiten in veränderter oder reduzierter Form vor (Bannister *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1997; Bannister *et al.*, 2000). N-Glykosylierungen von Parasitenproteinen im ER sind selten (Dieckmann-Schuppert *et al.*, 1992), aber vorhanden (Davidson and Gowda, 2001; Gowda and Davidson, 1999). In der *P. falciparum* Genomdatenbank konnten putative Homologe einer Oligosacchoryltransferase und einer N-Acetylglucosamintransferase gefunden werden (www.plasmodb.org). Bisher konnte allerdings noch keine Studie die Modifikationen dieser Glykosylierungen als Evidenz für das Vorliegen eines Golgi-Apparates eindeutig nachweisen. Folgende Punkte stützen jedoch die These der Existenz einer Golgi-ähnlichen Organelle: Die Entdeckung homologer Proteine in *P. falciparum* zu Golgi-assoziierten Proteinen höherer Eukaryoten weist auf die Existenz eines Golgi-Kompartiments hin. Darüber hinaus ist das Hefe-Homolog PfERD2 an einer definierten Stelle im perinukleären Raum des Parasiten lokalisiert worden (Elmendorf and Haldar, 1993). Dort dient es als Rezeptor für die „retrieval“ von Proteinen mit (I/S)DEL-Motiv aus dem Golgi-Apparat. Die Parasitenproteine PfERC und PfBiP beispielsweise besitzen ein (I/S)DEL-Motiv und sind ER-resident (Kumar *et al.*, 1991; La Greca *et al.*, 1997). Schließlich konnten zahlreiche *rab*-Proteine im Parasiten, inklusive solcher, die in höheren Eukaryoten am Vesikeltransport zwischen ER und Golgi beteiligt sind, identifiziert (de Castro *et al.*, 1996) oder in der *P. falciparum* Genom Datenbank (www.plasmodb.org) gefunden werden (Taraschi *et al.*, 2001). Allerdings konnten PfERD2 und rab6 nicht lokalisiert werden (Van Wye *et al.*, 1996), was für eine modifizierte Organisation des Golgi-Apparates im Parasiten sprechen könnte.

Es gibt Hinweise darauf, dass der Parasit eine Transportmaschinerie im Wirtszellzytosol etabliert (Foley and Tilley, 1998b; Taraschi *et al.*, 2003). Darauf deutet der komplexe Ausbau von Membranstrukturen des TVNs und der Maurer'schen Spalten, der Export der am COPII-Vesikeltransport beteiligten Proteine Sar1p und Sec31p (Adisa *et al.*, 2001; Albano *et al.*, 1999b), des an Vesikelfusionen beteiligten NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) und Bet3p Homologs Pf41-2 (Hayashi *et al.*, 2001; Knapp *et al.*, 1989a;

Sacher *et al.*, 2000) sowie der Nachweis von Sphingomyelin-Synthase Aktivität u.a. im TVN (Elmendorf and Haldar, 1993) hin.

Das am COPI-Vesikeltransport beteiligte Pf δ -COP wurde ausschließlich im Parasiten nachgewiesen (Adisa *et al.*, 2002); die Lokalisation der parasitären COPI-GTPase ARF1 (ADP-Ribosylierungsfaktor 1) (Stafford *et al.*, 1996) ist unbekannt. Aufgrund dieser zahlreichen Indikatoren gilt das Vorliegen eines funktionalen klassischen sekretorischen Weges im Parasiten für die meisten Autoren als wahrscheinlich. Dafür spricht, dass *P. falciparum* eine Vielzahl von Genen, deren Endprodukte in eukaryotischen Zellen am Aufbau einer Sekretionsmaschinerie beteiligt sind, besitzt und viele sekretorische Parasitenproteine mit einer spaltbaren, N-terminalen Signalsequenz für die Translokation in das ER Lumen ausgestattet sind (Lingelbach, 1993; Albano *et al.*, 1999b; Foley and Tilley, 1998b; Mattei *et al.*, 1999b; van Dooren *et al.*, 2000).

2.5 Alternative Sekretionswege

Fraglich ist, ob alternative Sekretionswege im Parasiten vorliegen könnten, da die Sekretion einiger Parasitenproteine Besonderheiten aufweist: Zum Einen besitzen nicht alle exportierten Proteine N-terminale Signalsequenzen (z.B. KAHRP, PfEMP3, GBP130), sondern weisen interne hydrophobe Regionen auf, die 50-80 Aminosäuren entfernt vom N-Terminus liegen (zusammengefasst in Lingelbach, 1993; Albano *et al.*, 1999b). Zum Anderen werden einige Parasitenproteine können trotz Behandlung der iRBCs mit Brefeldin A (BFA), das in eukaryotischen Zellen die Proteinsekretion inhibiert (Misumi *et al.*, 1986; Fujiwara *et al.*, 1988; Lippincott-Schwartz *et al.*, 1991; Orci *et al.*, 1991), exportiert (Elmendorf *et al.*, 1992; Elmendorf and Haldar, 1994; Moura and Pudles, 1999). Der Transport vieler bekannter sezernierter Parasitenproteine wird jedoch durch BFA-Behandlung inhibiert (Crary and Haldar, 1992; Benting *et al.*, 1994b; Hinterberg *et al.*, 1994). Diese Beobachtungen veranlassen einige Autoren zu Spekulationen über das Vorliegen von sekretorischen Wegen, die ER und/oder Golgi nicht einschließen. Nach einer Hypothese von Wisner *et al.* existiere ein alternativer, sekretorischer Weg in *Plasmodien*-infizierten Zellen (Wisner *et al.*, 1997; Wisner *et al.*, 1999). Behandelt man solche Zellen mit BFA, so akkumulieren diverse sekretorische Proteine (z. B. das an die Wirtszellmembran exportierte *P. berghei* Protein Pb(em)65 (Wisner *et al.*, 1988), die sonst in die Wirtszelle exportiert werden, an einem distinkten Ort an der Parasitenperipherie (Wisner *et al.*, 1997). Antikörpernachweise gegen die ER-Markerproteine PfBiP, PfERD2, PfATPase4 deuten darauf hin, dass dieses Kompartiment vermutlich nicht identisch mit dem „normalen“ ER ist. In dem von Wisner *et al.* vorgeschlagenen Modell

existiert parallel zum klassischen sekretorischen Weg über ER und Golgi-Apparat ein zweiter Weg über ein an der Parasitenperipherie lokalisiertes, ER-ähnliches Kompartiment, dem sogenannten sekundären ER der Apikomplexa (sERA). Eine Existenz des sERA würde auch das Vorhandensein eines alternativen sekretorischen Weges nahe legen, der für den Transport sekretorischer Parasitenproteine ohne klassische N-terminale Signalsequenz spezialisiert sein könnte. Es ist allerdings zur Zeit noch unbekannt, welche Effekte BFA auf die zelluläre Organisation von *P. falciparum*-Entwicklungsstadien hat. Daher ist die sERA-Hypothese für *P. falciparum* umstritten (Mattei *et al.*, 1999b, und andere). Der BFA-sensitive Exportweg von Proteinen ist für den Parasiten jedoch essentiell. Die Langzeit-Behandlung von infizierten Erythrozyten mit BFA ist letal (Benting *et al.*, 1994a; Crary and Haldar, 1992), unabhängig von der potentiellen Existenz alternativer Sekretionswege.

Neben der Möglichkeit alternativer sekretorischer Kompartimente wie dem sekundären ER wäre es denkbar, dass die ungewöhnlich positionierten Signalsequenzen einiger Parasitenproteine auf die Existenz von mechanistischen Besonderheiten bei der Translokation in das ER-Lumen hinweisen. Möglicherweise kann die parasitäre Signalpeptid-Erkennungs- bzw. Translokationsmaschinerie verschiedene Signalsequenz-„Typen“ diskriminieren. Denkbar wäre auch eine SRP-unabhängige Translokation von Proteinen mit „untypischen“ Signalsequenzen ins ER oder unterschiedliche Kombinationen dieser Szenarien.

2.6 „Trafficking Signals“

Das sekretorische System des Parasiten muss den Transport von Proteinen zu unterschiedlichen Kompartimenten/Organellen im infizierten Erythrozyten sicherstellen. Um einen zielgerichteten Transport zu gewährleisten, muss man spezielle *trafficking*-Signale der Proteine fordern. Folgende Zielkompartimente für die Parasitenproteine werden im Folgenden diesbezüglich betrachtet: Der Transport (1) über die Membran des ER und in den Golgi-Apparat, (2) zu den Kompartimenten des Apikalkomplexes, (3) in die Nahrungsvakuole (*fv*), (4) in den Apikoplast (A), (5) in die PV/PVM oder (6) über die PVM in das Erythrozytenzytosol (EZ) bzw. zur Erythrozytenplasmamembran (EPM). Um die korrekte Lieferung von Proteinen zu diesen außergewöhnlich zahlreichen Bestimmungsorten von Parasitenproteinen im infizierten Erythrozyten zu bewerkstelligen, wird von verschiedenen Autoren das Vorliegen zusätzlicher „alternativer“/ „nicht-klassischer“ sekretorischer Wegen diskutiert (zusammengefasst in Mattei *et al.*, 1999b; van Dooren *et al.*, 2000).

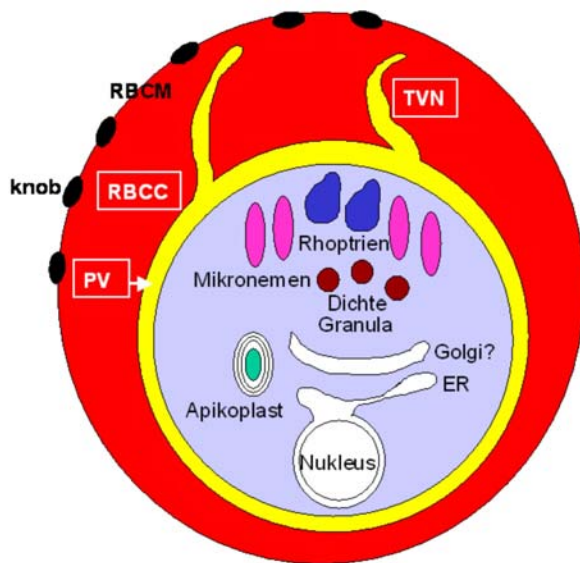


Abbildung 3: Schema der zahlreichen Bestimmungsorte parasitärer Proteine des sekretorischen Weges im Parasiten bzw. im infizierten Erythrozyten. Solche Zielkompartimente liegen entweder innerhalb der Parasitengrenzen (z.B. Dichte Granula, Mikronemen, Rhoptrien, Apikoplast) oder außerhalb des Parasiten (z.B. PV, RBCC, RBCM). Der Golgi-Apparat ist mit einem Fragezeichen gekennzeichnet, da sein morphologischer Aufbau unbekannt ist. Abk.: PV: Parasitophore Vakuole; RBCC: Zytosol der Wirtszelle; TVN: Tubovesikuläres Netzwerk; RBCM: Plasmamembran des Erythrozyten; Abbildung aus van Dooren *et al.*, 2000, verändert.

Für den klassischen sekretorischen Weg der Proteine über ER und Golgi bzw. für ER-residente Proteine in eukaryotischen Zellen ist ein Signalpeptid notwendig, das in der Regel am N-Terminus der Peptidkette vorliegt. Nachdem die Signalsequenz am Ribosom synthetisiert wurde, erkennt ein Komplex aus sechs Polypeptiden und einer kleinen zytoplasmatischen RNA (7SLRNA) - der sogenannte *signal recognition particle* (SRP) - das Signal und bindet daran. Die Translation wird unterbrochen und erst dann fortgesetzt, wenn der Ribosom/ mRNA/ Oligopeptid/ SRP-Komplex an den SRP-Rezeptor der ER-Membran gebunden hat (Meyer and Dobberstein, 1980a, b; Walter *et al.*, 1981). Die restliche Polypeptidkette wird durch einen aus Proteinkomplexen bestehenden Kanal der ER-Membran (Walter and Blobel, 1980; Simon and Blobel, 1991) in das ER-Lumen transportiert (Walter *et al.*, 1979). Für die Translokation durch die ER-Membran sind eine Reihe von Proteinen, beispielsweise der aus drei Untereinheiten bestehende Sec61-Komplex und TRAM notwendig (Gorlich and Rapoport, 1993). Eine der Hauptkomponenten des Kanals ist der Sec61-Komplex (Rapoport *et al.*, 1992), der auch als Rezeptor des SRP-Komplexes dient (Jungnickel and Rapoport, 1995). Einige Säuger-Proteine werden *in vitro* post-translational, SRP-unabhängig ins ER-Lumen transloziert (Wiech *et al.*, 1990; Schlenstedt *et al.*, 1992); auch die ER-Translokation einiger Hefe-Proteine ist *in-vivo* SRP-unabhängig (Hann and Walter, 1991; Ng *et al.*, 1996). Im Lumen des ER können Modifikationen der Polypeptidkette in Form von Bildung räumlicher Konformationen, Knüpfung von Disulfidbrücken und N-Glykosylierung erfolgen.

Signalsequenzen, die ein Protein für den Import in das ER-Lumen spezifizieren, beinhalten in der Regel drei verschiedene Regionen. Dazu gehört sowohl eine N-terminale

Region, die geladene Aminosäuren enthält und unspezifisch mit der Oberfläche von Membranen interagiert als auch eine zentrale kontinuierliche, hydrophobe Region (6-20 AA), die Affinität zum hydrophoben Inneren von Membranen hat sowie eine polare C-terminale Region, die die Spaltungsstelle bildet. Solche Signalsequenzen können in der Hydrophobizität, dem Ort der geladenen Aminosäuren oder der Lage relativ zum N-Terminus des Proteins in gewissem Umfang variieren (von Heijne, 1985; Keenan *et al.*, 1998). Da klassische N-terminale Signalsequenzen grundsätzlich die Translokation der Peptidkette ins endoplasmatische Retikulum veranlassen (Blobel and Dobberstein, 1975a, b; Walter *et al.*, 1979), kann diese gemeinsame Eigenschaft in sogenannten „*Signal Sequence Traps*“ zur Isolierung sekretorischer Proteine experimentell genutzt werden. Prinzipiell werden in *Signal Sequence Traps* putative sekretorische *leader*-Sequenzen mit Reportergenen ohne eigene sekretorische Signale fusioniert. Die Sekretion des entsprechenden Reporterproteins stellt eine Selektionsmöglichkeit dar, die es erlaubt, funktionelle Signalsequenzen zu identifizieren (Tashiro *et al.*, 1993; Arca *et al.*, 1999;; Jacobs *et al.*, 1999; Galliciotti *et al.*, 2001). Die sekretorischen Signalsequenzen der Proteine von verschiedenen Organismen sind funktionell häufig austauschbar, was durch die konservierte Natur der Sekretionsapparate verdeutlicht wird (Verner and Schatz, 1988). Die intern positionierten Signalsequenzen einiger exportierter Parasitenproteine wie KAHRP und Pf41-2 erlauben keine *in-vitro* Translokation in ER-Membranen (Lingelbach, nicht veröffentlicht; Mattei *et al.*, 1999a). Möglicherweise weist *P. falciparum* einige Besonderheiten des Translokationsmechanismus bzw. der -Maschinerie auf, die daher in heterologen Systemen nicht rekonstituiert werden können.

Membranständige Proteine bleiben durch nicht-spaltbare Signalankersequenzen in der Membran inseriert, so dass der N-Terminus des Proteins zytoplasmatisch ist (Typ II Membranprotein). Sie können aber auch eine Stop-Transfer-Sequenz (18 bis 25 hydrophobe Reste gefolgt von einer Gruppe positiv geladener Aminosäuren) beinhalten, die eine vollständige Translokation der wachsenden Polypeptidkette verhindert. Der noch zu synthetisierende Rest des Proteins verbleibt auf der zytoplasmatischen Seite des ERs und das Protein wird über die hydrophobe Helix in der Lipidschicht verankert. (Typ I Membranprotein). Membranproteine mit mehreren Transmembran-Durchgängen entstehen durch weitere Start-Transfer-Sequenzen (ebenfalls hydrophobe Regionen) und Stop-Transfer-Sequenzen. Die meisten sezernierten Parasitenproteine besitzen spaltbare, N-terminale Signalsequenzen (siehe Tabelle 1) deren Transport durch die Behandlung mit BFA hemmbar ist. Dies spricht für einen Transport über den klassischen ER-Golgi sekretorischen Weg (zusammengefasst in Nacer *et al.*, 2001).

Einige Parasitenproteine, insbesondere solche, die über die PVM hinaus transportiert werden, besitzen hydrophobe Regionen, die 20-80 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt liegen und als interne Signale dienen könnten (siehe Tabelle 1). Von anderen Organismen ist bekannt, dass auch intern gelegene Signale die Translokation in das ER-Lumen determinieren können (Tabe *et al.*, 1984; Martoglio *et al.*, 1997). Nach der Translokation ins ER-Lumen oder Insertion in die Membran werden die Proteine über COPII-vermittelten Vesikeltransport zum Golgi-Apparat transportiert (Rothman and Wieland, 1996; Schekman and Orci, 1996), sofern sie nicht ins ER zurücktransportiert werden. Im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) erfolgt die Verteilung von sekretorischen Proteinen zum jeweiligen Zielkompartiment („trafficking“). Dafür werden unterschiedliche „Markierungen“ der Proteine benötigt.

Die *trafficking*-Signale von Parasitenproteinen, die in die Organellen des Apikalkomplexes gelangen, sind bisher unbekannt. Zunächst gelangen diese Proteine höchstwahrscheinlich über spaltbare, N-terminale Signalsequenzen in das ER-Lumen (siehe Tabelle 1) und müssen dann verteilt werden. Auch der Zeitpunkt der Expression kann für die korrekte Lokalisation eines Proteins eine entscheidende Rolle spielen (Le Cabec *et al.*, 1996). So wurde beispielsweise mittels Promotorstudien für das Ropthrienprotein AMA1 gezeigt, dass eine konstitutive Expression zur „falschen“ Lokalisation des Proteins führen kann (Kocken *et al.*, 1998). Aus *Toxoplasma gondii* ist bekannt, dass Tyrosin bzw. Cytosin-Motive für das *targeting* von Ropthrien- und Mikronemenproteinen eine entscheidende Rolle spielen (Di Cristina *et al.*, 2000; Striepen *et al.*, 2001). Möglicherweise existiert ein Tyrosin-Motiv-abhängiges *targeting* auch für *P. falciparum* Proteine (Hoppe *et al.*, 2000).

Der Weg von Proteinen, die in die Nahrungsvakuole (*fv*) des Parasiten transportiert werden sollen, ist noch nicht aufgeklärt. Frühere Studien zeigten, dass z. B. das histidinreiche Protein II (HRP II, ein Parasitenprotein mit *in-vitro* Hämoglobinaseaktivität (Papalexis *et al.*, 2001) möglicherweise zuerst in inaktiver Form ins Erythrozytenzytosol gelangt und anschließend zusammen mit dem Hämoglobin endozytiert wird (Francis *et al.*, 1994; Sullivan *et al.*, 1996). Aktuelle Studien weisen jedoch darauf hin, dass keine massive Aufnahme des exportierten HRP II durch Endozytose erfolgt, sondern lediglich ein Anteil von ca. drei Prozent von HRP II möglicherweise direkt auf dem sekretorischen Weg in die Nahrungsvakuole gelangt (Akompong *et al.*, 2002). Wenn man davon ausgeht, dass die Parasiten-*fv* ein den Lysosomen äquivalentes Kompartiment ist, liegt ein Vergleich mit dem Transport von Enzymen in Lysosomen nahe. In Säugerzellen gelangen die meisten Lysosomenproteasen zunächst in den sekretorischen ER-Golgi-Weg, werden an Aminosäure-

sequenzspezifischen Motiven mit Mannose-6-Phosphat (M6P) modifiziert, binden im TGN an Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR) und werden schließlich zum Lysosom dirigiert (Mullins and Bonifacino, 2001). Inwieweit ein solcher Weg auch in *P. falciparum* existiert, ist jedoch noch ungeklärt, da N-Glycosylierungen von Proteinen selten sind bzw. die Modifikation von solchen N-Glykosylierungen bisher nicht gezeigt werden konnten. In der *Plasmodium*-Genom Datenbank konnte außerdem kein Mannose-6-Phosphat Transferase Gen identifiziert werden (www.plasmoDB.org).

Für die histidinreichen Proteine II und III des Parasiten (HRP II und III) werden N-terminale Signalsequenzen *in silico* vorhergesagt, ebenso wie für andere vakuoläre Hämoglobinasen, wie beispielsweise Plasmepsine (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Für Plasmepsine werden außerdem mehrere N-Glycosylierungsstellen angezeigt, an die potentiell M6P im *cis*-Golgi Netzwerk angehängt werden könnte (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/>). Von Akompong *et al.* (2002) wird daher ein direkter Transport von HRP II vom ER zur *fv* in sekretorischen Vesikeln, in denen HRP II zusammen mit Plasmepsin (und BiP) vorliegt, postuliert.

2.7 Proteintransport in den Apikoplast

Der Apikoplast ist ein Organell des Parasiten, das kein Homolog in humanen Zellen findet und für den Parasiten unverzichtbar ist. Daher ist der Weg von Proteinen in den Apikoplast Gegenstand intensiver Forschung. Im Apikoplasten finden für den Parasiten essentielle Prozesse wie z. B. Fettsäuresynthese und Isoprenoid-Synthese statt. Diese Vorgänge könnten attraktive *drug-targets* für die Bekämpfung von Malaria tropica darstellen (Fichera *et al.*, 1997; Waller *et al.*, 1998; Jomaa *et al.*, 1999; He *et al.*, 2001; Roos *et al.*, 2002).

Das Apikoplasten-Genom (~35 kb) ist durch horizontalen Gentransfer in den Nukleus der Wirtszelle stark reduziert worden und kodiert nur ca. 30 Proteine (Wilson *et al.*, 1996). Für die Aufrechterhaltung der biosynthetischen Prozesse im Apikoplasten ist es daher notwendig, kernkodierte Proteine posttranslational in die Plastide zu transportieren. Man geht davon aus, dass ca. 600 verschiedene Proteine - circa 10 Prozent des Parasitenproteoms - in den Apikoplasten transloziert werden müssen (Zuegge *et al.*, 2001; Gardner *et al.*, 2002). In Pflanzen werden kernkodierte Plastidenproteine mittels Serin-/Threoninreichen, positiv geladenen Transitpeptiden über zwei Membranen in die Plastiden transportiert (zusammengefasst in Bruce, 2001; Soll and Tien, 1998). Das Transitpeptid interagiert mit den Plastiden-Translokon-Komplexen (Toc: *translocon outer chloroplast complex*; Tic:

translocon inner chloroplast complex) (Soll and Tien, 1998) und wird im Stroma der Plastide abgespalten (Richter and Lamppa, 1998). Die Translokation in den Apikoplasten erfordert zweiteilige Signale, die aus einem N-terminalen Signalpeptid für den Import in das ER-Lumen und einem Serin-/ Threoninreichen Transitpeptid bestehen (DeRocher *et al.*, 2000; Waller *et al.*, 2000; Yung *et al.*, 2001; Foth *et al.*, 2003). Der Transport über die vier Apikoplastenmembranen erfolgt in mehreren Schritten (siehe Abbildung 4): Zunächst wird der Import ins ER („1. Membran“) über das Signalpeptid vermittelt. Der Transportmechanismus über die äußere Apikoplastenmembran („2. Membran“) ist noch nicht aufgeklärt und es existieren zahlreiche Modelle (Foth and McFadden, 2003), die an dieser Stelle nicht ausführlich diskutiert werden. Die beiden innersten den Apikoplasten („Membranen 3 + 4“) umgebenden Membranen werden wahrscheinlich über Translokation-Komplexe, ähnlich denen für den Import in Chloroplasten, überwunden (van Dooren *et al.*, 2000).

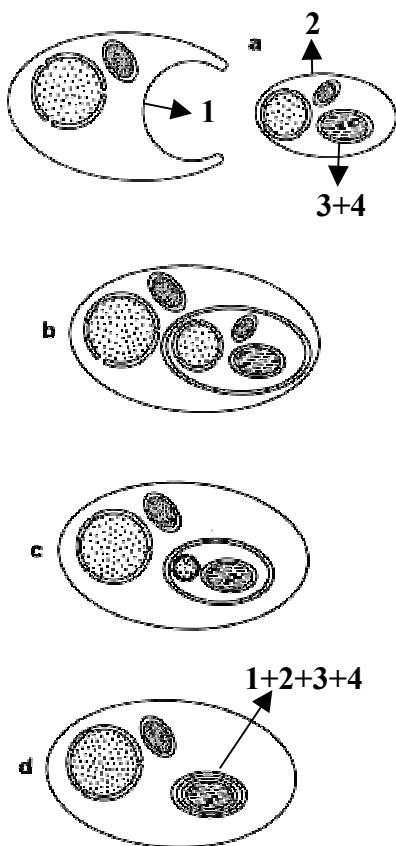


Abbildung 4: Schema der sekundären Endozytobiose: Man geht davon aus, dass der Apikoplast durch sekundäre Endozytobiose entstanden ist, bei der (a) eine eukaryotische Progenitorzelle eine plastidenhaltige Alge phagozytiert hat (Palmer *et al.*, 1996; Roos *et al.*, 1999). Die entstandene Zelle (b) eliminiert redundante Kompartimente (c) bis nur noch die zusätzlichen Membranen die Plastide als ehemals unabhängige Zelle identifizieren (d). Nach diesen Vorgängen wäre die Parasiten-Plastide von vier Membranen umgeben (Hopkins *et al.*, 1999), wobei die innerste Membran die des phototrophen Vorläuferbakteriums darstellt, die zweite Membran die Phagosomenmembran der Progenitorzelle. Die dritte Membran wäre auf die Plasmamembran dieses Vorläufers zurückzuführen und die vierte und äußere Membran stellt eine Endomembran der heterotrophen sekundären „Superzelle“ dar (Roos *et al.*, 1999). Es konnten vier Membranen um den Apikoplast beobachtet werden (McFadden *et al.*, 1999; Roos *et al.*, 1999) was u. a. als Evidenz für die sekundäre Endosymbionten-Hypothese gilt. Quelle der Abbildung: <http://staff-www.uni-marburg.de/~cellbio/welcome.html>, verändert.

In *Toxoplasma gondii* konnte gezeigt werden, dass ein GFP-Hybridprotein aus einem Standard-Signal-Peptid und einem *Arabidopsis*-Transitpeptid zur Translokation in den Apikoplasten führt (van Dooren *et al.*, 2000). Das spricht dafür, dass Apikomplexa chloroplastenähnliche Importmechanismen benutzen. Des Weiteren konnte ein Homolog der *stromal-processing peptidase* (SPP), die in Chloroplasten das Transitpeptid spaltet, in *P. falciparum* identifiziert werden (van Dooren *et al.*, 2002).

Andere Studien, in denen eine Apikoplast-*targeting* Sequenz mit GFP fusioniert und transient in *P. falciparum* exprimiert wurde, weisen auf eine Stadien-spezifische Translokation des Hybridproteins in PV und Apikoplast hin (Cheresh *et al.*, 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zweiteilige Apikoplasten-*targeting*-Sequenz Apikoplastenproteine über den sekretorischen Weg in die Plastide dirigiert (McFadden, 1999; Roos *et al.*, 1999; Waller *et al.*, 2000). Das Signalpeptid dirigiert Apikoplasten-Proteine zunächst in den sekretorischen Weg. Über das Transitpeptid wird der Import in die Plastide vermittelt, wobei der molekulare Mechanismus der Translokation in den Apikoplast noch unbekannt ist. Insbesondere die Translokationsprozesse über die „3. Membran“ sind weiterhin Gegenstand intensiver Forschung.

2.8 „Default pathway“

Ein Protein, das in den sekretorischen Weg gelangt und keine zusätzliche „Markierung“ für die Weiterleitung in ein spezifisches zelluläres Zielkompartiment trägt, wird in der Regel von eukaryotischen Zellen löslich sezerniert bzw. gelangt als Membranprotein in bzw. auf die Plasmamembran der Zelle (man spricht dann vom sogenannten „default pathway“). Die intraerythrozytären Entwicklungsstadien von *P. falciparum* sind stets von der PVM umschlossen, so dass weitere spezifische Proteintransportmechanismen außerhalb des Parasiten für die Verteilung von Parasitenproteinen in PV und Erythrozytenzytosol notwendig sind. Dabei stellt die PVM eine Barriere zwischen Parasit und Wirtszelle dar, die mittels spezifischen Translokationsvorgängen überwunden werden muss. Es existieren verschiedene Modelle, wie die Translokation von Proteinen über die PVM erfolgen könnte. Von Lingelbach (1997) wurden diese Modelle wie folgt zusammengefasst: Verläuft die Translokation von Proteinen über die PVM in zwei Schritten, so würden die Proteine zunächst in die PV gelangen und anschließend in die Wirtszelle transportiert werden. Der direkte Transport von Proteinen über die PVM (1-Schritt-Modell) wäre nur dann denkbar, wenn man Kontaktstellen zwischen PPM und PVM annimmt (Lingelbach, 1997).

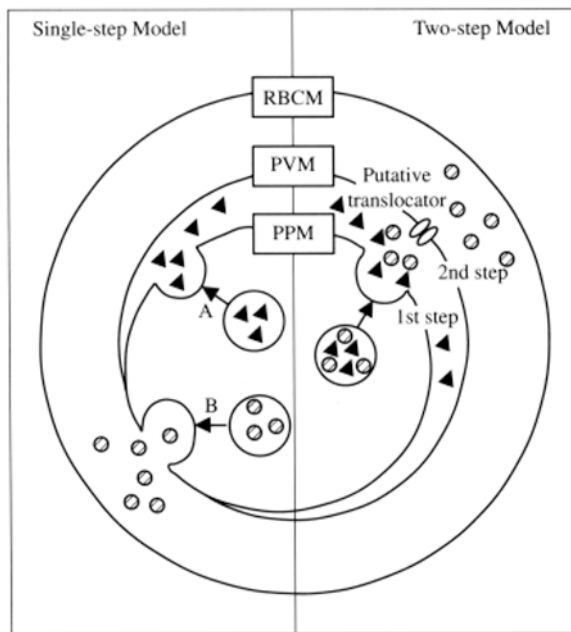


Abbildung 5: Ein-Schritt / Zwei-Schritt-Modell: Sofern man eine Fusion zwischen PPM und PVM, analog den Kontaktstellen der inneren und äußeren Mitochondrienmembranen, annimmt, könnte der Transport von Proteinen über die PVM in einem Schritt erfolgen. Transportvesikel mit sekretorischen Proteinen könnten an solchen Kontaktstellen fusionieren und ihren Inhalt direkt in das Erythrozytenzytosol entleeren ("1-Schritt-Modell"). Es wäre ebenfalls denkbar, dass Proteine, die zur Wirtszelle gelangen sollen, zunächst in der PV vorliegen und in einem zweiten Schritt selektiv über die PVM transloziert werden (2-Schritt-Modell) (Lingelbach, 1997).

Der Transport eines Proteins in einer gefalteten Konformation über eine Membran fordert jedoch die Mithilfe von membranständigen Translokatoren und die Ent- und Rückfaltung des Proteins durch Chaperone. Es gibt einige experimentelle Hinweise auf die Existenz von Chaperonen (Banumathy *et al.*, 2003) und deren Aktivität in der PV (J. Nyalwidhe und S. Charpian, AG Lingelbach, persönliche Mitteilungen). Von Ansorge *et al.* (1996) konnte gezeigt werden, dass ein ins Erythrozytenzytosol exportiertes Parasitenprotein (Gbp: *glycophorine binding protein*) transient in der PV nachweisbar ist, was gegen einen „1-Schritt-Transport“ spricht (Ansorge *et al.*, 1996).

Ob ein Protein ein spezifisches Signal besitzen muss, um selektiv in die PV oder über die PVM in die Wirtszelle transportiert zu werden, und welche Komponenten an der Signalerkennung beteiligt sind, ist Gegenstand der derzeitigen Diskussion. Es ist einerseits denkbar, dass ein intrinsisches Signal – wie beispielsweise ein bestimmtes Aminosäuremotiv - im Protein für die Translokation über die PVM notwendig ist. Andererseits könnte der "default pathway" des Parasiten in der Wirtszelle auch die Translokation über die PVM mit einschließen. Die letztere Hypothese würde eine Art „PV-Retentionssignal“ der PV-residenten Proteine wie beispielsweise SERP voraussetzen. Es ist zur Zeit ungeklärt, ob es derartige Signale in den bisher bekannten exportierten Parasitenproteinen gibt und wie sie aussehen könnten.

Protein	Lokalisation	N-term. SS	Put. Int. SS	Referenz
PfERC1	ER Lumen	ja	nein	La Greca <i>et al.</i> , 1997
PfBiP	ER-Lumen	ja	nein	(Kumar <i>et al.</i> , 1991
MSP1	PPM	ja	nein	Myler, 1989
EBA140	Mikronemen	ja	nein	Mayer <i>et al.</i> , 2001
EBA165	Mikronemen	ja	nein	Blair <i>et al.</i> , 2002b
EBA175	Mikronemen	ja	nein	Adams <i>et al.</i> , 1992
EBA181	Mikronemen	ja	nein	Blair <i>et al.</i> , 2002b
AMA1	Rhoptrien	ja	nein	Thomas <i>et al.</i> , 1990
MAEBL	Rhoptrien	ja	nein	Michon <i>et al.</i> , 2002
RAP1	Rhoptrien	ja	nein	Ridley <i>et al.</i> , 1990
Exp1	PVM	ja	nein	Coppel <i>et al.</i> , 1985
Exp2	PV	ja	nein	Johnson <i>et al.</i> , 1994
SERP	PV	ja	nein	Knapp <i>et al.</i> , 1989b
S-Antigen	PV	ja	nein	Nicholls <i>et al.</i> , 1988
GBP	PV/EZ	nein	ja	Kochan <i>et al.</i> , 1986
CG2	EZ/PVM-assoz.	nein	nein	Su <i>et al.</i> , 1997
KAHRP	EC	nein	ja	Kilejian <i>et al.</i> , 1986
PfEmp1	EPM	nein	nein	Baruch <i>et al.</i> , 1995
PfEmp3	EC	nein	ja	Pasloske <i>et al.</i> , 1994
RESA	EC	nein	ja	Favaloro <i>et al.</i> , 1986
MESA	EC	nein	ja	Coppel, 1992
PfSar1	PZ/EZ	nein	nein	Albano <i>et al.</i> , 1999b
Pf332	MC	nein	nein	Hinterberg <i>et al.</i> , 1994
Pf41-2	EZ	nein	ja	Knapp <i>et al.</i> , 1989a
HRP II	FV/EZ	ja	nein	Howard <i>et al.</i> , 1986
HRP III	FV	ja	nein	Wellems and Howard, 1986
Plasmepsin I	FV	ja	nein	Francis <i>et al.</i> , 1994
Falcipain 2	FV	ja	nein	Shenai <i>et al.</i> , 2000

Tabelle 1: Vergleich einiger Parasitenproteine bezüglich ihrer Lokalisation und der Natur ihrer Signalsequenzen. Grün unterlegt sind die Proteine, die bis zur PVM, aber nicht darüber hinaus transportiert werden und klassische N-terminale Signalsequenzen aufweisen. Die hellgrüne Farbe markiert den Verbleib solcher Proteine innerhalb der Parasitengrenzen. Mit rot unterlegt sind Proteine, die über die PVM hinaus transportiert werden und entweder intern gelegene putative Signale (hellrot) oder keine identifizierten Signalsequenzen (dunkelrot) besitzen. Abk.: PPM: Parasitenplasmamembran; PV(M): Parasitophore Vakuolen(membran); EZ: Erythrozytenzytosol; EC: Erythrozytenzytoskelett; EPM: Erythrozytenplasmamembran; PZ: Parasitenzytosol; MC: Maurer'sche Spalten; FV: Nahrungsvakuole.

In einer Studie von Burghaus & Lingelbach (2001) wurde die Signalsequenz des in die PVM exportierten Parasitenproteins Exp-1 mit dem Reportergen Luziferase fusioniert. In den transienten Transfektanten konnte drei Tage nach der Transfektion mittels Messung der Luziferaseaktivität eine Verteilung des Hybridproteins zu ca. 2/3 im Erythrozytenzytosol und zu ca. 1/3 in der PV gemessen werden. Der Nachweis dieses Hybridproteins in der PV untermauert die Annahme eines 2-Schritt-Translokationsprozesses in die Wirtszelle, der die PV als Transitkompartiment einschließt. Diese Ergebnisse sprechen außerdem dafür, dass kein zusätzliches Parasiten-spezifisches Signal im Protein für die Translokation über die PVM notwendig ist (Burghaus and Lingelbach, 2001).

Dem gegenüber wurde von Adisa *et al.* (2003) mittels konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie jedoch gezeigt, dass ein Hybridprotein aus der EXP-1 Signalsequenz und GFP ausschließlich in die PV transportiert wird (Adisa *et al.*, 2003). Die gleiche Gruppe konnte bereits 2001 zeigen, dass ein Hybridmolekül aus der intern gelegenen KAHRP-putativen Signalsequenz und GFP für den Transport in die PV ausreichend ist. Im Fall einer Fusion von GFP mit dem 123 Aminosäuren umfassenden N-Terminus von KAHRP, der eine histidinreiche Region folgend auf die putative Signalsequenz mit einschließt, konnte die Translokation des chimären Proteins über die PVM nachgewiesen werden (Wickham *et al.*, 2001). Diese Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, dass die histidinreiche Region von KAHRP ein Signal für die Translokation über die PVM darstellt, was im Gegensatz zu den Ergebnissen von Burghaus & Lingelbach (2001) steht. Derzeit wird diskutiert inwieweit die räumliche Konformation des jeweiligen Reporter-Proteins die Translokation über die PVM inhibieren bzw. modifizieren könnte.

Möglicherweise spielen in *P. falciparum* spezifische Signale für den Export über die PVM in bestimmten Entwicklungsstadien eine Rolle. Es sind weitere Experimente notwendig, um *trafficking*-Signale exportierter Parasitenproteine zu charakterisieren und am Transport beteiligte Komponenten zu identifizieren.

In *Toxoplasma gondii* – der ebenfalls zur Gruppe der Apikomplexa gehört - führt der *default pathway* sekretorische Proteine über die dichten Granula des Apikalkomplexes (Karsten *et al.*, 1997; Karsten *et al.*, 1998).

2.9 Transport innerhalb des Erythrozytenzytosols

Proteine, deren Bestimmungsort innerhalb des Erythrozyten liegt, müssen zunächst die PVM überqueren. Erst dann können sie zu verschiedenen Zielorten wie beispielsweise dem Erythrozytenzytoskelett oder der Erythrozytenplasmamembran weiter transportiert werden. Man nimmt an, dass die umfangreichen Membranstrukturen wie Maurer'sche Spalten und tubovesikuläres Netzwerk (TVN), die der Parasit im Erythrozytenzytosol (EZ) etabliert, am Transport von Parasitenproteinen innerhalb des EZ beteiligt sind. Wenn das TVN eine solche Rolle spielt, müsste man Helfer-Moleküle des Proteintransports bzw. Golgi-residente Proteine im TVN identifizieren können. Zwar wurde im TVN Sphingomyelin-Synthaseaktivität nachgewiesen (Elmendorf and Haldar, 1993), allerdings konnte keine Hemmung des Exports einiger Parasitenproteine durch die Behandlung der Zellen mit Sphingomyelin-Synthase Inhibitor festgestellt werden (Lauer *et al.*, 1997). Der *trans*-Golgi-Marker PfRab6 wurde ausschließlich an Membran-Strukturen im Parasitenzytoplasma nachgewiesen (Van Wye *et al.*, 1996).

Es gibt zahlreiche Hinweise auf einen vesikulären Transport von Proteinen im EZ: Es wurden beispielsweise vesikuläre Strukturen beobachtet, die aus der TVM entstehen (Kara *et al.*, 1988; Hibbs and Saul, 1994; Pouvelle *et al.*, 1994b; Trelka *et al.*, 2000) und die an Vesikeltransport und -fusion beteiligten Parasitenproteine Sar1p, PfSec31p und NSF wurden im Erythrozytenzytoplasma nachgewiesen (Adisa *et al.*, 2001; Albano *et al.*, 1999a; Hayashi *et al.*, 2001). Möglicherweise etabliert der Parasit durch den Export von Proteinen, die für einen vesikulären Transport notwendig sind und den Ausbau von Membranstrukturen eine Transportmaschinerie im Erythrozytenzytoplasma. Die Behandlung von infizierten Erythrozyten mit Aluminiumfluorid, welches G-Protein vermittelten Vesikeltransport inhibiert, führt nach Taraschi *et al.* (2003) zu Aggregation von vesikulären Strukturen im Erythrozytenzytosol (Taraschi *et al.*, 2003). Es gibt Hinweise, dass einige exportierte Parasitenproteine wie GBP, Pf41-2 und PfEMP1, PfEMP3 mit diesen potentiellen Transportvesikeln assoziiert sind (Bianco *et al.*, 1987; Knapp *et al.*, 1989b; Trelka *et al.*, 2000; Adisa *et al.*, 2001). Allerdings konnten andere exportierte Parasitenproteine wie KAHRP und MESA nicht assoziiert mit Membranstrukturen im EZ nachgewiesen werden (Gormley *et al.*, 1992; Wickham *et al.*, 2001). Möglicherweise gibt somit es auch vesikel-unabhängige Transportwege im EZ (zusammengefasst in Albano *et al.*, 1999b; Baumeister *et al.*, 1999; van Dooren *et al.*, 2000 und andere). Den Maurer'schen Spalten könnten Funktionen wie Sortierung und Weiterleitung zahlreicher exportierter Parasitenproteine zukommen. Dafür sprechen immunfluoreszenz- bzw. elektronenmikroskopische Daten, die

verschiedene Parasitenproteine wie z. B. PfSar1p, PfEMP1, KAHRP, PfSBP1, Pf332 an den Maurer'schen Spalten lokalisieren (Das *et al.*, 1994; Hinterberg *et al.*, 1994; Blisnick *et al.*, 2000; Wickham *et al.*, 2001).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass kein allgemein anerkanntes Modell für den Transport von Parasitenproteinen im EZ zu ihren jeweiligen Bestimmungsorten wie Erythrozytenzytoskelett oder -plasmamembran existiert. Einige Studien weisen auf vesikuläre Transportmechanismen hin, die aber offensichtlich nicht für alle exportierten Parasitenproteine Gültigkeit haben. Die Existenz alternativer Mechanismen, wie z. B. den Transport von Proteinaggregaten durch das EZ, kann nicht ausgeschlossen werden.

2.10 Inhibierung des Proteintransports durch Brefeldin A

Die Wirkungsweise des Pilz-Metabolits Brefeldin A (BFA) ist seit Langem bekannt und die molekularen Mechanismen der Inhibierung sind weitgehend aufgeklärt. BFA blockiert die Proteinsekretion in eukaryotischen Zellen (Klausner *et al.*, 1992; Takatsuki and Tamura, 1985) durch seine umfangreichen Effekte auf die Struktur und Funktion des Endomembransystems (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989; Hunziker *et al.*, 1992). Die Aktivität des Golgi-assoziierten Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors (Gef) auf die GTPase Arf1 (Adenosin-Ribosylierungs-Faktor 1) wird durch BFA gestört (Helms and Rothman, 1992). Arf1 ist Teil der Ummantelung von COP I -Vesikeln, die hauptsächlich den retrograden Transport zwischen den Golgi-Zisternen und zwischen Golgi und ER vermitteln, aber wahrscheinlich auch im anterograden Transport beteiligt sind (Bednarek *et al.*, 1995; Cosson *et al.*, 1996; Lewis and Pelham, 1996). Die Ausbildung von COP I Vesikeln setzt die Aktivierung von Arf1 voraus und erfolgt in mehreren Schritten: Arf1 liegt in GDP-gebundener Form löslich im Zytoplasma der Zelle vor. Arf1/GDP bindet über einen Myristylrest seiner N-terminalen Helix zunächst schwach an Membranen, an denen membranassoziierte Arf-Gefs mit Arf1 interagieren und den Austausch von GDP zu GTP auf ARF1 katalysieren. Dieser Austausch beginnt mit der Destabilisierung des GDP von Arf1, was die Extraktion der N-terminalen Helix des Arf1 Moleküls und die feste Bindung an die Membran zur Folge hat (Beraud-Dufour *et al.*, 1998; Beraud-Dufour *et al.*, 1999). Arf1 liegt zum Zeitpunkt des Austausches von GDP zu GTP in einem sehr kurzlebigen Komplex mit Arf-Gef vor (Cherfils and Chardin, 1999). Aktiviertes, GTP-gebundenes, membranverankertes Arf 1 rekrutiert *coatamer*-Proteine zur Membran und initiiert so die COP I-Vesikelbildung (zusammengefasst in Nickel *et al.*, 2002). Diese Art der membrangebundenen Aktivierung von Arf1 über membranassoziiertes Arf-Gef verhindert die

Aktivierung von Arf1 im Zytoplasma. BFA stabilisiert den Arf(GDP)-Gef-Komplex, bevor GDP gegen GTP Austausch erfolgen kann und verhindert so die ARF1 Aktivierung (Peyroche *et al.*, 1999). Die Depletion von funktionellen Arf-Gef Molekülen aus dem zytoplasmatischen Pool der Zelle durch die Stabilisierung des Arf(GDP)-Gef-Komplexes führt zum Erliegen des COP I-Vesikeltransports, da kaum „freies“ Arf-Gef verfügbar ist, um Arf1 zu aktivieren.

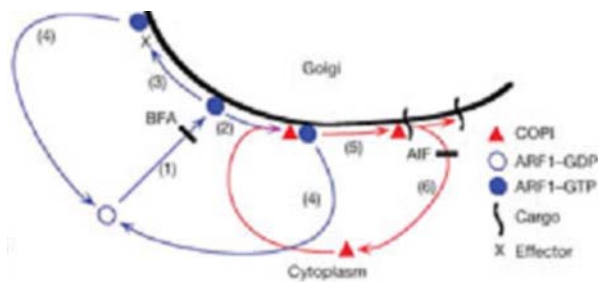


Abbildung 6: (1) Arf1-GDP bindet an die Golgi-Membran und wird von Arf-Gef aktiviert. Aktiviertes ARF1 interagiert mit COPI bzw. alternativen Effektormolekülen der Golgimembran (2;3), wobei Arf1 hydrolysiert wird (4). COP-Moleküle verbleiben an der Membran und binden Proteinfracht. In Gegenwart von BFA wird die Aktivierung von Arf1-GDP inhibiert (1), nach Presley *et al.*, 2002.

Die Familie der Arf-Gefs variiert in Größe und Sequenz, besitzt aber eine evolutiv konservierte Domäne von ca. 200 Aminosäuren, die Sec7 Domäne (Chardin *et al.*, 1996; Roth, 1999; Jackson and Casanova, 2000). Die Strukturen der humanen ARNO-Sec7 Domäne und der Hefe Gea2 Sec7 Domäne wurden aufgeklärt und zeigen den Aufbau der Sec7 Domäne aus 10 alpha-Helices (A-J), die in einer Zylinderform arrangiert sind (Cherfils *et al.*, 1998; Goldberg, 1998; Mossessova *et al.*, 1998). Dabei bilden die Helices F, G und H zusammen mit einem hydrophoben loop (F-G-loop) eine Grube aus, welche die Interaktionsfläche mit Arf1 darstellt (Goldberg, 1998). Es konnte 1999 gezeigt werden, dass die Sec7 Domäne *in vitro* ausreichend ist, um Arf1 durch GDT-GTP-Austausch zu aktivieren (Mansour *et al.*, 1999; Morinaga *et al.*, 1999). Die Sec7 Domäne ist der katalytische Anteil für den GDP-GTP-Austausch auf Arf1 und gleichzeitig die Zielstruktur von BFA (Mansour *et al.*, 1999; Sata *et al.*, 1998; Robineau *et al.*, 2000).

