

Die biochemische Analyse des
Plasmodium falciparum Zytoadhärenz Moleküls PfEmp1
zeigt einen potentiell neuen Mechanismus für die
Insertion von Oberflächenproteinen in Membranen

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

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Janni Papakrivos
aus Olpe

Marburg, 2004

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

am 23. 2. 2004 angenommen

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Zweitgutachter: Prof. Dr.Uwe Maier

Tag der mündlichen Prüfung

am: 27. 2. 2004

I Inhalt

II Abkürzungen	v
III Abbildungen	vi
IV Zusammenfassung	viii
1 Einleitung	1
1.1 Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	1
1.2 Malaria-Pathologie und das Immunsystem des Menschen	2
1.2.1 Sequestrierung infizierter Erythrozyten und die Implikationen	3
1.2.2 Malaria-Toxin	5
1.2.3 Erworbene Immunität gegen Malaria	6
1.3 Zelluläre Struktur und Physiologie der Blutstadien des Parasiten	9
1.3.1 Nährstoffaufnahme des intraerythrozytären Parasiten über die Wirtszellmembran	9
1.3.2 Nährstoffaufnahme des intraerythrozytären Parasiten über die parasitophore Vakuolenmembran	10
1.4 Proteintransport in infizierten Erythrozyten	11
1.5 Parasiteninduzierte Strukturveränderungen der Wirtszelle	15
1.5.1 Proteinsortierung im Cytoplasma der Wirtszelle	15
1.5.2 Parasiteninduzierte chemische und mechanische Veränderungen der Wirtszelle	16
1.5.3 Knobs	18
1.6 <i>P. falciparum</i>-Erythrocyten-Membranprotein 1 (PfEmp1)	20
1.6.1 Entdeckung	20
1.6.2 PfEmp1 vermittelt die Cytoadhärenz parasitierter Erythrozyten	21
1.6.3 Die Mechanismen der antigenen Variation von PfEmp1	22
1.7 PfEmp1 – ein Impfstoffkandidat?	23
1.8 Theoretische Überlegungen und die Ziele der Arbeit	24
2 Material und Methoden	27
2.1 Reagenzien	27
2.2 Antikörper	28
2.3 Sonstiges	29
2.4 Lösungen, Puffer und Medien	30
2.5 Zellkultur	35
2.5.1 Parasiten	35
2.5.2 Isolation von Trophozoiten-infizierten Erythrozyten (Pasvol et al., 1978)	35
2.5.3 Selektion der A4-Laborlinie auf die Expression von A4-PfEmp1	36
2.5.4 Radioaktive Markierung von infizierten Erythrozyten (Benting et al., 1994)	36
2.6 SDS-PAGE und Western Blot-Analyse von Proteinfractionen	36
2.6.1 Proteinbestimmung (Bradford, 1976)	36

2.6.2 Fällung von Proteinen	37
2.6.3 Analyse von Protein-Fractionen mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970)	37
2.6.4 Autoradiographie	38
2.6.5 Immunoblotting (Towbin et al., 1979)	38
2.7 Trypsin-Behandlung und Fraktionierung von infizierten Erythrozyten	39
2.7.1 Generelles Trypsinierungsschema für diese Arbeit als Orientierungshilfe	39
2.7.2 Fraktionierung und Lyse von infizierten Erythrozyten	39
2.8 Agarose-Gelelektrophorese und Northern-Blot-Analyse von RNA-Spezies	41
2.8.1 Präparation von genomischer DNA aus <i>P. falciparum</i> (Sambrook et al., 1989)	41
2.8.2 PCR (Rubio et al., 1996)	41
2.8.3 Radioaktive Markierung der varC-DNA	42
2.8.4 Präparation von Gesamt-RNA aus <i>P. falciparum</i> (Sambrook et al., 1989)	43
2.8.5 Elektrophorese von RNA durch Formaldehyd-Agarose-Gele (Sambrook et al., 1989)	43
2.8.6 Northern Blot (Sambrook et al., 1989)	43
2.9 Extraktionen von Membranen von infizierten Erythrozyten	44
2.9.1 Behandlung mit Salz- und Karbonatpuffer zur Extraktion von peripheren Membranproteinen (Fujiki et al., 1982; Johnson et al., 1994)	44
2.9.2 Extraktion mit 1 % Triton	44
2.9.3 Triton X-114-Phasenpartitionierung von Membranproteinen (Vachon et al., 1991)	44
2.9.4 Harnstoffbehandlung von Membranen von infizierten Erythrozyten	45
2.10 Dichtegradienten-Zentrifugation	45
2.10.1 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (Beckers et al., 1994)	45
2.10.2 Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation von leichten Membranen (Macintyre, 1992)	46
2.11 Lipidanalyse (nach Bligh und Dyer, 1959)	46
2.12 BFA-Behandlung	47
2.13 FACS-Analyse (Roberts et al., 1992)	47
2.14 Zweidimensionale Auftrennung von Proteinen	48
2.14.1 Auftrennung in der ersten Dimension	48
2.14.2 Auftrennung in der zweiten Dimension und Visualisierung der Proteinbanden	49
2.15 Morphologische Analysen	49
2.15.1 Immunfluoreszenz	49
2.15.2 Elektronenmikroskopie	49
3 Ergebnisse	51
3.1 Heterogenität der PfEmp1-Expression in der FCBR-Linie	51
3.1.1 Amplifikation und radioaktive Markierung des vollständigen varC-Fragmentes	51
3.1.2 In der FCBR-Linie wird eine heterogene Population von var-mRNA gebildet	52
3.2 Biochemische und morphologische Lokalisation von PfEmp1 in Trophozoiten-infizierten Erythrozyten	54
3.2.1 PfEmp1 ist in Trophozoiten-Stadien unlöslich	54
3.2.2 PfEmp1 wird auf die Oberfläche des infizierten Erythrozyten transportiert	55

3.2.3 PfEmp1 akkumuliert im Cytosol der Wirtszelle	58
3.2.4 Fazit	59
3.3 Intrazelluläres PfEmp1 assoziiert mit der Erythrozytenmembran	61
3.3.1 Der Dichtegradient wird kontinuierlich nach Zentrifugation und Austropfen	61
3.3.2 Lösliche und Membranproteine lassen sich in Saccharose-Dichtegradienten voneinander trennen	61
3.3.3 Die PVM vesikuliert während der osmotischen Lyse	65
3.3.4 Dichtegradienten mit optimierten Trenneigenschaften für PfExp1	66
3.3.5 Morphologische Analyse der PfExp1-enhaltenen Vesikel	67
3.3.6 PfEmp1 kosegregiert mit der Erythrozytenmembran	69
3.3.7 Fazit	69
3.4 PfEmp1 sedimentiert in Partikeln hoher Dichte nach Solubilisierung mit 1 % Triton	69
3.4.1 PfEmp1 ist unlöslich in Detergentien der Triton X-Reihe	70
3.4.2 PfEmp1 segregiert auch im Saccharose-Gradienten mit der Wirtszellmembran	71
3.4.3 PfEmp1 sedimentiert nach Solubilisierung in Triton X im Saccharose-Gradienten	72
3.4.4 Fazit	75
3.5 Intrazelluläres PfEmp1 weist für integrale Membranproteine untypische Löslichkeitseigenschaften auf	75
3.5.1 Intrazelluläres PfEmp1 ist in 0,1 M Karbonat löslich und segregiert teilweise in die wasserlösliche Phase nach Triton X-114-Partitionierung	75
3.5.2 Fazit	76
3.6 PfEmp1 interagiert nicht direkt mit den Lipiden der Wirtszellmembran	77
3.6.1 Das tryptische Fragment von PfEmp1 lässt sich mit Harnstoff aus der Erythrozytenmembran herauslösen	78
3.6.2 Auch intaktes PfEmp1 ist mit Harnstoff extrahierbar	79
3.6.3 Nach Harnstoff-Extraktion und Dialyse sedimentiert PfEmp1 bei 100'000 g	81
3.6.4 PfEmp1 segregiert mit Fraktionen geringer Dichte nach Harnstoff-Behandlung	81
3.6.5 Lipidanalyse der Fraktionen nach Harnstoff-Solubilisierung und Dichtegradientenzentrifugation	83
3.6.6 Fazit	86
3.7 Ein Versuch, das tryptische Fragment von PfEmp1 mit dem MALDI-TOF-Verfahren zu charakterisieren	86
3.7.1 Die Abundanz der Oberflächenpopulation von PfEmp1 reicht für eine MALDI-Charakterisierung nicht aus	86
3.7.2 Fazit	89
3.8 Analyse der physikalischen Eigenschaften von PfEmp1 nach Synthese und Import in den sekretorischen Transportweg	89
3.8.1 Die Sekretion von PfEmp1 wird durch BFA inhibiert; die Mehrheit des Proteins wird als karbonatlösliche Form synthetisiert	90
3.8.2 Fazit	92
4 Diskussion	93
4.1 Wird PfEmp1 mit gängigen Algorithmen als Transmembranprotein vorhergesagt?	93

4.2 Wird PfEmp1 als integrales Membranprotein synthetisiert und über den klassischen Sekretionsweg in die Wirtszelle exportiert?	96
4.3 Liegt PfEmp1 in der Wirtszelle als integrales Membranprotein vor?	98
4.4 Assoziiert PfEmp1 mit Vesikeln?	100
4.5 Ist PfEmp1 über die konservierte ATS-Region im Zytoskelett der Wirtszelle verankert?	102
4.6 Liegt externes PfEmp1 als integrales Membranprotein in der Erythrozytenmembran vor?	103
4.7 Neues Transportmodell für PfEmp1	106
4.8 Ausblick	109
5 Literatur	111

II Abkürzungen

		s. o.	siehe oben
		s. u.	siehe unten
Abb.	Abbildung	sek.	Sekunde
ATS	<i>Acidic Terminal Sequence</i>	SLO	Streptolysin O
BFA	Brefeldin A	sog.	sogenannt
bp	Basenpaare	Tab.	Tabelle
bzw.	beziehungsweise	U	<i>Units</i>
COP	<i>Coatomer Protein</i>	ÜN	über Nacht
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat	Vol.	Volumen
ER	Endoplasmatisches Retikulum	z. B.	zum Beispiel
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>	z. T.	zum Teil
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>		
h	Stunde		
IE	infizierter Erythrozyt		
iRBC	<i>infected Red Blood Cell</i>		
KAHRP	<i>Knob-associated Histidin-rich Protein</i>		
kDa	Kilodalton		
MC	<i>Maurer's Clefts</i>		
min.	Minute		
mind.	mindestens		
µg	Mikrogramm		
µl	Mikroliter		
ORF	<i>Open Reading Frame</i>		
P	<i>Pellet</i>		
PCR	Polymerase Chain Reaction		
PfEmp1	Plasmodium falciparum- Erythrozyten-Membranprotein 1		
PPM	<i>Parasite Plasma Membrane</i>		
PVM	parasitophore Vakuolenmembran		
RBCM	<i>Red Blood Cell Membrane</i>		
RT	Raumtemperatur		
S	<i>Supernatant</i>		

III Abbildungen

Abb. 1:	Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	1
Abb. 2:	Infizierter Erythrozyt schematisch	12
Abb. 3:	<i>Schematische Darstellung von GBP und KAHRP</i>	14
Abb. 4:	Sekretion, Verteilung und Interaktion wichtiger Membran-assoziiierter Proteine im infizierten Erythrozyten	16
Abb. 5:	Oberfläche des infizierten Erythrozyten	19
Abb. 6:	Primärstruktur von A4-PfEmp1	21
Abb. 7:	Gängiges Modell über den Transport von PfEmp1	25
Abb. 8:	Generelles Trypsinierungsschema	40
Abb. 9:	BFA-Experiment schematisch	48
Abb. 10:	Amplifikation der varC-Region von PfEmp1 mit PCR schematisch	51
Abb. 11:	<i>PCR von varC (A) und Herstellung einer radioaktiven Sonde (B)</i>	52
Abb. 12:	Northern-Blot-Analyse von var-mRNA	53
Abb. 13:	Löslichkeit von PfEmp1	54
Abb. 14:	<i>FACS-Analyse von A4-PfEmp1 nach Inkubation mit verschiedenen Trypsinkonzentrationen</i>	56
Abb. 15:	Western-Blot-Nachweis der ATS-Domäne	57
Abb. 16:	Western-Blot-Analyse der Transportkinetik von PfExp1 und PfEmp1 in Ring- und Trophozoiten-stadien	58
Abb. 17:	SLO-Permeabilisierung und Trypsinierung von infizierten Erythrozyten	60
Abb. 18:	<i>Gemittelte Saccharose-Konzentration der Fraktionen</i>	62
Abb. 19:	Western-Blot-Analyse von Marker-Membranproteinen nach Dichtegradientenzentrifugation	63
Abb. 20:	Autoradiographie von Membranproteinen nach der Trennung in der Dichtegradientenzentrifugation	64
Abb. 21:	Trypsin-Verdau von vesikulärem PfExp1	65
Abb. 22:	Dichteumrechnung von Saccharose nach Iodixanol	66
Abb. 23:	Flotation von Vesikeln im Iodixanol-Gradienten	67
Abb. 24:	Negative Staining der Vesikeln	68
Abb. 25:	PfEmp1 im Nycodenz-Dichtegradienten	70

Abb. 26: Solubilisierung von Membranen von infizierten Erythrozyten mit Triton X-100 und Triton X-114	71
Abb. 27: Verteilung von PfEmp1 und Marker-Membranproteine im Saccharose-Gradienten	73
Abb. 28: <i>Verteilung von PfEmp1 und Marker-Membranproteine im Saccharose-Gradienten nach Solubilisierung mit 1% Triton X-114</i>	74
Abb. 29: Extraktionen zur Charakterisierung von Membranproteinen	77
Abb. 30: Harnstoffextraktion und –dialyse von Membrane von Trypsin-behandelten infizierten Zellen	79
Abb. 31: Harnstoffextraktion und –dialyse von Membrane von infizierten Zellen	80
Abb. 32: Ultra-Zentrifugation bei verschiedenen Dialysekon-zentrationen	81
Abb. 33: Coomassie-Färbung und Autoradiographie von Membranproteinen nach Harnstoff-Behandlung und Trennung in der Dichtegradientenzentrifugation	82
Abb. 34: <i>Verteilung von PfEmp1 und Marker-Membranproteine im Saccharose-Gradienten nach Solubilisierung mit 8 M Harnstoff</i>	84
Abb. 35: Lipidanalyse der Fraktionen 7-11 und 2-6 aus Abb. 34	85
Abb. 36: 2-dimensionale Auftrennung von Membranproteinen	87
Abb. 37: 2-dimensionale Auftrennung von Membranproteinen nach Harnstoff-Behandlung	87
Abb. 38: BFA-Sensitivität von PfEmp1 und Markerproteinen in Ring-Stadien	89
Abb. 39: Vergleich hydrophober Regionen von 10 verschiedenen PfEmp1-Sequenzen und 2 Typ1-Transmembranproteinen	97
Abb. 40: Neues Modell über den Transport von PfEmp1	106

IV Zusammenfassung

Das 1995 entdeckte *Plasmodium falciparum* Zytoadhärenz-Molekül PfEmp1 wird auf der Oberfläche von infizierten Erythrozyten exponiert und ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor in Malaria. PfEmp1-Proteine bilden eine hoch-variable Antigenfamilie, die dem intraerythrozytären Parasiten die Immunevasion ermöglicht. In der allgemeinen Vorstellung wird PfEmp1, das eine zum C-Terminus proximale hydrophobe Region besitzt, als Typ 1-Membranprotein synthetisiert und als solches in die Erythrozytenmembran sezerniert. Dieses Modell setzt einen Protein-Sekretionsapparat, wie er in allen kernhaltigen eukaryoten Zellen vorhanden ist, in der Wirtszelle voraus. Erythrozyten sind jedoch weder zu der Synthese noch zu dem Transport von Proteinen fähig. Dieses Problem wurde in dem vorliegenden Projekt zum Anlass genommen, das Modell einer genauen biochemischen Überprüfung zu unterziehen.

Das Protein konnte nach Behandlung von infizierten Erythrozyten mit dem Sekretions-Inhibitor BFA im Parasiten akkumuliert werden und ließ sich dort mit alkalischem Karbonatpuffer im Gegensatz zu einem integralen Marker-Membranprotein extrahieren.

Es wurde ein Verfahren zur Untersuchung von Transportvesikeln entwickelt, jedoch konnte die Assoziation von PfEmp1 mit solchen nicht gezeigt werden. Stattdessen war das Protein, einmal in die Wirtszelle sezerniert, unter Bedingungen, unter denen integrale Membranproteine unlöslich sind, löslich.

PfEmp1-Moleküle, die in die Erythrozytenmembran inseriert waren, konnten mit Harnstoff extrahiert werden. Integrale Marker-Membranproteine waren resistent gegen die Harnstoffbehandlung, und in Saccharose-Dichtegradienten konnte Oberflächen-PfEmp1 nach Harnstoffbehandlung von Membranproteinen des Erythrozyten getrennt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeichnen ein neues Bild von der Membranassoziation von PfEmp1 und deuten auf einen gänzlich verschiedenen Mechanismus der Sekretion und der Membraninsertion hin. Das Protein wird vermutlich als peripheres Membranprotein oder als Teil eines Komplexes sezerniert und über einen unbekanntem Mechanismus, der die spezifische Interaktion von PfEmp1 mit Protein-Bindungspartnern impliziert, in die Erythrozytenmembran inseriert. Dort steht PfEmp1 im Verband mit anderen Proteinen, ohne selber direkt mit Lipiden wechselzuwirken.

1 Einleitung

1.1 Der Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

P. falciparum ist ein eukaryoter Parasit und durchläuft in seiner Entwicklung einen komplizierten Lebenszyklus, der sich durch Wirts- und Generationswechsel auszeichnet. Es soll hier nur kurz auf die wesentlichen Merkmale des Lebenszyklus (Abb. 1) des Parasiten eingegangen werden.

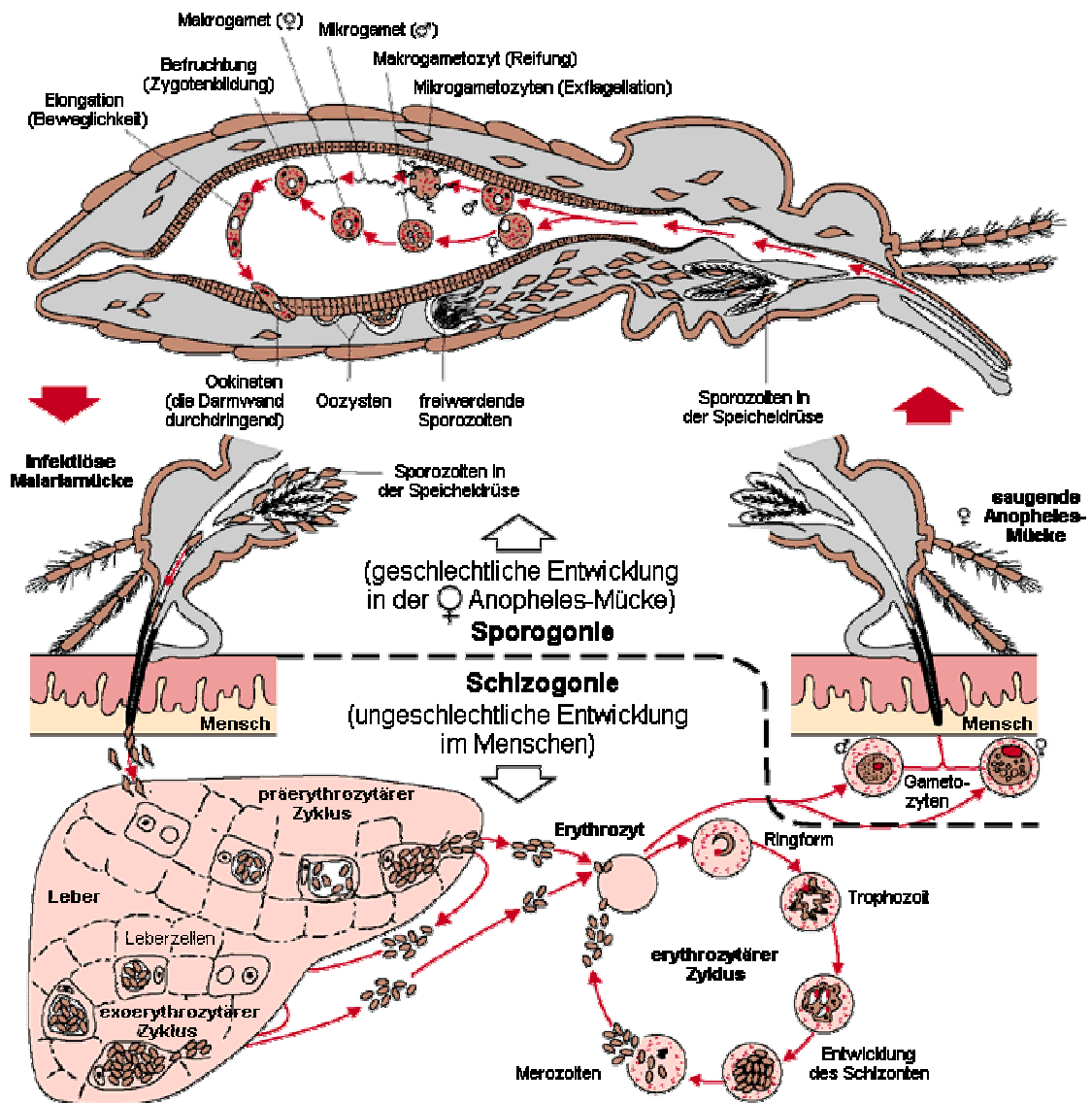


Abb. 1: Lebenszyklus von *P. falciparum*

Die obere Hälfte der Abbildung stellt die geschlechtliche Vermehrung (Sporogonie) der Parasiten in der *Anopheles*-Mücke dar. Die untere Hälfte zeigt die ungeschlechtliche Vermehrung (Schizogonie) der Parasiten im Menschen (Jeffrey und Leach, 1999). Details s. Text.

Als Transmissionsvektoren dienen Stechmücken der Gattung *Anopheles*; die ungeschlechtliche Vermehrung findet im Menschen, die geschlechtliche in der weiblichen Mücke statt. Bei einer Blutmahlzeit am Menschen, bei dem die Infektion mit *P. falciparum* mindestens 10 Tage fortgeschritten ist, nehmen die Stechmücken sexuell differenzierte Vorläuferzellen des Parasiten auf, sog. Gametocyten. In der Mücke differenzieren die Gametocyten schnell zu männlichen und weiblichen Gameten aus. Diese verschmelzen und bilden das einzige diploide Stadium des gesamten Zyklus, die Zygote. Noch im aufgenommenen Blut entwickelt sich die Zygote zu einer beweglichen Form, dem Ookineten. Dieser durchwandert die Mitteldarmwand der Mücke und bildet auf der Hämolymphe-seite des Mitteldarms zwischen den Epithelzellen und der Basalmembran die Oocyste. Damit ist die Infektion der Mücke, die jetzt als Vektor bezeichnet wird, etabliert. In der Oocyste entstehen durch meiotische Teilungen, die als Sporogonie bezeichnet werden, die Sporozoitien, die nach Aufplatzen der Oocyste über die Hämolymphe in die Speicheldrüse der Mücke gelangen. Bei einer erneuten Blutmahlzeit des Vektors werden diese Infektionsstadien wieder auf den Menschen übertragen und gelangen auf noch nicht geklärte Weise (Menard, 2001) zunächst in die Leber, wo sie Hepatocyten invadieren und sich in diesen vegetativ vermehren und schließlich durch Platzen der Wirtszelle in den Blutkreislauf freigesetzt werden. Dieser erste Vermehrungsschritt wird als präerythrozytäre Schizogonie bezeichnet. Im Blut des Menschen invadieren die Infektionsstadien des Parasiten (Merozoiten) Erythrozyten, in denen sie sich vermehren und diese schließlich zerstören. Der wiederholte Befall von Erythrozyten verursacht eine Überschwemmungsinfektion (erythrozytäre Schizogonie) im Menschen, die zum Verlust von 60% der roten Blutzellen führen kann (Sherman, 1998) und unbehandelt meist letal ist. Auf die besondere Pathologie einer Infektion mit *P. falciparum* wird an späterer Stelle detailliert eingegangen. Obwohl noch nicht in allen Einzelheiten verstanden, scheint die zunehmende Parasitämie und die damit verbundene Stresszunahme für den Parasiten durch Anämie und Immunantworten des Wirtes als Trigger für die Differenzierung zu Geschlechtszellen zu dienen, die von einer *Anopheles*-Mücke bei einer Blutmahlzeit aufgenommen werden (Nacher *et al.*, 2002). Damit schließt sich der Kreislauf.

1.2 Malaria-Pathologie und das Immunsystem des Menschen

Eine Schlüsselbeobachtung bei der Malaria ist das Fehlen eines Immunschutzes, der die Gesamtheit der *Plasmodium*-Erreger abtötet. Hyperimmune Erwachsene aus Endemiegebieten, die kontinuierlich der Transmission der Parasiten ausgesetzt sind, tragen

infizierte Erythrozyten ohne klinische Symptome aufzuweisen. Bei kontinuierlicher Exposition entwickelt sich im Menschen langsam eine Form der Immunität, die zwar vor Krankheit schützt, nicht aber vor der Infektion. Die Mechanismen, denen die erworbene Immunität gegen Malaria zugrunde liegt, stehen seit langem im Mittelpunkt der medizinischen Forschung. Bis heute konnte kein vollständiges Bild der molekularen Ereignisse während des Krankheitsverlaufes gewonnen werden. In den letzten Jahren wurde jedoch eine solche Fülle an Informationen erworben, dass es an dieser Stelle unmöglich wäre, einen umfassenden Einblick in alle Aspekte der Malaria-Pathologie zu geben. Dennoch sollen die wichtigsten Faktoren und ihre möglichen Folgen kurz dargestellt werden, soweit sie für diese Arbeit wichtig sind.

1.2.1 Sequestrierung infizierter Erythrozyten und die Implikationen

Die fortgeschrittenen Entwicklungsstadien von *P. falciparum*, Trophozoiten- und Schizonten, adhären an Endothelzellen der Mikrovaskulatur über Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die wichtigsten Rezeptoren der Endothelzellen sind "intercellular adhesion molecule 1" (ICAM-1), CD36 und Chondroitinsulfonsäure (CSA). PfEmp1 ist das zur Zeit am besten charakterisierte plasmodiale Adhärenzprotein, das an diese Rezeptoren bindet. Die Zytoadhärenz infizierter Erythrozyten an Endothelzellen der Mikrovaskulatur führt zu ihrer Retention in den Organen, so dass im peripheren Blutkreislauf des Menschen fast ausschließlich junge Ring-Stadien gefunden werden können. In der medizinischen Forschung wurde sehr früh der Zusammenhang zwischen den in verschiedenen Geweben und Organen adhären den infizierten Erythrozyten und dem klinischen Verlauf einer fortgeschrittenen Malaria tropica erkannt (Bignami und Bastianelle, 1889; Spitz, 1946). In Individuen, die an einer *P. falciparum*-Infektion gestorben sind, zeigten sich hohe Zellzahlen von sequestrierten Parasiten in der Leber, Milz, Gehirn, Herz, Lunge und Gastrointestinaltrakt. Die Gefäße der befallenen Organe waren deutlich geschwollen und entlang des Endothels von parasitierten Erythrozyten befallen, z. T. sogar scheinbar ganz durch sie verschlossen. Eine vollständige Blockierung des Blutflusses in selbst engen Kapillaren scheint aber unwahrscheinlich zu sein; der Widerstand gegen den Blutstrom steigt allerdings lokal durch sequestrierte Parasiten stark an (Kaul *et al.*, 1991), was zu mechanischen Schäden und Rissen der Gefäße führen kann (Berendt *et al.*, 1994). Der Blutstau führt zunächst zu einer verminderten Diffusion von Sauerstoff, Glucose und anderen Metaboliten, was die Malaria-typischen Symptome Hypoxie und Hypoglykämie zur Folge hat. Die anaeroben Bedingungen führen zur verstärkten Bildung von Laktat, dessen Bildung

mit fataler Malaria korreliert. Die Anreicherung von parasitierten Erythrozyten in den Blutgefäßen des Gehirns korreliert mit der schwersten Form der Malaria, der zerebralen Malaria.

Man weiß bis heute nicht genau, welche immunologischen und physiologischen Reaktionen die Ablagerung der Blutstadien von *P. falciparum* in den Blutgefäßen des Gehirns hervorrufen. Die rapiden Bewußtseinsveränderungen sind nicht mit einer extensiven Hypoxiebedingten Schädigung des Hirngewebes zu erklären; vielmehr scheinen sie Symptome von Effektmolekülen und eines gestörten Metabolitenflusses zu sein, der zu einer Dysfunktion des Gehirns führt (Review: Adams *et al.*, 2002).

Während einer klinischen Malaria-Episode findet die exzessive Bildung von Zytokinen statt. Welche Rolle diese bei der Malaria-Pathologie spielen, ist im Detail nicht verstanden. Hohe Konzentrationen von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α im peripheren Blut korrelieren mit dem fatalen Verlauf einer Malaria-Erkrankung (Kwiatkowski *et al.*, 1990; Shaffer *et al.*, 1991). TNF- α wird von Makrophagen und aktivierten T-Helferzellen (T_{H1}) gebildet und induziert die Bildung von Interleukin (IL)-1 bei Makrophagen und Fibroblasten. IL-1 verursacht das Malaria-Fieber, die Bildung von IL-6 und die Bildung der Proteine der akuten Phase. In vitro und in vivo Studien haben gezeigt, dass das Platzen parasitierter Erythrozyten die verstärkte Produktion von TNF- α induziert (Kwiatkowski *et al.*, 1989; Karunaweera *et al.*, 1992a). TNF- α induziert ferner die Erhöhung der Laktatproduktion und die Produktion von Stickstoffmonoxid, NO. NO wird von Nitritoxid-Synthasen (NOS) in Endothelzellen, Astrozyten und anderen Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) gebildet und ist ein gasförmiger Botenstoff, der die Funktion von Neuronen manipuliert, indem er den axonalen Transport von Ionen bzw. die synaptische Übertragung manipuliert. Auch die Erweiterung von Blutgefäßen bei unspezifischen Immunabwehrreaktionen ist eine durch NO ausgelöste Reaktion. TNF- α und NO können in hohen Dosen das ZNS schädigen (Ramasamy, 1998). Die Halbwertszeit dieser Mediatoren kann mit der Reversibilität der Symptome der zerebralen Malaria zusammenhängen (Clark *et al.*, 1993a). In experimentellen Therapien gegen die zerebrale Malaria wurden gegen TNF- α gerichtete monoklonale Antikörper eingesetzt; sie konnten eine Reduktion des Fiebers, nicht aber den Schutz gegen die Krankheit bewirken (Kwiatkowski *et al.*, 1993; van Hensbroek *et al.*, 1996). Die Hemmung von TNF- α mit einem Anti-Entzündungswirkstoff, Pentoxifylline, resultierte dagegen in der Verkürzung des Komas und der Senkung der Mortalität (Looareesuwan *et al.*, 1998; Hemmer *et al.*, 1997).

Bei generellen Beeinträchtigungen von Neuronenfunktionen, die Bewußtseinsstörungen hervorrufen, spielt die Diffusion von NO über die Blut-Hirn-Schranke eine zentrale

Rolle (Clark *et al.*, 1993b). Allerdings konnte in Patienten mit zerebraler Malaria keine hohe Konzentration an NO nachgewiesen werden (Anstey *et al.*, 1996). Der Grund dafür liegt möglicherweise in der erhöhten Produktion von Interleukin-10 in den untersuchten Patienten, denn IL-10 hemmt die Produktion von NO. Insgesamt kann noch nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob NO und TNF- α bei zerebraler Malaria eine protektive oder pathologische Funktion haben. *In vitro*-Studien zeigen zumindest toxische Effekte dieser Moleküle auf parasitierte Erythrozyten (Karunaweera *et al.*, 1992b; Clark und Rockett, 1996).

TNF- α induziert auch die Hochregulation von ICAM-1 und seinem Liganden LFA-1 auf Leukozyten (Ma *et al.*, 1996). Die Überexpression von ICAM-1 führt zur verstärkten Sequestrierung parasitierter Erythrozyten und konnte im Maus-Modell mit zerebraler Malaria korreliert werden (Favre *et al.*, 1999). Die Bindung infizierter Erythrozyten an ICAM-1 löst möglicherweise eine Kaskade von intrazellulären Signalprozessen aus, die die Oberflächeneigenschaften und die Permeabilität des Hirnendothels verändert. Entzündungsreaktionen, die Einwanderung von Immuneffektorzellen in den perivaskulären Raum und schließlich die Entstehung von Haemorrhagien und Hirnödemen sind möglicherweise die Folgen und zerstören lokal die Blut-Hirn-Schranke (Turner, 1997; Sanni, 2001). Die lokale Überschwemmung des Hirnparenchyms mit Flüssigkeit, Immunmodulatoren und Plasmaproteinen trägt sehr wahrscheinlich zu den Symptomen zerebraler Malaria bei (Adams *et al.*, 2002).

1.2.2 Malaria-Toxin

Die Induktion hoher TNF- α -Konzentrationen durch geplatzte infizierte Erythrozyten wird von vielen Wissenschaftlern auf die inflammatorische bzw. toxische Wirkung einzelner Parasiten-spezifischer Moleküle zurückgeführt. Viele Membranproteine von *P. falciparum* sind über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Membran verankert. Die parasitären GPI-Anker sind strukturell heterogen, und bisher wurden mind. 5 unterschiedliche GPI-Strukturen über Massenspektrometrie aufgeklärt. Der Glykan-Anteil besteht aus Man₄-GlkN, die Fettsäuresubstituenten variieren (Naik *et al.*, 2000). Damit unterscheiden sie sich fundamental von humanen GPI-Molekülen. Schofield *et al.* konnten erstmalig demonstrieren, dass die GPIs von *P. falciparum* Makrophagen und vaskuläres Endothel über die Protein-Tyrosin-Kinase (PTK)-abhängigen und Protein-Kinase C (PKC)-abhängigen Signalwege aktivieren können (Schofield *et al.*, 1996; Tachado *et al.*, 1996; Tachado *et al.*, 1997). Die Aktivierung resultiert in der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und der Hochregulation von ICAM-1, die wichtige Faktoren der Malaria-Pathogenese sind (s. o.).

Die Autoren konnten *in vitro* weiter zeigen, dass die Ausschüttung von TNF- α durch monoklonale Antikörper gegen parasitäre GPIs vollständig gehemmt werden konnte. Sie schließen daraus, dass die GPIs von *P. falciparum* das dominante Malaria-Toxin sind (Schofield *et al.*, 1993; Clark und Schofield, 2000).

Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist der Sachverhalt, dass 1 Bakterium der Spezies *Escherichia coli* pro ml Blut für jeden Menschen tödlich ist, während 2 Millionen infizierte Erythrozyten pro ml Blut auch von Menschen, die noch nicht in Kontakt mit *Plasmodium* gekommen waren, toleriert werden können (persönliche Mitteilung Nicholas J. White, Bangkok). Es ist daher wahrscheinlich, dass es ein spezifisches Malaria-Toxin, welches in seiner Wirksamkeit der vieler bakterieller Toxine entspricht, gar nicht gibt. Die GPI-Anker als Toxine zu bezeichnen, ist daher problematisch. Wie bereits gezeigt, sind die pathologischen Reaktionen auf eine *Plasmodium*-Infektion im Menschen auf viele Faktoren, zu denen die parasitären GPIs möglicherweise gehören, zurückzuführen.

1.2.3 Erworbene Immunität gegen Malaria

Die Mechanismen der erworbenen Immunität gegen die Infektion mit dem Protozoen *P. falciparum* sind nicht gut verstanden. Studien mit Individuen, die in Liberia in einem Gebiet mit kontinuierlicher Malaria-Transmission lebten, zeigen, dass die Zellzahlen von infizierten Erythrozyten in Individuen mit einem Alter von 6 Monaten bis 2 Jahren ihr Maximum erreichen und danach mit steigendem Alter sinken (Petersen *et al.*, 1991). Auch die Malaria-Morbidität, gemessen an der gemittelten Körpertemperatur, die in Abhängigkeit von der Zelldichte infizierter Erythrozyten im Blut verursacht wird, nimmt mit dem Alter ab (Rogier *et al.*, 1999). Die Manifestierungsrate der zerebralen Malaria und die Anzahl der Malaria-verursachter Todesfälle erreichen das Maximum bei Kindern mit 4 Jahren in Gambia (Waller *et al.*, 1995). Diese Beobachtungen werden als Beweis angeführt, dass sich die spezifische Immunität gegen Malaria langsam entwickelt und kontinuierliche Reinfektionen des Erregers erfordert. Im Gegensatz dazu zeigten Studien mit nicht-immunen Migranten in Irian Jaya, dass sich die erworbene Immunität gegen *P. falciparum* in Erwachsenen schneller entwickelt als in Kindern und nur weniger Infektionen bedarf (Baird, 1995). In jedem Fall ist die Immunität gegen den Malaria-Erreger niemals vollständig und führt nicht zur vollständigen Eliminierung der Parasiten aus der Blutzirkulation. Sie kann vielmehr als Semi-Immunität bezeichnet werden, da sie nur die Reduktion der Parasitenzahlen und der Symptome zu bewirken vermag.

Die durch die Anopheles-Mücke übertragenen Sporozoiten befinden sich für eine gewisse Zeit im Blut, wo ein Teil von ihnen das Ziel der humoralen Immunantwort wird. Vor allem Antikörper (Hollingdale *et al.*, 1984; Mazier *et al.*, 1988) und Proteine der akuten Phase (Pied *et al.*, 1989) tragen zur Ausschaltung von Sporozoiten bei. Infizierte Hepatocyten sind in der Lage, parasitenspezifische Antigene im MHC Klasse I-Kontext auf ihrer Oberfläche cytotoxischen T-Zellen zu präsentieren und eine Abwehrreaktion dieser zu induzieren (Hoffman *et al.*, 1990; Romero *et al.*, 1990; Hill *et al.*, 1992). Seit 1970 weiß man, dass Sporozoiten, die sich noch innerhalb der Mücke befinden, mit Röntgenstrahlen derartig abgeschwächt werden können, dass sie Leberzellen zwar noch invadieren, sich in diesen aber nicht vermehren können. Solche attenuierten Sporozoiten wurden in Impfstudien getestet und konnten protektive Immunitäten sowohl im Menschen als auch im Tiermodell induzieren (Nussenzweig und Nussenzweig, 1989). Die Experimente zeigten, dass eine vollständige Immunität gegen *Plasmodium* prinzipiell möglich ist. Die Identifizierung der molekularen Faktoren von Sporozoiten, die sich als Vaccine eignen, ist seit langem ein wichtiges Thema in der klinischen Malaria-Forschung, weil es nur zwei Möglichkeiten für die Impfung mit attenuierten Sporozoiten gibt; diese sind unpraktikabel und für die klinische Anwendung nicht geeignet. Die Sporozoiten können zum einen wie im Mausmodell intravenös injiziert werden; als Alternative können infizierte Mücken auf rasierte Hautpartien appliziert werden (Hoffman *et al.*, 2002).

Die Merozoiten halten sich zwischen den erythrozytären Schizogonien ebenfalls wenige Sekunden im extrazellulären Blut auf, wo sie das Ziel antikörpervermittelter Abwehrreaktionen werden können (Riley *et al.*, 1992; Oeuvray *et al.*, 1994). Erythrozyten können keine Antigene auf ihrer Oberfläche im MHC-Kontext präsentieren und bieten dem Parasiten daher prinzipiell einen Ort mit optimaler Tarnung vor dem Immunsystem. Während des Wachstums allerdings finden Veränderungen der Erythrozytenoberfläche durch die Einlagerung von Parasitenproteinen und durch Oxidationsprozesse von humanen Membranproteinen statt. Es wurde beobachtet, dass Antikörper derart modifizierte Wirtszellproteine des Erythrozyten als fremd erkennen und Monocyten oder Makrophagen aktivieren (Giribaldi *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2001). Weitere Funktionen solcher Antikörperreaktionen können in der Reversion der Cytoadhärenz liegen, deren Folge die Präsenz von fortgeschrittenen Stadien im peripheren Blut und damit ein verstärkter Abbau von parasitierten Erythrozyten in der Milz ist (Udeinya *et al.*, 1983; Singh *et al.*, 1988; Gysin *et al.*, 1996). Tieren, denen experimentell die Milz entfernt worden waren, oder Menschen, die die Milz durch einen Unfall verloren hatten (Splenektomie), zeigten auch bei Semi-

Immunität gegen *Plasmodium* einen beschleunigten Krankheitsverlauf nach einer erneuten Infektion. Dieser korrelierte mit einer höheren Mortalität. Durch das Fehlen der Milz konnte in den Individuen keine Selektion für den adhärierenden Phänotyp der parasitierten Erythrozyten induziert werden. Die infizierten Erythrozyten verloren infolgedessen schnell die Fähigkeit zur Zytoadhärenz und waren als fortgeschrittene Stadien auch im peripheren Blut nachweisbar (Garnham, 1970; Israeli *et al.*, 1987; Chotivanich *et al.*, 2002; Grobusch *et al.*, 2003). Diese Versuche belegen die grosse Bedeutung der Milz bei der Bekämpfung der Erreger.

Seit langem sind auch die protektiven Effekte des passiven Transfers von Immunglobulinen aus Immunseren, die die Parasitämie dosisabhängig senken kann, bekannt (Cohen *et al.*, 1961; Edozien, 1964; McGregor, 1964; Sabchareon *et al.*, 1991; Gysin *et al.*, 1996). In früheren Studien wurde herausgefunden, dass Immunseren nur dann protektiv wirken, wenn der Spender und der Empfänger aus derselben Region stammen und demselben lokalen *Plasmodium*-Stamm exponiert sind (Marsh *et al.*, 1989). Experimentell lässt sich das protektive Potential eines Antiserum in einem Agglutinationsassay überprüfen. In demselben Maße, mit dem das Antiserum die infizierten Erythrozyten eines lokalen Erreger-Stammes, also eines bestimmten Isolates, durch Vernetzung agglutinieren kann, wirkt das Antiserum protektiv. In natürlichen Infektionen fehlen zu Anfang solche isolatspezifischen, agglutinierenden Antikörper, werden anschließend aber schnell gebildet (Reeder *et al.*, 1994; Bull *et al.*, 1998, 1999). Darin zeigt sich, dass die protektiven Immunmechanismen isolatspezifisch und gegen Neuinfektionen durch andere Varianten wirkungslos sind. Dies erklärt, warum die Immunabwehr nicht zu einer vollständigen Entfernung der Erreger führen kann; Individuen müssten allen lokalen Varianten exponiert sein, um eine neutralisierende Immunität entwickeln zu können (Day und Marsh, 1991).

Neueren und überraschenden Daten zufolge greift der Parasit sogar aktiv in das Immunsystem des Menschen ein. Dendritische Zellen aktivieren als professionelle antigenpräsentierende Zellen cytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen. Dazu müssen sie aber zunächst selber durch Cytokine wie TNF- α aktiviert werden und die Expression von humanen Leukozytenantigenen (HLA), Adhäsions- und Kostimulationsmolekülen auf ihren Oberflächen hochregulieren (Sallusto *et al.*, 1995). Parasitierte Erythrozyten können durch Bindung an unreife dendritische Zellen diesen Aktivierungsschritt unterbinden und damit die anschließende T-Zellantwort umgehen (Urban *et al.*, 1999).

1.3 Zelluläre Struktur und Physiologie der Blutstadien des Parasiten

Die Infektionsdauer des erythrozytären Stadiums beträgt 48 Stunden. Während dieser Zeit durchläuft der Parasit verschiedene, morphologisch distinkte Wachstumsstadien, die als Ring-, Trophozoiten- und Schizontenstadium bezeichnet werden.

1.3.1 Nährstoffaufnahme des intraerythrozytären Parasiten über die Wirtszellmembran

Der intraerythrozytäre Parasit hat einen hohen Bedarf an niedermolekularen Nährstoffen, die er von der Wirtszelle und dem extrazellulären Medium beziehen muß. Zum Teil fehlen ihm wie vielen anderen intrazellulären Parasiten wichtige biosynthetische Stoffwechselwege wie ein funktioneller Zitronensäurezyklus (Roth, 1990). Dadurch ist der Parasit vorrangig auf die Glykolyse angewiesen, um seinen Bedarf an ATP und Pyruvat zu decken. Infizierte Erythrozyten verbrauchen aus diesem Grund mehr als zweimal so viel Glukose wie nicht-infizierte Erythrozyten. Weitere essentielle Bausteine sind Nukleoside, Aminosäuren und Vitamine. Nicht-infizierte Erythrozyten nehmen solche Moleküle mit geringer Effizienz oder überhaupt nicht auf (Review: Kirk, 2001). Nach der Invasion des Erythrozyten finden in der infizierten Zelle Veränderungen statt, die die Permeabilität der Wirtszellmembran erhöhen (Ginsburg *et al.*, 1985), ein Phänomen, das allgemein als "Novel Permeation Pathway" (NPP) beschrieben wird (Kirk *et al.*, 1999; Baumeister *et al.*, 2003). Der NPP ist funktionell ein Cl⁻-Kanal und selektiv für Cl⁻- und K⁺- Ionen und kann mit vielen Anionenkanal-Inhibitoren wie 4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonsäure (DIDS) oder Furosemid gehemmt werden (Kirk und Horner, 1995). Eine Reihe von Mechanismen wurden bisher diskutiert, die der verstärkten Aufnahme von Molekülen aus dem Medium zugrunde liegen können. Desai *et al.* (2000) konnten zeigen, dass ein spannungsabhängiger Anionenkanal auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten vorhanden ist, der mit ca. 1000 Kopien pro Zelle vertreten ist und dessen pharmakologischen Eigenschaften und Substratspezifitäten mit dem NPP übereinstimmen. Die Autoren nennen den Kanal "Plasmodial Erythrocyte Surface Anion Channel" (PSAC), ein vom Parasiten synthetisiertes Protein also, das in die Wirtszellmembran inseriert wird. Dieses Protein wurde bisher aber nicht identifiziert und es gibt keinerlei Hinweise auf die Existenz von Parasitenmembranproteinen in der Erythrozytenmembran, die als potentielle Kanäle in Frage kommen. Andere Wissenschaftler konnten zeigen, dass chemische Modifikationen die Transportkinetik humaner Transport-Proteine steigern können, so dass sie mit dem hohen Bedarf des Parasiten an Nährstoffen kompatibel werden. So wurde gezeigt, dass durch Oxidation von humanen, nicht-infizierten Erythrozyten mit t-Butylhydroperoxid die

Permeabilität für Kationen mehr als zweifach gesteigert werden kann (Duranton *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde an infizierten humanen Erythrozyten gezeigt, dass durch Reduktion mit Glutathion der NPP inhibiert werden konnte (Huber *et al.*, 2002). Die Autoren nehmen dies als Beweis, dass der Parasit durch Oxidation statt durch Einlagerung parasitärer Proteine die Permeabilität der Erythrozytenmembran erhöht.

1.3.2 Nährstoffaufnahme des intraerythrozytären Parasiten über die parasitophore Vakuolenmembran

Merozoiten, die man in gelartige Erythrozytenlysate eingeschlossen und in Anwesenheit von komplettem Medium unter Wachstumsbedingungen inkubiert hat, entwickelten sich bis zum späten Trophozitenstadium von 36 h, ohne eine parasitophore Vakuolenmembran (PVM) ausgebildet zu haben (Trager *et al.*, 1990; Zung *et al.*, 1991; Trager und Williams, 1992). Die Autoren folgerten, dass eine intakte PVM und Wirtszelle für das Wachstum des Parasiten nicht essentiell zu sein scheint. Entscheidend war das Milieu, in dem sich der Merozoit befand.

Als Schnittstelle zwischen Parasit und Wirtszelle muß die PVM in vivo dennoch wichtige Funktionen bei der Nährstoffversorgung des Parasiten haben. Mit polaren fluoreszierenden Molekülen unterschiedlichen Molekulargewichts konnte für *Toxoplasma gondii* und *Eimeria nieschulzi*, auch apikomplexe Parasiten, nachgewiesen werden, dass kleine Moleküle bis 1300 Da, zu denen Monosaccharide und Aminosäuren gehören, aus dem Cytoplasma der Wirtszelle in die Vakuole diffundieren (Schwab *et al.*, 1994; Werner-Meier und Entzeroth 1997). Man vermutet, dass nicht-selektive Proteinporen in der PVM diese Moleküle passieren lassen und als molekulares Sieb funktionieren. Auch in *P. falciparum* wurden Hinweise auf die Existenz solcher Poren gefunden (Desai und Rosenberg, 1997; Desai, 1999; Nyalwidhe *et al.*, 2002). Bisher konnten jedoch keine Proteine, die an der Porenbildung beteiligt sind, identifiziert werden.

Als Hauptnahrungsquelle dient dem Parasiten das Cytoplasma der Wirtszelle, das große Mengen an Hämoglobin enthält. Es wird generell angenommen, dass die Aufnahme des Hämoglobins über das Cytostom des Parasiten erfolgt. Es handelt sich hierbei um spezialisierte Invaginationen der Parasitenplasmamembran und der ihr anliegenden parasitophoren Vakuolenmembran, die große Mengen an Wirtszelleytoplasma einschließen und sich als Doppelmembranendosomen abschnüren (Aikawa *et al.*, 1966; Yayon *et al.*, 1984; Slomianny, 1990). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass diese Doppelmembranvesikel mit der sauren Nahrungsvakuole des Parasiten fusionieren und

Hämoglobin, die PVM und andere Bestandteile des Wirtszellcytoplasmas in das Lumen der Nahrungsvakuole freisetzen. Die saure Nahrungsvakuole enthält zum Abbau dieser Nährstoffe spezialisierte Aspartat-, Cystein- und Metalloproteasen (Banerjee *et al.*, 2002; Rosenthal *et al.*, 1988; Kolakovich *et al.*, 1997). In späten Trophozoitenstadien sind 60% des Hämoglobins der Wirtszelle abgebaut (Egan *et al.*, 2002). Der Abbau von Hämoglobin in der Nahrungsvakuole setzt lösliches Häm frei, welches für den Parasiten toxisch ist. Zur Detoxifizierung wird Häm in kristalline Strukturen überführt, das Hämozoin. Auf welche Weise dies geschieht ist, nicht bekannt (Pagola *et al.*, 2000). Wie der Parasit die Aufnahme von Hämoglobin reguliert und welche Proteine dabei beteiligt sind, ist ebenfalls ungeklärt.

1.4 Proteintransport in infizierten Erythrozyten

Reife humane Erythrozyten sind auf die Bindung und den Transport löslichen Sauerstoffs spezialisiert. Sie haben als hoch-spezialisierte Zellen während ihres Reifungsprozesses ihren Zellkern und ihre Organellen verloren, und damit auch die Fähigkeit, komplexe Makromoleküle wie Nukleinsäuren, Proteine und Lipide zu synthetisieren und zu transportieren. Während einer Infektion mit *P. falciparum* werden jedoch Proteine vom Parasiten gebildet, die in die Wirtszelle und auf die Wirtszellmembran transportiert werden. Dieser Sachverhalt stellt ein zentrales zellbiologisches Problem dar. Die Mechanismen, denen der Proteintransport jenseits der Parasitenplasmamembran zugrunde liegt, sind nicht bekannt.

Abb. 2 zeigt schematisch, dass ein infizierter Erythrozyt in drei Kompartimente unterteilt ist; die Zelle des Parasiten, die parasitophore Vakuole und die Wirtszelle. Als eukaryote Zelle besitzen intraerythrozytäre Stadien des Parasiten einen Zellkern und ein endoplasmatisches Retikulum (ER). Ein typischer, durch mehrere Zisternen in cis- und trans-Seite aufgegliederter Golgi-Apparat konnte morphologisch nicht nachgewiesen werden; vielmehr scheinen nur wenige vesikuläre Strukturen dem ER angegliedert zu sein (Aikawa, 1971; Langreth *et al.*, 1978). Biochemisch wurden der cis-Golgi-Marker ERD2 und der trans-Golgi-Marker Rab6, Homologe von Golgi-Proteinen höherer Eukaryoten, nachgewiesen (Elmendorf und Haldar, 1993; De Castro *et al.*, 1996; Van Wye *et al.*, 1996). Zusätzlich wurde Sphingomyelinsynthase-Aktivität in der Peripherie des intraerythrozytären Parasiten nachgewiesen, die in höheren Eukaryoten typischerweise eine Funktion des Golgi-Apparates darstellt (Elmendorf und Haldar, 1994). Insgesamt scheint es im Parasiten also Golgi-spezifische Funktionen zu geben, wenn auch kein Golgi-Apparat als solcher ausgebildet zu sein scheint. Die Sekretion von Proteinen lässt sich mit Brefeldin A (BFA), ein toxischer

Metabolit aus Pilzen, reversibel hemmen (Doms *et al.*, 1989; Benting *et al.*, 1994). BFA hemmt durch statische Stabilisierung des Proteinkomplexes ADP-Ribosylierungsfaktor (ARF) und "ARF-Guaninnukleotid Exchange Factor (GEF)" die Bildung der COPI-Hülle und unterbindet damit den retrograden Vesikeltransport vom Golgi zum ER (Peyroche *et al.*, 1999; Presley *et al.*, 2002). Die Inhibierung des COPI-vermittelten Transports resultiert morphologisch in dem Kollaps des distinkten Golgi-Apparates (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989). Viele der bisher identifizierten Parasitenproteine, die in die parasitophore Vakuole und in die

Wirtszelle sezerniert werden, weisen als Vorläuferproteine spaltbare N-terminale Signalsequenzen auf (siehe Tabelle 1). N-terminale Signalsequenzen zeichnen sich durch eine positiv-geladene *n*-Region variabler Länge und einen hydrophoben Bereich von 6-15 Aminosäuren (*h*-Region), der von einer kurzen polaren *c*-Region gefolgt wird, aus. Das "signal recognition particle" (SRP)-Protein bindet an das Signalpeptid der naszenten Polypeptidkette und dirigiert sie zum Translokon der ER-Membran, indem es dort an den SRP-Rezeptor, der seinerseits mit dem Translokon (sec61) wechselwirkt, bindet. Manche Proteine von Eukaryoten können *in vitro* post-translational und in Abwesenheit von SRP ins ER-Lumen transloziert werden (Wiech *et al.* 1990; Schlenstedt *et al.*, 1992). Dies konnte auch für einige Hefe-Proteine *in vivo* gezeigt werden (Hann und Walter, 1991).

Tabelle 1 listet neben Proteinen mit N-terminalen Signalsequenzen auch solche auf, die keine den typischen Parametern entsprechenden Signalsequenzen aufweisen und trotzdem in die Wirtszelle sezerniert werden. Morphologisch liess sich beispielsweise eine BFA-sensitive Sekretion für PfEmp1 nachweisen (Wickham *et al.* 2001). Auch die Aminosäuresequenzen von PfCG2 und PfSBP1 weisen keine N-terminalen hydrophoben Sequenzen auf, die als Signalpeptide berechnet werden können (Tabelle 1). Durch welche topologische Signalsequenz diese Proteine in den Sekretionsweg des Parasiten dirigiert

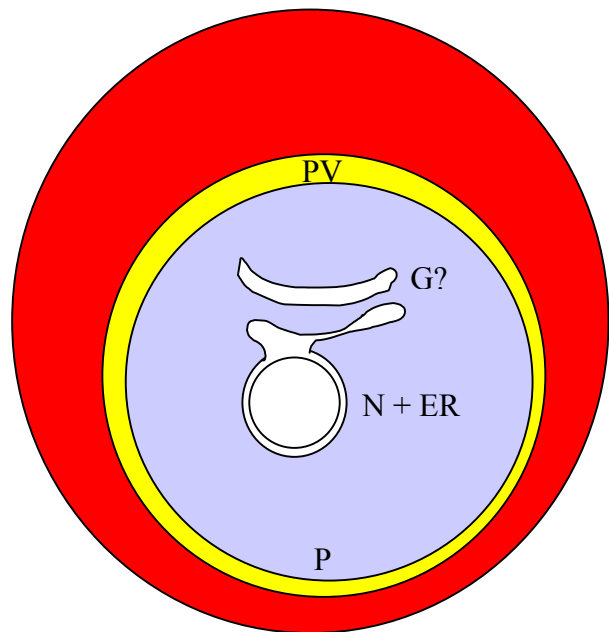


Abb. 2: Infizierter Erythrozyt schematisch

Im Parasiten (P) dargestellt sind der Nukleus (N) und das sich anschließende endoplasmatische Retikulum (ER). Ein Golgi-Apparat (G) ist möglicherweise vorhanden. Der Parasit befindet sich in der parasitophoren Vakuole (PV), die ihn von der Wirtszelle (E) trennt.

werden, und ob für alle Exportproteine derselbe Sekretionsmechanismus wirkt, ist nicht bekannt. In anderen eukaryoten Zellen wurde gezeigt, dass Proteine sogar unabhängig von SRP und sec61 über die ER-Membran transloziert werden können. Diese Proteine zeichnen sich durch eine einzige C-terminal lokalisierte hydrophobe Domäne aus, die sie in der Membran verankert. Mitglieder dieser Proteinklasse sind in verschiedenen zellulären Organellen lokalisiert und umfassen z. B. die löslichen "N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (SNARES)" (Kutay *et al.*, 1993; Kutay *et al.*, 1995).

Tab. 1: Exportierte membranassoziierte Proteine

Protein (kDa)	TMR (Pos)	SP (Pos)	Ziel	Ref
PfExp1 (18)	1 (80-101)	ja (1-22)	PVM	Günther <i>et al.</i> , 1991
PfExp2 (33)	0	ja (1-24)	PVM	Johnson <i>et al.</i> , 1994
PfCG2 (330)	0	nein	PVM	Su <i>et al.</i> , 1997
PfSbp1 (37)	1 (96-118)	nein	MC	Blisnick <i>et al.</i> , 2000
PfMAHRP1 (29)	1 (106-125)	nein	MC	Spycher <i>et al.</i> , 2003
PfKAHRP (85)	0	ja (10-34)	ZS	Pologe & Ravetch, 1986
PfEmp1 (200-350)	1 (3124-3146)*	nein	EM	Baruch <i>et al.</i> , 1995
PfEmp3 (300)	0	nein	ZS	Pasloske <i>et al.</i> , 1993
Rifins (35-44)	1 (294-317)	vielleicht (145-168)	EM	Kyes <i>et al.</i> , 1999
Clag (220)	1 (246-266)	ja (1-22)	EM	Trenholme <i>et al.</i> , 2000
Sequestrin (270)	1 (225-245)	ja (4-28)	EM	Ockenhouse <i>et al.</i> , 1991

Die Tabelle zeigt eine Auswahl wichtiger membranassoziiierter Proteine und ihren Bestimmungsorten (Ziel). Aufgelistet sind die Sequenzeigenschaften putativer Transmembranregionen (TMR), Signalpeptid (SP) und die Aminosäure-Positionen dieser Regionen in der Primärsequenz (Pos). Die Vorhersage der Signal- und Transmembranregion erfolgte mit dem Programm TMHMM. Für PfEmp1 erkennt das Programm die hydrophobe Region nicht als Transmembranhelix (*). Parasitophore Vakuolenmembran, PVM; Maurer'sche Spalten, MC; erythrozytäres Zytoskelett, ZS; Erythrozytenmembran, EM.

Die Tabelle listet auch den Bestimmungsort der aufgeführten sezernierten Proteine auf. PfSERP, PfExp1 und PfExp2 werden in die Vakuole bzw. in die Vakuolenmembran transportiert (Knapp *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1994; Fischer *et al.*, 1998). Diese Proteine weisen alle eine typische N-terminale Signalsequenz auf. Das "Knob-Assoziierte Histidin-Reiche Protein" (KAHRP) wird über die Vakuole hinaus in das Cytoplasma der Wirtszelle transportiert (Taylor *et al.*, 1987; Wickham *et al.*, 2001). Neben einer N-terminalen Signalsequenz (siehe Abb 3b) weist die Aminosäuresequenz dieses Proteins, ebenfalls N-terminal, eine auffallend histidinreiche Region auf. Für Transfektionsexperimente wurden

Plasmide konstruiert, in denen die Nukleinsäuresequenzen des für das Signalpeptid kodierenden und des für die histidinreiche Region kodierenden Bereiches an das 5'-Ende der Nukleinsäuresequenz des "Green Fluorescent Protein" (GFP) gekoppelt wurden. Es zeigte sich, dass in infizierten Erythrozyten, die mit dem Konstrukt "KAHRP-Signalpeptid + GFP" transfiziert waren, GFP in die Vakuole transportiert wurde. Das Einfügen der histidinreichen Region zwischen Signalpeptid und GFP genügte, um GFP in das Cytoplasma der Wirtszelle zu exportieren (Wickham *et al.*, 2001). Anhand von KAHRP stellt sich die Sekretion also so dar, dass eine zweigeteilte N-terminale Signalsequenz das Protein zunächst in den Sekretionsweg, der in die Vakuole führt, dirigiert, und dann, in einem zweiten Schritt, das Protein über die Vakuolenmembran in das Cytoplasma der Wirtszelle transportiert wird.

Ein solcher Zweischnittmechanismus der Sekretion wurde auch für PfGBP postuliert. PfGBP besitzt eine vom N-Terminus relativ entfernte interne hydrophobe Sequenz (Abb. 3a), die auch als atypische Signalsequenz bezeichnet wird (Benting *et al.*, 1994). Ob diese Sequenz nach dem kotranslationalen Import in das ER abgespalten wird, konnte bisher nicht gezeigt werden. Biochemische Daten zeigen hier, dass nach BFA-Behandlung infizierter Erythrozyten GBP zunächst in die Vakuole und dann über die PVM in die Wirtszelle sezerniert wird (Benting *et al.*, 1994, Ansorge *et al.*, 1996; Lingelbach, 1997).

a PfGBP



b PfKAHRP



Abb. 3: Schematische Darstellung von GBP und KAHRP

GBP besitzt eine vom N-Terminus relativ entfernte hydrophobe Region (rot), die möglicherweise ein topogenes Peptid darstellt. KAHRP besitzt eine klassische N-terminale Signalsequenz (rot), und eine N-terminale histidinreiche Region (gelb). Beiden Proteinen gemeinsam sind ausgedehnte, redundante Regionen geringer Komplexität (blau-schraffiert).

Im Gegensatz zu dem Zweischnittmodell stehen die Daten aus Transfektionsexperimenten mit Plasmiden, in denen die N-terminale Signalsequenz von PfExp1 vor das Gen für den Reporter Luziferase kloniert wurde. In mit solchen Konstrukten transfizierten infizierten Erythrozyten wurde der Großteil der Reporteraktivität im Zytoplasma der Wirtszelle gemessen (Burghaus und Lingelbach, 2001). Sollten sich diese Daten als richtig erweisen, würde es bedeuten, dass im infizierten Erythrozyten Proteine mit typischen

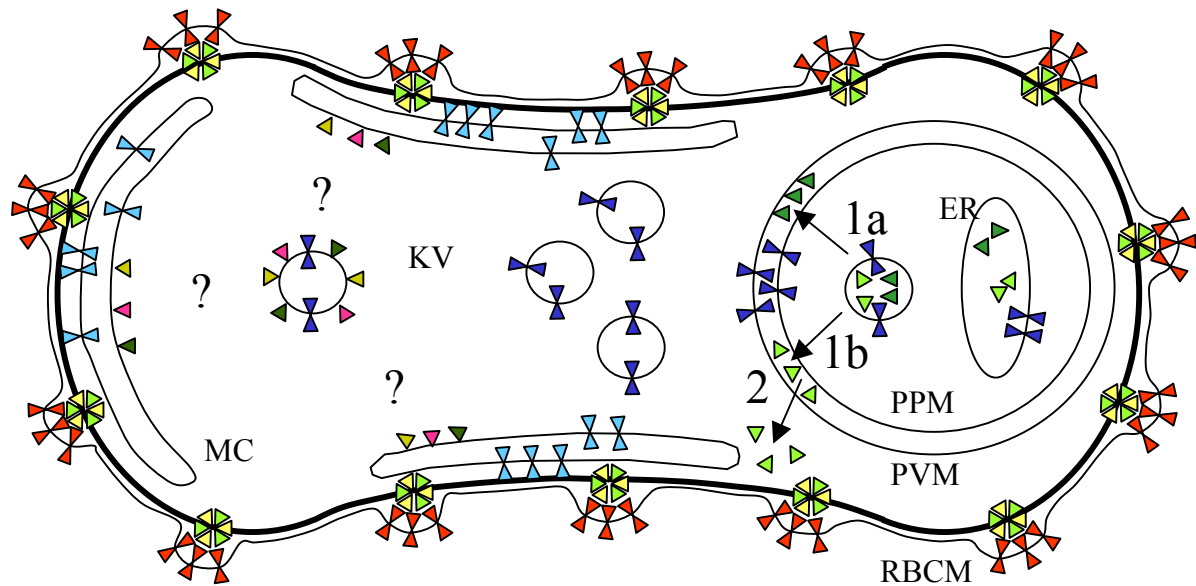
N-terminalen Signalsequenzen in einen Sekretionsweg dirigiert werden, der direkt in das Zytoplasma der Wirtszelle führt.

Die Proteine Rifin, Clag und Sequestrin (Tab. 1) scheinen Membranproteine mit typischen Signalsequenzen zu sein, die auf die Erythrozytenmembran sezerniert werden. Sie sind bisher noch nicht gut untersucht worden. Die Rifins gehören zu einer hoch-variablen Proteinfamilie mit ca. 150 Mitgliedern (Kyes *et al.*, 1999). Clag und Sequestrin scheinen an der Sequestrierung infizierter Erythrozyten in der Mikrovaskulatur beteiligt zu sein (Holt *et al.*, 1999; Sharma, 1997; s. Abb. 7).

1.5 Parasiteninduzierte Strukturveränderungen der Wirtszelle

1.5.1 Proteinsortierung im Cytoplasma der Wirtszelle

Serielle Genexpressionsstudien zeigen, dass membranassoziierte Proteine in infizierten Erythrozyten einen hohen Anteil aller Proteine darstellen (Patankar *et al.*, 2001). Während der Infektion eines Parasiten wird nicht nur die PVM als neue Membran gebildet; vielmehr entsteht im Erythrozyten ein kompliziertes Netzwerk bestehend aus PVM, membranumgrenzten Zisternen, sogenannten "Maurer's Clefts" (MC), und kleinen, mobilen Vesikeln (Gormley *et al.*, 1992; Hibbs und Saul, 1994). Dieses Membrannetzwerk ist in seiner Funktion und Herkunft noch völlig unverstanden. Möglicherweise handelt es sich bei den Maurer'schen Spalten um Erweiterungen der PVM, die, während der Parasit im Erythrozyten heranwächst und an Größe zunimmt, expandieren muss (Martinez *et al.*, 1998). Viele Autoren vermuten dagegen, dass es sich dabei um einen vom Parasiten gebildeten Proteinsortierungsapparat handelt, der die Transport-inkompetente Wirtszelle in eine kompetente umwandelt (Lauer *et al.*, 1997; Goodyer *et al.*, 1997; Albano *et al.*, 1999; Trelka *et al.*, 2000; Adisa *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2001; Taraschi *et al.*, 2001; Taraschi *et al.*, 2003; Wickert *et al.*, 2003). So wurden parasitäre Proteine im Cytoplasma der Wirtszelle identifiziert, die zu Proteinen von höheren eukaryoten Zellen, die am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt sind, homolog sind. Albano *et al.* (1999) identifizierten im Cytosol der Wirtszelle ein Protein, das homolog zu dem GTP-bindenden Protein Sar1p ist. Sar1p ist neben Sec13/31p und Sec23/24p Teil der COPII-Proteinhülle in höheren Eukaryoten (Barlowe, 2000; Pryer *et al.*, 1993). Über *P. falciparum*-Homologe zu Sec31p und NSF, welche auch am Vesikeltransport in höheren Eukaryoten funktionell beteiligt sind, wurde ebenfalls berichtet (Adisa *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2001). Auch sie wurden im Cytosol der Wirtszelle lokalisiert (Taraschi *et al.*, 2003). Für PfSar1p, PfSec31p und PfNSF gilt, dass ihre



— Cytoskelett der Wirtszelle

▲ PfEmp1

▲ PfSar1p

▲ PfSec31p

▲ PfNSF

▲ PfExp1

▲ PfSbp1

▲ PfExp2

▲ PfKAHRP

▲ PfEmp3

Abb.4: Sekretion, Verteilung und Interaktion wichtiger Membranassoziiierter Proteine im infizierten Erythrozyten

Integrale Membranproteine sind als Doppeldreiecke, periphere als Einzeldreiecke dargestellt. Die Funktionen von PfSar1p, PfSec31p und PfNSF im Zytosol und ihre Assoziation mit kleinen Vesikeln (KV) und den Maurerschen Spalten (MC) sind nicht eindeutig geklärt und mit einem Fragezeichen versehen. Die Sekretion von PfExp1 und PfExp2 erfolgt über einen klassischen Vesikeltransport vom endoplasmatischen Retikulum (ER) über die Membran des Parasiten (PPM) zur Vakuolenmembran (PVM). Für die Sekretion von PfKAHRP wird postuliert, daß sie in zwei Schritten erfolgt (Wickham *et al.*, 2001): Zunächst wird das Protein löslich in die Vakuole sezerniert (1b) und dann über die Vakuolenmembran in die Wirtszelle (2), wo es mit dem Cytoskelett der Wirtszellmembran (RBCM) komplexiert.

Lokalisation im Cytoplasma des Erythrozyten bis jetzt nicht biochemisch bestätigt werden konnte und dass anhand der zur Verfügung stehenden morphologischen Daten nur eine Minderheit der Moleküle in die Wirtszelle gelangt. Eine direkte Beteiligung der Proteine an der Sekretion von Parasitenproteinen wurde nicht nachgewiesen. In Abb. 4 sind die Membranstrukturen und wichtige membranassoziierte Proteine in der infizierten Zelle schematisch dargestellt.

1.5.2 Parasiteninduzierte chemische und mechanische Veränderungen der Wirtszelle

Neben der Bildung der MC's und dem Auftreten von Vesikeln finden ebenfalls weitreichende Veränderungen der Erythrozytenmembran statt, die der Membran neue morphologische, mechanische und physiologische Eigenschaften verleihen. In nicht-infizierten Erythrozyten liegt das Cytoskelett als zwei-dimensionales Proteinnetzwerk der

cytoplasmatischen Seite der Lipidmembran dicht an und verleiht der Zelle ihre besonderen strukturellen Eigenschaften, die im wesentlichen in einer hohen Elastizität und Fluidität beruhen (Mohandas *et al.*, 1983). Die Lebensdauer eines Erythrozyten beträgt ca. 120 Tage. Während dieser Zeit zirkulieren die Zellen im Blutkreislauf und sind aufgrund ihrer Funktion verstärkt oxidativen Prozessen durch Sauerstoffradikale ausgesetzt, die z. B. zur Peroxidation von Lipiden und zur Bildung von Seneszenzantigenen durch Modifizierung von Membranproteinen mit L-Isoaspartylresten führen (Ingrosso *et al.*, 2000). Die Oxidation von Hämoglobin kann zur Bildung von Heinz-Körpern führen, kristalline Hämoglobinderivate, die sich im Cytoskelett des Erythrozyten ablagern und die Flexibilität der Zelle herabsetzen und sogar eine Hämolyse herbeiführen können (Jarolim *et al.*, 1990). Der Erythrozyt kann diesen Prozessen nur begrenzt entgegenwirken, beispielsweise durch das Glutathion-Redoxsystem oder mit der Protein-L-Isoaspartat-O-Methyltransferase, die die Methylgruppe der freien α -Carboxygruppe eines abnormalen L-Isoaspartylrestes verestert. Nehmen die Oxidationsschäden an dem Hämoglobin, den Membranproteinen und -lipiden mit der Zeit zu, können die Zellen die Milz nicht mehr passieren und werden aus dem Kreislauf herausgefiltert und abgebaut. Die genauen Mechanismen des Erythrozytenalterns und des Abbaus alter Zellen in der Milz sind nicht bekannt (Review: Jollow und McMillan, 2001). Ähnliche Vorgänge wie die eben beschriebenen finden, obwohl noch nicht gut untersucht, auch während einer Infektion mit *P. falciparum* statt: Omodeo-Sale *et al.* (2003) fanden eine beschleunigte Alterung infizierter und nicht-infizierter Erythrozyten in *Plasmodium*-Kulturen. Glenister *et al.* (2002) haben eine messbare Abnahme der Deformabilität und eine Zunahme der Rigidität der Wirtszellmembran festgestellt. Sie führen diese mechanischen Veränderungen auf mehrere Faktoren zurück. Ein offensichtlicher Faktor ist die Präsenz des Parasiten, der in 48 Stunden in seiner Körpermasse 32fach zunimmt (Huber *et al.*, 2002) und den Raum für natürliche Deformationen der Erythrozyten, wie sie in engen Kapillaren an normalen Erythrozyten auftreten, begrenzt. Während einer Infektion induziert der Parasit, wie bereits erwähnt, oxidativen Stress in der Wirtszelle, der die Erythrozytenmembran schädigen kann (Griffiths *et al.*, 2001). Eda und Sherman (2002) konnten zeigen, dass der durch die Parasiten-Infektion induzierte oxidative Stress zu einer Verlagerung des Lipids Phosphatidylserin von der inneren Erythrocytenmembran auf ihre Aussenseite führt. Phosphatidylserin bindet CD36, das auf der Oberfläche von Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert wird. Möglicherweise ist Phosphatidylserin damit an dem Phänomen der Cytoadhärenz parasitierter Erythrozyten an Endothelzellen von Blutgefäßen beteiligt. Schliesslich wurde für eine Reihe von in das Wirtszellcytoplasma sezernierten

Parasitenproteinen gezeigt, dass sie mit hoher Affinität an das Cytoskelett der Wirtszelle binden. Zu ihnen gehören das bereits genannte KAHRP, aber auch Sbp1 (Tab. 1), das als integrales Membranprotein die Membran der MC's in das Cytoskelett des Erythrozyten zu verankern scheint (Blisnick *et al.*, 2000). Ferner binden das "Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen", RESA (Da Silva *et al.*, 1994), PfEmp3 (Waterkeyn *et al.*, 2000), PfEmp2 (Magowan *et al.*, 1995) und PfEmp1 an das Cytoskelett des Erythrozyten (Waller *et al.*, 1999; Oh *et al.* 2000; Waller *et al.*, 2002). Nicht nur durch die Präsenz des Parasiten, sondern auch durch die Einlagerung dieser Proteine wird das Cytoskelett in der Ausübung seiner Funktion beeinträchtigt, da seine Komponenten durch Bindung neuer Proteine störend quervernetzt werden (Chasis *et al.*, 1985). Glenister *et al.* (2002) konnten für KAHRP und PfEmp3 diesen Effekt direkt zeigen, indem sie die Rigidität von Erythrozyten, die mit den entsprechenden "Knockout"-Mutanten infiziert waren, maßen. Die Einlagerung von KAHRP und PfEmp3 scheint geordnet stattzufinden und ist im Elektronenmikroskop als elektronendichtes Aggregat (Knob), der sich unterhalb der Erythrozytenmembran hervorwölbt, sichtbar (Abb. 5).

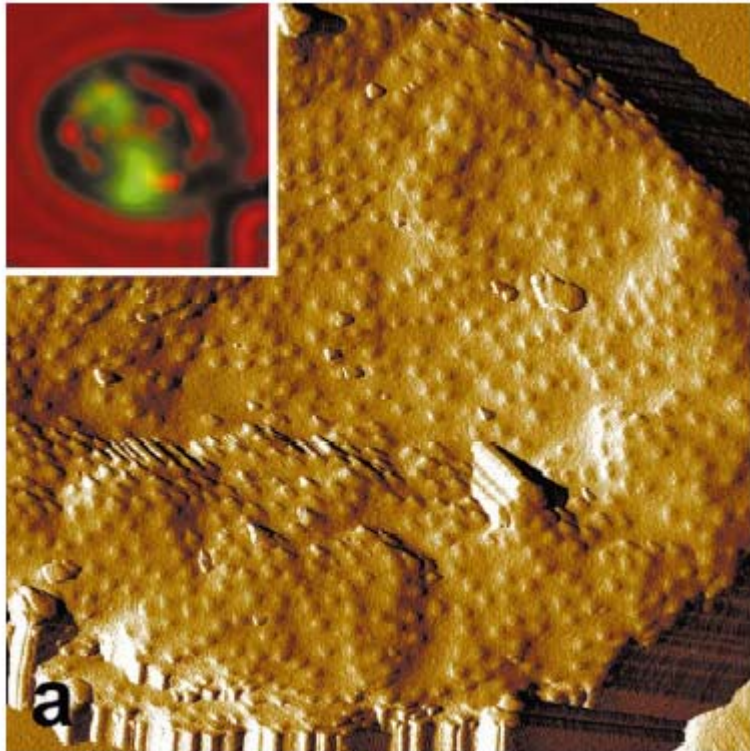
1.5.3 Knobs

Die Knobs stehen seit langem im Mittelpunkt der Malaria-Forschung, weil sie mit der schweren Pathologie einer *P. falciparum*-Infektion im Zusammenhang stehen (Reviews: Aikawa *et al.*, 1990; Oh *et al.*, 1997). In den letzten 6 Jahren sind mit Hilfe rekombinanter Techniken und der Möglichkeit, gezielte Gendelektionen in den Parasiten durchzuführen, eine Reihe neuer Erkenntnisse über die Wechselwirkungen von Parasitenproteinen mit dem Cytoskelett gewonnen worden. Für mit KAHRP-Knockout-Mutanten infizierte Zellen wurde gezeigt, dass in ihnen keine Knobs gebildet werden und dieses Protein damit ein essentieller Bestandteil der morphologisch sichtbaren Knob-Strukturen ist (Crabb *et al.*, 1997). KAHRP geht mit F-Aktin und Spektrin die Bildung eines Komplexes ein (Kilejian *et al.*, 1991), und Oh *et al.* (2000) zeigten, dass KAHRP sogar mit sich selbst assoziiert und spontan hochmolekulare Komplexe bildet, die morphologisch den Knobs sehr ähnlich sind. Darüber hinaus bindet KAHRP über elektrostatische Wechselwirkungen PfEmp1 (Waller *et al.*, 1999; Voigt *et al.*, 2000). Dieses Protein besitzt die Eigenschaft, an den Komplex Spektrin-Aktin-Protein 4.1, regelmäßige „Verbindungsknoten“ (Junctions) des Erythrocytencytoskeletts, zu binden (Oh *et al.*, 2000). Für PfEmp3 wurden solche Bindungsstudien noch nicht durchgeführt, es scheint aber mit den Knobs assoziiert zu sein (Pasloske *et al.*, 1993). KAHRP scheint damit die Funktion eines Proteinakkumulations-

keimes auszuüben, der sich durch Bindung an das Cytoskelett und durch Wechselwirkung mit sich selbst, mit PfEmp1 und vermutlich auch PfEmp3 schliesslich zu einem elektronendichten supramolekularen Multi-Proteinkomplex vergrössert und elektronen-mikroskopisch als Knob sichtbar wird (Abb. 5).

Abb. 5: Oberfläche des infizierten Erythrozyten

Die Abb. zeigt die Oberfläche eines Erythrozyten, der mit zwei Parasiten infiziert ist. Mit "Atomic Force"-Mikroskopie wurde das Oberflächenprofil der infizierten Zelle ermittelt. Die Knobs verleihen ihr ein rauhes Profil. Spätes Trophozoiten-Stadium (Nagao *et al.*, 2000)



Crabb *et al.* (1997) führten Experimente durch, in denen die Scherkräfte, die durch Blutdruck und Gefässdurchmesser *in vivo* auftreten, simuliert wurden. Die Autoren konnten zeigen, dass in Erythrozyten, die mit KAHRP-Knockout-Parasiten infiziert waren, die Fähigkeit zur Cytoadhärenz stark herabgesetzt war, Knobs also an der Cytoadhärenz beteiligt sind. Knob-positive infizierte Erythrozyten, deren Oberfläche mit Protease behandelt wird, verlieren ihre Zytoadhärenz (Waterkeyn *et al.*, 2000). Damit scheinen die Knobs nur indirekt an der Cytoadhärenz beteiligt zu sein; ihre cytoadhäsive Funktion liegt vermutlich in der Verankerung von Proteinen, die auf der extrazellulären Seite der Erythrozytenmembran exponiert sind und die Cytoadhärenz vermitteln. Bisher wurde nur PfEmp1, das nachfolgend detailliert behandelt wird, als solcher Vermittler gefunden. Inwieweit die abnehmende Flexibilität des infizierten Erythrozyten zur Sequestrierung in Kapillaren beiträgt, wurde bisher nicht untersucht. Die Parasiten in infizierten Erythrozyten sind aufgrund der beschriebenen Membranveränderungen der Wirtszelle durch Proteine und Oxidationsschäden für den Abbau in der Milz besonders sensitiv und entziehen sich diesem durch die Cytoadhärenz-bedingte Sequestrierung in den Kapillaren (s. oben). Die zusätzliche

Vernetzung des erythrozytären Cytoskeletts durch Parasitenproteine und der damit verbundenen Abnahme der Elastizität können, obwohl nicht bewiesen, für den Parasiten aber auch eine andere bzw. zusätzliche Funktion haben: Es ist denkbar, dass sie zwar die Flexibilität des Erythrozyten herabsetzen, gleichzeitig aber die Stabilität der Wirtszelle erhöhen und dem hochaktiven und dynamischen Parasiten (persönliche Mitteilung von Alan Hibbs) so den intraerythrozytären Aufenthalt bis zum Ende der Schizogonie gewährleisten (Glenister *et al.*, 2002).

1.6 *P. falciparum*-Erythrozyten-Membranprotein 1 (PfEmp1)

1.6.1 Entdeckung

Leech *et al.* (1984) identifizierten ein Parasitenprotein von ca. 300 kDa Molekulargewicht, welches oberflächeniodiniert und mit SDS solubilisiert werden konnte. Mit Triton X-100 war eine Solubilisierung nicht möglich, und das Protein fehlte oder hatte ein kleineres Molekulargewicht in knoblosen Linien. Oberflächenmarkierte Proteine von verschiedenen Linien zeigten unterschiedliche Molekulargewichte und liessen sich alle mit Protease-Behandlung von intakten infizierten Zellen spalten. Gemäß dieser Charakteristika hatte man offenbar ein neues Oberflächenantigen entdeckt.

1995 konnte erstmals gezeigt werden, dass das Oberflächenantigen, PfEmp1, zu einer polymorphen Gruppe von Proteinen gehört und von einer ganzen Gen-Familie kodiert wird (Su *et al.*, 1995; Baruch *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995). Sie umfasst mind. 50 Mitglieder, die in Grösse und Sequenz extrem divergieren (Taylor *et al.*, 2000). Alle Mitglieder besitzen ein Basisgerüst, bestehend aus einem 5' Exon (Exon I) variabler Länge, welches den größten Teil des Gens umfasst, einem ca. 1 kb grossen Intron und einem hoch-konservierten 3' Exon (Exon II). Das 5' Exon kodiert für die extrazelluläre Domäne und die hydrophobe Region des Proteins. Der allgemeinen Vorstellung entsprechend handelt es sich hierbei um die Transmembranhelix von PfEmp1 (Su *et al.*, 1995; Trelka *et al.*, 2000; Taraschi *et al.*, 2003; Kriek *et al.*, 2003). Der extrazelluläre Teil ist hoch variabel und setzt sich aus mehreren Blöcken zusammen, die von DBL- und CIDR-Domänen gebildet werden. Die DBL-Domänen zeigen Homologie zu den Duffy-Antigen bindenden Proteinen (Duffy Binding Like) aus *P. vivax* und *P. knowlesi*. Es handelt sich hierbei um Proteine, die an der Invasion beteiligt sind. Die CIDR-Domäne ist eine Cystein-reiche Region (Cystein rich Intermediate Domain Region). Bisher wurden sieben verschiedene DBL-Domänen und drei verschiedene CIDR-Domänen identifiziert (reviewed von Smith *et al.*, 2001). Jedes PfEmp1-Protein besitzt eine

konservierte Kopf-Struktur bestehend aus einer α -DBL-Domäne gefolgt von einer α -CIDR-Domäne. Alle weiteren DBL- und CIDR-Domänen sind bei den verschiedenen Mitgliedern der Proteinfamilie in unterschiedlicher Zahl und nicht vorhersagbarer Reihenfolge angegliedert. Das 3' Exon kodiert für den konservierten C-terminalen Teil des Proteins, der „acidic terminal sequence (ATS)“ oder VarC genannt wird und auf der cytosolischen Seite der Wirtszellmembran lokalisiert ist. Die ATS-Region interagiert mit KAHRP und Komponenten des Cytoskeletts (Waller *et al.*, 1999; Voigt *et al.*, 2000, Oh *et al.*, 2000). In Abb. 6 ist ein Mitglied der PfEmp1-Familie, A4-PfEmp1, schematisch dargestellt.

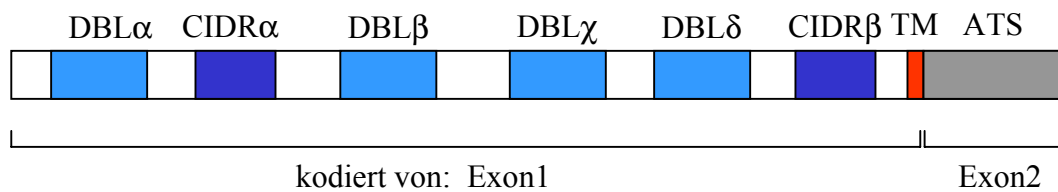


Abb. 6: Primärstruktur von A4-PfEmp1

Der von Exon1 kodierte Teil des Proteins ist extrazellulär und enthält semi-konservierte Domänen, die entweder Homologien zu den Duffy-antigenbindenden Proteinen (DBL) aufweisen oder cysteinreich sind (CIDR). Exon2 kodiert für die hydrophobe, putative Transmembranregion des Proteins (TM) und den konservierten, intrazellulären Teils des Proteins (ATS).

1.6.2 PfEmp1 vermittelt die Cytoadhärenz parasitierter Erythrozyten

In vielen Studien wurde gezeigt, dass PfEmp1 die Cytoadhärenz der parasitierten Wirtszelle an nicht-infizierte Erythrozyten („Rosetting“), an Endothelien der Mikrovaskulatur und an eine grosse Anzahl verschiedener Zelloberflächen-Rezeptoren vermittelt (Baruch *et al.*, 1995; Rowe *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998). Die verschiedenen DBL- und CIDR-Domänen zeigen dabei verschiedene Bindungseigenschaften: Für die CIDR α -Domäne wurde gezeigt, dass sie den endothelialen Oberflächenrezeptor CD36 bindet (Baruch *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1998). Die DBL χ - und DBL γ -Domänen binden an Chondroitinsulfat A (CSA), einen wichtigen endothelialen Rezeptor der Plazenta (Buffet *et al.*, 1999; Reeder *et al.*, 2000). Das „Rosetting“ scheint von der DBL α -Region vermittelt zu werden (Rowe *et al.*, 1997). Die Bindung verschiedener Rezeptoren an PfEmp1 verhält sich teilweise dichotom. PfEmp1-Moleküle, die ICAM-1 binden, binden auch an CD36 und umgekehrt. Allerdings binden sie nicht an CSA. Entsprechend können PfEmp1-Proteine, die an CSA binden, nicht mit CD36 oder ICAM-1 interagieren (Scherf *et al.*, 1998). Neben CSA können diese Spezies Hyaluronsäure und IgG binden (Beeson *et al.*, 2000; Flick *et al.*, 2001). Die molekulare Grundlage der dichotomen Bindung von PfEMP1 an CSA und CD36 wurde in einer Studie untersucht, in der die beteiligten Bindedomänen von PfEmp1 auf chinesischen

Hamstereierstockzellen (CHO) exprimiert und diese in Bindungsassays analysiert wurden. Dabei fanden die Autoren, dass die CIDR α -vermittelte CD36-Bindung die DBL γ -vermittelte CSA-Bindung ausschaltet. PfEmp1-Spezies, die CSA binden, besitzen CIDR-Domänen, die CD36 nicht binden können (Gamain *et al.*, 2002). Offenbar stehen einzelne Domänen des Proteins miteinander in Wechselwirkung, die der Proteinklasse nicht nur eine modulare, sondern auch eine tiefgreifende strukturelle Variabilität verleihen. In genetischen Experimenten wurde die Beteiligung von PfEmp1 an der Cytoadhärenz direkt untersucht. In Parasiten wurde das Gen für das Cytoskelett-assoziierte Protein PfEmp3 mittels episomalem Crossover trunkiert, und mit den Transfektanten Erythrozyten infiziert. Die Expression von PfEmp1 auf der Oberfläche der Wirtszellen war erheblich reduziert, wenn nicht ganz inhibiert, Knobs wurden aber weiterhin gebildet (Waterkeyn *et al.*, 2000). Solche infizierten Erythrozyten waren daraufhin vermindert zur Cytoadhärenz befähigt. Eine ähnliche Reduktion stellte sich in den bereits beschriebenen „knoblosen“ infizierten Erythrozyten ein, die aber, wenn auch beeinträchtigt, PfEmp1 auf ihre Oberfläche transportierten (Crabb *et al.*, 1997). Damit scheinen sowohl die Präsenz des Proteins auf der Oberfläche als auch seine Verankerung im Knob wichtige strukturelle Voraussetzungen für eine effiziente Cytoadhärenz zu sein (s. oben; Abb. 5).

1.6.3 Die Mechanismen der antigenen Variation von PfEmp1

Infizierte Erythrozyten mit gleichen Adhäsionseigenschaften lassen sich durch Bindungsassays, in denen sie an eine Klasse von Rezeptoren gebunden werden, aus heterogenen Kulturen anreichern (Scherf *et al.*, 1998; Buffet *et al.*, 1999). In jungen Ring-Stadien solcher Linien werden viele, wenn nicht alle var-Gene transkribiert, obwohl PfEmp1 noch nicht auf der Oberfläche des infizierten Erythrozyten erscheint (Scherf *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu wird in Trophozoiten-Stadien nur ein var-Gen transkribiert und exprimiert. Mit "Single cell"-RT-PCR-Experimente wurden diese Beobachtungen, die als allelische Exklusion bezeichnet werden, auch an einer einzelnen infizierten Zelle gemacht (Chen *et al.* 1998). Auf bestimmte Adhäsionseigenschaften selektierte Populationen von infizierten Erythrozyten exprimieren ein var-Gen nur für eine begrenzte Zeit. Ohne kontinuierliche Selektion verlieren die Kulturen allmählich ihre phänotypische Homogenität, d. h. sie exprimieren zunehmend PfEmp1-Spezies mit anderen Adhäsionseigenschaften. Es muss also ein An- und Ausschalten von var-Genen stattfinden, das mit ca. 2% per Generation gemessen wurde (Smith *et al.*, 1995; Rowe *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998).

Den der Selektion und Regulation der var-Genexpression zugrundeliegenden molekularen Mechanismen gilt ein hohes Interesse und die wichtigsten Beobachtungen diesbezüglich sind im folgenden aufgelistet. Rubio *et al.* (1996) und Hernandez-Rivas *et al.* (1997) fanden, dass viele var-Gene auf den transkriptionell inaktiven Chromosomenenden lokalisiert sind, nahe den Telomeren. Die Autoren vermuteten einen Zusammenhang zwischen der ungewöhnlichen Lokalisation der var-Gene und ihrer Diversität. Später stellte sich tatsächlich heraus, dass zwischen den var-Genen auf den Chromosomenenden ungewöhnlich viele Rekombinationsereignisse stattfinden (Taylor *et al.*, 2000). Freitas-Junior *et al.* (2000) konnten mit "Fluoreszenz in situ Hybridisierung" (FISH) zeigen, dass die Telomere der Chromosomen in einer Art Verpaarung aggregieren, was offensichtlich das strukturelle Korrelat zur erhöhten Rekombinationsrate ist. Die Regulation der Expression der var-Gene scheint auf der Transkriptionsebene stattzufinden, weil gemäß nukleären "Run-on"-Analysen nur eine var-mRNA-Spezies den Zellkern verläßt (Scherf *et al.*, 1998). Ferner konnte gezeigt werden, dass das konservierte Intron der var-Gene mit der 5' flankierenden Region in cis kooperiert und die Expression von Genen unabhängig von seiner Orientierung ausschalten kann (Deitsch *et al.*, 2001; Calderwood *et al.*, 2003). Auch der Chromatinkontext scheint bei der Inaktivierung von var-Genen eine Rolle zu spielen; Deitsch *et al.* (2001) konnten zeigen, dass die Vollendung der S-Phase, die bei höheren Eukaryoten für die Zusammensetzung inaktivierender Chromatinstrukturen erforderlich ist, eine wichtige Komponente bei der Regulation der var-Gene darstellt. Schließlich scheint die Beobachtung, dass nach der Selektion einer Parasitenlinie auf einen einheitlichen PfEmp1-Adhäsionstyp die Expression des entsprechenden var-Gens erst allmählich durch andere var-Gene ersetzt wird, darauf hinzudeuten, dass es eine Form der epigenetischen Kontrolle geben muß. Die differentielle Methylierung von aktiven und inaktiven var-Genen konnte aber ausgeschlossen werden (Deitsch *et al.*, 2001).