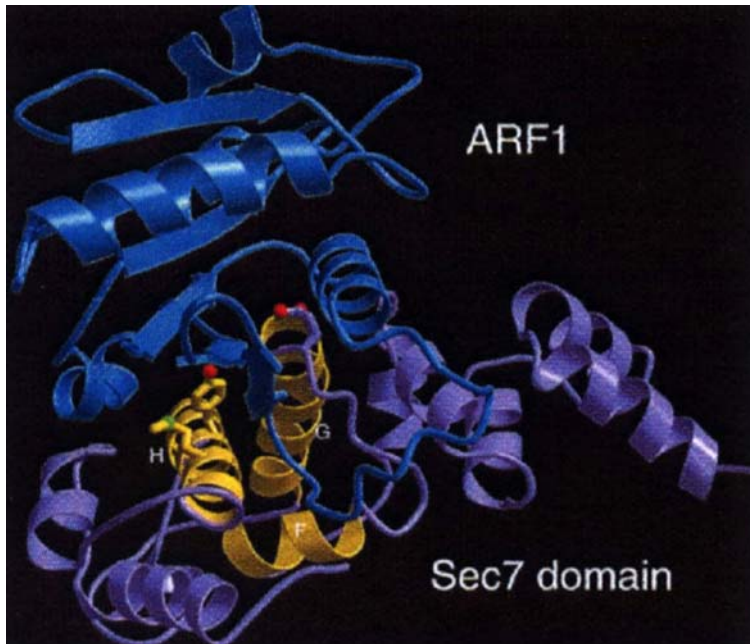


Abbildung 7: Räumliche Struktur der Sec7 Domäne von Gea2p (violett und gelb) im Komplex mit einer N-terminal verkürzten Form von Arf1 (blau). Die hoch konservierten Helices F, G und H bilden eine hydrophobe Grube aus. Der F-G-loop bildet den sogenannten „Glutamat-Finger“ aus, der essentiell für die Gef-Aktivität ist (Cherfils et al., 1999).

Durch Mutagenese-Experimente des Hefe-*gea1* Gens konnte eine Region von 35 Aminosäuren innerhalb der Sec7 Domäne identifiziert werden, in der Aminosäure-Substitutionen BFA-Resistenz bzw. -Sensitivität determinieren (Peyroche et al., 1999; Sata et al., 1998). Durch BFA-Behandlung wird die Sekretion der meisten *P. falciparum* Proteine inhibiert (Ansorge et al., 1996; Benting et al., 1994b; Crary and Haldar, 1992; Ogun and Holder, 1994) und die Parasiten sterben ab (Benting et al., 1994a). Die Effekte von BFA auf die Proteinsekretion in *Plasmodium falciparum* und die Identifizierung zahlreicher Gene, deren Produkte am Proteintransport beteiligt sind, deutet auf das Vorliegen eines klassischen sekretorischen Weges hin, der Vesikeltransport einschließt. Welche Kompartimente dieser Weg in *Plasmodium falciparum* einschließt und wie diese aufgebaut sind, ist Gegenstand der Diskussion (Lingelbach, 1997; van Dooren et al., 2000). Außerdem gibt es Hinweise auf die Existenz eines BFA-insensitiven Sekretionsweges in *P. falciparum* (Mattei et al., 1999a) bzw. in *P. berghei* (Wiser et al., 1997). Die zahlreichen Bestimmungsorte parasitärer Proteine im infizierten Erythrozyten legen die Vermutung nahe, dass Kompartimente, Moleküle und Mechanismen für die Verteilung dieser Proteine vorliegen müssen, die möglicherweise teilweise parasitenspezifisch sind. Um Einblicke über Proteinsortierungs- und Transportprozesse des Parasiten zu bekommen, ist es erforderlich daran beteiligte Mediatormoleküle zu identifizieren und zu charakterisieren.

2.11 Die Sec7 Domäne von *Plasmodium falciparum*

Um weitere Parasitenproteine zu identifizieren, die an Transport und Sekretion in *P. falciparum* beteiligt sind, wurde von Baumgartner *et al.*¹ eine BFA-resistente *P. falciparum* Zell-Linie etabliert (FCBR^{BFA}). Dieser Stamm zeigte keine Beeinträchtigung seiner Wachstumsfähigkeit im Vergleich zum parentalen FCBR Stamm in Gegenwart von normalerweise für *P. falciparum* letalen Konzentrationen von BFA. Der Export des Parasitenproteins Gbp ins Wirtszellzytosol in Gegenwart von bis zu 10 µg/ml BFA wurde in diesem Stamm nicht beeinträchtigt, während der Export von GBP im BFA-sensitiven Ausgangsstamm schon ab 1 µg/ml BFA blockiert ist. In der Zell-Linie FCBR^{BFA} konnte eine Punktmutation (Guanin zu Adenin, G-A) in der Sec7 Domäne des parasitären *arf-gef*-Gens identifiziert werden. Diese Punktmutation liegt innerhalb der von Peyroche *et al.* (1999) identifizierten „hot-spot“-Region für BFA Resistenz/Sensitivität (siehe Abbildung 8). Die Mutation führt auf Proteinebene zu einer Methionin zu Isoleucin-Substitution (M-I). Durch einen Austausch von Methionin zu Leucin an der korrespondierenden Position im Hefe Arf-Gef Gea1p konnte BFA-Resistenz *in vivo* in der Hefe vermittelt werden (Peyroche *et al.*, 1999). Aufgrund der Art und Position der G:A-Mutation im *P. falciparum arf-gef* Gen gehen die Autoren¹ davon aus, dass in dieser Substitution höchstwahrscheinlich die BFA-Resistenz dieser Parasitenlinie begründet ist (Baumgartner *et al.*, 2001). Die Datenbankanalyse des *P. falciparum*-Genoms zeigt nur einen *arf-gef open reading frame* (ORF) Eintrag an (http://plasmodb.org/cgi-bin/plasmodb/plasmod/search_blastdg4.pl#chr14), was im Vergleich zu anderen Organismen ungewöhnlich ist. So wurden beispielsweise in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mindestens vier *arf-gef*-Gene identifiziert (Peyroche *et al.*, 1996). Die weitere Analyse des *P. falciparum* Arf-Gef ergab außerdem die Existenz eines 146 Aminosäure-langen Einschubs, der die Helices G und H voneinander separiert. An der entsprechenden Position findet man im Hefe Gea2p Arf-Gef eine 32 Aminosäure lange Insertionssequenz. In den Arf-Gefs anderer Organismen jedoch gibt es keine Insertionen an dieser Stelle.

¹ Baumgartner F, **Wiek S**, Paprotka K, Zauner S und Lingelbach K

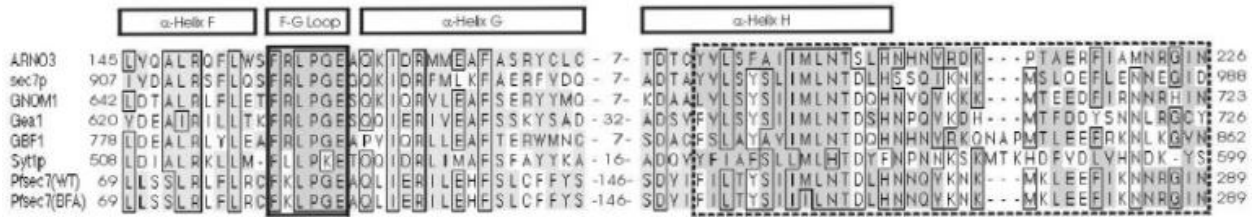


Abbildung 8: Sequenz-Gegenüberstellung der Sec7 Domänen von ARNO3, GBF1 (human), Sec7p, Gea1p und Syt1p (*Saccharomyces cerevisiae*), GNOM1 (*A. thaliana*) und *P. falciparum* FCBR und FCBR^{BFA}. Die Helices F, G und H sowie der F-G-loop sind über dem Alignment durch Rechtecke gekennzeichnet. Die „hot-spot“-Region für Mutationen, die mit BFA-Resistenz/Sensitivität verbunden sind, ist mit einer gestrichelten Linie markiert. Die Länge der jeweiligen Einschub-Sequenzen zwischen den Helices G und H ist als Zahlenwert angegeben (Baumgartner et al., 2001).

2.12 Ziele dieser Arbeit

Die Proteine, die *P. falciparum* während seiner intraerythrozytären Entwicklung in die Wirtszelle transportiert, sind maßgeblich an der Pathogenese der Malaria tropica beteiligt. Die Transport- bzw. Sekretionswege, die der Parasit dazu benutzt, sind nur unvollständig verstanden. Die Existenz von parasitenspezifischen Proteintransportwegen wird von einigen Autoren diskutiert. Außerdem können mechanistische Besonderheiten beim Translokationsvorgang an ER-Membranen nicht ausgeschlossen werden. Einige sezernierte Parasitenproteine, wie beispielsweise Gbp130, verfügen über intern gelegene hydrophobe Regionen, die möglicherweise als Signalsequenz fungieren. Der Export von Gbp130 wird durch BFA inhibiert, was für den Transport dieses Proteins über den klassischen sekretorischen Weg spricht. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Reporterproteine mit ungewöhnlich positionierten hydrophoben Regionen von Hefezellen sezerniert werden. Dazu sollte ein heterologes Expressionssystem in der Hefe *S. cerevisiae* etabliert werden, in dem Gene sezernerter Proteine von *P. falciparum* exprimiert werden können.

Um weitere Helferproteine, die an Transportprozessen beteiligt sind zu identifizieren, wurde ein Brefeldin A-resistenter Plasmodien-Stamm etabliert (Vorarbeiten von K. Paprotka). In diesem Stamm konnte eine Punktmutation, die zu einem M-I Aminosäureaustausch führt, in der konservierten Sec7 Domäne des *Pf*arf-gef Gens identifiziert werden. Bei dieser Analyse wurde auch deutlich, dass der Parasit eine ungewöhnliche Einschubsequenz innerhalb der Sec7 Domäne besitzt, die konservierte und funktionell zusammengehörige Untereinheiten des Proteins voneinander separiert (Baumgartner et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente durchgeführt, die zum Einen klären sollten, ob die gefundene Punktmutation des resistenten Parasitenstammes ausreichend ist, um Brefeldin A-Resistenz zu verursachen.

Andererseits war fraglich, ob die Einschubsequenz innerhalb der Sec7 für den Parasiten essentiell ist. Zur Beantwortung dieser Fragen sollte die Punktmutation in einen Brefeldin A-sensitiven Parasitenstamm eingebracht werden. Dazu sollte ein Transfektionssystem für *P. falciparum* angewendet werden, das auf Plasmid-Transfektion und stabile Doppel-*cross-over* Integration der DNA basiert (Duraisingh *et al.*, 2002). In Anlehnung an dort beschriebene Technologie sollte auch die Einschubsequenz aus der endogenen Sec7 Domäne des Parasiten deletiert werden. Des Weiteren sollte das heterologe Hefesystem benutzt werden und die *P. falciparum* Sec7 Domäne in der Hefe exprimiert werden. Dabei sollte auch eine verkürzte Variante, aus der die Insertionssequenz deletiert wurde, in die Hefen eingebracht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Agarosegelkammern	Gibco BRL	Neu-Isenburg
Aspirator, Unijet II	Uni Equip	Martinsried
Blotting Apparatur	Phase	Lübeck
Brutschrank	Hereaus	Hanau
C-Camera	Ultra-Lum	Kalifornien, USA
Digitalkamera	Kodak	Stuttgart
DNA-Sequenzier-Automat 373A	Applied Biosystems	Weiterstadt
Elektroporator	BioRad	Hercules, USA
ELISA-Reader Lambda E	MWG Biotech	Ebersbach
Geltrockner	Biotec Fischer	Schwerte
Labofuge III	Heraeus	Hanau
Laborroller Spiramix	Denley	UK
LiCOR DNA Sequenzer	MWG	Ebersberg
Macintosh Power PC 7500/ 100	Apple Macintosh	Cupertino, USA
Magnetrührer	Ika Combimag RCH	Staufen
Megafuge 1,0 R	Heraeus	Hanau
Mikroskop Diavert	Leitz	Wetzlar
Orthoplan Mikroskop	Leitz	Wetzlar
Personal Cycler	Biometra	Göttingen
pH-Meter 766	Knick	Berlin
Power Supply 2103	LKB Biochrom	St. Albans, UK
SAE 2761 Power Supply	Shandon	Pittsburgh, USA
Spektrophotometer DU7	Beckman	Irvine, USA
Superspeed Refrigerated Centrifuge	DuPont Instr. Sorvall	Bad Homburg
Test tube heater	Stuart Scientific	U.K.
Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg
Ultra Sonic Power Unit	MSE	
UNO-Thermoblock	Biometra	Göttingen
UV Dual Light Transilluminator	Biometra	Göttingen
Vakuumzentrifuge Unirapo 100 H	UniEquip	Martinsried
Video Graphic Printer UP 890 MD	Sony	Frankfurt
Vortexer REAX 2000	Heidolph	Schwabach
Wärmewasserbad 2219 Multitemp II	LKB	Bromma

3.1.2 Chemikalien

2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Fluka	Neu-Ulm
8-Hydroxychinolin	Merck Schuchardt	Hohenbrunn
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche Diagnostics	Mannheim
AdjuPrime, Immune Modulator	Pierce	Rockford, USA
Agar	Serva	Heidelberg
Agarose NEEO	Roth	Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth	Karlsruhe
Ampicillin (Amp)	Serva	Heidelberg
Antimycin A (AA)	Sigma	Schnelldorf

Aprotinin from bovine lung	Fluka	Neu-Ulm
Brefeldin A	Fluka	Neu-Ulm
Borsäure	Roth	Karlsruhe
Bovines Serum Albumin Frakt. V (BSA)	Roth	Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt
Chloramphenicol	Sigma Chemical	St. Louis, USA
Chloroform	Merck	Darmstadt
Complete Supplement Mixture ^(-His, Leu, Trp, Ura)	BIO 101 Inc.	Rutherford
Coomassie Brilliant Blue R 250	Fluka	Neu-Ulm
dATP($\alpha^{32}\text{P}$)	Hartmann Analytic	Braunschweig
Dig-Easy-Hyb	Boehringer	Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka	Neu-Ulm
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka	Neu-Ulm
Essigsäure	Roth	Karlsruhe
Ethanol (EtOH) p.a.	Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth	Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva	Heidelberg
Formaldehyd (37%)	Fluka	Neu-Ulm
Formamid	Fluka	Neu-Ulm
Ganciclovir	Cytovene	Basel
Gentamycin	Gibco	Eggenstein
Giemsa-Lösung	Merck	Darmstadt
Glycerin	Roth	Karlsruhe
Glycogen	Roth	Karlsruhe
Hefeextrakt	Serva	Heidelberg
Hepes	AppliChem	Darmstadt
Imidazol	Sigma Chemical	St. Louis, USA
Isoamylalkohaol	Roth	Karlsruhe
Isopropanol	Roth	Karlsruhe
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranisid (IPTG)	Biomol	Hamburg
Kaliumchlorid (KCl)	Merck	Darmstadt
Kanamycin (Kan)	Merck	Darmstadt
Lithium Acetat	Fluka	Neu-Ulm
Lysozym	Serva	Heidelberg
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Roth	Karlsruhe
Methanol (MeOH)	Roth	Karlsruhe
Natiumacetat (NaAc)	Roth	Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth	Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck	Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth	Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (NaHPO_4)	Merck	Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck	Darmstadt
Natruimhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck	Darmstadt
Nitrobluetetrazoliumchlorid (NBT)	Biomol	Hamburg
NNN'-N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka	Neu-Ulm
PEG 4000	Sigma	Schnelldorf
Pefablock	Serva	Heidelberg
Pepton	Roth	Karlsruhe
Phenol, sauer	Roth	Karlsruhe
Phenol, TE äquilibriert	Roth	Karlsruhe
Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Merck	Darmstadt

Pluronic L 121	Fluka	Neu-Ulm
Ponceaurot S Pure	Serva	Heidelberg
Pyrimethamin	Fluka	Neu-Ulm
Salmon Sperm DNA	Life Technologies	Rockville, UK
Salzsäure (HCl)	Roth	Karlsruhe
Saponin	Serva	Heidelberg
Squalen	Fluka	Neu-Ulm
Streptolysin O	S. Bhakdi	Universität Mainz
Trichloressigsäure	Roth	Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth	Karlsruhe
Trypsin Inhibitor from soybean	Fluka	Neu-Ulm
Tween 80	Fluka	Neu-Ulm
Wasserstoffperoxid	Fluka	Neu-Ulm
Yeast lytic enzyme	ICN Biochemicals Inc,	Aurora
Yeast Nitrogen Base	Life Technologies	Rockville, UK

3.1.3 Sonstige Materialien

Dialyseschlauch Spectra/ Por	Serva	Heidelberg
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg
Erlenmeyerkolben	Kobe	Marburg
Erlenmeyerkolben mit Schikanen	Kobe	Marburg
Expositionskassetten	rego Gollwitzer	Augsburg
Falconröhrchen	Greiner	Frickenhausen
Filme	New RX NIF, Fuji	Japan
Filterpipettenspitzen	Abimed	Langenfeld
Glasobjektträger	IDL	Nidderau
Kulturflaschen	Greiner	Frickenhausen
GST-Sepharose	Amersham Pharmacia	Freiburg
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell	Dassel
Nylonmembran	Hybond	Escondido, USA
PCR-Reaktionsgefäße	BioZym	Hess. Oldendorf
Pipetten	Gilson	Villiers-le-Bel,(F)
Pipettenspitzen	Greiner	Frickenhausen
Plastikpetrischalen	Greiner	Frickenhausen
Thermopapier K61 B	Mitsubishi	Japan
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell	Dassel

3.1.4 Medien, Puffer und sonstige Zusätze:

Acrylamid-Lösung: 30% (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid

AP-Entwicklungspuffer: 100 mM TrisHCl, pH 9,5, 100 mM NaCl₂, 5 mM MgCl₂

AP-Entwicklungspuffer: 66 µl NBT Stocklösung, 33 µl BCIP Stocklösung ad 10 ml Aqua Bidest

Auftragspuffer für DNA: 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 40 % (v/v) Sucrose

BCIP Stocklösung: 5% BCIP in 100% Dimethylformamid

Bradford-Stocklösung (5x): 42,5 % (w/v) Phosphorsäure, 23,8 % (v/v) Ethanol, 0,05 % (w/v) Coomassie Blue G-250

Brefeldin A-Stocklösung: 5 mg/ml in 100% EtOH

CMD-W-Platten (2x konzentriert, für 250 ml): 1 g trp-drop-out supplement (0,2%), 3,35 g yeast nitrogen base (0,67%), 1 g Ammoniumsulfat, ad 200 ml Aqua dest., autoklavieren, danach mit 50 ml 20% Glukoselösung (4%) versetzen

CMD-loW-Platten (2x konzentriert, für 250 ml): wie CMD-W-Platten, jedoch nur 0,1 % Glukose und 2 % Sukrose

Coomassie-Entfärbelösung: 30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, Aqua dest.

Coomassie-Färbelösung: 30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,25 % (w/v) Coomassie Blue R 250, Aqua dest.

Cracking Puffer für Hefe-Zell-Lyse: 5% SDS, 8M Urea, 40 mM Tris HCl pH 6,8, 0,1 mM EDTA, 1% β -Mercaptoethanol, 0,4 mg/ml Bromphenolblau

Cytomix (Transfektion Plasmodium falciparum): 120 mM KCl, 0,15 mM CaCl_2 , 2 mM EGTA, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,6, 25 mM HEPES, pH 7,6

DEPC-Wasser: 0,1% Diethylpyrokarbonat in Aqua bidest. suspendieren, inkubieren über Nacht bei 37°C, autoklavieren

Denaturierungslösung (Kolonie-Screen): 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl, 0,1 % SDS

ECL-Stocklösungen : 250 mM Luminol in DMSO, 90 mM P-Coumarsiure in DMSO, 1 M Tris HCl pH 8.5

ECL (1x) : 400 μl Luminollösung, 178 μl Coumarsiurelösung, 4 ml Tris HCl, ad 40 ml mit Aqua bidest, kurz vor Gebrauch mit 30 % H_2O_2 mischen (1 :2000)

Erststrangsynthesepuffer: 250 mM Tris HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 30 mM MgCl_2

Formaldehyd-Gelpuffer (5x): 0,1 M MOPS pH 7, 40 mM Na-Acetat, 5 mM EDTA pH 8, in DEPC-Wasser, steril filtrieren und im Dunkeln aufbewahren

Gas für Plasmodium falciparum Kultur: 5 % CO_2 , 5 % O_2 , 90 % N_2

Glukose-Stocklösung (20%): 200g Glukose in 1l Aqua dest. lösen und steril filtrieren

Giemsa-Färbelösung: 1 v/ v Giemsa-Lösung, 9 v/ v Giemsa-Puffer

Giemsa-Puffer 10 x, pH 6,8: 130 mM Na_2HPO_4 , 100mM KH_2PO_4

Laemmli-Gelelektrophoresepuffer: 2,5 mM Tris HCl, 19,2 mM Glycin, 0,01 % SDS

LB-Medium: 1% (w/v) Pepton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 170 mM NaCl, 1 mM NaOH, autoklavieren

LithiumAcetat-Mix: 100 mM LiAc in TE

Lysis-Puffer für DNA-Isolierung aus Plasmodium falciparum: 50 mM Tris-HCl, pH 9, 200 mM NaCl, 0,1 M EDTA, 1% SDS, 1 mg/ml Proteinase K

Neutralisierungslösung (Kolonie-Screen): 1 M Tris HCl pH 7.5, 1,5 M NaCl

NBT Stocklösung: 5% NBT in 70% Dimethylformamid

OHS (optimal hybridisation buffer): 5x SSC, 0,1% N-Lauroylsarcosine, 0,02% SDS, 1% Blocking Reagent (Boehringer Mannheim)

PBS, pH 7,5: 140 mM NaCl, 6,5 mM KCl, 2,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄

PCI-Gemisch: 25 v/ v Phenol, pH 8,0, 24 v/ v Chloroform, 1 v/ v Isoamylalkohol

PEG-Mix: 40 % (w/v) PEG 3350 in 100 mM LiAc.Mix

Ponceaurotfärbelösung: 0,2% Ponceaurot, 3% Trichloressigsäure, 100 µg/ ml RNase A

Plasmid Rescue Lösung: 85 ml Aqua bidest, 2 ml Triton X-100, 10 ml 10%SDS, 2 ml 5M NaCl₂, 1 ml 1M Tris HCl pH 8.0, 0,2 ml 0,5M EDTA, sterilfiltrieren und bei RT aufbewahren

Proteinase-Inhibitor-Cocktail: 1 µg/ ml Aprotinin, 10 µg/ ml Pefablock, 10 µg/ ml Soybean Trypsin Inhibitor, 100 µM Benzamidin

Pyrimethmin-Stocklösung 200 µM: 0,012g Pyrimethamin in 5 ml 1% Essigsäure lösen, zur Herstellung der Gebrauchslösung 200µl in 10 ml PBS lösen, steril filtrieren und bei 4 °C aufheben (verwendbar ca. 1 Monat)

RNA-Ladepuffer: 50% Glycerin, 1mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau in DEPC-Wasser

RPMI-Lösung: 31,784 RPMI, 25 mM Hepes, steril filtriert

RP-S-Medium (11): 867 ml RPMI-Lösung, 33 ml 1M NaHCO₃, 100 ml Humanplasma, inaktiviert 30 min 56 °C, 40 µg ml Gentamycin, steril filtrieren

RT-Mix: 2 µl 5x RT Puffer, 0,5 µl Superscript RT (100 U), 0,5 µl dNTPs (je 25 mM je), 1 µl DTT (0,1 M), 6 µl DEPC-Wasser, 20 mM Glucose

Saccharosepuffer: 2 Vol. 10%ige Saccharoselösung, 1 Vol. 10 mM Acetatpuffer pH 4.7

Sammelgelpuffer für SDS-PAGE, pH 6,8 (4x): 0,5 M TrisHCl, 0,4 % SDS

SD-Medium 1l (2x): 13,4g Yeast Nitrogen Base, 1,2g Complete Supplement Mixture minus His- Leu- Trp- Ura, sterilfiltrieren, je nach Selektion entsprechende Lösung noch dazugeben: 80x Uracil: 160 mg, 80x L-Trp: 160 mg, 80x L-His: 160 mg, 80x L-Leu: 480 mg auf 100 ml Aqua dest., jeweils sterilfiltrieren durch 0,2 µm Filter

SD Platten: 125 ml 2x SD, 100 ml, 2x Agar, 5 % Galactose/ Raffinose/Glucose, entspr. Aminosäure (80x) 3,15 ml

SDS-Probenpuffer: 50 mM Tris HCl pH 6.8, 100 mM Dithiothreitol, 2 % SDS, 0.1 % Bromphenolblau, 10 % Glycerol

SDS-Stocklösung: 10% (w/v) SDS in Aqua dest.

Semi-Dry-Blot-Puffer: 48 mM Tris HCl, 39 mM Glycin, 0.0375 % SDS

SOB Medium, pH 7: 2 % w/ v Pepton, 0,5 % w/ v Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, autoklavieren, 10 mM MgCl₂, steril dazu

SOC-Medium: 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v)Pepton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgCl₂

SSC (20x): 3 M NaCl, 300 mM NaCitrat pH 7

STP Adjuvans (2x): 0,4 % (v/v) Tween 80, 5 % (v/v) Pluronic L121, 10 % (v/v) Squalen ; in PBS

TB-Lösung: 10mM PIPES, 15 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 250 mM KCl, mit 1 M KOH auf pH 6,7 einstellen, 55 mM MnCl₂, steril filtrieren

TBE-Puffer (1x): 89 mM TrisHCl, 89 mM Borsäure, 20 mM EDTA

Tricine-EDTA-Puffer: 10 mM Tricine-KOH pH 8.5, 1 mM EDTA

Trenngelpuffer für SDS-PAGE, pH 8,8 (4x): 1,5 M TrisHCl, 0,4 % SDS

Waschpuffer (für Kolonie-Hybridisierung): 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7.5, 0,3% Tween 20

YPD-Platten: 250 ml 2x YPD + Glucose, 250 ml 2x Agar (7,5 g auf 250 ml Aqua dest.)

YPD-AA-Platten: 250 ml 2x YPD + Glucose, 250 ml 2x Agar (7,5 g auf 250 ml Aqua dest.)
1 µg/ml Antimycin A

YPD Medium 1l: 10g Bacto Yeast, 20 g Pepton pH 5,8, nach autoklavieren 50 ml 40% Glucose/Galactose/Sucrose/Raffinose steril zugeben

Zell-Lyse-Puffer (Proteinaufreinigung): 5mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mg/ml Lysozym in PBS

Zymolase (yeast lytic enzyme)-Stock-Lösung: 50 mg/ml *yeast lytic enzyme* in Aqua dest.

3.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase, <i>shrimp</i>	Roche Diagnostics	Mannheim
AgeI	New England Biolabs	Schwalbach
Avr II	New England Biolabs	Schwalbach
BssSI	New England Biolabs	Schwalbach
Dnase (Rnase-frei)	Amersham Pharmacia	Freiburg
DpnI	Amersham Pharmacia	Freiburg
HindIII	Amersham Biotech	Freiburg
EcoRI	Amersham Biotech	Freiburg
Lysozym (<i>chicken egg white</i>)	Serva	Heidelberg
NcoI	New England Biolabs	Schwalbach
NdeI	Amersham Biotech	Freiburg
Pfu-Polymerase	Roche Diagnostics	Mannheim
Rnase	Fluka	Neu-Ulm
Sall	New England Biolabs	Schwalbach
SfoI	New England Biolabs	Schwalbach
SuperscriptRT	Gibco	Eggenstein
T4 DNA Ligase	Roche Diagnostics	Mannheim
Taq-Polymerase	Amersham Biotech	Freiburg
XbaI	New England Biolabs	Schwalbach
XhoI	New England Biolabs	Schwalbach
XmaII	New England Biolabs	Schwalbach
XmnI	New England Biolabs	Schwalbach

3.1.6 Antikörper und Seren

anti-GST (goat)	Amersham Pharmacia	
anti-goat-IgG-HRP (pig)	Dako A/S	Denmark
anti-mouse-AP-IgG (goat)	Dako A/ S	Denmark
anti-rabbit-IgG-HRP (goat)	Dako A/ S	Denmark
anti-DIG-AP-fab fragments	Boehringer	Mannheim

3.1.7 Fertige Reagenziensätze und Marker

DIG Wash and Block Buffer Set, Boehringer, Mannheim
DNA-Marker 1 kb, GeneCraft, Münster
DNA-Marker 100 bp, GeneCraft, Münster
DNA-Marker, 1kb, MBI
Formamid *loading dye*, Amersham Pharmacia, Freiburg
Jetsorb, DNA Extraktion aus Agarosegelen, Genomed, Bad Oynhausen
Nucleospin Plus, Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Format, Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin PC 100, Aufreinigung von Plasmid-DNA im Midi-Format, Macherey-Nagel
Qiagen Maxi Kit, Plasmid-Aufreinigung im Maxi-Maßstab, Qiagen, Hilden
QuikChange XL Site-Directed-Mutagenesis Kit, Amersham Pharmacia, Freiburg
PCR-DIG-Labeling Mix, Boehringer, Mannheim
PCR-DIG Probe Synthesis Kit, Boehringer, Mannheim
PolyATtract mRNA Isolation System, Promega
Prime-It II Random Primer Labeling Kit, Stratagene
Prestained Protein Marker, New England Biolabs, Schwalbach
Protein Marker Broad Range, New England Biolabs, Schwalbach

RNA-Marker, RocheDiagnostics GmbH, Mannheim
 SuperSignal Substrate, Western Blotting, Pierce, Rockford, USA
 TA Cloning Kit, Invitrogen

3.1.8 Plasmide

pTOPO 2.1, Invitrogen
 pGEX 5X3, Amersham Pharmacia
 pCLJ90, C.Jackson, NIH, Bethesda, Maryland, U.S.A.
 pAP23, C.Jackson, NIH, Bethesda, Maryland, U.S.A.
 pAP43, C.Jackson, NIH, Bethesda, Maryland, U.S.A.
 pAP57, C.Jackson, NIH, Bethesda, Maryland, U.S.A.
 pAP58, C.Jackson, NIH, Bethesda, Maryland, U.S.A.
 pSST SUC2 T7 F1ORI (pSST), Genetics Institute, Cambridge, Massachusetts, U.S.A.
 pH-TK; A. Cowman, WEHI; Melbourne, Australia

3.1.9 Synthetische Oligonukleotide (in 5' - 3'Richtung)

5'CDS: (t)_{25gc}
 Sec7mut BFA5: cat att gaa tac tga tct aca taa taa tca agt taa g
 Sec7mut BFA3: ctt aac ttg att att atg tag atc agt att caa tat g
 Sec7-1: gca ttt taa aca tag tac
 Sec7-4: gat ttc ttc att taa aat aca att ata tag
 S5L: ccc cta ggg tag atg taa tga aac agg
 S5XL: ccc cta gga cgc atg ata ata aaa tgc
 S3L: ccc ccc ggg taa cat tat caa tta ttg c
 PfSec7 AgeI 5: acc ggt gct cat aat ttt tcg aaa aag c
 Pf Sec7 Sall 3: gtc gac ata tgt gtt ttg tgt att tg
 Pfsec7ins5: ctc gtg gaa aat agt gat gtt att ttt ata ttg
 Pfsec7ins3: cac gag acc atg tat tgg att aga ata aaa
 Long: cta ata cga ctc act ata ggg caa gca gtg gta aca acg cag agt
 M13f: gta aaa cga cgg cca gt
 M13r: gga aac agc tat gac cat g
 Sec7-AvrII(Xba)5: ccc cta gga atc cat ttc tag ata aag
 Sec7-XmaI(Xba)3: ccc ccc ggg tgt ctc tag agt att tcc
 AgeI-AvrII5: ccc cta ggg ctc ata att ttt cg
 Sall-XmaI: ccc ccc ggg ata tgt gtt ttg tg
 Smart II: aag cag tgg taa caa cgc aga gta cgc ggg
 Gbp1: cgg gat ccc gac ttt cta aag tat ctg
 Gbp3: gaa gat ctg gaa tgg aag gca cct aag g
 GBP-RNA: gct gaa gga gaa gat acg tgt gcacg
 SST-5': cct cgt cat tgt tct cgt tcc ctt
 SST-3': ggt gtg aag tgg acc aag gtc ta
 yEXP-1-5': ccg ctc gag arg aaa atc tta tca gta ttt ttt c
 yEXP-1-3': ccg ctc gag gtt tgt ttt ttc ggc taa gg
 yGBP(M1)-5': ccg ctc gag atg cga ctt tct aaa gta tc
 yGBP(M1/M2M)-3': ccg ctc gag tat ata agc ctg cag tag g
 yGBP(M2)-5': ccg ctc gag atg gaa gtc tca aaa aaa aat g
 yGBP(M3)-5': ccg ctc gag atg att tta tta att ttt gg
 yINV-SS-5': ccg ctc gag atg ctt ttg caa gct ttc ctt ttc c
 yINV-SS-3': ccg ctc gag cat tga tgc aga tat ttt ggc tgc

3.1.10 Zellen und Organismen

E. coli XL-1 Blue MRF', Stratagene, Heidelberg

E. coli MC4100 (DE 3), Stratagene, Heidelberg

E. coli Rosetta Garni (DE 3), Novagen, Freiburg

E. coli BL21 (DE 3), Novagen, Freiburg

E. coli DB1161, *E. coli* Genetic Stock Center, New Haven, USA

Humane Erythrozyten, Blutgruppe A Rh+, Universitätsblutbank Lahnberge, Marburg

Plasmodium falciparum, Stamm FCBR, Philipps-Universität Marburg

Plasmodium falciparum, Stamm FCBR (BFA-resistent), Philipps-Universität Marburg

Plasmodium falciparum, Stamm 3D7, The Walter and Eliza Institute of Medical Research, Melbourne, Australia

Saccharomyces cerevisiae, APY033-9-2, C.Jackson, NIH, Bethesda, Maryland, U.S.A.

Saccharomyces cerevisiae, APY045-18-3, C.Jackson, NIH, Bethesda, Maryland, U.S.A.

Saccharomyces cerevisiae, YTK12 (*suc2-*), Genetics Institute, Cambridge, Massachusetts, U.S.A.

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeiten mit Bakterien (*Escherichia coli*)

3.2.1.1 Mini-, Midi-, Maxi-Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die Isolation von Plasmid DNA wurde mit fertigen Reagenziensätzen der Firmen Macherey & Nagel bzw. Qiagen jeweils nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.1.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Die Bakterienzellen wurden in einer 6ml Vorkultur (LB-Medium) angeimpft und über Nacht bei 37°C im Brutschrank geschüttelt. Am nächsten Tag wurden damit 600 ml SuperBroth in einem 2 l Erlenmeyerkolben inokuliert. Die Zellen wurden bei 37 °C solange geschüttelt (200-250 rpm) bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht war, dann bei 2500g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Bakterienzellpellet wurde zweimal in 600 ml eiskalten sterilen Wasser (Aqua dest.) und einmal in 10%iger eiskalter Glycerinlösung resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 1-2 ml 10% eiskalter Glycerinlösung resuspendiert und die Zellsuspension in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Zellsuspensionaliquots konnten bei -70 °C ohne Kompetenzverlust für mindestens 1 Monat gelagert werden.

3.1.2.3 Transformation von *E. coli* (Elektroporation)

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Die Elektroporationsküvetten (0,2 cm) wurden vorgekühlt. 50 µl der kompetenten Zellen wurden mit 3-4 µl DNA gemischt und dann möglichst luftblasenfrei in die Küvette pipettiert. Die Küvetten wurden von außen trocken gewischt und die Zellen bei 2,5 kV (25 µF, 200 Ohm) elektroporiert. Die resultierende Zeitkonstante sollte bei 3-4 msec liegen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 1 ml SOC Medium in der Küvette resuspendiert, in ein 10 ml Falcon-Röhrchen gefüllt und für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Von der Zellsuspension wurden danach unterschiedliche Mengen auf die entsprechenden LB-Agar-Selektionsplatten ausplattiert. Die Transformationseffizienz für *supercoiled* Plasmid-DNA sollte bei 10⁸ bis 10¹⁰ Kolonien pro µg DNA liegen.

3.2.2 Arbeiten mit Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*)

3.2.2.1 Transformation von Hefen

Der entsprechende Hefestamm wurde in 50 ml YPD-Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt (150 rpm). Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 bis 1,0 wurden die Zellen abzentrifugiert (3000-5000 rpm, Raumtemperatur) und das Pellet in 1 ml 0,1 M LiAc-Lösung (steril) resuspendiert, anschließend erneut abzentrifugiert und das Zellpellet wiederum in 350 µl 0,1 M LiAc aufgenommen.

Der Transformationsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 36 µl 1M LiAc, 240 µl PEG 4000 (50 %ig, steril), 10 µl Salmon Sperm DNA (zuvor 5 min bei 95 °C aufkochen), 5 µl Plasmid DNA aus Mini-, Midi, oder Maxipräparation (1-10 µg Plasmid DNA), 50 µl kompetente Hefezellen. Der Ansatz wurde nach Vortexen 45 min bei 30 °C inkubiert, anschließend 30 min bei 42 °C. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml YPD-Medium resuspendiert und 1 h bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden erneut pelletiert und in 200 µl Aqua bidest aufgenommen und auf die entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen.

3.2.2.2 Alternatives Protokoll zur Hefetransformation

Die Hefekultur wurde entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll hergestellt und in 5 ml LiAc-Mix gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Zellen in 1 ml LiAc-Mix resuspendiert. Der Transformationsansatz bestand aus 100 µl Zellsuspension, 50 µg Salmon Sperm DNA, 0,7 ml PEG-Mix. Der Ansatz wurde durch Vortexen gemischt und 30 min bei 30 °C inkubiert, anschließend für 20 min bei 42 °C. Die Zellen wurden weiter wie im konservativen Transformationsprotokoll beschrieben behandelt.

3.2.2.3 Kolonie-PCR von Hefen

Die Einzelklone wurden auf einer Masterplatte ausgestrichen, mit einem sterilen Zahnstocher etwas von der Kolonie abgenommen und je in 50-100µl sterilem H₂O resuspendiert. Dieser Ansatz wurde anschließend für 5 min aufgekocht, danach gevortext. 5 bis 10 µl der Resuspension wurden in einen Standard 50 µl PCR-Ansatz eingesetzt.

Alternativer Ansatz zur PCR aus Hefen – Herstellung von Spheroblasten

Einzelklone wurden von der Platte mittels sterilem Zahnstocher oder Pipettenspitze abgenommen und in 10 µl Zymolaselösung (100µg/ml) resuspendiert. Die Suspension wurde durch auf- und abpipettieren gemischt und 5 min bei 37 °C inkubiert. 2µl der so hergestellten Spheroblasten-Suspension wurde in einen 50 µl Standard PCR Ansatz eingesetzt.

3.2.2.4 Hefe-Zell-Lyse und Vorbereitung von Hefen für SDS-PAGE

Von einer Einzelkolonie wurden 5 ml Flüssigkultur im entsprechenden Selektionsmedium angeimpft und über Nacht bei 30°C und 150 rpm bis zu einer OD 600 von 0,6-0,8 wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann bei 3000-5000 rpm pelletiert und das Zellpellet für mindestens 10 min bei -70 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl auf 60°C vorgewärmten Cracking Puffer resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden zu 0,1g Glas-beads in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, 10 min bei -70 °C inkubiert, danach 1 min gevortext und schließlich bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und 20-50 µl auf Gel aufgetragen.

3.2.2.5 Plasmid-DNA-Isolation aus Hefen

Von dem Hefestamm wurde eine 2 ml Übernacht-Kultur hergestellt. Diese Kultur wurde bei 13000rpm für 10 sec abzentrifugiert, das Zellpellet gevortext und in 200 µl Plasmid-Rescue-Lösung resuspendiert. Dazu gab man 200µl PCI, 0,3g Glas-beads und vortext das Gemisch für 2 min. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 13000rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA aus diesem Überstand wurde EtOH-gefällt und das Pellet in 5 µl Wasser oder TE-Puffer gelöst.

3.2.2.6 Transformation von Hefe-Plasmiden in Bakterien und M9 Selektion

Die isolierten Plasmide aus Hefen wurden in 50 µl elektrokompetente Zellen (M9-Selektion geeigneter *E. coli* Stamm DB1161) transformiert. 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Platten (inklusive des entsprechenden Antibiotikums) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine beliebige Anzahl Klone wurden auf M9 Selektions-Platten (exclusive der entsprechenden Aminosäuren) übertragen. Dort wachsende Klone wurden in 3ml-Flüssigmedium inokuliert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Aus diesen Kulturen konnte wiederum Plasmid-DNA präpariert werden und die DNA in einem Restriktionsverdau analysiert werden.

3.2.3 Arbeiten mit *Plasmodium falciparum* Blutstadien

3.2.3.1 Kultivierung von *Plasmodium falciparum* Blutstadien

Die *in-vitro* Kultivierung von *P. falciparum* (FCBR) Blutstadien erfolgte in sterilen Plastikflaschen. Der *P. falciparum* Stamm FCBR (Kolumbien) wurde in RP-S-Medium mit humanen Erythrozyten der Blutgruppe A Rh+ kontinuierlich kultiviert. Die Kulturflaschen wurden speziell begast (siehe Material) und bei 37 °C verschlossen im Brutschrank aufbewahrt.

Die Kultivierung der *P. falciparum* Stämmen 3D7, HB3, w2mef, FCR3 und K1 erfolgte in sterilen Petrischalen. Die Schalen wurden in einer abgedichteten Kammer begast und die verschlossene Kammer bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.3.2 Ernte und Anreicherung von *Plasmodium falciparum* Trophozoiten-/Schizontenstadien

Die Entwicklung von Trophozoiten- und Schizontenstadien von *Plasmodium falciparum* führt zu morphologischen Veränderungen der Wirtszellen. Vom Parasiten synthetisierte und zur Erythrozytenmembran transportierte Proteine führen zur Ausbildung sogenannter *knobs* (im Elektronenmikroskop dicht erscheinende membranassoziierte Ausbuchtungen). Diese Modifikationen verändern die Sedimentationseigenschaften der infizierten Erythrozyten im Gegensatz zu den nicht infizierten Erythrozyten, was zur Anreicherung der infizierten roten Blutzellen ausgenutzt werden kann.

Eine 250 ml-Kulturflasche mit 1 ml Erythrozyten (ca. 10^{10} Zellen) und 35 ml R-PS Medium wurde bis zu einer Parasitämie von maximal 15 % kultiviert. Die gesamten Zellen wurden zur Ernte aus der Kulturflasche entnommen, 5 min bei 3000 rpm (Labofuge III, Heraeus) abzentrifugiert, das über dem Sediment stehende Medium abgesaugt und das Pellet in 3-5 ml Gelafundin-RPMI-Mischung (2,4 : 1,4) in einem 10 ml Falconröhrchen resuspendiert. Die Zellen sedimentierten dann 8 min bei 37 °C; in dieser Zeit sinken die Erythrozyten ohne *knobs* ab, während die infizierten Erythrozyten noch in der plasmaartigen Flüssigkeit verbleiben. Im Überstand befinden sich so fast ausschließlich infizierte Erythrozyten (bis zu 95 % Parasitämie), welche mit einer Pipette abgenommen werden. Die geernteten Zellen wurden dann 2 x mit RPMI gewaschen und wurden anschließend für Experimente oder zur weiteren Kultivierung eingesetzt.

3.2.3.3 Giemsa-Färbung

Die Kontrolle der Parasitämie in der kontinuierlichen Kultur, die jeweiligen Entwicklungsstadien sowie die Anreicherung mit Gelafundin wurde mit einem Giemsa-gefärbten Ausstrich kontrolliert. Dazu wurden 10 µl Erythrozytensediment mit einer Pipette aus der Kulturflasche entnommen, die Suspension durch Auf- und Abpipettieren gemischt und auf einem Objektträger gleichmäßig ausgestrichen. Anschließend wurden die Ausstriche luftgetrocknet, im Methanolbad fixiert und danach 10 min mit Giemsa-Färbelösung überschichtet. Die gefärbten Ausstriche wurden wiederum luftgetrocknet und konnten in 1000facher Vergrößerung im Lichtmikroskop mit Ölimmersionsobjektiven betrachtet werden. Die Zellkerne der Parasiten wurden durch die Farbstoffe aus der Giemsalösung rot/blauviolett angefärbt und waren deutlich von dem nur leicht rötlich erscheinendem Erythrozytencytosol abzugrenzbar.

Um die Anzahl der in ein Experiment eingehenden Zellen zu bestimmen, wurden die Parasitämien durch Auszählen infizierter und nicht infizierter Zellen von mindestens zehn Gesichtsfeldern eines Ausstriches unter dem Mikroskop und die Gesamtzellzahl durch Zählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.2.3.4 Synchronisation von *Plasmodium falciparum* Blutzellkulturen mit Sorbitol

Die nicht-synchronisierte Parasitenkultur (möglichst mit hohem Anteil an Ringstadien) wurde 5 min bei 1500 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 5 Volumen 5% Sorbitol des Zellpellets resuspendiert und 5 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Zellen wie zuvor abzentrifugiert und das Zellpellet in RPS resuspendiert.

3.2.3.5 Aufschluß von infizierten Erythrozyten

Die Parasiten können aus den angereicherten infizierten Erythrozyten durch selektives Aufbrechen der Erythrozytenmembran gewonnen werden. Um Schizontenstadien der Parasiten ohne die Wirtszelle zu erhalten, wurden zwei Methoden angewendet.

(1) Saponinlyse: Saponin wirkt entsprechend einem Detergens auf cholesterinhaltige Biomembranen und verändert die biologischen Eigenschaften der Membran. Makromoleküle können nach Behandlung der Membran mit Saponin frei durch sie hindurch diffundieren (Saliba *et al.*, 1999). Die angereicherten infizierten Erythrozyten wurden mit 1,5 Volumen des Zellpellets in 0,15 %iger Saponinlösung (in PBS) aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert. Diese Zeit ist ausreichend, um die Erythrozytenmembran anzugreifen und zu disintegrieren.

Nach Zugabe von weiteren 2 Volumina PBS wurden die Zellen 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand, der Hämoglobin und Membrananteile des aufgebrochenen Erythrozyten enthält, entfernt. Nach einem zusätzlichen Waschschrift mit PBS kann das Parasitenpellet für Experimente eingesetzt werden.

(2) Streptolysin O -Lyse: Streptolysin O (SLO) von *Streptococcus pyogenes* (-in dieser Arbeit wurde rekombinant in *E. coli* hergestelltes SLO verwendet-) wirkt als Hämolyysin auf die Erythrozyten. Es formt stabile Poren einer Größe von ca. 30 nm in die Erythrozytenmembran (Bhakdi *et al.*, 1993) ohne die Membran an sich zu zerstören. Bei Behandlung von infizierten Erythrozyten fließt das Erythrozytenzytosol aus der Zelle aus, während die PVM intakt bleibt. Je 10^8 infizierte Zellen in 180 μ l RPMI oder PBS wurden mit je 16 μ l SLO (entspricht 2 bis 4 hämolytischen Einheiten) gemischt und 6 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Reaktionsgefäß zweimal vorsichtig geschüttelt, um das SLO homogen zu verteilen. Die Zellen wurden dann 5 min mit 4500 rpm zentrifugiert und das Pellet danach mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und für weitere Experimente eingesetzt.

3.2.3.6 Stabile Transfektion von *Plasmodium falciparum* Blutstadien (nach T. Triglia, persönliche Mitteilung)

Zum Zeitpunkt der Transfektion sollte die synchronisierte Blutzellkultur 3-4 % Ringstadien enthalten (für Stamm 3D7 1-2 % Ringstadien). Für eine Transfektion wurden 5 ml der Kultur bei 1500g für 1 min sedimentiert und der Überstand verworfen. Von der Plasmid DNA wurden 80 μ g weitestgehend in 15 μ l TE Puffer gelöst, anschließend mit 385 μ l Cytomix gemischt, die DNA komplett gelöst und zum Zellpellet gegeben. Das DNA-Zellgemisch wurde in eine 0,2 cm GenePulser Küvette gegeben und bei 0,310 kV/950 μ F (*high capacitance*) elektroporiert. Die resultierende Zeitkonstante sollte bei b/n 7-10 liegen. Sofort nach der Elektroporation wurden die Zellen in mit vorgewärmten Medium und frischen Erythrozyten (3% Hämatokrit) vorbereitete Kulturschalen gegeben und nach Begasung bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Kultur mit frischen RPS-Medium versehen. Die Parasitämie sollte beim 3D7 Stamm unter 3 % liegen; bei höherer Parasitämie sollte die Kultur geteilt werden. 48 Stunden nach Transfektion (Tag 2) wurde die Kultur mit frischen RPS-Medium mit 10nM WR99210 bzw. 200nM Pyrimethamin behandelt und täglich bis einschließlich dem 10. Tag nach Transfektion mit RPS/10 nM WR99210 bzw. 200 nM Pyrimethamin behandelt. Ab Tag 10 nach Transfektion wurde die Kultur zweimal wöchentlich mit frischen RPS/10nM WR99210 bzw. 200 nM Pyrimethamin versorgt. Die Kultur wurde täglich mittels eines

Giemsa-gefärbten Ausstrichs auf lebendige Transfektanten kontrolliert. Sobald diese in der Kultur auftraten, wurde ein Aliquot dieser Kultur eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 Restriktionsverdau von DNA

Der basenspezifische Verdau von DNA wird mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Ursprünglich wird das Restriktions-Modifikationssystem von Bakterien genutzt um sich gegen das Eindringen von Fremd-DNA (z.B. von Bakteriophagen) zu wehren. Ein Teil dieses Systems sind die DNA-abbauenden Restriktionsendonukleasen. Die eigene DNA des jeweiligen Bakteriums ist durch Modifikation mit Restriktionsmethylasen an den entsprechenden Schnittstellen geschützt. Diese Restriktionsenzyme können für den Schnitt von DNA-Doppelsträngen an den gewünschten Sequenzen gezielt eingesetzt werden, etwa für die Insertion von Oligonukleotiden in Plasmid-DNA oder für Restriktionsanalysen von Plasmid-DNA.

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 0,2 -1 µg DNA eingesetzt und in einem enzymespezifischen Puffer aufgenommen. Dazu wurden 3 U des entsprechenden Enzyms pipettiert und der Ansatz 2-3 h bei der entsprechenden Optimaltemperatur des Enzyms inkubiert. Anschließend wurde der Verdau mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.2.4.2 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

In Abhängigkeit von der gewünschten Trenneigenschaft wurden 0,8 bis 2%ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf ca. 70 °C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 10 µg/ml) versetzt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA und macht die DNA unter UV-Bestrahlung als fluoreszierendes Signal sichtbar (Maniatis *et al.*, 1989). Die Agarose-Ethidiumbromid-Lösung wurde in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gegossen und Taschen für das spätere Auftragen der Probe mit Hilfe eines Kammes ausgespart. Nach der endgültigen Erstarrung des Geles wurde es mit 1x TBE-Laufpuffer überschichtet. Die aufzutragenden DNA-Proben wurden mit 0,1 Volumen 10x Auftragspuffer versetzt, um ein Absinken der Proben in das Gel zu gewährleisten und die Lauffront im Gel verfolgen zu können. Zur Größen und Konzentrationsabschätzung der Proben wurde ein DNA-

Längenstandard bekannter Konzentration parallel aufgetragen. Die Gele wurden mit 5 V/cm laufen gelassen und anschließend bei Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) fotografiert.

3.2.4.3 Klonierung von PCR-Produkten

Um doppelsträngige DNA-Fragmente in Plasmid-DNA zu ligieren, wurde zunächst die Vektor-DNA mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Bei der Ligation von Vektor-DNA und DNA-Fragment sollten beide Nukleinsäurefragmente in mindestens äquimolaren Konzentrationen eingesetzt werden, besser jedoch sollten die DNA-Fragmente (Inserts) in dreifachen molaren Überschuss vorliegen. Um zu gewährleisten, daß der Vektor nicht ohne Fragment rezirkularisiert, wurde die Plasmid-DNA vor Ligationsreaktionen dephosphoryliert. Dazu wurden 5 µl Plasmid-DNA aus einer Minipräparation mit 1-2 Units alkalischer Phosphatase für 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend die DNA mit Ethanol p.a. gefällt und das Pellet in der gewünschten Menge Aqua dest. aufgenommen. Zu dem dephosphorylierten Vektor wurde ein dreifacher Überschuß an Insert-DNA gegeben, 2 bis 3 Units T4-DNA-Ligase, 0,1 Volumenanteil des 10x Ligationspuffers, 1 bis 5 mM ATP und der Ansatz mit Aqua dest. auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Ligationsreaktion erfolgte entweder 1 h bei Raumtemperatur oder bei 14 °C über Nacht im Thermoblock.

Die direkte Klonierung von PCR-Produkten ohne zwischengeschalteten Restriktionsverdau mittels der von Taq-Polymerasen *template*-unabhängig angehangenen Desoxyadenosine erfolgte mit Hilfe des TOPO TA-Cloning Kits (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers.

3.2.4.4 Reinigung von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäurelösungen von unerwünschten Inhaltsstoffen zu befreien (z.B. Proteine), kann man sie durch Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI) reinigen. Die verunreinigte Nukleinsäurelösung wurde mit dem gleichen Volumen PCI intensiv gemischt und anschließend das Gemisch bei 13000 rpm 10 min zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde dann abgenommen und durch Zugabe von EtOH gefällt. Dazu wurde die Nukleinsäurelösung mit 0,2 Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8-5,2) versetzt und 2,5 Volumen eiskaltes Ethanol p.a. dazugegeben. Die Fällung erfolgte bei -20 °C für mindestens 20 min oder über Nacht. Danach wurde die Mischung mit 13000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, um die Nukleinsäure zu pelletieren. Das Pellet wurde dann mit 1 Volumen 70% EtOH gewaschen und getrocknet, anschließend im gewünschten Volumen Aqua dest. oder im gewünschten Puffer aufgenommen.

3.2.4.5 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren ist aufgrund ihres maximalen Absorptionsmaximums bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm mittels Absorptionsspektrometrie über die Messung der optischen Dichte (OD) möglich. Bei einer Quarzküvettdichte von 1 cm läßt sich aus der OD unter Berücksichtigung der folgenden Parameter die Nukleinsäurekonzentration in $\mu\text{g}/\text{ml}$

berechnen:	doppelsträngige DNA:	$\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
	einzelsträngige DNA:	$\text{OD}_{260} \times 37 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
	RNA:	$\text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
	einzelsträngige Oligonukleotide:	$\text{OD}_{260} \times 20 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Aus dem Quotienten von OD_{260} zu OD_{280} läßt sich der Gehalt an Proteinkontamination in der Probe bestimmen, da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt. Der Quotient der beiden genannten Werte sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, um von relativ reiner Nukleinsäurelösung ausgehen zu können

3.2.4.6 Genomischer Screen von *E. coli* Kolonien

Der genomische Screen wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um eine große Anzahl *E. coli* Kolonien bzw. deren Plasmide zu analysieren, ohne dabei die jeweilige Plasmid-DNA der Klone präparieren zu müssen.

Ein „Schmier“ von RACE-PCR Produkten wurde in den pTOPO TA-Klonierungsvektor ligiert und die Transformantenpopulation anschließend wie folgt behandelt: Zunächst wurden Bakterienkolonien einzeln auf LB-Platten (100 Kolonien/Platte) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Platten eine Stunde kühl gestellt und danach ein Nylon-Filter (Hybond) aufgelegt. Der Nylon Filter wurde nach 2 min abgezogen, kurz zwischen trockenes Whatman Papier gelegt und danach für 15 min auf ein mit Denaturierungslösung (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl, 0,1% SDS) getränktes Whatman Papier gelegt. Danach wurde der Filter erneut zwischen zwei trockene Whatman Papiere gelegt und anschließend für 15 min wie zuvor mit Neutralisierungslösung (1 M Tris HCl pH 7.5, 1,5 M NaCl) behandelt; anschließend für 10 min mit 2x SSC. Nachdem der Filter bei Raumtemperatur getrocknet ist, wurde die DNA auf der Membran mittels UV-Bestrahlung kreuz-vernetzt. Die Prähybridierung des Filters erfolgte in einem Hybridisierungsgefäß für 1 Stunde bei 42 °C in DIG-Easy-Hybridisierungspuffer bei gleichmäßigem Drehen des Gefäßes im Hybridisierungssofen. Die Hybridisierung mit der DIG-markierten DNA-Sonde erfolgte für 2 Stunden bei 42 °C. Die DIG-markierte Sonde wurde dazu für 5 min aufgekocht 1-5 μl des Markierungs-PCR-Ansatzes (abhängig von der PCR-Ausbeute) zu 1 ml Hybridisierungspuffer

gegeben. Nach der Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung abgeschüttet (kann für spätere Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden) und die Membran zweimal für 5 min bei Raumtemperatur mit 2x Waschpuffer gewaschen, anschließend zweimal für 15 min in 0,5x Waschlösung (bei Raumtemperatur oder $42\text{ }^{\circ}\text{C}$). Die Membran wurde anschließend für 30 min in Blockpuffer (1% *blocking reagent*, Boehringer Mannheim) inkubiert; danach für 30 min in Blockpuffer/ anti-DIG-*fab-fragments* (1:20000) geschwenkt. Nach Waschen der Membran (zweimal 15 min mit Waschpuffer) konnte die Detektion mit ECL (siehe Western Blot) durchgeführt werden.

3.2.4.7 Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1988)

Die PCR ist die Methode der Wahl zur Amplifizierung beliebiger bekannter oder unbekannter DNA-Bereiche. Diese zu amplifizierenden Regionen müssen von zwei bekannten Nukleotidsequenzbereichen eingerahmt sein, von denen die Oligonukleotidprimer für die Polymerisationsreaktion abgeleitet werden. Um eine Anlagerung der für den Start der Reaktion notwendigen Oligonukleotidprimer zu erreichen, muß die für den jeweiligen Primer entsprechende Annealingtemperatur für jede Reaktion individuell ausgewählt werden. Die optimale Anlagerungstemperatur von Primern hängt sowohl vom Primer als auch von dem zu amplifizierenden Fragment ab:

$$T_a = 0,3 T_m (\text{Primer}) + 0,7 T_m (\text{Produkt}) - 14,9$$

$$(T_a = \text{Annealingtemperatur des Primers}; T_m = \text{Schmelztemperatur})$$

Die Schmelztemperatur des Primers errechnet sich für Oligonukleotide bis 20 bp mit folgender Formel näherungsweise aus dem GC-Gehalt des Primers:

$$T_m = 4 x (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 x (\text{Anzahl A bzw. T})$$

Die Elongationstemperatur und -zeit hängt von der verwendeten Polymerase ab. Üblicherweise wird eine Elongationstemperatur von $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei der Verwendung von *Taq*-Polymerase eingesetzt und eine Elongationszeit von 30-60 sec je kb Länge. Für *Pfu*-Polymerase werden 2 min je kb Länge berechnet und eine Elongationstemperatur von $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ benutzt. Generell wurden in einem Standard-PCR-Ansatz mit 50 μl Volumen folgende Ingredienzien eingesetzt: 5 μl 10x PCR-Puffer (Amersham Pharmacia), 2 μl 25 mM MgCl_2 , 1 μl dNTP-Lösung (10 mM jeweils), 10-100 ng *template* DNA, je 1 μl 5' und 3' Primer (10 μM) ad 50 μl gereinigtem Wasser (Fa. Roth; pyrogenfrei, hypotonisch).

Ein typisches Programm für die Amplifizierung von 150-800 bp eines Templates mit „normalem“ GC-Gehalt sah wie folgt aus:

<i>Schritt 1:</i>	95 °C	3 min
<i>Schritt 2:</i>	94 °C	60 sec
<i>Schritt 3:</i>	55 °C	60 sec
<i>Schritt 4:</i>	72 °C	60 sec
<i>Schritt 5:</i>	72 °C	5 min
<i>Schritt 6:</i>	8 °C	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden 35x wiederholt.

Bei Verwendung von *P. falciparum* -DNA als *template*-DNA wurde das Programm aufgrund des hohen A/T-Gehaltes modifiziert (Xin-zhuan *et al.*, 1996). Sollte ein PCR-Produkt direkt in einen Expressionsvektor ligiert werden, wurde außerdem *Pfu*-Polymerase verwendet, um die Fehlerrate der Synthese möglichst gering zu halten. Ein Programm beispielsweise für die Amplifikation von genomischen DNA-Bereichen aus *P. falciparum* sah wie folgt aus:

<i>Schritt 1:</i>	95 °C	4 min
<i>Schritt 2:</i>	94 °C	60 sec
<i>Schritt 3:</i>	50 °C	60 sec
<i>Schritt 4:</i>	60 °C	2 min / kb
<i>Schritt 5:</i>	60 °C	10 min
<i>Schritt 6:</i>	8 °C	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden 40x wiederholt.

Von den PCR-Ansätzen wurden standardmäßig 10 µl auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.2.4.8 Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Für die RT-PCR wurden 1 µg Gesamt-RNA von *Plasmodium falciparum* mit je 100 ng Primer (sec7-4 oder GBP-RNA) und 100 U Superscript reverse Transkriptase (Gibco) eingesetzt. Die Reaktion wurde für 2 min bei 72°C inkubiert, anschließend für 1,5 Stunden bei 42 °C in 250 mM TrisHCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 2 mM DTT und 1 mM dNTP durchgeführt. Als Kontroll-Reaktion auf Kontaminationen der RNA-Präparation mit gDNA wurde jeweils ein Ansatz ohne reverse Transkriptase gemacht. Die erhaltene cDNA wurde anschließend in einer PCR Reaktion als *template* verwendet.

3.2.4.9 RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends)

Die RACE-PCR wurde entsprechend dem SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die mRNA aus Gesamt-RNA aufgereinigt in die Erststrangsynthese eingesetzt: 1 µg mRNA, 1 µl 3' Primer (10 µM, entweder genspezifisch oder oligoT-Primer), 1 µl SMART II Primer (10 µM), ad 5 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde für 2 min bei 70 °C, danach für 2 min bei 4 °C inkubiert und anschließend kurz anzentrifugiert. Danach wurden 2 µl Erststrangsynthesepuffer, 1 µl 20 mM DTT, 1 µl dNTP-Mix (10 mM jeweils), 200 U Reverse Transkriptase (Gibco Superscript II) dazugegeben und die Mixtur für 1,5 Stunden bei 42 °C inkubiert. Der SMART II Primer besitzt einen 3'GGG-Schwanz, der mit den zusätzlichen dCs, welche die reverse Transkriptase an cDNA Enden anhängt, hybridisieren kann. Auf diese Weise ist es möglich, einen Adapter bekannter Sequenz an den „unbekannten“ 5'Bereich der mRNA zu knüpfen und die Amplifikation dieses Bereiches in einem zweiten Schritt durchzuführen.

Die Reaktion wurde in 100 µl Tricine-EDTA-Puffer aufgenommen und für 7 min bei 72 °C inaktiviert. Mittels RNase Behandlung konnte die verbliebene mRNA abgedaut werden und die cDNA bei -20 °C gelagert werden.

Anschließend wurde die Erststrang-cDNA als Template in die 5'RACE-PCR eingesetzt: Dabei wurde ein genspezifischer Primer (5') und der 3'Long-Primer, der eine verlängerte Version des SMART II Primers darstellt, eingesetzt. Diese Primerkombination ermöglicht die Amplifikation eines unbekanntes 5'mRNA/cDNA Bereiches. Die RACE-PCR wurde unter Standard PCR Bedingungen durchgeführt.

3.2.4.10 Deletion von DNA-Sequenzbereichen

Die Deletion von Sequenzbereichen aus DNA (beispielsweise der Insertionssequenz aus der Sec7 Domäne von *Plasmodium falciparum*) wurde auf verschiedene Weisen herbeigeführt:

1. Die Sequenzbereiche, die den zu deletierenden Bereich (die Insertionssequenz) flankieren, wurden mittels PCR amplifiziert. Dafür wurden Primer verwendet, die eine Restriktionsenzym-Schnittstelle (BssSI) am 3'Ende des ersten Fragments (*Pf Sec7 ins3'*) und am 5'Ende des zweiten Fragments (*Pf Sec7 ins5'*) erstellen. Beide PCR Produkte wurden anschließend unabhängig voneinander in pCRII-TOPO ligiert. Plasmid 1 und 2 wurden danach jeweils mit BssSI geschnitten (die Schnittstelle sollte ansonsten im Plasmid nicht vorhanden sein) und zusammen als *template* in einer weiteren PCR eingesetzt. Die aufgeschnittenen Plasmide können zum Einen religieren, sich zum Anderen aber auch mit dem jeweils anderen Plasmid verknüpfen. Wählt man

für diese zweite PCR äußere Primer (*Pf Sec7 AgeI* 5' und *Pf Sec7 Sall* 3'), die nur dann ein Produkt ergeben, wenn eine Verknüpfung verschiedener Plasmide stattgefunden hat, erhält man ein rekombinantes PCR Fragment. Aus diesem Fragment ist dann der gewünschte Bereich deletiert. Über dieses Verfahren wurden das Hefekonstrukt pAP43 G-PfSec^{ins}-G hergestellt. Da hierbei allerdings die Subklonierung der zwei flankierenden Sequenzen erforderlich war, wurde für die Herstellung der *Plasmodium falciparum*-Transfektionsvektoren ein anderes Verfahren gewählt (siehe 2.)

2. Zunächst wurde die *Sec7* Domäne vom Brefeldin A-resistenten Parasitenstamm FCBR^{BFA} amplifiziert. Dazu wurden die Primer *Sec7AvrRII*-5'-ccCCTAGGaatccattctagataaag-3' and *Sec7EcoRI*-5'-cgGAATTCgtctctagagtattcc-3' benutzt. Das entstandene PCR-Fragment von 1386 bp wurde in den pTOPO2.1 Klonierungsvektor ligiert und sequenziert (pCR2.1-TOPO/*Sec7*^{BFA}). Die Insertionssequenz wurde anschließend mittels einer rekombinatorischen PCR deletiert. Der Vektor pCR2.1-TOPO/*Sec7*^{BFA} diente als Matrize zur Amplifikation von den die Insertion flankierenden Regionen. Hierzu wurden die Primer (i) *Sec7AvrRII* and *ex-ins1* 5'-CAATATAAAAATAACATCACTATTTTCaccatgtattggattag-3' (252 bp Fragment) und (ii) *ex-ins2* 5'-CTAATCCAATACATGGTgaaaatagtgat gttattttatattg-3' and *Sec7EcoRI* (758 bp Fragment) eingesetzt. Die resultierenden PCR Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt und eluiert. Anschließend dienten beide Fragmente zusammen als *template* in einer zweiten (rekombinatorischen) PCR mit den Primern *Sec7AvrRII* and *Sec7EcoRI*. Das entstandene Fragment (969 bp) besteht demnach aus den Insertionssequenz-flankierenden Regionen, beinhaltet also nicht die Insertionssequenz. Jeder *ex-ins* Primer besteht aus einem "Kopfteil", der komplementär zur kodierenden Sequenz ist und einem "Schwanzteil", der zum anderen *ex-ins* Primer komplementär ist. Dabei entstehen überhängende Enden der Produkte aus PCR 1, die miteinander hybridisieren und als *template* in der zweiten (rekombinatorischen) PCR dienen. Die Produkte aus PCR 2 wurden direkt pH-TK Transfektions-Vektor ligiert und anschließend sequenziert (pH-TK/*Sec7*^{BFA-ins}).

3.2.4.11 Markierung von DNA-Fragmenten

Radioaktive Markierung: Für die Herstellung der radioaktiv markierten DNA-Sonden wurde das Prime-It II Random Primer Labeling Kit (Stratagene) verwendet: 200 ng des aufgereinigten, zu markierenden DNA-Fragments wurden in 23 µl Wasser aufgenommen, mit

10 µl Primer Mix gemischt und 5 min bei 100 °C aufgeköcht. Zu diesem Mix wurden 3 µl ($\alpha^{32}\text{P}$)dATP und 1 µl Klenow-Enzym gegeben, vorsichtig durchmischt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit Stopp-Puffer versetzt und über eine Schleudersäule mit Bio-Gel von den nicht eingebauten Nukleotiden getrennt. Bevor die markierte DNA zu dem RNA Filter gegeben wurde, musste sie für 5 min aufgeköcht werden. Um den Einbau von Radioaktivität zu überprüfen, konnte die markierte DNA im Szintillationszähler gemessen werden: Dazu wurde 1 µl der markierten Proben gegen Vergleichsproben gemessen. Es sollten mindestens eine Aktivität von 10^8 cpm/µg DNA gemessen werden, damit eine spätere Detektion von Hybridisierungen möglich ist.

DIG-Markierung: Für die Herstellung von DIG-markierten Sonden wurde das DIG-Markierungssystem von Boehringer Mannheim verwendet. Es wurden je 50 µl PCR-Ansatz 10 ng der Template DNA mit 5 µl des PCR-DIG-Labeling Mix (enthält 1 mM Digoxigenin-11-dUTP, Boehringer Mannheim) sowie Primer und Taq-Polymerase in Standard-Konzentrationen zusammengegeben und eine Standard-PCR durchgeführt.

3.2.4.12 Southern Blot (upward-capillar-transfer)

Der Transfer von genomischer DNA aus *Plasmodium falciparum* wurde auf eine Nylonmembran durchgeführt. Dazu wurde die gDNA zunächst mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in einem 0,8%igen Agarosegel ohne EtBr aufgetrennt. Das Gel wurde nach dem Lauf in einer EtBr Lösung (0,5µg/ml) gefärbt und unter UV –Licht fotografiert. Die DNA im Gel wurde dann depuriniert (45 min, 250 mM HCl), denaturiert (45 min, 0.4N NaOH, 1 M NaCl) und neutralisiert (45 min, 1M TrisHCl pH7.4, 1,5M NaCl). Der Transfer der DNA erfolgte mit 20xSSC als Transferlösung. Der Blot wurde wie unter *Northern Blot* beschrieben aufgebaut. Nach dem mind. 18 stündigen Transfer wurde der Nylon-Filter in 6xSSC gewaschen, getrocknet und die DNA kreuz-vernetzt. Die Membran wurde anschließend für 30 min bei 42 °C in Southern Hyb. Puffer prähybridisiert, danach für 16 Stunden bei 42 °C mit der DIG-markierten PCR-Sonde hybridisiert. Das Waschen des Filters erfolgte zunächst unter nicht-stringenten Bedingungen (2x 5min in 2x SSC/ 0,1% SDS, Raumtemperatur) und danach unter stringenteren Bedingungen (2x 15 min in 0,1x SSC, 0,1% SDS bei 42°C). Die Membran wurde anschließend für 30 min in Blockpuffer (1% *blocking reagent*, Boehringer Mannheim) inkubiert; danach für 30 min in Blockpuffer/ *anti-DIG-fab-fragments* (1:20000) geschwenkt. Nach Waschen der Membran (zweimal 15 min mit Waschpuffer) konnte die Detektion mit ECL (siehe Western Blot) durchgeführt werden.

3.2.4.13 Sequenz-spezifische Mutagenese

Die Mutagenese von Vektor DNA wurde mit dem QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach den Anleitungen des Herstellers durchgeführt. In dieser Arbeit wurde eine Markermutation in die Pf Sec7 Sequenz eingebracht. Dazu wurden die Primer *Sec7mut1BFA* 5'cat att gaa tac tga tct aca taa taa tca agt taa g-3' und *Sec7mut2BFA* 5'ctt aac ttg att att atg tag atc agt att caa tat g-3' eingesetzt, die die *mismatch*-Mutation beinhalten. Mittels Pfu Turbo DNA Polymerase wurde das gesamte Plasmid (pCRII-TOPO/Pf Sec7^{BFA}) „rundherum“ synthetisiert und die Primer inkorporiert. Das resultierende (offene) Plasmid besteht aus nicht-methylierter DNA. Die parentale, nicht mutierte Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von DpnI abgedaut und ein Teil des gesamten Ansatzes in *E. coli* transformiert. In den Bakterien konnte die offene, mutierte dsDNA repariert werden. Aus den Transformations-Kolonien wurde die Plasmid DNA präpariert und sequenziert.

3.2.4.14 Präparation von Gesamt RNA aus *Plasmodium falciparum*

Zunächst wurden infizierte Erythrozyten (Trophozoitenstadium) mittels Gelafundin angereichert und mit PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Saponinlyse der Zellen und anschließend die Präparation der Gesamt RNA mittels TRI Reagent (Sigma). Dabei wurde die Extraktion der Gesamt RNA nach den Angaben des Herstellers des TRI Reagents durchgeführt. Es wurden allerdings aufgrund der geringen Größe von *Plasmodium falciparum* mehr Zellen eingesetzt, als der Hersteller veranschlagt (ca. Faktor 1000).

3.2.4.15 Aufreinigung von mRNA aus Gesamt RNA

Um aus Gesamt-RNA die mRNA aufzureinigen, wurde das PolyATtract mRNA Isolation System (Promega) verwendet. Hierbei wurde die mRNA aus *Plasmodium falciparum* Gesamt-RNA laut Anweisung des Herstellers zum Produkt durchgeführt.

3.2.4.16 Präparation von genomischer DNA aus *Plasmodium falciparum*

Für die Isolation von genomischer DNA wurden Trophozoiten-infizierte Zellen zunächst angereichert (Gelafundin) und genauso wie für die Gesamt-RNA Präparation mit Saponin behandelt. Anschließend wurden die Parasiten (10^9) bei 1300g für 10 min sedimentiert, in 2 ml Lysis-Puffer resuspendiert und über Nacht bei 50°C unter behutsamen Schütteln inkubiert. Die genomische DNA wurde am nächsten Morgen Phenol-Chloroform behandelt und mit 0,6 Volumen Isopropanol / 0,1 M NaAc gefällt. Danach wurde die DNA mit 75% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 10 mM Tris HCl pH 8, 0,1 mM EDTA gelöst.

3.2.4.17 Elektrophorese von RNA im Formaldehydgel

Nach der Gesamt RNA Präparation aus *Plasmodium falciparum* wurden die präparierte Gesamt-RNA Menge photometrisch bestimmt. Es sollten 30 µg Gesamt RNA je Spur auf das Gel aufgetragen werden. Für ein 1%iges Formaldehyd-Agarose Gel (150 ml Volumen) wurden zunächst 1,5 g Agarose in 93,75 ml und bis 60 °C abgekühlt. Anschließend werden 26,79 ml 5x Formaldehyd-Gelpuffer und 58,9 ml Formaldehyd zugegeben, gemischt und unter dem Laborabzug in die Gelkammer gegossen. Die RNA (4,5 µl) wurde vor dem Auftrag auf das Gel mit 2 µl 5x Formaldehyd-Gelpuffer, 3,5 ml Formaldehyd und 10 µl Formamid versetzt und 15 min bei 65 °C inkubiert. Danach wurden 2 µl RNA-Ladepuffer zugegeben und die Proben und ein RNA-Größenstandard aufgetragen. Das Gel wurde in 1x Formaldehyd-Gelpuffer mit 3-4 V/cm unter dem Laborabzug laufen gelassen.

3.2.4.18 Northern Blot

Um das Formaldehyd vor dem Blotten wieder aus dem Gel zu entfernen, wurde es 3 x 5 min in DEPC-Wasser inkubiert. Anschließend wurde das Gel für 20 min in 0,05 M NaOH geschwenkt, um eine partielle Hydrolyse der RNA zu erwirken, danach wurde es in DEPC-Wasser äquilibriert und für 45 min in 20x SSC gelegt. Der Blot-Aufbau (*upward-blot*) verlief wie folgt: Das Gel wird auf ein Whatman-Papier (getränkt in 20x SSC) gelegt, welches auf einer Glasplatte liegt und mit einem Pufferreservoir (20x SSC) verbunden ist. Auf das Gel wird die Nylon-Membran (getränkt in 20x SSC), zwei Whatman Papiere (getränkt in 2x SSC) und ein Stapel Papierhandtücher gelegt. Zum Abschluß kommt auf den Stapel eine Glasplatte, auf die ein Gewicht (ca. 500g) gestellt wird. Der Transfer der RNA sollte mindestens 6 Stunden oder über Nacht erfolgen. Vor dem Abbau des *upard-blots* wurden die Taschen auf der Membran markiert, die Membran getrocknet und für 5 min in 6 x SSC gewaschen. Der Filter wurde nach dem Waschen erneut getrocknet und anschließend die RNA auf dem Filter mittels UV-Bestrahlung *crosslinked*. Vor der eigentlichen Hybridisierung mit einer markierten DNA-Sonde wurde die Membran für 1 Stunde bei 68°C mit OHS prähybridisiert und danach mit der entsprechenden radioaktiv markierten DNA-Sonde (5-25 ng/ml) über Nacht bei 68 °C hybridisiert. Anschließend wurde der Filter zweimal für 20 min mit 2x SSC/ 0,1% SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Danach konnte ein Film aufgelegt werden und die Autoradiographie entwickelt werden. Falls noch zu viele Hintergrundbanden dabei auftraten, konnte die Membran erneut zweimal 20 min mit 0,5x SSC/ 0,1% SDS gewaschen und ein neuer Film aufgelegt werden.

3.2.5 Proteinbiochemische Methoden

3.2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Lämmli, 1970)

Die Gelelektrophorese ermöglicht eine Auftrennung von Proteingemischen in einer Gelmatrix nach ihrer Größe. Die Proteine werden durch SDS denaturiert und binden SDS in konstantem Ladungs- zu Masseverhältnis (1,4 g SDS/ g Protein in 1% SDS Lösungen). Die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe wandern im elektrischen Feld zum Pluspol; während dieser Wanderung wirkt die Polyacrylamidgelmatrix als Molekularsieb und trennt die Komplexe nach ihrer Größe.

Die Gelelektrophoresen wurden in dieser Arbeit mit Gelkammern, die unterschiedlich lange Trennstrecken aufweisen, durchgeführt. Die Glasplatten der Kammern wurden mit Extran, Aqua dest. und Ethanol gereinigt, getrocknet, die Abstandshalter zwischen die Platten gelegt und mit Klammern fixiert. In den Raum zwischen den Glasplatten wurde zuerst das Trenngel gefüllt und mit Aqua dest. überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Sammelgel darübergeschichtet und mit Hilfe eines in das Sammelgel geschobenen Kammes Taschen für die Beladung mit Proteinlösungen ausgespart.

Das vollständig auspolymerisierte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingespannt und beide Pole des Geles mit Lämmli-Laufpuffer überschichtet. Nachdem der Kamm aus dem Sammelgel entfernt worden ist, konnten die mit SDS-Probenpuffer versetzten und aufgekochten Proteinlösungen in die Taschen gefüllt werden. Zur Größenbestimmung der aufgetragenen Proteine wurde stets ein Größenstandard mit Proteinen bekannter Größe aufgetragen.

Ein SDS-Polyacrylamid-Gel mittlerer Größe (16x 9,5 cm) setzte sich wie folgt zusammen:

Gel \ Ingredienzen	12 % TrennG	15 % TrennG	18 % TrennG	SammelG
30% Acryamid/ 0,8% Bisacrylamid	3 ml	3,75 ml	4,5 ml	0,325 ml
Tris-HCl/ SDS pH 6,8				0,625 ml
Tris HCl/ SDS pH 8,8	1,88 ml	1,88 ml	1,88 ml	
Aqua dest.	2,63 ml	1,88 ml	1,13 ml	1,5 ml
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl	12,5 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	3 µl

Die SDS-Gele wurden standardmäßig mit 8 V/cm laufen gelassen bis die Proben bis zum Trenngel gelangten, danach wurden sie mit 15 V/cm im Trenngel aufgetrennt.

3.2.5.2 Westernimmunoblot

Der Transfer der SDS-beladenen Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte mit Hilfe einer *Semi-dry*-Blotkammer. Für einen Blot wurden 8 Whatman-Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell) in der Größe des Gels ausgeschnitten und in *Semi-Dry*-Blot-Puffer equilibriert. Das Gel wurde nach Ablösen von den Glasplatten ebenfalls kurz in *Semi-Dry*-Blot-Puffer geschwenkt. Auf die untere, als Kathode fungierende Edelstahlelektrode wurden zunächst 4 Lagen Whatman-Papier gelegt, darauf das Gel geschichtet; darauf die Nitrocellulosemembran platziert und schließlich mit vier weiteren Whatman-Papieren überschichtet. Um eine vollständige Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran zu gewährleisten, wurden alle Luftblasen durch Abrollen einer Glaspipette auf dem Stapel entfernt und eine Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für mindestens 45 min angelegt.

3.2.5.3 Proteinfärbung auf dem Blot

Die transferierten Proteine können auf dem Blot mit Ponceaurot angefärbt werden. Der Blot wird dazu 1-2 min mit Ponceaurotfärbelösung inkubiert und danach der überschüssige Farbstoff mit Wasser gewaschen, bis Bandenmuster zu erkennen waren.

3.2.5.4 Immunfärbung

Die auf die Membran transferierten Antigene reagieren mit spezifischen Antikörpern (AK). Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran wurden die Blots zunächst 1 h mit Blocklösung (5% w/v Milchpulver in PBS) inkubiert, mit PBS 3x 10 min gewaschen, bevor der Blot mit Erst-AK für mindestens 1 h bei RT inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen mit PBS (3x 10 min) wurde der Blot mit Enzym-gekoppelten Zweitantikörper für mindestens 2 h inkubiert. Nach erneutem Waschen wie zuvor konnten mit Hilfe der enzymatischen Markierung des Zweitantikörpers spezifische Bindungen des Erstantikörpers an Antigene sichtbar gemacht werden. Bei Verwendung von AP-konjugiertem Zweit-AK wurden die Antigene auf dem Blot durch Schwenken der Membran in AP-Entwicklerlösung detektiert und waren als blaurote Banden erkennbar. Bei Einsatz von HRP-konjugiertem Zweit-AK wurde der Blot nach den Waschsritten mit chemilumineszierendem „ECL“ bedeckt, der Blot zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und überschüssiges Substrat

mit einem Papiertuch weggewischt. In der Dunkelkammer wurde anschließend ein Film aufgelegt und nach 15 sec, 1 min, 5 min Exposition entwickelt.

3.2.5.5 Proteinanfärbung in SDS-Polyacrylamidgelen

Um Proteinbanden im Gel sichtbar zu machen, wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel angefärbt.

Coomassie-Färbung

Die aufgetrennten Proteine im SDS-Gel werden gleichzeitig durch die Essigsäure im Gel fixiert und durch die Bindung mit dem blauen Coomassie-Farbstoff angefärbt.

Die Färbung der Gele erfolgte zumeist über Nacht. Überschüssige Farbe wurde am darauffolgenden Tag durch mehrstündiges Entfärben in Entfärbelösung aus dem Gel gewaschen, wobei die Proteinbanden blau gefärbt bleiben. Mit der Coomassie-Färbung sind 200 ng Protein pro Bande gerade noch detektierbar. Coomassie-gefärbte Gele können auf Whatman-Papier oder zwischen 2 Zellophanfolien getrocknet und aufbewahrt werden, wobei die Bandenmuster erhalten bleiben.

Kupfersulfat-Färbung

In Kupfersulfatfärbelösung (0,3 M CuSO_4) können Proteinbanden schnell sichtbar gemacht werden. Das Gel wird 2-3 min in der Färbelösung geschwenkt, wobei sich der Hintergrund dunkel anfärbt. Die hell ausgesparten Proteinbanden sind gegen einen schwarzen Hintergrund gut sichtbar. Das Gel kann schnell durch kurzes Schwenken in Wasser wieder entfärbt werden.

3.2.5.6 Dialyse von Proteinlösungen

Vor der Verwendung der Proteinlösungen für Immunisierungen mußten beispielsweise Harnstoff oder Glutathion aus dem Puffer entfernt werden. Die Proteinlösungen wurden in Dialyseschläuche gefüllt, welche zuvor 10 min in Aqua dest. vorinkubiert wurden. Die befüllten Schläuche wurden an beiden Enden mit Dialyseklammern dicht verschlossen und in eine großes Gefäß mit ca.5 Liter PBS soweit untergetaucht, daß die gesamte darin enthaltene Proteinlösung im Puffer war. Auf einem Magnetrührer wurden die Proteinlösungen dann ein bis zwei Tage bei 4 °C gegen PBS unter leichtem Rühren dialysiert. Harnstoff/Glutathion konnte in dieser Zeit durch den Dialyseschlauch mit dem Konzentrationsgefälle aus der Proteinlösung austreten, während die Proteine im Schlauch zurückgehalten wurden. Nach 12 Stunden wurde der PBS-Puffer jeweils gegen frischen Puffer ausgewechselt.

3.2.5.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen durch den Bradford-Test

Die Konzentration einer Proteinlösung kann photometrisch mit Hilfe des Bradford-Reagenz und Vergleichslösungen bekannter Konzentrationen ermittelt werden. Als Vergleichsstandard wurde BSA in Konzentrationen von 50, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000 µg/ml eingesetzt. Je 10 µl der einzelnen Proteinlösungen bekannter und unbekannter Konzentration wurden mit je 200 µl 1x Bradford-Reagenz gemischt. Der im Bradford-Reagenz enthaltene Farbstoff Coomassie brilliant blue G-250 bindet an in der Lösung enthaltene Proteine und verschiebt das Absorptionsmaximum der Farbe zu 595 nm. Die Absorption bei 595 nm wurde als Maß für die Proteinkonzentration gemessen und eine Standard-Eichgerade mit den Proteinlösungen bekannter Konzentration erstellt.

3.2.5.8 Aufreinigung von GST-markierten Proteinen mittels Affinitätschromatografie

Die Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-markierten Proteinen basiert auf der Interaktion zwischen dem aminoterminalen GST-Anteil (*Schistosoma japonicum*) des aufzureinigenden Proteins und der GST-Sepharose (Amersham Pharmacia). Die hohe Affinität der Matrix zu Proteinen mit GST-Anteil läßt eine selektive Reinigung der GST-markierten Proteine zu.

Die in dieser Arbeit aufgereinigten markierten Proteine wurden zunächst in Bakterienzellen (*E. coli* DH5 alpha Z1, pCodon) rekombinant exprimiert. Die entsprechenden DNA-Plasmidkonstrukte wurden dazu in die kompetenten Bakterienzellen transformiert. Als Ausgangsvektor für die hergestellten Expressionsplasmide diente der pGEX 5X3 Vektor (Amersham Pharmacia). Zur Aufreinigung im größeren Maßstab wurden die jeweiligen Zellen in 500 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmedium bei 37°C geschüttelt, bis eine optische Dichte von 0,8 (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm) erreicht war. Danach wurde die Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und die Bakterienkultur für 3 bis 20 Stunden (für jeweiliges Konstrukt unterschiedlich) bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakterienzellen wurden bei 6000 rpm (Sorvall RC-5 Superspeed) für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienzellpellet konnte sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C bis zur Aufreinigung gelagert werden.

Das Zellpellet wurde in 20 ml eiskaltem PBS resuspendiert, anschließend 1 mg Lysozym je ml PBS sowie Proteinase-Inhibitor-Cocktail zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Um die Bakterienzellen vollständig aufzubrechen und die genomische DNA zu zerkleinern, wurde das Zellysate mit Ultraschall behandelt (10x 10 sec Beschallung mit 200-300 W). Die kaum noch

viskose Flüssigkeit wurde dann 20 min bei 13000 rpm in der Kühlzentrifuge zentrifugiert, um Zelltrümmer der Bakterien zu pelletieren. Anschließend wurde der Überstand durch einen 0,45 µm Sterilfilter filtriert.

Bei der in dieser Arbeit angewendeten Aufreinigungsmethode nach dem *batch*-Verfahren wurde weitgehend nach den Anleitungen des Herstellers (Amersham Pharmacia) vorgegangen.. Die kalkulierte Matrixkapazität betrug 10-12 mg je ml äquilibrierter Matrix-*beads*. Das filtrierte Lysat wurde mit 500 µl der Matrix für 30 min in einem 50 ml Falcon-Röhrchen auf dem Labor-Roller gerollt. Zum Waschen wurde das Gemisch für 5 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, mit 30 ml PBS überschichtet und 10 min auf dem Laborroller bewegt. Der Waschschrift wurde anschließend noch zweimal in gleicher Weise wiederholt. Zur Elution der gebundenen Proteine wurde ein Glutathion-haltiger Puffer verwendet. Der PBS-Puffer wurde nach dem letzten Waschschrift so gut wie möglich abgenommen und mit 1 ml Elutionspuffer (50 mM Tris HCl pH 8,0, 30 mM reduziertes Glutathion) für 10 min inkubiert. Anschließend wurde wie zuvor zentrifugiert und der Überstand abgenommen, ohne die Matrix-Partikel aufzuwirbeln.

Alle Fraktionen konnten danach durch den Bradford-Test beziehungsweise im SDS-PAGE analysiert werden.

3.2.5.9 *In-vitro* Invertase-Aktivitätstest

Hefezellen sezernieren Invertase ins extrazelluläre Milieu/Medium, die dort angebotene Saccharose oder Raffinose spalten kann und damit diese Zucker in einem ersten Schritt der Hefe als Kohlenstoffquelle verfügbar macht . Die Menge an sezernierter Invertase kann indirekt über eine chromogene Reaktion mit TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) nachgewiesen werden. Wird den Hefen beispielsweise ausschließlich Saccharose im Medium angeboten, sezernieren sie Invertase, welche Saccharose (α -Glukose(1-2) β -Fruktose) in Fruktose und Glukose spalten kann. Das Spaltprodukt Fruktose wird mittels TTC reduziert, was im basischen Milieu zu einem violetten Farbumschlag führt.

Zu testende Hefe-Flüssigkulturen wurden im jeweiligen Selektionsmedium (mit Glukose) 24 Stunden bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wurde die OD wurde bei 600 nm gemessen und alle Kulturen geschüttelt, bis 1,0 OD erreicht war. Von jeder Kultur wurde 1 ml mit 1 ml frischem Saccharosepuffer gemischt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Hefezellen abzentrifugiert (4000 rpm, 4 min) und 200 µl des Überstandes mit 800 µl 0,1 % TCC in 1M NaOH gemischt. Nach wenigen Minuten konnte ein violetter Farbumschlag unterschiedlicher Intensität beobachtet werden.

3.2.6 Generierung spezifischer Antisera aus Kaninchen

3.2.6.1 Überprüfung der Präimmunsere

Für die Immunisierung eines Kaninchen wurden zunächst den zur Auswahl stehenden Tieren Blutproben entnommen. Die Proben wurden in einem schmalen Plastikröhrchen für eine Stunde bei RT inkubiert, anschließend wurde der leicht geronnene Blutkuchen mit einem dünnen Spatel von der Gefäßwand gelöst und die Probe mehrere Stunden bis über Nacht bei 4 °C gelagert. In dieser Zeit bildete sich ein fester Blutkuchen sowie darüber eine Flüssigphase, das Blutserum. Die Blutseren wurden im Western Blot Verfahren als Erstantikörperlösungen gegen Gesamtlysate von mit *P. falciparum*-infizierten sowie nicht infizierten Erythrozyten auf Kreuzreaktionen gegen *P. falciparum*-Antigene getestet. Für die Immunisierung mit dem rekombinant hergestellten Sec7 Protein wurde ein Kaninchen ausgewählt, bei welchem im Western Blot Verfahren keine beziehungsweise geringe Kreuzreaktivität des Präimmunsere mit *P. falciparum*-Proteinen nachgewiesen werden konnte.

3.2.6.2 Immunisierung

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper wurden rekombinant in *E. coli* exprimierte Proteine verwendet. Um die gewünschten Proteine möglichst rein zu erhalten wurden sie mit GST-Markierungen versehen und über eine GST-Sepharose-Matrix aufgereinigt.

Dem ausgewählten Kaninchen Nr. 568 wurden am Tag 0, 6, 9, 39, 54 nach jeweils 140 µg des aufgereinigten Proteins zusammen mit 700 µg Adjuvans (Pierce) intramuskulär injiziert. Die Immunsere wurden ab Tag 54 auf ihre Reaktivität gegenüber dem Antigen GST-PfSec7 sowie nicht infizierten und *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten getestet im Western Blot Verfahren getestet. Dafür wurden jeweils Serumverdünnungen von 1:2000, 1:1000, 1:500 und 1:100 eingesetzt.

4. Ergebnisse

4.1 Gbp130 - ein sezerniertes Parasitenprotein mit ungewöhnlicher Signalsequenz?

4.1.1 Analyse des genomischen Aufbaus einiger sezernerter Parasitenproteine

Einige Parasitenproteine, die über die PVM hinaus in die Wirtszelle transportiert werden, besitzen interne hydrophobe Regionen, die als putative Signale für ihre Translokation über ER-Membranen dienen könnten. Diese hydrophoben Regionen sind folgendermaßen definiert: Die Länge dieser Bereiche liegt zwischen 13 und 36 Aminosäuren, die einen hohen Anteil der Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin sowie kleine Aminosäuren enthalten.

	Exon 1	Intron	Exon 2	Hydr. R.
GBP 130 chr.10	1 51 63	1	64 67	824 51-67
KAHRP chr.2	1 11 34	1	38	654 11-34
EMP 3 chr.2	1 11 37	1	39	2441 11-39
Rifin chr.1	2 18	1	27	332 2-27
RESA chr.1	1 35 65	1	71	760 35-71
MESA chr.5	1 34 50	1	62	1526 34-62
	1 65 92 184	0		184 66-92
	1 2718	1	TM	3120 /
			EMP 1 chr.11	

Abbildung 9: Eine Vielzahl exportierter Parasitenproteine weist eine **interne hydrophobe Region** auf, die 11 bis 92 Aminosäuren (Zahlen stellen die Aminosäure-Anzahl dar) vom N-Terminus des Proteins entfernt liegen (GBP, KAHRP, EMP3, RESA, MESA, 41-2) und 13-36 Aminosäuren lang sind. Das knob-Protein EMP1 besitzt keine N-terminale hydrophobe Region. Die Informationen zur Darstellung der Proteine wurden aus den Daten des Plasmodium falciparum Genomprojekts (www.plasmodb.org) bezogen. Das einzige Intron dieser Gene (soweit vorhanden) liegt entweder innerhalb (EMP3, RESA, MESA) der hydrophoben Region oder direkt dahinter (KAHRP). Das Intron von PfEMP1 liegt C-terminal (nicht dargestellt).

Diese Bereiche werden von den meisten vielen *in silico* Vorhersage-Algorithmen als Transmembrandomänen eingestuft. In Abbildung 9 wird einerseits die Lage dieser potentiellen topogenen Signale einiger solcher Proteine, als auch die Position des jeweiligen Introns in dem entsprechenden Gen gezeigt. In der Darstellung sind die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Proteine bis zum Start der hydrophoben Regionen bzw. bis zum Beginn des Introns angegeben.

Der *splicing* Prozess zum „Herausschneiden“ der Intronsequenz könnte theoretisch nicht vorhersagbare *Splicing*-Produkte hervorbringen, deren N-Terminus möglicherweise eine Sequenz für ein hydrophobes Signal besitzt, das aus der genomischen Sequenz nicht erkennbar ist. Die Analyse der Sequenz der mRNA der genannten Gene könnte Aufschluss über mögliche alternative *splicing* Vorgänge und die Organisationsstruktur der Transkripte nach dem *splicing* Vorgang geben.

4.1.2 Analyse des *gbp 130* Transkripts

Gbp130 wird in infizierten Erythrozyten in die Wirtszelle sezerniert. Die Analyse der genomischen Sequenz des *Gbp130* Gens bzw. der abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigt eine 51-67 Aminosäuren vom N-Terminus entfernte hydrophobe Region, welche auf genomischer Ebene von einem Intron „unterbrochen“ ist. In Position 31 (gezählt vom N-Terminus) existiert ein zweites Methionin, welches möglicherweise durch alternative Spleiß-Vorgänge den Translationsstartpunkt darstellen könnte. Die hydrophobe Region läge in diesem Fall lediglich 20 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt.



Abbildung 10: Schematische Darstellung des *gbp130* Gens. M1, erstes Methionin an Nukleotid-Position 1-3; M31, zweites Methionin an Nukleotid-Position 93-96; **hydrophobe Region**, Nukleotide 153-380 (AA 51-67); Intron, 179 bp (AA 63/64)

Mittels reverser Transkription sollte eine cDNA der reifen, gespleißten mRNA hergestellt werden, welche auch die N-terminale, untranslatierte Sequenz des GBP-Transkripts mit einschließt. Um das unbekanntes 5' Ende des Transkripts amplifizieren zu können, musste ein Adapterprimer an das 5' Ende der Gbp-cDNA gekoppelt werden, über den es anschließend möglich war, den unbekanntes Sequenzbereich zu amplifizieren (siehe

Abbildung 11). Daher wurde eine RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends*) durchgeführt, in deren Verlauf in einem ersten Schritt die mRNA zu einer cDNA umgeschrieben wurde und gleichzeitig das mRNA/cDNA-5'Ende mit einem Adapterprimer (smart II) versehen wurde (siehe nachfolgende Abbildung 11).