1.7 PfEmp1 – ein Impfstoffkandidat?

Mit 59 var Genen verwendet *P. falciparum* ca. 6% seiner nukleären DNA für die Bereitstellung eines grossen Repertoires von polymorphen PfEmp1-Antigenen (Hernandez-Rivas *et al.*, 1997). Neben den Rifins (Tab. 1), die in experimentellen Untersuchungen an der antigenen Variation von *P. falciparum* bisher nur wenig beachtet wurden, ist PfEmp1 das einzige bekannte und detailliert untersuchte variable Oberflächenantigen von infizierten Erythrozyten. Seit seiner Entdeckung 1995 wird mit grossem Aufwand versucht, konservierte

Bereiche des variablen extrazellulären Anteils des Proteins zu identifizieren, die sich als universelle Vaccinekandidaten für eine protektive Immunisierung eignen. Teilerfolge konnten erzielt werden. Wie oben beschrieben, haben bestimmte Domänen des Proteins spezifische Adhäsionseigenschaften und sind z. T. konserviert. Für die Bindung des Plazenta-Rezeptors Chondroitinsulfat A (CSA) konnte bisher nur eine bestimmte, konservierte DBL-Domäne gefunden werden (DBL γ). Die Adhäsion parasitierter Erythrozyten in der Plazenta (maternale Malaria) führt zu schwerwiegenden Komplikationen in der Schwangerschaft, die zu Frühgeburten oder Aborten führen können. Costa *et al.* (2003) haben Mäuse mit der rekombinanten Version der DBL γ -Domäne immunisiert und konnten Antikörper gewinnen, die die Adhäsion infizierter Erythrozyten an CSA unterbinden konnten. Als Impfstoff zum Schutz des Fetus gegen Malaria scheint dieser Ansatz aufgrund der hohen Bindungsspezifität von DBL γ vielversprechend zu sein. Im Gegensatz zur spezifischen CSA-Erkennung binden fast alle PfEmp1-Proteine mit der CIDR α -Domäne CD36. Die Immunisierung von Affen mit CIDR α führte zum vollständigen Schutz, allerdings nur gegen das Isolat, gegen das der rekombinante Impfstoff entwickelt wurde. Gegen heterologe Infektion konnte eine Immunisierung mit CIDR α nicht schützen (Baruch *et al.*, 2002). Aufgrund der hohen Rekombinationshäufigkeit zwischen var-Genen, die zu einer unüberschaubaren Anzahl verschiedener PfEmp1-Antigenen führt, der hoch polymorphen Struktur des extrazellulären Proteinteils und seiner variablen Adhäsionseigenschaften erscheint es insgesamt fragwürdig, ob die Anstrengungen, Peptide von PfEmp1 als Impfstoffe zu testen, gerechtfertigt sind.

1.8 Theoretische Überlegungen und die Ziele der Arbeit

PfEmp1 ist das am meisten untersuchte Protein von *P. falciparum* und im medizinischen Kontext das zur Zeit wichtigste. Allerdings wurden die meisten Daten über seine Rolle als Adhäsionsmolekül und Antigen erhoben; der Frage, wie PfEmp1 sezerniert wird und mit internen Strukturen assoziiert, wurde kaum nachgegangen.

Die Aminosäuresequenz des Proteins weist einige Besonderheiten auf, die aus zellbiologischer Sicht interessant erscheinen. Zunächst offenbart sie kein mit gängigen Algorithmen identifizierbares Signalpeptid, was eine Untersuchung des Sekretionsweges von PfEmp1 rechtfertigt. Morphologische Daten deuten darauf hin, dass die Sekretion von PfEmp1 mit BFA blockierbar ist (Wickham *et al.*, 2001). Biochemische Daten, die diese Beobachtung absichern, konnten bisher nicht erhoben werden. Ein Ziel der Arbeit ist es daher,

den Transport von PfEmp1 biochemisch zu untersuchen und eine mögliche Assoziation mit dem klassischen Sekretionsweg zu überprüfen.

Ungewöhnlich an der Sequenz von PfEmp1 sind auch die Proportionen der einzelnen Domänen. Der große extrazelluläre Anteil umfaßt je nach Typ bis zu 300 kDa des Proteins (Abb. 5), ca. 45 kDa stellt die cytoplasmatische Region. Zwischen beiden befindet sich eine kurze hydrophobe Region, die allgemein als Transmembranhelix angesehen wird. Viele Veröffentlichungen zeigen morphologische Daten, die eine Assoziation von PfEmp1 mit internen Membranstrukturen andeuten (Trelka *et al.*, 2000; Taraschi *et al.*, 2003; Kriek *et al.*, 2003). Sie alle unterstützen das allgemein akzeptierte Bild, dass PfEmp1 als Typ 1 Membranprotein synthetisiert wird und über Vesikeltransport, der die Fusion und das Abschnüren von Vesikeln an jeder internen Membran des infizierten Erythrozyten einschließt, zur Peripherie der Wirtszelle gelangt. Dort findet dann die letzte Fusion der Transportvesikel mit der Erythrozytenmembran statt, die PfEmp1 in die Erythrozytenmembran inseriert (Abb. 7). Dieses Modell wird gestützt von der Typ 1-Topologie des Proteins auf der Erythrozytenmembran, der hydrophoben Region in der Sequenz und der Identifizierung von COPII-homologen Proteinen (Abb. 4) im Wirtszellcytoplasma (Albano *et al.*, 1999; Adisa *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2001). Bis jetzt konnten jedoch keine biochemischen Daten gewonnen werden, die eine Assoziation von

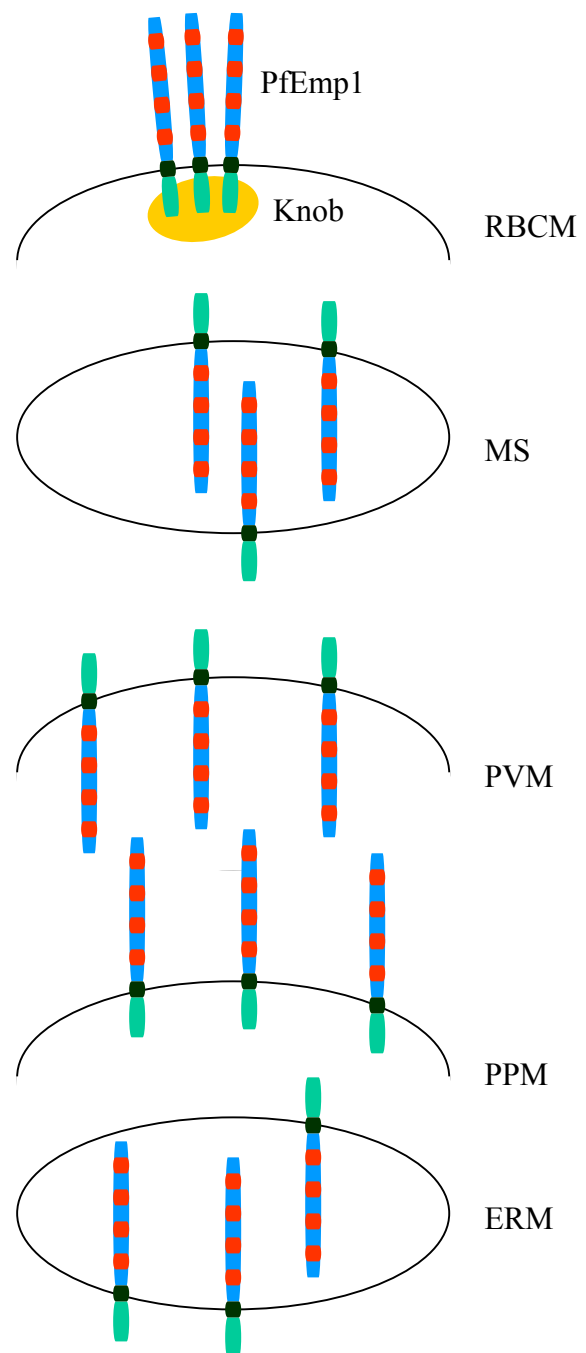


Abb. 7: Gängiges Modell über den Transport von PfEmp1

PfEmp1 wird als Typ I-Membranprotein an der ER-Membran (ERM) synthetisiert und über die Parasitenplasmamembran (PPM), die parasitophore Vakuolenmembran (PVM), und die Maurer'schen Spalten (MS) in die Erythrozytenmembran (RBCM) transportiert. Dort wird PfEmp1 über den C-Terminus (grün) in die Knob-Strukturen (gelb) eingelagert. Der N-Terminus (blau-rot) des Proteins lokalisiert auf der extrazellulären Seite der Wirtszellmembran

PfEmp1 mit Transportvesikeln bestätigen. Die Fusion von Vesikeln mit der Erythrozytenmembran konnte bis jetzt ebenfalls nicht gezeigt werden.

Eine Reihe von Überlegungen macht es unwahrscheinlich, dass die hydrophobe Domäne von PfEmp1 das Protein als Transmembranhelix im Lipid-Bilayer verankert. Es ist denkbar, dass das hydrophobe Segment von PfEmp1 sowohl als Transmembrandomäne als auch als ER-Signalpeptid fungiert (Nacer *et al.*, 2001). In diesem Fall wäre eine Typ I-Topologie jedoch unwahrscheinlich, weil der N-terminale Anteil des Moleküls auf der zytoplasmatischen Seite der ER-Membran zu groß wäre, um über die ER-Membran in das Lumen des ER transloziert zu werden. Ein weiteres Problem bei dem bestehenden Modell liegt in der Größe der identifizierten vesikulären Strukturen mit einem Durchmesser von mind. 100 nm: Das erythrozytäre Zytoskelett ist ein hoch-spezialisiertes und dichtes Maschenwerk (s. oben), dessen Strukturelemente aus 3-6 filamentösen Spektrin-Tetrameren, die an ihren Enden mit Aktin-Bande 4.1-Komplexen in Verbindung treten, bestehen. Die Filamente sind ca. 50 nm lang und schließen sich zu unregelmäßigen oligogonalen Gittern (maximal hexagonal) zusammen, so dass sich für jede Masche eine durchschnittliche Fläche von 3000 – 4800 nm² ergibt (Takeuchi *et al.*, 1998; Swihart *et al.*, 2001). Diese Maschen sind zu klein, um Vesikel mit der beobachteten Mindestfläche von 7800 nm² durchzulassen. Es erscheint daher eher unwahrscheinlich, dass die Vesikel das Cytoskelett als Barriere überwinden können. In Rahmen dieser Arbeit soll neben Untersuchungen an der Sekretion von PfEmp1 auch die Membran-Assoziation von PfEmp1 in drei unterschiedlichen Lokalisationen des infizierten Erythrozyten analysiert werden: Im Parasiten, in der Wirtszelle und in der Wirtszellmembran. Mit Hinblick auf das allgemeingültige Modell soll geklärt werden, ob PfEmp1 tatsächlich als integrales Membranprotein sezerniert wird und mit Transportvesikeln assoziiert.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien

<i>Reagenz</i>	<i>Firma</i>
Agarose	Roth
Ammoniak-Lösung	Fluka
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Bradford-Ragenz	BIO-RAD
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)	Biomol
Bromphenolblau	Merck
Chlormethan	Fluka
Coomassie Brilliant Blue R 250	Fluka
Diethylpyrokarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylformamid	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	Fluka
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Formaldehyd	Roth
Formamid	Fluka
Gelafundin	B. Braun Melsungen AG
Gentamycin	Gibco
Giemsa	Merck
Immobilisierte pH-Gradienten (IPG), pH 3-10, 13 cm	Amersham Pharmacia Biotech
Iodixanol	Progen Biotechnik GmbH
IPG-Puffer pH 3-10	Amersham Pharmacia Biotech
Kupfer(II)-sulfat-pentahydrat	Fluka
Luminol	Fluka
L-[³⁵ S]-Methionin	ICN
Magermilchpulver	Fluka
Methanol	Roth

N, N-Dimethylformamid	Fluka
Natriumazid	Merck
Natriumsulfit	Roth
Nitrotetrazoliumblausäure (NBT)	Biomol
p-Coumarsiure	Sigma
Phenol	Roth
Phosphorsäure	Roth
Ponceau S	Serva
Protogel (30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid)	National Diagnostics
Silbernitrat	Fluka
Saccharose	Roth
Saponin	Roth
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Roth
Streptolysin O (SLO), modifiziert	Prof. Succharit Bhakdi, Mainz
SLO	Sigma
N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Roth
Trichloressigsäure (TCA)	Roth
Triton X-100	Sigma
Triton X-114	Fluka
Trypsin	Sigma
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	Sigma
Uranylacetat	Sigma

2.2 Antikörper

<i>Antikörper / Antiserum</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Verdünnung</i>
Kaninchen- α -SERP	Eigene Arbeitsgruppe	1 : 800
Kaninchen- α -GBP	Eigene Arbeitsgruppe	1 : 500
mAbBC6 (Maus- α -PfEmp1)	Chris Newbold, Oxford	1 : 500
Kaninchen- α - $\delta\epsilon$ (PfEmp1)	Chris Newbold, Oxford	1 : 500
Kaninchen- α -ATS (PfEmp1)	Chris Newbold, Oxford	1 : 1000

Kaninchen- α -Exp1C	Eigene Arbeitsgruppe	1 : 200
Kaninchen- α -Exp1N	Eigene Arbeitsgruppe	1 : 50
Kaninchen- α -Exp2	Eigene Arbeitsgruppe	1 : 100
Kaninchen- α -Bip	Eigene Arbeitsgruppe	1 : 500
Kaninchen- α -Spektrin	Sigma	1 : 500
Maus- α -Sbp1	Catherine Braun-Breton, Paris	1 : 1000
Maus- α -CG2	Tom Wellems, NIH	1 : 1000
Maus- α -Bande3	Sigma	1 : 2000
Maus- α -Glykophorin-A(B)	Sigma	1 : 500
Kaninchen- α -Maus-Ig	DAKO	1 : 1000
Fluorescein-Isothiocyant- (FITC)-Schwein- α -Kaninchen- Ig	DAKO	1 : 1000
Kaninchen- α -Maus (AP)	DAKO	1 : 5000
Ziege- α -Maus (Cy3)	Jackson Immuno Research	1 : 100
Kaninchen- α -Maus (POD)	DAKO	1 : 5000
Ziege- α -Kaninchen (AP)	DAKO	1 : 5000
Ziege- α -Kaninchen (Cy5)	Jackson Immuno Research	1 : 100
Ziege- α -Kaninchen (POD)	DAKO	1 : 5000

2. 3 Sonstiges

<i>Material</i>	<i>Bezogen von</i>
Humanplasma (Blutgruppe A / Rh ⁺)	Uni-Klinikum Marburg
Humane Erythrozyten (Blutgruppe A / Rh ⁺)	Uni-Klinikum Marburg
RPMI 1640	Gibco
Methionin-freies RPMI 1640	Gibco
Polyallomer-Röhrchen; 5, 40 ml	Konrad Beranek, Weilheim
Polycarbonat-Röhrchen; 10, 25 ml	Konrad Beranek, Weilheim
var-Primer 1	Chris Newbold, Oxford
var-Primer 2	Chris Newbold, Oxford
Megaprime DNA-Markierungskit	Amersham
Platinum-Taq-Polymerase-Kit	Invitrogen

PCR-Aufreinigungskit	Qiagen
Whatman-Filterpapier	MAGV
Röntgenfilme, X-Ray	Kodak
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell
Nickel-Netzchen, Formvar/Kohle	PLANO GmbH

2. 4 Lösungen, Puffer und Medien

Agarose-Lösung

Enthält 0,5 % Agarose in SDS-Elektrophoresepuffer (s. unten).

Alkalische Phosphatase-Puffer (AP-Puffer)

100 mM Tris, 100 mM NaCl und 5 mM $MgCl_2 \times 6 H_2O$ werden mit HCl auf pH 9,5 eingestellt.

Ammoniumpersulfat

10 % APS-Lösung.

Blockmilch

5 % Milchpulver und 0,02 % Natriumazid werden in Wasser gelöst und bei 4°C gelagert.

Coomassie-Färbelösung

Enthält 40 % Methanol, 10 % Essigsäure und 0,04 % Brilliant Blue R 250 (Coomassie).

Coomassie-Entfärber

40 % Methanol

DEPC-Wasser

1 % DEPC in Wasser; ÜN bei 37° C inkubieren und autoklavieren.

ECL-Reagenz

Stocklösungen: 250 mM Luminol in DMSO; 90 mM p-Coumarsäure in DMSO; 1M Tris-HCl pH 8,5. Für die Gebrauchslösungen werden davon 400 µl Luminollösung, 178 µl

Coumarsiurelösung und 4 ml Tris-Puffer mit Wasser auf 40 ml aufgefüllt und kurz vor Gebrauch mit 30 % H₂O₂ (1 : 2000) aktiviert.

Elektrophorese-Puffer

Enthält 0,124 M Tris, 0,96 M Glycin und 0,05 % SDS in entsalztem Wasser.

Entwickler (Silberfärbung)

Enthält 3 % Natriumkarbonat und 0,5 % Formaldehyd

Fixierer (Silberfärbung)

Enthält 40 % Ethanol, 10 % Essigsäure

5x Formaldehyd-Stocklösung

11 M Formaldehyd in DEPC-Wasser.

Gelafundin-Lösung

RPMI wird mit Gelafundin im Verhältnis 1,4 : 2,4 gemischt und bei 4° C für 1 Woche gelagert.

Gentamycin

In der Konzentration 50 mg/ml kommerziell bezogen. Im Gebrauch beträgt die Endkonzentration 50 µg/ml.

Gepuffertes RPMI-Medium

960 ml RPMI-Medium werden 36 ml autoklavierte NaHCO₃-Lösung und 1 ml Gentamycin-Lösung hinzugefügt. Es stellt sich ein pH-Wert von ca. 7,2 ein.

Giemsa-Färbelösung

0,125 M Na₂HPO₄- und 0,1 M KH₂PO₄-Lösung werden bis zu einem pH von 6,8 gemischt. Dieser Puffer wird vor Gebrauch 1 : 10 verdünnt. Die Giemsa-Lösung (Merck) wird vor der Färbung im Verhältnis 1 : 10 mit dem verdünnten Puffer gemischt.

HEPES-KOH, Stammlösung

100 mM Hepes werden mit 1 M KOH auf pH 7,5 eingestellt.

Hybridisierungspuffer

0,5 M NaP_i auf pH 7.2 eingestellt; zugegeben werden SDS zu 7 % Endkonzentration, Dextransulfat zu 2 % Endkonzentration und EDTA zu 1 mM Endkonzentration.

Karbonatpuffer

Enthält 0,1 M NaHCO₃/Na₂CO₃, pH 11, und 1 mM EDTA.

L-Alaninlösung

10 mM Hepes werden mit konz. KOH auf pH 7,4 eingestellt. L-Alanin wird in der Endkonzentration von 0,3 M zugegeben.

Lysis-Puffer

Enthält 50 mM Tris-HCl, pH 9, 200 mM NaCl, 0,1 M EDTA, 1 % SDS, 1 mg/ml Proteinase K.

NBT- / BCIP-Reagenz

Zunächst getrennte Herstellung: 0,5 g NBT werden in 10 ml 70 % Dimethylformamid und 0,5 g BCIP in 100 % Dimethylformamid gelöst. Die Ausgangslösungen werden bei 4°C aufbewahrt. Kurz vor der Anwendung werden die NBT- und BCIP-Lösung im Verhältnis 2 : 1 gemischt.

PBS

Enthält 10 mM KH₂PO₄, 10 mM K₂HPO₄ und 140 mM NaCl.

Ponceau S-Färbelösung

0,2 % Ponceau S werden in 3 % Trichloressigsäure gelöst.

Probenpuffer

Die Stammlösung enthält 63 mM Tris, 0,5 M Saccharose und 5 mM EDTA. Mit HCL wird der pH auf 6,8 eingestellt und eine geringe Menge Bromphenolblau zugegeben. Diese Probenpuffer-Stammlösung wird bei 4°C gelagert. In Aliquots à 200 µl wird DTT in der Konzentration 0,5 M vorgelegt und bei -20° C gelagert. SDS wird als 20 %ige Stammlösung angesetzt und bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Der fertige Probenpuffer setzt sich aus 200 µl 0,5 M DTT, 200 µl 20 % SDS und 600 µl der Probenpuffer-Stammlösung zusammen.

Protease Inhibitor Cocktail (PIC)

Der Cocktail enthält 50 µl Antipain (2 mg/ml), 20 µl Chymostatin (5 mg/ml), 50 µl Aprotinin (2 mg/ml), 20 µl Trypsin-Inhibitor (5 mg/ml), 50 µl Na-EDTA (2 mg/ml), 50 µl Pepstatin (2 mg/ml), 20 µl Leupeptin (5 mg/ml) und 100 µl Elastatinal (1 mg/ml). Diese Inhibitor-Mischung wird mit 140 µl Hepes-KOH auf 500 µl aufgefüllt, so dass jeder Inhibitor in der Konzentration 200 µg/ml vorliegt. Der Cocktail wird 1 : 200 verdünnt.

RNA-Gelladepuffer

50 % Glycerin in DEPC-Wasser, enthält 1 mM EDTA und 0,25 % Bromphenolblau.

5x RNA-Gellaufpuffer

0,1 M MOPS werden mit NaOH auf pH 7, enthält 40 mM Natriumacetat und 5 mM EDTA. Alle Chemikalien werden in DEPC-Wasser angesetzt.

Reduktionslösung (Silberfärbung)

0,02 % Natriumsulfit

RPMI-Medium

79,46 g RPMI-Medium 1640 / 25 mM Hepes werden in 5000 ml bidestilliertem Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

RPS

Gepuffertes RPMI-Medium, das 10 % hitzeinaktiviertes Humanplasma (30 min bei 56° C) enthält.

Salzpuffer

Enthält 10 mM HEPES, pH 7,5, 0,6 M KCl, 3 mM MgCl₂ und 5 mM DTT.

Sammelgel-Puffer

0,5 M Tris werden mit HCl auf pH 6,8 eingestellt und filtriert. Lagerung bei 4°C.

SDS-Elektrophoresepuffer

Enthält 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin und 0,1 % SDS.

SDS-Equilibrierungspuffer (mit DTT oder Iodoacetamid)

Enthält 50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % Glycerin, 4 % SDS und Spuren von Bromphenolblau. Für die erste Equilibrierung werden 100 mg DTT in 10 ml Equilibrierungspuffer, für die zweite 250 mg Iodoacetamid in 10 ml Equilibrierungspuffer gelöst.

Silber-Färbelösung

Enthält 0,1 % Silbernitrat

SLO (modifiziert, Arbeitskreis Prof. Succharit Bhakdi)

100 µg SLO-Lyophilisat werden in 1,12 ml PBS 2 bei 4°C gelöst und aliquotiert. Lagerung bei -70° C.

SLO (Sigma)

Aktivierung von SLO: 25'000 U SLO wurden in 750 µl PBS gelöst, aliquotiert und bei -70° C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurden davon 90 µl mit DTT in der Endkonzentration von 20 mM für 15 min bei 37° C inkubiert.

2D-Solubilisierungspuffer

Enthält 8 M Harnstoff, 4 % Chaps,

20x SSC-Puffer

3 M NaCl und 300 mM Na-Citrat, stellt sich auf pH 7 ein.

10x TBE-Puffer

890 mM Tris-HCl, 890 mM Borsäure und 20 mM EDTA.

TBS

10 mM Tris-HCl, pH 7,4 und 140 mM NaCl.

TBS-saturiertes Triton X-114

1,5 g Triton X-114 werden in 50 ml eiskaltem TBS gelöst. Danach wird die Lösung auf 37° C erwärmt und die Detergensphase (ca. 12 % Triton X-114) bei 5000 g sedimentiert. Diese wird dreimal auf diese Art behandelt und schließlich aliquotiert und bei -20° C gelagert.

Transfer-Puffer

Enthält 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % SDS und 20 % Methanol.

Trenngel-Puffer

1,49 M Tris werden mit HCl auf pH 8,8 eingestellt und filtriert, Lagerung bei 4°C.

Waschpuffer mit und ohne Detergenz

Enthält 100 mM Tris und 1,5 M NaCl. Als Detergens wird 0,05 % Triton[®] X-100 hinzugefügt. Vor dem Waschen wird die Stocklösung 1 : 10 mit entsalztem Wasser verdünnt.

2.5 Zellkultur

2.5.1 Parasiten

Die *Plasmodium falciparum*-Linien A4 und FCBR wurden in dieser Arbeit verwendet. Die A4-Laborlinie wurde durch Mikromanipulation der ITO4-Linie, die von einem Parasitenisolat aus Ituxi in Brasilien stammt, hergestellt (Roberts *et al.*, 1992). Die FCBR-Linie stammt ursprünglich aus Kolumbien (Raether *et al.*, 1989). Infizierte Erythrozyten der Blutgruppe A⁺ wurden in RPMI 1640-Medium, welches mit Humanserum der gleichen Blutgruppe zu einer Endkonzentration von 10 % versetzt wurde (Trager und Jensen, 1976) kultiviert. Erythrozyten, die bei einer Parasitämie von 10 % mit Ring-Stadien infiziert waren, wurden in regelmäßigen Abständen mit L-Alaninlösung behandelt. Dabei wurden sie sedimentiert, mit 5 Vol L-Alaninlösung für 5 min bei 37° C inkubiert und dreimal mit RPMI gewaschen (Braun-Breton *et al.*, 1988). Zur Überprüfung der Parasitämie wurde ein mit Giemsa gefärbter Blutaussstrich angefertigt. Dazu wurden Kultur-Ausstriche 20 sec in Methanol fixiert und für weitere 10 min mit Giemsa-Färbelösung inkubiert. Die Färbelösung wurde danach von den Objektträgern mit Wasser abgewaschen.

2.5.2 Isolation von Trophozoiten-infizierten Erythrozyten (Pasvol et al., 1978)

Vor der Ernte wurde zunächst überschüssiges RPS aus der Kulturflasche abgesaugt, die Zellen in einem Rest von RPS resuspendiert und in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Sedimentation mittels Zentrifugation für 5 min bei 800 g. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml Gelafundin-Lösung resuspendiert und das Falcon-Röhrchen für 10 min in einem 37° C-Wasserbad senkrecht arretiert. Der aus angereicherten infizierten Erythrozyten bestehende Überstand wurde in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und bei 800 g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen

und das Zellsediment in RPMI-Medium aufgenommen. Die Parasitämie wurde erneut mittels Giemsa-gefärbtem Blutausschlag ermittelt und lag in der Regel bei 70-90 %. Die Anzahl der Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.5.3 Selektion der A4-Laborlinie auf die Expression von A4-PfEmp1

Nur infizierte Erythrozyten, die A4-PfEmp1 auf ihrer Oberfläche exponieren, können den monoklonalen BC6-Antikörper (Kriek *et al.*, 2003) binden. Für die kontinuierliche Kultivierung dieser Zellen wurden Trophozoiten-infizierte Erythrozyten in regelmäßigen Abständen von 4-8 Wochen an immobilisierten monoklonalen BC6-Antikörper gebunden. Dazu wurde der Antikörper 1 : 1000 in sterilem PBS verdünnt und in Zellkulturflächen für nicht adhärenz-fähige Zellen UN bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der PBS-Puffer aus der Flasche entfernt und diese mit in RPMI resuspendierten angereicherten Trophozoiten-infizierten Erythrozyten beladen. Die Zellen wurden für 1 h bei 37° C in der Flasche inkubiert, sanft aufgeschüttelt und wieder entfernt. Es folgten drei sanfte Waschrunde mit RPMI, bevor die gebundenen infizierten Zellen mit Medium und Erythrozyten supplementiert und weiter kultiviert wurden.

2.5.4 Radioaktive Markierung von infizierten Erythrozyten (Benting *et al.*, 1994)

Angereicherte Trophozoiten-infizierte Erythrozyten wurden in 50 Vol. Methionin-freiem RPMI, dem L-[³⁵S]-Methionin mit einer Endaktivität von 50 µCi/ml beigegeben worden war, resuspendiert und für 2 h bei 37° C inkubiert. Die metabolisch markierten Zellen wurden danach zweimal mit RPMI gewaschen.

2.6 SDS-PAGE und Western Blot-Analyse von Proteinfractionen

2.6.1 Proteinbestimmung (Bradford, 1976)

Das Bradford-Reagenz wurde 1:5 mit PBS verdünnt und gründlich geschüttelt. Die Proteinproben wurden in PBS aufgenommen und, um Extinktionswerte zwischen 0,1 und 1 zu erreichen, entsprechend verdünnt. Davon wurden 1 – 5 µl mit 500 µl der verdünnten Bradford-Lösung für 10 min bei RT inkubiert. Für den Leerwert wurde die gleiche Menge PBS eingesetzt. Die Ansätze wurden dann bei 595 nm in einem Standard-Photometer gemessen. Da in dieser Arbeit absolute Mengenangaben nicht notwendig waren, wurden keine Eichgeraden erstellt.

2.6.2 Fällung von Proteinen

Proteinfraktionen wurden je nach Anwendung mit TCA, Aceton oder einer Kombination beider gefällt. Die eingesetzte Konzentration von TCA betrug immer 10 %, die eingesetzte Menge von Aceton 3-5 Vol der Proteinfraktion. Gefällt wurde mit TCA bei 4° C für 30 min, mit Aceton bei -20° C ÜN. In der kombinierten Fällung wurde Aceton mit 10 % TCA bei Bedingungen wie für die Actetonfällung verwendet. Das Proteinpräzipitat wurde einmal mit Aceton gewaschen, um restliches TCA zu entfernen.

2.6.3 Analyse von Protein-Fractionen mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

In den Experimenten wurden die Proben in der Regel 2 : 1 mit Probenpuffer versetzt. Vor dem Auftrag der zu analysierenden Proben mußten sie für 5 min bei 100°C erhitzt werden, um die Proteine zu denaturieren und eine Beladung mit SDS-Molekülen zu ermöglichen. Tabelle 2 veranschaulicht die Zusammensetzung der verwendeten Gele.

Tab. 2: Pipettierschema für SDS-Gele

Art des Gels	4 %	5 %	7,5 %	10 %	12 %	15 %
Acrylamid	1,9 ml	2,5 ml	3,75 ml	5 ml	6 ml	7,5 ml
Trenngel-Puffer		3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
Sammelgel-Puffer	3,75 ml					
H ₂ O-Bidest.	9,3 ml	8,75 ml	7,5 ml	6,25 ml	5,25 ml	3,75 ml
APS	75 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	25 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Für die Analyse von PfEmp1 wurden in der Regel 5-7,5 %ige Gradientengele gegossen. Für die zweidimensionale Auftrennung von Membranproteinen wurden Gradientengele von 7,5-15 % gegossen (s. unten). Die Auftrennung erfolgte nach Standardbedingungen.

Für die Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurden die Gele entweder mit Coomassie Brilliant Blue R 250 oder Silber gefärbt. Bei der Coomassie-Färbung wurden die Gele 1 h bei RT mit Coomassie-Färbelösung gefärbt und dann ÜN bei 4° C mit Coomassie-Entfärbter entfärbt (Sambrook *et al.*, 1989). Auf die Entfärbung folgten mehrere Waschriffe mit Wasser. Die Gele wurden bei 4° C in Wasser gelagert. Für die Silberfärbung wurde ein Protokoll verwendet, das mit der MALDI-MS-Analyse kompatibel ist und von der Silberfärbung nach Blum abgeleitet ist (Larsson *et al.*, 1997). Zunächst wurden die Gele für 1 h bei RT in Fixierer-Lösung fixiert. Danach wurden die Gele zweimal für 20 min in 30 %

Ethanol und nochmal in Wasser gewaschen. Die Reduktion der Proteine wurde für 1 min durchgeführt; die Gele wurden dann dreimal für 20 Sek in Wasser gewaschen und für 20 min mit Silber-Färbelösung inkubiert. Es folgten wieder drei kurze Waschschrte mit Wasser (je 20 Sek) und schließlich die Entwicklung der Gele in Entwicklerlösung. Die Silberfärbung der Proteinbanden wurde in 5 %iger Essigsäure gestoppt und die Gele gründlich mit Wasser gewaschen. Sie wurden bei 4° C in 1 %iger Essigsäure gelagert.

2.6.4 Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteine wurden in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (s. o.). Danach wurden die Acrylamid-Gele auf angefeuchtete Whatman-Filterpapiere gelegt, mit Küchenfolie bedeckt und in einer Standard-Geltrocknungsapparatur für ca. 2 Stunden getrocknet. Unter Rotlicht in einer Dunkelkammer wurden die getrockneten Gele dann in eine Filmkassette gelegt und mit einem Röntgenfilm bedeckt. Die Expositionsdauer betrug abhängig von der Menge der radioaktiven Proteine 1-3 Tage.

2.6.5 Immunoblotting (Towbin *et al.*, 1979)

In dieser Arbeit wurde das Semi-Dry-Verfahren angewendet. Als Strombrücke dienten in Transferpuffer eingelegte Filterpapiere. Die Stromstärke und Transferdauer richteten sich nach den zu detektierenden Proteinen, wobei für die in den Experimenten relevanten Proteine eine Stromstärke von 1 mA / cm² bei einer Transferdauer von 60 min bis 120 min (PfEmp1) gewählt wurde. Nach Ende des Transfers wurde die Nitrocellulose-Membran für wenige Minuten in Ponceau-Färbelösung inkubiert, um die Proteine der Größenstandards und die einzelnen Spuren färben und markieren zu können. Die Farbe wurde anschließend mit Wasser wieder entfernt. Mit 5 %iger Blockmilch wurden restliche Proteinbindungsstellen auf der Membran für 60 min bei RT abgesättigt. Danach konnte die Inkubation ÜN bei 4° C mit dem ersten, gegen das gesuchte Protein gerichteten Antikörper erfolgen. Folgend wurde die Membran jeweils 5 min einmal mit Waschpuffer + Triton X-100 und zweimal mit Waschpuffer ohne Triton X-100 inkubiert, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, der den jeweiligen ersten Antikörper bindet, erfolgte für 1 h bei RT. Die nicht gebundenen Antikörper wurden wie beschrieben von der Membran gewaschen. Die Art der folgenden Immunfärbung wurde nach dem Konjugat des zweiten Antikörpers gewählt. Bei dem Konjugat Alkalische Phosphatase (AP) wurde der Antikörper mit dem NBT / BCIP-Reagenz (Blake *et al.*, 1984) detektiert (66 µl NBT + 33 µl BCIP in 10

ml AP-Puffer). Dazu wurde die Membran mit diesem Gemisch benetzt und die Reaktion nach ausreichender Färbung mit Leitungswasser gestoppt. Antikörper, die mit einer Meerrettich-Peroxidase (POD) konjugiert waren, wurden durch Chemilumineszenz nachgewiesen (Ogata *et al.*, 1983). Dabei wurde die Membran vor Auflegen eines Films für 60 mit ECL-Reagenz benetzt.

2.7 Trypsin-Behandlung und Fraktionierung von infizierten Erythrozyten

2.7.1 Generelles Trypsinierungsschema für diese Arbeit als Orientierungshilfe

Im Verlaufe dieser Arbeit wird die Trypsinbehandlung von zellulären Fraktionen und Zellysaten auf unterschiedliche Arten und mit unterschiedlichen Zielsetzungen eingesetzt. Sie gilt vor allem der Entfernung der Proteine auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten, um anhand des tryptischen Fragmentes von PfEmp1 die intrazelluläre Population dieses Proteins spezifisch analysieren zu können. In anderen Fällen findet sie an permeabilisierten Zellen oder an ganzen Zellysaten statt, um intrazelluläres PfEmp1 oder andere Proteine zu entfernen. Für eine bessere Übersicht wird an dieser Stelle ein Schema gezeigt, welches die verschiedenen Trypsinierungsschritte und ihre Funktionen darstellt (Abb. 8). Grundsätzlich wurde die Trypsinierung entweder bei 37° C oder bei 25° C für 15 min durchgeführt. Die Trypsinkonzentration betrug je nach Anwendung 1 mg/ml, 100 µg/ml oder 10 µg/ml (PBS oder TBS). Gestoppt wurde die Proteasereaktion mit Trypsin-Inhibitor, dessen Konzentration des vom Hersteller angegebenen Wertes betrug, für 5 min bei 4° C.

2.7.2 Fraktionierung und Lyse von infizierten Erythrozyten

Die Zellen wurden mit Saponin oder Streptolysin O (SLO) permeabilisiert. Alle nachfolgenden Schritte fanden bei 4° C statt. Infizierte und permeabilisierte Erythrozyten wurden für die Gewinnung von Membranfraktionen entweder in hypotoner Lösung osmotisch oder durch Einfrieren und Auftauen mechanisch lysiert. Die Membranen wurden wie angegeben entweder bei 10'000 in einer Standard-Laborzentrifuge (Typ Heraeus Biofuge) oder 100'000 g in einer Ultrazentrifuge (Typ Centrikon T-2060) sedimentiert.

i Osmotische bzw. mechanische Lyse (Ramwani und Mishra, 1986)

Infizierte Erythrozyten wurden in 20 Vol eiskaltem 10 mM HEPES pH 7,5 mit Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Membranen wie angegeben sedimentiert. Für die Dichtegradientenzentrifugation (s.

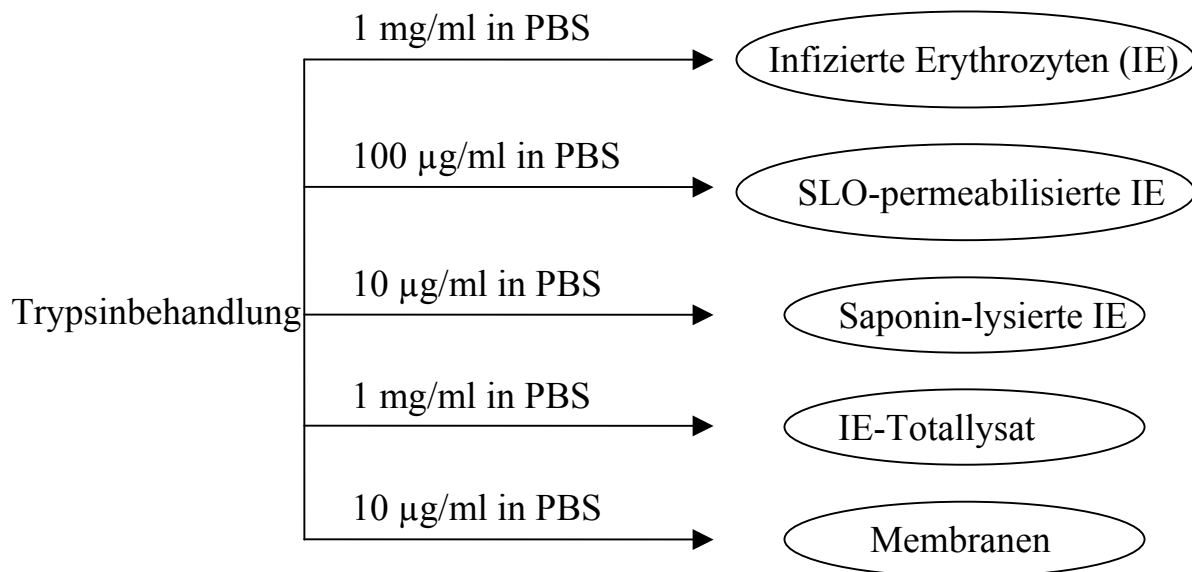


Abb. 8: Generelles Trypsinierungsschema

In dieser Arbeit wurde die Trypsinierung von Proteinen an unterschiedlichen Präparaten durchgeführt. Details siehe Text.

unten) wurden infizierte Erythrozyten zunächst osmotisch in 50 Vol 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, oder 10 mM HEPES, pH 7,5, lysiert, dann auf 250 mM Saccharose eingestellt und unter Verwendung eines hand-getriebenen Homogenisators homogenisiert. Für die mechanische Lyse wurden die Zellen in TBS, PBS oder hypotonem Tris-Puffer (s. oben) resuspendiert und dann mehrmals in flüssigen Stickstoff getaucht und in einem Wasserbad bei RT aufgetaut.

ii Saponin-Lyse (Kreier, 1977)

Infizierte Erythrozyten wurden in RPS resuspendiert und mit Saponin bei einer Endkonzentration von 0,1 % lysiert. Die Saponinlyse beschädigt unter diesen Bedingungen nicht die Parasiten, die PVM und die Erythrozytenmembran werden aber zerstört. Die Parasiten wurden dann bei 2000 g sedimentiert und dreimal mit PBS gewaschen, um Reste von Hämoglobin und Wirtszellzytoplasma zu entfernen.

iii SLO-Permeabilisierung (Ansorge et al., 1996)

Die Permeabilisierung wurde mit modifizierten SLO (Bhakdi et al., 1984, 1993) oder mit SLO, das von Sigma erworben und kurz vor Gebrauch aktiviert wurde (s. o.), an isolierten Trophozoiten-infizierten Erythrozyten durchgeführt. Für eine höhere Aktivität wurden bei dem modifizierten SLO mit rekombinanten Techniken die Cytein-Reste durch Alanin-Reste ausgetauscht; damit ist das Protein unempfindlich gegenüber Oxidationsprozessen, die das

Protein inaktivieren. 2×10^8 infizierte Erythrozyten wurden zunächst in 180 μ l PBS bei Raumtemperatur resuspendiert und anschließend wurden 4 Einheiten (U) des modifizierten SLO oder 600 U des Sigma-SLO hinzugefügt. Diese Mengen sind unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen definiert als die Menge SLO, bei der 50 % des Hämoglobins aus der infizierten Zelle austritt. Aufgrund der geringeren spezifischen Aktivität mussten für eine effiziente Permeabilisierung mehr U des Sigma-SLO eingesetzt werden. Nach der Zugabe von SLO wurde für 6 min bei RT inkubiert, wobei die Suspension alle 2 min geschüttelt wurde, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Suspension zu gewährleisten. Nach Ablauf der Inkubation wurde für 5 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment mit PBS gewaschen. Die Effizienz der Permeabilisierung wurde anhand der Menge des ausgetretenen Hämoglobins gemessen. Dafür wurde eine Probe aus infizierten Zellen der gleichen Ernte auf die Konzentration 10^8 Zellen / 100 μ l PBS eingestellt, durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen lysiert und bei 10'000 g für 20 min bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand entsprach 100 % der Hämoglobinkonzentration und wurde 1 : 500 mit Wasser verdünnt. Die verdünnte Probe wurde photometrisch bei 412 nm gemessen und mit einer ebenso verdünnten Probe des SLO-Überstandes verglichen. SLO-permeabilisierte Zellen wurden wie oben angegeben trypsinisiert und zusammen mit der Überstandfraktion für die Proteinanalyse prozessiert.

2.8 Agarose-Gelelektrophorese und Northern-Blot-Analyse von RNA-Spezies

2.8.1 Präparation von genomischer DNA aus *P. falciparum* (Sambrook et al., 1989)

10^9 Trophozoiten-infizierte Erythrozyten wurden mit Gelafundin angereichert und mit Saponin lysiert. Anschließend wurde das Lysat bei 2000 g für 10 min zentrifugiert und die sedimentierten Parasiten in 2 ml Lysis-Puffer resuspendiert und über Nacht bei 50° C inkubiert. Die genomische DNA wurde am nächsten morgen mit Phenol/Chloroform behandelt und mit 0,6 vol 0,1 M Natriumacetat in Isopropanol gefällt. Danach wurde die DNA mit 75% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 100 μ l 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,1 mM EDTA gelöst. Die Konzentration der DNA wurde spektrometrisch bei 260 nm gemessen und betrug 10 μ g/ μ l.

2.8.2 PCR (Rubio et al., 1996)

Für die Amplifikation der konservierten varC-Region wurden die Primer 5'-AAAAACAAAATCATCAGTAGGAAATTTATTTC-3'(1) und 5'-TATCCCATAAATCT-

GCTATTGGGTA-3'(2) gewählt. Ihre Konzentration in Wasser wurde auf 10 μM eingestellt. Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich entsprechend den Herstellerangaben (Invitrogen) zusammen aus: 5 μl 10x PCR-Puffer, 1 μl von einer 10 mM dNTP-Mischung, 1,5 μl von einer 50 mM MgCl_2 -Lösung, 0,5 μl jedes Primers, 1 μl "Template-DNA" und 0,2 μl Enzymlösung (Platinum Taq-Polymerase). Der Reaktionsansatz wurde mit autoklaviertem Wasser auf 50 μl aufgefüllt. Die PCR-Bedingungen umfassten einen Zyklus bei 95° C für 3 min, gefolgt von 35 Zyklen mit Schritt 1, 94° C 30 sek, Schritt 2, 50° C, 30 sek und Schritt 3, 65° C 60 sek. Die Visualisierung des PCR-Produktes erfolgte mit konventioneller Agarose-Gelelektrophorese. Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mit einem Kit entsprechend den Herstellerangaben (Qiagen). Die DNA-Konzentration wurde mit einem analytischen Gel bestimmt und wurde auf 5 ng/ μl eingestellt.

2.8.3 Radioaktive Markierung der varC-DNA

Zur Herstellung einer radioaktiven varC-Sonde mit dem Megaprime-Kit werden 10 ng PCR-Produkt benötigt. Bei einer Konzentration von 5 ng/ μl wurden daher 2 μl des PCR-Ansatzes eingesetzt. Dazu wurden bei RT 20 μl H_2O , 5 μl 10x Reaktionspuffer und 5 μl "Random Primers" (10 μM) pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde für 5 min auf 95° C erhitzt, um die doppelsträngige DNA in Einzel-stränge zu überführen. Zu dem Ansatz wurden dann zu je 4 μl dCTP, dGTP und dTTP gegeben (je 10 mM). Mit 4 μl α -markiertem [³²P]-dATP (10 mM) bei einer spezifischen Aktivität von 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ und 1 μl Enzymlösung (2 Einheiten Klenow-Fragment) wurde der Ansatz vervollständigt und bei 37° C für eine Stunde inkubiert. Danach wurde er für 2 min auf 95° C erhitzt und auf Eis gelagert.

Reaktionsansatz "PCR"

40,3 μl H_2O
5 μl 10x Puffer
1, 5 μl 50 mM MgCl_2
1 μl Template-DNA
1 μl Primermischung
1 μl dNTP-Lösung
0, 2 μl Enzymlösung

50 μl gesamt

PCR-Bedingungen

50 μl Reaktionsansatz

35 {	95° C, 3min
	94° C, 30 sek
	50° C, 30 sek
	65° C 60 sek
	65° C 7 min

Reaktionsansatz "radioaktive Sonde"

20 μl H_2O
5 μl 10x Puffer
2 μl DNA-Lösung
5 μl Random Primers
4 μl dCTP
4 μl dGTP
4 μl dTTP
4 μl α -[³² P]-dATP
2 μl Enzymlösung

50 μl gesamt

2.8.4 Präparation von Gesamt-RNA aus *P. falciparum* (Sambrook et al., 1989)

10⁹ Ring-infizierte Erythrozyten wurden mit Gelafundin angereichert und mit Saponin lysiert. Anschließend wurde das Lysat bei 2000 g für 10 min zentrifugiert und die sedimentierten Parasiten in 1 ml TRIS-Reagenz aufgenommen und für 5 min bei RT resuspendiert. Die Suspension wurde mit 200 µl Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt und bei 10'000 g und 4° C für 30 min zentrifugiert. Danach wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und mit 1 Vol 2-Propanol gemischt. Das Gemisch wurde für 1 Stunde auf Eis inkubiert und danach bei 10'000 g für 30 min zentrifugiert, um die RNA zu sedimentieren. Sie wurde für 5 min luftgetrocknet und in 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde bei 260 nm gemessen und betrug ca. 3 µg/µl.

2.8.5 Elektrophorese von RNA durch Formaldehyd-Agarose-Gele (Sambrook et al., 1989)

4 µl RNA (ca. 12 µg, s. oben) wurden mit 2 µl 5x RNA-Gellaufpuffer, 4 µl 11 M Formaldehyd und 10 µl Formamid versetzt und für 15 min bei 65° C inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis gekühlt und 2 µl RNA-Gelladepuffer dazugegeben. Für die Auftrennung der RNA-Spezies wurde ein Gel aus 0,8 % Agarose in 1x RNA-Gellaufpuffer gegossen. Das Gel wurde mit 5 V/cm Länge für 5 min vorlaufen gelassen, bevor die Proben auf das Gel geladen wurden. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel 3x für 5 min in 0,05 M NaOH in DEPC-Wasser gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen und die RNA zu hydrolysieren.

2.8.6 Northern Blot (Sambrook et al., 1989)

Für den Transfer und die Immobilisierung der Nukleinsäuren wurde eine Nitrocellulosemembran (10 x 15 cm) verwendet. Der Transfer der RNA vom Gel auf die Membran erfolgte mit der passiven "Aufwärts-Blot-Technik", die mit Hilfe von Kapillarkräften die RNA auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Das NaOH-behandelte Gel wurde für 30 min in 20x SSC gelegt bevor es in der "Sandwich"-Anordnung über Nacht "geblottet" wurde. Als Transferpuffer diente ebenfalls 20x SSC. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran in 6x SSC für 5 min geschwenkt und anschließend auf Whatmann-Papier getrocknet. Für die Hybridisierung mit der radioaktiven Sonde (s. oben) wurde die Membran für 1 Stunde bei 50° C in Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Danach wurde die Lösung durch 8 ml frischen Puffer ersetzt und der Reaktionsansatz der Megaprime-Markierung (50 µl) zugegeben. Die Nylon-Membran wurde dann in dieser Lösung ÜN bei 50° C geschwenkt und einmal mit 500 ml 2x SSC-Puffer gewaschen. Danach wurde sie noch

zweimal mit 500 ml 0,5x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Der Filter wurde dann aus der Waschlösung genommen, leicht angetrocknet und für die Autoradiographie zusammen mit einem Röntgenfilm und einer Verstärkerplatte in eine Kassette gelegt. Die Expositionsdauer des Films betrug ein bis mehrere Tage.

2.9 Extraktionen von Membranen von infizierten Erythrozyten

Membranen wurden sequentiell mit Puffern, die eine hohe Salzkonzentration (Salzpuffer) oder einen alkalischen pH-Wert von 11 (Karbonatpuffer) aufwiesen, behandelt.

2.9.1 Behandlung mit Salz- und Karbonatpuffer zur Extraktion von peripheren Membranproteinen (Fujiki et al., 1982; Johnson et al., 1994)

Membranen von 10^8 infizierten Erythrozyten wurden durch osmotische Lyse in HEPES-Puffer und Sedimentation bei 10'000 g für 30 min oder durch Saponin- und mechanische Lyse der infizierten Erythrozyten gewonnen. Sie wurden in 100 μ l Salzpuffer (mit PIC) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Membranen bei 100'000 g für 1 h bei 4° C sedimentiert und das Pellet in 10 Vol Karbonatpuffer resuspendiert. Die Inkubation in diesem Puffer wurde für 30 min auf Eis ausgeführt und die Membranen wie oben erneut zentrifugiert. Die Proteine der Überstand- und Sedimentfraktionen wurden für die Proteinanalyse prozessiert.

2.9.2 Extraktion mit 1 % Triton

Membranen von 10^8 infizierten Erythrozyten wurden durch osmotische Lyse in Tris-Puffer und Sedimentation bei 10'000 g für 30 min gewonnen. Sie wurden mit Detergentien der Triton-Reihe (TX-100, TX-114) extrahiert. Dazu wurden die Detergentien mit einer Konzentration von 1 % in TBS (mit PIC) gelöst und die Membranfraktionen in 10 Vol dieser Lösungen für 30 min auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Fraktionen wurden danach entweder bei 10'000 g für 30 min sedimentiert oder auf Saccharose-Gradienten geladen (s. unten). Lösliche und unlösliche Fraktionen wurden im Western Blot analysiert.

2.9.3 Triton X-114-Phasenpartitionierung von Membranproteinen (Vachon et al., 1991)

Membranen von 10^8 infizierten Erythrozyten wurden durch mechanische Lyse in hypotonem Tris-Puffer und Sedimentation bei 10'000 g für 30 min gewonnen. Sie wurden mit einer Mischung aus 200 μ l TBS (mit PIC) und 50 μ l TBS-saturiertes Triton X-114 extrahiert. Die Inkubation dauerte 30 min und wurde bei 4° C durchgeführt. Die unlöslichen Partikel

wurden danach bei 10'000 g und 4° C für 30 min sedimentiert und der Überstand auf 37° C erwärmt und bei 3000 g für 5 min erneut zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde von der unteren Detergensphase getrennt und mit 50 µl Triton X-114 versetzt. Die Detergensphase wurde in 200 µl TBS aufgenommen. Beide Phasen wurde dann noch zweimal partitioniert bevor die darin enthaltenen Proteine in Aceton gefällt und zusammen mit der unlöslichen Fraktion im Western Blot analysiert wurden.

2.9.4 Harnstoffbehandlung von Membranen von infizierten Erythrozyten

Membranen von 10⁸ infizierten Erythrozyten wurden durch mechanische Lyse in hypotonem Tris-Puffer und Sedimentation bei 10'000 g für 30 min gewonnen. Danach wurden die Membranen in 10 Vol 10 mM Tris-HCl pH 8, das 8 M Harnstoff und 1 mM EDTA enthielt, bei RT für 1 h extrahiert. Die Proben wurden daraufhin gegen 10 mM Tris-HCl, pH 8, mit 1 mM EDTA und 0,1, 0,5 oder 1M Harnstoff, ÜN bei 4° C dialysiert und dann bei 10'000 g für 30 min zentrifugiert. Sediment- und Überstandfraktionen wurden im Western Blot analysiert. In anderen Experimenten wurden die Dialysate auf Saccharose-Gradienten geladen (s unten).

2.10 Dichtegradienten-Zentrifugation

2.10.1 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (Beckers et al., 1994)

Membranen von 10⁹ infizierten Erythrozyten wurden wie beschrieben in Tris-Puffer homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 2000 g für 10 min von Zelldebris gereinigt und die Membranen bei 100'000 g für 1 h sedimentiert. Die Sedimentfraktion wurde in 1 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8 und 1 mM EDTA (mit PIC) resuspendiert und 400 µl davon auf das oberste Saccharosekissen eines diskontinuierlichen Gradienten geladen. Der Gradient bestand aus Kissen von 800 µl mit 60, 50, 40 30 bzw. 20 % Saccharose, die in 10 mM Tris-HCl, pH 8, und 1 mM EDTA gelöst worden und in dünnwandigen Polyallomerröhrchen aufeinander geschichtet worden waren. Die Zentrifugation wurde bei 100'000 g zwischen 8 und 14 h in einem Ausschwingrotor ausgeführt. Die Fraktionen wurden durch Anstechen des Röhrchenbodens gesammelt, und die Saccharose-Konzentration in jeder Fraktion wurde über den refraktären Index mit Hilfe eines Saccharo-Refraktometers bestimmt. Die Proteine wurden aus jeder Fraktion mit TCA gefällt und im Western Blot analysiert. Die densitometrische Auswertung von immunreaktiven Banden wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm "KODAK 1D 3.5" durchgeführt.

Für die Dichtegradientenzentrifugation von Detergens-solubilisierten Membranen wurden die gleichen Bedingungen gewählt, außer dass der pH-Wert des Gradienten 7,4 betrug. Auch für die Dichtegradienten-Zentrifugation von harnstoffbehandelten Membranen wurden die gleichen Bedingungen gewählt, mit der Ausnahme, dass dem Gradienten Harnstoff in einer Konzentration von 0,1 M zugegeben wurde.

2.10.2 Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation von leichten Membranen (Macintyre, 1992)

Membranen von 10^9 infizierten Erythrozyten wurden wie beschrieben in HEPES-Puffer homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 2000 g für 10 min von Zelldebris gereinigt und die Membranen bei 100'000 g für 1 h sedimentiert. Die Sedimentfraktion wurde in 1 ml 10 mM HEPES, pH 7,4, 1 mM EDTA, 250 mM Saccharose und 30 % Iodixanol (mit PIC) resuspendiert. Der Dichtegradient bestand aus 800 µl-Fraktionen von 35, 25, 20, 15 und 10 % Iodixanol in 10 mM HEPES pH 7,4, 1 mM EDTA und 250 mM Saccharose. 400 µl der in 30 % Iodixanol aufgenommenen Membranfraktion wurden als 30 %-Kissen verwendet. Die Kissen wurden in dünnwandigen Polyallomerröhrchen aufeinandergeschichtet und bei 100'000 g für 10 Stunden zentrifugiert. Die Fraktionen wurden durch Anstechen des Röhrchenbodens gesammelt und die Proteine in diesen mit TCA gefällt. Die gefällten Proteine wurden im Western Blot analysiert. Die densitometrische Auswertung von immunreaktiven Banden wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm "KODAK 1D 3.5" durchgeführt.

2.11 Lipidanalyse (nach Bligh und Dyer, 1959)

Die Fraktionen 2-6 und 7-11 aus der Dichtegradientenzentrifugation in Harnstoff (s. oben) wurden zu 2 Fraktionen vereint und deren Proteingehalt mit der Bradford-Methode bestimmt. Die beiden Fraktionen wurden dann auf die gleiche Menge Protein eingestellt, fünffach mit eiskaltem Wasser verdünnt und die Membranen bei 100'000 g für 1 h bei 4° C sedimentiert. Die Membranen wurden dann in einem Gemisch aus Chlormethan, Methanol und Wasser in dem Verhältnis 10:10:3 unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbades extrahiert. Die Proben wurden danach bei 3,500 g für 5 min zentrifugiert und die Extraktion mit den Sedimenten wiederholt. Die Überstände aus beiden Extraktionen wurden vereint und unter Stickstoffbegasung getrocknet. Die getrockneten Proben wurden in 1 ml n-Butanol gelöst und mit einem weiteren ml Wasser stark geschüttelt. Danach wurde die Dispersion wieder zentrifugiert und in eine wässrige und organische Phase geteilt. Die obere organische Phase

wurde von der wässrigen Phase getrennt und mit Wasser gewaschen. Die Proben wurden dann wieder unter Stickstoffbegasung getrocknet und in einem Laufmittel gelöst, das aus Chlormethan, Methanol und 2 M Ammoniaklösung in dem Verhältnis 65:25:4 bestand. Die Proben wurden auf Dünnschicht-Chromatographieplatten aufgetragen und durch Kapillarkwirkung getrennt. Nach dem Lauf wurden die Platten Luft-getrocknet und mit 6,9 mM Kupfer(II)sulfatpentahydrat in 7,3 % Phosphorsäure besprüht. Für die Sichtbarmachung der Lipide wurden die Platten für 15 min bei 170° C erhitzt.

2.12 BFA-Behandlung

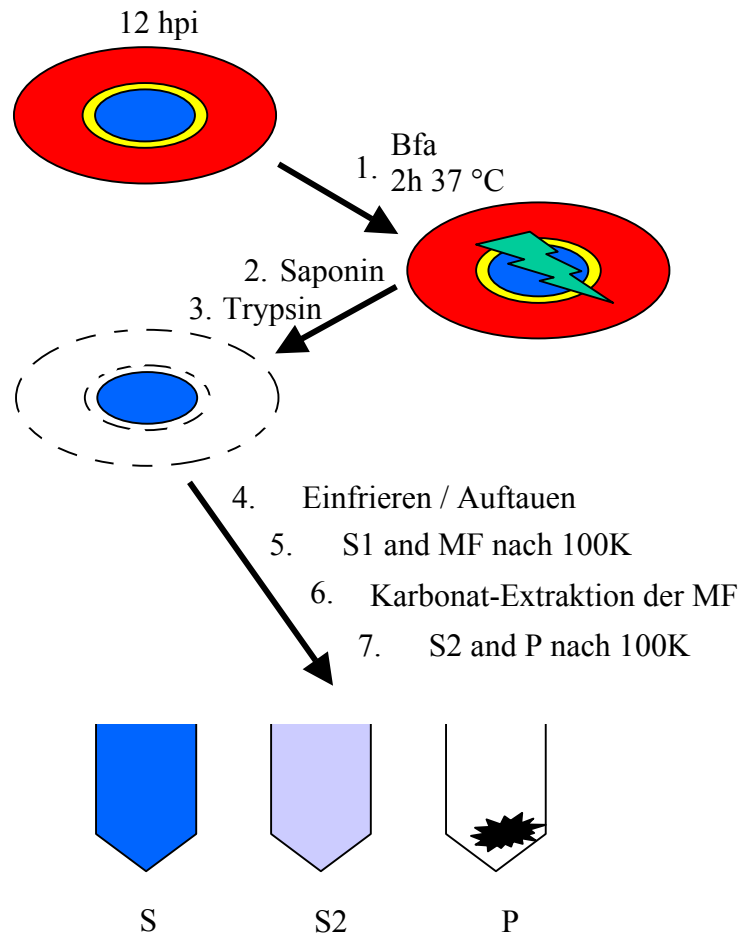
Infizierte Erythrozyten wurden durch wiederholte Alanin-Behandlung hoch-synchronisiert und der Zeitpunkt der Reinvasion mit Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen bestimmt. Danach wurden die infizierten Erythrozyten für einen neuen Zyklus ausgesät und 12 h post-Invasion bei einer Parasitämie von ca. 15 % mit 5 µg/ml BFA behandelt. Die Inkubationsdauer wurde empirisch ermittelt und betrug 2 h unter Kulturbedingungen. Für die Trypsinbehandlung wurden die Parasiten wie oben angegeben behandelt. Danach wurden die Zellen in TBS pH 8 (mit PIC) aufgenommen und mechanisch lysiert. Die Lysate wurden dann bei 100'000 g zentrifugiert, um die löslichen Proteine von den Membranproteinen zu trennen. Die Membranfraktion wurde dann mit Karbonatpuffer behandelt und erneut zentrifugiert. Die Überstandfraktionen und die Sedimentfraktion wurden im Western Blot analysiert. Für eine bessere Übersicht ist die Strategie dieses Experimentes schematisch in Abb. 9 dargestellt.

2.13 FACS-Analyse (Roberts *et al.*, 1992)

Trophozoiten-infizierte Erythrozyten wurden in Mikrotiterplatten zunächst mit mAbBC6 inkubiert, ein gegen A4-PfEmp1 spezifischer monoklonaler Mausantikörper. Für die zweite Lage wurden die Zellen mit Kaninchen- α -Maus-Immunglobulinen und für die dritte mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-konjugiertem Schwein- α -Kaninchen-Immunglobulinen inkubiert. Im dritten Inkubationsschritt wurden die Zellen gleichzeitig mit 1 µg/ml Ethidiumbromid behandelt, um parasitierte von nicht-infizierten Erythrozyten unterscheiden zu können. Alle Inkubationsschritte wurden für 30 min bei RT ausgeführt. Das Verhältnis von FITC- zu Ethidiumbromid-markierten Zellen nach Trypsinbehandlung wurde in der Durchflußzytometrie (FACSCalibur, Becton Dickinson) als mittlere Fluoreszenz (MFI) in Abhängigkeit von der Trypsinkonzentration, die für eine lineare Darstellung logarithmisch aufgetragen wurden, bestimmt.

Abb. 9: BFA-Experiment schematisch

Infizierte Erythrozyten wurden 12 h post-Invasion (hpi) mit BFA für 2 h inkubiert (1.). Danach wurden die Zellen mit Saponin lysiert und trypsiniert, um Proteine der Wirtszelle und der parasitophoren Vakuole zu entfernen (2. + 3.). Um die löslichen Proteine von den Membranproteinen zu trennen, wurden die infizierten Erythrozyten mechanisch lysiert (4.) und bei 100'000 g zentrifugiert (100K, 5.). Die Membranfraktion wurde im Folgenden mit Karbonatpuffer behandelt und erneut bei 100'000 g zentrifugiert (6. + 7.). Die beiden Überstände (S1, S2) und die Sedimentfraktion wurden schließlich im Western Blot analysiert.



2.14 Zweidimensionale Auftrennung von Proteinen

Für die 2D-Analyse von Proteinen wurden entweder Membranfraktionen von 10^9 infizierten Zellen direkt eingesetzt, oder es wurden Proteinproben verwendet, die durch die kombinierte TCA/Aceton-Fällung gewonnen wurden.

2.14.1 Auftrennung in der ersten Dimension

Membranen von 10^9 infizierten Erythrozyten oder Proteinpräzipitate von 5×10^9 infizierte Erythrozyten wurden für 1 Stunde bei RT in 250 μ l Solubilisierungspuffer extrahiert. Den Extrakten wurde dann gemäß den Herstellerangaben (Amersham) 2 % IPG-Puffer pH 3-10 (Ampholyte) und Spuren von Bromphenolblau beigegeben. IPG-Streifen (pH 3-10, 13 cm) wurden mit den solubilisierten Proteinen bedeckt und ÜN bei RT inkubiert. Zur anschließenden Auftrennung der Proben in der 1. Dimension wurde die Elektrophorese (IEF System Multiphor II) mit den Gelstreifen für 1 h bei 200 V, 1 h bei 500 V und 11 h bei 2500 V durchgeführt (28200 Vh). Diese Werte wurden empirisch ermittelt. Nach dem Lauf der 1.

Dimension wurden die Gelstreifen für 15 min in SDS-Äquibrierungspuffer mit DTT und danach für 15 min in demselben Puffer mit Iodoacetamid inkubiert.

2.14.2 Auftrennung in der zweiten Dimension und Visualisierung der Proteinbanden

Zur Auftrennung in der 2. Dimension wurden die äquibrierten IPG-Streifen auf SDS-Trenngele platziert und mit warmer Agarose-Lösung überschichtet. Nach dem Lauf der 2. Dimension wurden die Gele zur Visualisierung der Proteinbanden mit Coomassie (Brilliant Blue R 250) oder Silber gefärbt (s. o.).

2.15 Morphologische Analysen

2.15.1 Immunfluoreszenz

Infizierte Erythrozyten wurden auf Objektträgern ausgestrichen, getrocknet und für 10 min in einem Bad aus Aceton und Methanol (1 : 2) bei -20° C fixiert. Alle nachfolgenden Inkubationen wurden bei 37° C für 30 min durchgeführt. Die Objektträger wurden nach der Fixierung getrocknet und mit 1 % Milchpulver in PBS inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Milchlösung entfernt und die Objektträger mit dem Erstantikörper in frischer Milchlösung inkubiert: Anti-Bande3-Antikörper wurde 1 : 200, Anti-GBP-Antikörper und Anti-ATS (PfEmp1)-Antikörper 1 : 100 verdünnt. Danach wurden die Objektträger mit Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern (Anti-Maus-Cy3 und Anti-Kaninchen Cy5), die ebenfalls 1 : 100 in Milchlösung verdünnt wurden, unter Lichtausschluß inkubiert und schließlich mit PBS gewaschen, getrocknet und mit einem Tropfen PBS/Glyzerin (1 : 2) eingebettet. Die Visualisierung erfolgte mit einem konfokalen Lasermikroskop (Leica TCS SP2).

2.15.2 Elektronenmikroskopie

Membranen von 10^9 infizierten Erythrozyten wurden wie unter 2.10.2 beschrieben präpariert und in der Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Durch seitliches Anstechen des Polyallomerröhrchens mit einer 2 ml-Spritze wurden die Membranen der leichten Fraktionen isoliert, mit 5 Vol. 10 mM HEPES, pH 7,5, 250 mM Saccharose verdünnt und bei $100'000$ g sedimentiert. Das Sediment wurde in 50 μ l PBS resuspendiert und 20 μ l davon als Tropfen auf den Boden einer Petrischale pipettiert. Auf diesen Tropfen wurde dann ein Nickel-Netzchen mit Kohlefilm für 1 min gelegt. Das Netzchen wurde danach auf einem Tropfen PBS für 1 min gewaschen und auf einen weiteren Tropfen bestehend aus 1% frisch

angesetztem Uranylacetat für 1 min gelegt. Es erfolgten ein zweiter Waschritt in Wasser und das Trocknen des Netzchens auf sauberem Filterpapier. Die morphologische Analyse fand statt mit Hilfe eines Standard-Elektronenmikroskops.

3 Ergebnisse

3.1 Heterogenität der PfEmp1-Expression in der FCBR-Linie

Um in den geplanten Untersuchungen an PfEmp1 repräsentative Aussagen treffen zu können, wurde mit dem FCBR-Stamm von *P. falciparum* keine Selektion auf einen bestimmten, von PfEmp1 vermittelten Adhäsionstyp durchgeführt. In solchen Linien sind mehrere var-Gene transkriptionell aktiv und individuell nachweisbar, und weisen daher verschiedene Größen auf. Das Muster der var-Transkripte in der FCBR-Kultur sollte zunächst untersucht werden, um einen Eindruck von der Heterogenität der var-Expression im FCBR-Stamm zu gewinnen. Eine "Northern-Blot-Analyse" dieser var-mRNA's ermöglichte es, die Anzahl der verschiedenen transkribierten var-Gene zu erfassen.

3.1.1 Amplifikation und radioaktive Markierung des vollständigen varC-Fragmentes

Zur Herstellung einer radioaktiven universellen Sonde musste zunächst die konservierte varC-Region mittels PCR amplifiziert werden (Abb. 10). Die PCR wurde mit genomischer

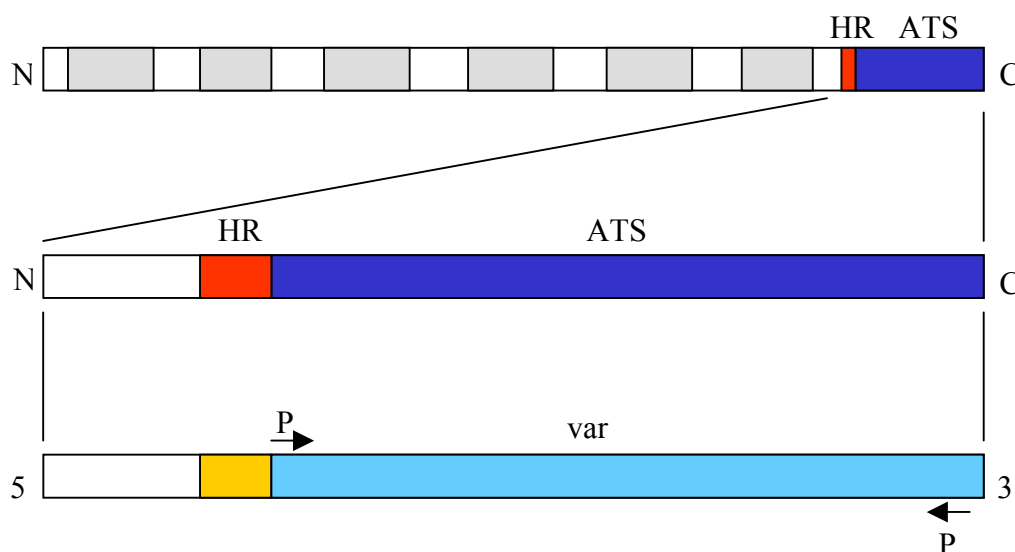


Abb. 10: Amplifikation der varC-Region von PfEmp1 mit PCR schematisch

Die schematische Abbildung zeigt die hydrophobe Region (HR) in der Protein- (rot) und in der Nukleinsäuresequenz (gelb), sowie die konservierte Region in der Protein- (ATS, blau) und in der Nukleinsäuresequenz (varC, hellblau). Die Positionen, gegen die Primer 1 (P1) und Primer 2 (P2) gerichtet sind, sind mit Pfeilen markiert (Rubio *et al.*, 1996). Details s. Abschnitt „Material und Methoden“

DNA vom FCBR-Stamm nach Rubio *et al.* (1996) durchgeführt und lieferte das typische Amplifikat von ca. 1,1 kb Größe (Abb. 11 A), das für den nächsten Schritt von Salzen und Nukleotiden befreit wurde (Abb. 11 B). Es diente anschließend als "Template" für die

Amplifizierungsreaktion mit radioaktivem α -[32 P]-dATP und unspezifischen 9er-Primern zur Herstellung einer radioaktiven Sonde (ohne Abb).

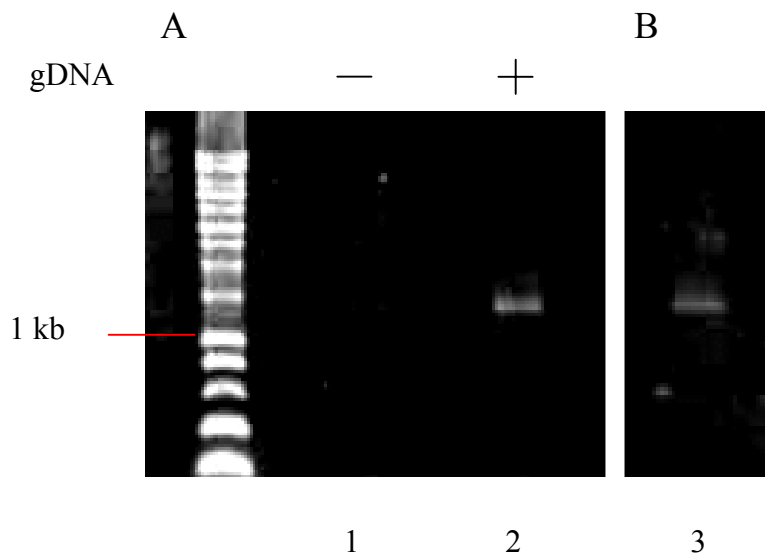


Abb. 11: PCR von *varC* (A) und Herstellung einer radioaktiven Sonde (B)
1, Kontrolle ohne genomische DNA (gDNA); 2 PCR mit genomischer DNA; 3, PCR-Fragment nach Reinigung von Salzen und Nukleotiden.

3.1.2 In der FCBR-Linie wird eine heterogene Population von *var*-mRNA gebildet

Die Transkriptionsrate der *var*-Gen-Expression erreicht ihren Höhepunkt ca. 12 Stunden nach der Invasion (Gardner *et al.*, 1996). Nach 30 Stunden sind Transkripte der *var*-Gene kaum mehr nachweisbar. Aus diesem Grund müssen *var*-Transkripte, die mit der "Northern Blot"-Methode analysiert werden sollen, von Ring-Stadien stammen. Die Präparation der RNA erfolgte daher aus einer Kultur, die mit Ring-Stadien angereichert war. Die aufgereinigte RNA wurde, um sie auf Degradationsprodukte zu überprüfen, unter denaturierenden Bedingungen in einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 12 A). Wie die Abb. zeigt, trennte sich die ribosomale RNA in distinkte Banden auf; die 28 S und 18 S rRNA sind deutlich zu erkennen. Nach dieser Qualitätskontrolle wurde die aufgetrennte RNA auf einen Nitrocellulose-Filter transferiert, welcher mit der hergestellten radioaktiven *varC*-Sonde inkubiert und anschließend für die Autoradiographie verwendet wurde. In Abb. 12 B und C sind die Ergebnisse nach verschiedenen Expositionszeiten dargestellt. Bei einer Exposition des Filmes von drei Tagen (Abb. 12 C) wurden drei Transkripte der *var*-Gene detektiert, die oberhalb von 7,5 kb migrieren. Pf60 ist ein zur ATS-Domäne von PfEmp1 homologes Protein, dessen Synthese im späten Ring- bzw. jungem Trophozoitenstadium beginnt und in der Northern-Analyse von *var*-Transkripten als Indikator für das Stadium der parasitierten Zellen ausgewertet werden kann (Kyes *et al.*, 2000). Abb. 12 B zeigt ein starkes Signal für

das Transkript dieses Proteins, das bei ca. 3 kb migriert. Die deutliche Detektion von pf60-mRNA zeigt, dass zum Zeitpunkt der RNA-Präparation die Ring-Stadien älter als 12 Stunden und für die Analyse von var-mRNA nicht optimal waren. Für die Überprüfung der Heterogenität der var-Transkripte reicht das Ergebnis aber vollkommen aus.

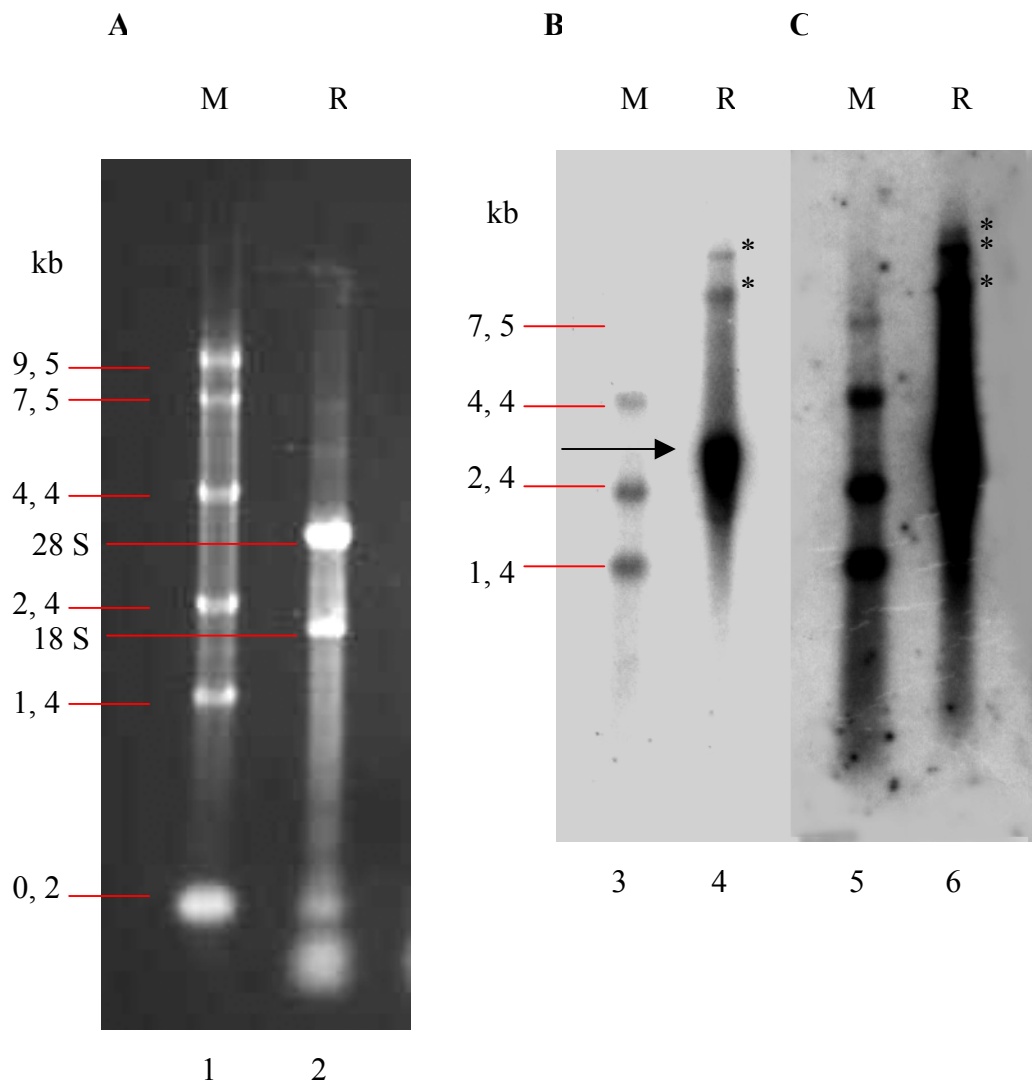


Abb.12: Northern-Blot-Analyse von var-mRNA

RNA (R) wurde aus einer Kultur mit Ring-Stadien von *P. falciparum* aufgereinigt und zusammen mit Marker-RNA (M) unter denaturierenden Bedingungen in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (A). Die Positionen der beiden ribosomalen RNA (28 S und 18 S) sind angegeben. Nach der Visualisierung des Gels wurde die RNA auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wurde mit einer radioaktiven Sonde für die konservierte varC-Region inkubiert und nach unterschiedlichen Expositionszeiten auf Röntgenfilm abgebildet: 1 Tag (B) und 3Tage (C). Die Sonde kreuzhybridisiert mit pf60 (Pfeil), einem zur konservierten ATS-Region von PfEmp1 homologen Parasitenprotein. Spezifische Hybridisierungen mit var-mRNA führen zu Signalen oberhalb von 7,5 kb (Sterne).

3.2 Biochemische und morphologische Lokalisation von PfEmp1 in Trophozoiten-infizierten Erythrozyten

Die Northern-Blot-Analyse zeigte, dass die FCBR-Linie mindestens drei verschiedene Transkripte der var-Gene erzeugt. In ersten Experimenten sollte überprüft werden, ob sich die Heterogenität der RNA-Moleküle in einer heterogenen Population von PfEmp1-Proteinen widerspiegelt. Ebenfalls sollte in diesen Experimenten untersucht werden, ob und wann PfEmp1 auf der Oberfläche der infizierten Zelle erscheint und in welche Kompartimente das Protein exportiert wird.

3.2.1 PfEmp1 ist in Trophozoiten-Stadien unlöslich

Zunächst wurden mit Gelafundin angereicherte Trophozoiten-Stadien durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen lysiert und bei 10'000 g zentrifugiert. Die Auftrennung der Proteine aus Überstand- und Sedimentfraktion im SDS-Gel und anschließende Immunoblot-Nachweise von PfExp1 und PfExp2 ergaben, dass die Membranproteine in die Sedimentfraktion segregierten, also unlöslich sind (Abb. 13). Das gegen die ATS-Region von PfEmp1 gerichtete Antiserum reagierte, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem Northern Blot, mit zwei Proteinen, die sich in ihrer Größe unterscheiden und größer als 200 kDa sind. Sie segregierten wie PfExp1 und PfExp2 in die Membranfraktion. Um Kreuzreaktionen des α -ATS-Antiserums mit humanen Erythrozytenproteinen auszuschließen, wurden die Membranen von nicht-infizierten Erythrozyten ebenfalls analysiert; in diesen konnten keine kreuzreaktiven humanen Erythrozyten-Proteine (Abb. 13) detektiert werden. Auch die Antiseren gegen die parasitenspezifische Aldolase, gegen PfExp1 und PfExp2 reagierten nicht mit Membranproteinen des Erythrozyten.

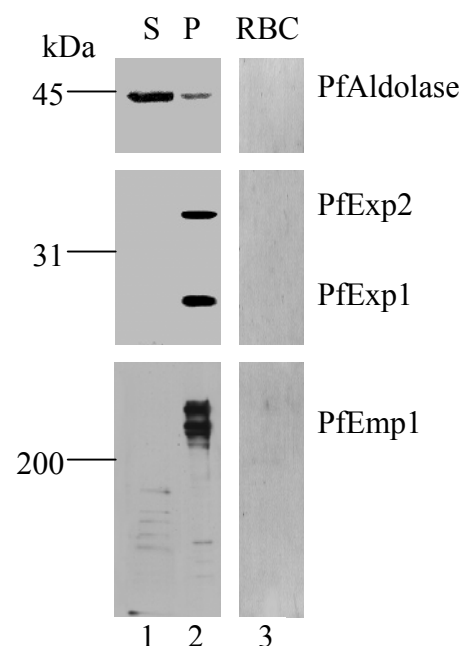


Abb. 13: Löslichkeit von PfEmp1

Infizierte Erythrozyten wurden lysiert und durch Zentrifugation bei 10'000 g in eine Fraktion mit löslichen Proteinen (S) und eine mit unlöslichen Proteinen (P) getrennt. Auf die gleiche Weise wurden nicht-infizierte Erythrozyten präpariert (RBC). Die Fraktionen wurden im Western Blot mit Antiseren gegen PfEmp1 und Markerproteine analysiert.

3.2.2 PfEmp1 wird auf die Oberfläche des infizierten Erythrozyten transportiert

Durch Trypsin-Behandlung an intakten infizierten Erythrozyten sollte überprüft werden, ob PfEmp1 auf der extrazellulären Seite der Wirtszellmembran exponiert ist. Um Bedingungen für eine quantitative Trypsinierung der exponierten PfEmp1-Moleküle zu definieren, wurden infizierte Erythrozyten, die für die Expression des A4-PfEmp1-Typs selektioniert worden waren, mit verschiedenen Trypsinkonzentrationen bei unterschiedlichen Inkubationszeiten behandelt. Für die Markierung von exponiertem A4-PfEmp1 stand ein monoklonaler, gegen den exponierten N-terminalen Teil des Proteins gerichteter Antikörper zur Verfügung (BC6). Dieser bindet an infizierte Zellen, die PfEmp1 vom A4-Typ exprimieren, und läßt sich mit einem fluoreszierenden α -Maus-Antikörper markieren (FITC), so dass eine Auswertung des Experimentes durch FACS-Analyse erfolgen kann (Abb. 14). Mit zunehmender Trypsineinwirkung sollte das Epitop für BC6 verdaut werden und die gemessene Fluoreszenz abnehmen. Um kernhaltige, d. h. parasitierte Erythrozyten, von nicht-infizierten Erythrozyten unterscheiden zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit Ethidiumbromid behandelt. Wie Abb. 14. zeigt, wurden nicht-infizierte Erythrozyten weder mit Ethidiumbromid noch mit FITC-konjugiertem Antikörper markiert. Die Analyse ergab, dass bereits bei einer Trypsinkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ und einer Inkubationszeit von 5 min keine Fluoreszenz mehr nachweisbar, d. h. alle Epitope des primären Antikörpers durch die Protease degradiert worden waren.

Die experimentell ermittelten Bedingungen für eine effiziente Trypsinierung wurden auf intakte FCBR-infizierte Erythrozyten angewendet. Die Immunoblot-Analyse der Membranfraktion derart behandelter Zellen mit dem gegen die cytoplasmatische ATS-Region von PfEmp1 gerichteten Antiserum zeigte eine neue immunreaktive Bande bei ca. 90 kDa (Abb. 15), bei der es sich um den gegen Trypsin geschützten cytoplasmatischen Anteil des Proteins handelt (Waterkeyn *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurden Proteine detektiert, die kleiner als das Trypsinfragment sind und auch mit dem α -ATS-Antiserum reagieren. Die Signale waren für diese Proteine wesentlich schwächer als für das tryptische Fragment. Das α -ATS-Antiserum reagierte auch mit "Volle-Länge" PfEmp1-Proteinen, die im Vergleich mit der Kontrollfraktion in ihrer Abundanz reduziert waren, obwohl die Trypsinierung unter Bedingungen durchgeführt wurde, die die auf der Oberfläche der infizierten Zellen vorhandenen PfEmp1-Moleküle vollständig entfernte. Es muss sich bei diesen Proteinen also um eine intrazelluläre Population von PfEmp1-Molekülen handeln.

Tab. 2: FACS-Daten

A % iRBC mAb/BC6 positiv					B MFI		
T ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Log [T]	5 min (F)	15 min (F)	30 min (F)	5 min (F)	15 min (F)	30 min (F)
0,01	0	84,45 (0,96)	82,64 (0,75)	84,26 (0,01)	145,00 (8,49)	153,50 (4,95)	146,00 (11,31)
1	0	83,62 (0,51)	81,45 (0,41)	83,65 (1,23)	113,50 (13,44)	99,00 (4,24)	115,00 (5,66)
10	1	34,52 (0,76)	3,04 (0,10)	2,89 (0,24)	7,00 (0,00)	5,50 (0,71)	10,00 (1,41)
100	2	3,04 (0,94)	2,41 (0,58)	1,83 (0,98)	2,00 (0,00)	5,00 (1,41)	2,50 (0,71)
500	2,7	2,94 (0,74)	1,84 (0,65)	1,70 (0,20)	3,50 (3,54)	6,00 (7,07)	5,00 (2,83)
1000	3	2,12 (0,81)	0,82 (0,13)	1,01 (0,05)	2,00 (1,41)	3,00 (4,24)	3,50 (0,71)

Infizierte Erythrozyten wurden auf den A4-PfEmp1-Phänotyp selektioniert und mit verschiedenen Konzentrationen von Trypsin ([T]) und unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 37° C behandelt. Danach wurden sie mit α -A4-PfEmp1-Antikörper, sekundärem FITC-konjugierten Antikörper und zuletzt mit Ethidiumbromid behandelt. Über FACS-Analyse wurden in zwei Versuchsreihen der prozentuale Anteil der PfEmp1-markierten (mAb/BC6 + FITC-Konjugat) Erythrozyten von allen infizierten Erythrozyten (A) und die mittlere Fluoreszenz (MFI; B) bestimmt. Fehlerwerte (F) sind in Klammern angegeben. Die Trypsinkonzentration wurde für eine lineare Darstellung logarithmisch umgerechnet.

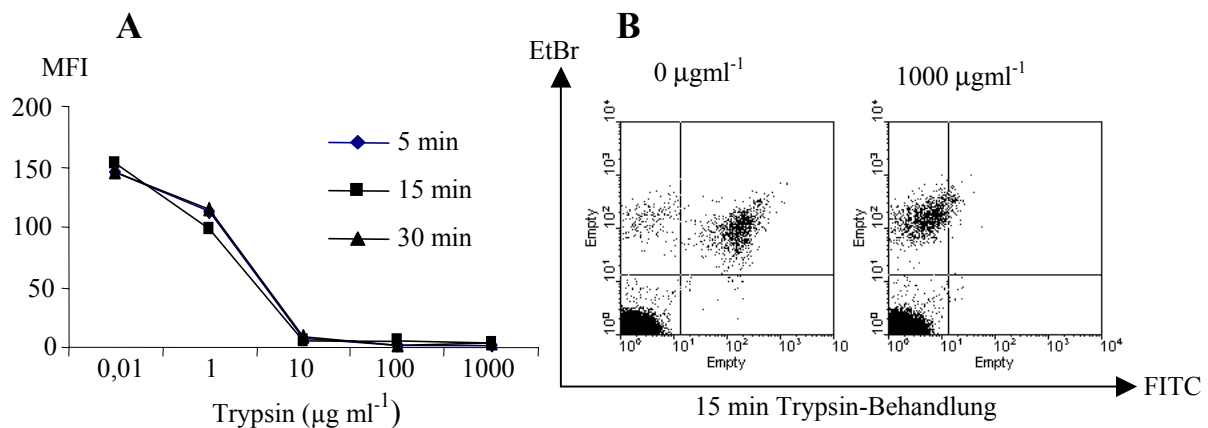
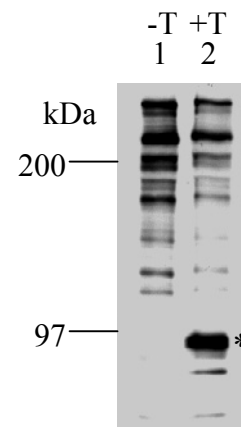


Abb. 14: FACS-Analyse von A4-PfEmp1 nach Inkubation mit verschiedenen Trypsin-Konzentrationen. Versuchsdurchführung s. Tab. 2. A Graphische Darstellung der in Tab. 2 B gezeigten Werte für die bei unterschiedlichen Trypsinierungsbedingungen ermittelte mittlere Fluoreszenz (MFI). B Typisches FACS-Ergebnis bei einer Inkubationszeit von 15 min mit 1 mg ml⁻¹ Trypsin. Die EtBr-Achse kennzeichnet in den beiden oberen Fenstern die kernhaltigen, also parasitierten Erythrozyten. Die FITC-Achse kennzeichnet in den beiden rechten Fenstern die Zellen, die die fluoreszierenden Antikörper tragen. Das rechte obere Fenster beider Diagramme (B) stellt also die Schnittmenge, die sowohl parasitierte als auch Fluoreszenz-markierte Erythrozyten enthält, dar.

Die Trypsinierung von intakten infizierten Erythrozyten eignet sich, um die Transportkinetik von PfEmp1 im Laufe der Entwicklung des Parasiten zu untersuchen. Dazu wurde die FCBR-Linie durch wiederholte Behandlung mit Alanin hoch-synchronisiert, so dass die Invasion aller Erythrozyten innerhalb von 4 Stunden stattfand. Die Zellen wurden weiter unter Kulturbedingungen inkubiert, nach Inkubationszeiten zwischen 0 und 27 Stunden

Abb. 15: Western-Blot-Nachweis der ATS-Domäne

Infizierte Erythrozyten wurden mit Trypsin (+T) behandelt, lysiert und die Membranfraktionen von löslichen Proteinen durch Sedimentation bei 10'000 g getrennt. Kontrollzellen wurden gleichermaßen prozessiert, jedoch nicht trypsinisiert (-T). Die Proteine wurden dann im SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Detektiert wurde PfEmp1 mit dem gegen die ATS-Region gerichteten polyklonalem Antiserum. 1 ohne Trypsinierung der Zellen, 2 mit Trypsinierung. Die Trypsinierung generiert ein immunreaktives Fragment von ca. 90 kDa Größe (Stern).



post-Invasion entnommen und mit Trypsin behandelt. Die Trypsinierung diente der Entfernung aller Proteine auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten. Als Kontrolle für die Proteasebehandlung dienten parasitierte Zellen, die entweder vor der Trypsinierung durch Einfrieren und Auftauen lysiert oder ohne Trypsin behandelt worden waren. Nach der Trypsinierung wurde die Protease mit Trypsin-Inhibitor inaktiviert und alle intakten Zellen durch Einfrieren und Auftauen lysiert. Sie wurden zusammen mit den bereits lysierten Kontrollfraktionen zentrifugiert und die Sedimentfraktionen im Western Blot unter Verwendung von Antiseren gegen PfExp1 und die ATS-Domäne von PfEmp1 analysiert (Abb. 16). Die Abb. zeigt, dass PfExp1 nach allen Inkubationszeiten detektiert aber in Ringstadien (0 – 15 h) in nur geringem Maße gebildet wird. Weil das Zeitfenster für die Invasion in diesem Experiment ca. 4 Stunden betrug, wurde PfExp1 zum Zeitpunkt 0 bereits detektiert. Während die Parasiten in den infizierten Zellen wuchsen nahm, die Abundanz von PfExp1 kontinuierlich zu. Die Trypsinierung der intakten Zellen führte nicht zur Degradation des mit der PVM assoziierten Proteins, das in diesem Experiment somit als Kontrolle für interne und somit vor Trypsinverdau geschützte Proteine gelten konnte. Wurden die Zellen vor der Trypsinierung durch Einfrieren und Auftauen aufgebrochen, konnte keine immunreaktive PfExp1-Proteinbande detektiert werden, indikativ für vollständigen Verdau durch die Protease. PfEmp1 wird im Gegensatz zu PfExp1 erst 12 Stunden nach Invasion detektiert; danach nimmt seine Bildung ebenfalls kontinuierlich zu. Die Trypsinierung an intakten Zellen erzeugte das typische tryptische Fragment von PfEmp1 von ca. 90 kDa, das bereits nach 12 Stunden post-Invasion detektiert wurde. In diesen Fraktionen wurde auch ein zur nicht-trypsinisierten Fraktion reduzierter Anteil von intakten PfEmp1-Molekülen detektiert, der der intrazellulären Population von PfEmp1 entspricht.