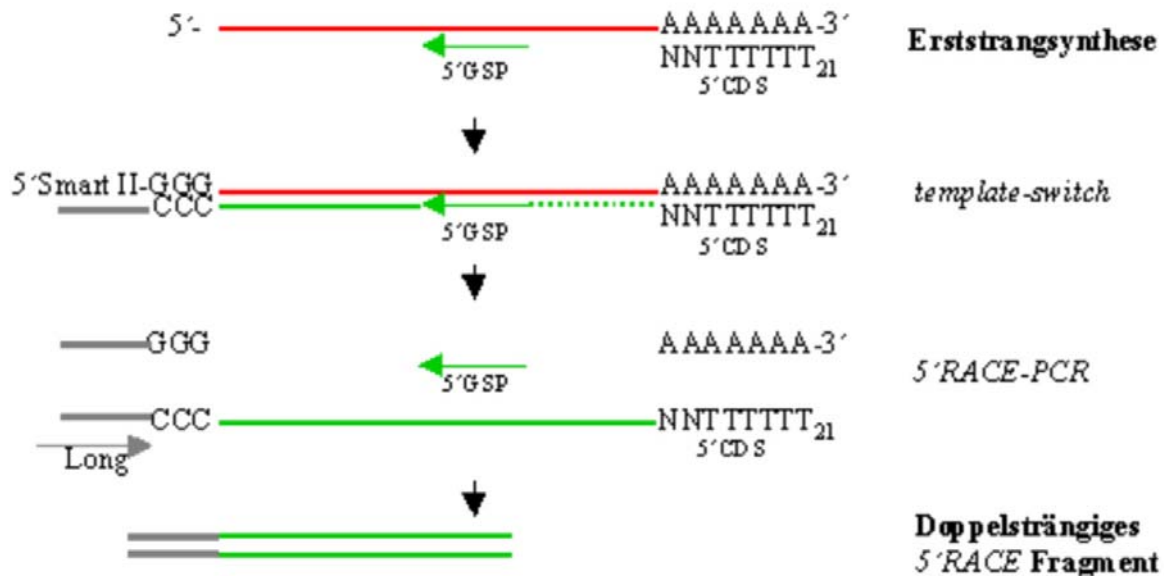


Abbildung 11: Die Erststrangsynthese erfolgt mit einem oligoT-Primer (5'CDS) oder einem genspezifischen Primer (GSP) mit mRNA als template (rot). Gleichzeitig mit der Erststrangsynthese erfolgt die Zugabe des Smart II Primers, der an die von der reversen Transkriptase zusätzlich an den cDNA-Erststrang (grün) angehängten Cytosine hybridisieren kann. Nachfolgend verwendet die reverse Transkriptase auch DNA als template (template switching) und synthetisiert eine cDNA bis zum Ende des Smart II Adapterprimers. Mittels des 5'Long Primers (einer verlängerten Version des Smart II Primers) und des GSPs kann ein spezifisches, doppelsträngiges RACE-PCR Produkt synthetisiert werden.

Aus der RACE-PCR sollte theoretisch ein DNA Fragment hervorgehen, das am 5'Ende den Adapterprimer SmartII trägt und am 3'Ende entweder mit dem genspezifischen Primer (GSP) oder dem polyT-Primer (5'CDS) endet. In dieser Arbeit wurde die Erststrangsynthese der *gbp130* cDNA mit dem genspezifischen Primer GBP-RNA-3' durchgeführt. In der anschließenden RACE-PCR wurde der 5'Long Primer, welcher eine verlängerte Variante de SmartII Primers darstellt, zusammen mit dem GBP-RNA-3' Primer eingesetzt. Dabei sind Amplifikationsprodukte zu erwarten, deren Größe sich jeweils nach der Länge der zugrundeliegenden Erststrangprodukte richtet.

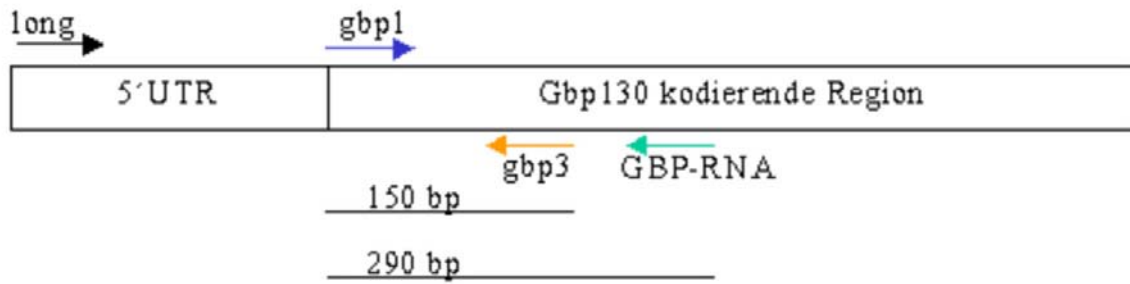


Abbildung 12: Schema der erwarteten PCR Produktlängen mit verschiedenen *gbp*-Primern bei Einsatz von *cDNA* als *template DNA* (ohne 179 bp Intron)

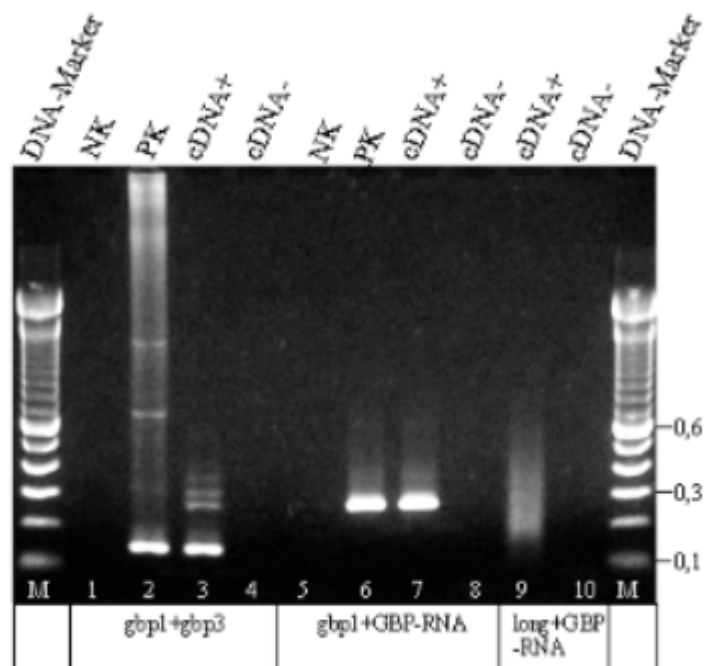


Abbildung 13: 1,2%iges Agarosegel. Es wurde für die Kontrollprimerkombinationen (*gbp1+gbp3* und *gbp1+GBP-RNA*) jeweils das Plasmid *pKS GBP EI/EII* als Positivkontrolle (PK) eingesetzt. Dieses Plasmid enthält die *gbp* Exons 1 (komplett) und 2 teilweise (383 bp). Die Negativkontrolle NK enthält keine *template-DNA*. Bei der reversen Transkription wurde jeweils ein Ansatz ohne Zugabe von reverser Transkriptase durchgeführt (*cDNA-*), um mögliche Kontaminationen mit *gDNA* in der folgenden RACE-PCR aufzuzeigen. Die Produkte der RACE-PCR (Spur 9) stellten sich als „Schmier“ im Gel dar.

Mittels Einsatz von zwei genspezifischen Primern (Primer-Kombination *gbp1/gbp3* sowie der Kombination *gbp1/GBP-RNA*) konnte nachgewiesen werden, dass reife, gespleißte mRNA als *template* in die PCR eingesetzt wurde. Die hierbei entstandenen Hauptbanden in Spur 3 und 7 haben die gleiche Größe wie die Produkte der Kontrollreaktion mit Vektor *pKS GBP EI/EII* (Spur 2 und 6), welcher *gbp*-kodierende Sequenz, jedoch keine Intronsequenz enthält. Es entstanden mit den Primern *gbp1* und *gbp3* (Spur 2 und 3) außerdem einige

unspezifische Nebenbanden, die möglicherweise auf die niedrige Annealing-Temperatur (50°C) zurückzuführen sind. Die RACE-PCR Produkte stellten sich im Agarosegel als „Schmier“ dar (Spur 9). Über Variationen der RACE-PCR Bedingungen konnte keine Spezifizierung der RACE-PCR Produkte erzielt werden.

Die RACE-PCR Produkte wurden ohne weitere Aufarbeitung in den pCR2.1-TOPO Vektor ligiert, in Elektroporations-kompetente *E.coli* transformiert und die Transformanten in einem Kolonie-Screening analysiert. Dazu wurden 99 Klone und eine Positivkontrolle auf einer LB-Agar Platte ausgestrichen, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und die in den jeweiligen Kolonien vorliegenden Plasmide mittels Sondenhybridisierung analysiert. Als Sonde wurde hierzu ein 290 bp langes DIG-markiertes *Gbp*-Fragment (siehe Abbildung 12) eingesetzt.

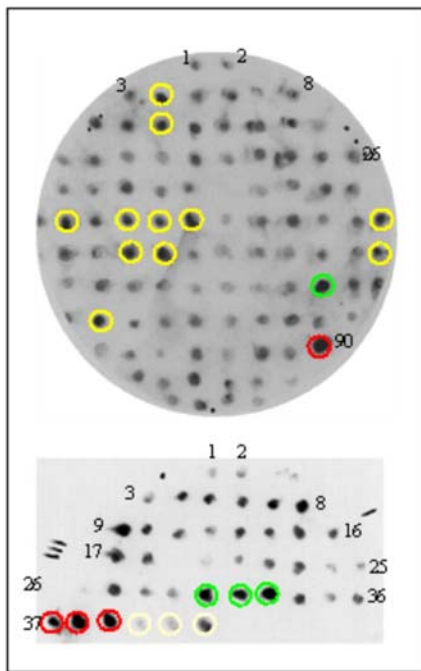


Abbildung 14: Dargestellt sind Röntgenfilme der Filter, welche von den LB-Agarplatten abgezogen und mit anti-DIG-Antikörpern (*fab*-fragments, Boehringer Mannheim, 1:20000) chemolumineszent detektiert wurden. Auf dem oberen runden Filter sind Kolonien (1-100) von oben links jeweils in Reihen bis unten rechts durchnummeriert. Die Kolonie Nr. 90 ist eine Positivkontrolle eines Plasmids (*pKS GBP EI/EII*, rot eingekreist), welches einen 5' Anteil der *Gbp130* kodierenden Sequenz enthält. Der untere Filter zeigt einen Re-Screen, welcher von den eingekreisten Kolonien (Nrn. 4, 11, 38, 40, 41, 42, 49, 52, 53, 60, 70, 74) des ersten Screens gemacht wurde (jeweils dreimal ausgestrichen). Die Positivkontrollen sind auch hier rot umkreist, während die Negativkontrolle (*pCR2.1-TOPO* Vektor ohne Insert) mit weißen Kreisen gekennzeichnet ist. Mit grün gekennzeichnet ist Kolonie Nr. 70, welche sowohl im ersten Screen als auch im Rescreen die stärksten Signale aufwies und weiter analysiert wurde.

Mittels des Re-Screens konnte ein Klon identifiziert werden, der mit der Positivkontrolle vergleichbar starke Signale aufwies (Klon Nr. 70). Die Plasmid-DNA *pCR2.1/Gbp-RACE* aus Klon Nr. 70 wurden mittels Plasmid-Mini Präparation (Macherey-Nagel) aufgereinigt und die inserierte RACE-PCR Produkt zweimal sequenziert. Diese Sequenzanalyse ergab die in Abbildung 15 dargestellte Sequenz, welche identisch zur genomischen Sequenz mit Ausnahme der Intronsequenz ist. Die Sequenz wurde soweit dargestellt, wie die Sequenzierungsergebnisse eindeutig auswertbar waren (204 bp stromaufwärts der kodierenden Region). Die Intronsequenz war in dem hier analysierten Klon

nicht enthalten. Beide ATG-Start-Kodons sind im Transkript vorhanden. Es konnten aus diesem Klon keine „zusätzlichen“ Sequenzen identifiziert werden, welche durch alternative *splicing*-Prozesse im Transkript hätten vorliegen können. Dies schließt allerdings die Möglichkeit nicht völlig aus, dass die Analyse weiterer Klone andere *splicing*-Varianten gezeigt hätte. Der wahrscheinliche Transkriptionsstart des *Gbp130* Gens liegt noch mehrere hundert Basenpaare stromaufwärts (Lanzer *et al.*, 1993).

gbp130	-219	TATATGTAATTTATGTAAAAACAAAAAAATTAAA	-185
gbpRace	-204	-----TAAAAACAAAAAAATTAAA	-185
gbp130	-184	TAAAAAATACTTATTCTTT	-150
gbpRace	-184	TAAAAAATACTTATTCTTT	-150
gbp130	-149	ATATATATATTTAAAAAAGAGAAAA	-115
gbpRace	-149	ATATATATATTTAAAAAAGAGAAAA	-115
gbp130	-114	GAAAATATATTATATATATTATATATATTATATAC	-80
gbpRace	-114	GAAAATATATTATATATATTATATATATTATATAC	-80
gbp130	-79	ATATAATATTTGTATTCATAATTATTTTAGAAACA	-45
gbpRace	-79	ATATAATATTTGTATTCATAATTATTTTAGAAACA	-45
gbp130	-44	CCAAAATTAATATATATATAAATATATTTTATT	-10
gbpRace	-44	CCAAAATTAATATATATATAAATATATTTTATT	-10
gbp130	-9	TGTGTAAATATGCGACTTTCTAAAGTATCTGATAT	26
gbpRace	-9	TGTGTAAATATGCGACTTTCTAAAGTATCTGATAT	26
gbp130	27	TAAATCTACAGGAGTTTCGAATTATAAAAAATTTCA	61
gbpRace	27	TAAATCTACAGGAGTTTCGAATTATAAAAAATTTCA	61
gbp130	62	ATTCGAAAAATTCCTCTAAGTATTCTTTAATGGAA	96
gbpRace	62	ATTCGAAAAATTCCTCTAAGTATTCTTTAATGGAA	96
gbp130	97	GTCTCAAAAAAATGAAAAGAAGAATTCCTTAGG	131
gbpRace	97	GTCTCAAAAAAATGAAAAGAAGAATTCCTTAGG	131
gbp130	132	TGCCTTCCATTCCAAAAAATTTTATTAATTTTGG	166
gbpRace	132	TGCCTTCCATTCCAAAAAATTTTATTAATTTTGG	166
gbp130	167	GAATAATATATGTAGTCCTACTGCAGGCTTATATA	201
gbpRace	167	GAATAATATATGTAGTCCTACTGCAGGCTTATATA	201
gbp130	202	TGTGGAGACAAATACGAAAAGGCTGTAGATTATGG	236
gbpRace	202	TGTGGAGACAAATACGAAAAGGCTGTAGATTATGG	236
gbp130	237	TTTTAGAGAAAGCAGAATTTTAGCTGAAGGAGAAG	271
gbpRace	237	TTTTAGAGAAAGCAGAATTTTAGCTGAAGGAGAAG	271
gbp130	272	ATACGTGTGCACGAAAAGAAAAGACTACATTAAGA	306
gbpRace	272	ATACGTGTGCACG-----	284
gbp130	307	AAAAGTAAGCAGAAA	321
gbpRace	0	-----	284

Abbildung 15: Sequenz der 5' nicht-translatierten Region und kodierende Sequenz des *Gbp130* Gens (oben, ohne Intronsequenz). Im Vergleich dazu die Sequenz aus der 5'RACE-PCR (unten). Die potentiellen Translations-Start-Kodons (ATG) sind mit roten Kästen markiert. Die Primerbindensequenzen, die auch bei der Sequenzierung eingesetzt wurden, sind mit farbigen Pfeilen gekennzeichnet: *gbp1-5'*, *gbp3-3'* und *GBP-RNA-3'*. Der rote Pfeil markiert die Stelle des *herausgespleißten Introns*.

Es konnten mit der durchgeführten RACE-PCR keine längeren cDNA Produkte generiert werden, die eine weitere Sequenzanalyse stromabwärts der *Gbp130* kodierenden Region zugelassen hätte.

4.1.3 Signal Sequence Trap

Gemäß der Signal-Sequenz-Hypothese von Blobel und Dobberstein (Blobel and Dobberstein, 1975a, b Anderson *et al.*, 1983) bestimmen die physiko-chemischen Eigenschaften N-terminaler Peptidsequenzen, ob ein Protein in den sekretorischen Weg gelangt. Es existieren verschiedene experimentelle Strategien eine Aminosäure (AS)-Sequenz bezüglich ihrer Funktion als Signalpeptid zu testen. Zum Einen erlauben beispielsweise Mikrosomen-Import Studien die Überprüfung, ob eine bestimmte AS-Abfolge als Signal für die Translokation eines Proteins über die Membran dienen kann. Des Weiteren können potentielle Signalpeptide *in-vivo* in sogenannten „Signal Sequence Traps“ analysiert werden. In diesem Versuchsansatz werden putative Signalsequenzen mit Reporter-Genen fusioniert und in verschiedenen Zell-Linien exprimiert. Hierbei lassen sich heterologe Expressionssysteme anwenden und ermöglichen die Identifizierung bisher unbekannter sekretorischer Proteine verschiedener Organismen über unterschiedliche Selektionsverfahren, bei denen meist nur solche Zellen viabel sind, die das Reporterprotein sezernieren (Tashiro *et al.*, 1993; Jacobs *et al.*, 1999; Peterfy *et al.*, 2000; Galliciotti *et al.*, 2001). Es gibt verschiedene „Signal Sequence Trap“-Varianten, die unter anderem das Durchsuchen umfangreicher cDNA-Bibliotheken ermöglichen (Tashiro *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 1996). Neben diesen beiden experimentellen Ansätzen kann außerdem mittels mathematischer Algorithmen eine *in-silico* Vorhersage über potentielle Signalseptide erstellt werden (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP).

In dieser Arbeit wurde zur weiteren Analyse des GBP130 Proteins ein „Signal Sequence Trap“-Verfahren eingesetzt, das auf der Verwendung eines Invertase-defizienten Hefestamms (YTK *Suc2*-) zur Analyse putativer Signalsequenzen beruht (Klein *et al.*, 1996; Jacobs *et al.*, 1997;). Die Sekretion der Invertase ist für das Überleben der Hefe in Saccharosemedium essentiell (Kaiser and Botstein, 1986). Ein Anteil von 0,6 % der „normalen“ Invertasesekretion ermöglicht den Hefen bereits in Saccharosemedium zu wachsen (Kaiser *et al.*, 1987). Die Verwendung dieses Systems erlaubt daher auch die Identifizierung von weniger effizienten, heterologen Signalpeptiden, da der Export eines kleinen Anteils der Invertase ausreicht, um das Überleben der Hefe in Gegenwart von

Saccharose zu gewährleisten. Invertase-defiziente Hefen können auf Glukose-haltigem Medium normal wachsen.

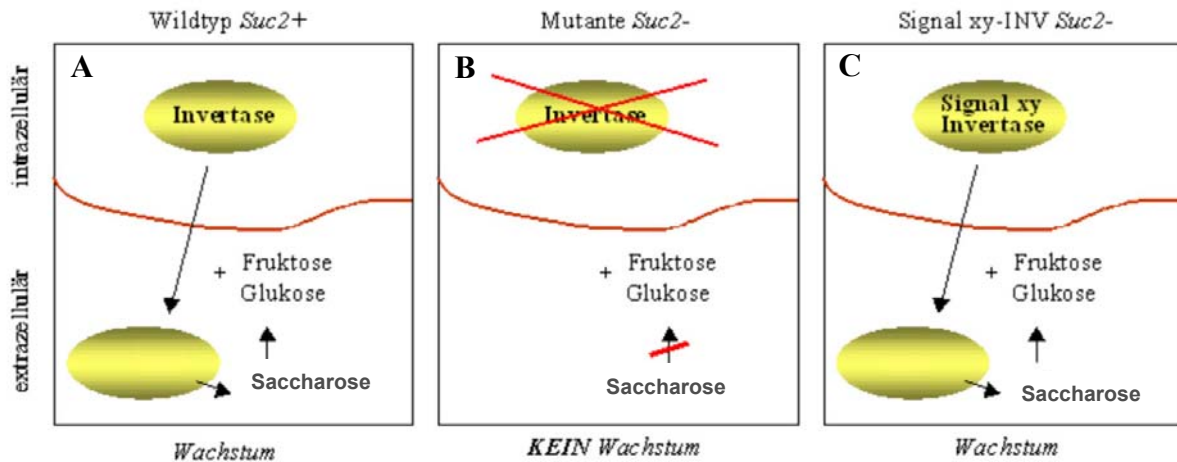
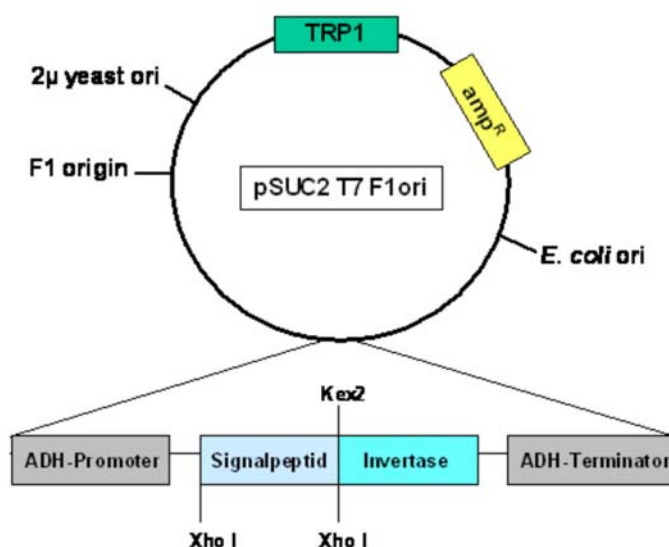


Abbildung 16: Bei Verwendung eines Wildtyp-Hefestamms (*Suc2+*) wird in Gegenwart von Saccharose Invertase sezerniert und erlaubt die Spaltung von Saccharose in Glukose und Fructose (A). Die Mutante *Suc2-* ist Invertase-defizient und kann im Gegensatz zur Wildtyp-Hefe nicht in Saccharose-Medium wachsen, da sie keine Invertase produziert (B). Transformiert man die *Suc2-* Hefe mit einem Plasmid, das sowohl das Invertase Gen, als auch eine funktionelle Signalsequenz enthält, kann das Wachstum im Saccharosemedium rekonstituiert werden (C).

Zur Analyse der potentiellen sekretorischen *leader*-Sequenz des GBP130 Proteins wurden verschiedene Plasmidkonstrukte hergestellt, die auf dem pSUC2T7F1ori-Vektor basierten (Genetics Institute, Cambridge, Massachusetts, USA).



Die zu testende sekretorische leader Sequenz liegt in frame (mittels *Xho I*-Schnittstellen) vor dem Invertase Offenen-Leserahmen. *Kex2* ist eine endogene Hefe-Protease im Golgi-Apparat, die das Signalpeptid von der Invertase spaltet (*Kex2*-Spaltstelle). Als regulatorische Einheiten liegen Alkoholdehydrogenase-(ADH)-Promotor und -Terminator vor.

Abbildung 17: Schematische Darstellung des pSUC2T7F1ori Vektors. Das Plasmid besitzt Replikationsorigins für den Bakteriophagen F1, für *E. coli* und für *S. cerevisiae*. Mittels eines Ampicillin-Resistenzmarkers ist eine Selektion in *E. coli* möglich. Der verwendete Hefestamm YTK12*Suc2-* ist Tryptophan-auxotroph. Über das Plasmid kann die Fähigkeit zur Tryptophan-Synthese rekonstituiert werden (TRP1), so dass sich transfizierte Hefen über Tryptophan-Mangelmedium selektioniert werden können. Die zu testende

Die Konstrukte wurden sequenziert und anschließend in YTK12*Suc2*⁻ Hefen transformiert. Danach wurde jeweils ein Einzelklon ausgewählt und erneut auf SD^T-Platte sowie auf YPD-Platte ausgestrichen.

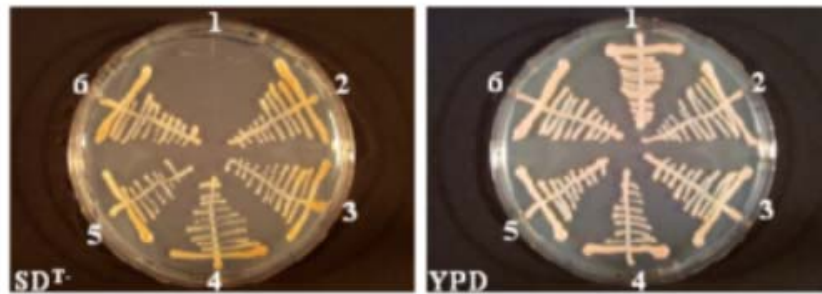


Abbildung 19: Ausstrich der transfizierten YTK*Suc2*⁻ Hefen auf SD^T und YPD Platten: YTK*Suc2*⁻ (ohne pSST) (1), YTK*Suc2*⁻ + pSST (ohne Insert) (2), YTK*Suc2*⁻ + pSST/Exp-1-SS (3), YTK*Suc2*⁻ + pSST/GBP/M1 (4), YTK*Suc2*⁻ + pSST/GBP/M2 (5) und YTK*Suc2*⁻ + pSST/GBP/M3 (6).

Die nicht-transfizierten Hefen YTK*Suc2*⁻ (Abbildung 19) wuchsen wie erwartet auf Kompletmedium (YPD), aber nicht auf Tryptophan-Mangelmedium (SD^T). Die mit pSST-Varianten transfizierten Hefen konnten auf dem Tryptophan-Mangelmedium (SD^T) ebenso schnell wachsen wie auf Kompletmedium (2-6). Sowohl das Kompletmedium, als auch das Mangelmedium enthielten Glukose. Die transfizierten Hefen wurden anschließend über eine Reihe von verschiedenen Selektionsmedien propagiert, um die Hefen zu selektionieren, die Invertase sezernieren (siehe Abbildung 20).

Nachdem die Einzelklone zunächst auf CMD-loW gewachsen waren (nicht dargestellt), wurden sie auf YPR-AA-Platten ausgestrichen. Durch die Zugabe von Antimycin A (AA) in das Medium wurde der mitochondriale Elektronen-Transport zwischen Cytochrom b und c geblockt und somit die aerobe Synthese von ATP inhibiert. Obwohl die Hefe-Platten unter normaler Atmosphäre bei 30 °C inkubiert wurden, konnten so anaerobe Bedingungen „vortäuscht“ werden. Die Aktivität des ADH-Promoters, der die Expression der Invertase und der jeweiligen *leader*-Sequenz steuert, wurde so verstärkt.

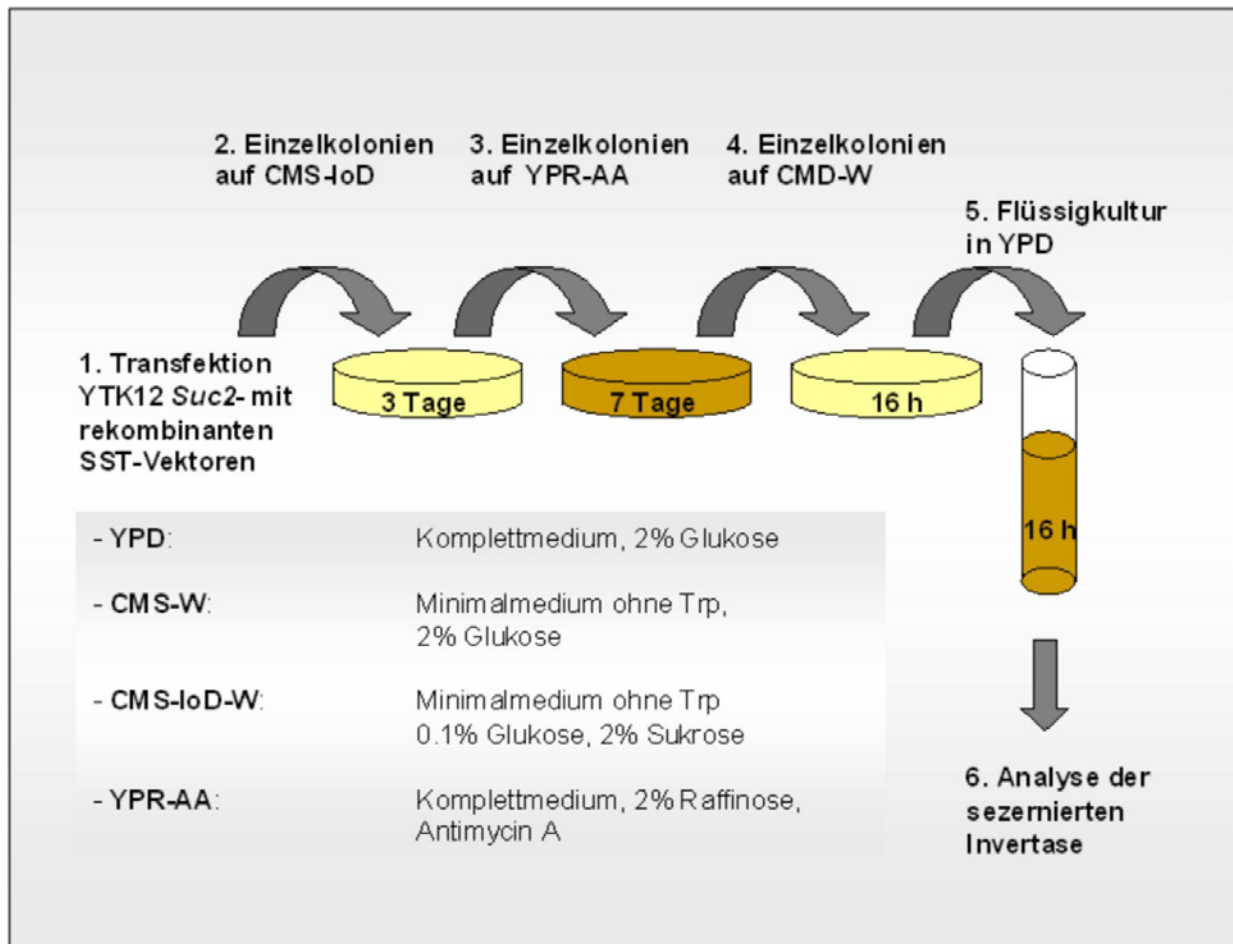


Abbildung 20: Selektionsschritte der transfizierten Hefen YTK12Suc2- bis zur Analyse der Invertase-Sekretion und Zusammensetzung der jeweiligen Medien.

Das Wachstum der Hefen auf YPR-AA ist in Abbildung 21A dargestellt. Als Positivkontrolle wurde ein YTK12Suc2- Stamm verwendet, der zuvor in dieser Art Signal-Sequenz-Screen einer *Eimeria tenella* cDNA Bank positiv getestet wurde. Dieser Klon (Signalsequenz des Oberflächenproteins Ta4 aus *E. tenella* (Brothers *et al.*, 1988) wurde freundlicherweise von C. Klotz (Berlin) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt und konnte als Positivkontrolle für die nachfolgenden Analysen eingesetzt werden.

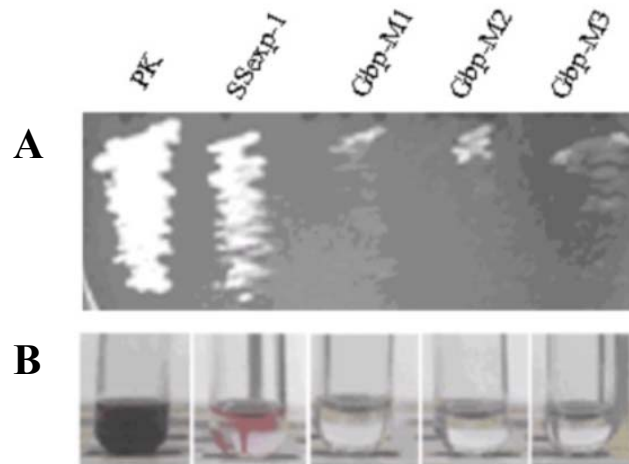


Abbildung 21: **(A)** Wachstum der transfizierten YTK12Suc2- Hefen auf YPD-AA. **(B)** in-vitro Invertase-Aktivitätstest der Hefen. Abkürzungen: PK: Positivkontrolle *E.tenella* cDNA-Hefe, SSexp-1: Signalsequenz Exp1, Gbp-M1: ungekürzter GBP-N-Terminus (AA1-67), Gbp-M2: GBP N-Terminus ab zweitem Methionin (AA31-67), Gbp-M3: GBP-hydrophobe Region (AA 51-67) + zusätzliches Methionin

Die Positivkontroll-Hefe (PK) wächst auf YPR-AA (Abbildung 21A) schnell, während die *Plasmodium falciparum*-Positiv-Kontrolle (pSST/Exp-1-SS) im Vergleich dazu deutlich langsamer wächst. Die nicht-transfizierten YTK12Suc2- Hefen und solche, die nur mit pSST (ohne insert Sequenz) transfiziert wurden, konnten nicht auf YPR-AA-Platten wachsen (nicht dargestellt). Alle drei pSST/GBP-Konstrukte (M1, M2, M3) befähigen die YTK2Suc2- Hefen nur sehr eingeschränkt auf YPR-AA zu wachsen. Die Klone von den YPR-AA-Platten wurden einem Invertase-Aktivitätstest unterzogen (Abbildung 21B). Dabei lässt sich die sezernierte Invertase-Menge über eine chromogene Reaktion mit dem Kulturüberstand darstellen und zueinander korrelieren. Die Intensität der violetten Färbung stellt die jeweilige Invertase-Menge im Überstand dar. Es ist eine intensive Färbung bei Hefen der Positivkontrolle zu erkennen, eine schwache Färbung bei der Exp-1-*Plasmodium falciparum*-Positivkontrolle und keine sichtbare Färbung bei den mit Gbp-Varianten transfizierten Hefen. Sowohl der Wachstumstest der Hefen auf YPR-AA, als auch der Invertase-Nachweis im Medium-Überstand zeigen, dass die Gbp130-leader Sequenzen nicht als Signalsequenzen in der Hefe funktionieren. Auch die Exp-1-Signalsequenz erwies sich als sehr eingeschränkt funktionsfähig; es ist nur eine sehr schwache Färbung im *in vitro* Invertase-Assay zu erkennen. Im Vergleich zu den Plasmodium-Sequenzen verleiht die *E. tenella*-cDNA-leader Sequenz den Hefen deutlich sichtbare Wachstumsfähigkeit auf YPR-AA-Platten und zeigt intensive rot/violette Färbung des Mediumüberstandes im *in vitro* Invertase-Assay.

4.1.4 Berechnung der Wahrscheinlichkeiten für Signalsequenzen

Mittels computergestützter Algorithmen lassen sich Vorhersagen darüber machen, ob eine bestimmte Aminosäuresequenz als sekretorisches *leader*-Peptid dienen könnte. In dieser Arbeit wurde für die Berechnung der dargestellten Wahrscheinlichkeiten für Signalpeptide der SignalP V1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) verwendet. Dieses Programm verwendet ein sogenanntes neuronales Netzwerk für die Erstellung der Vorhersagen, während andere Programme auf Gewichtungs-Matrizen beruhen. In der folgenden Tabelle 3 sind die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen der in pSST eingebrachten *inserts* aufgelistet.

Protein	Lokalisation in iRBC	Exprimierter Anteil (AA)	Vorhersage C S Y s	SS-Spaltungsstelle
PfEXP-1	PVM	1-26	J J J J	22 - 23
MKILSVFFLVLFIFNKESLAEKTN				
PfGBP/M1	PV / RBCC	1-67	N N J N	(9 - 10)
MRLSKVSDIKSTGVSNYKNFNSKNSKYSLMEVSKKNEKKNSLGAFHSKKILLIFGHIYVLLNAYI				
PfGBP/M2		31-67	N N J N	(0 - 1)
MEVSKKNEKKNSLGAFHSKKILLIFGHIYVLLNAYI				
PfGBP/M3		51-67	N N J J	(16 - 17)
MILLIFGHIYVLLNAYI				

Tabelle 3: Die in pSST exprimierten Anteile von *Exp-1* und *Gbp130* sind jeweils als Aminosäuresequenz dargestellt. Das SignalP V1.1 Vorhersage-Programm gibt den **C-score** (Bewertung der Wahrscheinlichkeit für eine Spaltungsstelle), den **S-score** (Bewertung der Wahrscheinlichkeit für ein Signalpeptid) und den **Y-score** (Kombination des C-score und S-score) an. Die Ergebnisse der verschiedenen scores ergeben eine Ja/Nein-Aussage über das Vorliegen einer spaltbaren sekretorischen Signalsequenz. Die Spaltungsstellen für die *Gbp*-Varianten sind in Klammern dargestellt, da ihre Wahrscheinlichkeiten wesentlich geringer waren, als für *Exp-1* (siehe auch C-score).

Das SignalP V1.1 Programm (Nielsen *et al.*, 1997) erstellt für jede Peptidsequenz einen C-Wert, der die Wahrscheinlichkeit für eine Signalpeptid-Spaltstelle angibt. Die Spaltstelle wird gemäß der sogenannten (-3,-1)-Regel bestimmt: Die Position -1 und -3 der Aminosäuresequenz des Proproteins wird gemäß dieser Regel meist von Alanin gebildet, in selteneren Fällen auch Glycin (-1) oder Valin (-3). Die Position 1 ist entsprechend die erste Aminosäure des reifen, gespaltenen Proteins. Bei einem Signalpeptid mit den entsprechenden Eigenschaften ist der C-Wert hoch für die Position +1 und niedrig für alle anderen Positionen.

Die Bewertung des Signalpeptids (*S-score*) aufgrund der physiko-chemischen Eigenschaften der N-terminalen Peptidsequenz (60-70 AA): Die Signalsequenz beinhaltet viele unpolare, hydrophobe Aminosäuren wie Leucin, Alanin, Phenylalanin und Valin. Der *S-score* sollte für ein Signalpeptid hoch für die Positionen vor der Spaltungsstelle sein, danach niedrig. Der Algorithmus, den SignalP V1.1 zugrundelegt, erstellt einen Zahlenwert für C- und *S-score*, der aufgrund der Übereinstimmungen der Aminosäureeigenschaften und -positionen im Vergleich zu bekannten Signalpeptiden gebildet wird. Diese beiden Werte werden im *Y-score* kombiniert, der einen geometrischen Durchschnitt zwischen C-Wert und dem abgeleiteten S-Wert darstellt. Bei der Gesamtbewertung eines fraglichen Peptids, ob es sich dabei um ein Signalpeptid handelt oder nicht, gehen die C-, S- und Y-Werte ein und werden in dem s-Wert kombiniert. Mit dem SignalP V1.1 Programm konnte eine graphische Darstellung der C-/S-/Y-Werte erstellt werden (siehe nachfolgende Abbildung 22).

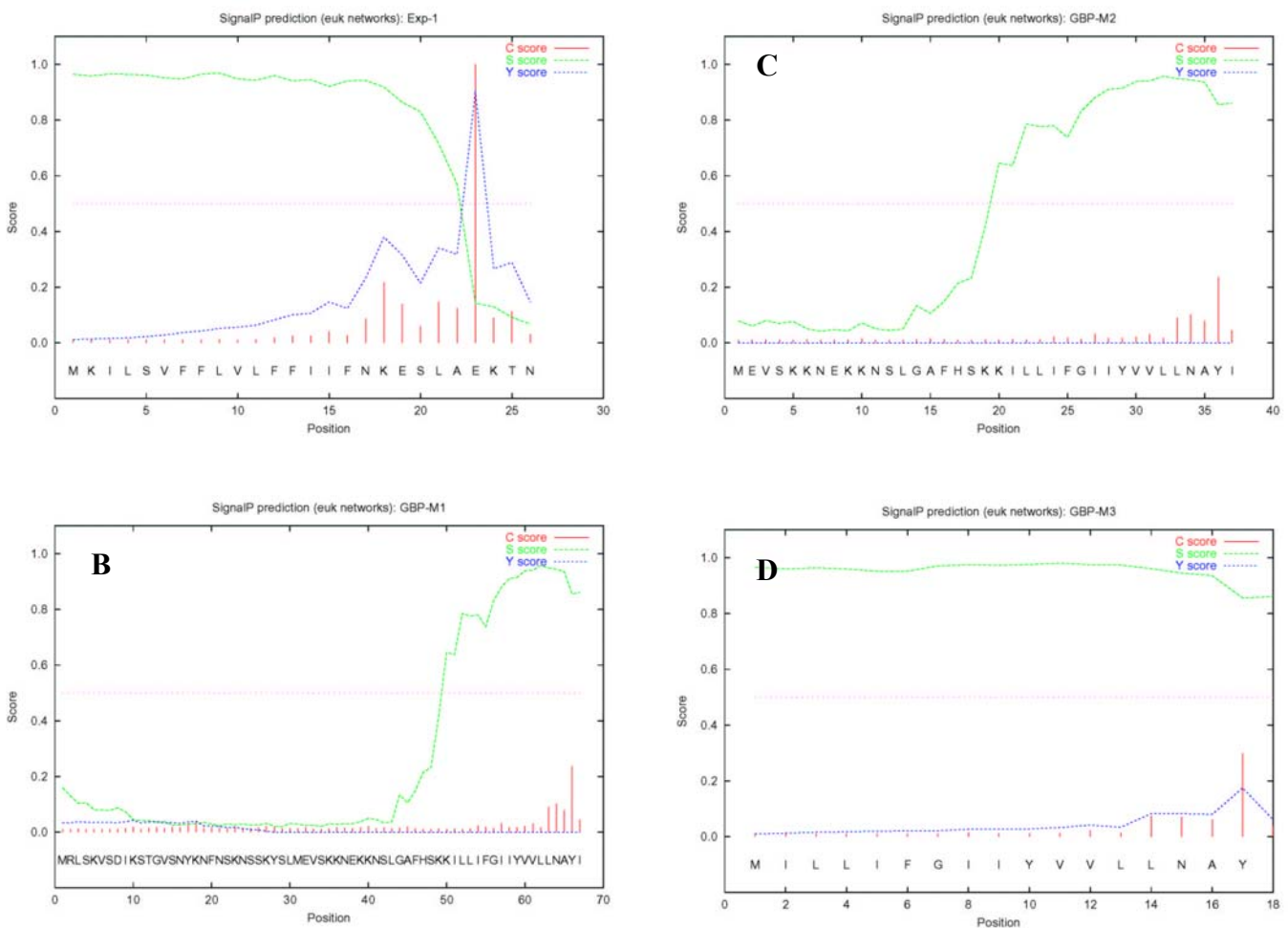


Abbildung 22: Darstellung der Signal-Sequenz-Vorhersagen mit dem SignalP V1.1 Programm: Der *C-score* ist mit roten Balken eingezeichnet, der *S-score* als grüne Kurve und der *Y-score* als blaue Kurve.

Die vom Programm für die jeweiligen C-, S- und Y-Werte festgelegten Zahlenwerte können graphisch in Kurvenverläufen dargestellt werden. Der S-Wert eines Signalpeptids liegt dabei über 0,5.

Der Exp-1 N-terminale Anteil zeigt den typischen Kurvenverlauf für eine klassische, spaltbare Signalsequenz (A). Hierbei gibt es zunächst eine N-terminale hydrophobe Region (S-score), der eine Spaltungsstelle folgt (C-score). Die Kombination dieser beiden S und C-Werte zeigt im Y-score eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine spaltbare Signalsequenz an (Wert ~0,9). Der 67 AA-lange N-terminale Anteil von GBP130 zeigt einen ab AA 51 ansteigenden S-score, der auf die dort beginnende hydrophobe Region zurückzuführen ist (B). Bei den verkürzten Gbp130-Varianten (C, D) beginnt der Anstieg des S-score entsprechend eher (ab AA21 bzw. AA1). Für die Versionen des GBP130 N-terminalen Anteils liegt der Wert für die Wahrscheinlichkeit einer Spaltstelle (C-score) zwischen 0,2 und 0,3. Die Bewertung der GBP/M1 bzw. GBP/M2-Sequenzen als Signalsequenz fällt insgesamt negativ aus. Die GBP/M3-Sequenz wird von dem verwendeten Programm insgesamt positiv als Signalsequenz bewertet, obwohl die Einzelwerte für C- und S Wert negativ und nur der Y-Wert positiv ausfallen (siehe Tabelle 3).

Fazit 1

Mittels RACE-PCR und anschließender Sequenzierung der Gbp130-cDNA konnte gezeigt werden, dass der ausgewählte Klon keine Unterschiede zur genomischen Sequenz in dem analysierten Bereich aufweist. Diese Analyse ergab keine Hinweise auf das Vorliegen eines alternativen splicing-Produktes, das eine Signalsequenz aufweisen würde, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass weitere Spleiß-Produkte existieren.

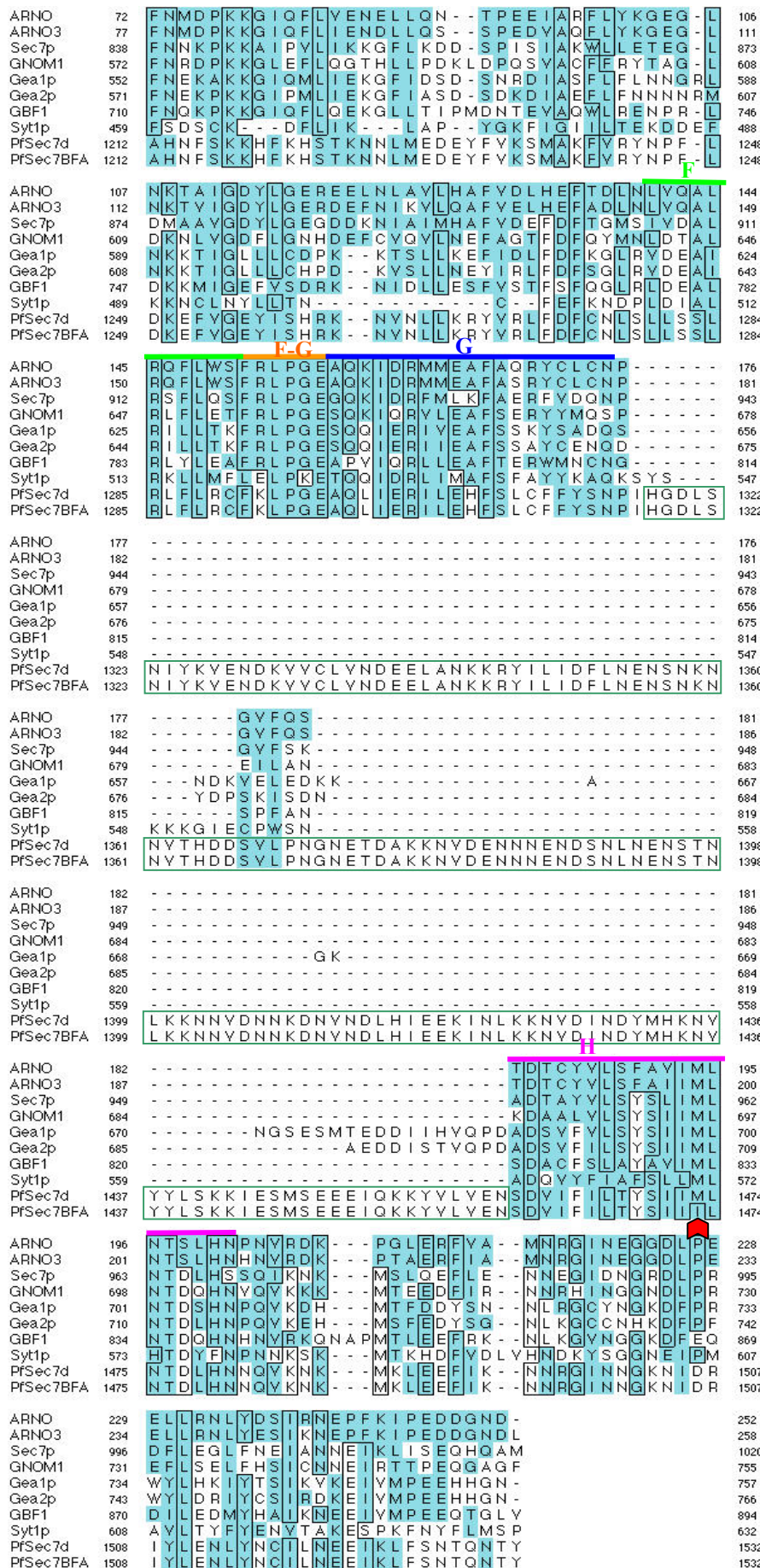
Im Signal-Sequence-Trap Verfahren in der Hefe wurden verschiedene Varianten des Gbp130-N-Terminus als „sekretorische leader“-Sequenzen getestet. Keine der Gbp130 Varianten konnte die Sekretion der Invertase aus der Hefe rekonstituieren.