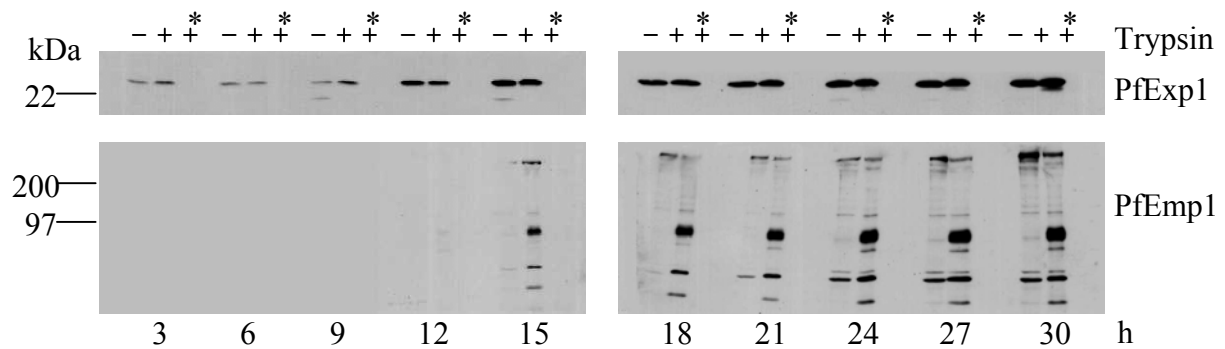


Abb. 16: Western-Blot-Analyse der Transportkinetik von PfExp1 und PfEmp1 in Ring- und Trophozoitenstadien

In Abständen von 3 Stunden post-Invasion wurden infizierte Zellen, die unter Kulturbedingungen inkubiert wurden, entnommen und mit Trypsin behandelt (+). Kontrollfraktionen wurden nicht trypsiniert (-) oder vor der Trypsinierung lysiert (+*). Die Fraktionen wurden im Western Blot unter Verwendung von Antikörpern gegen die ATS-Region von PfEmp1 und gegen PfExp1 analysiert.

3.2.3 PfEmp1 akkumuliert im Cytosol der Wirtszelle

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass ein großer Anteil der PfEmp1-Moleküle intrazellulär vorliegt und vor Protease-Verdau geschützt ist. An dieser Stelle sollte untersucht werden, in welchen Kompartimenten der infizierten Zelle intrazelluläres PfEmp1 lokalisiert ist. Dazu wurde ein Streptolysin O (SLO) -Permeabilisierungsexperiment durchgeführt. SLO bildet Poren in der Erythrozytenmembran und erlaubt es, das Zytoplasma der Wirtszelle freizusetzen und Proteasen in die Wirtszelle einzubringen. Proteine, die in der Wirtszelle lokalisiert sind, können in SLO-permeabilisierten Zellen durch Proteasen degradiert und somit nicht mehr detektiert werden. Werden die Proteine nicht durch die Protease-Behandlung zerstört, bedeutet dies, dass die Proteine sich entweder im Parasiten oder in der parasitophoren Vakuole (PV) aufhalten, vorausgesetzt, sie sind nicht resistent gegen die Protease. Die Membran der PV wird durch SLO nicht permeabilisiert und erlaubt daher Proteasen nicht den Zugang zur PV (Ansorge *et al.*, 1996).

Zunächst wurden infizierte Erythrozyten (FCBR oder A4) im Trophozoitenstadium mit Gelafundin angereichert. Danach wurden die Zellen mit Streptolysin O (SLO) permeabilisiert und anschließend zentrifugiert. Die permeabilisierten Zellen wurden mit Trypsin behandelt und zusammen mit dem durch die Permeabilisierung freigesetztem Zytoplasma im Western Blot analysiert (Abb. 17 A). Die Trypsin-Suszeptibilität von PfEmp1 wurde beim homogenen A4-Zelltyp mit Antiseren gegen die konservierte ATS-Region und gegen den N-Terminus, beim heterogenen FCBR-Typ nur gegen die ATS-Region untersucht. In allen drei Fällen wurde PfEmp1 in permeabilisierten Zellen vollständig verdaut (Abb. 17 a, b und c) und verhielt sich damit wie Spektrin, das in diesem Experiment als Referenz für das Cytoskelett

der Erythrozytenmembran herangezogen wurde. PfEmp1 und Spektrin wurden nicht in der zytosolischen Fraktion detektiert. PfExp1 ist ein integrales Membranprotein der parasitophoren Vakuolenmembran. Der C-Terminus des Proteins ist der Wirtszelle zugewandt, der N-Terminus dem Parasiten. Ein Anteil des Proteins wurde, wie Abb. 17 e zeigt, durch die Trypsin-Einwirkung auf die SLO-permeabilisierten Zellen degradiert, so dass das gegen den C-terminalen Teil gerichtete Antiserum mit einer reduzierten Anzahl von Epitopen reagieren konnte. PfExp1 wurde ebenfalls nicht im Zytosol der Wirtszelle gefunden. Im Gegensatz zu PfExp1, Spektrin und PfEmp1 wurde PfSERP, ein lösliches Protein der parasitophoren Vakuole, nicht durch Trypsin verdaut. Diese Kontrolle belegte die Intaktheit der PVM während der Trypsinierung. In Trophozoiten-infizierten Erythrozyten befindet sich also die Gesamtheit der intrazellulären PfEmp1-Moleküle in der Wirtszelle.

Dieser Befund wurde morphologisch durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft. Dazu wurden FCBR-infizierte Zellen auf Objektträgern fixiert, mit Antiseren gegen die ATS-Region von PfEmp1, gegen PfGBP, ein lösliches Protein, das in die Wirtszelle sezerniert wird, und gegen humanes Bande-3-Protein, ein abundantes Membranprotein der Wirtszellmembran, inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit Fluoreszenz-konjugierten Zweitantikörpern inkubiert und im konfokalen Lasermikroskop ausgewertet (Abb. 17 B). In der Immunfluoreszenz-Analyse verteilte sich PfEmp1 in Fluoreszenzzentren mit großem Radius im Zytoplasma der Wirtszelle. Die GBP-spezifische Fluoreszenz verteilte sich dagegen gleichmäßig in infizierten Erythrozyten. Die Erythrozytenmembran wurde durch die Fluoreszenzmarkierung von Bande-3 deutlich dargestellt. Insgesamt schien nur ein kleiner Anteil der PfEmp1-Moleküle auf der Oberfläche des Erythrozyten lokalisiert zu sein. Der größte Anteil schien, konsistent mit den Ergebnissen der vorhergehenden Trypsinierungsversuche, im Cytoplasma der Wirtszelle lokalisiert zu sein.

3.2.4 Fazit

Die bisher behandelten Experimente zeigen, dass in der FCBR-Linie eine Mischpopulation von var-RNA und PfEmp1-Molekülen gebildet wird. PfEmp1 ist unter Bedingungen, die das lösliche Proteine Aldolase freisetzen, unlöslich. In intakten Zellen generiert die Trypsin-Behandlung ein Fragment bekannter Größe (Waterkeyn *et al.*, 1999). Auf der Oberfläche erscheint nur ein Teil der gesamten PfEmp1-Population, der 12 Stunden post-Invasion detektiert werden kann. PfEmp1 ist in permeabilisierten Trophozoiten-infizierten Zellen vollständig trypsinierbar. Es wird folglich vom Parasiten in die Wirtszelle sezerniert. Dieser Befund konnte mit Immunfluoreszenz morphologisch bestätigt werden.

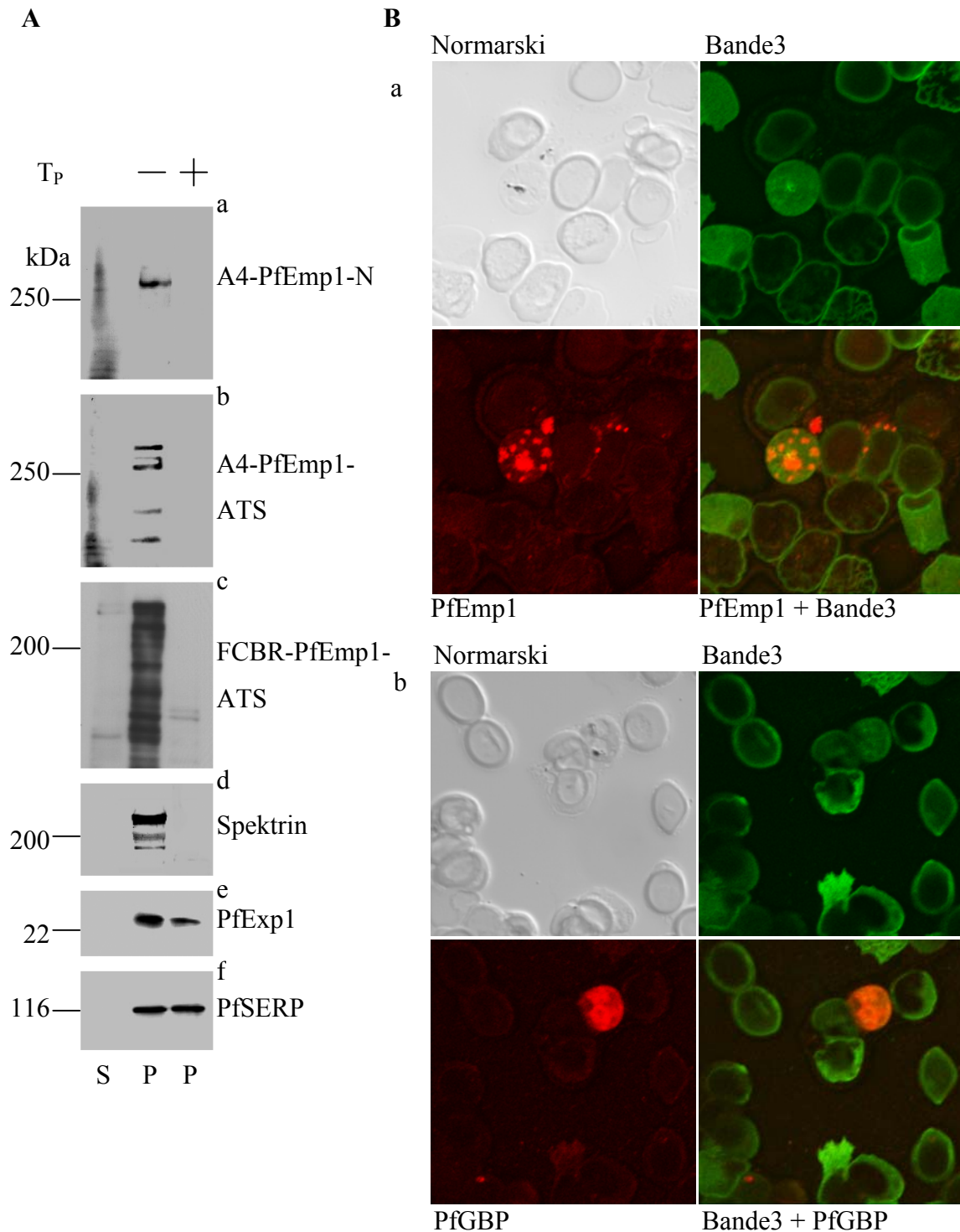


Abb. 17: SLO-Permeabilisierung und Immunfluoreszenz-Analyse von infizierten Erythrozyten
 A Infizierte Erythrozyten vom Typ A4 oder FCBR wurden mit SLO permeabilisiert und sedimentiert. Die permeabilisierten Zellen wurden mit Trypsin behandelt (T_p). Danach wurden die Proteine aller Fraktionen im SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Filter wurden mit Antiseren gegen den N-Terminus von A4-PfEmp1 (a), gegen die ATS-Region von A4-PfEmp1(b), gegen die ATS-Region von FCBR-PfEmp1(c), gegen Spektrin (d), gegen PfExp1 (e) und PfSERP (f) getestet. B Infizierte FCBR-Zellen wurden auf Objektträgern fixiert, mit Antiseren gegen die ATS-Region von PfEmp1 (a) und gegen PfGBP (b) inkubiert. Für die Markierung von humanem Bande-3-Protein wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet. Anschließend wurden die Objektträger mit den entsprechenden Fluoreszenz-konjugierten Zweitantikörpern inkubiert und im konfokalen Lasermikroskop visualisiert.

3.3 Intrazelluläres PfEmp1 assoziiert mit der Erythrozytenmembran

Die SLO-Permeabilisierung hat gezeigt, dass alle detektierbaren PfEmp1-Moleküle in die Wirtszelle exportiert werden. Es stellte sich daher die Frage, mit welchen Zielstrukturen innerhalb des Erythrozyten PfEmp1 assoziiert. Wichtige Interaktionen von exportierten Proteinen finden auf der cytosolischen Seite der PVM, an den Maurer'schen Spalten (MC), in dem Zytoskelett der Wirtszelle und mit der Wirtszellmembran statt. Bisher konnte jedoch nicht *in situ* gezeigt werden, mit welchen dieser Strukturen intrazelluläres PfEmp1 interagiert. Der Grund hierfür liegt in dem Mangel an geeigneten Methoden in der zellbiologischen Malaria-Forschung, mit denen sich die verschiedenen Strukturkomponenten der durch die Infektion modifizierten Wirtszelle voneinander trennen und analysieren lassen. Das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation stellte zu Beginn des Forschungsvorhabens eine solche Möglichkeit dar. Die Realisierung dieser war daher eine wichtige methodische Zielsetzung und Voraussetzung für die weitere experimentelle Durchführung des Forschungsvorhabens. Die folgenden Experimente dienten der Optimierung der Dichtegradientenzentrifugation und der anschließenden analytischen Verfahren.

3.3.1 Der Dichtegradient wird kontinuierlich nach Zentrifugation und Austropfen

In drei unabhängigen Experimenten wurde die Saccharose-Konzentration der Fraktionen nach Dichte-Gradientenzentrifugation bestimmt, um eine Aussage über das Verhalten und die Reproduzierbarkeit des diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten nach Zentrifugation und Austropfen zu treffen. Die Konzentration der Saccharose wurde refraktometrisch bestimmt (Abb. 18). Wie sich zeigte, wichen die Werte nur wenig voneinander ab. Auffällig war, dass eine stete Abnahme der Saccharose-Konzentration festgestellt wurde, die den diskontinuierlich gegossenen Gradienten nicht widerspiegelte und auf Diffusionsprozesse und Vermischungen beim Austropfen zurückgeführt wurden. Insgesamt zeigte sich aber ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit von unabhängigen Experimenten.

3.3.2 Lösliche und Membranproteine lassen sich in Saccharose-Dichtegradienten voneinander trennen

Zur empirischen Bestimmung der optimalen Trennung von löslichen und Membranproteinen wurden Dichtegradienten verschiedener Konzentrationsabstufungen gegossen und mit Membranfraktionen von infizierten Erythrozyten, die mit hypotoner Lösung

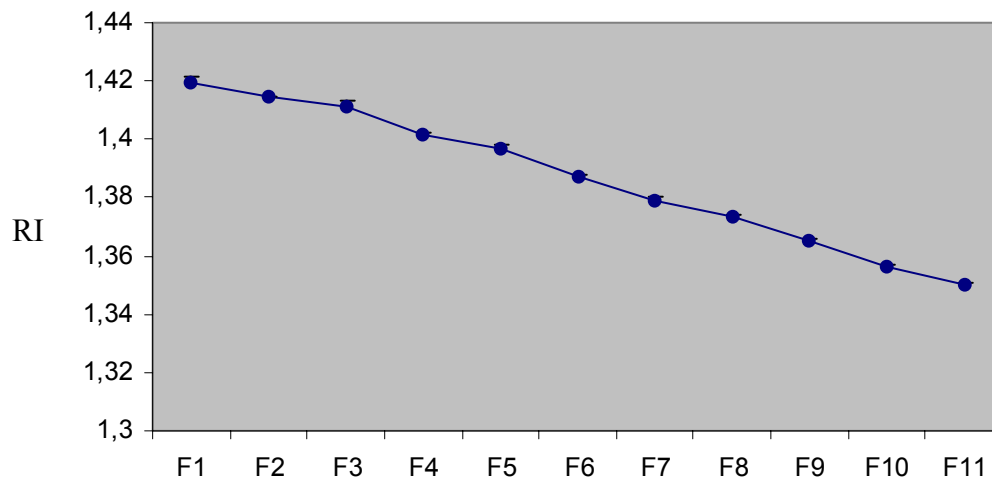


Abb. 18: Gemittelte Saccharose-Konzentration der Fraktionen

Wie in Abb. 11 beschrieben wurden drei Dichtegradientenzentrifugationen ohne biologisches Material durchgeführt, die Fraktionen (F1-F11) gesammelt und die Saccharosekonzentration dieser Fraktionen refraktometrisch bestimmt (Refraktärer Index, RI). Für das Diagramm wurden die Werte gemittelt und mit positiven Standardabweichungen (Querbalken) versehen.

unter Verwendung eines Homogenisators lysiert worden waren, beladen. Den Membranfraktionen waren als lösliche Proteine BSA und Immunglobuline (IgG) beigegeben. Für eine vollständige Trennung wurde die Dauer der Zentrifugation zunächst mit 14 Stunden, die Gravitation mit $100'000 \times g$ gewählt (Beckers *et al.*, 1994). Die Fraktionen wurden durch Austropfen gesammelt und die Proteine mit TCA gefällt. Die Analyse erfolgte im Western Blot durch Identifizierung der Referenzproteine Bande3 für die Erythrozytenmembran und PfExp1 für die PVM. Abb. 19 zeigt ein typisches Ergebnis, das an dieser Stelle repräsentativ für viele verschiedene Testgradienten gezeigt wird. Empirisch wurde der Bereich zwischen 60 und 20 % Saccharose als ausreichend für die Trennung der Markerproteine gefunden. In Fraktionen mit höherer Dichte wurden keine Proteine detektiert (nicht gezeigt). Bande3 wurde in Fraktionen höherer Dichte von 50 und 40 % Saccharose detektiert. Im Gegensatz dazu verteilten sich PfExp1 und PfExp2, konsistent mit ihrer gemeinsamen Lokalisation in der PVM, in allen Fraktionen bis auf die mit der höchsten Dichte von 60 % Saccharose. Anhand der Membranmarkerproteine konnte also nur eine Teiltrennung der Erythrozytenmembran von der PVM erzielt werden. Die löslichen Proteine verblieben in den Bereichen geringerer Dichte von 30 bis 20 % Saccharose. Dabei zeigte BSA gegenüber den Immunglobulinen die Tendenz, sich in Bereichen geringerer Dichte anzusammeln.

Um die Trennungseigenschaften des Saccharosegradienten für parasitenspezifische Membranproteine repräsentativ zu untersuchen, wurden infizierte Erythrozyten mit [^{35}S]-Methionin metabolisch markiert und im Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Die

Analyse der Fraktionen erfolgte mit SDS-PAGE und Visualisierung der Proteine durch Coomassie-Färbung (Abb. 20 A).

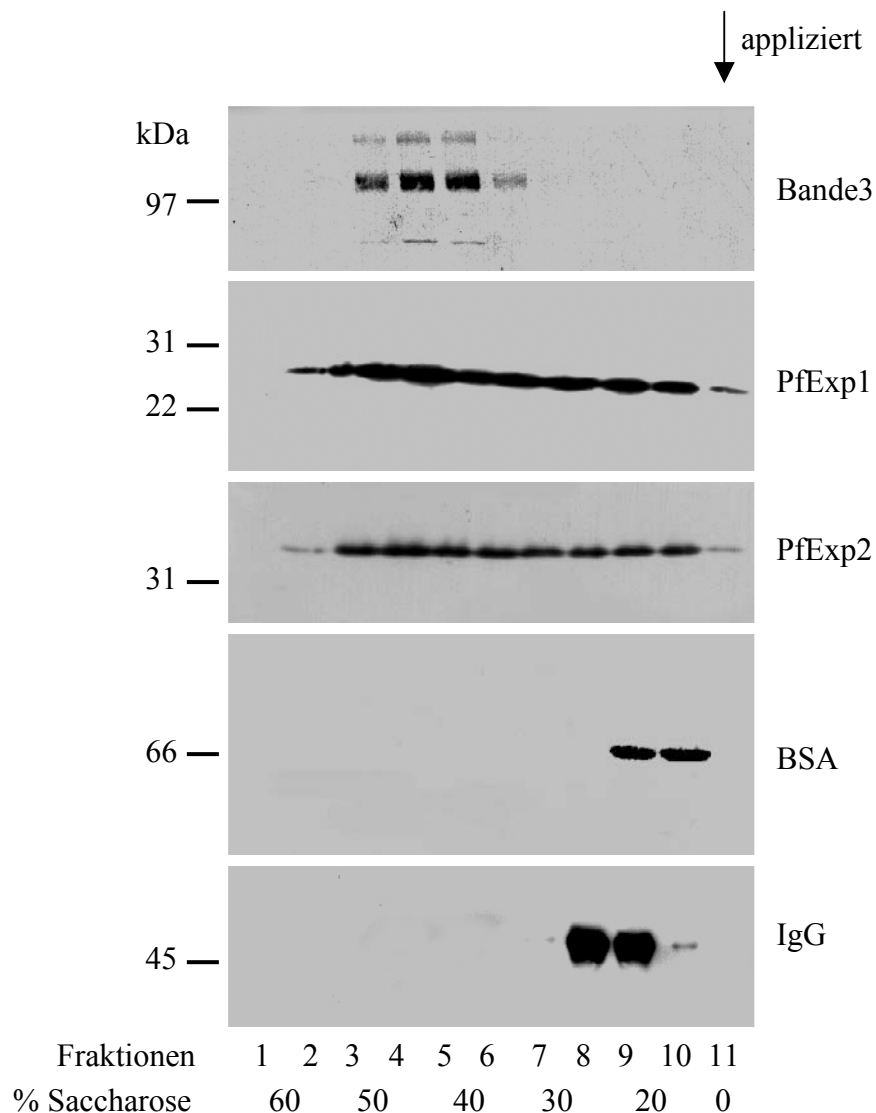


Abb. 19: Western-Blot-Analyse von Marker-Proteinen nach Dichtegradientenzentrifugation

Durch hypotone Lyse und Zentrifugation wurden die Membranen von infizierten Erythrozyten präpariert und im Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Der Pfeil deutet die Position an, an der die Proben aufgetragen wurden. Die Saccharose-Konzentration der aufeinandergeschichteten Dichtekissen ist in % angegeben. Fraktionen (1-11) wurden gesammelt, die Proteine mit TCA gefällt und im Western Blot analysiert. Zur Detektion von humanem Bande3 wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet; PfExp1 und PfExp2 wurden mit polyklonalen Antisera detektiert. BSA wurde durch Ponceau-Färbung des Nitrocellulose-Filters sichtbar gemacht, Immunglobuline durch Bindung reaktiver Sekundäntikörper-Konjugate detektiert.

Die radioaktiven Proteine wurden zusätzlich auf Röntgenfilm abgebildet (Abb 20 B). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Trennung von Membranproteinen in der Dichtegradientenzentrifugation vermutlich nur in Einzelfällen (Abb. 20 B, rote Pfeile) möglich ist. Die meisten

radioaktiven Proteine verteilen sich ähnlich wie PfExp1 und PfExp2 auf viele Fraktionen, wobei der Großteil der Reaktivität in den Fraktionen 3-6 detektiert wurde. Insgesamt befinden sich die zahlreichen Membranproteine nur auf einer begrenzten Anzahl von Membranen, so dass allein aus diesen Gründen ein hohes Maß an Kosegregation zu erwarten ist. Weil für die Analyse der Proteine aus technischen Gründen keine zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt werden konnte, ist es dennoch möglich, dass sich eine Proteinbande, die in mehreren Fraktionen detektiert wird, aus verschiedenen Proteinspezies zusammensetzt, die sich vollständig voneinander getrennt haben. Eine Verlängerung der Zentrifugationsdauer führte zu keiner Veränderung der Verteilung von PfExp1 und anderen Membranproteinen (nicht gezeigt). Bei einer Verkürzung von 14 auf 10 Stunden wurde ebenfalls das gleiche Ergebnis erzielt. Auch die Auftrennung von Membranen unterschiedlicher Stadien (Ring, Trophozoit, Schizont) konnte nicht mit einer veränderten Verteilung der Markerproteine korreliert werden. Jedoch nahm die Abundanz der Markerproteine, zurückzuführen auf die hohe Syntheseleistung fortgeschrittener Blutstadien, in Trophozoiten-Stadien zu (nicht gezeigt). Insgesamt schien die Dichtegradienten-Zentrifugation keine geeignete Methode zu sein, unterschiedliche Membranen des infizierten Erythrozyten voneinander zu trennen. Die Trennung löslicher Proteine von Membranproteinen schien dagegen möglich zu sein.

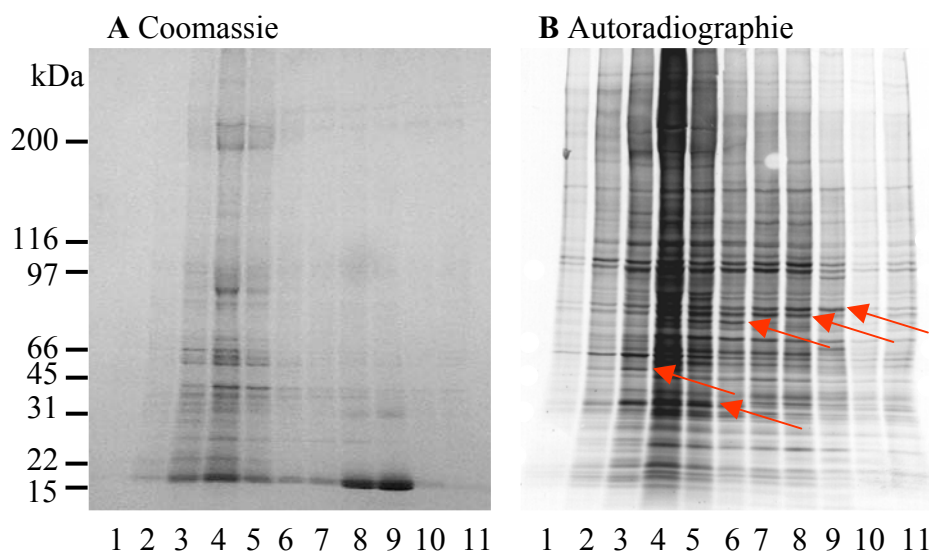


Abb. 20: Autoradiographie von Membranproteinen nach der Trennung in der Dichtegradientenzentrifugation

Infizierte Erythrozyten wurden in Anwesenheit von [35 S]-Methionin metabolisch markiert und wie unter Abb. 11 beschrieben präpariert. Die Proteine wurden in einem 5–15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (a). Danach wurde das Gel getrocknet und die radioaktiven Proteine auf Röntgenfilm abgebildet (b). Beispiele für Proteine, die sich ganz oder teilweise voneinander trennten, sind mit einem roten Pfeil markiert.

3.3.3 Die PVM vesikuliert während der osmotischen Lyse

Infizierte Erythrozyten wurden in hypotoner Lösung unter Verwendung eines Homogenisators lysiert, um die Annahme zu überprüfen, ob PfExp1 mit Vesikeln assoziiert ist (Haeggström *et al.*, 2004). Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 2000 x g von Zelldebris und großen Membranfragmenten befreit und der Überstand bei 10'000 g erneut zentrifugiert. Schließlich wurde das resultierende Sediment in isoosmotischem Puffer resuspendiert und mit Trypsin behandelt. Kontrollfraktionen wurden entweder nicht mit Trypsin oder mit Trypsin und Detergens behandelt. Die Proteine wurden gefällt, im SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Detektion von PfExp1 mit Antiseren, die gegen den N-Terminus bzw. C-Terminus von PfExp1 gerichtet sind, ist in Abb. 21 dargestellt. In nicht mit Trypsin behandelten Membranen wurde "Volle-Länge" PfExp1 von beiden Antiseren detektiert. In Trypsin-behandelten Membran-Suspensionen konnte der C-Terminus des Proteins mit dem entsprechenden Antiserum nicht detektiert werden (Abb. 21 A, Spur 2). Die Trypsinierung führte offenbar zu

dem Verlust des Epitopes. Der N-Terminus von PfExp1 dagegen wurde von dem gegen diesen Teil des Proteins gerichteten Antiserum detektiert. Durch die Trypsinierung wurde das Protein allerdings verkürzt und migrierte daher schneller als intaktes PfExp1 (Abb. 21 B, Spur 2).

Nach Trypsin-Behandlung unter Verwendung eines Detergens konnte PfExp1 von keinem der beiden Antiseren detektiert werden; beide Termini wurden durch die Protease offenbar verdaut (Abb. 21 A, B; Spur

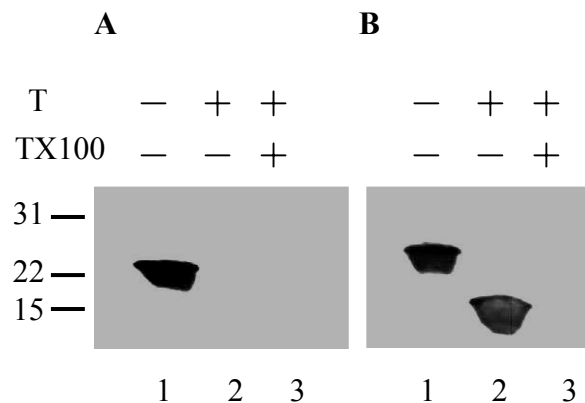


Abb. 21: Trypsin-Verdau von vesikulärem PfExp1

Durch hypotone Lyse wurden Membranen nach differentieller Zentrifugation von infizierten Erythrozyten präpariert und mit Trypsin (T) behandelt (A, B; 2). Kontrollfraktionen wurden ohne Trypsin behandelt (A, B; 1) oder mit Triton X-100 (TX100) und Trypsin (A, B; 3). Proteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Filter transferiert. Die Filter wurden mit Antiseren gegen den C-Terminus (A) bzw. den N-Terminus (B) von PfExp1 getestet.

3). Die Ergebnisse zeigen, dass PfExp1 in der untersuchten Fraktion ein integraler Bestandteil der Membranen ist, mit einer exponierten C-terminalen und einer luminalen N-terminalen, vor Proteaseaktivität geschützten Domäne. Damit zeigten die Vesikel die gleiche Orientierung wie die PVM in infizierten Erythrozyten. Inside-Out-Vesikel, bei denen der C-Terminus von PfExp1 vor Protease-Verdau geschützt sein sollte, konnten nicht nachgewiesen werden.

3.3.4 Dichtegradienten mit optimierten Trenneigenschaften für PfExp1

Es sollte nun die Frage geklärt werden, ob die Assoziation von PfExp1 mit Vesikeln mit der Segregation von PfExp1 in Fraktionen geringer Dichte korreliert. Dazu wurde der Flotationsnachweis von Vesikeln mit Iodixanol als Dichtemedium geführt (Macintyre, 1992), denn Saccharose hat bei bestimmten Trennproblemen zwei bedeutende Nachteile. Erstens nimmt mit steigender Konzentration die Viskosität zu, wodurch Flotationsexperimente, bei denen die biologischen Partikel im Bereich der hohen Dichte des Gradienten appliziert werden, erschwert werden. Zweitens ist Saccharose osmotisch aktiv; Lösungen mit mehr als 250 mM Saccharose sind hyperosmotisch. Saccharose-Dichtegradienten sind daher nicht für die Trennung von Organellen und Endosomen geeignet, die durch den Entzug von Wasser schrumpfen, inaktiv werden oder disintegrieren. Iodixanol ist im Gegensatz zu Saccharose in allen Konzentrationen isoosmotisch und weist die gleiche Viskosität auf. Abb. 22 zeigt die Umrechnung der Konzentrationen und Dichten für Saccharose und Iodixanol. Membranen von infizierten Erythrozyten wurden in 30 % Iodixanol resuspendiert und durch Flotation im Iodixanol-Dichtegradienten aufgetrennt.

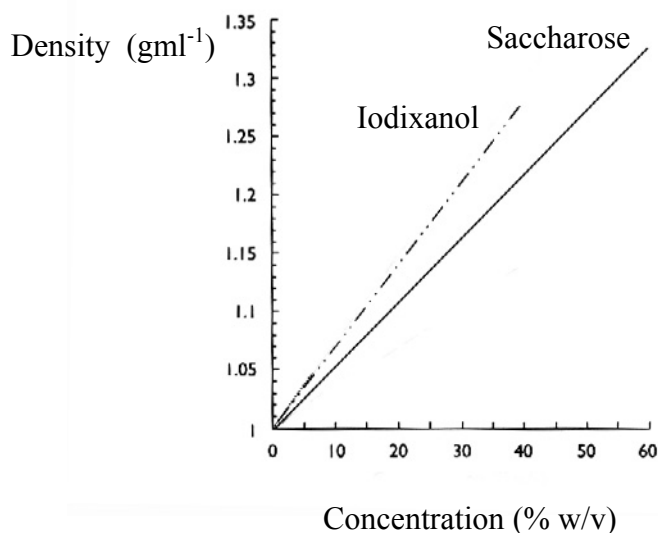


Abb. 22: Dichtenumrechnung von Saccharose nach Iodixanol (aus J. Graham "Biological Centrifugation")

Es konnte nun eine nahezu vollständige Trennung der Referenzproteine PfExp1 und Bande3 erzielt werden (Abb. 23 A). Ein großer Anteil von PfExp1 segregierte mit Fraktionen geringer Dichte. Diese Fraktionen wurden vereint und wie in Abb. 21 mit Trypsin behandelt und mit Antiseren gegen den N- und C-Terminus von PfExp1 analysiert (Abb. 23 B). Das Ergebnis zeigt, daß der N- Terminus vor Trypsin geschützt war, also ein Großteil aller PfExp1-Moleküle als integrale Membranproteine von intakten Vesikeln vorlagen. Inwieweit

die Erythrozytenmembran unter den gegebenen experimentellen Bedingungen vesikuliert und aufgrund der dichten Vernetzung mit dem Zytoskelett möglicherweise Vesikel hoher Dichte bildet, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

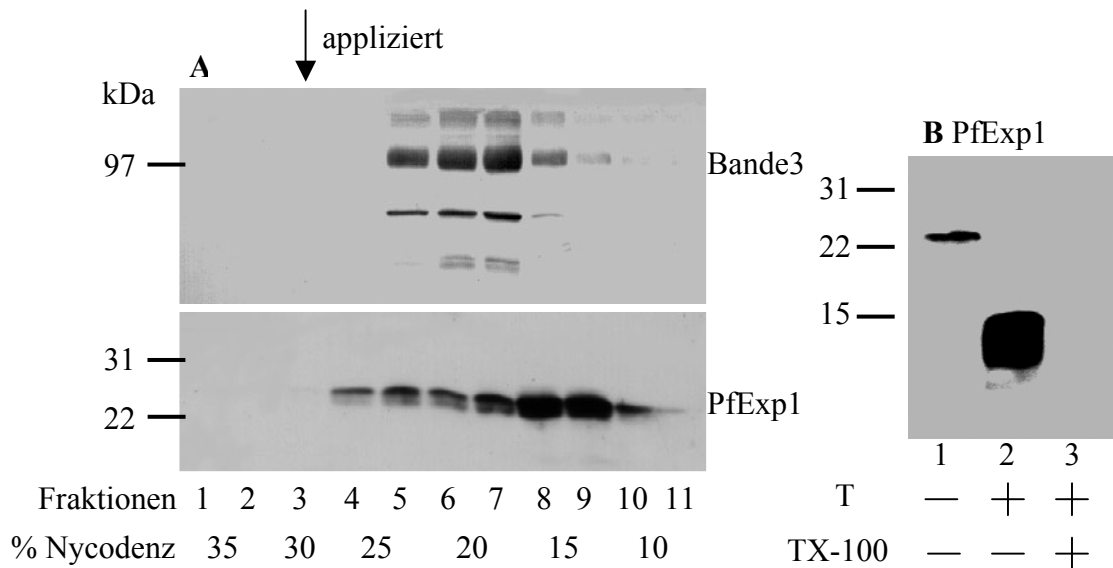


Abb. 23: Flotation von Vesikeln im Iodixanol-Gradienten

Membranen von infizierten Erythrozyten wurden durch Flotation im Dichtegradienten mit Iodixanol als Medium aufgetrennt, fraktioniert und im Western Blot mit Antikörpern gegen Bande3 und PfExp1 analysiert (A; 1-11). Der Pfeil deutet die Position der Proben-Applikation vor der Gradientenzentrifugation an. Die Konzentration von Iodixanol in den aufeinander geschichteten Kissen ist in % angegeben. B Membranen der Fraktionen 8-11 wurden sedimentiert und mit Trypsin (T) behandelt. Kontrollfraktionen wurden zusätzlich mit Triton X-100 (TX-100) solubilisiert. Die Western Blot-Analyse erfolgte mit einem Antiserum gegen den N-Terminus von PfExp1.

3.3.5 Morphologische Analyse der PfExp1-enhaltenen Vesikel

An dieser Stelle sollte ein morphologischer Nachweis der Vesikel geführt werden. Die Membranen der Fraktionen geringer Dichte (leichte Membranen) wurden sedimentiert und an Nickel-Netzchen mit Karbonfilmen adsorbiert, danach mit Uranylacetat negativ kontrastiert und im Elektronenmikroskop visualisiert (Abb. 24). Die Mehrheit der gefundenen Strukturen waren kollabierte Vesikel, die eine Größe von 100-1000 nm aufwiesen. Die Membranen der Vesikel zeigten auch bei hoher Auflösung eine glatte Struktur, was darauf hindeutet, dass keine großen Proteinkomplexe wie z. B. der F_1F_0 -ATPase-Komplex der Mitochondrien in diesen Membranen vorhanden sind (Persönliche Mitteilung Erhard Mörschel).

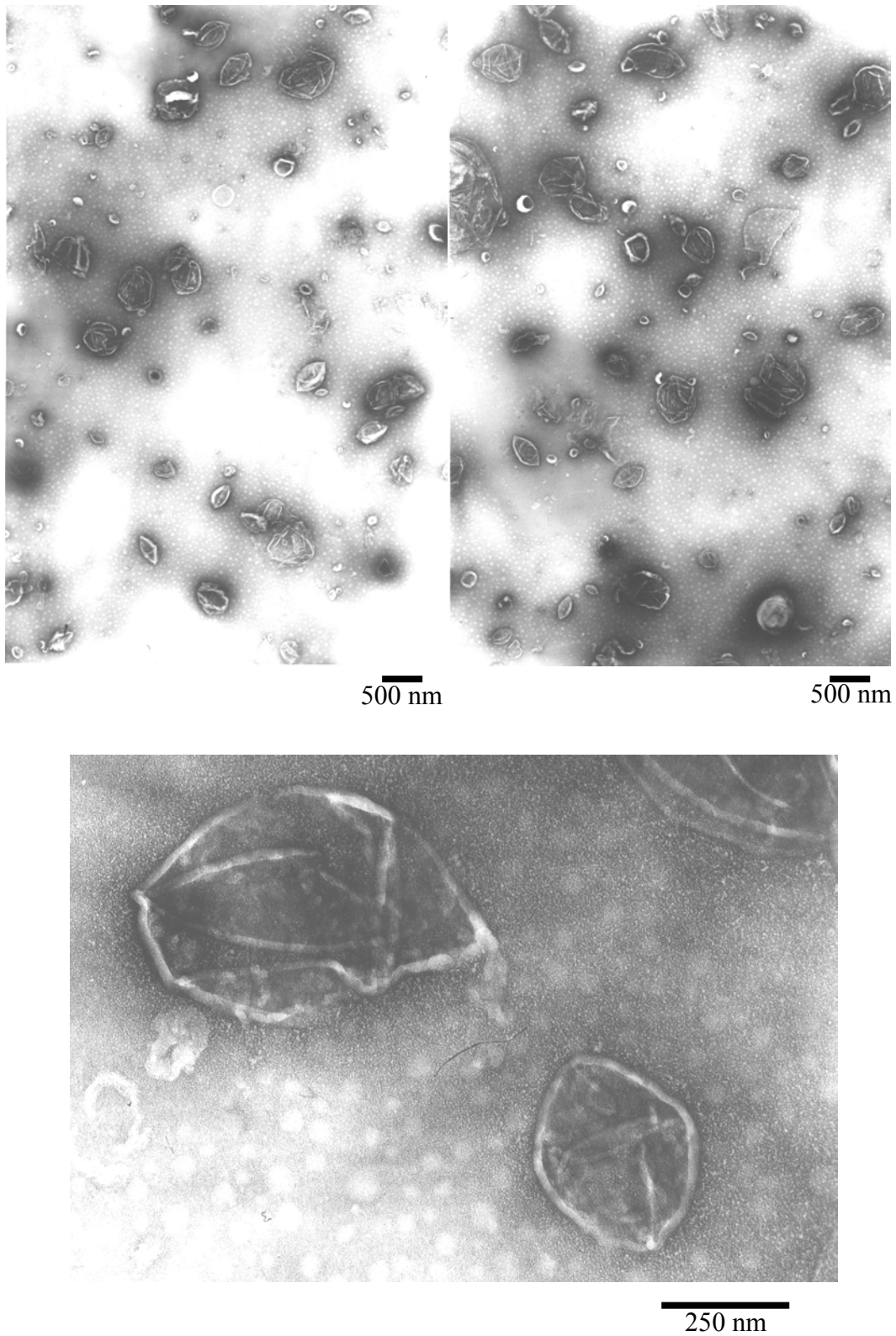


Abb. 24: Negative Staining der Vesikel

Membranen der leichten Fraktionen aus Abb. 23 wurden isoliert, sedimentiert und auf Karbonfilme von Nickel-Netzchen transferiert. Dort wurden sie mit Uranylacetat kontrastiert und mit einem Elektronenmikroskop visualisiert.

3.3.6 PfEmp1 kosegregiert mit der Erythrozytenmembran

Mit Iodixanol stand ein Dichtemedium zur Verfügung, das die Untersuchung von Vesikeln unterschiedlicher Größe mit PfExp1 als Markerprotein erlaubte. Im Folgenden wurden daher die Fraktionen von Iodixanol-Gradienten auf die Verteilung wichtiger Markerproteine und PfEmp1 untersucht. Neben PfExp1 und Bande3 wurden Antiseren für die Detektion von PfSbp1, ein Marker der Maurer'schen Spalten (Blisnick *et al.*, 2000) und Spektrin für das Cytoskelett eingesetzt.

Infizierte Erythrozyten wurden mit Trypsin behandelt, um zwischen externer und interner Population von PfEmp1 unterscheiden zu können (s. o.). Danach wurden sie, wie beschrieben, für die Herstellung einer Membranfraktion prozessiert. Die Membranen wurden in der Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und die Markerproteine der gesammelten Fraktionen im Western Blot analysiert (Abb. 25). Bande3 und PfExp1 verhielten sich wie in Abb. 23 gezeigt: Die Mehrheit von Bande3 migrierte in die Fraktionen 5-7 und die von PfExp1 wieder in die Fraktionen 8-10 (hier nicht gezeigt). Spektrin akkumulierte in den Fraktionen 5-7 und kosegregierte damit mit Bande3. PfEmp1 verhielt sich wie Spektrin und Bande 3; sowohl die membranständigen Proteine (tryptisches Fragment) als auch die intrazellulären segregierten mit den Fraktionen 5-7. Auch PfSbp1 segregierte hauptsächlich mit den Fraktionen 5-7.

3.3.7 Fazit

Es konnte gezeigt werden, dass PfExp1 mit internen Membranen assoziiert ist, die nicht mit dem Zytoskelett des Erythrozyten interagieren und bei osmotischer Lyse vesikulieren. Während der Dichtegradientenzentrifugation migrieren die Vesikel in Fraktionen geringer Dichte, in denen Bande3 nicht detektiert werden kann. Auch PfEmp1 kann nicht in diesen Fraktionen gefunden werden. Das Protein kosegregierte mit Bande3, Spektrin und PfSbp1.

3.4 PfEmp1 sedimentiert in Partikeln hoher Dichte nach Solubilisierung mit 1 % Triton

Eine Assoziation von PfEmp1 mit vesikulären Strukturen konnte nicht gezeigt werden. Die bisherigen Ergebnisse lassen aber aufgrund des ähnlichen Verhaltens von PfEmp1 und Spektrin vermuten, dass intrazelluläres PfEmp1 mit der Erythrozytenmembran oder dem Membranskelett assoziiert ist. Um zwischen den beiden Möglichkeiten zu diskriminieren, wurden Membranen infizierter Zellen in 1 % Triton solubilisiert und in Saccharose-

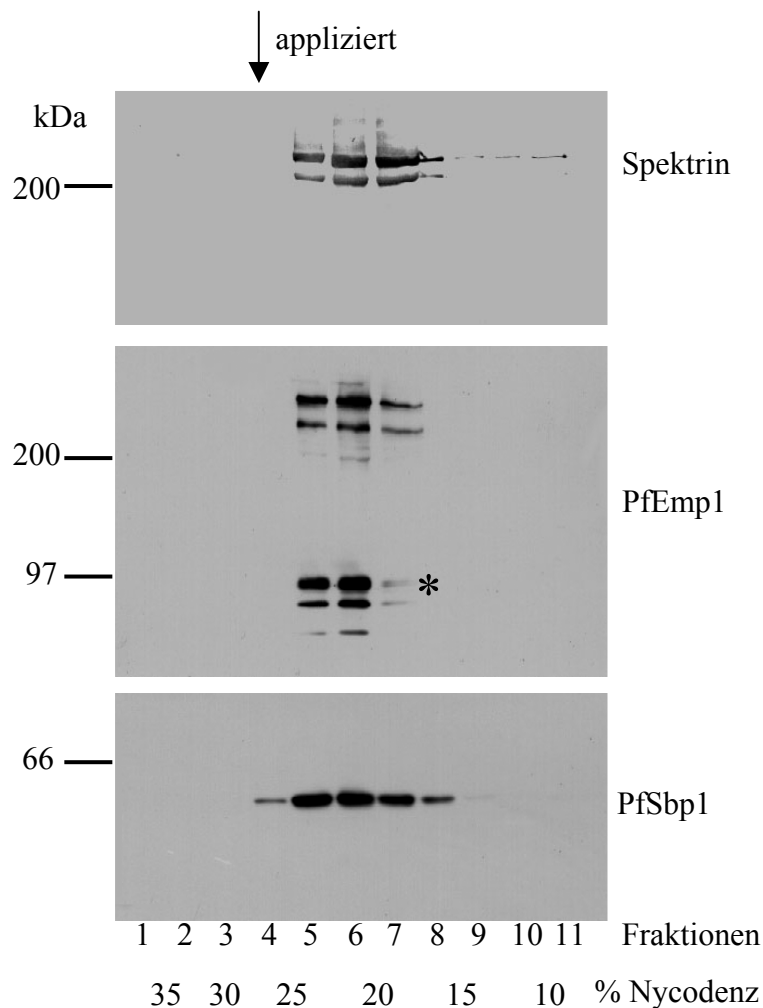


Abb. 25: PfEmp1 im Nycodenz-Dichtegradienten

Infizierte Erythrozyten wurden mit Trypsin behandelt, um zwischen externer und interner PfEmp1-Population zu unterscheiden. Fraktionen 1-11 wurden wie in Abb. 13 hergestellt. Proteine wurden gefällt, im SDS-Gel voneinander getrennt und auf Nitrozellulose-Filter transferiert. Diese wurden mit polyklonalen Antisera gegen humanes Spektrin, PfEmp1 und PfSbp1 getestet. Das tryptische Fragment von PfEmp1 ist mit einem Stern markiert.