Mittels eines Signalsequenz-Algorithmus wurden für verschiedene Gbp130 N-terminale-Sequenzen Vorhersagen erstellt. Dabei wurde weder der originäre N-Terminus von Gbp130 noch die um 30 Aminosäuren verkürzte Variante (GBP/M2) nicht als „sekretorische leader“ berechnet. Die bis zur hydrophoben Region verkürzte Form (GBP/M3) von dem Programm als Signalpeptid bewertet.

4.2 Der Arf-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (Arf-Gef) des Parasiten *P. falciparum*

Um neue Helferproteine, die im sekretorischen Weg involviert sind zu identifizieren, wurde ein BFA-resistenter *P. falciparum* Stamm (FCBR^{BFA}) generiert. Dieser Stamm weist innerhalb der konservierten Sec7 Domäne des ARF-GEF Gens einen Methionin-Isoleucin-Austausch auf. ARF (Adenosin-Ribosylierungs-Faktor)-GEF Proteine sind Schlüsselmoleküle für die Ausbildung von Transportvesikeln und der Hauptangriffspunkt für Brefeldin A (BFA). Der Methionin-Rest in Position 1473 ist in ARF-GEF-Proteinen verschiedener Organismen und in unterschiedlichen ARF-GEF-Proteinen eines Organismus sehr konserviert und verleiht BFA-Sensitivität (siehe Abbildungen 8 und 24). Daher bestand die Vermutung, dass diese Substitution direkt mit dem resistenten Parasiten-Phänotyp zusammenhängt. Bei der weiteren Analyse der Parasitenstämme FCBR und FCBR^{BFA} wurde ein 146 Aminosäuren langer Einschub in der Sec7 Domäne identifiziert, der im Vergleich zu anderen Organismen einzigartig für den Parasiten ist. Dadurch werden die beiden sehr konservierten Helices G und H, die notwendig für den GDT/GTP-Austausch auf dem ARF-Molekül sind, voneinander separiert.

Mittels verschiedener experimenteller Ansätze sollte zum Einen untersucht werden, ob die Punktmutation des BFA-resistenten Stammes alleine ausreichend ist, um BFA-Resistenz zu vermitteln. Zum Anderen war fraglich, ob der Einschub innerhalb der Sec7 Domäne für den Parasiten essentiell ist. Im folgenden Abschnitt wird zunächst der Aufbau der Sec7 Domäne in *P. falciparum* und anderen Organismen dargestellt. Die meisten eukaryotischen Zellen besitzen mehrere verschiedene ARF-GEF Gene; die Hefe *S. cerevisiae* beispielsweise mindestens vier. Im Gegensatz dazu besitzt *P. falciparum* höchstwahrscheinlich lediglich eine Kopie eines arf-gef Gens, was mittels Southern Blot Verfahren von Baumgartner *et al.* (2001) experimentell gezeigt wurde und laut Datenbankanalyse bestätigt wurde (www.plasmodb.org). Die Expression dieses arf-gef Gens im Parasiten wird mittels Northern Blot Verfahren analysiert und das Transkript durch RT-PCR Analyse mit anschließender Sequenzierung untersucht. Diese Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Dissertation erhoben und sind Bestandteil der Publikation (Baumgartner *et al.*, 2001). Ein Teil dieser Ergebnisse, Northern Blot und RT-PCR, wird in dieser Dissertation nachfolgend dargestellt.



4.2.1 Konserviertheit der Sec7 Domäne

Abbildung 23: Das Alignment zeigt die AA-Sequenzen der Sec7 Domänen ARNO, ARNO3, GBF1 (human); Sec7p, Gea1p, Gea2p (*S. cerevisiae*); GNOM1 (*A. thaliana*); sowie die aus der genomischen Sequenz abgeleiteten Sequenzen der Sec7 Domänen von *P. falciparum* (FCBR und FCBR^{BFA}). Homologe Bereiche der Sequenzen sind farbig unterlegt. Identische Bereiche sind in Kästen zusammengefasst. Die Position der M-I-Mutation im resistenten *P. falciparum*-Stamm ist mit einem roten Pfeil markiert. Die Insertionssequenz aus *P. falciparum* ist mit einem grünem Kasten gekennzeichnet. Die farbigen Balken über dem Alignment zeigen die am höchsten konservierten Bereiche der Helices F, G und H sowie den F-G-loop an. Die Homologie im Bereich der Sec7 Domänen der ARF-GEF Proteine Gea1p und Gea2p weisen eine kurze Einschubsequenz zwischen den Helices G und H auf.

Mittels Transfektionsexperimenten im homologen System mit *P. falciparum* sollte geklärt werden, ob einerseits die Punktmutation des resistenten Stammes BFA-sensitiven Parasiten Resistenz verleihen kann und andererseits ob die Deletion der Insertion aus der Sec7 Domäne für den Parasiten letal ist. Es werden zusätzlich Hefe-Transfektionsexperimente dargestellt, in denen untersucht wird, ob mit der parasitären Sec7 Domäne ein arf-gef-defizienter *S. cerevisiae* Stamm funktionell komplementiert werden kann und welche Auswirkungen die An- bzw. Abwesenheit der Insertionssequenz im heterologen System hat.

Der Sequenz-Vergleich einiger Sec7 Domänen von *S. cerevisiae*, *Homo sapiens*, und *Arabidopsis thaliana* mit den *P. falciparum* Sequenzen des resistenten und sensitiven Parasitenstammes insgesamt zeigt hohe Homologie der Sequenzen (Abbildung 23, blau unterlegte Aminosäuren). In den höchst konservierten Bereichen der Helices F, G und H und des F-G-loops ist eine hohe Identität der Aminosäuren festzustellen (in Kästen zusammengefasste Aminosäuren). Die Insertionssequenz von *P. falciparum* bleibt ohne vergleichbare Gegenstücke in der Hefe, im Menschen oder im Ackerschmalwand. Die Hefe ARF-GEF-Proteine Gea1p und Gea2p weisen jeweils eine Einschubsequenz auf, die aber mit ca. 32 Aminosäuren (Gea1p) im Vergleich zu der *P. falciparum* 146 AA Insertion sehr kurz ist.

Vergleicht man Sec7-Sequenzen innerhalb der Gattung *Plasmodium* (siehe Abbildung 24), findet sich eine relativ große Homologie über den gesamten Sec7 Bereich und signifikante Identität der Helices F, G und H und des F-G-loops. Aus der Genomdatenbank des apikomplexen Parasiten *Toxoplasma gondii* (<http://toxodb.org/ToxoDB.shtml>) konnte mittels einer Motivsuche nach dem konserviertesten Bereich der Sec7 Domäne, dem F-G-loop, ein Leserahmen identifiziert werden, der hohe Sequenzhomologie mit den Plasmodien-Sec7-Domänen aufweist. Die Homologie der Sec7 Domäne ist zwischen *P. falciparum*, *P. knowlesi* und *P. berghei* und *P. yoelii* sehr groß und die Länge der Insertionssequenz ähnlich (*Pf* 146 AS, *Pk* 139, AS, *Pb* 137 AS, *Py* 137). Für den Bereich der Insertion zwischen den Helices G und H finden sich innerhalb der Gattung *Plasmodium* lange Sequenzbereiche mit signifikanter Identität, die um 50 % im Vergleich zu *P. falciparum* liegt.

Die putative Sec7-Sequenz aus *T. gondii* weist zum großen Teil signifikante Homologie zu den Plasmodien Sec7 Domänen auf. Innerhalb der Bereiche F bis H gibt es weitgehend identische Regionen. Die Insertionssequenz in *T. gondii* ist leicht verkürzt (132 AS) und weist lediglich eine 10%ige Identität im Vergleich zu *P. falciparum* auf.

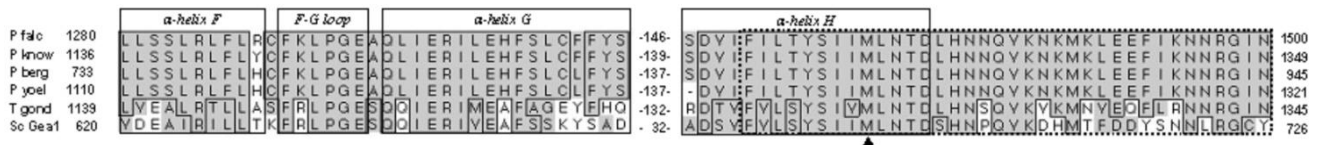


Abbildung 24: Vergleich putativer Sec7 Aminosäuresequenzen von *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. berghei* und *P. yoelii* sowie *T. gondii* und *S. cerevisiae*. Der Bereich der Insertion wurde aus dem Alignment herausgenommen und ist als Zahlenwert der Aminosäuren dargestellt. Konservierte Bereiche (Helices F, G, H, F-G-loop) sind mit Kästen gekennzeichnet. Homologe Aminosäuren sind grau unterlegt; identische Aminosäuren sind in Kästen zusammengefasst. Der Pfeil kennzeichnet die Methionin zu Isoleucin Substitution des BFA-resistenten Parasitenstammes.

4.2.2 Expression des Pfarf-gef Gens bzw. der Sec7 Domäne

Die bisher dargestellten parasitären Sec7 Sequenzen wurden aus der genomischen Sequenz *in silico* in Aminosäuresequenzen übersetzt. Ob und wann das Pf arf-gef-Gen aktiv ist und transkribiert wird, war nicht bekannt. Daher wurde aus *P. falciparum* Trophozoiten-Stadien die Gesamt RNA isoliert und mittels *Northern Blot* Verfahren gegen eine Sec7 spezifische Sonde hybridisiert. Es konnte gezeigt werden, dass in beiden Parasitenlinien das putative arf-gef Gen im Trophozoiten-Stadium transkribiert wird (siehe nachfolgende Abbildung 25).

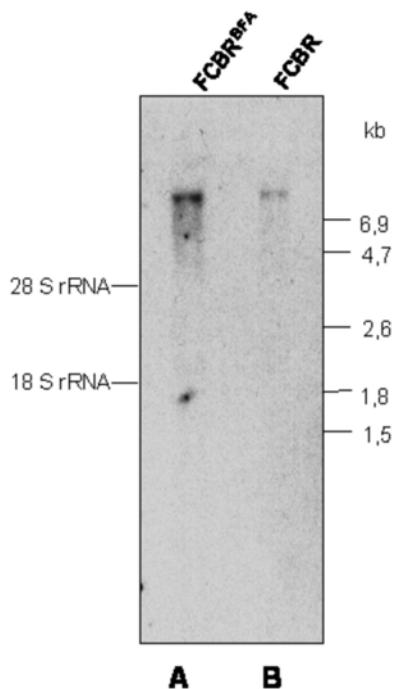


Abbildung 25: 30 µg Gesamt-RNA aus *P. falciparum* FCBR^{BFA} (Spur A) und FCBR (Spur B) Trophozoitenstadien wurde im Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Ein 913 bp langes, radioaktiv-markiertes *P. falciparum* Sec7-DNA-Fragment wurde als Sonde eingesetzt. Zum Größenvergleich wurde ein RNA-Standard aufgetragen. In beiden Parasiten-Zell-Linien ist das Arf-Gef Gen transkriptionell aktiv.

Es konnte mittels RT-PCR gezeigt werden, dass die Insertionssequenz im arf-gef Gen beider *P. falciparum* Stämme (BFA-resistent und -sensitiv) keine Intronsequenz darstellt und nicht „herausgespleißt“ wird.

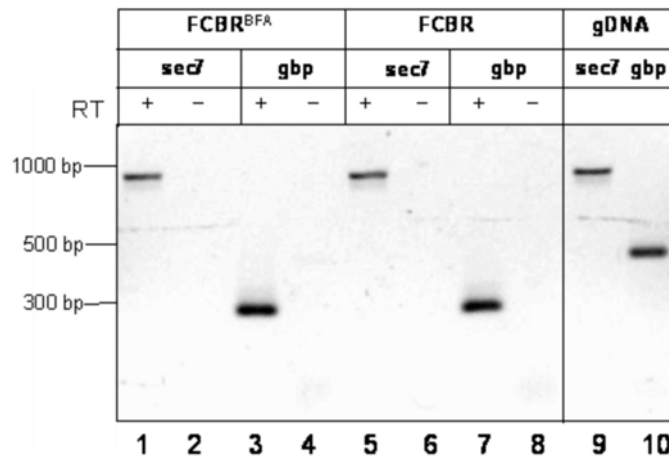


Abbildung 26: Mittels RT-PCR wurde ein Teil der Sec7 kodierenden Region amplifiziert. Dabei wurde die Erststrangsynthese mit Gesamt-RNA aus *P. falciparum* FCBR und FCBR^{BFA} durchgeführt (Spuren 1-8). Um ausschließen zu können, dass Amplifikate von gDNA entstanden sind, wurde jeweils eine Kontrollreaktion ohne Zugabe von reverser Transkriptase parallel angesetzt (RT-, Spur 2, 4, 6, 8). Die Primerkombinationen wurden jeweils auch mit genomischer DNA eingesetzt (Spuren 9, 10). Alle Reaktionsprodukte wurden auf einem 1,2%igen Agarose Gel dargestellt.

Für die RT-PCR wurden komplementäre Primer zur Sec7 Region sowie zu einem Teilbereich der Gbp130 kodierenden Region (enthält ein 179 bp Intron) eingesetzt. Die Größen der resultierenden PCR Fragmente sind folgendem Schema (Abbildung 27) dargestellt.

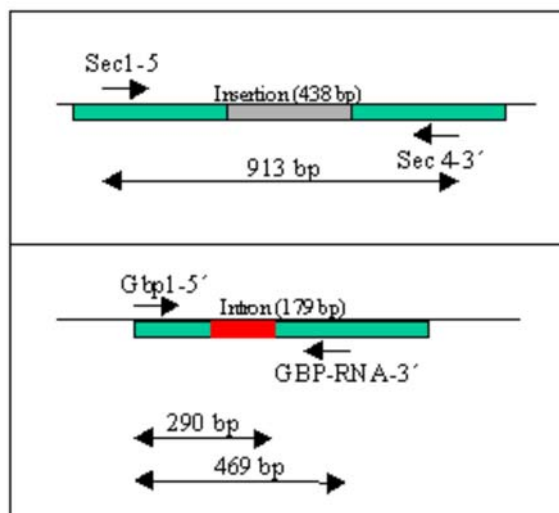


Abbildung 27: Durch Einsatz der Primer Sec1-5' und Sec4-3' entsteht ein 913 bp PCR-Produkt. Das Gbp130-Intron wird von den Primern gbp1 und GBP-RNA eingeschlossen und es kann über PCR ein 290 bp Fragment (mit Intron) bzw. ein 469 bp Fragment (ohne Intron) amplifiziert werden.

Das *P. falciparum* arf-gef Gen ist entsprechend den bisher dargestellten Ergebnissen transkriptionell aktiv. Die Größe der detektierten Banden im *Northern Blot* deutet darauf hin, dass der größte Teil des identifizierten Leserahmens mit 11224 bp transkribiert wird. Diese Transkripte scheinen gemäß der RT-PCR-Analyse die Insertionsregion zu enthalten. Mittels eines weiteren Northern Blots, bei dem eine Sonde verwendet wurde, die ausschließlich die Insertionssequenz darstellt, konnte lediglich ein extrem schwaches Signal mit starkem Hintergrund detektiert werden (nicht dargestellt). Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Insertion auch im Protein vorliegt.

4.2.3 Struktur der Pf Sec7 Domäne im Modell

Es wurde mittels *in silico* Protein Modeling Software unter Verwendung der *combinatorial extension method* (<http://cl.sdsc.edu/ce.html>) ein Modell der *P. falciparum* Sec7 Domäne erstellt. Dabei diente die bekannte Struktur der humanen ARNO Sec7 Domäne als „*template*“, anhand dessen die Aminosäuresequenz der *Pf* Sec7 Domäne räumlich dargestellt werden konnte. Da es keine bekannte Entsprechung der *P. falciparum* Insertionssequenz in Arf-Gef-Proteinen anderer Organismen gibt, musste dieser Bereich aus dem räumlichen Alignment rausgenommen werden.

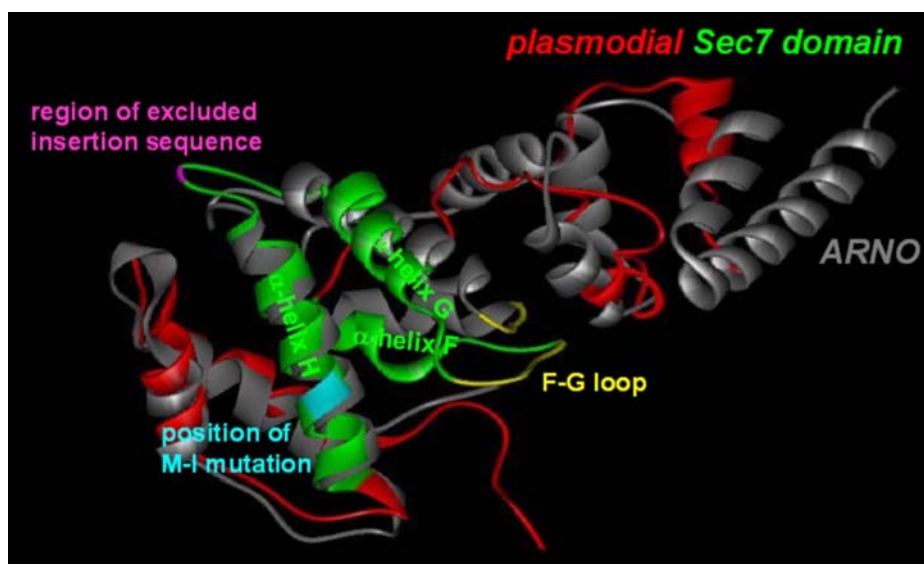


Abbildung 28: Darstellung der räumlichen Struktur der ARNO-Sec7 Domäne (grau) im Vergleich mit dem Modell der Plasmodium falciparum Sec7 Domäne (rot und grün). Die Position der ausgeschlossenen Insertionssequenz ist violett markiert. Im Bereich der Helices F, G und H sieht man, dass diese Region auch in der räumlichen Anordnung konserviert zu sein scheint. Die Darstellung wurde mit Hilfe der Accelrys Visualisation Software Viewer Lite 4.2 erstellt.

Das räumliche Alignment zeigt, dass sich die Strukturen der *P. falciparum* und der ARNO Sec7 Domäne stark ähneln. Im Bereich der besonders konservierten Helices F, G und H gleicht sich die räumliche Struktur der α -Helices sehr. Die Position, an der eigentlich die Insertion vorliegen würde, ist markiert (Abbildung 28, violett) und zeigt, dass möglicherweise die Anordnung der Helices G und H sowie die Struktur der *hydrophobic groove* verändert sein könnte, wenn dieser Bereich im gefalteten Protein vorliegt. Eine Analyse der Insertionssequenz mittels des SMART-Protein *Pattern Research Tool* (<http://smart.embl-heidelberg.de>), der nach Mustern in der Aminosäuresequenz sucht, ergab keine bekannten Motive oder Domänen in dieser Sequenz. Es konnten aber zwei Bereiche, die sich durch besonders niedrige Komplexität auszeichnen, identifiziert werden. Diese Bereiche werden auch vom Programm LaserGene/DNAStar/Prosite als besonders flexible Regionen definiert und zeichnen sich dadurch aus, sehr wenig oder keine Sekundärstruktur auszubilden.

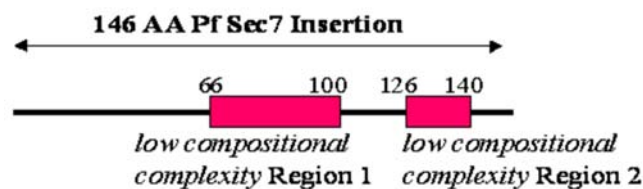


Abbildung 29: Schema der *Pf Sec7*-Insertions-Aminosäuresequenz, Aufbau dieser Sequenz aus zwei „low compositional complexity“ Regionen und Bereichen sonstige bekannte Motive

4.2.4 Transfektionen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Plasmodium falciparum*

Um die Fragen zu klären, ob die Punktmutation in der *P. falciparum* Sec7 Domäne ausreichend ist, oder ob andere Mutationen im *arf-gef* Gen bzw. in anderen Genen beteiligt sind um eine Brefeldin A Resistenz zu bewirken, wurde die entsprechende Nukleotid-Substitution sowohl in BFA-sensitive Parasiten als auch in die Hefe eingeführt. Dazu wurden Plasmid-Konstrukte hergestellt, die einen Teil der kodierenden Sequenz für die *Pf Sec7*^{BFA} Domäne enthalten und diese in die jeweiligen Organismen mittels Transfektion eingebracht. Ob der Insertionsbereich für den Parasiten essentielle Funktionen ausübt, sollte durch Deletion der Insertionssequenz aus dem Parasitengenom überprüft werden. Es bestand die Möglichkeit, dass die „volle-Länge“- *Pf Sec7*^{BFA} Domäne inklusive der Insertionssequenz in der Hefe nicht funktionieren/ komplementieren kann, da keine entsprechenden Gegenstücke zu dieser Sequenz in Hefe-Arf-Gef Proteinen bekannt sind. Daher wurde ein Hefe-Konstrukt hergestellt und verwendet, aus dem die Insertionssequenz der *Pf Sec7*^{BFA} Domäne deletiert wurde.

4.2.5 Plasmid-Transfektionen von *Plasmodium falciparum* Blutstadien

Die Punktmutation aus dem BFA-resistenten *P. falciparum* FCBR^{BFA} Stamm, welche in der konservierten Helix H der Sec7 Domäne zu einem Austausch von Methionin zu Isoleucin führt, wurde mittels Transfektion in einen BFA-sensitiven Stamm eingebracht. Als Rezipienten-Stamm wurde der *P. falciparum* 3D7-Stamm ausgewählt. Mit diesem Stamm wurde bereits ein erfolgreicher genomischer Gen-*knock-out* über homologe Rekombination mit einem eingebrachten Plasmid durchgeführt (Duraisingh *et al.*, 2002). Entsprechend dieser *knock-out*-Technologie wurde versucht, eine homologe Rekombination ins Leseraster des parasitären *arf-gef* Gens herbeizuführen. Die Integration der Sec7^{BFA}-DNA in das Genom über ein *double-crossover*-Ereignis würde auch die Punktmutation des BFA-resistenten Stammes einbringen. Stabile Transfektanten, die den entsprechenden Sec7^{BFA}-Sequenzbereich in den *arf-gef*-Leserahmen integriert haben, wurden anschließend durch Zugabe von BFA ins Medium selektioniert, soweit diese einzelne Mutation ausreicht, um BFA-Resistenz zu bewirken. Im Falle einer homologen Rekombination über ein *single-crossover* Ereignis (Crabb *et al.*, 1997) würden auch Plasmidanteile in den Leserahmen integrieren und so zu einem *knock-out* des *arf-gef* Gens führen.

4.2.6 Verwendung des *Plasmodium falciparum* 3D7 Stammes für Transfektionen

Die Sequenzierung eines großen Teils der parasitären *arf-gef* cDNA aus FCBR zeigte keine Unterschiede zur Genom-Datenbank-Sequenz (www.plasmodb.org) des 3D7 Stammes (Dr. F. Baumgartner, persönliche Mitteilung). Die Verwendung von FCBR-Sec7 Sequenzen stellte daher für die geplante Integration ins Genom des 3D7 Stammes kein Hindernis dar.

Die Wachstumsfähigkeit des 3D7 Stammes in Gegenwart von BFA wurde vor den Transfektionsexperimenten getestet und mit dem FCBR Stamm sowie dem FCBR^{BFA} Stamm verglichen (siehe Abbildung 30). Dabei wurden die drei Stämme jeweils mit verschiedenen BFA-Konzentrationen behandelt und kontinuierlich kultiviert. Die Wachstumsfähigkeit der Stämme wurde alle 48 Stunden durch Auszählung der neu infizierten Erythrozyten bestimmt. Zum Vergleich wurde jeder Stamm ohne BFA kultiviert und ebenfalls ausgezählt.

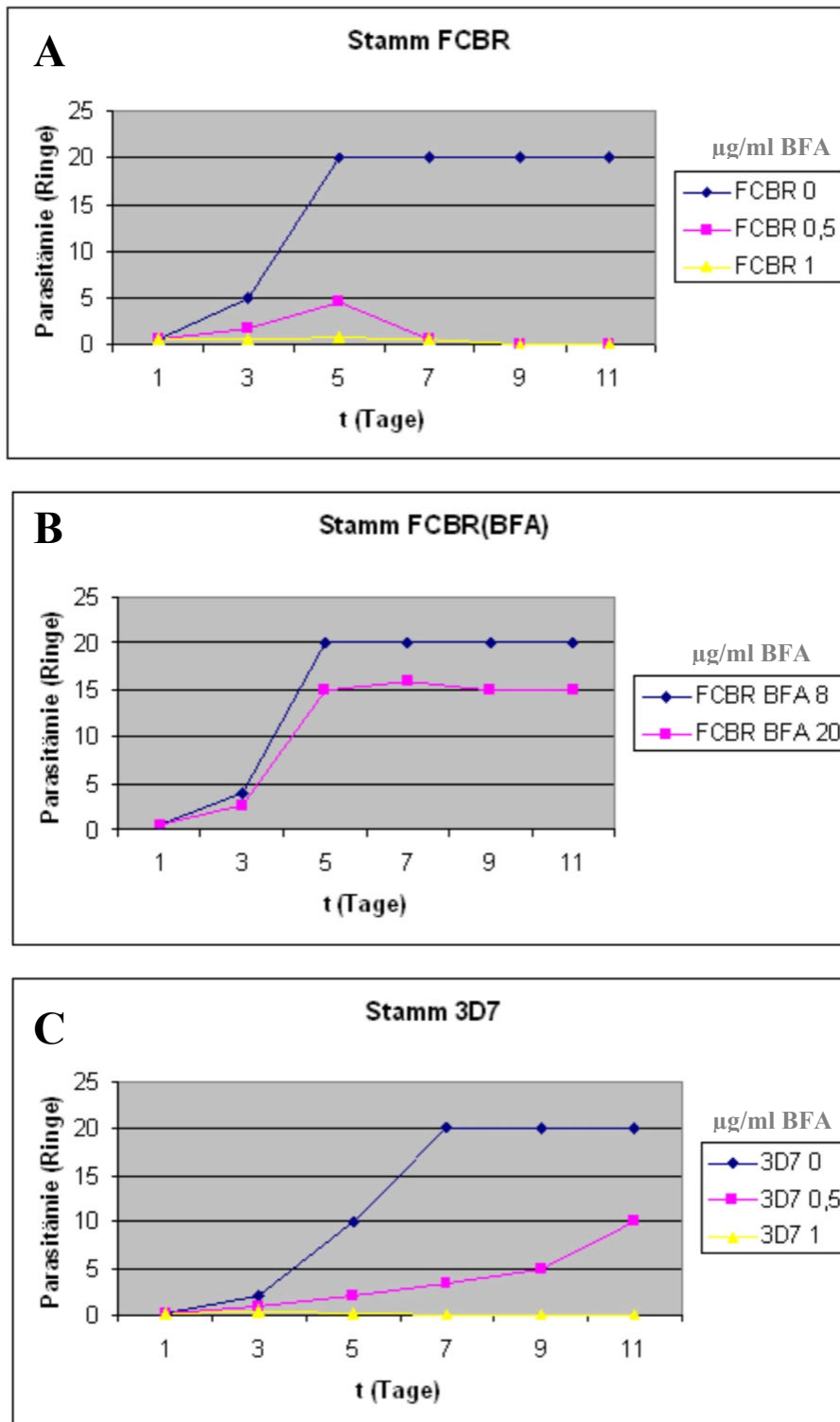


Abbildung 30: Die Stämme FCBR und 3D7 wurden jeweils in Gegenwart von 0,5 und 1 $\mu\text{g/ml}$ BFA bzw. ohne BFA in RPMI-Medium/ 4%Hämatokrit kultiviert (A, C). Der Stamm FCBR^{BFA} wurde in Gegenwart von 8 und 20 $\mu\text{g/ml}$ BFA kultiviert (B). Am Tag 1 wurden jeweils 0,2% Ringe ausgesät und alle 48 Stunden Ringstadien ausgezählt. Ab Tag 5 (FCBR) bzw. 7 (3D7) wurden die Kulturen ohne BFA jeweils auf 4% Parasitämie verdünnt. Bei FCBR^{BFA} mussten alle Kulturen (+/- BFA) ab Tag 5 verdünnt werden, um Parasitämien von unter 20% zu erhalten.

Der BFA-sensitive Stamme FCBR ist nicht in der Lage Konzentrationen über 0,5 $\mu\text{g/ml}$ BFA im Medium über den beobachteten Zeitraum von 11 Tagen (5 Zyklen) zu tolerieren und stirbt im dritten Zyklus ab. Der resistente FCBR^{BFA} Stamm hingegen toleriert eine Konzentration von 8 $\mu\text{g/ml}$ BFA ohne Einschränkung der Wachstumsfähigkeit. Erst ab 20 $\mu\text{g/ml}$ BFA wachsen die resistenten Parasiten verlangsamt. Für den Stamm 3D7 (BFA-sensitiv) ist eine Konzentration ab 1 $\mu\text{g/ml}$ BFA letal, während er bei 0,5 $\mu\text{g/ml}$ BFA verlangsamt weiterwächst. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde dieser BFA-„adaptierte“ 3D7 Stamm in einem erneutem BFA-Wachstumsversuch über einen längeren Zeitraum beobachtet, um dessen Potential zu spontaner BFA-Resistenzbildung zu studieren.

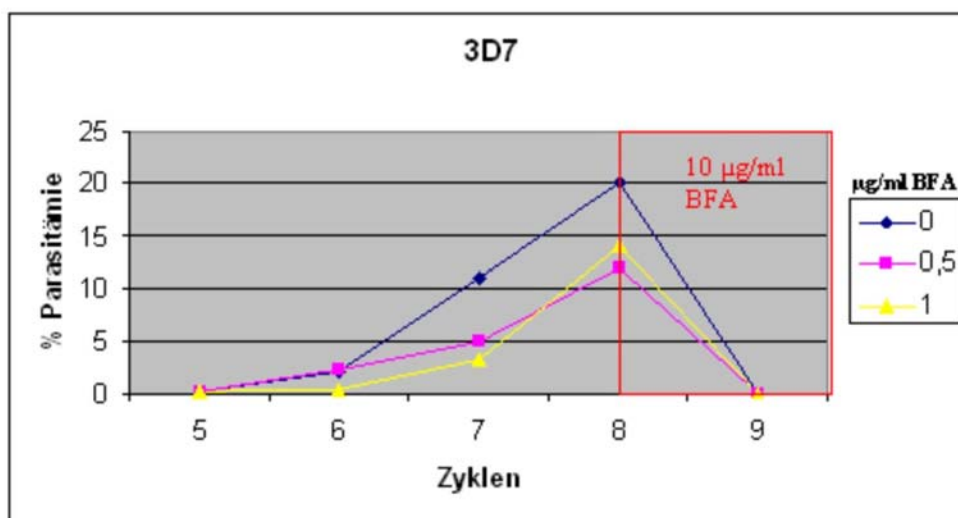


Abbildung 31: Der Stamm 3D7, der bereits zuvor über 5 Zyklen mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ BFA kultiviert wurde (siehe Abbildung 35) im 5. Zyklus verschiedenen BFA-Konzentrationen (0,5 und 1 $\mu\text{g/ml}$) ausgesetzt. Zum Start wurden jeweils 0,2 % Parasitämie eingesetzt. Im 8. Zyklus wurden die Kulturen alle mit 10 $\mu\text{g/ml}$ BFA behandelt.

Bei Konzentrationen von 0,5 und 1 $\mu\text{g/ml}$ BFA war der „BFA-adaptierte“ 3D7 Stamm in der Lage, verlangsamt weiterzuwachsen und glich seine Wachstumsraten im 7. Zyklus der Kontroll-Kultur ohne BFA an. Im 8. Zyklus wurden die Parasitenkulturen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ BFA versetzt und starben daraufhin ab. Mit diesem Experiment konnte einerseits die Höhe der BFA-Konzentration, bei der nach Transfektion selektioniert werden sollte, abgeschätzt werden. Andererseits zeigt der zeitliche Umfang der Selektion mit geringeren BFA-Konzentrationen, dass eine BFA-Resistenzbildung des 3D7 Stammes durch spontane Mutationen innerhalb von 8 Teilungszyklen sehr unwahrscheinlich ist.

4.2.7 Konstruktion der Transfektionsplasmide

Entsprechend der von Duraisingh *et al.* beschriebenen Transfektionsmethode wurden Parasiten mit rekombinanten Plasmiden transfiziert, die die $Sec7^{BFA}$ -Domäne kodieren. Die hergestellten Transfektionskonstrukte basieren auf dem pH-TK Vektor, der freundlicherweise von Prof. Alan Cowman (WEHI, Melbourne, Australien) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurde. In Abbildung 32 sind schematisch die Transfektions-Plasmidkonstrukte dargestellt.

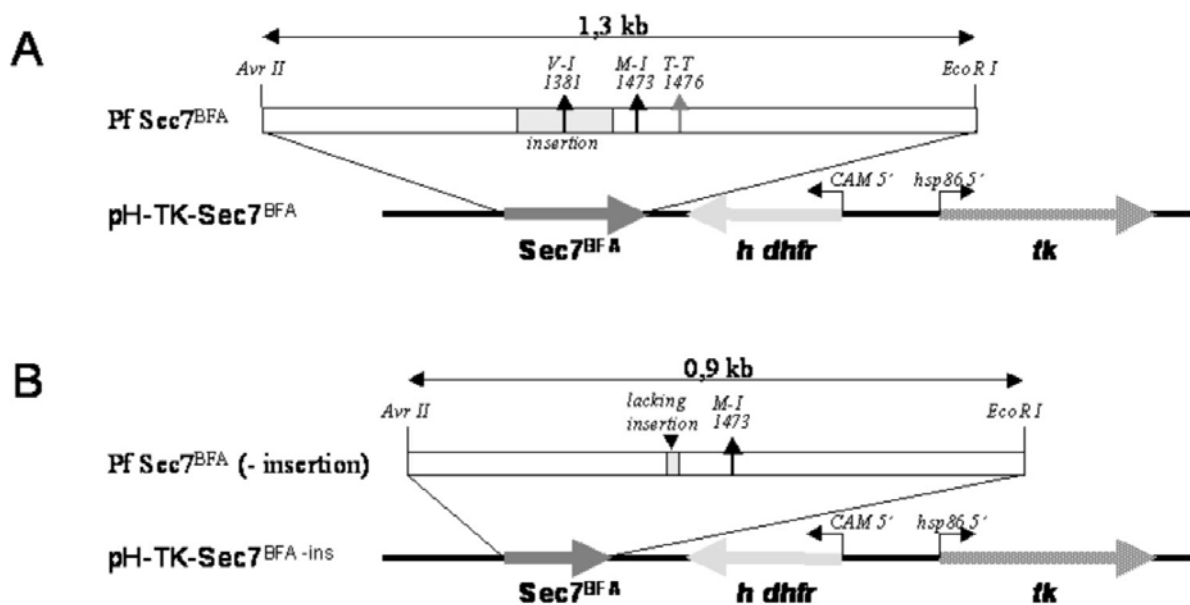


Abbildung 32: Konstruktion der pH-TK-Sec7 Transfektionsplasmide. Der Ausgangsvektor pH-TK kodiert ein humanes Dihydrofolatreduktasegen (*h dhfr*), das als positiv selektionierbarer Marker dient und ein Herpes simplex Thymidinkinasegen (*tk*), welches den transfizierten Parasiten Ganciclovir Sensitivität verleiht. Die Expression des *h dhfr* Gens wird vom Plasmodium falciparum Calmodulin Promotor reguliert; die Expression des *tk* Gens von dem Plasmodium falciparum „heat shock protein 86“ Promotor. Die *Sec7* Domäne Inserts repräsentieren (A) die originäre *Pf Sec7* Domäne des BFA resistenten $FCBR^{BFA}$ Stammes inklusive einer stillen Markermutation in AS-Position 1476 oder (B) die verkürzte *Pf Sec7* Version, der die Insertionssequenz fehlt. Beide *Pf Sec7* Inserts beinhalten die ATG-ATA^(BFA) Mutation (AS-Position 1473) des BFA -resistenten $FCBR^{BFA}$ Stammes und wurden über *AvrII* / *EcoRI* Schnittstellen in den pH-TK Vektor ligiert.

Das $Sec7^{BFA}$ Fragment (inklusive Insertion) wurde über PCR aus genomischer DNA des BFA -resistenten $FCBR^{BFA}$ Stammes amplifiziert, das resultierende 1386 bp lange Fragment anschließend in pCR2.1-TOPO inseriert und die Sequenz des Inserts verifiziert. Es war notwendig, die *Pf Sec7* Sequenz im Vektor von der genomischen Sequenz der Parasiten

unterscheidbar zu machen, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass spontane Mutationen in Gegenwart von BFA auftreten könnten, die der BFA-Mutation auf dem Plasmid entsprechen. Um diese spontanen Mutationen von der durch Rekombination mit Sec7^{BFA}-Vektor-Sequenz entstandenen Mutation abgrenzen zu können, wurde eine (stille) Markermutation in der Nähe des ATA^(BFA)-Kodons auf dem Plasmid generiert. Dazu wurde eine Sequenz-spezifische Mutagenese mit pCR2.1-TOPO/PfSec7^{BFA} mit mutagenen Primer durchgeführt, die über eine *mismatch*-Basenpaarung eine gewünschte Mutation (Nukleotidaustausch) in die Sequenz einbringt. Hierbei wurde ein ACA-Kodon (Threonin) zu einem ACT-Kodon (Threonin) umgewandelt. Über diese stille Markermutation lässt sich im Falle einer homologen Rekombination das Integrationsereignis über Sequenzanalysen nachweisen und von einer natürlich vorkommenden spontanen Mutation unterscheiden.

1473	M	L	N	T	1476
	ATG	TTG	AAT	ACA	
	ATA	TTG	AAT	ACT	
	I	L	N	T*	

Abbildung 33: Aminosäure- bzw. Nukleotidsequenz der BFA-Mutation (M-I) und der Markermutation (T-T*) in der Sec7 Domäne des Plasmids pCR2.1-TOPO/PfSec7^{BFA}. Die Zahlenangaben repräsentieren die AS-Positionen im arf gef Leserahmen.

Zur Deletion der Insertionssequenz wurde eine „rekombinatorische PCR“ (siehe Methoden) durchgeführt aus der ein 969 bp Fragment hervorgeht. Dabei diente pCR2.1-TOPO/PfSec7^{BFA} als *template* um die Insertionssequenz auszuschließen. In diesem Konstrukt liegt keine stille Markermutation vor. Die Deletion der Insertion lässt sich in diesem Fall eindeutig zum Nachweis einer Integration der eingebrachten pDNA benutzen. Anschließend wurden die Inserts (Sec7^{BFA} und Sec7^{BFA-ins}) aus pCR2.1-TOPO mit AvrII und EcoRI herausgeschnitten und in pH-TK Vektor ligiert (siehe Abbildung 32).

4.2.8 Selektionsstrategie mit transfizierten Parasiten

Von Duraisingh *et al.* wurde 2002 ein Gen-*knock out* bei *P. falciparum* publiziert, der über ein sequenzspezifisches *double-cross-over* Ereignis herbeigeführt wurde. Dabei wurde zum ersten Mal gezeigt, dass ein gezielter Austausch von homologen DNA-Sequenzen zwischen einem eingebrachten Plasmid und genomischer DNA über homologe Rekombination im Parasiten durchführbar ist. Für diese Experimente wurde der pH-TK Vektor benutzt, der auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen verwendet wurde. Der pH-TK Vektor besitzt ein humanes *dhfr* Gen, das 5' und 3' flankiert von

Restriktions-Stellen ist. Fügt man in diese Schnittstellen DNA-Sequenzen ein, die homologe Bereiche im *P. falciparum* Genom haben, so kann über ein *double-crossover* Ereignis der homologen Bereiche die Integration des *h dhfr* Gens erzielt werden (Duraisingh *et al.*, 2002).

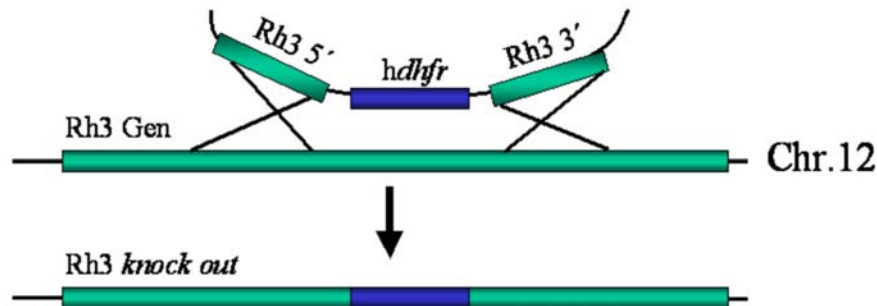


Abbildung 34: Homologe DNA Bereiche vom pH-TK Plasmid vermitteln ein *double-crossover* Ereignis. In diesem Fall handelt es sich bei den homologen Sequenzen um Bereiche des *rh3* Gens des Parasiten, das folglich durch die Integration des *h dhfr* Gens ausgeschaltet wird. Von Duraisingh *et al.* wurde der Gen-knock-out über *double crossover* an Beispiel des *rh3* Gens zum ersten Mal gezeigt (Duraisingh *et al.*, 2002).

Sowohl transiente Transfektanten, die episomale Plasmide tragen, als auch stabile Transfektanten, die über die homologen Bereiche des Plasmids das *h dhfr* Gen in das Genom integriert haben, sind grundsätzlich mit Pyrimethamin bzw. mit dem Pyrimethamin Analog WR99210 selektionierbar (Sardarian *et al.*, 2003). Das *P. falciparum dhfr* Gen ist Pyrimethamin-/WR99210-sensitiv, während das humane *dhfr* Gen Pyrimethamin-/WR99210-resistent ist. In dieser Arbeit wurde sowohl WR99210 als auch Pyrimethamin – je nach Verfügbarkeit – eingesetzt.

Des Weiteren kodiert pH-TK die *Herpes simplex* Virus-Thymidinkinase (TK), welche eine Sensitivität gegen Ganciclovir (Cytovene, Roche Basel) herbeiführt. Wildtyp-Parasiten (3D7), die kein *tk* Gen besitzen, sind resistent gegen Ganciclovir. Virale Thymidinkinase bildet aus Ganciclovir die zytotoxische Komponente Ganciclovir-Triphosphat, die in DNA eingebaut wird und zum Absterben der sich teilenden Parasiten führt. Mittels dieser neu erschaffenen Sensitivität der transfizierten Parasiten, die das eingebrachte Plasmid zunächst episomal propagieren und exprimieren, ist es möglich eine Selektion gegen solche Parasiten durchzuführen, die episomale Plasmide enthalten. Über den Einsatz von Ganciclovir könnte der „Druck“ auf ein Integrationsereignis erhöht werden, da nur solche Zellen einen Selektionsvorteil haben und überleben, die keine episomalen Plasmide enthalten. Werden pH-TK-transfizierte Parasiten gleichzeitig mit WR99210 und Ganciclovir behandelt, können nur solche Zellen überleben, die den homologen Sequenzbereich inklusive des *h dhfr* Gens aus

dem pH-TK Vektor in das Genom integriert haben. Diese sind weiterhin resistent gegen WR99210, da das *h dhfr* Gen über die homologen Bereiche mit ins Genom integriert wurde (siehe Abbildung 34). Falls nur ein *single cross-over* Ereignis stattgefunden hätte, wären solche Zellen weiterhin sensitiv gegenüber Ganciclovir, da durch das einseitige Integrationsereignis das *tk* Gen zusätzlich in das Genom integriert worden wäre und weiterhin exprimiert werden könnte. Nur solche Parasiten sind nach Transfektion WR99210-/Ganciclovir-resistent, bei denen eine *double cross-over* Integration der homologen Sequenzbereiche stattgefunden hat und die keine episomalen Plasmide in der Zelle propagieren.

Die in dieser Arbeit angewendete Technik der stabilen Transfektion basiert auf dem pH-TK Transfektionsvektor und grundsätzlich auf der von Duraisingh *et al.* beschriebenen Selektionsstrategie. Allerdings wurde die Pf Sec7^{BFA} Sequenz lediglich in die 3' flankierende Seite des *h dhfr* Gens des pH-TK-Vektors inseriert.

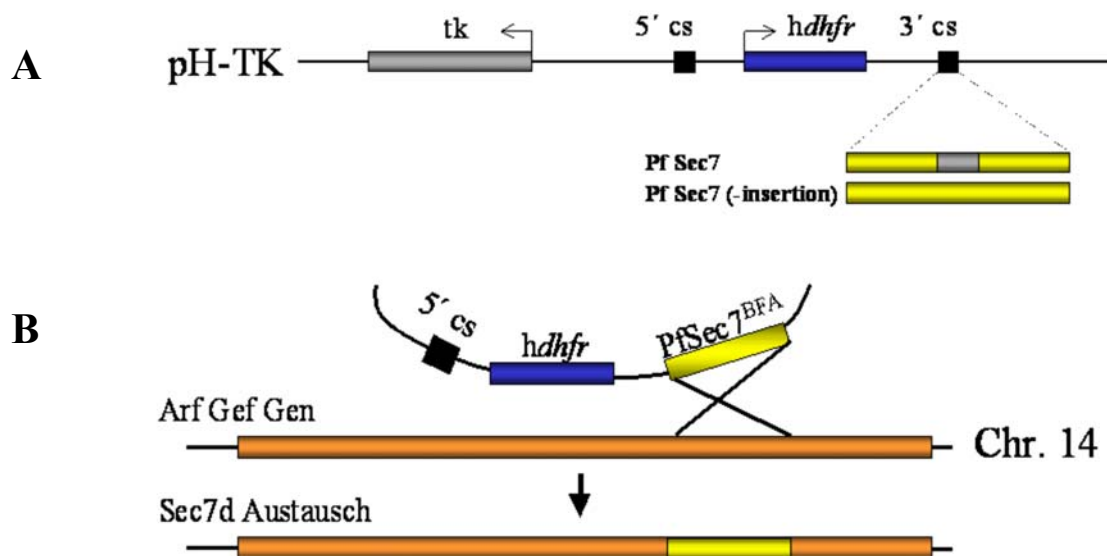


Abbildung 35: **A:** Integration der PfSec7^{BFA} Sequenzen in die 3' Klonierungsstelle (3'cs) des in pH-TK Vektors. **B:** Bei der Integration der homologen Pf Sec7d Sequenzbereiche des pH.TK Plasmids in das Genom über double crossover wird im Gegensatz zu den Experimenten von Duraisingh *et al.* (2002) das *h dhfr* Gen NICHT integriert.

Es war geplant, die Pf Sec7^{BFA} Sequenz in das arf-gef Gen auf Chromosom 14 des Parasiten zu integrieren. Dieser Austausch von homologen Sequenzbereichen sollte im Gegensatz zu Duraisingh *et al.* im Leserahmen des arf-gef Gens erfolgen. Die zusätzliche

Integration des *h dhfr* Gens hätte in jedem Fall zum *knock-out* des *arf-gef* Zielgens geführt. Diese Variante der *double crossover* Integration setzt voraus, dass die eingebrachte DNA einen anderen Selektionsmarker mitbringt. In diesem Fall sollte die im resistenten FCBR^{BFA}-Parasitenstamm gefundene Punktmutation eine BFA Resistenz erzeugen und die transgenen Parasiten dadurch über BFA selektionierbar machen.

Die mit pH-TK/PfSec7^{BFA} bzw. pH-TK/PfSec7^{BFA-ins} transfizierten Parasiten wurden nach der Elektroporation für 48 Stunden in RPMI/ 3% Hämatokrit kultiviert bevor am dritten Tag nach Transfektion das Medium mit 5 nM WR99210 (Jacobus Pharmaceutical Co. Inc., USA) versetzt wurde. Daraufhin starben die meisten Parasiten zunächst ab. Die Kulturen wurden unter WR99210-Selektionsdruck für fünf Wochen mit einmaligem Mediumwechsel pro Woche weiterkultiviert. In der sechsten Woche nach Transfektion wurden Ringstadien in den Kulturen sichtbar, die WR99210 resistent waren. Aus den Kulturen wurde die GesamtdNA isoliert und die Chromosomen/Plasmid-DNA mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) aufgetrennt. Mittels dieser PFGE konnte nachgewiesen werden, dass beide WR99210-resistenten Kulturen das eingebrachte pH-TK Plasmid besaßen (durchgeführt von J. Thompson, WEHI, Melbourne, Australien, nicht dargestellt). Die verschiedenen Parasitenkulturen bzw. Parasitenlinien wurden anschließend verschiedenen mit Ganciclovir/Brefeldin A (BFA) – Kombinationen, jedoch ohne WR99210/Pyrimethamin, behandelt (siehe Tabelle 4).

Die Behandlung der verschiedenen Parasitenlinien mit Ganciclovir zeigte, dass die Wildtyp-Stämme (FCBR, FCBR^{BFA} und 3D7) gegen bis zu 4µM Ganciclovir resistent waren. 4 µM Ganciclovir stellen eine ausreichende inhibitorische Konzentration für die Selektion von Parasiten dar (Duraisingh *et al.*, 2002). Die transfizierten Linien, die episomale pH-TK/PfSec7^{BFA} Plasmide propagieren und exprimieren, waren nicht in der Lage in Gegenwart von 4 µM Ganciclovir zu wachsen. Allerdings konnten diese bei einer Konzentration von 2µM Ganciclovir noch verlangsamt weiterwachsen. In Gegenwart von 5 bzw. 10 µg/ml BFA war zunächst ausschließlich der FCBR^{BFA} Stamm resistent, während die Stämme FCBR und 3D7 abstarben. Die transfizierten Linien wurden über drei Vermehrungs-Zyklen mit BFA inkubiert, wonach keine lebendigen Parasiten mehr in den Kulturschalen zu finden waren. Danach wurden diese Kulturen für 2 Zyklen ohne BFA weiterkultiviert, bis wieder Parasiten sichtbar wurden. Anschließend wurden erneut 5 bzw. 10 µg/ml BFA zu den Zellen gegeben.

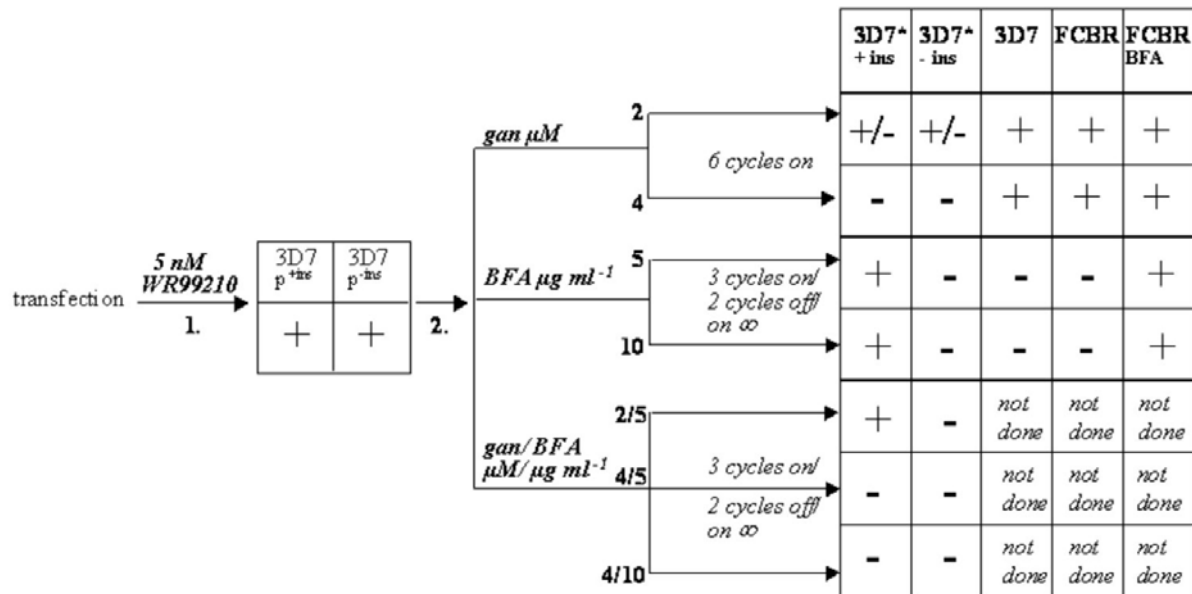


Tabelle 4: Wachstumsfähigkeit der Parasitenstämme FCBR, FCBR^{BFA}, 3D7 bzw. der transfizierten Parasitenlinien 3D7-pH-TK Sec7^{BFA} und 3D7-pH-TK Sec7^{BFA-ins} in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Ganciclovir (Gan) und/oder Brefeldin A (BFA). Die Zeichen stehen für: + normales Wachstum der Zellen, +/- eingeschränktes bzw. stark verlangsamtes Wachstum, - kein Wachstum. Nicht durchgeführte Kombinationen sind mit not done gekennzeichnet.

Diese Parasiten erwiesen sich im Fall der 3D7/Sec7^{BFA}-Linie als BFA-resistent. Die gleiche „on/off-drug“-Behandlung des transfizierten 3D7/Sec7^{BFA-ins} oder des 3D7-Wildtypstammes führte zu keiner Resistenzausbildung gegen BFA.

Die transgenen, BFA-resistenten 3D7 Parasiten (im Folgenden mit 3D7^{BFA} benannt) wurden anschließend wiederum mit 4 μ M Ganciclovir kultiviert, ohne dass sie sich in ihrer Wachstumsfähigkeit vom Wildtypstamm unterschieden hätten. Bei Behandlung der 3D7^{BFA} Parasiten mit Pyrimethamin starben diese Parasiten ab. Im Gegensatz dazu konnten die 3D7/pH-TKSec7^{BFA}-Parasiten, mit denen keine BFA-Selektion durchgeführt wurde, in Gegenwart von 200 nM Pyrimethamin wachsen (siehe Tabelle 5).

Zusätze (c)	BFA 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$	Gan 4 μM	Pyrimethamin 200nM
Stämme			
3D7	-	++	-
3D7pH-TK-Sec7 ^{BFA}	-	-	++
3D7Sec7 ^{BFA}	++	++	-

Tabelle 5: Wachstumsfähigkeit der Linien 3D7 (Wildtyp), 3D7pH-TKSec7^{BFA} (episomale Plasmide) und 3D7^{BFA} (stabil transgene Linie) mit Ganciclovir, BFA und Pyrimethamin in den angegebenen Konzentrationen

4.2.9 Sequenz-Analyse des transgenen 3D7^{BFA} Stammes

Aus den Linien 3D7(wt) und 3D7^{BFA} wurde Gesamt-RNA und -DNA präpariert. Die Gesamt-RNA wurde in eine RT-PCR eingesetzt. In beiden Linien wird das arf-gef Gen bzw. die Sec7 Region transkribiert (siehe Abbildung 41). Zum Nachweis, dass vollständig gespleißte RNA in die reverse Transkriptions-Reaktion eingesetzt wurde, diente eine Kontrollreaktion mit Gbp130 Primern aus derselben RNA-Präparation (siehe Abbildung 36 und Abbildung 26 zum Vergleich).

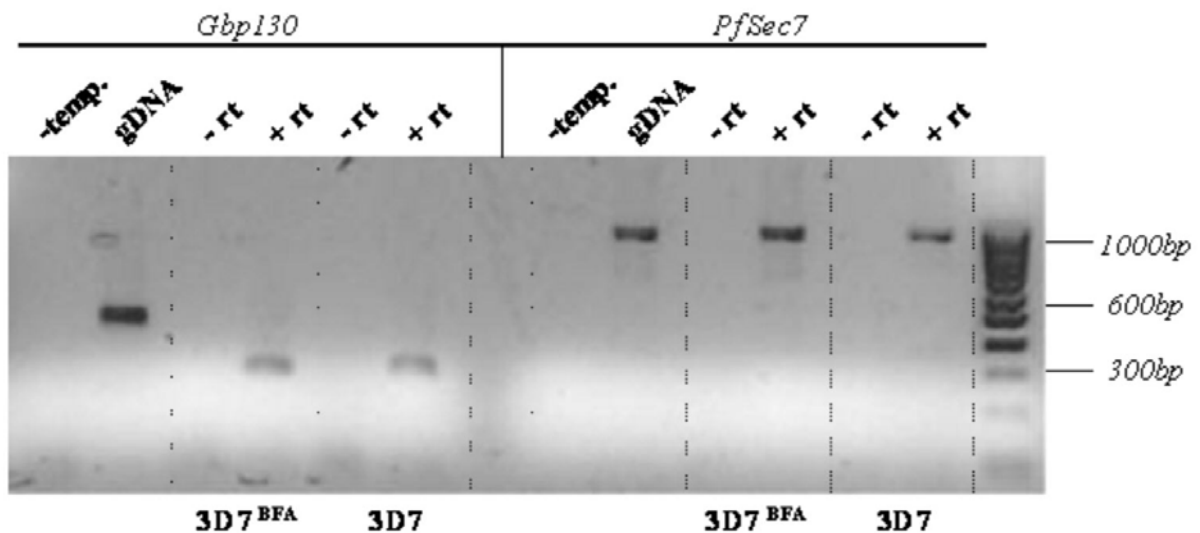


Abbildung 36: Über RT-PCR wurde ein Teil der Sec7 kodierenden Region amplifiziert. Es wurde Gesamt-RNA aus 3D7 und 3D7^{BFA} in die Erststrangsynthese eingesetzt. Für beide eingesetzten komplementären Primer (Gbp130 und Sec7) wurden jeweils Kontrollreaktionen ohne Zugabe von reverser Transkriptase durchgeführt (-rt). Als Positivkontrolle diente genomische Parasiten DNA (gDNA). Die Negativkontrollen (-temp.) enthalten alle PCR Zusätze, jedoch keine template DNA. Es wurden neben den Sec7 komplementären Primern auch Gbp130 Primer eingesetzt. Gbp130 enthält ein 179bp Intron (siehe auch Abbildung 27).

3D7	4537	TGAAAATAGTAATAAAAAATAATGTAACGCATGATGATAGTGTATTACCAA	4587
FCBR	4537	TGAAAATAGTAATAAAAAATAATGTAACGCATGATGATAGTGTATTACCAA	4587
FCBR(BFA)	4537	TGAAAATAGTAATAAAAAATAATGTAACGCATGATGATAGTGTATTACCAA	4587
3D7(BFA)	4537	TGAAAATAGTAATAAAAAATAATGTAACGCATGATGATAGTGTATTACCAA	4587
pH-TK/Sec7(BFA)	330	TGAAAATAGTAATAAAAAATAATGTAACGCATGATGATAGTGTATTACCAA	380
3D7	4588	TGGTAATGAAACGGACGCGAAAAAAAATGTGGATGAGAATAATAATGAAAA	4638
FCBR	4588	TGGTAATGAAACGGACGCGAAAAAAAATGTGGATGAGAATAATAATGAAAA	4638
FCBR(BFA)	4588	TGGTAATGAAACGGACGCGAAAAAAAATGTGGATGAGAATAATAATGAAAA	4638
3D7(BFA)	4588	TGGTAATGAAACGGACGCGAAAAAAAATGTGGATGAGAATAATAATGAAAA	4638
pH-TK/Sec7(BFA)	381	TGGTAATGAAACGGACGCGAAAAAAAATGTGGATGAGAATAATAATGAAAA	431
3D7	4639	TGATTCTAATTTAAATGAAAATAGTACAAATCTGAAAAAAAATAATGTAGA	4689
FCBR	4639	TGATTCTAATTTAAATGAAAATAGTACAAATCTGAAAAAAAATAATGTAGA	4689
FCBR(BFA)	4639	TGATTCTAATTTAAATGAAAATAGTACAAATCTGAAAAAAAATAATGTAGA	4689
3D7(BFA)	4639	TGATTCTAATTTAAATGAAAATAGTACAAATCTGAAAAAAAATAATGTAGA	4689
pH-TK/Sec7(BFA)	432	TGATTCTAATTTAAATGAAAATAGTACAAATCTGAAAAAAAATAATGTAGA	482
3D7	4690	TAATAATAAAGATAAATGTGAATGATTTACATATTGAAGAAAAAATTAATTT	4740
FCBR	4690	TAATAATAAAGATAAATGTGAATGATTTACATATTGAAGAAAAAATTAATTT	4740
FCBR(BFA)	4690	TAATAATAAAGATAAATGTGAATGATTTACATATTGAAGAAAAAATTAATTT	4740
3D7(BFA)	4690	TAATAATAAAGATAAATGTGAATGATTTACATATTGAAGAAAAAATTAATTT	4740
pH-TK/Sec7(BFA)	483	TAATAATAAAGATAAATGTGAATGATTTACATATTGAAGAAAAAATTAATTT	533
3D7	4741	AAAAAAGAATGTAGATATTAATGATTATATGCATAAAAAATGTATATTACTT	4791
FCBR	4741	AAAAAAGAATGTAGATATTAATGATTATATGCATAAAAAATGTATATTACTT	4791
FCBR(BFA)	4741	AAAAAAGAATGTAGATATTAATGATTATATGCATAAAAAATGTATATTACTT	4791
3D7(BFA)	4741	AAAAAAGAATGTAGATATTAATGATTATATGCATAAAAAATGTATATTACTT	4791
pH-TK/Sec7(BFA)	534	AAAAAAGAATGTAGATATTAATGATTATATGCATAAAAAATGTATATTACTT	584
3D7	4792	ATCAAAAAAATTGAAAGTATGAGTGAAGAGGAAATTCAAAAGAAGTATGT	4842
FCBR	4792	ATCAAAAAAATTGAAAGTATGAGTGAAGAGGAAATTCAAAAGAAGTATGT	4842
FCBR(BFA)	4792	ATCAAAAAAATTGAAAGTATGAGTGAAGAGGAAATTCAAAAGAAGTATGT	4842
3D7(BFA)	4792	ATCAAAAAAATTGAAAGTATGAGTGAAGAGGAAATTCAAAAGAAGTATGT	4842
pH-TK/Sec7(BFA)	585	ATCAAAAAAATTGAAAGTATGAGTGAAGAGGAAATTCAAAAGAAGTATGT	635
3D7	4843	ACTTGTTGAAAATAGTGA:GTTATTTTTATATTGACATATTCTATAATCAT	4893
FCBR	4843	ACTTGTTGAAAATAGTGA:GTTATTTTTATATTGACATATTCTATAATCAT	4893
FCBR(BFA)	4843	ACTTGTTGAAAATAGTGA:GTTATTTTTATATTGACATATTCTATAATCAT	4893
3D7(BFA)	4843	ACTTGTTGAAAATAGTGA:GTTATTTTTATATTGACATATTCTATAATCAT	4893
pH-TK/Sec7(BFA)	636	ACTTGTTGAAAATAGTGA:GTTATTTTTATATTGACATATTCTATAATCAT	686
3D7	4894	GTTGAATACAGATTTACATAAATAATCAAGTTAAGAATAAAAATGAAATTAGA	4944
FCBR	4894	GTTGAATACAGATTTACATAAATAATCAAGTTAAGAATAAAAATGAAATTAGA	4944
FCBR(BFA)	4894	ATTGAATACAGATTTACATAAATAATCAAGTTAAGAATAAAAATGAAATTAGA	4944
3D7(BFA)	4894	ATTGAATACTGATTTACATAAATAATCAAGTTAAGAATAAAAATGAAATTAGA	4944
pH-TK/Sec7(BFA)	687	ATTGAATACTGATTTACATAAATAATCAAGTTAAGAATAAAAATGAAATTAGA	737
3D7	4945	AGAATTTATTTAAAAATAAATAGAGGAATAAAT: AATGGAAAAAATAT	4989
FCBR	4945	AGAATTTATTTAAAAATAAATAGAGGAATAAAT: AATGGAAAAAATAT	4989
FCBR(BFA)	4945	AGAATTTATTTAAAAATAAATAGAGGAATAAAT: AATGGAAAAAATAT	4989
3D7(BFA)	4945	AGAATTTATTTAAAAATAAATAGAGGAATAAAT: AATGGAAAAAATAT	4989
pH-TK/Sec7(BFA)	738	AGAATTTATTTAAAAATAAATAGAGGAATAAAT: AATGGAAAAAATAT	782

Abbildung 37: Sequenz-Vergleich des RT-PCR-Produktes aus 3D7^{BFA} mit den entsprechenden Sequenzbereichen aus 3D7 (Wildtyp), FCBR, FCBR^{BFA} und pH-TK Sec7^{BFA}. Der blaue Kasten markiert die Insertionssequenz. Die Helix H ist mit pink gekennzeichnet. Die gestrichelte Linie umrandet den Bereich der „hot spot-Region“ für Mutationen, die mit BFA-Resistenz in Verbindung stehen (Jackson and Casanova, 2000). Unterschiedliche Basen der verschiedenen Sequenzen sind weiß unterlegt und verschieden farbig markiert: rot= BFA-Mutation (M-I); grün= stille Marker-mutation (T-T*); schwarz= artifizielle Mutation aus pH-TK Sec7^{BFA} (V-I). Die Zahlen markieren die Nukleotidanzahl des Arf-Gef Leserahmens bzw. die Nukleotidanzahl der Pf Sec7 Domäne im pH-TK-Vektor.

Mit den resultierenden PCR-Produkten wurde anschließend eine Sequenzanalyse durchgeführt. Dabei wurden zwei unabhängige PCR Produkte aus unterschiedlichen PCR-Reaktionen jeweils zweimal sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt.

Die Sequenzen der Stämme FCBR, FCBR^{BFA}, 3D7, 3D7^{BFA} und pH-TK Pf Sec7^{BFA} stimmen bis auf drei Mutationen überein. Zum Ersten besitzen nur die BFA-resistenten FCBR^{BFA} und 3D7^{BFA} *P. falciparum* Linien den ATG (Position 4419) zu ATA (M-I) Basen-Austausch. Diese Mutation, die ursprünglich im FCBR^{BFA} Stamm identifiziert und in den 3D7 Stamm eingebracht wurde, liegt auch im Transfektionsplasmid pH-TK Sec7^{BFA} vor. Die stille Markermutation (Position 4428), die über pH-TK Sec7^{BFA} in den 3D7 Stamm eingebracht wurde, findet sich auch nur in den transgenen Parasiten und dem Transfektionsplasmid.

Es wurde des weiteren eine zusätzliche Mutation in Position 4685 des Transfektionsplasmids und der 3D7^{BFA} Sequenz identifiziert (siehe Abbildung 37). Hierbei handelt es sich um eine Mutation im Transfektionsplasmid, die im primären PCR-Produkt nicht vorhanden war, allerdings im Laufe der Klonierung entstanden ist und zunächst trotz Plasmid-Sequenzierungen unentdeckt blieb. Diese Mutation (GTA-ATA) findet sich an entsprechender Stelle in der Insertion auch in den 3D7^{BFA} Parasitengenom und wurde erst nachträglich im Transfektionsplasmid verifiziert. Sie führt zu einem Valin zu Isoleucin (V-I) Austausch. Diese beiden Aminosäuren haben ähnliche chemische Eigenschaften (unpolar und aliphatisch). Durch das Vorliegen dieser Mutation in den transgenen 3D7^{BFA} zeigte sich, dass der in das Genom integrierte Bereich mindestens 218 bp (Abstand dieser ATA Mutation zur Markermutation ACT) umfasst haben muß.

Die isolierte genomische DNA aus dem parentalen 3D7 Stamm bzw. aus dem 3D7^{BFA} Stamm wurde mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen behandelt und in einem Agarosegel aufgetrennt. Mittels einer DIG-markierten-Sec7-Sonde konnten spezifische Hybridisierungen auf dem Southern Blot nachgewiesen werden (siehe Abbildung 38).

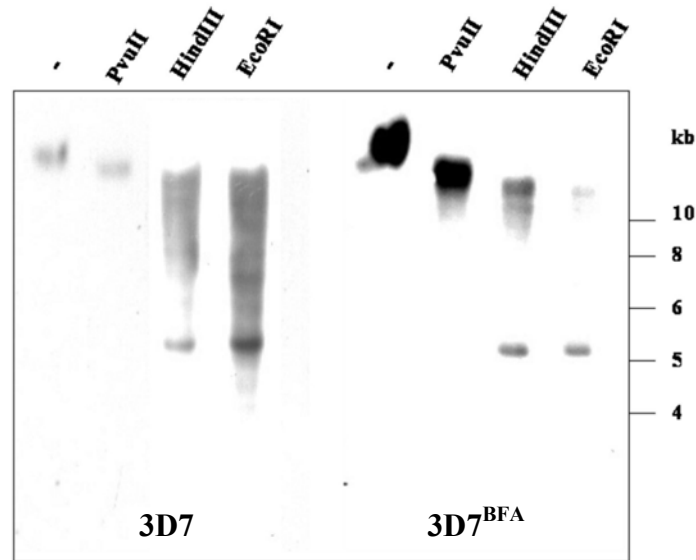


Abbildung 38: Southern Blot Hybridisierung mit gDNA aus 3D7/ 3D7^{BFA}. Jeweils 10 µg gDNA wurden mit EcoRI, HindIII oder PvuII behandelt und die geschnittenen DNA in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylon Membran (Hybond) transferiert. Mittels einer DIG-markierten Sec7 DNA Sonde wurde in beiden Stämmen bei EcoRI bzw. HindIII Behandlung ein spezifisches Signal von ca. 5,3 kb Länge detektiert werden. Unverdaute DNA ist mit – gekennzeichnet.

Die Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII schneiden im Leserahmen des *P. falciparum* arf-gef Gens jeweils dreimal (siehe Abbildung 39), so dass Fragmente von ca. 5,3 kb Länge zu erwarten sind, die die Sec7 Domäne beinhalten. PvuII schneidet generell seltener im parasitären Genom und nur einmal im arf-gef Leserahmen, so dass hier ein über 9 kb langes Fragment zu erwarten ist, das die Sec7 Domäne enthält. Die Fragmente der erwarteten Größen konnten im Southern Blot Nachweis detektiert werden.

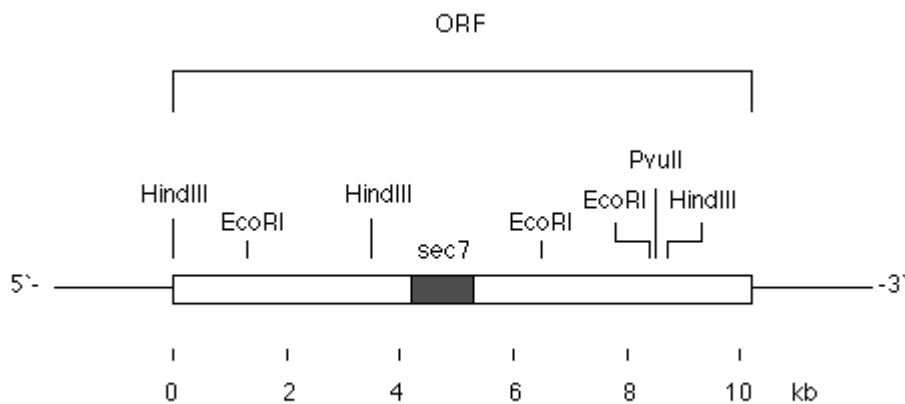


Abbildung 39: Schema des arf-gef Leserahmens (ORF) und Positionen der Endonukleaseschnittstellen EcoRI, HindIII und PvuII.

Aufgrund der Ergebnisse der Southern Hybridisierung ist davon auszugehen, dass im Genom des 3D7 Ausgangsstammes und des BFA-resistenten transgenen 3D7^{BFA*} Stammes keine Unterschiede bezüglich des *arf-gef* Gens vorliegen. Die verwendeten Restriktionsnukleasen hätten Genduplikationen auf demselben Chromosom (14) oder auf anderen Chromosomen nachweisen können.

4.2.10 Transfektion von *Plasmodium falciparum* mit PCR-Fragmenten

Des Weiteren wurde versucht, die Parasiten mit PCR-Fragmenten, die ebenfalls die PfSec7^{BFA} (mit oder ohne Insertion) kodierten, zu transfizieren. Dazu wurden 100 µg bzw. 200 µg PCR Fragment eingesetzt und entsprechend dem Verfahren für Plasmid DNA transfiziert. Die DNA-Fragmente wurden direkt von den rekombinanten pH-TK Sec7 Transfektionsvektoren amplifiziert und nach Aufreinigung der DNA (PCR Purification Kit, Macherey-Nagel) direkt für die Transfektionen eingesetzt. Über das Einbringen von PCR-Fragmenten sollte dann ein Integrationsereignis herbeizuführen sein, wenn die DNA-Fragmente eine ausreichende Zeit stabil in der Zelle vorliegen. Anschließend wurden die transfizierten Parasiten direkt dem BFA-Selektionsverfahren unterzogen (siehe Tabelle 4), da über die eingebrachte DNA keine sonstigen Selektionsmarker (wie *hdhfr* oder Hs *tk*) in die Parasitenzellen gelangt waren. Über keines der eingebrachten PCR-Fragmente (weder mit noch ohne Insertionssequenz) konnten BFA-resistente Parasiten erzeugt werden.

4.2.11 Fazit 2

Die im FCB^{BFA} Stamm identifizierte Punktmutation in der Helix H der Sec7 Domäne konnte über Plasmid-Transfektion in BFA-sensitive 3D7 P. falciparum Blutstadien eingebracht werden. Ein Bereich der Sec7 kodierenden Region der rekombinanten Plasmide wurde stabil ins Genom integriert und prägte einen BFA-resistenten Phänotyp aus, der sich in der Wachstumsfähigkeit in Gegenwart von BFA nicht von FCB^{BFA} Stamm unterscheidet. Diese Ergebnisse zeigen, dass (i) diese Punktmutation ausreichend ist, um den Parasiten BFA-Resistenz zu vermitteln und (ii) eine gezielte homologe Rekombination in den Leserahmen eines Parasitengens möglich ist. Die Deletion der Insertion war über den gleichen Versuchsansatz nicht zu erzielen. Dies deutet darauf hin, dass der Einschubbereich möglicherweise essentiell für den Parasiten ist.

Die Expression der P. falciparum Sec7^{BFA} Domäne in der Hefe S. cerevisiae sollte in weiteren Experimenten zeigen, ob die parasitäre Sec7^{BFA} Domäne in der Hefe ein ARF- GEF komplementieren kann und welche Implikationen die Existenz der Insertion dabei hat.

4.2.12 Komplementation einer Sec7 Domäne in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Funktionalität der *Pf* Sec7 Domäne kann experimentell nachgewiesen werden, falls das Gen bzw. der funktionelle Teilbereich des Gens in einem anderen Organismus die Funktion des entsprechenden homologen Gegenstücks ersetzt. Hierbei wurde als einfach zugängliches experimentelles System für Transfektionen die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ausgewählt. Ein Hefestamm, der defizient für zwei *arf-gef* Gene und Brefeldin A-sensitiv ist, diente als Rezipient für die *P. falciparum* Sec7 Domäne. Dieser experimentelle Ansatz basierte darauf, die Punktmutation in der *Pf* Sec7 Domäne des BFA-resistenten Parasitenstammes als Selektionsmarker für die Komplementation der transfizierten Hefen mittels BFA-Selektion zu verwenden.

Für die *in vivo* Komplementationsstudien wurde ein Versuchsansatz gewählt, der bereits in früheren Studien von Peyroche *et al.* (1999) für den Austausch von Hefe Sec7 Domänen gegen humane Sec7 Domänen verwendet wurde. Auf dieser Grundlage wurden transfizierte Hefen hergestellt, die verschiedenen Formen der *Pf* Sec7 Domäne (mit und ohne Insertion) exprimieren. Die Hefe APY033 ist für die *arf-gef* Gene *gea1* und *gea2* defizient. Die beiden Proteine Gea1p und Gea2p sind zu 50% identisch, funktionell redundant und BFA-sensitiv (Peyroche *et al.*, 1996). Beide Proteine sind im ARF1-Aktivierungsprozess und an der COPI-Vesikelbildung an den Golgi Membranen in der Hefe beteiligt. Der *gea1/2*-Doppel-*knock-out* ist letal, daher besitzen die Hefen ein Plasmid (p90), über das geringe Mengen von Gea1p in der Zelle synthetisiert werden. Dieses geringe Level von Gea1p hält die Hefen unter normalen Wachstumsbedingungen lebensfähig, jedoch nicht in Gegenwart von BFA. Von Peyroche *et al.* (1999) wurde auch gezeigt, dass die Expression von Gea1p-chimären Proteinen in APY033(p90), deren Sec7 Domäne gegen die BFA-resistente ARNO Sec7 Domäne ausgetauscht wurde, den Hefen erlaubt, in Gegenwart von BFA zu wachsen (Peyroche *et al.*, 1996). Entsprechend den Experimenten von Peyroche *et al.* wurde die Sec7 Domäne von Gea1p gegen die Sec7 Domäne von *P. falciparum* ausgetauscht. Dabei wurde auch eine verkürzte Variante verwendet, aus der die Insertionssequenz deletiert wurde (siehe Abbildung 28). Die Sequenzen für die parasitären Sec7 Domänen wurden zunächst in pCR2.1-TOPO subkloniert, sequenziert und anschließend in Hefe-Transfektionsvektoren umkloniert.

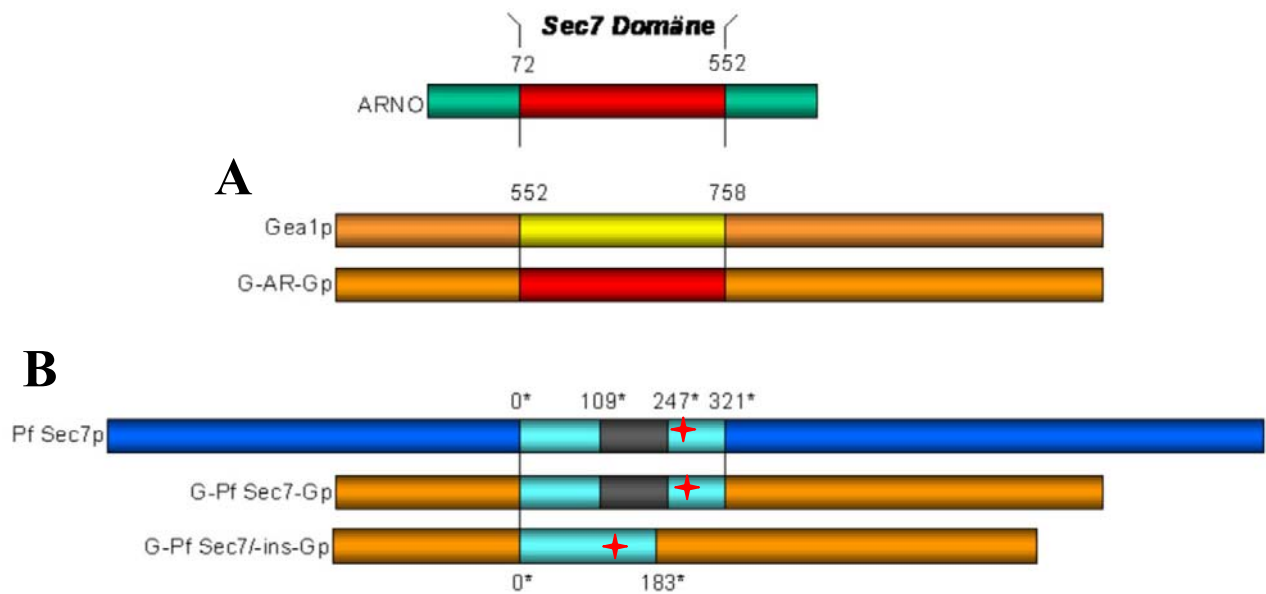


Abbildung 40: Schema der Austausche von Sec7 Domänen im Gea1p Kontext. Von Peyroche et al. wurde die Sec7 Domäne von Gea1p gegen die BFA-resistente humane ARNO Sec7 Domäne ausgetauscht (G-AR-Gp). Die resultierenden transfizierten Hefen aus diesen Experimenten waren gegen 70 µg/ml BFA im Medium resistent (Peyroche et al., 1996). Die Sec7 Domäne von Gea1 wurden im Rahmen dieser Arbeit (i) gegen die volle Länge Pf Sec7 Domäne ausgetauscht (G-Pf Sec7-Gp) oder (ii) gegen die verkürzte Variante der Pf Sec7 Domäne (G-Pf Sec7-ins-Gp). Die parasitären Varianten der Gea1-Chimären enthalten den Methionin-Isoleucin Aminosäureaustausch des resistenten Plasmodium falciparum Stammes (gekennzeichnet durch einen roten Stern, Position 251 bzw. 105 in der Sec7 Domäne).

Beide parasitären Sec7 Varianten beinhalteten die Methionin-Isoleucin-Substitution. Die transfizierten Hefen wurden in Gegenwart von BFA selektioniert. Als Kontrolle wurde die BFA-resistente APY033(p90) Hefe verwendet, die ARNO-Gea1p chimäres Protein exprimiert und bis zu 70 µg/ml BFA im Medium toleriert (Peyroche et al., 1999). Das originäre ARNO Protein ist BFA-resistent aufgrund der Aminosäuren Phenylalanin/Alanin (F/A) in Position 190/191 der Helix H (Peyroche et al., 1999). *P. falciparum* besitzt an den entsprechenden Positionen in der Sec 7 Domäne die Aminosäuren Tyrosin/Serin (Y/S).

Der verwendete Hefestamm APY033(p90) sowie Hefe-Transfektionsplasmide wurden freundlicherweise von Prof. C. Jackson (NIH, Bethesda, USA) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Hefen APY033 sind auxotroph für die Synthese der Aminosäuren Leucin, Histidin und Lysin sowie für die organischen Basen Uracil und Adenin. Normalerweise sind *S. cerevisiae* Wildtyp-Hefen für BFA impermeabel und dadurch BFA-resistent. Der verwendete APY033 Hefestamm ist allerdings defizient für die Ergosterol-Synthese, was die

Hefezellen für BFA permeabel und sensitiv macht (Graham *et al.*, 1993; Shah and Klausner, 1993; Vogel *et al.*, 1993).

Für die Klonierung der ARNO-Geal bzw. Pf Sec7-Geal Sequenzen wurde das Plasmid pAP43 verwendet. Die DNA Fragmente, die für die oben schematisch dargestellten Sec7 Domänen kodieren, wurden über Age I/Sal I Schnittstellen in pAP43 in den Geal Kontext *in frame* eingebracht. Als weitere Kontrolle wurde das Plasmid pAP23 verwendet, das für die originäre *geal* Sec7 Domäne kodiert und einen „Wildtyp-Zustand“ rekonstituiert. Die Plasmide pAP23 und die pAP43 Derivate besitzen einen Uracil-Selektionsmarker; p90 einen Tryptophan-Selektionsmarker; pAP90, pAP23 und pAP43 außerdem einen Centromer-Replikationsorigin (CEN) und einen Ampicillin-Marker (AmpR).

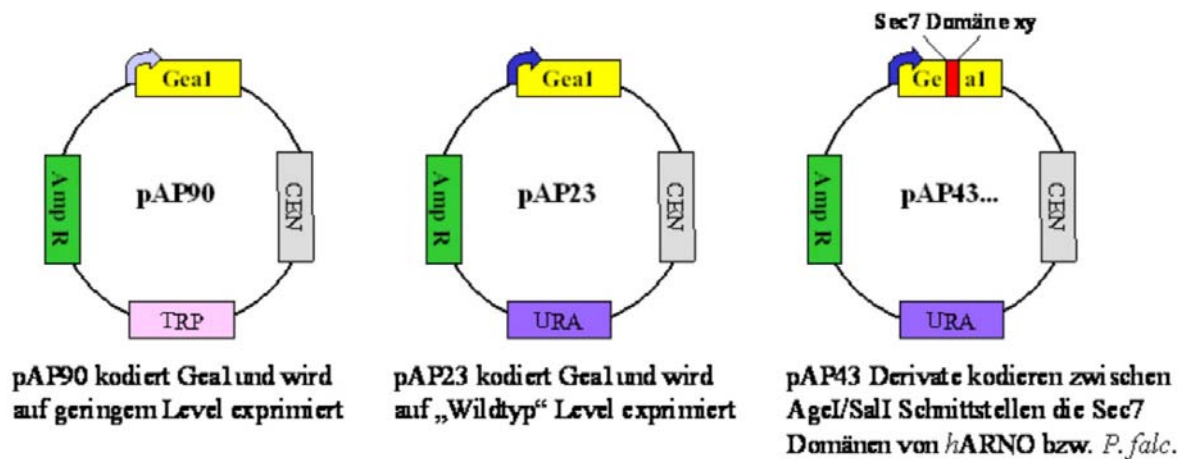


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Hefe-Transfektionsplasmide pAP90, pAP23 und pAP43

Die Plasmide pAP23 und die drei pAP43-Varianten (ARNO-Geal, Pf Sec7-Geal und Pf Sec7-ins-Geal) wurden über die Lithium-Acetat-Transformationsmethode in die Hefen eingebracht und zunächst auf Uracil/Tryptophan-Mangelmedium (SD^{UT-}) selektioniert. Dort wachsende Transfektanten wurden jeweils simultan auf Komplettmedium (YPD) und Tryptophan-Mangelmedium (SD^{T-}) ohne oder mit 70 $\mu\text{g/ml}$ BFA ausgestrichen.

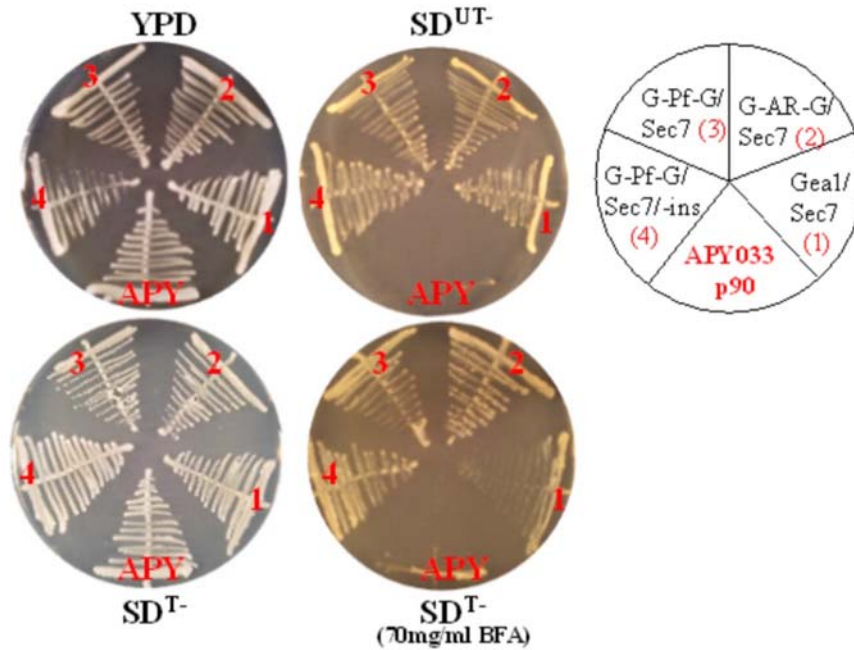


Abbildung 42: Auf den unterschiedlichen Agar-Medien wurden jeweils fünf verschiedene Hefen ausgestrichen: **APY**: nicht-transfizierter Ausgangsstamm APY033(p90), **1**: rekonstituierter Wildtyp mit pAP23, **2**: „Positivkontrolle“ = BFA-resistente ARNO-Sec7 Domäne im Geal Kontext, **3 und 4**: Pf Sec^{BFA} Domäne (**3**) mit oder ohne Insertionssequenz (**4**) im Geal Kontext. Die ausgestrichenen Hefen wurden jeweils für 2 Tage bei 30 °C inkubiert, bei Zugabe von BFA ins Medium wurde die Platte für 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert. YPD: Kompletmedium; SD^T: Definiertes Medium ohne Tryptophan; SD^{UT}: Definiertes Medium ohne Uracil und ohne Tryptophan (alle Medien mit Glukose als Kohlenstoffquelle)

Alle Hefestämme wuchsen gleichmäßig auf Kompletmedium (YPD) bzw. auf Tryptophan-Mangelmedium. Auf Uracil/Tryptophan-Mangelmedium waren nur solche Hefen in der Lage zu wachsen, die ein pAP43 (mit Uracil-Marker) Derivat trugen (1-4). Vergleicht man die Wachstumsfähigkeit der verschiedenen Hefen in Gegenwart von BFA gegeneinander, fällt auf, dass die Hefen zwei, drei und vier ungefähr gleich schnell wachsen, während nicht transfizierter APY033 gar nicht wachsen und solche mit pAP23 („Wildtyp-rekonstituierte“) sehr langsam. Es ist bekannt, dass die Menge an Gealp-Protein in der Zelle mit der BFA-Toleranz korreliert (Peyroche *et al.*, 1999). Es konnte kein quantitativer Western Blot gegen die chimären Geal-Proteine der Hefe-Stämme durchgeführt werden, da kein spezifisches Antiserum verfügbar war. Da hier gleiche Plasmide für die Expression verschiedener chimärer Proteine verwendet werden, muss davon ausgegangen werden, dass gleiche Proteinmengen synthetisiert wurden. Um genauere Unterschiede in der Wachstumsfähigkeit der PfSec7 bzw. ARNO-Hefen in Gegenwart von BFA deutlich zu machen, wurden jeweils äquivalente Zellzahlen auf den entsprechenden Medium ausplattiert.

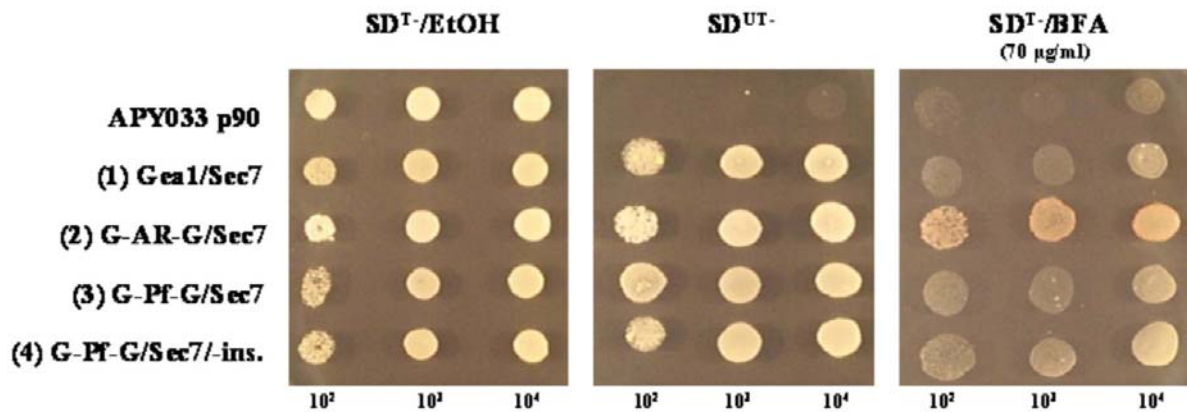


Abbildung 43: Es wurden jeweils 10^2 , 10^3 und 10^4 Zellen jedes Stammes auf SD^T -, SD^{UT} - und $SD^{T-70\mu g/ml BFA}$ aufgetragen. BFA wurde in 100% EtOH gelöst und die entsprechende Menge EtOH zum SD^T -Medium zugegeben. Die Nummerierung der verschiedenen Hefen entspricht den bereits oben verwendeten Zahlen.

In der Wachstumsschnelligkeit zwischen der BFA-resistenten G-ARNO-G/Sec7-Hefe (2) und den G-PfSec7-G-Hefen (3,4) auf BFA-haltigem Medium ist ein Unterschied zu erkennen, was in der stärksten Verdünnung der Zellen (10^2) am deutlichsten wird. Die Pf-Sec7-Hefestämme (3,4) mit oder ohne Insertionssequenz wachsen beide vergleichbar auf BFA-Medium etwas langsamer als G-AR-G (2); im Vergleich zum „Wildtyp“ (1) allerdings schneller. Die Pf Sec7BFA Domäne vermittelt den Hefen eine intermediäre BFA-Resistenz, die über dem „Wildtyp“ (1), aber unter der BFA-resistenten Positivkontrolle (2) liegt. Die Präsenz der Insertionssequenz führt zu keinen - in diesem experimentellen Ansatz sichtbaren - Unterschieden für die Hefen.

Im Folgenden wurden die in den verschiedenen Hefen vorliegenden Plasmide mittels PCR überprüft. Dazu wurden zum Einen Sec7-spezifische Primer verwendet, zum Anderen Primer, die das Uracil-Markergen der pAP43 Derivate amplifizieren. Als *template* wurden Hefe-Gesamtllysate bzw. Spheroblasten-Präparationen in die PCRs eingesetzt.

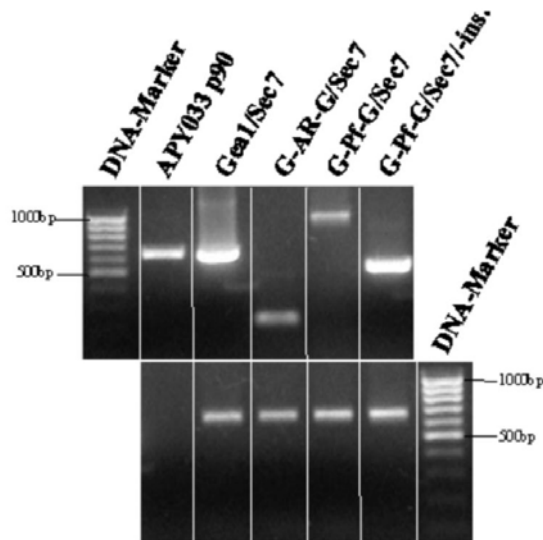
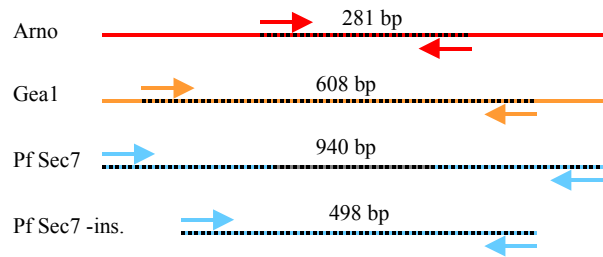


Abbildung 44: 1,2 %iges Agarose/EtBr Gel



Die transfizierten Hefen wurden mit Sec7-Domänen-spezifischen Primern analysiert. Jeder Stamm zeigt ein spezifisches PCR-Produkt für die ARNO-, Hefe- oder Pf-Sec7 Domänen (+/- Insertion). Der untere Teil der

Abbildung zeigt ein Uracil-Marker-Genfragment, das aus den Hefen, die pAP43 Derivate beinhalteten, amplifiziert werden konnte (670 bp).

Die Größe der PCR-Produkte bestätigt das Vorliegen der unterschiedlichen pAP43 Derivate in den jeweiligen Hefen. Die mit spezifischen Primern amplifizierten Fragmente konnten aufgrund der unterschiedlichen Größen identifiziert werden.