Gradienten aufgetrennt. Das Cytoskelett der Erythrozytenmembran ist resistent gegen die Solubilisierung mit Detergentien wie Triton und Saponin (Kuhlman, 2000).

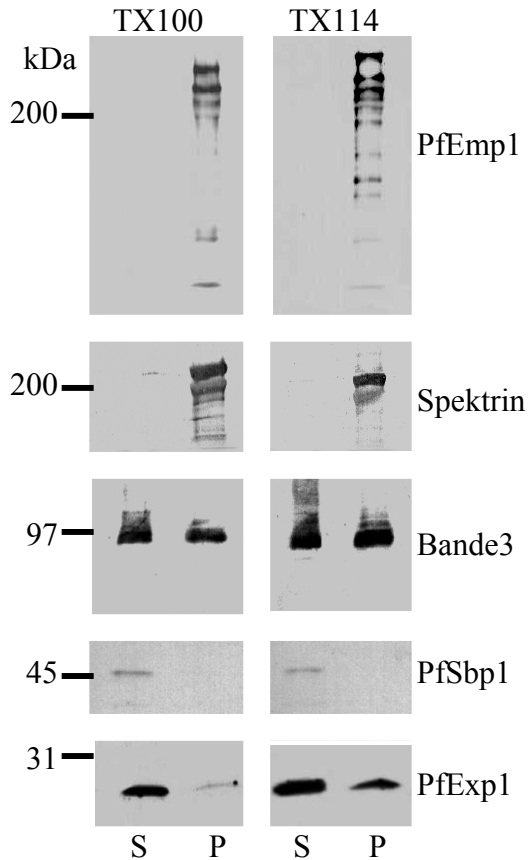
3.4.1 PfEmp1 ist unlöslich in Detergentien der Triton X-Reihe

Mit 1 % Triton solubilisierete Membranen wurden zunächst bei 10'000 g sedimentiert und in Überstand- und Sedimentfraktion getrennt, um die Verteilung der Markerproteine und PfEmp1 zu beobachten. Die Western-Blot-Analyse (Abb. 26) zeigt, dass PfEmp1 und Spektrin in 1 % Triton X-100 und Triton X-114 unlöslich sind (s. auch Leech *et al.*, 1984). Bande3 verteilte sich gleichmäßig auf die Überstand- und Sedimentfraktionen. PfExp1 und PfSbp1 wurden zu großen Anteilen durch die beiden Detergentien solubilisiert. Nur ein kleiner Anteil von PfExp1 war in der Sedimentfraktion zu detektieren. Um eine differenziertere

Analyse der gefundenen Solubilisierbarkeit der Markerproteine in Triton zu machen, wurden die solubiliserten Membranen im Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt.

Abb. 26: Solubilisierung von Membranen von infizierten Erythrozyten mit Triton X-100 und Triton X-114

Membranen von infizierten Erythrozyten wurden nach hypotoner Lyse sedimentiert und mit 1 % Triton X-100 (TX100) bzw. 1 % Triton X-114 (TX114) solubilisiert. Durch Zentrifugation bei 10'000 g wurde eine Überstands- (SNT) und Sedimentfraktion (P) gewonnen. PfEmp1 und Markerproteine der Fraktionen wurden im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert.



3.4.2 PfEmp1 segregiert auch im Saccharose-Gradienten mit der Wirtszellmembran

Membranen von infizierten und Trypsin-behandelten Zellen wurden auf diskontinuierliche Saccharose-Gradienten geladen und aufgetrennt. Die Segregation der Markerproteine der einzelnen Fraktionen wurde dann im Western Blot analysiert und die Proteinbanden zusätzlich densitometrisch ausgewertet (Abb. 27). Das Ergebnis zeigt, dass PfEmp1, Spektrin und Bande 3 in die gleichen Fraktionen partitionieren (Abb. 27 a, b und c; Fraktionen 4 und 5). Zwischen intrazellulärem und externem PfEmp1 (tryptisches Fragment, in Abb. 27 a mit einem Stern markiert) konnte bzgl. des Migrationsverhalten kein Unterschied festgestellt werden. Die Referenzproteine PfSbp1 für die Maurer'schen Spalten und PfExp1 für die PVM verteilten sich beide auf die Fraktionen 2-11 (Abb. 27 d und e), etwas PfSbp1 konnte auch in Fraktion 1 detektiert werden. Allerdings zeigte die densitometrische Auswertung der reaktiven Banden der beiden Referenzproteine, dass sie sich auf unterschiedliche Weise in den Fraktionen ankonzentrieren. Ca. 35 % der Gesamtintensität für PfSbp1 findet sich in den Fraktionen 4 und 5 wieder. Bei gleichförmiger Verteilung in allen 11 Fraktionen würde der Wert 18 % betragen. Für PfExp1

beträgt dieser Wert mit ca. 25 % 10 Prozentpunkte weniger und würde bei gleichmäßiger Verteilung von PfExp1 (nur 10 Fraktionen) 20 % betragen. Die densitometrische Auswertung der reaktiven PfExp1-Banden zeigt, dass relativ hohe Anteile von PfExp1 sich auch in den Fraktionen 9 und 10 wiederfinden (ca. 24 %). Für PfSbp1 beträgt dieser Wert dagegen nur ca. 14 %. In diesen Fraktionen findet also eine relative Abreicherung von PfSbp1 gegenüber einer relativen Anreicherung von PfExp1 statt. Die unterschiedlichen Migrationsverhalten der beiden Membranproteine bestätigt ihre Lokalisation in unterschiedlichen Membranen und die bereits beschriebene Wechselwirkung zwischen PfSbp1 und Spektrin (Blisnick *et al.*, 2000). Die Bestimmung des refraktären Index zeigt wie eingangs schon beschrieben, dass sich die Saccharose-Konzentration in den aufeinander folgenden Fraktionen stetig verändert und damit nicht den diskontinuierlichen Aufbau des Gradienten widerspiegelt.

3.4.3 PfEmp1 sedimentiert nach Solubilisierung in Triton X im Saccharose-Gradienten

Die Membranen von Trypsin-behandelten Zellen wurden mit 1% Triton solubilisiert und wie vorher im Dichtegradienten aufgetrennt und analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 28 für die Solubilisierung in Triton X-114 dargestellt. Nach der Zentrifugation bildete sich jenseits der Dichte von 60 % Saccharose ein Sediment, das in die Analyse mit einbezogen wurde (Abb. 28, P). Dieses enthielt gemäß der Western-Blot-Analyse PfEmp1 (Abb. 28 a). PfEmp1 war in keiner der übrigen Fraktionen des Gradienten zu detektieren; sowohl die externe, als Trypsin-Fragment (Stern) markierte Population als auch die intrazelluläre Population von PfEmp1-Molekülen sedimentierten vollständig im Gradienten. Wie PfEmp1 verhielt sich Spektrin und sedimentierte ebenfalls nahezu vollständig (Abb. 28 b). Nur ein geringer Anteil konnte auch in der Fraktion höchster Dichte detektiert werden. Das Markerprotein Bande3 segregierte sowohl in die Sedimentfraktion als auch in die Fraktionen 4-7 (Abb. 28 c). Dabei betrug der Anteil der Moleküle, die sedimentierten, ca. 25 %. Das Markerprotein PfSbp1 (Abb. 28 d) segregierte in diesem Experiment in die Fraktionen 1-10, wobei in den ersten drei Fraktionen hoher Dichte nur wenig PfSbp1 detektiert wurde (ca. 10 %). Ca. 66 % der Gesamtintensität verteilte sich auf die übrigen Fraktionen. Die übrigen 24 % des PfSbp1-Proteins sedimentierten jenseits der Fraktion höchster Dichte. Eine andere Verteilung wurde für PfExp1 (Abb. 28 e) beobachtet. 10 % der Gesamtintensität wurde in der Sedimentfraktion gemessen. Die übrigen 90 % wurden in den Fraktionen 2-11 gemessen, wobei 30% in den Fraktionen geringster Dichte, 11 und 10, detektiert wurden. Das gleiche Ergebnis wurde erzielt, wenn Membranen in 1 % Triton X-100 solubilisiert und im Dichtegradienten aufgetrennt wurden (nicht gezeigt).

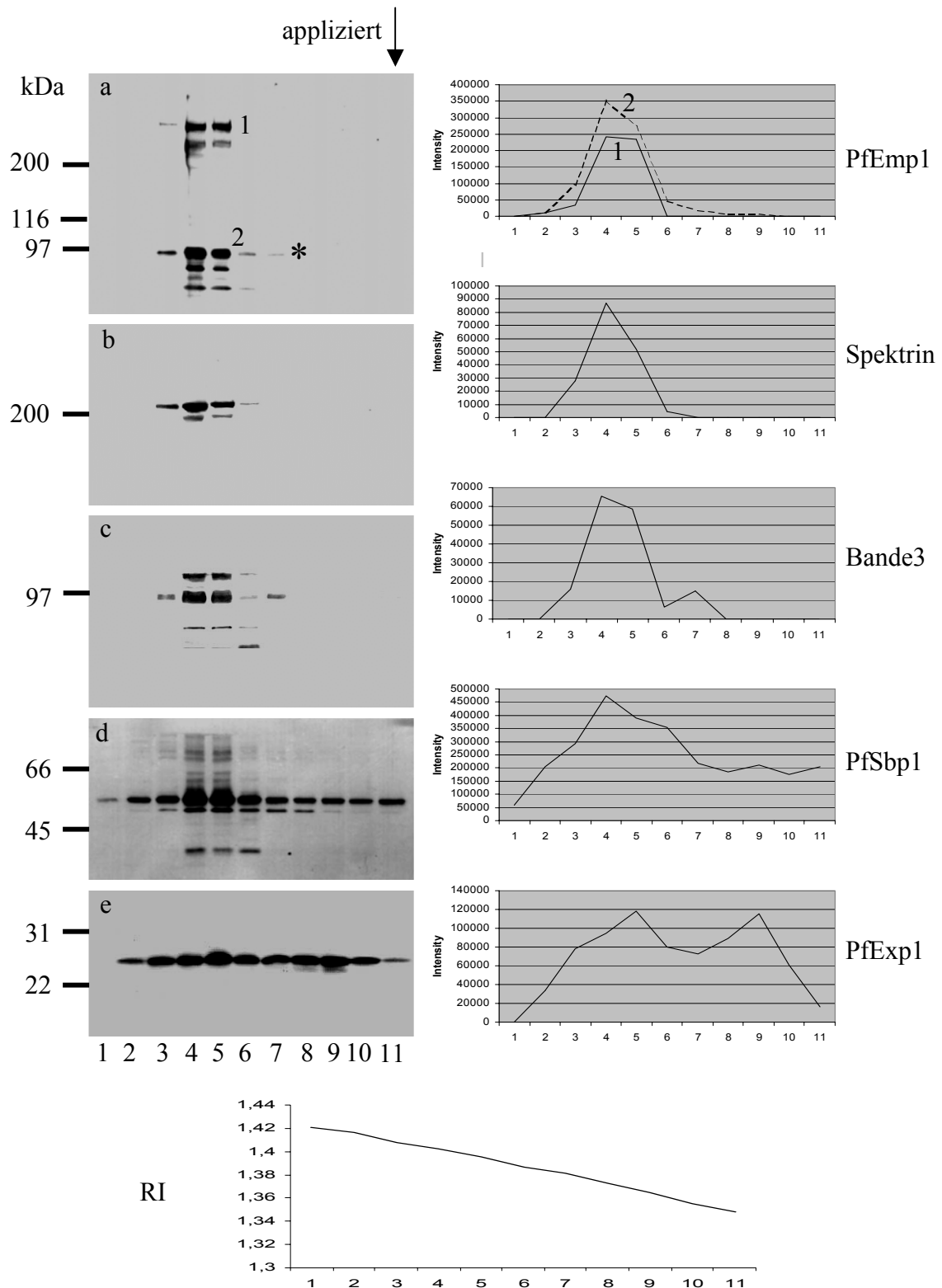


Abb. 27: Verteilung von PfEmp1 und Marker-Membranproteine im Saccharose-Gradienten

Infizierte Erythrozyten wurden mit Trypsin behandelt und in hypotoner Lösung lysiert. Membranen wurden bei 10'000 g sedimentiert, gewaschen und im Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Die Fraktionen wurden durch Austropfen gewonnen und die enthaltenen Proteine mit TCA gefällt, bevor sie im SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Filter transferiert wurden. Die Filter wurden mit polyklonalen Antisera gegen PfEmp1 (a), Spektrin (b) und PfExp1(e) getestet. Für die Detektion von Bande3 (c) und PfSbp1 (d) wurden monoklonale Antikörper verwendet. Die Bandenintensität wurde densitometrisch ausgewertet (rechts). Die Saccharose-Konzentrationen der Fraktionen wurde refraktometrisch gemessen (RI, unten). Der Stern markiert das durch die Trypsin-Behandlung der intakten Zellen erzeugte Fragment von PfEmp1.

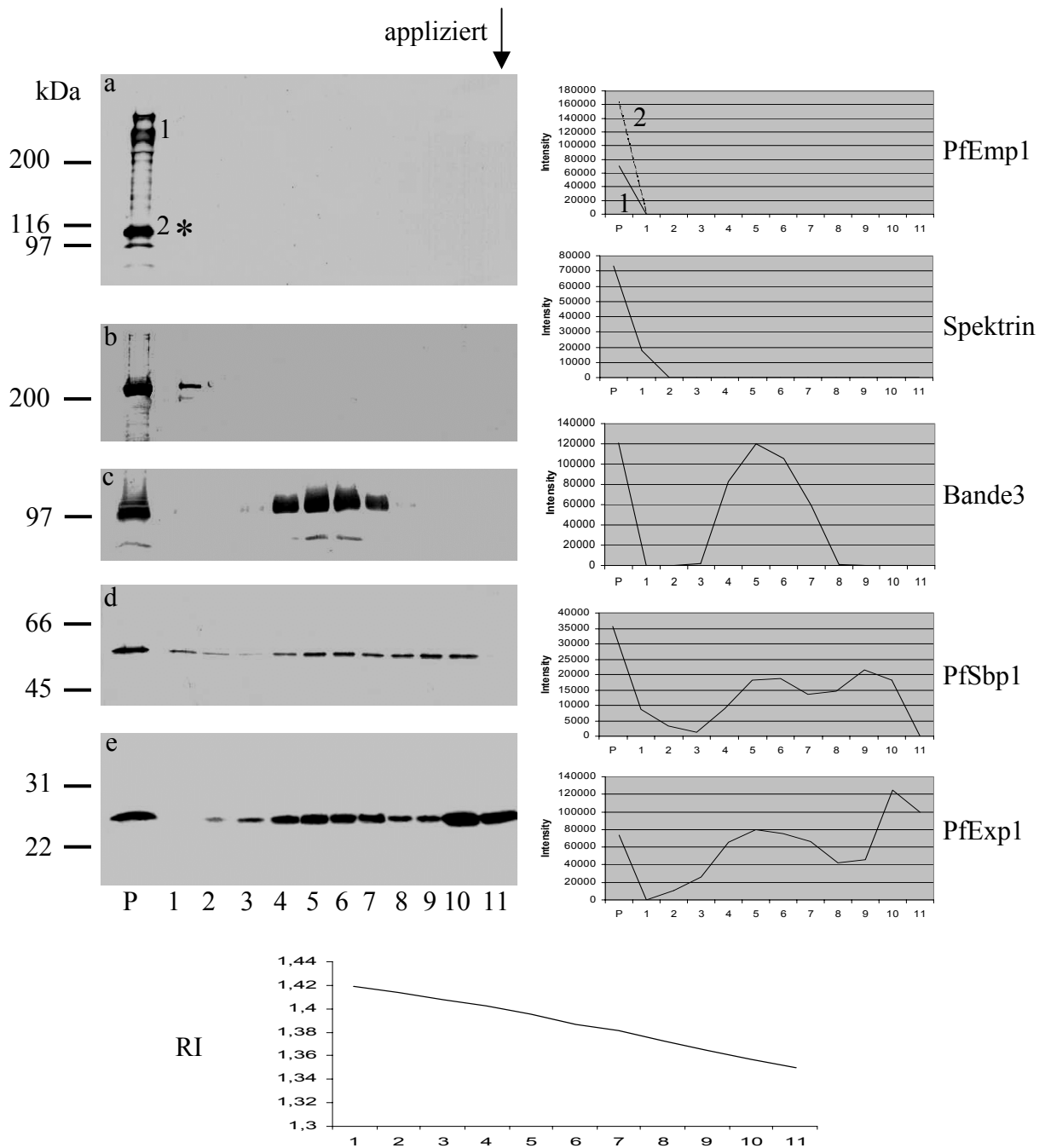


Abb. 28: Verteilung von PfEmp1 und Marker-Membranproteine im Saccharose-Gradienten nach Solubilisierung mit 1% Triton X-114

Infizierte Erythrozyten wurden mit Trypsin behandelt und in hypotoner Lösung lysiert. Die Membranen wurden bei 10'000 g sedimentiert, gewaschen und mit 1% Triton X-114 solubilisiert. Danach erfolgte die Auftrennung im Saccharose-Gradienten. Die Fraktionen wurden durch Austropfen gewonnen und die enthaltenen Proteine mit TCA gefällt, bevor sie im SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Filter transferiert wurden. Die Filter wurden mit den entsprechenden Antiseren gegen PfEmp1 (a), Spektrin (b) und PfExp1(e) getestet (s. Abb. 16). Für die Detektion von Bande3 (c) und PfSbp1 (d) wurden monoklonale Antikörper verwendet. Die Bandenintensität wurde densitometrisch ausgewertet (rechts). Die Saccharose-Konzentrationen der Fraktionen wurde refraktometrisch gemessen (RI, unten). Das Sternchen markiert das durch die Trypsin-Behandlung der intakten Zellen erzeugte Fragment von PfEmp1.

3.4.4 Fazit

Die Ergebnisse zeigen, dass PfEmp1 in 1 % Triton X-114 bzw. Triton X-100 unlöslich ist und nach Solubilisierung der Membranen mit Partikeln hoher Dichte assoziiert. Es besitzt damit ähnliche Eigenschaften wie die Proteine des Cytoskeletts, für das Spektrin in den Experimenten als Referenz verwendet wurde. Auch signifikante Anteile von Bande3 und PfSbp1 wurden im Sediment hoher Dichte detektiert. Diese Proteine sind Membranproteine und binden mit ihren cytoplasmatischen Domänen an Proteine des Cytoskeletts. Die Detektion dieser Proteine in Fraktionen, in denen Spektrin nicht nachweisbar war, zeigt, dass eine große Population dieser Markerproteine nicht im Verband mit dem Cytoskelett steht. Eine solche Population konnte für PfEmp1 nicht nachgewiesen werden. Sowohl intrazelluläres als auch membranständiges PfEmp1 scheinen mit dem Cytoskelett der Wirtszelle verbunden zu sein. Die zusätzliche Assoziation der PfEmp1-Moleküle mit Membranen konnte bisher aber weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

3.5 Intrazelluläres PfEmp1 weist für integrale Membranproteine untypische Löslichkeitseigenschaften auf

Im Folgenden sollten Möglichkeiten gefunden werden, PfEmp1 aus seiner Einbettung in das erythrozytäre Membranskelett herauszulösen, denn seine weitgehende Unlöslichkeit in wässrigen Lösungen und nicht-ionischen Detergentien zeigt andere Eigenschaften auf als die von Membranproteinen.

3.5.1 Intrazelluläres PfEmp1 ist in 0,1 M Karbonat löslich und segregiert teilweise in die wasserlösliche Phase nach Triton X-114-Partitionierung

Infizierte Erythrozyten wurden mit Trypsin behandelt, um zwischen der exponierten Population von PfEmp1 als tryptisches Fragment und der intrazellulären Population diskriminieren zu können (s. o.). Die Zellen wurden daraufhin osmotisch lysiert und bei 10'000 g zentrifugiert. Die resultierende Membranfraktion wurde dann sequentiell mit Puffern behandelt, die eine hohe Konzentration an Salzen ("Hochsalzpuffer") bzw. einen hohen pH-Wert aufwiesen ("Karbonatpuffer"). Die Membranfraktion wurde, um extrahierte Proteine eindeutig als löslich klassifizieren zu können, nach jeder Extraktion bei 100'000 g zentrifugiert. Im Western Blot wurden die Fraktionen mit Antiseren gegen PfEmp1, PfExp2 und PfExp1 analysiert (Abb. 29 A). PfExp2 war wie schon beschrieben resistent gegen die Extraktionen (Johnson *et al.*, 1994), obwohl dieses Protein über keine hinreichend

hydrophobe Region verfügt, die als integraler Membrananker in Betracht kommt (Fischer *et al.*, 1998). PfExp1 besitzt eine solche und war daher erwartungsgemäß resistent gegen die Extraktionen. Auch das tryptische Fragment von PfEmp1 (Abb. 29 A, Stern) war resistent gegen die Extraktionen. Die intrazelluläre Population des Proteins war ebenfalls resistent gegen die Extraktion mit dem Hochsalzpuffer, allerdings zu großen Anteilen löslich nach der Behandlung mit alkalischem Karbonatpuffer. Damit konnte das erste Mal im Rahmen dieser Arbeit ein Unterschied zwischen den physikalischen Eigenschaften von internem und externem PfEmp1 festgestellt werden.

Als zweites wurden Membranen von Trypsin-behandelten infizierten Zellen in einem Triton-X-114-Partitionierungsexperiment nach der Verteilung von PfEmp1, PfExp2 und PfExp1 untersucht. Triton X-114 besitzt die Eigenschaft, nach Erwärmung auf 37° C eine detergensfreie wasserlösliche Phase von der Detergensphase abzuscheiden. Membranproteine, die nur peripher mit Membranen assoziiert sind, partitionieren bevorzugt in die wässrige Phase. Die Transmembranregionen der integralen Membranproteine assoziieren dagegen direkt mit Triton X-114-Lipiden, so dass sich die Proteine in der Detergensphase anreichern. Alle drei Fraktionen wurden wieder im Western Blot analysiert (Abb. 29 B). PfExp2 reicherte sich als peripheres Membranprotein erwartungsgemäß in der wasserlöslichen Phase, PfExp1 als integrales Membranprotein in der Detergensphase an. Keines der beiden Proteine segregierte mit der Sedimentfraktion. Im Gegensatz zu PfExp1 und PfExp1 sedimentierte PfEmp1 nahezu vollständig, sowohl die vor Trypsinverdau geschützte intrazelluläre als auch die externe Population. Ein kleiner Anteil der intrazellulären PfEmp1-Moleküle partitionierte allerdings auch mit der wasserlöslichen Fraktion. Externes PfEmp1 konnte in dieser Fraktion nicht gefunden werden.

3.5.2 Fazit

In Extraktionsexperimenten zur Diskriminierung zwischen integralen und peripheren Membranproteinen sowie komplexierenden Proteinen verhielt sich die intrazelluläre Population von PfEmp1 anders als das integrale Membranprotein PfExp1 und z. T. anders als exponiertes PfEmp1. Intrazelluläre PfEmp1-Proteine ließen sich mit alkalischem Karbonatpuffer extrahieren und ein kleiner Anteil dieser Population partitionierte in die wasserlösliche Phase nach Triton X-114-Partitionierung. Die externe Population von PfEmp1, als tryptisches Fragment gekennzeichnet, erwies sich in den Extraktionsversuchen als unlöslich.

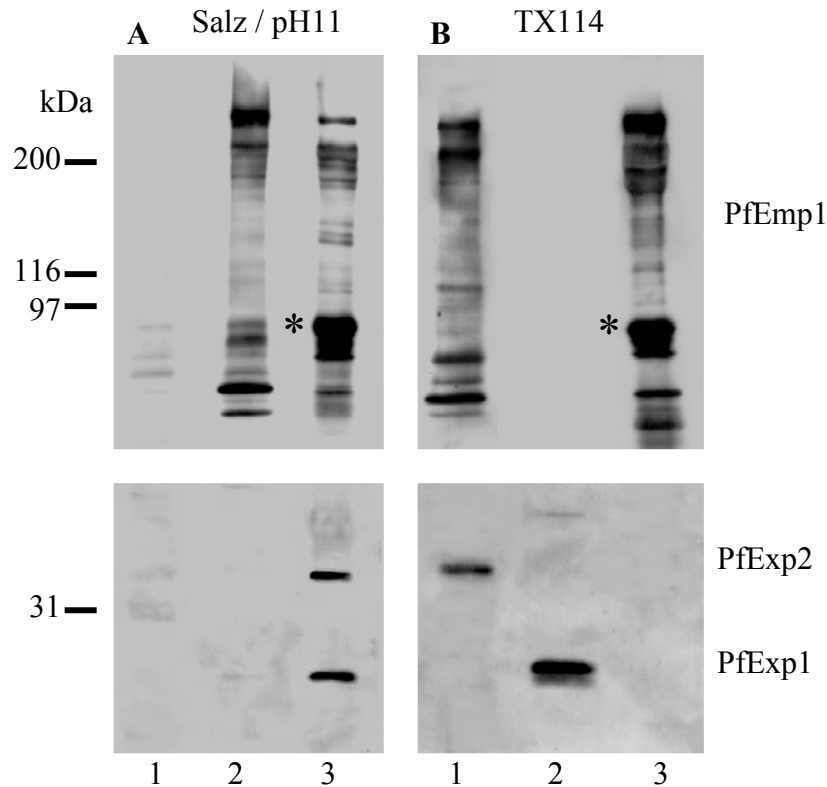


Abb. 29: Extraktionen zur Charakterisierung von Membranproteinen

A Membranen von infizierten und Trypsin-behandelten Zellen wurden sequentiell mit Extraktionspuffern behandelt. Nach jeder Extraktion erfolgte eine Ultra-Zentrifugation zur Trennung von Überstand und Sediment. Die Fraktionen wurden im Western Blot mit Antiseren gegen die ATS-Region von PfEmp1, gegen PfExp2 und PfExp1 untersucht. 1 Extrakt nach Behandlung mit "Hochsalzpuffer"; 2 Extrakt nach Behandlung mit alkalischem Karbonatpuffer; 3 Sedimentfraktion. B Membranen von infizierten und Trypsin-behandelten Zellen wurden einer Triton X-114-Partitionierung unterzogen. Unlösliche Partikel sedimentierten während der Behandlung. Die Proteine aller Fraktionen wurden im Western Blot mit Antiseren gegen die ATS-Region von PfEmp1, gegen PfExp2 und PfExp1 untersucht. 1 Proteine der wasserlöslichen Phase; 2 Proteine der Detergensphase; 3 Sedimentfraktion.

3.6 PfEmp1 interagiert nicht direkt mit den Lipiden der Wirtszellmembran

Während sich die intrazelluläre Population von PfEmp1 durch Extraktionen mit Karbonatpuffer und Triton X-114-Partitionierung näher charakterisieren ließ, konnte für die Art der Membranassoziation der als tryptisches Fragment erkennbaren membranständigen Population bisher keine Aussage gemacht werden. Es galt der Frage nachzugehen, ob auch diese Population sich durch besondere physikalische Eigenschaften auszeichnet.

3.6.1 Das tryptische Fragment von *PfEmp1* lässt sich mit Harnstoff aus der Erythrozytenmembran herauslösen

Mit Harnstoff lassen sich bei Proteinen Entfaltungsprozesse induzieren, die die Quartär- und Tertiärstrukturen zerstören. Viele Proteinaggregate können mit Harnstoff aufgelöst werden, z. B. proteinöse Einschlusskörper, die oft bei der rekombinanten Genexpression in Bakterien entstehen. Die Sekundärstrukturen der Proteine bleiben oft teilweise erhalten (Bras *et al.*, 1989; Scholtz *et al.*, 1995). Harnstoff interkaliert reversibel in Membranen, ohne Membranproteine aus ihrem Verband mit Lipiden herauszulösen (Xu und Colombini, 1996). An dieser Stelle wurde das Verhalten von *PfEmp1* und integralen Membranproteinen nach Behandlung mit Harnstoff untersucht.

Zunächst wurde der Einfachheit halber nur das tryptische Fragment von *PfEmp1*, das die *PfEmp1*-Population auf der Oberfläche der Wirtszelle repräsentiert, untersucht. Eine Analyse aller *PfEmp1*-Populationen war an dieser Stelle noch nicht geplant. Infizierte Erythrozyten wurden mit Trypsin behandelt, durch Einfrieren und Auftauen lysiert und bei 10'000 g sedimentiert. Das Einfrieren und Auftauen diente der Zerstörung aller internen Kompartimente und der Entfernung aller löslichen Proteasen (z. B. aus der Nahrungsvakuole) nach erfolgter Zentrifugation. Die Membranfraktion wurde dann in 8 M Harnstoff solubilisiert und nach der Inkubationszeit gegen verschiedene niedrigere Harnstoff-Konzentrationen dialysiert. Die Dialysate wurden bei 10'000 g zentrifugiert und in Überstand- und Sedimentfraktion getrennt. Die Proteine der Überstände wurden gefällt und zusammen mit denen der Sedimentfraktion im Western Blot unter Verwendung von Antikörpern gegen die cytoplasmatische Domäne von *PfEmp1*, gegen *Bande3* und *PfExp1* analysiert (Abb. 30).

Das tryptische *PfEmp1*-Fragment wurde ohne Dialyse, d. h., bei einer Konzentration von 8 M Harnstoff, nur im Überstand detektiert. *Bande3* und *PfExp1* verteilten sich jeweils zur Hälfte auf beide Fraktionen (Abb. 30, Spuren 1 und 2). Es zeigte sich weiter, dass in Bezug auf die Verteilung der Proteine zwischen den Dialysen gegen verschiedene Harnstoffkonzentrationen keine erkennbaren Unterschiede auftraten (Abb 30, Spuren 3-8). Sowohl bei Dialyse gegen 1M, 0,5 M als auch 0,1 M Harnstoff wurde *Bande3* ausschließlich und *PfExp1* zu einem großen Anteil in den Sedimentfraktionen detektiert. Im Gegensatz dazu wurde die Mehrzahl der trunkierten *PfEmp1*-Moleküle in den Überständen detektiert. Die Verringerung der Harnstoffkonzentration von 8 M auf bis zu 0,1 M führte dazu, dass ein signifikanter Anteil der trunkierten *PfEmp1*-Moleküle in den Sedimentfraktionen zu finden war.

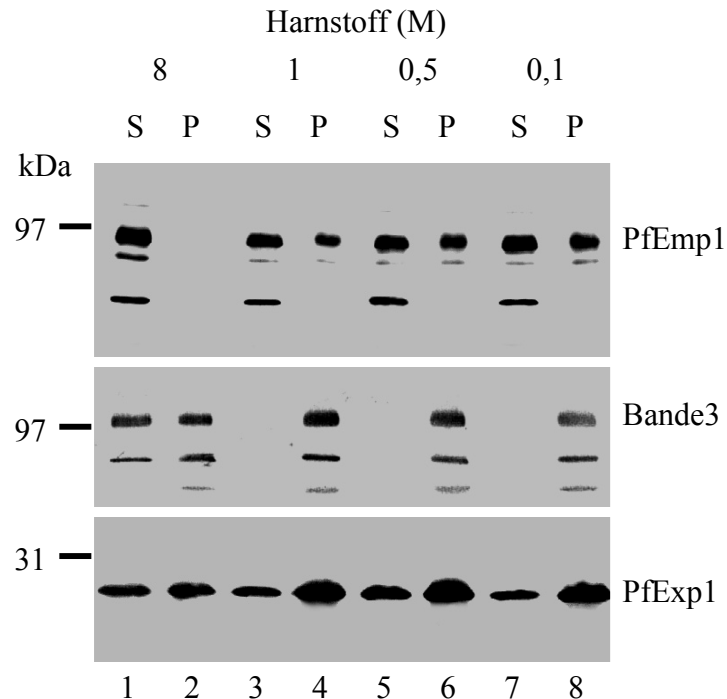


Abb. 30: Harnstoffextraktion und -dialyse von Membranen von Trypsin-behandelten infizierten Zellen

Infizierte Erythrozyten wurden mit Trypsin behandelt und anschließend durch Einfrieren und Auftauen lysiert. Die Membranen wurden durch Zentrifugation bei 10'000 g gewonnen und in 8 M Harnstoff solubilisiert. Danach wurden sie gegen 1 M, 0,5 M und 0,1 M Harnstoff dialysiert (3-8). Eine Kontrollfraktion wurde nicht dialysiert (1, 2). Nach der Dialyse wurden alle Fraktionen durch erneute Zentrifugation in Überstand- (S) und Sedimentfraktionen (P) getrennt. Die Proteine aller Fraktionen wurden im SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Filter transferiert. Die Filter wurden mit Antiseren gegen die ATS-Region von PfEmp1 und gegen PfExp1 getestet. Für die Detektion von Bande3 wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet.

3.6.2 Auch intaktes PfEmp1 ist mit Harnstoff extrahierbar

Der unter Abb. 30 gezeigte Vorversuch wurde nun mit dem Ziel wiederholt, die Löslichkeitseigenschaften von Gesamt-PfEmp1, intrazellulärem PfEmp1 und weiteren Marker-Membranproteinen zu untersuchen. Da zwischen den Dialysen gegen Harnstoffkonzentrationen von 1 bis 0,1 M in Bezug auf die Löslichkeit der getesteten Proteine keine Unterschiede erkennbar waren, wurde nun nur gegen die geringste Konzentration von 0,1 M Harnstoff dialysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 31 wiedergegeben. Als Marker für die Erythrozytenmembran wurden diesmal die Glykophorine herangezogen, die über eine Transmembranhelix verankert sind und in dieser Experimentenreihe dadurch geeignetere Marker-Membranproteine sind als Bande 3, welches 14 Transmembranhelices besitzt (Ott und Lingappa, 2002). Auch PfSbp1, das als integrales Membranprotein der Maurer'schen Spalten

beschrieben ist (Blisnick *et al.*, 2000), wurde hier überprüft. Das Ergebnis aus Abb. 30 wurde bestätigt. PfExp1, PfSbp1 und die Glykophorine wurden größtenteils in den Sedimentfraktionen detektiert. Dabei war der Anteil der Proteine, die im Überstand gefunden wurden, bei PfSbp1 am größten. Gesamt-PfEmp1, intrazelluläres und das Trypsinfragment wurden dagegen hauptsächlich im Überstand detektiert.

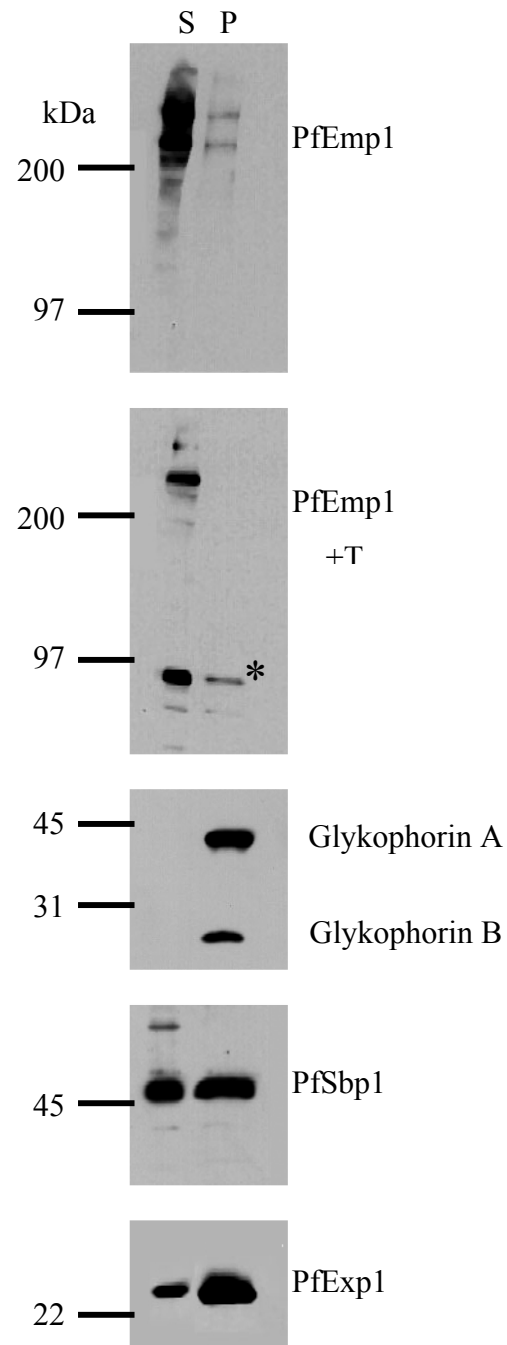


Abb. 31: Harnstoffextraktion und -dialyse von Membranen von infizierten Zellen

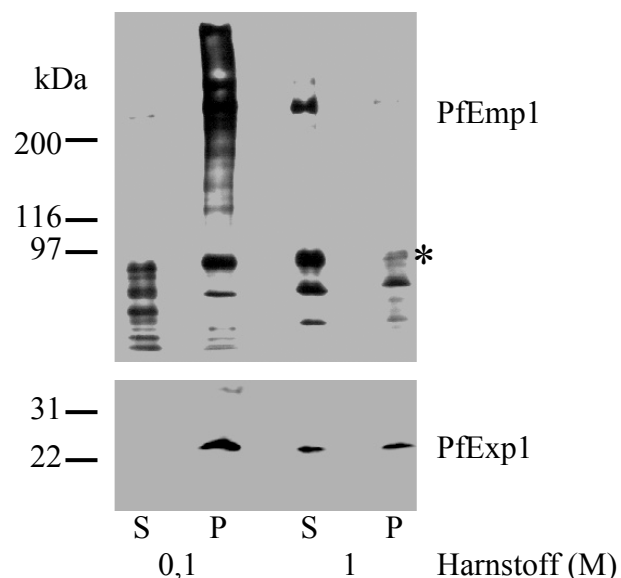
Infizierte Erythrozyten wurden durch Einfrieren und Auftauen lysiert. Die Membranen wurden durch Zentrifugation gewonnen und in 8 M Harnstoff solubilisiert. Danach wurden sie gegen 0,1 M Harnstoff dialysiert. Als Kontrolle zur Untersuchung der exponierten PfEmp1-Population wurden infizierte Erythrozyten zunächst mit Trypsin behandelt (+T) und dann wie oben prozessiert. Nach der Dialyse wurden alle Fraktionen durch erneute Zentrifugation in Überstand- (S) und Sedimentfraktionen (P) getrennt. Die Proteine aller Fraktionen wurden im SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Filter transferiert. Die Filter wurden mit Antiseren gegen die ATS-Region von PfEmp1 und gegen PfExp1 getestet. Für die Detektion der Glykophorine und PfSbp1 standen monoklonale Antikörper zur Verfügung. Das tryptische Fragment von PfEmp1 ist mit einem Sternchen markiert.

3.6.3 Nach Harnstoff-Extraktion und Dialyse sedimentiert PfEmp1 bei 100'000 g

Im folgenden sollte überprüft werden, ob die mit Harnstoff behandelten PfEmp1-Moleküle tatsächlich lösliche Proteine sind, d. h. ob sie auch nach der Zentrifugation bei 100'000 g im Überstand zu detektieren sind. Das Experiment wurde wie beschrieben wiederholt und die Membranen nach Dialyse in der Ultrazentrifuge bei 100'000 g zentrifugiert. Das Ergebnis ist in Abb. 32 dargestellt. Der größte Teil von PfEmp1 -sowohl das die membranständige Population repräsentierende tryptische Fragment als auch die intrazellulären, intakten Moleküle- wurde in der Sedimentfraktion zusammen mit den anderen Marker-Membranproteinen gefunden, wenn gegen 0,1 M Harnstoff dialysiert wurde. Auch PfExp1 sedimentierte vollständig. Wurde stattdessen gegen 1 M Harnstoff dialysiert, verblieb nach der Zentrifugation bei 100'000 g das meiste PfEmp1 beider Populationen im Überstand. PfExp1 verteilte sich dann ca. zur Hälfte auf die Überstand- und die Sedimentfraktion.

Abb. 32: Ultra-Zentrifugation bei verschiedenen Dialysekonzentrationen

Experiment wie in Abb. 21. Es wurde gegen 2 Harnstoffkonzentrationen dialysiert: 0,1 und 1 M. Danach wurden die Dialysate bei 100'000 g zentrifugiert. Die Verteilung von PfExp1 und PfEmp1 in Überstände und Membranfraktionen wurde im Western Blot mit den entsprechenden Antisera analysiert. Das Trypsinfragment von PfEmp1 ist mit einem Sternchen markiert.



3.6.4 PfEmp1 segregiert mit Fraktionen geringer Dichte nach Harnstoff-Behandlung

Die Ergebnisse aus Abb. 32 zeigen, dass bei einer Harnstoff-Konzentration von 1 M, gegen die dialysiert wird, die Zentrifugalkraft von 100'000 g nicht ausreicht, PfExp1 vollständig zu sedimentieren. Dagegen sedimentieren sowohl PfExp1 als auch PfEmp1 nahezu vollständig, wenn die Harnstoff-Konzentration auf 0,1 M reduziert wird. Möglicherweise renaturiert PfEmp1 wieder bei ausreichender Reduktion der Harnstoffkonzentration und bildet Komplexe mit anderen Proteinen, die bei 100,000 g sedimentieren. Für eine differenzierte Untersuchung der Löslichkeit der auf der Oberfläche von infizierten Erythrozyten exponierten PfEmp1-Moleküle nach Dialyse gegen 0,1 M

Harnstoff wurden wieder Saccharose-Gradienten hernagezogen, um die Zentrifugalkraft durch steigende Dichte des Mediums und längere Wegstrecke dosiert zum Einsatz zu bringen. Dem Gradientenmedium wurde Harnstoff in der Dialysekonzentration von 0,1 M zugegeben. Infizierte Zellen wurden für die autoradiographische Analyse der Trenneigenschaften des mit Harnstoff modifizierten Gradienten mit [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert. Für die Western-Blot-Analyse wurde keine solche Markierung der infizierten Erythrozyten durchgeführt. Die nicht-markierten Zellen wurden stattdessen mit Trypsin behandelt und getrennt von den radioaktiven Zellen präpariert. Nach der Harnstoff-Behandlung und Dialyse der Membranen (s. oben) wurden die solubiliserten Membranen in dem neuen Saccharose-Gradienten aufgetrennt und die Proteine der Fraktionen gefällt. Die radioaktiven Proteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt, das Gel getrocknet und die markierten Proteine auf Röntgenfilm abgebildet (Abb. 33). Die nicht-modifizierten Proteine wurden im Western Blot mit Antiseren gegen Markerproteine und PfEmp1 analysiert (Abb. 34).

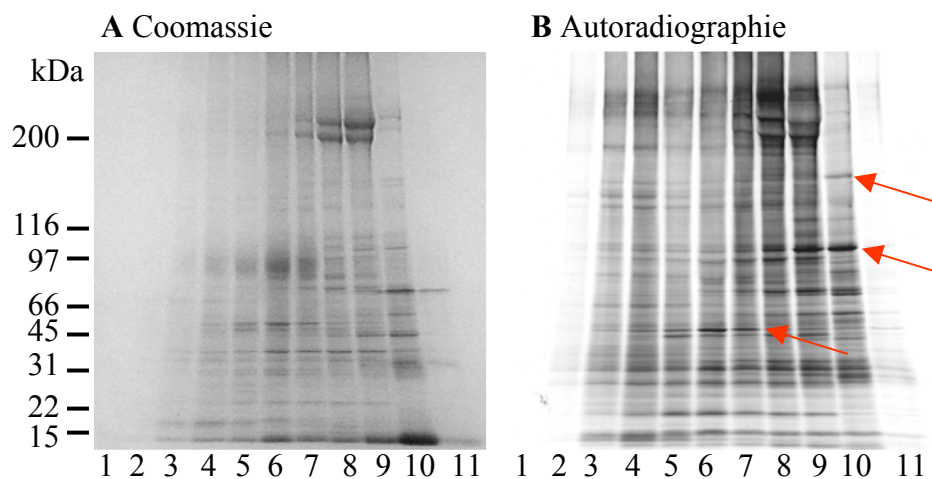


Abb 33: Coomassie-Färbung und Autoradiographie von Membranproteinen nach Harnstoff-Behandlung und Trennung in der Dichtegradientenzentrifugation
Infizierte Erythrozyten wurden in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert und wie unter Abb. 23 beschrieben präpariert. Die Proteine wurden in einem 5–15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (a). Danach wurde das Gel getrocknet und die radioaktiven Proteine auf Röntgenfilm abgebildet (b). Beispiele für Proteine, die sich ganz oder teilweise voneinander trennten, sind mit einem roten Pfeil markiert.

Viele der radioaktiven Proteine wurden in den Fraktionen geringerer Dichte (7-11) detektiert (Abb. 33 B). Spektrin, in dem Coomassie-gefärbten Gel (Abb. 33 A) als markante Doppelbande bei 200 kDa erkennbar, wurde in diesen Fraktionen ebenfalls detektiert. Insgesamt zeigten sich für den mit Harnstoff modifizierten Gradienten ähnliche Trenneigenschaften wie schon in Abb. 20 beobachtet. Im Vergleich zu Abb. 27 zeigte

PfEmp1 ein neues Migrationsverhalten. Gesamt-PfEmp1 (Abb. 34 a) segregierte mit den Fraktionen 6-10, also Fraktionen geringerer Saccharose-Dichte. Zwischen den beiden schon in Abb. 19 detektierten Größenklassen zeigte sich dabei ein geringfügiger Unterschied. Die PfEmp1-Moleküle der kleineren Größe zeigten die Tendenz, in den leichteren Fraktionen 8-10 zu akkumulieren (65 % der Bandenintensität), während die PfEmp1-Moleküle der höhermolekularen Klasse bevorzugt mit den dichteren Fraktionen 8-10 segregierten (90 % der 300 kDa großen PfEmp1-Proteine in den Fraktionen 8 und 9, 90 % der 250 kDa großen PfEmp1-Proteine in den Fraktionen 9 und 10). Für die intrazelluläre, d. h. die intakten hochmolekularen Moleküle, wurde dieselbe Beobachtung gemacht wie in Abb. 34 a. Das tryptische Fragment von PfEmp1 segregierte mit den Fraktionen 6-11, wurde also auch in der leichtesten Fraktion detektiert (Abb. 34 b). Das Markerprotein für das Zytoskelett, Spektrin, zeigte ein ähnliches Migrationsverhalten wie PfEmp1 und segregierte hauptsächlich mit den Fraktionen 7-9 (71 % der spezifischen Intensität). Ein deutlicher Anteil der Spektrin-Moleküle wurde auch in den Fraktionen 5 und 6 gefunden (24%). Geringe Spuren wurden darüber hinaus auch in den Fraktionen 10 und 11 detektiert (5 %; Abb. 34 c). Die Glykophorine A und B, die in diesem Experiment als Referenzproteine der Erythrozytenmembran getestet wurden, segregierten im Vergleich zu PfEmp1 und Spektrin relativ fokussiert mit den Fraktionen 5 und 6 (Abb. 34 d). PfExp1 verteilte sich auf die Fraktionen 2-10 und zeigte damit wieder ein diffuses Segregationsverhalten. Allerdings reichert sich mit ca. 70 % der PfExp1-spezifischen Intensität die Mehrzahl der Moleküle in den Fraktionen 6-10 an (Abb. 34 e).

3.6.5 Lipidanalyse der Fraktionen nach Harnstoff-Solubilisierung und Dichtegradientenzentrifugation

Die Verteilung von PfEmp1 und den Glykophorinen in den Fraktionen aus Abb. 34 wurde mit einer Verteilung der Lipide korreliert. Dieses Experiment sollte überprüfen, ob die Proteine der leichten Fraktionen, in denen PfEmp1 detektiert wurde, mit Lipiden assoziiert sind. Dazu wurden die Fraktionen 2-6 und 7-11 jeweils zusammengefaßt und ihre Proteinkonzentration bestimmt. Die Proteinmenge der beiden zusammengefaßten Fraktionen wurde bestimmt, die Fraktionen danach, um die Dichte zu verringern, mit Wasser verdünnt und die Membranen schließlich bei 100'000 g sedimentiert. Die Gesamt-Lipide der Membranen wurden dann in einem Gemisch aus Chloroform und Methanol extrahiert und zu dem Proteingehalt äquivalente Mengen in der Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (Abb. 35, 3 und 4). Für den Vergleich der Lipidmuster wurden die Membranen von nicht-infizierten

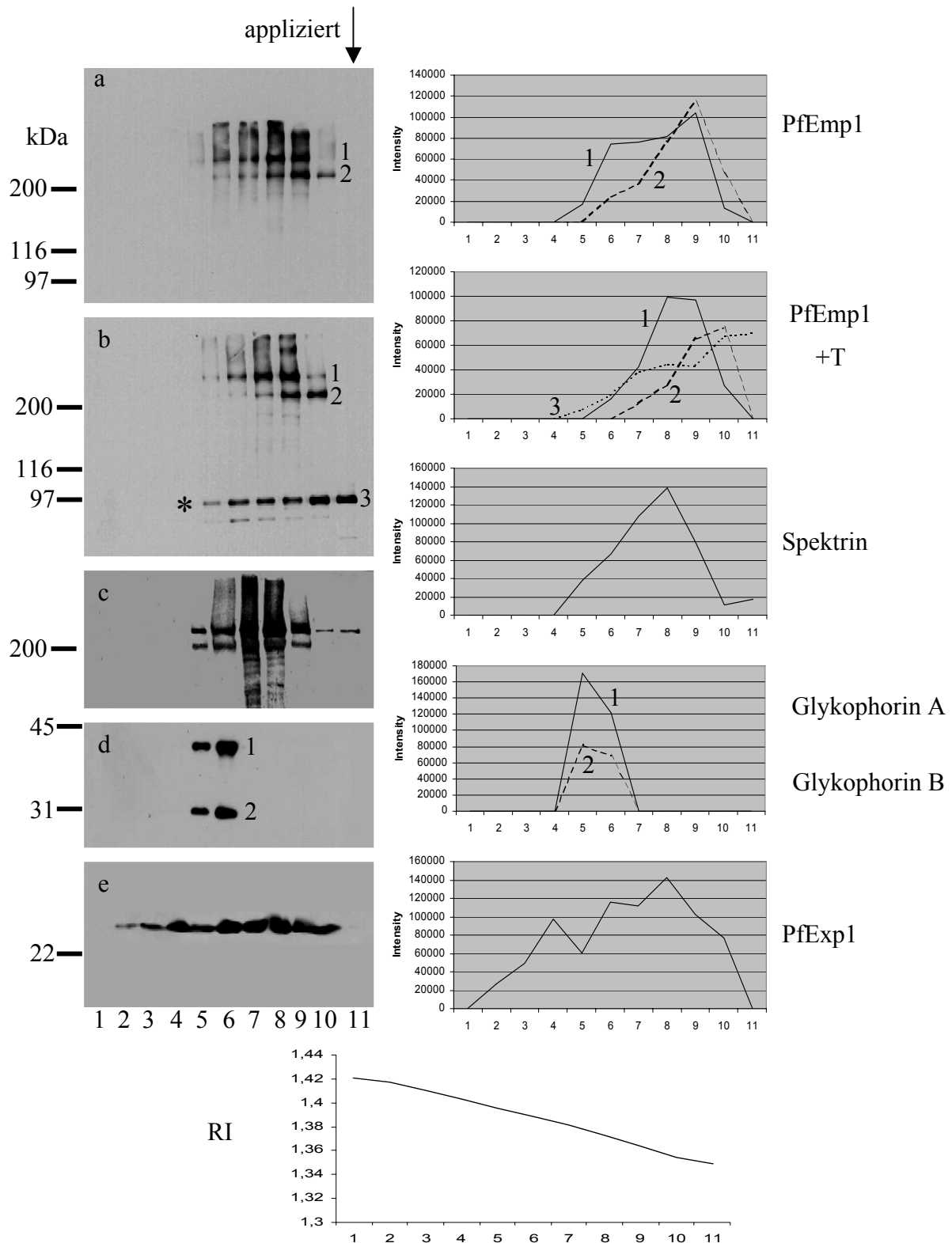


Abb. 34: Verteilung von PfEmp1 und Marker-Membranproteinen im Saccharose-Gradienten nach Solubilisierung mit 8 M Harnstoff

Infizierte Erythrozyten wurden mit Trypsin (+T) behandelt bzw. unbehandelt gelassen und durch Einfrieren und Auftauen lysiert. Membranen wurden sedimentiert, gewaschen und in 8 M Harnstoff solubilisiert. Danach erfolgte die Auftrennung im Saccharose-Gradienten. Gewinnung der Fraktionen und Analyse der Proteine wie in Abb. 18. Für die Detektion der Glykophorine A und B (d) wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet. Die Bandenintensität wurde densitometrisch ausgewertet (rechts). Die Saccharose-Konzentrationen der Fraktionen wurde refraktometrisch gemessen (RI, unten). Das Sternchen markiert das durch die Trypsin-Behandlung der intakten Zellen erzeugte Fragment von PfEmp1 (b).

und infizierten Erythrozyten präpariert (s. Abb. 19), wie oben beschrieben standardisiert und analysiert (Abb. 35, 1 und 2).

Die Analyse der Lipide von nicht-infizierten Erythrozyten zeigte, dass vor allem Cholesterin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylethanolcholin, Phosphatidylethanolserin und Sphingomyeline nachweisbar waren. Bei gleicher Proteinmenge als Standard wurden bei den infizierten Erythrozyten zusätzlich Triglyceride gefunden. Während die Cholesterinmenge vergleichbar war, zeigte sich eine höhere Abundanz und größere Heterogenität für die übrigen Lipidklassen bei infizierten Erythrozyten. Bei der Lipidanalyse der Fraktionen zeigte sich, dass beinahe die Gesamtheit der Lipide mit den Fraktionen 2-6 des Gradienten aus Abb. 34 rekrutiert wurden. Nur Spuren von Cholesterin und Triglyceriden wurden auch in den Fraktionen 7-11 nachgewiesen.

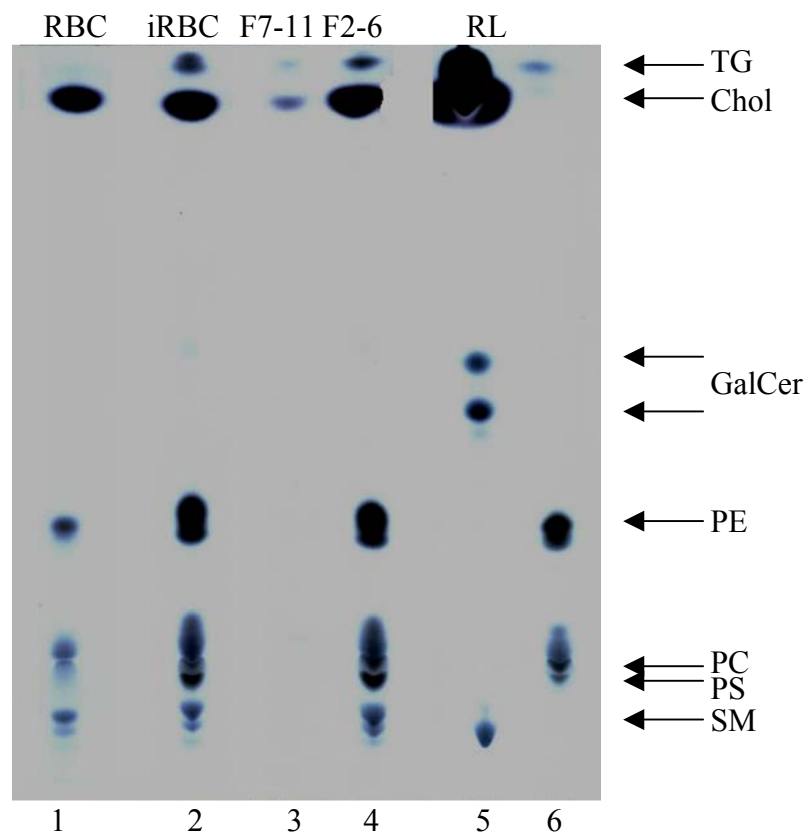


Abb. 35: Lipidanalyse der Fraktionen 7-11 und 2-6 aus Abb. 34

Die Membranen von nicht-infizierten und infizierten Erythrozyten wurden durch Lyse und Sedimentation gewonnen. Die Membranen der Fraktionen 7-11 und 2-6 aus Abb. 23 wurden durch Verdünnung und Sedimentation gewonnen. Bei gleicher Proteinmenge wurden die Lipide der einzelnen Fraktionen extrahiert und in der Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (1-4). Für die Identifikation der Lipidklassen wurden Referenzlipide (RL) als Standards verwendet (5 und 6). TG, Triglycerole; Chol, Cholesterol; GalCer, Galaktocerebroside; PE, Phosphatidylethanolamin; PC, Phosphatidylethanolcholin; PS, Phosphatidylethanolserin; SM, Sphingomyeline

3.6.6 Fazit

Die Behandlung der Membranen von infizierten Erythrozyten mit Harnstoff erwies sich als geeignete Methode, intrazelluläres und membranständiges PfEmp1 aus seiner Einbettung in der Wirtszellmembran herauszulösen. Die Experimente zeigten, dass die hier getesteten integralen Membranproteine, nämlich PfExp1, PfSbp1, Glykophorine und Bande3 weitgehend resistent gegen die Behandlung mit Harnstoff sind. Die Analyse der Lipide der untersuchten Fraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation zeigte, dass die Fraktionen geringerer Dichte, in denen PfEmp1 nachgewiesen wurde, fast frei von Lipiden waren.

3.7 Ein Versuch, das tryptische Fragment von PfEmp1 mit dem MALDI-TOF-Verfahren zu charakterisieren

Das durch Trypsinbehandlung von intakten infizierten Erythrozyten erzeugte PfEmp1-Fragment von ca. 90 kDa (Abb. 15) sollte wegen seiner ungewöhnlichen Größe (berechnet nur 45 kDa) einer MALDI-TOF-Analyse unterzogen werden. Die Zielvorgabe dabei war, das tryptische Fragment von PfEmp1 als Proteinspezies in einem Coomassie-gefärbten Gel sichtbar zu machen, zu isolieren und seine Größe mit dem MALDI-TOF-Verfahren exakt zu bestimmen.

3.7.1 Die Abundanz der Oberflächenpopulation von PfEmp1 reicht für eine MALDI-Charakterisierung nicht aus

Infizierte Erythrozyten wurden mit Trypsin behandelt, durch Einfrieren und Auftauen lysiert und die Membranen sedimentiert. Die Membranen wurden gründlich gewaschen, um kontaminierende lösliche Proteine zu entfernen. Für einen ersten Versuch wurde die Membranfraktion von 10^9 infizierten Erythrozyten mit Solubilisierungspuffer extrahiert und der Extrakt mittels Rehydratisierung auf immobilisierte pH-Gradienten (IPG) geladen. Danach erfolgte die zweidimensionale Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (IP) und ihrem Molekulargewicht (MG). Die in den SDS-Gelen aufgetrennten Proteine wurden entweder mit Coomassie gefärbt oder auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Die Membranen wurden dann mit polyklonalen Antiseren gegen die ATS-Region von PfEmp1 und PfExp1 getestet (Abb. 36 A). Als Kontrolle wurden nicht-behandelte Zellen der gleichen Prozedur unterzogen (Abb. 36 B).

Anhand des Coomassie-gefärbten SDS-Gels zeigte sich, dass die Membranproteine bevorzugt in den sauren Bereich des pH-Gradienten migrierten. In der Fraktion der Membran-

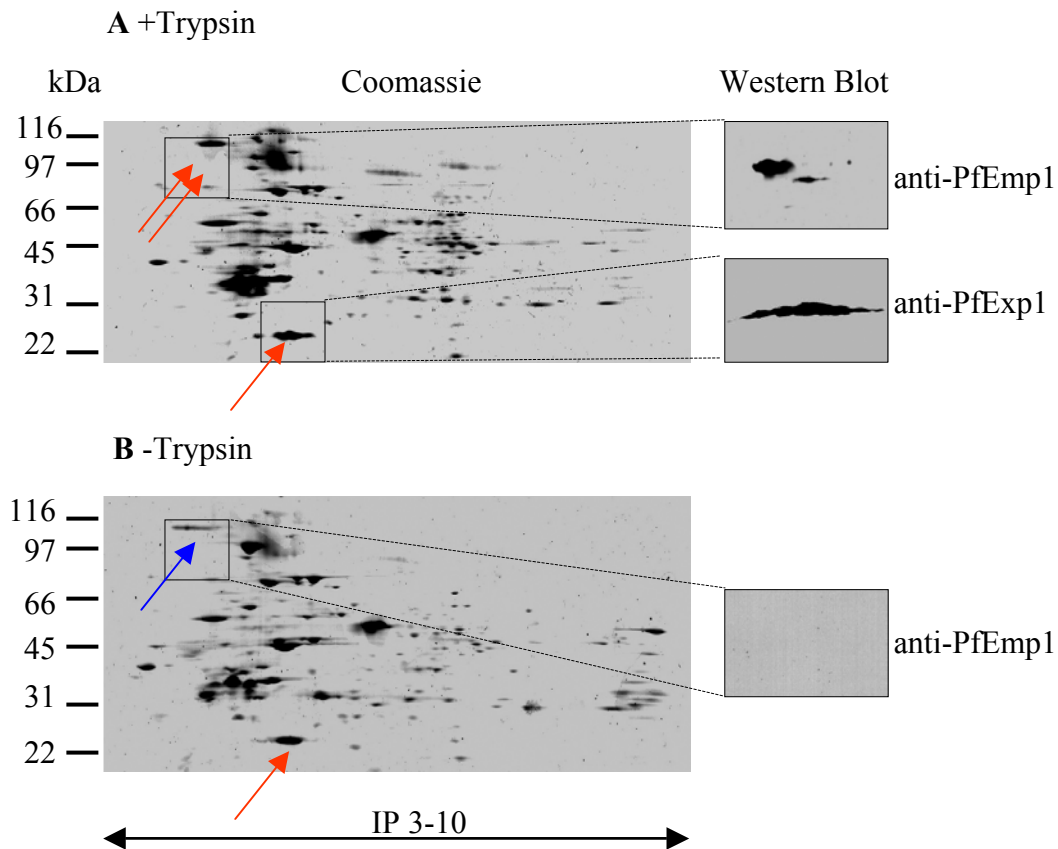


Abb. 36: 2-dimensionale Auftrennung von Membranproteinen

10^9 infizierte Erythrozyten wurden mit Trypsin (+Trypsin) behandelt und durch Einfrieren und Auftauen lysiert. Die Membranen wurden sedimentiert, gewaschen und die Membranproteine mit Solubilisierungspuffer extrahiert. Der Extrakt wurde in der 2-dimensionalen Gelelektrophorese unter Verwendung von immobilisierten pH-Gradienten (IP 3-10) aufgetrennt. Die Proteine wurden entweder mit Coomassie gefärbt (links) oder auf Nitrocellulose transferiert und mit polyklonalen Antisera gegen PfEmp1 und PfExp1 getestet (rechts). Als Kontrolle wurden auch Membranproteine von unbehandelten infizierten Erythrozyten (-Trypsin) aufgetrennt und analysiert (b). Die roten Pfeile markieren die Positionen der mit dem Antiserum reaktiven Proteine in den Coomassiegefärbten Gelen. Der blaue Pfeil markiert die Position, an der man das tryptische Fragment von PfEmp1 nach der Trypsinbehandlung von infizierten Erythrozyten erwarten würde. Für PfExp1 wurde unter b (roter Pfeil) kein Immunblot-Nachweis durchgeführt.

proteine von Trypsin-behandelten Zellen wurden zwei PfEmp1-spezifische reaktive Proteine von ca. 90 und 85 kDa detektiert. Das größere Fragment war erheblich abundanter als das kleinere und zeichnete sich durch einen etwas saureren IP aus. Der theoretischen IP des tryptischen Fragmentes, vorausgesetzt, die extrazelluläre Domäne des Proteins wird durch die Trypsin-Behandlung vollständig entfernt, beträgt für die in Tab. 2 aufgeführten PfEmp1-Sequenzen ungefähr 5 und stimmt mit dem in Abb. 36 Beobachteten überein. Die Lumineszenz der beiden reaktiven Proteine verteilte sich heteromorph und schien ihren Ursprung in vielen nahe beieinander gelegenen Foci zu nehmen. Diese konnten allerdings weder durch die Verkürzung der Belichtungszeit herausgestellt noch Coomassie-gefärbten Protein-Spezies zugeordnet werden (Abb. 36 A). PfExp1 ließ sich in der Membranfraktion

ebenfalls detektieren und einer Proteinspezies im SDS-Gel eindeutig zuordnen (Abb. 36 A). Im Gegensatz zu der PfEmp1-spezifischen Lumineszenz verteilte sich die PfExp1-spezifische über einen größeren pH-Bereich und isomorph, d. h. mit gleichmäßiger Intensität. Unter aufgetrennten Membranproteinen von nicht-trypsinierten infizierten Erythrozyten ließ sich im Western Blot kein PfEmp1-Fragment nachweisen (Abb. 36 B). In vielen unabhängigen Experimenten wurde beobachtet, dass der Transfer von großen Proteinen aus der ersten in die zweite Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese ineffizient und die Darstellung hoch-molekularer Proteinspezies nur bei sehr abundanten Proteinen wie Spektrin beispielsweise möglich ist (persönliche Mitteilung Julius Nyalwidhe). Aus diesem Grund ist es nicht überraschend, dass „volle-Länge“-PfEmp1 in diesem Experiment nicht detektiert wurde.

Offenbar reichte die zu 10^9 infizierten Zellen äquivalente Membranproteinmenge nicht aus, um mit Coomassie-Färbung trunkierte PfEmp1-Spezies sichtbar zu machen. Eine Verdopplung der Membranmenge resultierte nicht in einer für die Coomassie-Visualisierung von PfEmp1 ausreichenden Abundanz der Proteinspezies nach der 2-dimensionalen Auftrennung (nicht gezeigt). Das Volumen des Membranprotein-Solubilisierungspuffers ist durch die Aufnahmekapazität des IPG-Streifens bestimmt, so dass die eingesetzte Membranmenge nicht weiter erhöht werden konnte. Für einen letzten Versuch, das tryptische Fragment von PfEmp1 direkt im SDS-Gel sichtbar zu machen, wurde der experimentelle Ansatz von Kapitel 3.6.4 herangezogen. PfEmp1 reichert sich nach Harnstoff-Behandlung und Dichtegradienten-zentrifugation in den Fraktionen geringer Dichte an. Diese Eigenschaft sollte genutzt werden, um Proteine der leichten Fraktionen in Mengen, die das Zelläquivalent von 10^9 übertreffen, in der 2-dimensionalen Gelelektrophorese aufzutrennen.

5×10^9 infizierte Erythrozyten wurden wie unter 3.6.4 beschrieben mit Trypsin behandelt und in der Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Die Proteine der Fraktionen 7-11 (s. Abb. 34) wurden präzipitiert und in 2D-Solubilisierungspuffer extrahiert. Die zweidimensionale Auftrennung der Proteine erfolgte wie für Abb. 36. Diesmal wurden die Gele nicht mit Coomassie gefärbt, sondern wegen der höheren Sensitivität mit Silber. 10 % der Proteine ($\sim 5 \times 10^8$ infizierte Zellen) wurden für die Immundetektion von PfEmp1 in einem zweitem Ansatz aufgetrennt (Abb. 37). Im Western Blot wurden drei PfEmp1-spezifische Signale bei 90, 85 und 50 kDa detektiert. Die Signale konnten wie bei den Coomassie-gefärbten Gelen keinen Silber-gefärbten Proteinen zugeordnet werden. Die Versuche, detaillierte molekulare Informationen über das tryptische Fragment mittels MALDI-TOF-Verfahren zu gewinnen, waren damit gescheitert und wurden eingestellt.

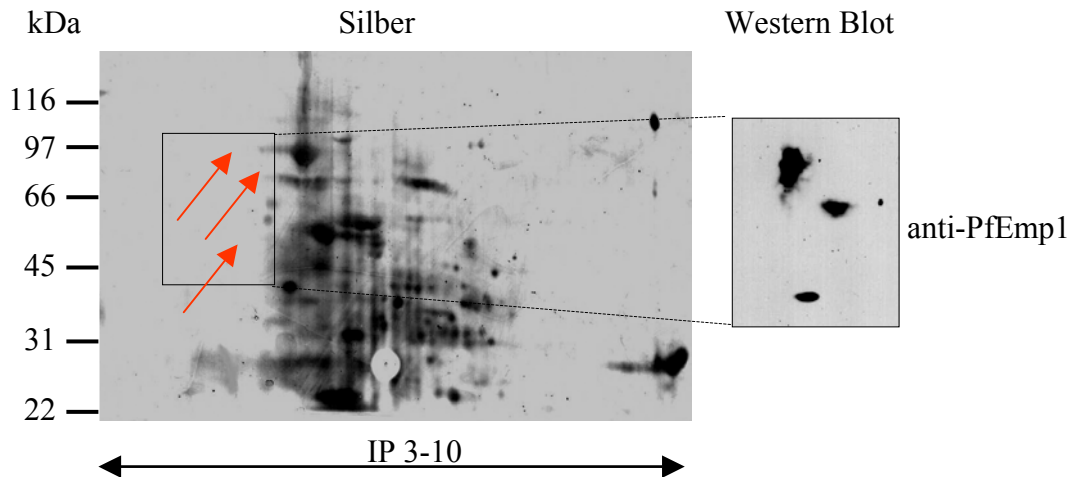


Abb. 37: 2-dimensionale Auftrennung von Membranproteinen nach Harnstoff-Behandlung
 5×10^9 infizierte Erythrozyten wurden mit Trypsin behandelt und durch Einfrieren und Auftauen lysiert. Die Membranen wurden sedimentiert, gewaschen und mit Harnstoff behandelt (s. Abb. 31). Danach wurden die Membranen wie in Abb. 34 beschrieben in der Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und die Proteine der Fraktionen 7-11 gefällt. Die gefällten Membranproteine wurden mit 2D-Solubilisierungspuffer extrahiert. Der Extrakt wurde in der 2-dimensionalen Gelelektrophorese unter Verwendung von immobilisierten pH-Gradienten (IP 3-10) aufgetrennt. 10 % der Proteine wurde für den Immunoblot-Nachweis von PfEmp1 getrennt separiert. Das SDS-Gel mit 90 % der Proteine wurde mit Silber gefärbt (links). Das zweite SDS-Gel mit 10 % der Proteine wurde auf Nitrocellulose geblottet und mit einem polyklonalen Antiserum gegen die ATS-Region von PfEmp1 getestet (rechts). Die roten Pfeile markieren die Positionen der PfEmp1-spezifischen Western-Blot-Signale im silbergefärbtem Acrylamidgel.

3.7.2 Fazit

Es war nicht möglich, das tryptische Fragment von PfEmp1 nach der zweidimensionalen Auftrennung mit Coomassie oder Silber anzufärben und mittels MALDI-TOF-Verfahren zu charakterisieren. Der Immunoblot-Nachweis von PfEmp1 zeigte mindestens 2 Foci PfEmp1-spezifischer Proteine, die sich im isoelektrischen Punkt und im Molekulargewicht unterschieden.

3.8 Analyse der physikalischen Eigenschaften von PfEmp1 nach Synthese und Import in den sekretorischen Transportweg

Bisher konnte die Sekretion von PfEmp1 in die Wirtszelle biochemisch nicht analysiert werden. In den folgenden Experimenten zur Untersuchung der BFA-Sensitivität des PfEmp1-Transportes war PfExp1 eine wichtige Kontrolle. PfExp1 ist mit seiner klassischen N-terminalen Signalsequenz und der gut charakterisierten Membranregion das einzige zur Zeit identifizierte integrale Membranprotein, welches die formalen Bedingungen eines

Referenzproteins, welches über den klassischen Sekretionsweg jenseits der Plasmamembran des Parasiten sezerniert wird, erfüllt.

3.8.1 Die Sekretion von PfEmp1 wird durch BFA inhibiert; die Mehrheit des Proteins wird als karbonatlösliche Form synthetisiert

In vielen Vorversuchen wurden die geeigneten Bedingungen für die Experimente zur Untersuchung des PfEmp1-Transportes in Ring-Stadien gesucht. Die wichtigsten Schritte des Experimentes sind (i) die Trennung der BFA-behandelten Parasiten von ihren Wirtszellen durch Saponin-Lyse, (ii) die Trypsin-Behandlung der Parasiten, um bereits sezernierte Membranproteine, die durch die Saponin-Lyse nicht entfernt und die Analyse der BFA-Sensitivität erschweren würden, zu entfernen, (iii) die komplette Lyse der Parasiten durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Alle internen Membransysteme des Parasiten werden dadurch komplett zerstört. Schließlich (iv) wird das Lysat bei 100'000 g zentrifugiert und die löslichen und unlöslichen Proteine im Western Blot analysiert (Schema in Abb. 9).

In einem ersten Versuch wurden junge Ring-Stadien für 16 Stunden gemäß dem von Wickham *et al.* (2001) veröffentlichten Protokoll mit BFA inkubiert. Die Methode ließ sich aber nicht auf die Western-Blot-Analyse von PfEmp1 und anderer Markerproteine anwenden, da die Menge der in Anwesenheit von BFA produzierten Proteinen nicht für den Immunoblot-Nachweis ausreichte (nicht gezeigt). Die Inkubation wurde daher auf 2 Stunden verkürzt und auf Ringe angewendet, die in Übereinstimmung mit der gefundenen maximalen Transkriptionsrate der var-Gene (Gardner *et al.*, 1996) ca. 12 Stunden alt waren. Um das Alter der Ringe mit größtmöglicher Sicherheit bestimmen und reproduzieren zu können, wurden die parasitierten Erythrozyten durch wiederholte Alanin-Behandlung hoch-synchronisiert. In diesem Stadium reichte die Proteinmenge von 5×10^8 infizierten Erythrozyten (vgl. mit 10^7 bei Trophozoiten) pro Gelspur für die Detektion von PfEmp1 und PfExp1 im Western Blot aus. Die Sedimentfraktion wurde mit alkalischem Karbonatpuffer behandelt, um peripher assoziierte Membranproteine zu solubilisieren, und erneut bei 100'000 g zentrifugiert (s. Abb. 9). Die Western- Blot-Analyse der Fraktionen wurde mit Antiseren gegen PfEmp1 sowie die Markerproteine PfBIP, PfExp1 und PfGBP durchgeführt (Abb. 38).

Ohne Trypsin-Behandlung der Saponin-lysierten infizierten Eyrthrozyten zeigten sich aufgrund der hohen Proteinmenge so starke Reaktionen von PfEmp1 mit dem α -ATS-Antiserum, dass eine Auswertung unmöglich war (nicht gezeigt). In Anwesenheit von Trypsin und in Abwesenheit von BFA konnte kein PfEmp1 detektiert werden (Abb. 38, Spuren 1-3). Offenbar war PfEmp1 aus dem Parasiten sezerniert worden. In Anwesenheit von BFA und

Trypsin wurden zwei PfEmp1-Populationen, deren Proteine mit 250 und 300 kDa (geschätzt) ein unterschiedliches Molekulargewicht aufwiesen, detektiert. PfEmp1 wurde vor allem in der Karbonat-löslichen Fraktion detektiert (Spur 5). Ein kleiner Anteil der 250 kDa großen PfEmp1-Moleküle wurde auch in der ersten löslichen Fraktion (Spur 4), ein kleiner Anteil beider PfEmp1-Populationen auch in der Sedimentfraktion detektiert (Spur 6). Insgesamt schien die kleinere PfEmp1-Population bezüglich des Löslichkeitsverhaltens diverser zu sein als die größere 300 kDa-Population, die fast ausschließlich in der Karbonat-löslichen Fraktion gefunden wurde. PfBIP, ein ER-residentes Chaperon, wurde in vergleichbaren Mengen in allen Fraktionen detektiert. Die BFA-Behandlung hatte auf dieses Protein erwartungsgemäß keine Auswirkung gezeigt. PfExp1 wurde unabhängig von Trypsinierung und BFA-Inkubation ausschließlich in den Sedimentfraktionen (Spuren 3 und 6) detektiert. Nach Trypsinierung wurde in beiden Sedimentfraktionen (Spuren 3 und 6) eine Doppelbande detektiert, von der die obere der typischen PfExp1-Bande entsprach. Unabhängig von der BFA-Behandlung waren die Mengen der unteren Banden in beiden Fraktionen vergleichbar, während die obere, typische PfExp1-Bande nach BfA-Behandlung abundanter war. PfGBP

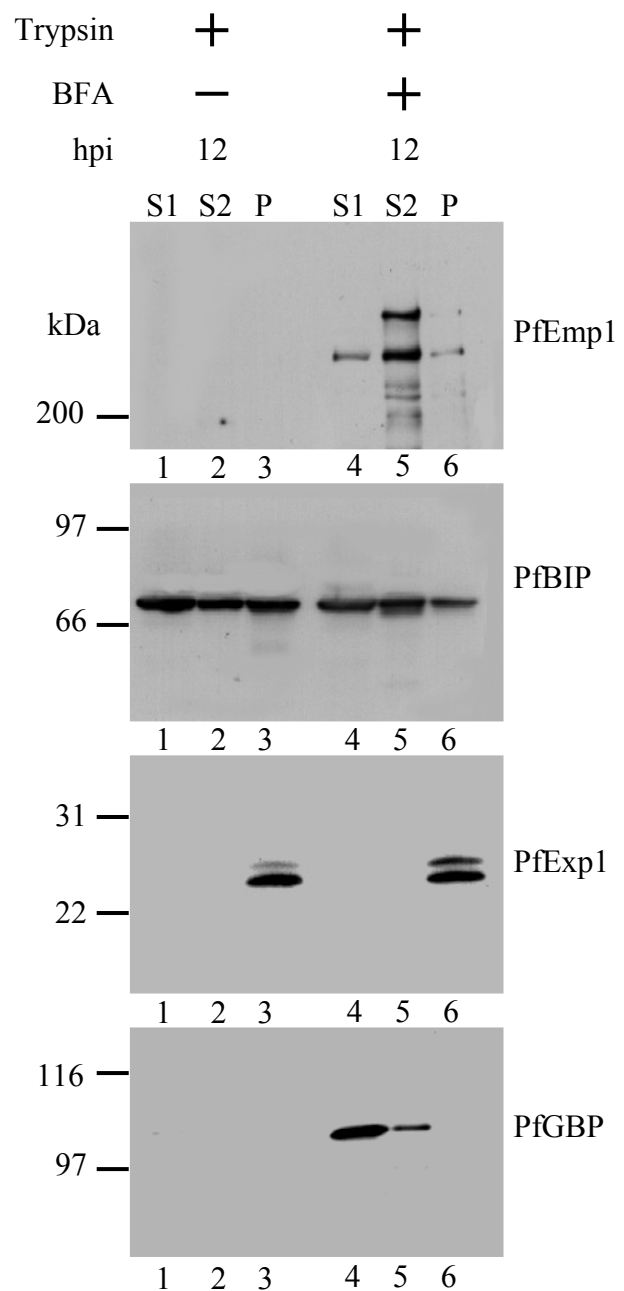


Abb. 38: BFA-Sensitivität von PfEmp1 und Markerproteinen in Ring-Stadien

Synchrone Ring-infizierte Erythrozyten wurden 12 Stunden post Invasion (hpi) mit Brefeldin A (BFA) für 2 Stunden inkubiert und danach mit Saponin lysiert. Die von den Wirtszellen entfernten Parasiten wurden mit Trypsin behandelt, durch Einfrieren bzw. Auftauen lysiert und bei 100'000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde mit Karbonatpuffer pH 11 behandelt und erneut zentrifugiert. Überstand- (S1, S2) und Sedimentfraktionen (P) wurden im Western Blot unter Verwendung von Antiseren gegen PfEmp1 (a), PfBIP (b), PfExp1 (c) und PfGBP (d) getestet.

wurde in diesem Experiment als lösliches Kontrollprotein für den BFA-sensitiven Sekretionsweg benutzt (Benting *et al.*, 1994). Mit Trypsin-, aber ohne BfA-Behandlung wurde im ersten löslichen Überstand sehr wenig PfGBP gefunden (Spur 1). In der Karbonat-löslichen und in der Sedimentfraktion (Spuren 2 und 3) konnte kein PfGBP nachgewiesen werden. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit der rapiden Sekretion dieses Proteins (Benting *et al.*, 1994). Nach Trypsin- und BFA-Behandlung wurde PfGBP im ersten löslichen Überstand detektiert. Ein kleiner Anteil wurde auch im Karbonat-löslichen Überstand gefunden. Offenbar fand in Anwesenheit von BFA, wie bei Benting *et al.* (2004) beschrieben, eine Retention des Proteins im frühen Sekretionsweg des Parasiten statt. Insgesamt zeigte PfEmp1 in Anwesenheit von BFA eine zu PfExp1 unterschiedliche Löslichkeit.

3.8.2 Fazit

Erstmals konnte biochemisch gezeigt werden, dass PfEmp1 mit BFA im Parasiten angereichert und analysiert werden kann. Die Sekretion von PfEmp1 ist also, obwohl die Nukleinsäuresequenzen der var-Gene nicht für offensichtliche Signalpeptide kodieren, BFA-sensitiv. Darüber hinaus läßt sich die große Mehrheit von im Parasiten akkumuliertem PfEmp1 mit alkalischem Karbonat-Puffer extrahieren; PfExp1 als Markerprotein für integrale Membranproteine war in den BFA-behandelten Parasiten dagegen resistent gegen die Extraktion. Da in Trophozoiten-infizierten Erythrozyten signifikante Mengen von PfEmp1 resistent gegen die Karbonat-Extraktion sind (Abb. 29), scheint die Löslichkeit des Proteins während der Sekretion abzunehmen.

4 Diskussion

Zu Beginn des Forschungsvorhabens galt die Hypothese, dass PfEmp1 ein Typ I-Membranprotein ist und über Vesikelfluß und Membranfusionen vom ER des Parasiten bis zur Erythrozytenmembran transportiert wird. Das Modell wird im wesentlichen gestützt von der Typ I-Topologie des Proteins in der Erythrozytenmembran (Waterkeyn *et al.*, 2001), der Beobachtung von vesikulären Strukturen im Zytoplasma der Wirtszelle (Gormley *et al.*, 1992; Hibbs und Saul, 1994; Trelka *et al.*, 2000 und Taraschi *et al.*, 2003), und der morphologischen Identifizierung der parasitären Proteinen PfNSF, PfSec31p und PfSar1p in der Wirtszelle, deren Homologe in höheren Eukaryoten bei Vesikeltransportprozessen eine Rolle spielen (Albano *et al.*, 1999; Adisa *et al.*, 2001 und Hayashi *et al.*, 2001). Die direkte Assoziation von PfEmp1 mit Vesikeln konnte bis jetzt jedoch biochemisch nicht bewiesen werden. Darüber hinaus wurden viele Beobachtungen, denen dieses Modell nur unzureichend gerecht wird, in der wissenschaftlichen Gemeinschaft bis heute nicht nennenswert beachtet. Dazu zählen das im Vergleich mit der berechneten Größe zu hohe Molekulargewicht des tryptischen Fragmentes (Waterkeyn *et al.*, 2000) und die ineffiziente Insertion des Proteins in seine Zielmembran; der Großteil von PfEmp1 verbleibt bis zum Ende des Zyklus im Zytoplasma des Erythrozyten (Kriek *et al.*, 2003). Auch die Struktur des erythrozytären Zytoskeletts und die durchschnittliche Maschenweite des Spektrinnetzwerkes sind mit der Vorstellung, dass Vesikel der von den genannten Autoren beobachteten Größe von 100 nm mit der Erythrozytenmembran verschmelzen, unvereinbar (s. Einleitung). Im Folgenden wird sich die Diskussion mit den wichtigsten Aspekten des klassischen Modells in Widerspiegelung mit den Ergebnissen des Projektes und einer Reihe weiterer Beobachtungen detailliert auseinandersetzen.

4.1 Wird PfEmp1 mit gängigen Algorithmen als Transmembranprotein vorhergesagt?

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit dem allgemein akzeptierten Modell des PfEmp1-Transportes, dessen Grundlage die integrale Assoziation des Proteins mit Transportvesikeln darstellt, nicht überein. An dieser Stelle sollte daher eine Datenbank-Analyse der hydrophoben Region von PfEmp1 erfolgen und die Frage beantwortet werden, ob es sich bei dieser um eine klassische, eindeutig bestimmbare Transmembranhelix handelt.

Die bioinformatische Analyse fand an PfEmp1-Sequenzen des 3D7-Isolats von *P. falciparum* statt, das fast vollständig im Malaria-Genomprojekt sequenziert wurde. Zunächst sollte mit verschiedenen Algorithmen zur Bestimmung der Sicherheit, mit der sich eine

putative Sequenz als Transmembranregion qualifiziert, eine Analyse der variablen PfEmp1-Sequenzen durchgeführt werden. Es erschien an dieser Stelle nicht sinnvoll, alle zur Verfügung stehenden PfEmp1-Sequenzen zu testen; stattdessen sollte die zufällige Auswahl von einigen einen repräsentativen Durchschnitt bilden. 10 vollständige PfEmp1-Sequenzen wurden mit den im Internet zur Verfügung stehenden Programmen „HMMTOP“, „Sousi“, „TMHMM“, „TmPred“ und „TopPred“ untersucht (Tab. 3). Im Vergleich wurden auch die gut charakterisierten Membranproteine PfExp1 und Glykophorin A getestet, sowie die Aminosäuresequenz von PfGBP.

Alle Programme bestätigten die Transmembranhelices von PfExp1 und Glykophorin A. Auch die N-terminalen Signalsequenzen dieser Proteine wurden als Transmembranhelices gewertet; sie sind in der Tabelle nicht aufgeführt. Die hydrophobe Region von PfGBP, bei der es sich möglicherweise um eine atypische Signalsequenz handelt, wurde ebenfalls als Transmembranhelix erkannt. Die Programme berücksichtigen für die Vorhersage also nicht die Position der hydrophoben Aminosäuren in der Sequenz und können nicht zwischen Signal- und Transmembranpeptiden unterscheiden. Bei der Analyse der verschiedenen PfEmp1-Sequenzen wurden im Gegensatz zu den klassischen Membranproteinen keine eindeutigen Ergebnisse erzielt. Die Programme TmPred und TopPred gaben die hydrophoben Regionen aller getesteten Sequenzen als Transmembranhelix aus. Bei der Aminosäuresequenz von A4-PfEmp1 (A4var) sagten sie im zentralen Bereich der Sequenz eine weitere Transmembranhelix voraus. Bei zwei weiteren Sequenzen (Q81D09 und Q81HM0) detektierte TopPred ebenfalls eine weitere Transmembranregion; in der Q81D09-Sequenz relativ N-terminal, in der Q81HM0-Sequenz zu Beginn des letzten Drittels der Sequenzlänge. Die Programme HMMTOP, Sousi und TMHMM erkannten in der Mehrzahl der getesteten Sequenzen von PfEmp1 keine Transmembranregionen. HMMTOP erkannte die putative Region nur in Q91EU9 und Q8IIZ4. Auch hier wurde wieder in beiden Sequenzen eine zweite Region als Transmembranhelix ausgegeben, diesmal relativ C-terminal gelegen. Keines der anderen Programme detektierte eine Transmembranregion in diesem Bereich. Mit Sousi wurde in 4 PfEmp1-Sequenzen die putative Region als Transmembranhelix erkannt (Q81098, Q81EU9, Q81HM0 und Q8IIZ4), mit TMHMM in 3 PfEmp1-Sequenzen (Q81098, Q81HM0 und Q8IIZ4). Insgesamt wurde nur in der PfEmp1-Sequenz Q8IIZ4 die putative hydrophobe Region von allen Programmen als Transmembranhelix erkannt. Die Sequenzen Q81098, Q81EU9, Q81HM0 und Q8IIZ4 wurden von 4 Programmen als Transmembranproteine vorhergesagt. HMMTOP, Sousi und TMHMM berechneten diese als lösliche Proteine

Tab. 3: Vorhersage von Transmembranregionen bei einer zufälligen Auswahl von PfEmp1-Sequenzen der 3D7-Linie

Protein	HMMTOP	Sousi	TMHMM	TMpred	TopPred
A4var(3331)	nein	nein	nein	ja(1330,1348,1042;2884,2905,1699)	ja(1329,1349,1.016;2885,2905,1.953)
Q25733(2924)	nein	nein	nein	ja(2454,2475,1296)	ja(2457,2477,1.758)
Q8I098(3553)	nein	ja(3123,3145)	ja(3124,3146)	ja(3124,3146,2738)	ja(3124,3144,2.247)
Q8I218(3467)	nein	nein	nein	ja(3014,3035,1445)	ja(3016,3036,1.878)
Q81220(2646)	nein	nein	nein	ja(2170,2190,2217)	ja(2170,2190,1.922)
Q8I639(3056)	nein	nein	nein	ja(2646,2665,1395)	ja(2649,2669,1.777)
Q8ID09(3954)	nein	nein	nein	ja(3440,3461,1286)	ja(473,493,1.002;3443,3463,1.727)
Q8IEU9(3346)	ja(2670,2687;2926,2943)	ja(2926,2947)	nein	ja(2925,2947,2218)	ja(2927,2947,1.958)
Q8IHM0(3119)	nein	ja(2694,2716)	ja(2695,2717)	ja(2695,2717,2724)	ja(1904,1924,1.181;2695,2715,2.274)
Q8IIZ4(2994)	ja(2328,2345;2549,2566)	ja(2550,2571)	ja(2549,2571)	ja(2549,2571)	ja(2551,2571,2.108)
PfExp1 (162)	ja(81,101)	ja(78,100)	ja (78,101)	ja (76,101,2394)	ja(80,100,1.983)
Glycophorin A	ja(91,110)	ja(90,112)	ja(91,113)	ja(91,109,2432)	ja(91,111,2.292)
PfGBP(774)	ja(51,68)	ja(51,73)	ja(51,68)	ja(51,69,1846)	ja(50,70,1.531)

Mit 5 verschiedenen Algorithmen (HMMTOP, Sousi, TMHMM, TMpred und TopPred) wurde die Wahrscheinlichkeit, mit der die hydrophobe Region von verschiedenen PfEmp1-Aminosäuresequenzen (Spalte "Protein") eine Transmembranhelix bildet, berechnet. Negative Ergebnisse sind mit "nein", positive mit "ja" benannt. Zahlen geben die Länge der Proteinsequenz in Aminosäuren an; Zahlenpaare geben die Positionen der die putativen Transmembranregionen flankierenden Aminosäuren an; Zahlentriplets bedeuten die Position der flankierenden Aminosäuren und den Wahrscheinlichkeitwert (nur bei TMpred und TopPred).

(A4var, Q25733, Q81218, Q81220, Q81639 und Q81D09). Insgesamt konnten die für die Vorhersage von integralen Membranproteinen zur Verfügung stehenden Algorithmen für die variablen Aminosäuresequenzen von PfEmp1 kein eindeutiges Ergebnis berechnen. Für experimentell verifizierte integrale Membranproteine erfolgte die Identifikation der Transmembranregion dagegen ausnahmslos eindeutig.

In mehreren Studien wurde die Genauigkeit von Algorithmen zur Vorhersage von Transmembranregionen mit Sequenzen von experimentell charakterisierten Transmembranproteinen bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass die Algorithmen auf der Grundlage des "Hidden Markov Model" (HMM), also hier HMMTOP und TMHMM, die genauesten sind (Tusnady und Simon, 1998; Melen *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003). Dies stimmt mit den in dieser Arbeit berechneten Werten für die diversen PfEmp1-Proteine überein, weil mit HMMTOP und TMHMM im Gegensatz zu Tmpred und TopPred differenzierte Ergebnisse für verschiedene PfEmp1-Sequenzen erzielt wurden.

Ein detaillierter Sequenzvergleich zwischen den verschiedenen hydrophoben Regionen der in Tab. 2 aufgeführten PfEmp1-Sequenzen und den Transmembranregionen von PfExp1 und Glykophorin A zeigt, dass die hydrophoben Regionen der PfEmp1-Sequenzen zum Teil, vor allem aber am C-terminalen Ende, konserviert sind (Abb. 39). Dort findet sich bei allen Sequenzen das Motiv L(F)-F(L)-L(M)-K-K-K wieder. N-terminal lässt sich die hydrophobe Region nicht eindeutig eingrenzen. Der hydrophobe Kern der Region scheint bei dem konservierten Isoleucin-Rest (Leucin bei Q81220), der die hydrophobe Region auf 17 Aminosäuren begrenzt, zu beginnen. Die Transmembranregionen von PfExp1 und Glykophorin A sind dagegen 22 bzw. 23 Aminosäuren lang.