4.2.13 Fazit 3

Über die *P. falciparum* Transfektionen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Punktmutation der Sec7 Region des FCB^{BFA} Stammes ausreichend ist, um den Parasiten BFA-Resistenz zu vermitteln. Das Einbringen dieser Mutation in das Hefe Gea1p sollte ebenfalls BFA-Resistenz erzeugen. Die Wachstumsfähigkeit der transfizierten Hefen unterscheidet sich nicht erkennbar durch das Vorliegen oder die Abwesenheit der Pf Sec7 Insertionssequenz. Möglicherweise übt die Insertion ausschließlich parasitenspezifische Funktionen aus. Der „intermediäre“ Wachstums-Phänotyp der transfizierten Hefen deutet darauf hin, dass die parasitäre Sec7 Domäne - mit oder ohne Insertion – nur zwar im Gea1 Kontext in der Hefe funktioniert aber möglicherweise funktionell eingeschränkt ist. Die Ergebnisse, die mittels der Hefe-Transfektionsexperimente erzielt werden konnten, weisen darauf hin, dass die Pf Sec7 Domäne grundsätzlich die Hefe Gea1 Sec7 Domäne funktionell komplementieren kann. Daher kann angenommen werden, dass die Pf Sec7 Domäne als katalytischer Anteil des parasitären Arf-Gefs *in vivo* funktionsfähig ist.

5. Diskussion

5.1 Sezernierte Proteine von *Plasmodium falciparum*

P. falciparum transportiert Proteine zu zahlreichen Bestimmungsorten innerhalb des Parasiten sowie in die Wirtszelle (Lingelbach, 1997; van Dooren *et al.*, 2000). Parasitenproteine, die zur Erythrozytenoberfläche transportiert werden, stehen in Verbindung mit den schweren klinischen Symptomen der Malaria tropica (zusammengefasst in Cooke *et al.*, 2000). Der hohen Anzahl der Zielorte für sekretorische Parasitenproteine steht gegenüber, dass in erythrozytären Entwicklungsstadien des Parasiten möglicherweise kein definierter Golgi-Apparat vorhanden ist (Bannister and Mitchell, 1995); Ward *et al.*, 1997; (Bannister *et al.*, 2000), der in anderen eukaryotischen Zellen eine zentrale Sortierungseinrichtung darstellt. Der Parasit benötigt für die Sekretion dieser Proteine eine Transportmaschinerie, die sekretorische Kompartimente und Helfermoleküle, die als Mediatoren im Proteintransport wirken, einschließt. Der Export der meisten Parasitenproteine, wie auch Gbp130, ist *in vivo* BFA-sensitiv ist (Benting *et al.*, 1994 b; Nacer *et al.*, 2001). Dies spricht dafür, dass der Transport dieser Proteine über den ER-Golgi Sekretionsweg erfolgt. Einige Parasitenproteine werden jedoch auch in Gegenwart von BFA sezerniert (Elmendorf *et al.*, 1992; Mattei *et al.*, 1999). Aufgrund dieser zellbiologischen Besonderheiten wurde die Existenz verschiedener sekretorischer Transportwege postuliert (Elmendorf *et al.*, 1992; Wisner *et al.*, 1999). Zur Abgrenzung dieser potentiell unterschiedlichen Sekretionswege ist die Identifizierung und molekulare Analyse von involvierten Mediatormolekülen in *P. falciparum* von zentraler Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde einerseits die interne hydrophobe Region von Gbp130 auf ihre funktionelle Eignung als ER-Signalsequenz und andererseits die konservierte Sec7 Domäne des am COP I-Vesikeltransport beteiligten *PfArf*-Gef untersucht. Nach derzeitigem Stand der Kenntnis sind die molekularen Mechanismen und Moleküle der Proteinsekretion im Tier- und Pflanzenreich sehr konserviert (Fung *et al.*, 1992; Galliciotti *et al.*, 2001; Keenan *et al.*, 2001; Jurgens and Geldner, 2002; Burri and Lithgow, 2004). Die ausgewählten Proteindomänen konnten daher in heterologen Hefe-Rekonstitutionsexperimenten analysiert werden. Die Sec7 Domäne von Arf-Gef wurde außerdem in Transfektionsexperimenten mit *P. falciparum* untersucht und die experimentellen Systeme verglichen.

5.2 Funktionelle Analyse von *Plasmodium falciparum* Antigenen in homologen bzw. heterologen Expressionssystemen

Die Möglichkeiten zur genetischen Manipulation von *P. falciparum* sind zur Zeit noch limitiert, obwohl die Sequenz des Parasiten-Genoms nahezu vollständig bekannt ist (Gardner *et al.*, 2002). Im Jahr 1996 wurde erstmalig die stabile Integration von rekombinanter DNA mittels *single cross-over* in das *P. falciparum* Genom durchgeführt (Wu *et al.*, 1996). Der Austausch zwischen genomischen Sequenzen und homologen Plasmid DNA-Sequenzen über *double cross-over* Rekombination wurde 2002 gezeigt. Dabei war es erforderlich, die transfizierten Parasiten negativ zu selektionieren (Duraisingh *et al.*, 2002). RNA Interferenz (RNAi) wurde bisher erst in zwei Studien in *P. falciparum* nachgewiesen und bietet eine Alternative zur langwierigen Selektion von Plasmid-transfizierten Parasiten (Malhotra *et al.*, 2002; McRobert and McConkey, 2002). Die Komplementation von Genen des Parasiten, die zuvor deletiert wurden, konnte bisher *in vivo* nicht gezeigt werden, da diese Linien enorme Wachstumsdefizite aufweisen (Crabb, 2002). Die Expression von Transgenen in *P. falciparum* ist generell problematisch, da der Einsatz von „falschen“ Promotoren zur Fehlregulationen der Transkription führen und so toxische Effekte auf den Parasiten haben kann (Crabb, 2002). Insgesamt sind die heute zur Verfügung stehenden genetischen Manipulationsmöglichkeiten mit *P. falciparum* im Vergleich zu anderen eukaryotischen Zellen sehr eingeschränkt oder experimentell aufwendig (zusammengefasst in Gardiner *et al.*, 2003). Daher wurde in der Vergangenheit häufig auf heterologe Systeme zurückgegriffen, um Funktionsanalysen von *P. falciparum* Antigenen durchführen zu können. In einigen Studien wurden *P. falciparum* Antigene in der Hefe exprimiert, beispielsweise PfCRT (*antimalarial drug resistance protein*) (Zhang *et al.*, 2002), Dihydrofolatreduktase (Wooden *et al.*, 1997) und AMA1 (*apical membrane protein 1*) (Kocken *et al.*, 2002). Allerdings stellten hierbei die ungewöhnlichen Kodon-Präferenzen des Parasiten durch sein AT-reiches Genom eine Schwierigkeit dar, die teilweise durch Rückübersetzung des Proteins und Einsatz von bevorzugten Hefe-Kodons überwunden werden konnte (Kocken *et al.*, 2002; Yadava *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2002). Des Weiteren konnten *P. falciparum* Gene für Phosphatase Typ1 (Bhattacharyya *et al.*, 2002), GPI-1 (Shams-Eldin *et al.*, 2002), bifunktionale Dihydrofolat-Synthetase-Folylpolyglutamat-Synthetase (PfdHFS-FPGS) (Salcedo *et al.*, 2001) sowie der Ste6-Transporter (Volkman *et al.*, 1995) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert und die Komplementation der jeweiligen Hefe-Homologen nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde die Hefe *S. cerevisiae* als experimentelles System für Transfektionen mit

rekombinanten Plasmiden, die für konservierte *P. falciparum* Proteindomänen kodieren, etabliert.

5.2.1 Signal Sequence Trap

Die Gbp130 N-terminale Region und verkürzte Varianten dieser Region wurden in einem *Signal Sequence Trap* (SST) als potentielle ER-Signalsequenzen in der Hefe *S. cerevisiae* getestet. Mittels RACE-PCR wurde zuvor nachgewiesen, dass die analysierte Sequenz des gbp130-Transkripts nicht durch alternative *splicing* Vorgänge modifiziert wird. Für die rekombinanten Hefe-SST-Vektoren wurden daher gbp130-Sequenzen, die der genomischen gbp130-Sequenz entsprechen, bzw. verkürzte Varianten, verwendet. Die eingesetzte SST-Methode erlaubt die Identifikation von heterologen Signalsequenzen, da bereits eine geringe Menge sezernierter Invertase ausreicht, um positiv aus dem Selektionsverfahren hervorzugehen (Kaiser *et al.*, 1987). Die Wachstumsfähigkeit der transfizierten Hefe-Linien auf Raffinose-Medium ist davon abhängig, ob Invertase sezerniert wird, um den Zucker zum Wachstum zu verwerten (Jacobs *et al.*, 1997; Jacobs *et al.*, 1999). Als *P. falciparum* Positivkontrolle im SST wurde die *PfExp1*-Signalsequenz verwendet, von der die Funktionalität für ER-Translokation *in vitro* nachgewiesen wurde (Gunther *et al.*, 1991). In *P. falciparum*-Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die *Exp1*-Signalsequenz zur Sekretion von Reporterproteinen führte (Adisa *et al.*, 2003; Burghaus and Lingelbach, 2001). Bei Verwendung der *Exp-1*-Signalsequenz in dieser Arbeit zeigte sich im SST/YTK12-Hefesystem, dass die klassische N-terminale *Exp-1* Signalsequenz die Invertasesekretion der Hefen nur zu einem sehr geringen Anteil ermöglichte und offenbar nur extrem eingeschränkt als ER-Signalpeptid in der Hefe funktionierte. Vor diesem Hintergrund sind die negativen Ergebnisse, die mit den verschiedenen *Pf gbp130* Konstrukten erzielt werden konnten, schwer auswertbar. Die Funktionsfähigkeit des verwendeten SST-Hefe Systems wurde mittels einer klassischen Signalsequenz des Oberflächenproteins Ta4 aus *E. tenella* (Brothers *et al.*, 1988) in dieser Arbeit nachgewiesen. Frühere Studien mit diesem System zeigten, dass auch mit artifiziellen Signalsequenzen Invertase-Sekretion wieder hergestellt werden konnte (Klein *et al.*, 1996). Möglicherweise lässt sich die Invertase-Sekretion in den YTK12 Hefen mit *P. falciparum*-Sequenzen generell nur ineffizient rekonstituieren. Die *Plasmodium*-Signalsequenz von *Exp-1* bzw. die N-terminale Gbp130-Sequenz und deren Varianten wurden über den Signalsequenz-Algorithmus SignalP V1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) einer Bewertung unterzogen. Die Vorhersagen, die mittels des SignalP V1.1 Programms erstellt wurden, können Hinweise auf

die grundsätzliche Eignung einer gegebenen Sequenz als Signalpeptid geben, allerdings ist bei den *in silico* Beurteilungen des Algorithmus zu beachten, dass die Vorgaben zur Berechnung von Signalsequenzen auf bekannten „klassischen“ Signalsequenzen basieren (Nielsen *et al.*, 1997a, b). Den Vorhersagen gemäß erschien die *P. falciparum* Exp-1 Signalsequenz eindeutig als N-terminale, spaltbare Signalsequenz und damit als geeignete „Positivkontrolle“ und die Gbp130/M3-Sequenz als vielversprechende Variante für den Einsatz im SST-Verfahren. Möglicherweise kann jedoch im heterologen Hefe-System die Translokation in den sekretorischen Weg über untypische Signalsequenzen des Parasiten generell nicht bzw. extrem eingeschränkt rekonstituiert werden, da

- (i) für den Export von Proteinen, die bis in die Wirtszelle transportiert werden sollen, besondere parasitenspezifische Kompartimente, wie beispielsweise das von Wiser (1999) postulierte sekundäre ER benutzt werden könnten. In diesem Szenario würden naszierende Peptide mit „untypischen“ Signalsequenzen direkt zu diesen speziellen Kompartimenten dirigiert (Wiser *et al.*, 1999).
- (ii) möglicherweise „untypische“ von klassischen N-terminalen Signalsequenzen über parasitenspezifische Helfermoleküle diskriminiert werden, die im heterologen Expressionssystem nicht vorhanden sind.
- (iii) eine *SRP*-unabhängige Translokation von Proteinen mit „untypischen“ Signalsequenzen ins ER stattfinden könnte. Dieser generelle Mechanismus ist zwar aus verschiedenen anderen eukaryotischen Zellen bekannt (Wiech *et al.*, 1990; Hann and Walter, 1991; Schlenstedt *et al.*, 1992; Ng *et al.*, 1996), könnte aber parasitenspezifisch modifiziert sein.
- (iv) möglicherweise Parasitenproteine mit internen Signalsequenzen an späterer Stelle in Sekretionsweg eintreten, wobei diese Eintrittsstellen eventuell parasitenspezifisch sind. Für humanes Interleukin-beta, das keine Signalsequenz besitzt, wurde gezeigt, dass es post-ER in den sekretorischen Weg gelangt (Rubartelli *et al.*, 1990).

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Untersuchung der *PfGbp130*-Sequenz zeigen, dass über die Verwendung eines heterologen experimentellen Systems zur Rekonstitution komplexer Mechanismen wie ER-Translokation und Sekretion keine endgültige Bewertung über die Funktionalität der getesteten Bereiche abgegeben werden kann. Viele der in die Wirtszelle exportierten Parasitenproteine besitzen interne hydrophobe Regionen, die als Signalsequenz fungieren könnten. Daher bleibt die Analyse

dieser Regionen eine wichtige Voraussetzung zum Verständnis der Funktionsweise des Sekretionsapparates in *P. falciparum*.

5.3 Der Arf-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (Arf-Gef) von *Plasmodium falciparum*

Brefeldin A (BFA) blockiert den Proteinexport von Gbp130 (Benting *et al.*, 1994) sowie der meisten sezernierten Parasitenproteine. Dabei ist die konservierte Sec7 Domäne des ARF-GEF der Hauptangriffspunkt von BFA und inhibiert die Rekrutierung von *coat* Proteinen zur Membran und die Ausbildung von COP I-Transportvesikeln (Mansour *et al.*, 1999; Robineau *et al.*, 2000; Sata *et al.*, 1998). Durch die Analyse eines über kontinuierliche *drug*-Selektion generierten BFA-resistenten Parasitenstammes konnte in der Sequenz der Sec7 Domäne eine Punktmutation identifiziert werden, die zu einem Methionin-Isoleucin Austausch in der Helix H führt und von der angenommen wurde, dass sie direkt mit dem BFA-resistenten Phänotyp in Verbindung steht (Baumgartner *et al.*, 2001)¹.

Um zu überprüfen, ob die Punktmutation, die im BFA-resistenten FCBR^{BFA} Stamm identifiziert wurde, ausreichend ist, um BFA-Resistenz zu vermitteln, wurde diese Mutation über Transfektionen in BFA-sensitive 3D7 Parasiten eingebracht. Es konnte ein stabiles *double cross-over* Integrationsereignis der Plasmid-kodierten Sec7^{BFA} Region in den *arf-gef* Leserahmen herbeigeführt werden. Parasiten mit *single cross-over* Genotyp wurden nicht detektiert, da die Integration von Plasmidresten in das *arf-gef* Gen die Unterbrechung eines essentiellen Leserahmens zur Folge gehabt hätte und daher mit großer Wahrscheinlichkeit letal wäre. Die resultierenden transgenen Parasiten, in denen die Plasmid-Sec7^{BFA}-Region (inklusive Insertion) gegen die endogene Sec7 Region ausgetauscht wurde, waren resistent gegenüber letalen BFA-Konzentrationen im Kulturmedium.

Nach Transfektion der 3D7 Parasiten mit pH-TK/Sec7^{BFA} Vektoren (mit und ohne Insertionssequenz) wurden die Parasiten kontinuierlich in Gegenwart von WR99210 kultiviert und darüber solche Parasiten selektioniert, die über das Plasmid-kodierte humane *dhfr* Gen WR99210-resistent waren. Die Selektion mit WR99210 über sechs Wochen war vermutlich deswegen notwendig, weil bei der Transfektion über die Elektroporations-Methode möglicherweise ein großer Anteil infizierter Erythrozyten desintegrierte und sich erst nach Ablauf von ca. 20 Teilungszyklen die intakten, Plasmid-tragenden Parasiten ausreichend vermehrt hatten. Diese Plasmid-transfizierten, WR99210-resistenten Parasiten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von BFA bzw. mit Kombinationen von Ganciclovir und BFA, jedoch ohne WR99210, behandelt, um auf *double cross-over* Ereignisse der Sec7^{BFA} Sequenz

¹ Baumgartner F, **Wiek S**, Paprotka K, Zauner S, and Lingelbach K

in den arf-gef Leserahmen zu selektionieren (siehe Tabelle 4). Dabei konnten in drei Fällen nach periodischer *on/off-drug*-Behandlung BFA-resistente 3D7 Parasiten beobachtet werden: Bei Behandlung mit (i) 5 µg/ml BFA, (ii) 10 µg/ml BFA und (iii) 2µM Ganciclovir in Kombination mit 5 µg/ml BFA. In allen Fällen handelte es sich um die mit pH-TK *PfSec7*^{BFA} (inklusive Insertionssequenz) transfizierten Parasiten.

Von Duraisingh *et al.* (2002) wurden 4µM Ganciclovir in Kombination mit 5 nM WR99210 eingesetzt, um transgene Parasiten zu selektionieren („negative Selektion“). Dabei waren nur solche Parasiten sensitiv gegenüber Ganciclovir, die episomale pH-TK-Plasmid-Derivate trugen oder über ein *single cross-over* Integrationsereignis den *tk* Genbereich des Plasmids in das Genom integriert hatten (Taylor *et al.*, 2001; Duraisingh *et al.*, 2002). In dieser Studie wurde ein Gen *knock-out* über die Integration des *hdhfr* Gens ins Zielgen generiert. Das *hdhfr* Selektionsgen war hierbei sowohl vom Plasmid über den *PfCalmodulin* Promoter, als auch nach der Integration in das Genom über den endogenen Promoter aktiv. Die Zugabe von Ganciclovir war notwendig, um die transgenen Parasiten, bei denen ein Integrationsereignis stattgefunden hat, selektionieren zu können, da man davon ausgehen musste, dass *knock-out*-Parasiten gegenüber solchen Parasiten, die episomale Plasmide tragen aber ansonsten Wildtyp sind, grundsätzlich Wachstumsnachteile aufweisen könnten (Gardiner *et al.*, 2003). Dem Gegenüber konnten in der hier vorliegenden Arbeit aus den mit pH-TK*PfSec7*^{BFA} Plasmiden transfizierten Parasitenkulturen nach Zugabe von inhibitorischen Ganciclovir-Konzentrationen keine vitalen Parasiten erhalten werden. Durch die Ganciclovir-Zugabe wurde möglicherweise die Anzahl der transgenen Parasiten mit dem gewünschten Genotyp soweit reduziert, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen keine transgenen Parasiten nachgewiesen werden konnten, da grundsätzlich alle Zellen, die funktionelle Thymidinkinase exprimieren, in Gegenwart von Ganciclovir abgetötet werden (Moolten, 1986) und dabei auch solche Zellen eliminiert werden, die zwar ein stabiles *double cross-over* Integrationsereignis aufweisen, aber auch zusätzlich episomale Plasmide tragen.

Von einigen Autoren wird generell eine niedrige Frequenz für *double cross-over* Ereignisse im Vergleich zu *single cross-over* Ereignissen in *Plasmodium falciparum* propagiert (Crabb *et al.*, 1997; Duraisingh *et al.*, 2002). Möglicherweise erfolgt ein *double cross-over* über eine erste, *single cross-over* Zwischenstufe (Triglia *et al.*, 1997), die dann über negativen Selektionsdruck (beispielsweise über *tk* Gen-Expression und Ganciclovir-Selektion) zum *double cross-over* fortgesetzt wird (Duraisingh *et al.*, 2002). Die Transfektionsergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *double cross-over* Vorgänge ohne negativen Selektionsdruck in *P. falciparum* herbeigeführt werden können. Der hier

beschriebene Versuchsansatz war durchführbar, da eine erfolgreiche Integration des Transgens in einen positiv selektionierbaren Phänotyp resultierte. Über diese Technologie könnten weitere Mutationen in anderen Genen auf ihr Potential erhöhte Wirkstoff-Resistenz zu verursachen, getestet werden.

Eine der drei BFA-resistenten transgenen 3D7^{BFA} Parasitenlinien wurde im Detail analysiert. Diese Parasiten wurden mit 200 nM Pyrimethamin (substituiert 5 nM WR99210) oder 4 µM Ganciclovir im Medium kultiviert. Dabei stellte sich heraus, dass die Parasiten sensitiv gegen Pyrimethamin waren, sich jedoch als resistent gegen Ganciclovir erwiesen, was auf das Fehlen von episomalen pH-TK-Plasmid-Derivaten hindeutet. Die BFA-Mutation sowie die stille Markermutation, die in die Transfektionsplasmide eingeführt wurde, konnte in der cDNA der transgenen Linie nachgewiesen werden und beweist, dass ein *double crossover* Austausch der endogenen gegen die plasmid-kodierte Sec7 Region in den Leserahmen des arf-gef Gens stattgefunden haben muss. Des Weiteren wurde auch die dritte Mutation (Position 1381 des ARF-GEF Proteins) identifiziert, die zu einem konservativen Valin zu Isoleucin (V-I) Austausch innerhalb der Insertionssequenz führt. Es ist nicht davon auszugehen, dass dieser Aminosäure-Austausch in den transgenen 3D7 Parasiten die BFA-Resistenz beeinflusst, da im arf-gef Gen des FCBR^{BFA} Stammes an dieser Stelle keine solche Substitution vorhanden ist und der Bereich der Insertion großen Abstand von der *hot spot* Region für BFA-Sensitivität hat (Jackson and Casanova, 2000). Über diese Mutation wird ein in das Genom integrierter transgener Bereich von mindestens 218 bp markiert. Mittels *Southern blot* Hybridisierung von genomischer DNA aus der parentalen 3D7 Linie sowie der transgenen BFA-resistenten 3D7^{BFA} Linie mit einer Sec7-DNA-Sonde konnte gezeigt werden, dass keine Re-Arrangements in Form von Genduplikationen oder Transpositionen der genomischen Organisation des arf-gef Gens im 3D7^{BFA} Stamm vorliegen, durch die eine erhöhte BFA-Resistenz begründet sein könnte.

5.4 Komplementiert die *P. falciparum* Sec7 Domäne die *S. cerevisiae* Gea1 Sec7 Domäne?

Aufgrund der hohen Sequenzhomologien zu anderen Organismen im Bereich der PfSec7 Domäne ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass der identifizierte *P. falciparum* Leserahmen ein arf-gef Gen darstellt. Grundsätzlich lässt sich die Sec7-Proteinfamilie in zwei übergeordnete Klassen unterteilen: 1. „große“ (*high molecular weight*) Arf-Gef, > 100 kDa; und 2. „kleine“ (*low molecular weight*) Arf-Gef Proteine, < 100 kDa (Jackson and Casanova, 2000). Die Mitglieder der Klasse der großen Arf-Gef Proteine sind an Protein-Transportprozessen beteiligt. Das PfArf-Gef kann aufgrund der Größe des Gens bzw.

der Transkripte der *high molecular weight*-Gruppe zugerechnet werden. Die „kleinen“ Arf-Gef Proteine wurden bisher nur in höheren eukaryotischen Zellen identifiziert und sind hauptsächlich an Signal-Transduktions-Prozessen beteiligt. Die Hefe *S. cerevisiae* beispielsweise kodiert keine „kleinen“ Arf-Gef Proteine (zusammengefasst in Jackson and Casanova, 2000). Die Expression der *P. falciparum* Sec7 Domäne einem *gea1/2*-defizienten Hefestamm sollte klären, dass die *Pf*Sec7 Domäne als katalytische Domäne in einem Arf-Gef funktionell ist. Dabei wurde die Punktmutation, die in *P. falciparum* BFA-Resistenz vermittelt, als Selektionsmarker eingesetzt. Die Wachstumsraten der transfizierten Hefen in Gegenwart von BFA lagen für beide *Pf* Sec7-Varianten (mit oder ohne Insertion) intermediär zwischen der BFA-resistenten ARNO-Positivkontrolle und der p23-„Wildtyp“ Hefe. Die eingebrachte Punktmutation der *Pf*Sec7 Domäne vermittelt den Hefen im Gea1p Kontext offenbar eine intermediäre BFA-Resistenz. Dabei ist kein Unterschied zwischen den Hefen zu erkennen, die Gea1-*Pf*Sec7 inklusive Insertion exprimieren und solchen, die Gea1-*Pf*Sec7 ohne Insertion synthetisieren. Das Vorliegen des Einschubes wirkt sich in der Hefe offenbar nicht auf die Funktionalität des chimären Gea1p Proteins aus. Die eingebrachte *Pf*Sec7^{BFA} Domäne vermittelte den Hefen zwar BFA-Resistenz, möglicherweise wird aber dieser positive Effekt auf die Wachstumsfähigkeit durch eine generell verminderte Funktionalität der chimären *Pf* Sec7-Gea1p Proteine wiederum eingeschränkt. Der intermediäre Phänotyp der transfizierten Hefen konnte aufgrund fehlender vergleichbarer Studien schwer interpretiert werden, weist aber darauf hin, dass parasitenspezifische Besonderheiten bezüglich der Funktionsweise des Arf-Gef Aktivität vorliegen könnten.

5.5 Welche Rolle spielt die Sec7-Insertionssequenz im Arf-Gef für den Parasiten?

Über die in dieser Arbeit dargestellten Transfektionsexperimente konnte die *Pf*Sec7-Insertionssequenz nicht aus dem *P. falciparum* Genom deletiert werden. Es konnten keine BFA-resistenten Parasiten mit Plasmid-Konstrukten, aus denen die Insertion der Sec7 Domäne deletiert wurde, generiert werden. In der Hefe waren keine Unterschiede bezüglich der Aktivität des chimären Gea1-*Pf*Sec7 Proteins mit oder ohne Insertion zu beobachten. Möglicherweise übt die Insertion eine parasitenspezifische Funktion aus.

Arf-Gef Proteine anderer eukaryotischer Zellen können teilweise mehrere verschiedene Arf Moleküle aktivieren; jedoch beschränkt sich die Aktivierungsaktivität häufig auf eine Klasse von Arf-Molekülen (Jackson and Casanova, 2000). Beispielsweise aktiviert das humane Arf-Gef GBF1 *in vivo* Klasse I Arf-Moleküle (an der Ausbildung von Vesikel-Ummantelungen beteiligt), kann aber *in vitro* auch Klasse II Arf 5 aktivieren. *S.*

cerevisiae besitzt mindestens vier Arf-Gef Proteine, die teilweise promiskuitiv mit verschiedenen Arf-Molekülen interagieren (Jackson and Casanova, 2000). Berücksichtigt man die Existenz von mehreren verschiedenen Arf Proteinen in *P. falciparum* (Truong *et al.*, 1997) ist es auffällig, dass nur eine Art Arf-Gef Protein zu deren Aktivierung vorhanden ist. Möglicherweise besteht eine Funktion der Insertionssequenz in *P. falciparum* darin, räumliche Flexibilität der Sec7 Domäne zu erschaffen und so die Interaktion mit verschiedenen Arf Molekülarten zu ermöglichen. Es ist zur Zeit unbekannt, welche Folgen sich aufgrund dieses Einschubes bezüglich der räumlichen Konformation des *Pf* Arf-Gef Proteins bzw. der Sec7 Domäne ergeben und welche funktionellen Eigenschaften damit zusammenhängen könnten. Die *in silico*-Modellierung der *P. falciparum* Sec7 zeigte signifikante Ähnlichkeiten in der räumlichen Struktur der 10 α -Helices der Sec7 Domäne mit der als *template* zur räumlichen Modellierung benutzten ARNO Sec7 Domäne. Die *P. falciparum* Insertionssequenz konnte in das räumliche Alignment nicht einbezogen werden, da keine entsprechenden Sequenzen aus anderen Organismen bekannt sind. Die Position der ausgesparten Insertion liegt in einem *loop* zwischen den Helices G und H, die beide direkt an der Ausbildung der hydrophoben Grube, die mit Arf interagiert, beteiligt sind.

Für eine Reihe anderer *P. falciparum* Proteine ist bekannt, dass sie Insertionsbereiche in Proteinen besitzen, die sich in den homologen Gegenstücken anderer Organismen nicht finden. Diese Insertionssequenzen sind in verschiedenen *Plasmodien*-Arten konserviert (siehe Tabelle 6). In den meisten Fällen ist nicht bekannt, welche Funktionen diese Sequenzbereiche ausüben oder ob sie essentiell sind. Die Insertionen in den Arf-Gef Proteinen zwischen *P. berghei*, *P. knowlesi* und *P. yoelii* sind zu ca. 50 % identisch. Auch die *Plasmodien*-Insertionen in der Glutathion-Reduktase, im Flavoprotein und anderen Proteinen sind sehr konserviert. Die hohe Konserviertheit der *Plasmodium*-Insertionen deutet insgesamt darauf hin, dass diese Bereiche Funktionen besitzen, die für den Parasiten von Bedeutung sind. Im Fall der Glutathion-Reduktase wurde nachgewiesen, dass eine der beiden Einschubsequenzen für die enzymatische Aktivität des Proteins *in vitro* notwendig ist (Gilberger *et al.*, 2000). Es wurden bisher noch keine Transfektionsexperimente mit *P. falciparum* durchgeführt, bei denen Insertionssequenzen *in vivo* deletiert werden konnten.

Protein	Größe (AS)	Insertion Größe(AS)	Genkopien	Insertionsgröße (AS)/ % Identität zu Pf	Insertionsgröße/ % Homologie zu Pf	Eigenschaften der Insertion	Referenzen
<i>Arf-Gef c14m2</i>	3370	146	1	<i>Pb</i> 137/ 50 <i>Pk</i> 139/ 51 <i>Fy</i> 137/ 49 <i>Tg</i> 132/ 10	<i>Pb</i> 137/ 71 <i>Pk</i> 139/ 71 <i>Fy</i> 137/ 71 <i>Tg</i> 132/ 42	2low complexity regions	<i>Baumgartner et al., 2001</i>
<i>Laktat DH PF13_0141</i>	316	5	1	<i>Pb</i> 5/ 100 <i>Fy</i> 5/ 100 <i>Fv</i> 5/ 100	<i>Pb</i> 5/ 100 <i>Fy</i> 5/ 100 <i>Fv</i> 5/ 100	Insertion im aktiven Zentrum	<i>Bzik et al., 1993</i> <i>Dunn et al., 1996</i> <i>Winter et al., 2003</i>
<i>Glutathion R PF14_0192</i>	500	(i) 19 (ii) 41	1	<i>Pb</i> (i) 16/ 42 (ii) 41/ 71 <i>Fy</i> (i) 16/ 32 (ii) 41/ 76 <i>Pk</i> (i) 34/ 32 (ii) 41/ 78	<i>Pb</i> (i) 16/ 68 (ii) 41/ 88 <i>Fy</i> (i) 16/ 58 (ii) 41/ 90 <i>Pk</i> (i) 34/ 79 (ii) 41/ 88	(ii) <i>in vitro</i> essentiell	<i>Gilberger et al., 2000</i> <i>Sarna et al., 2003</i>
<i>biDHFR/TS PF08030w</i>	627	94	1	<i>Pb</i> 65/ 34 <i>Fy</i> 65/ 34 <i>Fv</i> 100/ 26 <i>Sp</i> 34/ 9 <i>Pk</i> 103/ 30	<i>Pb</i> 65/ 48 <i>Fy</i> 65/ 48 <i>Fv</i> 100/ 48 <i>Sp</i> 34/ 19 <i>Pk</i> 103/ 54	Ins. separiert DHFR und TS Domänen	<i>De Pecoulas et al., 1998</i>
<i>Flavoprotein/ Succinate DH PF10_0334</i>	631	12	1	<i>Pb</i> 12/ 58 <i>Fy</i> 12/ 58 <i>Fv</i> 12/ 33 <i>Pk</i> 12/ 42	<i>Pb</i> 12/ 75 <i>Fy</i> 12/ 75 <i>Fv</i> 12/ 33 <i>Pk</i> 12/ 67		<i>Takwo et al., 2000</i>
<i>Rab5a PFB0500c</i>	236	36	11 (Familie)		Keine Homologen bekannt		<i>Gardner et al., 1998</i> <i>Quevillon et al., 2003</i>
<i>Glu6PDH/6P PGL PF14_0511</i>	910	61	1	<i>Pb</i> 86/ 26 <i>Fy</i> 101/ 26 <i>Pk</i> 60/ 8	<i>Pb</i> 86/ 48 <i>Fy</i> 101/ 51 <i>Pk</i> 60/ 26	ess. für 6PGL Funktion im Pb Protein	<i>Clarke et al., 2001</i> <i>Clarke et al., 2003</i>

Tabelle 6: Zusammenstellung von *P. falciparum* Proteinen, die Insertionssequenzen aufweisen. Diese Insertionen sind in verschiedenen Plasmodium-Arten sehr konserviert, während sie keine Gegenstücke in den homologen Proteinen anderer eukaryotischer Zellen haben. Die Prozentzahlen beziehen sich jeweils auf die *P. falciparum* Aminosäuresequenz. Die Werte wurden über Clustal X kalkuliert. Abk.: DH: Dehydrogenase, R: Reduktase: biDHFR/TS: bifunktionale Dihydrofolatreduktase/ Thymidylatsynthase, Glu6PDH/6PGL: Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-6Phophogluconolactonase

5.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die gezielte Integration von DNA-Sequenzbereichen über *double cross-over* Rekombination ohne negative Selektion in *P. falciparum* möglich ist. Soweit die Integration der DNA einen selektionierbaren Phänotyp erzeugt, können transgene Parasiten generiert werden. Diese Methode könnte weiterhin eingesetzt werden, um die zugrundeliegenden Mutationen für Wirkstoff-Resistenzen des Parasiten *in vivo* zu identifizieren. Über die Etablierung von Transfektionsmethoden mit linearisierter DNA, die selektionierbare Punktmutationen aufweist, könnte die genetische Manipulation der Parasiten zukünftig vereinfacht werden, da keine langfristige Selektion auf die eingebrachte Plasmid-DNA nötig wäre. Aufgrund der zur Zeit noch aufwendigen Transfektionsmethoden mit *P. falciparum* wird die Verwendung von heterologen

Expressionssystemen auch in Zukunft eine Alternative darstellen. Dabei ist der Einsatz von unterschiedlichen heterologen *in vitro* und *in vivo* Systemen notwendig, da parasitenspezifische Eigenheiten die Expression und Analyse von rekombinanten Proteinen erschweren. Beispielsweise könnte die Analyse von *P. falciparum* Signalsequenzen bzw. putativen Signalsequenzen in verschiedenen eukaryotischen Expressionssystemen durchgeführt werden.

Die Aufklärung der räumlichen Struktur mittels Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des *PfArf*-Gef Proteins könnte Aufschluß über die Positionierung der Insertionssequenz im katalytischen Anteil des Proteins geben. In *in-vitro* GDP-GTP-Austausch-Assays mit rekombinant exprimierten *PfSec7* Varianten könnten die Funktionseigenschaften der Insertionssequenz in der *PfSec7* Domäne getestet werden, soweit die Deletion der endogenen Insertionssequenz über genetische Manipulation nicht durchführbar ist.

I. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Entwicklungszyklus von P. falciparum.....2*
- Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme des infizierten Erythrozyten.....5*
- Abb. 3: Schema der zahlreichen Bestimmungsorte parasitärer Proteine des sekretorischen Weges im Parasiten bzw. im infizierten Erythrozyten.....10*
- Abb. 4: Schema der sekundären Endozytobiose.....14*
- Abb. 5: : Ein-Schritt / Zwei-Schritt-Modell der Proteintranslokation über die parasitophore Vakuolenmembran.....16*
- Abb 6: Arf-Aktivierung über Arf-Gef und BFA-Wirkung.....21*
- Abb. 7: Räumliche Struktur der Sec7 Domäne von Gea2p im Komplex mit einer N-terminal verkürzten Form von ARF.....22*
- Abb. 8: Sequenz-Gegenüberstellung der Sec7 Domänen von ARNO3, GBF1 (human), Sec7p, Gea1p und Syt1p (Saccharomyces cerevisiae), GNOM1 (A. thaliana) und Plasmodium falciparum FCBR und FCBR^{BFA}.....24*
- Abb. 9: Schematische Übersicht einiger Gene exportierter Parasitenproteine mit internen hydrophoben Regionen.....57*
- Abb. 10: Schematische Darstellung des gbp130 Gens.....58*
- Abb. 11: Schema des RACE-PCR Verlaufs.....59*
- Abb. 12: Schema der erwarteten PCR Produktlängen mit verschiedenen gbp-Primern bei Einsatz von cDNA als template DNA (ohne 179 bp Intron).....60*
- Abb 13: 1,2%iges Agarosegel der RACE PCR Produkte.....60*
- Abb. 14: Röntgenfilme der Kolonie-Screen-Filter, Detektion über anti-DIG-Antikörper (fab-fragments, Boehringer Mannheim, 1:20000).....61*
- Abb. 15: Sequenz der 5' nicht-translatierten Region und kodierende Sequenz des Gbp130 Gens. Im Vergleich dazu die Sequenz aus der 5'RACE-PCR.....62*
- Abb. 16: Verwendung von Saccarose-Selektionsmedium der Wildtyp-Hefe bzw. Suc2-Hefe im Signal Sequence Trap.....64*
- Abb 17: Schematische Darstellung des pSUC2T7F1ori Vektors.....64*
- Abb 18: Schematische Darstellung der sekretorischen leader-Sequenzen von EXP-1 und GBP130 (putative sekretorische leader-Sequenzen).....65*
- Abb. 19: Ausstrich der transfizierten YTKSuc2- Hefen auf SD^T- und YPD Platten.....66*

- Abb. 20: Selektionsschritte der transfizierten Hefen YTK12Suc2- bis zur Analyse der Invertase-Sekretion und Zusammensetzung der jeweiligen Medien.....67
- Abb. 21: : (A) Wachstum der transfizierten YTK12Suc2- Hefen auf YPD-AA. (B) in-vitro Invertase-Aktivitätstest der Hefen.....68
- Abb. 22: Graphische Darstellung der Signal-Sequenz-Vorhersagen mit dem SignalP V1.1 Programm.....70
- Abb. 23: Alignment der AA-Sequenzen der Sec7 Domänen ARNO, ARNO3, GBF1 (human); Sec7p, Gea1p, Gea2p (*S. cerevisiae*); GNOM1 (*A. thaliana*); sowie die aus der genomischen Sequenz abgeleiteten Sequenzen der Sec7 Domänen von *Plasmodium falciparum* (FCBR und FCBR^{BFA}).....73
- Abb. 24: Vergleich putativer Sec7 Aminosäuresequenzen von *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. berghei* und *P. yoelii* sowie *T. gondii* und *S. cerevisiae*.....75
- Abb. 25: Northern Blot mit Gesamt-RNA aus *Plasmodium falciparum* FCBR^{BFA} (Spur A) und FCBR (Spur B) Trophozitenstadien.....75
- Abb. 26: Reaktionsprodukte der Sec7 RT-PCR auf einem 1,2%igen Agarose Gel.....76
- Abb. 27: Schema der erwarteten Produktgrößen und Primer für die Sec7-RT-PCR.....76
- Abb. 28: Darstellung der räumlichen Struktur der ARNO-Sec7 Domäne im Vergleich mit dem Modell der *Plasmodium falciparum* Sec7 Domäne.....77
- Abb. 29: Schema der PfSec7-Insertion-Aminosäuresequenz, Aufbau dieser Sequenz aus zwei „low compositional complexity“ Regionen und Bereiche sonstige bekannte Motive.....78
- Abb. 30: Wachstumskurven der Stämme FCBR, FCBR^{BFA} und 3D7 in Gegenwart von BFA bzw. ohne BFA in RPMI-Medium/ 4%Hämatokrit.....80
- Abb. 31: Wachstumskurve des 3D7 Stammes, der bereits zuvor über 5 Zyklen mit 0,5 µg/ml BFA kultiviert wurde.....81
- Abb. 32: Konstruktion der pH-TK-Sec7 Transfektionsplasmide.....82
- Abb.33: Aminosäure- bzw. Nukleotidsequenz der BFA-Mutation (M-I) und der Markermutation (T-T*) in der Sec7 Domäne des Plasmids pCR2.1-TOPO/PfSec7^{BFA}83
- Abb. 34: Homologe DNA Bereiche vom pH-TK Plasmid vermitteln ein double-crossover Ereignis.....84
- Abb. 35: A: Integration der PfSec7^{BFA} Sequenzen in die 3' Klonierungsstelle (3'cs) des in pH-TK Vektors. B: Bei der Integration der homologen PfSec7d Sequenzbereiche des pH.TK Plasmids in das Genom über double crossover wird im Gegensatz zu den Experimenten von Duraisingh et al. (2002) das *h dhfr* Gen NICHT integriert.....85
- Abb. 36: RT-PCR eines Teil der Sec7 kodierenden Region aus 3D7 und 3D7^{BFA}88

Abb. 37: Sequenz-Vergleich des RT-PCR-Produktes aus 3D7^{BFA} mit den entsprechenden Sequenzbereichen aus 3D7 (Wildtyp), FCBR, FCBR^{BFA} und pH-TK Sec7^{BFA}89

Abb. 38: Southern Blot Hybridisierung mit gDNA aus 3D7/ 3D7^{BFA}91

*Abb. 39: Schema des *orf-gef* Leserahmens (ORF) und Positionen der Endonuklease-schnittstellen EcoRI, HindIII und PvuII.....91*

*Abb. 40: Schema der Austausch von Sec7 Domänen im *Gea1p* Kontext. Von Peyroche et al. wurde die Sec7 Domäne von *Gea1p* gegen die BFA-resistente humane ARNO Sec7 Domäne ausgetauscht.....94*

Abb. 41: Schematische Darstellung der Hefe-Transfektionsplasmide pAP90, pAP23 und pAP43.....95

Abb. 42: Agar-Medien wurden jeweils fünf verschiedenen ausgestrichenen Hefen.....96

Abb. 43: 10², 10³ und 10⁴ Zellen jedes Stammes auf SD^T, SD^{UT} und SD^{T-/70µg/ml BFA}97

Abb. 44: 1,2 %iges Agarose/EtBr Gel der Hefe-PCR Produkte.....98

II. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Vergleich einiger Parasitenproteine bezüglich ihrer Lokalisation und der Natur ihrer Signalsequenzen.....17

Tab. 2: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels mittlerer Größe.....51

Tab. 3: Darstellung der in pSST exprimierten Anteile von Exp-1 und Gbp130 als Aminosäuresequenz und Vorhersageergebnis des SignalP V1.1 Programms.....69

Tab. 4: Wachstumsfähigkeit der Parasitenstämme FCBR, FCBR^{BFA}, 3D7 bzw. der transfizierten Parasitenlinien 3D7-pH-TK Sec7^{BFA} und 3D7-pH-TK Sec7^{BFA-ins} in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Ganciclovir (Gan) und/oder Brefeldin A (BFA).....87

Tab. 5: Wachstumsfähigkeit der Linien 3D7 (Wildtyp), 3D7pH-TKSec7^{BFA} (episomale Plasmide) und 3D7^{BFA} (stabil transgene Linie) mit Ganciclovir, BFA und Pyrimethamin in den angegebenen Konzentrationen.....88*

Tab. 6: Zusammenstellung von P. falciparum Proteinen, die Insertionssequenzen aufweisen.....108

III. Abkürzungsverzeichnis

A:	Adenin
AK:	Antikörper
Ala:	Alanin
Amp:	Ampicillin
AP:	Alkalische Phosphatase
APS:	Ammoniumpersulfat
AS:	Aminosäure
ATP:	Adenosintriphosphat
BCIP:	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BFA:	Brefeldin A
bp:	Basenpaare
BSA:	Bovines Serum Albumin
C:	Cytosin
cDNA:	Komplementäre DNA
CI:	Chloroform-Isoamylalkohol
Cys:	Cystein
DNA:	Desoxyribo Nucleic Acid
Dnase:	Desoxyribonuklease
dNTP:	Desoxynukleotid
dTTP:	Desoxythymidintriphosphat
EK:	Endkonzentration
ELISA:	enzyme linked immuno sorbent assay
g:	Erdbeschleunigung
G:	Guanin
GBP:	Glycophorin bindendes Protein
gDNA:	genomische DNA
Gln:	Glutamin
Gly:	Glycin
HRP:	Horse Radish Peroxidase
I:	Isoleucin
iRBC:	infected red blood cell
Kan:	Kanamycin
kb:	Kilobasen

kDa:	Kilodalton
LB:	Luria Broth
M:	Methionin
MMLV:	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
mRNA:	messenger RNA
NBT:	Nitro Blau Tetrazoliumchlorid
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
OD:	Optische Dichte
ORF:	offenes Leseraster
ori:	origin of replication
PAGE:	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PCI:	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR:	Polymerasekettenreaktion
PFGE:	Pulsfeldgelelektrophorese
Pfu:	Pfu-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
P:	Phenylalanin
PPM:	Parasiten Plasma Membran
PV:	parasitophore Vakuole
PVM:	parasitophore Vakuolenmembran
RACE:	rapid amplification of cDNA ends
RBC:	red blood cell
RNA:	Ribo Nucleic Acid
RNase:	Ribonuklease
rpm:	rounds per minute
rRNA:	ribosomale RNA
RT:	Reverse Transkriptase
SDS:	Soduimdodecylsulfat
S:	Serin
SG:	Sammelgel
SRP:	signal recognition particle
SST :	<i>Signal Sequence Trap</i>
T:	Thymin
Taq:	Taq-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>

TB:	Terrific Broth
TBE:	Tris-Borat-EDTA
TG:	Trenngel
tRNA:	Transfer-RNA
Trp:	Tryptophan
TVM:	tubovesikuläre Membran
TVN:	tubovesikuläres Netzwerk
u:	unit
U:	Uracil
UV:	ultraviolett
v/v:	volume/volume
V:	Valin
w/v:	weight/volume

VIII. Literaturverzeichnis

- Adams, J.H., Sim, B.K., Dolan, S.A., Fang, X., Kaslow, D.C., and Miller, L.H. (1992) A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7085-7089.
- Adisa, A., Albano, F.R., Reeder, J., Foley, M., and Tilley, L. (2001) Evidence for a role for a Plasmodium falciparum homologue of Sec31p in the export of proteins to the surface of malaria parasite-infected erythrocytes. *J Cell Sci* **114**: 3377-3386.
- Adisa, A., Rug, M., Foley, M., and Tilley, L. (2002) Characterisation of a delta-COP homologue in the malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **123**: 11-21.
- Adisa, A., Rug, M., Klonis, N., Foley, M., Cowman, A.F., and Tilley, L. (2003) The signal sequence of exported protein-1 directs the green fluorescent protein to the parasitophorous vacuole of transfected malaria parasites. *J Biol Chem* **278**: 6532-6542.
- Aikawa, M. (1971) Parasitological review. Plasmodium: the fine structure of malarial parasites. *Exp Parasitol* **30**: 284-320.
- Akompong, T., Kadekoppala, M., Harrison, T., Oksman, A., Goldberg, D.E., Fujioka, H., Samuel, B.U., Sullivan, D., and Haldar, K. (2002) Trans expression of a Plasmodium falciparum histidine-rich protein II (HRPII) reveals sorting of soluble proteins in the periphery of the host erythrocyte and disrupts transport to the malarial food vacuole. *J Biol Chem* **277**: 28923-28933.
- Albano, F.R., Berman, A., La Greca, N., Hibbs, A.R., Wickham, M., Foley, M., and Tilley, L. (1999a) A homologue of Sar1p localises to a novel trafficking pathway in malaria-infected erythrocytes. *Eur J Cell Biol* **78**: 453-462.
- Albano, F.R., Foley, M., and Tilley, L. (1999b) Export of parasite proteins to the erythrocyte cytoplasm: secretory machinery and traffic signals. *Novartis Found Symp* **226**: 157-172.
- Ansorge, I., Jeckel, D., Wieland, F., and Lingelbach, K. (1995) Plasmodium falciparum-infected erythrocytes utilize a synthetic truncated ceramide precursor for synthesis and secretion of truncated sphingomyelin. *Biochem J* **308**: 335-341.
- Ansorge, I., Benting, J., Bhakdi, S., and Lingelbach, K. (1996) Protein sorting in Plasmodium falciparum-infected red blood cells permeabilized with the pore-forming protein streptolysin O. *Biochem J* **315**: 307-314.
- Ansorge, I., Paprotka, K., Bhakdi, S., and Lingelbach, K. (1997) Permeabilization of the erythrocyte membrane with streptolysin O allows access to the vacuolar membrane of Plasmodium falciparum and a molecular analysis of membrane topology. *Mol Biochem Parasitol* **84**: 259-261.
- Baldi, D.L., Andrews, K.T., Waller, R.F., Roos, D.S., Howard, R.F., Crabb, B.S., and Cowman, A.F. (2000) RAP1 controls rhoptry targeting of RAP2 in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Embo J* **19**: 2435-2443.
- Banerjee, R., Liu, J., Beatty, W., Pelosof, L., Klemba, M., and Goldberg, D.E. (2002) Four plasmepsins are active in the Plasmodium falciparum food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 990-995.
- Bannister, L.H., and Mitchell, G.H. (1995) The role of the cytoskeleton in Plasmodium falciparum merozoite biology: an electron-microscopic view. *Ann Trop Med Parasitol* **89**: 105-111.
- 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.
- Banumathy, G., Singh, V., and Tatu, U. (2002) Host chaperones are recruited in membrane-bound complexes by Plasmodium falciparum. *J Biol Chem* **277**: 3902-3912.

- Banumathy, G., Singh, V., Pavithra, S.R., and Tatu, U. (2003) Heat shock protein 90 function is essential for Plasmodium falciparum growth in human erythrocytes. *J Biol Chem* **278**: 18336-18345.
- 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.
- Baruch, D.I., Ma, X.C., Singh, H.B., Bi, X., Pasloske, B.L., and Howard, R.J. (1997) Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of Plasmodium falciparum infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence. *Blood* **90**: 3766-3775.
- Baumeister, S., Burgwedel, A., Maier, U.G., and Lingelbach, K. (1999) Reconstitution of protein transport across the vacuolar membrane in Plasmodium falciparum-infected permeabilized erythrocytes. *Novartis Found Symp* **226**: 145-154.
- Baumeister, S., Paprotka, K., Bhakdi, S., and Lingelbach, K. (2001) Selective permeabilization of infected host cells with pore-forming proteins provides a novel tool to study protein synthesis and viability of the intracellular apicomplexan parasites Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii. *Mol Biochem Parasitol* **112**: 133-137.
- Baumeister, S., Endermann, T., Charpian, S., Nyalwidhe, J., Duranton, C., Huber, S., Kirk, K., Lang, F., and Lingelbach, K. (2003) A biotin derivative blocks parasite induced novel permeation pathways in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* **132**: 35-45.
- Baumgartner, F., Wiek, S., Paprotka, K., Zauner, S., and Lingelbach, K. (2001) A point mutation in an unusual Sec7 domain is linked to brefeldin A resistance in a Plasmodium falciparum line generated by drug selection. *Mol Microbiol* **41**: 1151-1158.
- Behari, R., and Haldar, K. (1994) Plasmodium falciparum: protein localization along a novel, lipid-rich tubovesicular membrane network in infected erythrocytes. *Exp Parasitol* **79**: 250-259.
- Benting, J., Ansorge, I., Paprotka, K., and Lingelbach, K.R. (1994a) Chemical and thermal inhibition of protein secretion have stage specific effects on the intraerythrocytic development of Plasmodium falciparum in vitro. *Trop Med Parasitol* **45**: 303-307.
- Benting, J., Mattei, D., and Lingelbach, K. (1994b) Brefeldin A inhibits transport of the glycophorin-binding protein from Plasmodium falciparum into the host erythrocyte. *Biochem J* **300**: 821-826.
- Bhattacharyya, M.K., Hong, Z., Kongkasuriyachai, D., and Kumar, N. (2002) Plasmodium falciparum protein phosphatase type 1 functionally complements a glc7 mutant in Saccharomyces cerevisiae. *Int J Parasitol* **32**: 739-747.
- Bianco, A.E., Culvenor, J.G., Coppel, R.L., Crewther, P.E., McIntyre, P., Favaloro, J.M., Brown, G.V., Kemp, D.J., and Anders, R.F. (1987) Putative glycophorin-binding protein is secreted from schizonts of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **23**: 91-102.
- Blair, P.L., Witney, A., Haynes, J.D., Moch, J.K., Carucci, D.J., and Adams, J.H. (2002) Transcripts of developmentally regulated Plasmodium falciparum genes quantified by real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **30**: 2224-2231.
- 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.

- Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975a) Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* **67**: 852-862.
- Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975b) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* **67**: 835-851.
- Bonnefoy, S., Mattei, D., Dubremetz, J.F., Guillotte, M., Jouin, H., Ozaki, L.S., Sibilli, L., and Mercereau-Pujalon, O. (1988) Plasmodium falciparum: molecular analysis of a putative protective antigen, the thermostable 96-kDa protein. *Exp Parasitol* **65**: 69-83.
- Bruce, B.D. (2001) The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochim Biophys Acta* **1541**: 2-21.
- Buehren, T., Collins, M.J., Iskander, D.R., Davis, B., and Lingelbach, B. (2001) The stability of corneal topography in the post-blink interval. *Cornea* **20**: 826-833.
- Burghaus, P.A., Gerold, P., Pan, W., Schwarz, R.T., Lingelbach, K., and Bujard, H. (1999) Analysis of recombinant merozoite surface protein-1 of Plasmodium falciparum expressed in mammalian cells. *Mol Biochem Parasitol* **104**: 171-183.
- 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.
- Bzik, D.J., Fox, B.A., and Gonyer, K. (1993) Expression of Plasmodium falciparum lactate dehydrogenase in Escherichia coli. *Mol Biochem Parasitol* **59**: 155-166.
- Carlson, J., Helmby, H., Hill, A.V., Brewster, D., Greenwood, B.M., and Wahlgren, M. (1990) Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. *Lancet* **336**: 1457-1460.
- Chattopadhyay, D., Langsley, G., Carson, M., Recacha, R., DeLucas, L., and Smith, C. (2000) Structure of the nucleotide-binding domain of Plasmodium falciparum rab6 in the GDP-bound form. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**: 937-944.
- Chen, Q., Schlichtherle, M., and Wahlgren, M. (2000) Molecular aspects of severe malaria. *Clin Microbiol Rev* **13**: 439-450.
- Cheresh, P., Harrison, T., Fujioka, H., and Haldar, K. (2002) Targeting the malarial plastid via the parasitophorous vacuole. *J Biol Chem* **277**: 16265-16277.
- Clarke, J.L., Sodeinde, O., and Mason, P.J. (2003) A unique insertion in Plasmodium berghei glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase: evolutionary and functional studies. *Mol Biochem Parasitol* **127**: 1-8.
- Cohn, J.V., Alkhalil, A., Wagner, M.A., Rajapandi, T., and Desai, S.A. (2003) Extracellular lysines on the plasmodial surface anion channel involved in Na⁺ exclusion. *Mol Biochem Parasitol* **132**: 27-34.
- Cooke, B., Coppel, R., and Wahlgren, M. (2000) Falciparum malaria: sticking up, standing out and out-standing. *Parasitol Today* **16**: 416-420.
- Coppel, R.L., Favaloro, J.M., Crewther, P.E., Burkot, T.R., Bianco, A.E., Stahl, H.D., Kemp, D.J., Anders, R.F., and Brown, G.V. (1985) A blood stage antigen of Plasmodium falciparum shares determinants with the sporozoite coat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 5121-5125.
- Coppel, R.L., Bianco, A.E., Culvenor, J.G., Crewther, P.E., Brown, G.V., Anders, R.F., and Kemp, D.J. (1987) A cDNA clone expressing a rhoptry protein of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **25**: 73-81.
- Coppel, R.L. (1992) Repeat structures in a Plasmodium falciparum protein (MESA) that binds human erythrocyte protein 4.1. *Mol Biochem Parasitol* **50**: 335-347.
- Couffin, S., Hernandez-Rivas, R., Blisnick, T., and Mattei, D. (1998) Characterisation of PfSec61, a Plasmodium falciparum homologue of a component of the translocation

- machinery at the endoplasmic reticulum membrane of eukaryotic cells. *Mol Biochem Parasitol* **92**: 89-98.
- Crary, J.L., and Haldar, K. (1992) Brefeldin A inhibits protein secretion and parasite maturation in the ring stage of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **53**: 185-192.
- Criado, F.J., Barnatan, M.F., Lingelbach, J.M., Mills, J.D., Richards, B.E., and Morgan, W.R. (2002a) Abdominal aortic aneurysm: overview of stent-graft devices. *J Am Coll Surg* **194**: S88-97.
- Criado, F.J., Lingelbach, J.M., Ledesma, D.F., and Lucas, P.R. (2002b) Carotid artery stenting in a vascular surgery practice. *J Vasc Surg* **35**: 430-434.
- Das, A., Elmendorf, H.G., Li, W.I., and Haldar, K. (1994) Biosynthesis, export and processing of a 45 kDa protein detected in membrane clefts of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* **302**: 487-496.
- Davidson, E.A., and Gowda, D.C. (2001) Glycobiology of *Plasmodium falciparum*. *Biochimie* **83**: 601-604.
- de Castro, F.A., Ward, G.E., Jambou, R., Attal, G., Mayau, V., Jaureguiberry, G., Braun-Breton, C., Chakrabarti, D., and Langsley, G. (1996) Identification of a family of Rab G-proteins in *Plasmodium falciparum* and a detailed characterisation of pfrab6. *Mol Biochem Parasitol* **80**: 77-88.
- de Pecoulas, P.E., Tahar, R., Ouatas, T., Mazabraud, A., and Basco, L.K. (1998) Sequence variations in the *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and their relationship with pyrimethamine resistance. *Mol Biochem Parasitol* **92**: 265-273.
- Deitsch, K.W., and Wellems, T.E. (1996) Membrane modifications in erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **76**: 1-10.
- DeRocher, A., Hagen, C.B., Froehlich, J.E., Feagin, J.E., and Parsons, M. (2000) Analysis of targeting sequences demonstrates that trafficking to the *Toxoplasma gondii* plastid branches off the secretory system. *J Cell Sci* **113**: 3969-3977.
- Desai, S.A., Bezrukov, S.M., and Zimmerberg, J. (2000) A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature* **406**: 1001-1005.
- Di Cristina, M., Spaccapelo, R., Soldati, D., Bistoni, F., and Crisanti, A. (2000) Two conserved amino acid motifs mediate protein targeting to the micronemes of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Biol* **20**: 7332-7341.
- Dieckmann-Schuppert, A., Bender, S., Odenthal-Schnittler, M., Bause, E., and Schwarz, R.T. (1992) Apparent lack of N-glycosylation in the asexual intraerythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem* **205**: 815-825.
- Dluzewski, A.R., Fryer, P.R., Griffiths, S., Wilson, R.J., and Gratzer, W.B. (1989) Red cell membrane protein distribution during malarial invasion. *J Cell Sci* **92**: 691-699.
- Dunn, C.R., Banfield, M.J., Barker, J.J., Higham, C.W., Moreton, K.M., Turgut-Balik, D., Brady, R.L., and Holbrook, J.J. (1996) The structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* reveals a new target for anti-malarial design. *Nat Struct Biol* **3**: 912-915.
- Dyer, M., Jackson, M., McWhinney, C., Zhao, G., and Mikkelsen, R. (1996) Analysis of a cation-transporting ATPase of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **78**: 1-12.
- Egan, T.J. (2002) Four aspartic proteases occur in the *Plasmodium falciparum* food vacuole. *Trends Parasitol* **18**: 150.
- Elford, B.C., Cowan, G.M., and Ferguson, D.J. (1997) Transport and trafficking in malaria-infected erythrocytes. *Trends Microbiol* **5**: 463-465.

- Elmendorf, H.G., Bangs, J.D., and Haldar, K. (1992) Synthesis and secretion of proteins by released malarial parasites. *Mol Biochem Parasitol* **52**: 215-230.
- 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.
- Elmendorf, H.G., and Haldar, K. (1994) *Plasmodium falciparum* exports the Golgi marker sphingomyelin synthase into a tubovesicular network in the cytoplasm of mature erythrocytes. *J Cell Biol* **124**: 449-462.
- Fast, N.M., Kissinger, J.C., Roos, D.S., and Keeling, P.J. (2001) Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Mol Biol Evol* **18**: 418-426.
- Favaloro, J.M., Coppel, R.L., Corcoran, L.M., Foote, S.J., Brown, G.V., Anders, R.F., and Kemp, D.J. (1986) Structure of the RESA gene of *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res* **14**: 8265-8277.
- Fernandez, V., and Wahlgren, M. (2002) Rosetting and autoagglutination in *Plasmodium falciparum*. *Chem Immunol* **80**: 163-187.
- Fichera, M.E., and Roos, D.S. (1997) A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* **390**: 407-409.
- Fischer, K., Marti, T., Rick, B., Johnson, D., Benting, J., Baumeister, S., Helmbrecht, C., Lanzer, M., and Lingelbach, K. (1998) Characterization and cloning of the gene encoding the vacuolar membrane protein EXP-2 from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **92**: 47-57.
- Foley, M., and Tilley, L. (1998a) Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacol Ther* **79**: 55-87.
- Foley, M., and Tilley, L. (1998b) Protein trafficking in malaria-infected erythrocytes. *Int J Parasitol* **28**: 1671-1680.
- Foth, B.J., and McFadden, G.I. (2003) The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other Apicomplexan parasites. *Int Rev Cytol* **224**: 57-110.
- 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.
- Francis, S.E., Gluzman, I.Y., Oksman, A., Knickerbocker, A., Mueller, R., Bryant, M.L., Sherman, D.R., Russell, D.G., and Goldberg, D.E. (1994) Molecular characterization and inhibition of a *Plasmodium falciparum* aspartic hemoglobinase. *Embo J* **13**: 306-317.
- 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.
- Gardner, M.J., Tettelin, H., Carucci, D.J., Cummings, L.M., Aravind, L., Koonin, E.V., Shallom, S., Mason, T., Yu, K., Fujii, C., Pederson, J., Shen, K., Jing, J., Aston, C., Lai, Z., Schwartz, D.C., Perte, M., Salzberg, S., Zhou, L., Sutton, G.G., Clayton, R., White, O., Smith, H.O., Fraser, C.M., Hoffman, S.L., and et al. (1998) Chromosome 2 sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* **282**: 1126-1132.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Perte, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M., and Barrell, B.

- (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**: 498-511.
- Gilberger, T.W., Schirmer, R.H., Walter, R.D., and Muller, S. (2000) Deletion of the parasite-specific insertions and mutation of the catalytic triad in glutathione reductase from chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* 3D7. *Mol Biochem Parasitol* **107**: 169-179.
- Ginsburg, H. (1994) Transport pathways in the malaria-infected erythrocyte. Their characterization and their use as potential targets for chemotherapy. *Biochem Pharmacol* **48**: 1847-1856.
- Ginsburg, H. (1999) The permeability properties of the parasite cell membrane. *Novartis Found Symp* **226**: 99-108; discussion 108-113.
- Goldberg, D.E. (1993) Hemoglobin degradation in *Plasmodium*-infected red blood cells. *Semin Cell Biol* **4**: 355-361.
- Gormley, J.A., Howard, R.J., and Taraschi, T.F. (1992) Trafficking of malarial proteins to the host cell cytoplasm and erythrocyte surface membrane involves multiple pathways. *J Cell Biol* **119**: 1481-1495.
- Gowda, D.C., and Davidson, E.A. (1999) Protein glycosylation in the malaria parasite. *Parasitol Today* **15**: 147-152.
- Gunther, K., Tummler, M., Arnold, H.H., Ridley, R., Goman, M., Scaife, J.G., and Lingelbach, K. (1991) An exported protein of *Plasmodium falciparum* is synthesized as an integral membrane protein. *Mol Biochem Parasitol* **46**: 149-157.
- Haldar, K. (1998) Intracellular trafficking in *Plasmodium*-infected erythrocytes. *Curr Opin Microbiol* **1**: 466-471.
- Haldar, K., Mohandas, N., Samuel, B.U., Harrison, T., Hiller, N.L., Akompong, T., and Cheresch, P. (2002) Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. *Cell Microbiol* **4**: 383-395.
- Hayashi, M., Taniguchi, S., Ishizuka, Y., Kim, H.S., Wataya, Y., Yamamoto, A., and Moriyama, Y. (2001) A homologue of N-ethylmaleimide-sensitive factor in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is exported and localized in vesicular structures in the cytoplasm of infected erythrocytes in the brefeldin A-sensitive pathway. *J Biol Chem* **276**: 15249-15255.
- He, C.Y., Striepen, B., Pletcher, C.H., Murray, J.M., and Roos, D.S. (2001) Targeting and processing of nuclear-encoded apicoplast proteins in plastid segregation mutants of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* **276**: 28436-28442.
- Hempelmann, E., and Egan, T.J. (2002) Pigment biocrystallization in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* **18**: 11.
- Hempelmann, E., Motta, C., Hughes, R., Ward, S.A., and Bray, P.G. (2003) *Plasmodium falciparum*: sacrificing membrane to grow crystals? *Trends Parasitol* **19**: 23-26.
- Hibbs, A.R., and Saul, A.J. (1994) *Plasmodium falciparum*: highly mobile small vesicles in the malaria-infected red blood cell cytoplasm. *Exp Parasitol* **79**: 260-269.
- Hibbs, A.R., Stenzel, D.J., and Saul, A. (1997) Macromolecular transport in malaria--does the duct exist? *Eur J Cell Biol* **72**: 182-188.
- Hinterberg, K., Scherf, A., Gysin, J., Toyoshima, T., Aikawa, M., Mazie, J.C., da Silva, L.P., and Mattei, D. (1994) *Plasmodium falciparum*: the Pf332 antigen is secreted from the parasite by a brefeldin A-dependent pathway and is translocated to the erythrocyte membrane via the Maurer's clefts. *Exp Parasitol* **79**: 279-291.
- Holt, D.C., Gardiner, D.L., Thomas, E.A., Mayo, M., Bourke, P.F., Sutherland, C.J., Carter, R., Myers, G., Kemp, D.J., and Trenholme, K.R. (1999) The cytoadherence linked asexual gene family of *Plasmodium falciparum*: are there roles other than cytoadherence? *Int J Parasitol* **29**: 939-944.

- Hopkins, J., Fowler, R., Krishna, S., Wilson, I., Mitchell, G., and Bannister, L. (1999) The plastid in *Plasmodium falciparum* asexual blood stages: a three-dimensional ultrastructural analysis. *Protist* **150**: 283-295.
- Hoppe, H.C., Ngo, H.M., Yang, M., and Joiner, K.A. (2000) Targeting to rhoptry organelles of *Toxoplasma gondii* involves evolutionarily conserved mechanisms. *Nat Cell Biol* **2**: 449-456.
- Howard, R.F., and Schmidt, C.M. (1995) The secretory pathway of *Plasmodium falciparum* regulates transport of p82/RAP1 to the rhoptries. *Mol Biochem Parasitol* **74**: 43-54.
- Howard, R.J., Uni, S., Aikawa, M., Aley, S.B., Leech, J.H., Lew, A.M., Wellems, T.E., Rener, J., and Taylor, D.W. (1986) Secretion of a malarial histidine-rich protein (Pf HRP II) from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Cell Biol* **103**: 1269-1277.
- Huber, S.M., Uhlemann, A.C., Gamper, N.L., Duranton, C., Kremsner, P.G., and Lang, F. (2002) *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl(-) channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *Embo J* **21**: 22-30.
- Huete-Perez, J.A., Engel, J.C., Brinen, L.S., Mottram, J.C., and McKerrow, J.H. (1999) Protease trafficking in two primitive eukaryotes is mediated by a prodomain protein motif. *J Biol Chem* **274**: 16249-16256.
- Johnson, D., Gunther, K., Ansoorge, I., Benting, J., Kent, A., Bannister, L., Ridley, R., and Lingelbach, K. (1994) Characterization of membrane proteins exported from *Plasmodium falciparum* into the host erythrocyte. *Parasitology* **109**: 1-9.
- Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Turbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H.K., Soldati, D., and Beck, E. (1999) Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285**: 1573-1576.
- Kaneko, O., Fidock, D.A., Schwartz, O.M., and Miller, L.H. (2000) Disruption of the C-terminal region of EBA-175 in the Dd2/Nm clone of *Plasmodium falciparum* does not affect erythrocyte invasion. *Mol Biochem Parasitol* **110**: 135-146.
- Kara, U.A., Stenzel, D.J., Ingram, L.T., and Kidson, C. (1988) The parasitophorous vacuole membrane of *Plasmodium falciparum*: demonstration of vesicle formation using an immunoprobe. *Eur J Cell Biol* **46**: 9-17.
- Karsten, V., Qi, H., Beckers, C.J., and Joiner, K.A. (1997) Targeting the secretory pathway of *Toxoplasma gondii*. *Methods* **13**: 103-111.
- Karsten, V., Qi, H., Beckers, C.J., Reddy, A., Dubremetz, J.F., Webster, P., and Joiner, K.A. (1998) The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. *J Cell Biol* **141**: 1323-1333.
- Kaviratne, M., Khan, S.M., Jarra, W., and Preiser, P.R. (2002) Small Variant STEVOR Antigen Is Uniquely Located within Maurer's Clefts in *Plasmodium falciparum*-Infected Red Blood Cells. *Eukaryot Cell* **1**: 926-935.
- Kilejian, A., Sharma, Y.D., Karoui, H., and Naslund, L. (1986) Histidine-rich domain of the knob protein of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 7938-7941.
- Kirk, K., Staines, H.M., Martin, R.E., and Saliba, K.J. (1999a) Transport properties of the host cell membrane. *Novartis Found Symp* **226**: 55-66; discussion 66-73.
- Kirk, K., Tilley, L., and Ginsburg, H. (1999b) Transport and trafficking in the malaria-infected erythrocyte. *Parasitol Today* **15**: 355-357.
- Kirk, K. (2001) Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Rev* **81**: 495-537.

- Klotz, F.W., Cohen, S.J., Szarfman, A., Aikawa, M., and Howard, R.J. (1996) Cross-reactive epitope among proteins in *Plasmodium falciparum* Maurer's clefts and primate leukocytes and platelets. *Am J Trop Med Hyg* **54**: 655-659.
- Knapp, B., Hundt, E., and Kupper, H.A. (1989a) A new blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* transported to the erythrocyte surface. *Mol Biochem Parasitol* **37**: 47-56.
- Knapp, B., Hundt, E., Nau, U., and Kupper, H.A. (1989b) Molecular cloning, genomic structure and localization in a blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by a serine stretch. *Mol Biochem Parasitol* **32**: 73-83.
- Knapp, B., Gunther, K., and Lingelbach, K. (1991) In vitro translation of *Plasmodium falciparum* aldolase is not initiated at an unusual site. *Embo J* **10**: 3095-3097.
- Kochan, J., Perkins, M., and Ravetch, J.V. (1986) A tandemly repeated sequence determines the binding domain for an erythrocyte receptor binding protein of *P. falciparum*. *Cell* **44**: 689-696.
- Kocken, C.H., van der Wel, A.M., Dubbeld, M.A., Narum, D.L., van de Rijke, F.M., van Gemert, G.J., van der Linde, X., Bannister, L.H., Janse, C., Waters, A.P., and Thomas, A.W. (1998) Precise timing of expression of a *Plasmodium falciparum*-derived transgene in *Plasmodium berghei* is a critical determinant of subsequent subcellular localization. *J Biol Chem* **273**: 15119-15124.
- Kocken, C.H., Withers-Martinez, C., Dubbeld, M.A., van der Wel, A., Hackett, F., Valderrama, A., Blackman, M.J., and Thomas, A.W. (2002) High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. *Infect Immun* **70**: 4471-4476.
- Krishna, S., Woodrow, C.J., Burchmore, R.J., Saliba, K.J., and Kirk, K. (2000) Hexose transport in asexual stages of *Plasmodium falciparum* and kinetoplastidae. *Parasitol Today* **16**: 516-521.
- Kumar, N., Koski, G., Harada, M., Aikawa, M., and Zheng, H. (1991) Induction and localization of *Plasmodium falciparum* stress proteins related to the heat shock protein 70 family. *Mol Biochem Parasitol* **48**: 47-58.
- 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.
- 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., de Bruin, D., and Ravetch, J.V. (1993) Transcriptional differences in polymorphic and conserved domains of a complete cloned *P. falciparum* chromosome. *Nature* **361**: 654-657.
- Lauer, S., VanWye, J., Harrison, T., McManus, H., Samuel, B.U., Hiller, N.L., Mohandas, N., and Haldar, K. (2000) Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *Embo J* **19**: 3556-3564.
- Lauer, S.A., Ghori, N., and Haldar, K. (1995) Sphingolipid synthesis as a target for chemotherapy against malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9181-9185.
- 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.
- Le Cabec, V., Cowland, J.B., Calafat, J., and Borregaard, N. (1996) Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expressed in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6454-6457.
- Lingelbach, K., and Dobberstein, B. (1988) An extended RNA/RNA duplex structure within the coding region of mRNA does not block translational elongation. *Nucleic Acids Res* **16**: 3405-3414.

- Lingelbach, K. (1997) Protein trafficking in the Plasmodium-falciparum-infected erythrocyte—from models to mechanisms. *Ann Trop Med Parasitol* **91**: 543-549.
- Lingelbach, K., and Joiner, K.A. (1998) The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* **111**: 1467-1475.
- Lingelbach, K. (2001) Life in vacuoles - a strategy for parasite survival. *Int J Parasitol* **31**: V-VI.
- Lingelbach, K.R. (1993) Plasmodium falciparum: a molecular view of protein transport from the parasite into the host erythrocyte. *Exp Parasitol* **76**: 318-327.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L., and Klausner, R.D. (1991) Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* **67**: 601-616.
- Martinez, S.L., Clavijo, C.A., and Winograd, E. (1998) Identification of peripheral membrane proteins associated with the tubo-vesicular network of Plasmodium falciparum infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* **91**: 273-280.
- Mattei, D., Berry, L., Couffin, S., and Richard, O. (1999a) The transport of the histidine-rich protein I from Plasmodium falciparum is insensitive to brefeldin A. *Novartis Found Symp* **226**: 215-226; discussion 227-230.
- Mattei, D., Ward, G.E., Langsley, G., and Lingelbach, K. (1999b) Novel secretory pathways in Plasmodium? *Parasitol Today* **15**: 235-237.
- Mayer, D.C., Kaneko, O., Hudson-Taylor, D.E., Reid, M.E., and Miller, L.H. (2001) Characterization of a Plasmodium falciparum erythrocyte-binding protein paralogous to EBA-175. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5222-5227.
- McFadden, G.I. (1999) Plastids and protein targeting. *J Eukaryot Microbiol* **46**: 339-346.
- McFadden, G.I., and Roos, D.S. (1999) Apicomplexan plastids as drug targets. *Trends Microbiol* **7**: 328-333.
- Michon, P., Stevens, J.R., Kaneko, O., and Adams, J.H. (2002) Evolutionary relationships of conserved cysteine-rich motifs in adhesive molecules of malaria parasites. *Mol Biol Evol* **19**: 1128-1142.
- Misumi, Y., Miki, K., Takatsuki, A., Tamura, G., and Ikehara, Y. (1986) Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* **261**: 11398-11403.
- Moura, I.C., and Pudles, J. (1999) A Plasmodium chabaudi chabaudi high molecular mass glycoprotein translocated to the host cell membrane by a non-classical secretory pathway. *Eur J Cell Biol* **78**: 186-193.
- Mullins, C., and Bonifacino, J.S. (2001) The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* **23**: 333-343.
- Myler, P.J. (1989) Nucleotide and deduced amino acid sequence of the gp195 (MSA-1) gene from Plasmodium falciparum Palo Alto PLF-3/B11. *Nucleic Acids Res* **17**: 5401.
- Nacer, A., Berry, L., Slomianny, C., and Mattei, D. (2001) Plasmodium falciparum signal sequences: simply sequences or special signals? *Int J Parasitol* **31**: 1371-1379.
- 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.
- Nicholls, S.C., Hillman, Y., Lockyer, M.J., Odink, K.G., and Holder, A.A. (1988) An S antigen gene from Plasmodium falciparum contains a novel repetitive sequence. *Mol Biochem Parasitol* **28**: 11-19.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., von Heijne, G., and Brunak, S. (1996) Defining a similarity threshold for a functional protein sequence pattern: the signal peptide cleavage site. *Proteins* **24**: 165-177.

- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997) A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst* **8**: 581-599.
- Noviyanti, R., Brown, G.V., Wickham, M.E., Duffy, M.F., Cowman, A.F., and Reeder, J.C. (2001) Multiple var gene transcripts are expressed in Plasmodium falciparum infected erythrocytes selected for adhesion. *Mol Biochem Parasitol* **114**: 227-237.
- Ockenhouse, C.F., Klotz, F.W., Tandon, N.N., and Jamieson, G.A. (1991) Sequestrin, a CD36 recognition protein on Plasmodium falciparum malaria-infected erythrocytes identified by anti-idiotypic antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3175-3179.
- Ogun, S.A., and Holder, A.A. (1994) Plasmodium yoelii: brefeldin A-sensitive processing of proteins targeted to the rhoptries. *Exp Parasitol* **79**: 270-278.
- Orci, L., Tagaya, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Donaldson, J.G., Lippincott-Schwartz, J., Klausner, R.D., and Rothman, J.E. (1991) Brefeldin A, a drug that blocks secretion, prevents the assembly of non-clathrin-coated buds on Golgi cisternae. *Cell* **64**: 1183-1195.
- Palmer, J.D., and Delwiche, C.F. (1996) Second-hand chloroplasts and the case of the disappearing nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7432-7435.
- Papalexis, V., Siomos, M.A., Campanale, N., Guo, X., Kocak, G., Foley, M., and Tilley, L. (2001) Histidine-rich protein 2 of the malaria parasite, Plasmodium falciparum, is involved in detoxification of the by-products of haemoglobin degradation. *Mol Biochem Parasitol* **115**: 77-86.
- Pasloske, B.L., Baruch, D.I., Ma, C., Taraschi, T.F., Gormley, J.A., and Howard, R.J. (1994) PfEMP3 and HRP1: co-expressed genes localized to chromosome 2 of Plasmodium falciparum. *Gene* **144**: 131-136.
- Peters, J., Fowler, E., Gatton, M., Chen, N., Saul, A., and Cheng, Q. (2002) High diversity and rapid changeover of expressed var genes during the acute phase of Plasmodium falciparum infections in human volunteers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10689-10694.
- Pouvelle, B., Spiegel, R., Hsiao, L., Howard, R.J., Morris, R.L., Thomas, A.P., and Taraschi, T.F. (1991) Direct access to serum macromolecules by intraerythrocytic malaria parasites. *Nature* **353**: 73-75.
- Pouvelle, B., Gormley, J.A., and Taraschi, T.F. (1994) Characterization of trafficking pathways and membrane genesis in malaria-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* **66**: 83-96.
- Quevillon, E., Spielmann, T., Brahimi, K., Chattopadhyay, D., Yeramian, E., and Langsley, G. (2003) The Plasmodium falciparum family of Rab GTPases. *Gene* **306**: 13-25.
- Ragge, K., Arnold, H.H., Tummler, M., Knapp, B., Hundt, E., and Lingelbach, K. (1990) In vitro biosynthesis and membrane translocation of the serine rich protein of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **42**: 93-100.
- Richter, S., and Lamppa, G.K. (1998) A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7463-7468.
- Ridley, R.G., Takacs, B., Lahm, H.W., Delves, C.J., Goman, M., Certa, U., Matile, H., Woollett, G.R., and Scaife, J.G. (1990) Characterisation and sequence of a protective rhoptry antigen from Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **41**: 125-134.
- Roos, D.S., Crawford, M.J., Donald, R.G., Fohl, L.M., Hager, K.M., Kissinger, J.C., Reynolds, M.G., Striepen, B., and Sullivan, W.J., Jr. (1999a) Transport and trafficking: Toxoplasma as a model for Plasmodium. *Novartis Found Symp* **226**: 176-195; discussion 195-178.
- Roos, D.S., Crawford, M.J., Donald, R.G., Kissinger, J.C., Klimeczak, L.J., and Striepen, B. (1999b) Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Curr Opin Microbiol* **2**: 426-432.

- Roos, D.S., Crawford, M.J., Donald, R.G., Fraunholz, M., Harb, O.S., He, C.Y., Kissinger, J.C., Shaw, M.K., and Striepen, B. (2002) Mining the Plasmodium genome database to define organellar function: what does the apicoplast do? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**: 35-46.
- Rothman, J.E., and Wieland, F.T. (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**: 227-234.
- Rowe, A., Obeiro, J., Newbold, C.I., and Marsh, K. (1995) Plasmodium falciparum rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect Immun* **63**: 2323-2326.
- Rowe, J.A., Moulds, J.M., Newbold, C.I., and Miller, L.H. (1997) P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature* **388**: 292-295.
- Sacher, M., Barrowman, J., Schieltz, D., Yates, J.R., 3rd, and Ferro-Novick, S. (2000) Identification and characterization of five new subunits of TRAPP. *Eur J Cell Biol* **79**: 71-80.
- Salcedo, E., Cortese, J.F., Plowe, C.V., Sims, P.F., Hyde, J.E., Volkman, S.K., Cowman, A.F., and Wirth, D.F. (2001) A bifunctional dihydrofolate synthetase--folylpolyglutamate synthetase in Plasmodium falciparum identified by functional complementation in yeast and bacteria. *Mol Biochem Parasitol* **112**: 239-252.
- Saliba, K.J., Horner, H.A., and Kirk, K. (1998) Transport and metabolism of the essential vitamin pantothenic acid in human erythrocytes infected with the malaria parasite Plasmodium falciparum. *J Biol Chem* **273**: 10190-10195.
- Saliba, K.J., and Kirk, K. (2001) H⁺-coupled pantothenate transport in the intracellular malaria parasite. *J Biol Chem* **276**: 18115-18121.
- Sam-Yellowe, T.Y., Fujioka, H., Aikawa, M., Hall, T., and Drazba, J.A. (2001) A Plasmodium falciparum protein located in Maurer's clefts underneath knobs and protein localization in association with Rhop-3 and SERA in the intracellular network of infected erythrocytes. *Parasitol Res* **87**: 173-185.
- Sarma, G.N., Savvides, S.N., Becker, K., Schirmer, M., Schirmer, R.H., and Karplus, P.A. (2003) Glutathione reductase of the malarial parasite Plasmodium falciparum: crystal structure and inhibitor development. *J Mol Biol* **328**: 893-907.
- Schekman, R., and Orci, L. (1996) Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**: 1526-1533.
- Shams-Eldin, H., Azzouz, N., Kedees, M.H., Orlean, P., Kinoshita, T., Schwarz, R.T., Salcedo, E., Cortese, J.F., Plowe, C.V., Sims, P.F., Hyde, J.E., Volkman, S.K., Cowman, A.F., and Wirth, D.F. (2002) The GPII homologue from Plasmodium falciparum complements a Saccharomyces cerevisiae GPII anchoring mutant. *Mol Biochem Parasitol* **120**: 73-81.
- Shenai, B.R., Sijwali, P.S., Singh, A., and Rosenthal, P.J. (2000) Characterization of native and recombinant falcipain-2, a principal trophozoite cysteine protease and essential hemoglobinase of Plasmodium falciparum. *J Biol Chem* **275**: 29000-29010.
- Sherman, I.W., Eda, S., and Winograd, E. (2003) Cytoadherence and sequestration in Plasmodium falciparum: defining the ties that bind. *Microbes Infect* **5**: 897-909.
- Simmons, D., Woollett, G., Bergin-Cartwright, M., Kay, D., and Scaife, J. (1987) A malaria protein exported into a new compartment within the host erythrocyte. *Embo J* **6**: 485-491.
- Soete, M., Hettman, C., and Soldati, D. (1999) The importance of reverse genetics in determining gene function in apicomplexan parasites. *Parasitology* **118**: S53-61.
- Soll, J., and Tien, R. (1998) Protein translocation into and across the chloroplastic envelope membranes. *Plant Mol Biol* **38**: 191-207.

- Stafford, W.H., Stockley, R.W., Ludbrook, S.B., and Holder, A.A. (1996) Isolation, expression and characterization of the gene for an ADP-ribosylation factor from the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem* **242**: 104-113.
- Stahl, H.D., Kemp, D.J., Crewther, P.E., Scanlon, D.B., Woodrow, G., Brown, G.V., Bianco, A.E., Anders, R.F., and Coppel, R.L. (1985) Sequence of a cDNA encoding a small polymorphic histidine- and alanine-rich protein from *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res* **13**: 7837-7846.
- Stanley, H.A., Langreth, S.G., and Reese, R.T. (1989) *Plasmodium falciparum* antigens associated with membrane structures in the host erythrocyte cytoplasm. *Mol Biochem Parasitol* **36**: 139-149.
- Stoebe, B., and Kowallik, K.V. (1999) Gene-cluster analysis in chloroplast genomics. *Trends Genet* **15**: 344-347.
- Stoebe, B., and Maier, U.G. (2002) One, two, three: nature's tool box for building plastids. *Protoplasma* **219**: 123-130.
- Striepen, B., Soldati, D., Garcia-Reguet, N., Dubremetz, J.F., and Roos, D.S. (2001) Targeting of soluble proteins to the rhoptries and micronemes in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **113**: 45-53.
- Su, X., Kirkman, L.A., Fujioka, H., and Wellems, T.E. (1997) Complex polymorphisms in an approximately 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell* **91**: 593-603.
- Sullivan, D.J., Jr., Gluzman, I.Y., and Goldberg, D.E. (1996) *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science* **271**: 219-222.
- Tabe, L., Krieg, P., Strachan, R., Jackson, D., Wallis, E., and Colman, A. (1984) Segregation of mutant ovalbumins and ovalbumin-globin fusion proteins in *Xenopus* oocytes. Identification of an ovalbumin signal sequence. *J Mol Biol* **180**: 645-666.
- Takeo, S., Kokaze, A., Ng, C.S., Mizuchi, D., Watanabe, J.I., Tanabe, K., Kojima, S., and Kita, K. (2000) Succinate dehydrogenase in *Plasmodium falciparum* mitochondria: molecular characterization of the SDHA and SDHB genes for the catalytic subunits, the flavoprotein (Fp) and iron-sulfur (Ip) subunits. *Mol Biochem Parasitol* **107**: 191-205.
- Tannich, E., Tummler, M., Arnold, H.H., and Lingelbach, K. (1990) Deletion mutagenesis in M13 by polymerase chain reaction using universal sequencing primers. *Anal Biochem* **188**: 255-258.
- Taraschi, T.F., Trelka, D., Schneider, T., and Matthews, I. (1998) *Plasmodium falciparum*: characterization of organelle migration during merozoite morphogenesis in asexual malaria infections. *Exp Parasitol* **88**: 184-193.
- Taraschi, T.F. (1999) Macromolecular transport in malaria-infected erythrocytes. *Novartis Found Symp* **226**: 114-120; discussion 121-115.
- Taraschi, T.F., Trelka, D., Martinez, S., Schneider, T., and O'Donnell, M.E. (2001) Vesicle-mediated trafficking of parasite proteins to the host cell cytosol and erythrocyte surface membrane in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Int J Parasitol* **31**: 1381-1391.
- Taraschi, T.F., O'Donnell, M., Martinez, S., Schneider, T., Trelka, D., Fowler, V.M., Tilley, L., and Moriyama, Y. (2003) Generation of an erythrocyte vesicle transport system by *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Blood* **17**: 17.
- Tatu, U., and Helenius, A. (1997) Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **136**: 555-565.
- Thomas, A.W., Waters, A.P., and Carr, D. (1990) Analysis of variation in PF83, an erythrocytic merozoite vaccine candidate antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **42**: 285-287.

- 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.
- 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 Dooren, G.G., Su, V., D'Ombain, M.C., and McFadden, G.I. (2002) Processing of an apicoplast leader sequence in *Plasmodium falciparum* and the identification of a putative leader cleavage enzyme. *J Biol Chem* **277**: 23612-23619.
- Van Wye, J., Ghori, N., Webster, P., Mitschler, R.R., Elmendorf, H.G., and Haldar, K. (1996) Identification and localization of rab6, separation of rab6 from ERD2 and implications for an 'unstacked' Golgi, in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **83**: 107-120.
- Vial, H.J., Eldin, P., Martin, D., Gannoun, L., Calas, M., and Ancelin, M.L. (1999) Transport of phospholipid synthesis precursors and lipid trafficking into malaria-infected erythrocytes. *Novartis Found Symp* **226**: 74-83.
- Volkman, S.K., Cowman, A.F., and Wirth, D.F. (1995) Functional complementation of the *ste6* gene of *Saccharomyces cerevisiae* with the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8921-8925.
- von Heijne, G. (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* **184**: 99-105.
- Wagner, M.A., Andemariam, B., and Desai, S.A. (2003) A two-compartment model of osmotic lysis in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Biophys J* **84**: 116-123.
- Waller, R.F., Keeling, P.J., Donald, R.G., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., Cowman, A.F., Besra, G.S., Roos, D.S., and McFadden, G.I. (1998) Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12352-12357.
- 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.
- Wastl, J., Duin, E.C., Iuzzolino, L., Dorner, W., Link, T., Hoffmann, S., Sticht, H., Dau, H., Lingelbach, K., and Maier, U.G. (2000) Eukaryotically encoded and chloroplast-located rubredoxin is associated with photosystem II. *J Biol Chem* **275**: 30058-30063.
- Waterkeyn, J.G., Wickham, M.E., Davern, K.M., Cooke, B.M., Coppel, R.L., Reeder, J.C., Culvenor, J.G., Waller, R.F., and Cowman, A.F. (2000) Targeted mutagenesis of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) disrupts cytoadherence of malaria-infected red blood cells. *Embo J* **19**: 2813-2823.
- Wellems, T.E., and Howard, R.J. (1986) Homologous genes encode two distinct histidine-rich proteins in a cloned isolate of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 6065-6069.
- 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., Denny, P.W., Preiser, P.R., Rangachari, K., Roberts, K., Roy, A., Whyte, A., Strath, M., Moore, D.J., Moore, P.W., and Williamson, D.H. (1996) Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* **261**: 155-172.
- Wilson, R.J. (2002) Progress with parasite plastids. *J Mol Biol* **319**: 257-274.
- Winter, V.J., Cameron, A., Tranter, R., Sessions, R.B., and Brady, R.L. (2003) Crystal structure of *Plasmodium berghei* lactate dehydrogenase indicates the unique structural differences of these enzymes are shared across the *Plasmodium* genus. *Mol Biochem Parasitol* **131**: 1-10.

- Wiser, M.F., Leible, M.B., and Plitt, B. (1988) Acidic phosphoproteins associated with the host erythrocyte membrane of erythrocytes infected with *Plasmodium berghei* and *P. chabaudi*. *Mol Biochem Parasitol* **27**: 11-21.
- Wiser, M.F., Lanners, H.N., Bafford, R.A., and Favaloro, J.M. (1997) A novel alternate secretory pathway for the export of *Plasmodium* proteins into the host erythrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9108-9113.
- Wiser, M.F., Grab, D.J., and Lanners, H.N. (1999a) An alternative secretory pathway in *Plasmodium*: more questions than answers. *Novartis Found Symp* **226**: 199-211; discussion 211-194.
- Wiser, M.F., Lanners, H.N., and Bafford, R.A. (1999b) Export of proteins via a novel secretory pathway. *Parasitol Today* **15**: 194-198.
- Wooden, J.M., Hartwell, L.H., Vasquez, B., and Sibley, C.H. (1997) Analysis in yeast of antimalaria drugs that target the dihydrofolate reductase of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **85**: 25-40.
- Yadava, A., Ockenhouse, C.F., Zhang, H., Howard, E.M., Roepe, P.D., Wooden, J.M., Hartwell, L.H., Vasquez, B., and Sibley, C.H. (2003) Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Infect Immun* **71**: 4961-4969.
- Yang, S., Nikodem, D., Davidson, E.A., and Gowda, D.C. (1999) Glycosylation and proteolytic processing of 70 kDa C-terminal recombinant polypeptides of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 expressed in mammalian cells. *Glycobiology* **9**: 1347-1356.
- Yung, S., Unnasch, T.R., and Lang-Unnasch, N. (2001) Analysis of apicoplast targeting and transit peptide processing in *Toxoplasma gondii* by deletional and insertional mutagenesis. *Mol Biochem Parasitol* **118**: 11-21.
- Zhang, H., Howard, E.M., Roepe, P.D., Wooden, J.M., Hartwell, L.H., Vasquez, B., and Sibley, C.H. (2002) Analysis of the antimalarial drug resistance protein PfCRT expressed in yeast. *J Biol Chem* **277**: 49767-49775.
- Zuegge, J., Ralph, S., Schmuker, M., McFadden, G.I., and Schneider, G. (2001) Deciphering apicoplast targeting signals--feature extraction from nuclear-encoded precursors of *Plasmodium falciparum* apicoplast proteins. *Gene* **280**: 19-26.

V. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach für die Betreuung dieser Arbeit, für seine fachliche und persönliche Unterstützung, sowie für die Möglichkeit eines viermonatigen Forschungsaufenthalts am Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research in Melbourne (Australien) bedanken.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Uwe Maier für die Erstellung des Zweitgutachtens und für die gute und unkomplizierte „botanisch-zoologische“ Zusammenarbeit.

Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl und Herrn Prof. Dr. Ralph Schwarz möchte ich für ihre Teilnahme an der Prüfungskommission danken.

Ich danke den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Parasitologie, die mich bei der Durchführung der Experimente unterstützt haben und mir immer hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite standen: PD Dr. Frank Seeber, Dr. Stefan Baumeister, Dr. Julius Nyalwidhe, Nadine Thomsen-Zieger, Lothar Kremp, Stefan Charpian, Verena Böhm, Julia Eckart, Nadine Kiel, Sandra Marx, Nicole Draht, Marco Mernberger und Galina Bauer. Bei Frank Seeber bedanke ich mich außerdem für die tolerante Aufnahme einer „Plasmodianerin“ ins Toxo-Labor und dafür, dass meine Allgemeinbildung durch die WDR2-Textbeiträge enorm verbessert wurde. Nadine Thomsen-Zieger danke ich insbesondere für den freundschaftlichen Umgangston im Labor und manche kleine „Verschwörungen“.

Meinem Freund und Lieblings-Kollegen Janni Papakrivos danke ich für alle fachlichen sowie absolut-unwissenschaftlichen Diskussionen und Gespräche und besonders für seine Loyalität.

Mein Dank gilt auch ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Parasitologie, von deren „Erbe“ ich profitieren durfte: Kerstin Paprotka, Michael Vollmer, Christiane Bomm, Stefanie Bolte, Anika Bednarek und Dr. Frank Baumgartner.

Des Weiteren danke ich Dr. Cyrill Brand, Dr. Stefan Zauner, PD Dr. Achim Paululat, Dr. Simone Lier, Annette Bergter und vielen weiteren aktuellen oder ehemaligen Kollegen und Kolleginnen aus dem Fachbereich Biologie für ihre Kooperation und Unterstützung.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Alan F. Cowman für die Möglichkeit am Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research die Plasmodium-Transfektionstechnik zu erlernen. Für die freundliche Aufnahme in Melbourne und tatkräftige Hilfestellung im Labor danke ich Dr. Tim Gilberger, Dr. Melanie Rug, Dr. Till Voss, Janine Stubbs, Jenny Thomson, Tony Triglia, Dr. Jake Baum, Marian Cravino, Dr. Stuart Ralph, Dr. Matthias Marti, Dr. Markus Meissner, Prof. Dr. Brendan Crabb, Dr. Ellen Knuepfer, Dr. Robert Good und Dr. Alexander Maier.

Bei Prof. Dr. Catherine Jackson (NIH, Bethesda, Maryland) bedanke ich mich für die freundliche Überlassung der Hefe-Transfektionsplasmide und des APY033p90 Hefestammes.

Christian Klotz (Humboldt-Universität, Berlin) danke ich für die Zusammenarbeit beim Signal Sequence Trap.

Ich danke dem Boehringer Ingelheim Fonds für die Gewährung von Geldern für ein viermonatiges Reisestipendiums nach Melbourne, Australien.

Meiner Familie, meinen Freundinnen und Freunden, Bekannten sowie MitbewohnerInnen danke ich herzlich dafür, dass sie immer für mich da waren.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„*Plasmodium falciparum*: Funktionsanalysen von Proteinen des sekretorischen Transportweges in transfizierten Zellen“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 30. Januar 2004

Sabine Wiek