Insgesamt ergibt die bioinformatische Analyse zehn zufällig gewählter PfEmp1-Sequenzen, dass die hydrophobe Region von PfEmp1 nur in einem Fall eindeutig als Transmembranregion berechnet werden konnte. In den meisten Fällen wurden die Proteine, konsistent mit den Ergebnissen dieser Arbeit, als lösliche Proteine vorhergesagt. Die genaue Analyse der verschiedenen hydrophoben Regionen zeigte, dass der hydrophobe Kern der Region nur 17 Aminosäuren lang und als Transmembranregion möglicherweise zu kurz ist.

4.2 Wird PfEmp1 als integrales Membranprotein synthetisiert und über den klassischen Sekretionsweg in die Wirtszelle exportiert?

Wickham *et al.* (2001) inkubierten Ring-Formen des Parasiten für 16 Stunden mit BFA und konnten danach PfEmp1 mit immunfluoreszierenden Antikörpern im Parasiten nachwei-

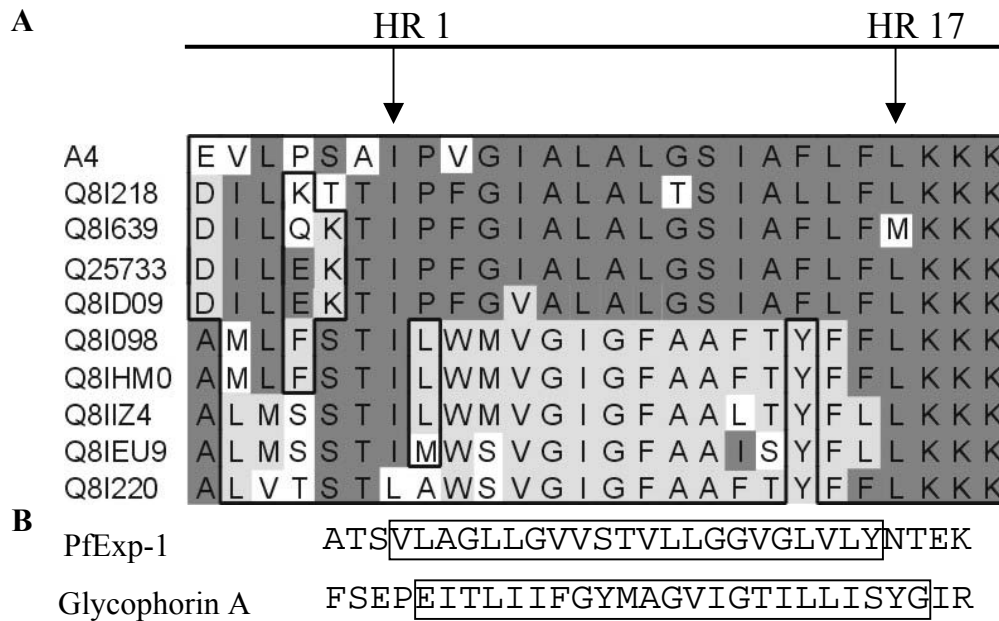


Abb. 39: Vergleich hydrophober Regionen von 10 verschiedenen PfEmp1-Sequenzen und 2 Typ1-Transmembranproteinen

Sequenzhomologien wurden mit dem Programm DNASTar ermittelt. Identische Aminosäuren sind dunkelgrau oder grau unterlegt. Chemisch ähnliche Aminosäuren sind eingerahmt. Die N- und C-terminalen Grenzen der Transmembranregionen von PfExp1 und Glycophorin A wurden mit dem Programm TMHMM bestimmt und sind ebenfalls eingerahmt.

sen. Ferner konnten die Autoren zeigen, dass diese PfEmp1-Population mit dem ER-residenten Chaperon PfBip kolokalisierte. Die Autoren schlußfolgerten, dass PfEmp1 über den klassischen Sekretionsweg exportiert wird. Die Weise, in der die Experimente durchgeführt wurden, war allerdings problematisch. Die meisten Ring-Stadien sterben bei einer Inkubationszeit von 16 Stunden in Anwesenheit von BFA (Benting *et al.*, 1994). Die Autoren benutzten die wenigen überlebenden Parasiten als Kontrolle dafür, dass die in der Immunfluoreszenz beobachteten Zellen nicht durch die BFA-Inkubation getötet worden waren. Ein direkter Nachweis dafür wurde aber nicht erbracht. Deswegen wurde in dieser Arbeit versucht, die von den Autoren gemachten Beobachtungen biochemisch zu überprüfen.

Das Ergebnis zeigte in Übereinstimmung mit Wickham *et al.* (2001), dass PfEmp1 nach Behandlung mit BFA im Parasiten angereichert werden kann. Es kann somit für die Sekretion von PfEmp1 nur die Möglichkeit bestehen, dass das Protein über ER und Golgi-Membranen sezerniert wird. Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt ferner, dass für einen Großteil von PfEmp1 die hydrophobe Region bei der kotranslationalen Translokation in das ER nicht als Transmembrananker gebildet wird. PfExp1 war dagegen resistent gegen die Extraktion mit Karbonatpuffer. Allerdings reagierte das PfExp1-Antiserum mit zwei Proteinen, die als Doppelbande erschienen und nur in den Trypsin-behandelten Fraktionen beobachtet wurden.

Die obere der beiden Banden korrelierte mit der typischen Größe für PfExp1 und schien sich in Anwesenheit von BFA zu verstärken. Über die Herkunft der unteren Bande kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Möglicherweise gelangen nach der Arretierung des Proteintransportes proteolytische Enzyme oder die aus dem Golgi-System zurückgeführten Proteasen ins ER und führen dort zur Spaltung von PfExp1. Als Beweis für die BFA-Sensitivität der PfExp1-Sekretion kann die Doppelbande aber solange nicht gelten, bis die Herkunft des kleineren Proteins eindeutig geklärt ist. Die erfolgreiche Anwendung von BFA wurde mit PfGBP als Positivkontrolle, konsistent mit früheren Arbeiten (Benting *et al.*, 1994), hinreichend gezeigt. Das ER-residente Chaperon BIP war zu einem großen Anteil resistent gegen die Extraktion mit alkalischem Karbonatpuffer. Dies zeigt, dass BIP mit anderen Proteinen starke Wechselwirkungen, die nicht mit alkalischem Karbonatpuffer aufgebrochen werden können, eingeht.

Die Hypothese, dass es sich bei der hydrophoben Region von PfEmp1 nicht um eine Stop-Transfer-Sequenz handelt, wird durch die bioinformatische Analyse der PfEmp1-Sequenzen untermauert (Tab. 3).

Die Art, wie PfEmp1 in das ER gelangt, bleibt allerdings rätselhaft. Das Fehlen einer N-terminalen Signalsequenz legt die Möglichkeit einer Sec61-unabhängigen Translokation nahe, wie sie bei manchen "Schwanz-verankerten" Proteinen in eukaryoten Zellen beobachtet wurde (Kutay *et al.*, 1993). In diesem Falle wäre denkbar, dass die hydrophobe Region des Proteins als topogenes Signal, welches das Protein post-translational ins ER dirigiert, fungiert (Nacer *et al.*, 2001). Ein solcher Sec61-unabhängiger Translokationsmechanismus würde sehr wahrscheinlich einen bis dato unbekanntem Proteinkanal mit kooperierenden Chaperonen, die das Protein auf der zytoplasmatischen Seite des ER entfalten und auf der luminalen Seite zurückfalten, beinhalten. Die Vorstellung, dass ein Protein mit einem Molekulargewicht von bis zu 350 kDa post-translational über die ER-Membran transportiert wird, bleibt allerdings problematisch und wurde bis heute für kein vergleichbares Protein gezeigt.

4.3 Liegt PfEmp1 in der Wirtszelle als integrales Membranprotein vor?

Kriek *et al.* (2003) führten Experimente durch, in denen SLO-permeabilisierte Trophozoiten-infizierten Zellen mit Trypsin behandelt wurden. In den permeabilisierten Zellen konnte der C-Terminus mit Trypsin verdaut werden, während der N-Terminus unbeschadet blieb. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Topologie von intraerythrozytärem A4-PfEmp1 vom Typ 1 ist. Dieses Ergebnis wurde gleichzeitig als Beweis für die Lokalisation der intraerythrozytären Population von PfEmp1 in den Membranen der

Maurer'schen Spalten gewertet. Allerdings wurde der Schutz des N-Terminus von PfEmp1 vor Trypsin-Verdau nicht direkt im Western Blot gezeigt; stattdessen wurden die infizierten Erythrozyten mit L-[³⁵S]-Methionin zunächst metabolisch markiert. Danach erfolgte die SLO-Permeabilisierung und die Trypsin-Behandlung der permeabilisierten Zellen. Von den zellulären Fraktionen wurden dann Triton X-100-Extrakte hergestellt, PfEmp1 immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE autoradiographiert.

In Trophozoiten-infizierten Erythrozyten ist der Großteil von PfEmp1 jedoch resistent gegen die Extraktion mit nicht-ionischen Detergentien (Leech *et al.*, 1984) und kann nicht immunpräzipitiert werden. Zweitens wurden die in Kriek *et al.* (2003) durchgeführten Immunpräzipitationen nicht quantitativ durchgeführt. In diesen Arbeiten konnte folglich nur eine begrenzte Anzahl der intraerythrozytären PfEmp1-Population erfasst werden. Es ist daher durchaus möglich, dass diese zwar der Menge des geschützten Fragmentes entspricht, nicht aber die eigentliche Situation widerspiegelt.

Dieser Sachverhalt wurde in der vorliegenden Arbeit zum Anlaß genommen, das Experiment mit dem Ziel zu wiederholen, die Topologie der intraerythrozytären PfEmp1-Population in ihrer Gesamtheit zu untersuchen. Außerdem sollte die Frage untersucht werden, ob in Trophozoiten-Stadien die Gesamtheit der PfEmp1-Proteine in die Wirtszelle sezerniert wird. Es zeigte sich, dass in diesem direkten Ansatz weder ein geschützter N- noch ein C-Terminus von A4-PfEmp1 oder der PfEmp1-Spezies der FCBR-Linie in SLO-permeabilisierten Zellen detektiert werden konnte. Da der Western Blot vermutlich weniger sensitiv als die Autoradiographie von immunpräzipitierten radioaktiven Proteinen ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein geringer Anteil von PfEmp1 unter diesen Bedingungen geschützt ist. Es erscheint daher möglich, dass zumindest eine kleine Population von PfEmp1 die postulierte Struktur eines integralen Typ 1-Membranproteins hat. Die Majorität des Proteins scheint sich jedoch anders zu verhalten.

Aufgrund des Fehlens einer geeigneten Kontrolle für intraerythrozytäre Membransysteme konnte die Intaktheit dieser nicht gewährleistet werden. Die Daten aus Kriek *et al.* (2003) zeigen jedoch indirekt, dass die Permeabilisierung interner Membranen nicht stattfindet.

Periphere Membranproteine lassen sich in der Regel mit alkalischem Karbonatpuffer (pH 11) von den Membranen ablösen, weil die elektrostatischen Wechselwirkungen des Proteins mit den Phospholipiden der Membran durch die Natrium- und Hydroxid-Ionen, die in hoher Konzentration verabreicht werden, komplementiert werden (Fujiki *et al.*, 1982). Eine Behandlung von infizierten Erythrozyten mit Karbonatpuffer führte dazu, dass die Mehrheit

der intrazellulären PfEmp1-Proteine in den Überstand freigesetzt wurde, während die externe Population resistent gegen die Extraktion war. Auch nach Zentrifugation bei 100'000 g blieben die gelösten PfEmp1-Moleküle im Überstand. Das Ergebnis zeigt, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit diese PfEmp1-Proteine keine integralen Membranproteine sein können. PfExp2, ein unlösliches Protein ohne hydrophobe Region, konnte als Kontrolle für periphere Membranproteine nicht positiv getestet werden, weil es resistent gegen Karbonatextraktion ist (Johnson *et al.* 1994). Zur Zeit gibt es keine Erklärung für dieses Phänomen. Im Zusammenhang mit PfEmp1 ist die hohe „Unlöslichkeit“ von PfExp2 allerdings ein besonders interessanter Befund, denn er zeigt, dass intrazelluläres PfEmp1 mit seiner hydrophoben Region löslicher ist als PfExp2, das aufgrund seiner Sequenz ein lösliches Protein sein sollte. Eine kleine Population von internen PfEmp1-Proteinen war jedoch wie PfExp2 resistent gegen die alkalische Extraktion. Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass die A4-Familie der PfEmp1-Proteine resistent gegen die Extraktion mit Karbonatpuffer war (nicht gezeigt). Offenbar scheint es variantenspezifische Unterschiede der Löslichkeitseigenschaften von PfEmp1-Proteinen im Karbonatpuffer zu geben. Diese Beobachtung wurde auch in dem BFA-Experiment gemacht. Dass es sich bei den gegen Karbonat-Extraktion resistenten PfEmp1-Proteinen um integrale Membranproteine handelt, konnte formal nicht ausgeschlossen werden. In dem Triton X-114-Partitionierungsexperiment konnte, konsistent mit den Ergebnissen der Karbonat-Extraktion, ein kleiner Anteil der intraerythrozytären Population mit Triton X-114 extrahiert werden; dieser partitionierte in die wasserlösliche Phase. Die hydrophobe Domäne dieser PfEmp1-Proteine wechselwirkt mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mit Lipiden. Insgesamt kann mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden, dass es sich bei den intraerythrozytären PfEmp1-Proteinen um integrale Membranproteine handelt.

4.4 Assoziiert PfEmp1 mit Vesikeln?

Die Untersuchung der Verteilung von PfEmp1 im Erythrozyten mit konfokaler Lasermikroskopie zeigte, dass das Protein in wenigen Fluoreszenzfoci, von denen nur wenige oberflächennah waren, lokalisierte. Eine derartige Verteilung von PfEmp1 ist nicht neu und wurde bereits in Wickham *et al.* (2001) und Kriek *et al.* (2003) dokumentiert. Das Protein kolokalisierte dabei zum Teil mit dem Knob-Protein PfKAHRP und mit PfSbp1, ein integrales Membranprotein der Maurer'schen Spalten (Blisnick *et al.*, 2000). Beide Proteine interagieren mit Spektrin, d. h. mit dem Zytoskelett des Erythrozyten. Für die ATS-Region von PfEmp1 wurde auch gezeigt, dass sie mit KAHRP und Spektrin wechselwirkt (Waller *et*

al. 1999; Voigt *et al.*, 2000; Oh *et al.* 2000). Die Kollokalisierung von PfEmp1 mit PfKAHRP und PfSbp1 ist aus diesen Gründen nicht überraschend. In den genannten Veröffentlichungen werden die PfEmp1-spezifischen Fluoreszenzmuster aber als Membranen von Vesikeln und Maurer'schen Spalten interpretiert, in denen PfEmp1 als integrales Membranprotein vorliegt und aufgrund seiner Membranassoziation mit PfSbp1 kollokalisiert. Kriek *et al.* (2003) markierten intrazelluläres PfEmp1 auch mit Gold-Antikörpern, konnten eine direkte Lokalisation dieser auf intrazellulären Membranen jedoch nicht eindeutig zeigen. Auch Trelka *et al.* (2000) und Taraschi *et al.* (2003) versuchten die Assoziation von PfEmp1 mit intrazellulären Vesikeln über Immuno-Elektronenmikroskopie zu zeigen. Die undeutliche Darstellung der Membranstrukturen, die geringe Anzahl der dekorierenden Goldpartikel und das Fehlen unterstützender biochemischer Daten lassen die Interpretationen der Autoren jedoch zweifelhaft erscheinen.

Es war daher wünschenswert, im Rahmen dieser Arbeit einen neuen experimentellen Ansatz zur direkten Untersuchung von Vesikeln zu entwickeln. Dabei wurde ein Verfahren herausgearbeitet, in dem die PVM spontan vesikuliert und gemäß des PfExp1-Markers in der Iodixanol-Dichtegradienten-Zentrifugation in Fraktionen geringer Dichte migriert. Der Nachweis von PVM-Vesikeln ist konsistent mit morphologischen Untersuchungen, die PfExp1 in Assoziation mit vesikulären Strukturen zeigen (Haeggström *et al.*, 2004). Die elektronenmikroskopische Analyse der in den Fraktionen geringer Dichte migrierenden Partikel zeigte fast ausschließlich Vesikel unterschiedlicher Größe, zwischen 100 und 1000 nm im Durchmesser. Der Anteil der natürlich vorkommenden Vesikel an der Gesamtfraktion konnte nicht bestimmt werden. In einer Reihe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden aber Vesikel mit mind. 100 nm Durchmesser beobachtet (Gormley *et al.*, 1992; Hibbs und Saul, 1994).

PfEmp1 konnte in den Fraktionen, in die die Vesikel segregierten, aber nicht nachgewiesen werden. Sowohl die intraerythrozytäre als auch die exponierte Population von PfEmp1 kosegregierten mit der Erythrozytenmembran, dem Zytoskelett und den Maurer'schen Spalten. Das allgemeine Transportmodell, dessen zentrale Hypothese der Fluß von Vesikeln und deren Fusion mit der Zielmembran ist, wird durch diese Daten nicht unterstützt. Es erscheint aus diesen Gründen unwahrscheinlich, dass die in der Immunfluoreszenz beobachteten PfEmp1-spezifischen Signale (Wickham *et al.*, 2001; Trelka *et al.*, 2000; Kriek *et al.*, 2003;) auf vesikuläre Strukturen zurückzuführen sind.

4.5 Ist PfEmp1 über die konservierte ATS-Region im Zytoskelett der Wirtszelle verankert?

Die allgemeine Vorstellung, wie PfEmp1 die Zytoadhärenz der infizierten Zelle vermittelt, beinhaltet die Verankerung des Proteins im erythrozytären Zytoskelett als wichtige strukturelle Komponente. Die Bindung der ATS-Region an Spektrin und KAHRP wurde *in vitro* bereits gezeigt (Waller *et al.* 1999; Voigt *et al.*, 2000 und Oh *et al.*, 2000). Die Kolo-kalisation von PfEmp1 mit Spektrin in der Dichtegradientenzentrifugation nach Detergensbehandlung ist konsistent mit diesen Befunden.

Alle getesteten Membranproteine, also PfExp1, PfSBP1 und Bande 3, migrierten nach der Extraktion mit 1 % Triton X-100 (bzw. Triton X-114) hauptsächlich in Fraktionen diverser Dichte. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass sowohl die Erythrozytenmembran als auch die parasitophore Vakuolenmembran Detergens-resistente Membranbereiche (sog. DRM) aufweisen, die in Dichtegradienten-Zentrifugationen in Fraktionen geringer Dichte flotieren (Civenni *et al.*, 1998; Lauer *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu den Marker-Membranproteinen sedimentierten PfEmp1 und Spektrin nach der Solubilisierung mit Triton vollständig jenseits des Bereichs höchster Dichte im Saccharose-Gradienten. Dieser Befund zeigt, dass intrazelluläres PfEmp1 direkt in Verbindung mit Proteinaggregaten hoher Dichte steht, bei denen es sich aufgrund der Spektrinkontrolle und der Wechselwirkung zwischen Spektrin und PfEmp1 (Oh *et al.*, 2000) sehr wahrscheinlich um das Zytoskelett des Erythrozyten handelt, welches unter den experimentellen Bedingungen nicht disintegriert wird (Chishti *et al.*, 1992; Svoboda *et al.*, 1992). Nicht-komplexiertes und membranassoziiertes PfEmp1, von dem zu erwarten wäre, dass es während der Zentrifugation in den Fraktionen des Gradienten verbleibt, konnte weder für intrazelluläres noch für externes PfEmp1 nachgewiesen werden. Ein signifikanter Anteil der Marker-Membranproteine Bande3, PfExp1 und PfSbp1 wurde ebenfalls in der Sedimentfraktion nach Triton-Solubilisierung und Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation gefunden. Er war für Bande3 und PfSBP1 relativ hoch, was wiederum mit der Interaktion der beiden Proteine mit dem Zytoskelett korreliert (Blisnick *et al.*, 2000; Pasternack *et al.*, 1985). Für PfExp1 wurde bisher keine Interaktion mit anderen Proteinen nachgewiesen, und die Ergebnisse der Flotationsexperimente deuten nicht auf eine solche hin. An dieser Stelle kann daher nur spekuliert werden, warum dennoch ein kleiner Anteil von PfExp1 in der Sedimentfraktion gefunden wurde. Möglicherweise haben sich während der Detergensextraktion unspezifische Bindungen zwischen Detergens-unlöslichen Regionen der

PVM und Proteinaggregaten gebildet, die sich während der Zentrifugation durch die Saccharose-Kissen nicht aufgelöst haben.

Die in dem Partitionierungsexperiment gefundene lösliche Fraktion von PfEmp1 konnte in der Dichtegradientenzentrifugation von Membranen, die mit 1 % Triton X-114 bzw. Triton X-100 solubilisiert wurden, nicht detektiert werden. Entweder handelt es sich bei dieser Fraktion um Proteinkomplexe, die unter den Bedingungen der Dichtegradientenzentrifugation sedimentierten, oder aber PfEmp1 kann nur unter den Bedingungen, wie sie in dem Partitionierungsexperiment angewendet werden (2,5 % Triton X-114, 37° C) teilweise aus dem Verband mit anderen Proteine herausgelöst werden.

4.6 Liegt externes PfEmp1 als integrales Membranprotein in der Erythrozytenmembran vor?

Für einen Großteil der intraerythrozytären Population konnte die integrale Assoziation mit Membranen ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung, ob es sich bei der exponierten Population von PfEmp1 tatsächlich um Membranproteine handelt (Su *et al.*, 1995; Baruch *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995 und Waterkeyn *et al.*, 2001), wurde überlegt, die Membranen von infizierten Erythrozyten mit 8 M Harnstoff zu extrahieren. Harnstoff zerstört als chaotropes Agens Quartär- und Tertiärstrukturen von Proteinen und kann so die Vernetzung von Proteinaggregaten (z. B. Einschlußkörper rekombinanter Proteine in Bakterien) auflösen. Wie Harnstoff mit biologischen Membranen reagiert ist nicht gut verstanden, jedoch scheint Harnstoff in die Lipidschicht reversibel zu interkalieren, ohne integrale Membranproteine herauszulösen (Xu und Colombini, 1996). Die Herabsetzung der Harnstoffkonzentration, die in den Experimenten mit Dialyse erreicht wurde, sollte die Membranen also wieder angenähert in den Ausgangszustand zurückführen. Die Harnstoff-Behandlung von Membranen von infizierten Erythrozyten zeigte entsprechend, dass PfEmp1 im Gegensatz zu integralen Membranproteinen mit Harnstoff extrahiert werden konnte. Als Marker-Membranprotein für die Erythrozytenmembran schienen die Glykophorine die geeignetere Kontrolle als Bande3 zu sein, da sie mit nur einer Transmembranregion in der Membran verankert sind. Wurden die Harnstoff-behandelten Membranen bei 100'000 g zentrifugiert, sedimentierten nicht nur die integralen Membranproteine, sondern auch PfEmp1, dass bei 10'000 g noch zu großen Anteilen im Überstand verblieb. Für diese Beobachtung gibt es 2 mögliche Erklärungen: Zum einen führte die Dialyseverdünnung der Harnstoffkonzentration nach der Extraktion der Membranen möglicherweise zur Bildung von falschgefalteten Proteinen, die durch exponierte hydrophobe Bereiche präzipitierten. Möglich wäre auch, dass PfEmp1 wieder renaturierte und

Komplexe mit seinen natürlichen Bindungspartnern bildete. Schließlich konnte auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dieser Population von PfEmp1 um integrale Membranproteine handelte. Die Trennung der Harnstoff-behandelten Membranen in der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation zeigte dann aber, dass sich bei 100'000 g PfEmp1 von den Glykophorinen trennen ließ, also nicht mehr in der Erythrozytenmembran verankert sein konnte. Das Ergebnis zeigte zusammen mit dem geringen Lipid-Gehalt der leichten Fraktionen, dass externes PfEmp1 wahrscheinlich kein integrales Membranprotein der Erythrozytenmembran ist, sondern vielmehr mit Proteinen direkt wechselwirken muß. Die geringe Menge an Lipid, die in den leichten Fraktionen detektiert wurde, geht wahrscheinlich auf die Kontamination dieser mit PfExp1 und anderen Membranproteine zurück. Ein kleiner PfEmp1-Anteil kosegregierte mit den Glykophorinen. Ob es sich bei diesen Molekülen um integrale Membranproteine oder Kontaminanten aus den Fraktionen geringerer Dichte handelt, kann abschließend nicht beantwortet werden. PfEmp1 vom A4-Typ ließ sich mit Harnstoff ebenfalls extrahieren und zeigte damit in diesem Experiment die gleichen physikalischen Eigenschaften wie die heterogene PfEmp1-Population der FCBR-Linie (nicht gezeigt). Vermutlich zeigen sich die unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften zwischen verschiedenen PfEmp1-Typen nur bei der Karbonat-Extraktion, bei der A4-PfEmp1 resistent gegen die Extraktion ist. Möglicherweise gehen unterschiedliche PfEmp1-Typen aufgrund ihrer strukturellen Diversität (Gamain *et al.*, 2002) unterschiedlich starke Bindungen mit anderen Proteinen ein, die aber in jedem Fall durch die Harnstoff-Behandlung, die die wirkungsvollste Methode zur Auflösung von Proteinkomplexen darstellt, gebrochen werden können.

Interessant ist die Beobachtung, dass sich in Abb. 34 die PfEmp1-Proteine über mehrere Fraktionen verteilen und die verschiedenen Größenklassen inklusive des tryptischen Fragmentes graduell unterschiedlich migrierten. Sie verhielten sich damit nicht wie typische lösliche Proteine, die in wenigen Fraktionen akkumulieren. Eine Erklärung kann an dieser Stelle nur spekulativ gegeben werden. Die Migration von PfEmp1 in Fraktionen auch etwas höherer Dichte ist konsistent mit der Beobachtung, dass ohne die Verwendung von Saccharose-Kissen beinahe die Gesamtheit von PfEmp1 bei 100'000 g sedimentiert. Möglicherweise zeigen sich in der graduell unterschiedlichen Verteilung von PfEmp1 unterschiedliche Aggregate, die von den verschiedenen PfEmp1-Spezies unter den experimentellen Bedingungen gebildet werden. Eine andere Schlußfolgerung kann aber aus dieser Beobachtung mit hoher Sicherheit bezüglich der Spezifität des Antiserums gezogen werden. Es ist denkbar, dass es sich bei den sich in dem Molekulargewicht unterscheidenden

PfEmp1-Spezies um proteolytische Fragmente nur einer Spezies handelt. Diese wären am N-Terminus um einen kleinen Aminosäureanteil trunziert, was auf die Löslichkeit des Proteins, welche maßgeblich von der hydrophoben Region und dem konservierten C-Terminus bestimmt wird, keinen Einfluß hätte. Derartige proteolytische Fragmente würden in Abb. 34 die gleiche Verteilung im Gradienten zeigen wie die "Volle-Länge"-Proteine.

Das beobachtete Molekulargewicht des tryptischen PfEmp1-Fragmentes von ca. 90 kDa (s. auch Waterkeyn *et al.*, 2001) stimmt nicht mit dem Berechneten von ca. 45 kDa überein. Wenn die hydrophobe Domäne eine Transmembranregion wäre, würde man ein kleineres Fragment von ca. 45 kDa erwarten. Die Tatsache, dass das tatsächlich beobachtete Fragment größer ist, spricht dafür, dass die hydrophobe Region intrazellulär lokalisiert ist. Diese Hypothese sollte mit der Identifikation und der Bestimmung des Molekulargewichtes des tryptischen Fragmentes von PfEmp1 mit dem MALDI-TOF-Verfahren überprüft werden. Alle Versuche hierzu blieben aber erfolglos. Das tryptische Fragment konnte nur im Western Blot nachgewiesen werden. Überraschend war, dass verschiedene Western-Blot-Signale für das tryptische Fragment von PfEmp1 detektiert wurden. Sie korrelierten mit den schon vorher beobachteten immunreaktiven Proteinen, die kleiner als das eigentliche tryptische Fragment waren. Die Migration der immunreaktiven Proteine in den sauren Bereich des IPG-Streifens stimmte mit dem berechneten isoelektrischen Punkt von 5 für das theoretische tryptische Fragment von PfEmp1, welches aus der ATS-Region und der hydrophoben Region zusammengesetzt ist, überein. Das stärkste Signal korrelierte mit dem ca. 90 kDa großem Proteinfragment und verteilte sich diffus, d. h. es schien nicht von einem Proteinfocus auszugehen. Möglicherweise erzeugte die Trypsinbehandlung eine in Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt heterogene Population des tryptischen Fragmentes von PfEmp1. Diese Erklärung erscheint aber angesichts der angewendeten Bedingungen für die Trypsinbehandlung, die die vollständige Trypsinierung des extrazellulären Teils von PfEmp1 gewährleisten, unwahrscheinlich. Die hohe Konserviertheit der ATS-Region kann ebenfalls nicht die gefundene Heterogenität der reaktiven Proteine erklären. Eine andere, hier favorisierte Möglichkeit könnte sein, dass die PfEmp1-Moleküle nicht exakt in die Knobs inseriert werden und somit zu unterschiedlichen Anteilen exponiert werden. Die mit ca. 50 kDa beobachtete Größe der kleinen immunreaktiven Proteine stimmt mit der berechneten Größe für das theoretische tryptische Fragment, also ATS und hydrophobe Region, überein. Für die anderen Fragmente (ca. 70 und 90 kDa) würde gelten, dass die hydrophoben Regionen nicht auf der Höhe der Erythrozytenmembran sondern im Zytoskelett verankert sind. Deswegen

könnte der verdaubare extrazelluläre PfEmp1-Teil kleiner sein. Insgesamt scheint also auch die externe Population von PfEmp1 keine integralen Membranproteine zu konstituieren.

4.7 Neues Transportmodell für PfEmp1

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeichnen ein neues Bild für den Transport von PfEmp1 und seine Verankerung in die Erythrozytenmembran. Das neue Modell soll im folgenden, beginnend mit der Synthese von PfEmp1, skizziert werden (Abb. 40).

Zunächst wird PfEmp1 vollständig in das Lumen des ER transloziert, wo es entweder peripher mit der ER-Membran assoziiert oder aber mit anderen Proteinen komplexiert. Über den klassischen Sekretionsweg wird das Protein, vielleicht ähnlich wie KAHRP (Wickham *et al.*, 2001), in zwei Schritten zunächst in die parasitophore Vakuole und dann über die PVM in das Zytosol der Wirtszelle sezerniert. Es war nicht möglich, im Rahmen dieser Arbeit Transportintermediate in der Vakuole zu lokalisieren oder zu arretieren. Es bleibt daher festzustellen, wie das Protein über dieses Kompartiment sezerniert wird. Vielleicht wird das Protein auch in einem 1-Schritt-Mechanismus direkt in die Wirtszelle exportiert. Wisner *et al.* (1997) diskutieren diesbezüglich ein Modell, in dem Proteine, die in die Wirtszelle exportiert werden, über ein ER-ähnliches Organell (sekundäres ER der Apikomplexa), das möglicherweise in Verbindung mit der PVM steht, sezerniert

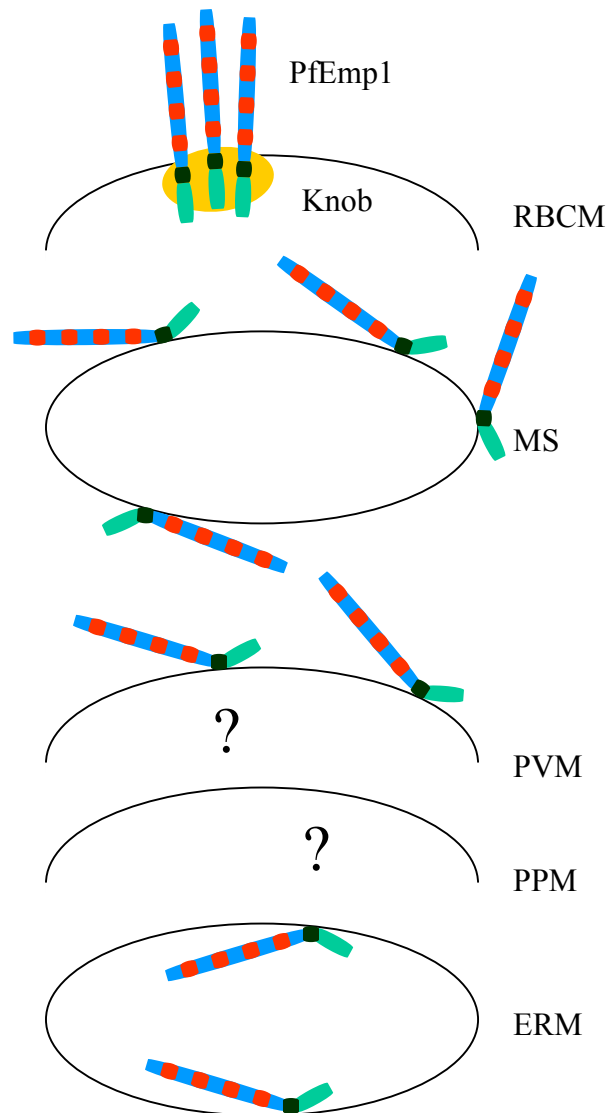


Abb. 40: Neues Modell über den Transport von PfEmp1

PfEmp1 wird als peripheres Membranprotein synthetisiert und über die ER-Membran (ERM), Parasitenplasmamembran (PPM), die parasitophore Vakuolenmembran (PVM), und die Maurer'schen Spalten (MS) in die Erythrozytenmembran (RBCM) transportiert. Dort wird PfEmp1 über den C-Terminus (grün) in die Knob-Strukturen (gelb) eingelagert. Der N-Terminus (blau-rot) des Proteins lokalisiert auf der extrazellulären Seite der Wirtszellmembran. Die hydrophobe Region von PfEmp1 (schwarz) interagiert an der Ziellmembran nur mit Proteinen.

werden. Auch hier wurden die Schlussfolgerungen aufgrund wenig überzeugender morphologischer Daten gezogen. Aussagekräftige experimentelle Beweise für dieses Modell fehlen (Mattei *et al.*, 1999a; 1999b).

Einmal in der Wirtszelle, bindet PfEmp1 als peripheres Membranprotein KAHRP und andere Mediatoren, die das Protein zunächst in Vorläuferstrukturen der Knobs verankern und später exponieren. In diesem Modell könnte der hohe Grad der Konservierung der ATS- und der hydrophoben Region von PfEmp1 ein wichtiges Indiz sein, denn er könnte bedeuten, dass in der Evolution der PfEmp1-vermittelten antigenen Variation ein Selektionsdruck auf diese Region wirkte. Die Einzigartigkeit der PfEmp1-Proteinfamilie macht einen Vergleich mit einer analogen Antigenfamilie unmöglich, so dass an dieser Stelle nur Spekulationen angestellt werden können. Es ist jedoch denkbar, dass die hydrophobe Region neben der ATS-Region bei der Interaktion des Proteins mit anderen Bindungspartnern, die gemäß des in dieser Arbeit neu postulierten Modells das Protein in die Erythrozytenmembran einlagern, eine wichtige Funktion hat und deswegen sequenz-konserviert ist. Denn es erscheint unwahrscheinlich, dass Aminosäure-Sequenzen, die mit Lipiden interagieren und nur einer Selektion unterworfen sind, die Einfluß nimmt auf Polarität oder Hydrophobizität, einen solchen Grad an Konserviertheit aufweisen.

Die Knobs stellen große Ansammlungen von Proteinen im Zytoskelett des Erythrozyten dar und verleihen der Erythrozytenmembran ein sichtbares Profil (Abb. 5). Zu der Klasse der vom Parasiten gebildeten Knob-Proteine gehören KAHRP (Crabb *et al.*, 1997), PfEmp3 (Pasloske *et al.*, 1993) und PfEmp1 (Su *et al.*, 1995; Baruch *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995); die wichtigste Knob-Komponente des erythrozytären Zytoskeletts scheint Spektrin zu sein (Kilejian *et al.*, 1991; Oh *et al.*, 2000). Es ist aber möglich, dass noch weitere Proteine am Aufbau der Knobs beteiligt sind. Die physikalischen und physiologischen Veränderungen der Erythrozytenmembran in der Nähe der Knobs wurden nie untersucht, aber man geht im allgemeinen davon aus, dass die Membran sich an diesen Stellen, ohne selber strukturelle Veränderungen durchzumachen, durch Krümmung anpasst, und dass daher die Lipiddoppelschicht über der Knob-Struktur intakt ist. Möglicherweise stimmt dieses Bild nicht. Im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist es denkbar, dass die Knob-Strukturen einen großen Einfluß auf die strukturelle Integrität der Membran nehmen, indem sie die Lipidschicht der Membran derartig stören, dass große Proteine wie PfEmp1 exponiert werden können, ohne in die Membran über einen Transmembrananker inseriert zu werden. In diesem Modell wären nur Proteine, die mit PfEmp1 wechselwirken, und das Zytoskelett als mechanisches "Widerlager" an der Verankerung des Proteins beteiligt. KAHRP und Spektrin

könnten diese Funktionen übernehmen. Konsistent mit diesem Modell ist die Beobachtung, dass durch Mikroaspiration Vesikel der reifen Erythrozytenmembran abgeschnürt werden können, die frei von Zytoskelettproteinen und integralen Membranproteinen, die mit dem Zytoskelett interagieren, sind (Knowles *et al.*, 1997). Dieser Befund belegt die hohe Fluidität der Erythrozytenmembran, die dem Zytoskelett aufliegt und dem Erythrozyten ermöglicht, durch engste Kapillargefäße quasi fließen zu können. In infizierten, Knob-positiven Erythrozyten ist daher vorstellbar, dass die Lipide aufgrund ihrer Fluidität an den Knobs auseinanderweichen und einen Teil der eingelagerten PfEmp1-Proteine freigeben können. Konsistent mit dieser Beobachtung ist auch, dass in KAHRP-Knockout-Mutanten zwar die infizierten Erythrozyten an Endothelrezeptoren adhärieren, diese Adhäsion aber stark herabgesetzt ist und unter physikalischen Bedingungen, die den hämodynamischen Verhältnissen in Blutkapillaren ähnlich sind, nicht stattfindet (Crabb *et al.*, 1997).

P. falciparum verwendet ca. 6 % seines Genoms für die Bereitstellung von beinahe 60 verschiedener Varianten der var-Gene, von denen immer nur eins exprimiert wird. (Hernandez-Rivas *et al.*, 1997). Dies belegt die Leistungsfähigkeit des menschlichen Immunsystems, denn ohne die Sicherheit eines ausreichenden Reservoirs von variablen var-Genen könnten die Parasiten nicht PfEmp1 auf der Oberfläche des Erythrozyten exponieren und gleichzeitig überleben. PfEmp1 hat für den Parasiten eine wichtige Funktion, die diesen Aufwand rechtfertigt: Die Retention der Parasiten in der Mikrovaskulatur des Blutkreislaufs, um dem Abbau in der Milz zu entkommen. Infizierte Erythrozyten verlieren unter Kulturbedingungen innerhalb weniger Wochen ihren Knob-Phänotyp, wenn sie nicht kontinuierlich auf diesen Phänotyp selektioniert werden. Solche Zellen zeigen auf ihrer Oberfläche kein oder nur sehr wenig PfEmp1 (nicht veröffentlichte Daten). Im Vergleich zu Transportprozessen in Eukaryoten, die auf eine maximale Effizienz für einen Transport zu einem Bestimmungsort selektioniert wurden, scheint der Transport von PfEmp1 zur Zelloberfläche doch sehr ineffizient zu sein. Diese Überlegungen sind mit einem grundsätzlichen konstitutiven Vesikeltransport schwer vereinbar. Man könnte daher spekulieren, dass PfEmp1 ursprünglich (oder vielleicht auch heute noch) andere Funktionen hatte und dass die Zytoadhärenz eine sekundäre Eigenschaft ist, auf die aus den genannten Gründen dann allerdings selektioniert wurde.

Für die Zellbiologie der Parasiten werden die Ergebnisse dieser Arbeit möglicherweise von großer Bedeutung sein, da sie einen neuartigen Weg aufzeigen, mit dem Proteine in Membranen inseriert werden können. Während das aktuelle Modell sich an den gut charakterisierten Transportvorgängen in eukaryoten Zellen orientiert und wahrscheinlich

falsch ist, bietet das in diesem Forschungsunterfangen Erarbeitete das Potential, neue Erkenntnisse über Proteintransport und Wechselwirkungen zwischen Proteine und Membranen, speziell in infizierten Erythrozyten, zu erlangen. Sie werden helfen, die Evolution der Wirt-Parasit-Interaktionen besser zu verstehen.

4.8 Ausblick

Die Extraktionsexperimente mit Harnstoff zeigen, dass PfEmp1 nach Dialyse gegen niedrige Harnstoff-Konzentrationen unlöslich wird und bei 100'000 g sedimentiert. Diese Beobachtung ist interessant, weil sie möglicherweise auf die Komplexbildung des Proteins bei niedrigen Harnstoffkonzentrationen zurückzuführen ist. Die Komplexbildung von PfEmp1 mit anderen Proteinen, wie sie *in situ* stattfindet, und die wahrscheinlich damit verbundene Bildung der Knobs sind völlig unbekannte Vorgänge, die aber aufgrund der medizinischen Implikationen von hohem wissenschaftlichen Interesse in der Malariaforschung sind. Man sollte daher im Anschluß an die Experimente dieser Arbeit versuchen, über das differentielle Löslichkeitsverhalten von PfEmp1 in Anwesenheit von verschiedenen Harnstoff-Konzentrationen herauszufinden, ob und welche Proteine PfEmp1 komplexiert. Die Dichtegradientenzentrifugation stellt dabei ein wertvolles Hilfsmittel dar, mit der sich unterschiedliche Komplexe, an denen PfEmp1 beteiligt ist, isolieren lassen. Die elektronenmikroskopische Untersuchung und die zweidimensionale Gelelektrophorese solcher Aggregate würden sich als analytische Methoden anbieten.

Mit rekombinanten Techniken kann man mittelfristig versuchen, die Aminosäuresequenz für ein „Minimal-PfEmp1“, welches noch auf die Oberfläche der infizierten Zelle transportiert wird, zu bestimmen und in transfizierten infizierten Erythrozyten zu exprimieren. Die DBL-Domänen des N-Terminus des Proteins sind wahrscheinlich nur an der Funktion des Proteins, nicht aber an seinem Transport beteiligt. Vorstellbar wäre ein Konstrukt, welches nur für einen kleinen Teil des N-Terminus, die hydrophobe Region und die ATS-Region kodiert. Über einen C- oder N-terminal angefügten Reporter, vorzugsweise einen kleinen „myc-Tag“, liesse sich eindeutig klären, ob alleine der C-Terminus *in situ* mit Knob-Proteinen wechselwirkt und der N-Terminus tatsächlich keine topogenen Domänen beherbergt.

Längerfristige Forschungsvorhaben könnten sich mit detaillierten Untersuchungen an den Interaktionen zwischen PfEmp1 und KAHRP bzw. PfEmp1 und Spektrin befassen. Sie scheinen zentrale Voraussetzungen für die Exposition von PfEmp1 zu sein und sind auf molekularer Ebene noch nicht gut verstanden. *In vitro* wurde bereits gezeigt, dass die ATS-

Region von PfEmp1 an KAHRP und Spektrin bindet (Oh *et al.*, 2000). Waller *et al.* (2002) vermuten, dass die Bindung an KAHRP aufgrund komplementärer Ladungen entlang der ATS-Region von PfEmp1 und bestimmten KAHRP-Domänen zustande kommt. Man könnte die relevanten Aminosäuredomänen durch sukzessive Sequenzverkürzungen der Bindungspartner identifizieren und die Bindung mit komplementären Peptiden inhibieren. Die Benutzung von komplementären Peptiden als kompetitive Inhibitoren wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um die Bindung von PfEmp1 an CD36 *in situ* zu hemmen (Cooke *et al.*, 1998). Da zur Zeit keine Techniken vorhanden sind, mit denen sich solche Peptide in infizierte Erythrozyten einbringen lassen, sollte man versuchen, vorausgesetzt, man kennt die an der Bindung zwischen KAHRP und PfEmp1 bzw. Spektrin und PfEmp1 essentiellen Domänen, inhibitorische Peptide als Teile von Fusionsproteinen unter Kontrolle eines starken Promotors (z. B. der für das HRP II-Gen) in infizierten Erythrozyten trans-dominant zu exprimieren. Das langfristige Ziel dieser Strategie ist die Unterbindung der Knobbildung und der damit verbundenen Exposition von PfEmp1 auf der Oberfläche des infizierten Erythrozyten.

5 Literatur

- Adams, S., Brown, H., und Turner, G. (2002). Breaking down the blood-brain barrier: signaling a path to cerebral malaria? *Trends Parasitol.* *18*, 360-366.
- Adisa, A., Albano, F.R., Reeder, J., Foley, M., und 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.
- Aikawa, M., Hepler, P.K., Huff, C.G., und Sprinz, H. (1966). The feeding mechanism of avian malarial parasites. *J. Cell. Biol.* *28*, 355-373.
- Aikawa, M. (1971). Plasmodium: the fine structure of malarial parasites. *Exp. Parasitol.* *30*, 284-320.
- Aikawa, M., Pongponratn, E., Tegoshi, T., Nakamura, K., Nagatake, T., Cochrane, A., und Ozaki LS. (1992). A study on the pathogenesis of human cerebral malaria and cerebral babesiosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* *87*, 297-301.
- Albano, F.R., Berman, A., La Greca, N., Hibbs, A.R., Wickham, M., Foley, M., und Tilley, L. (1999). A homologue of Sar1p localises to a novel trafficking pathway in malaria-infected erythrocytes. *Eur. J. Cell. Biol.* *78*, 453-462.
- Ansorge, I., Benting, J., Bhakdi, S., und 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., und 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.
- Anstey, N.M., Weinberg, J.B., Hassanali, M.Y., Mwaikambo, E.D., Manyenga, D., Misukonis, M.A., Arnelle, D.R., Hollis, D., McDonald, M.I., und Granger, D.L. (1996). Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J. Exp. Med.* *184*, 557-567.
- Baird, J.K., Fryauff, D.J., Basri, H., Bangs, M.J., Subianto, B., Wiady, I., Purnomo, Leksana B., Masbar, S., Richie, T.L., et al. (1995). Primaquine for prophylaxis against malaria among nonimmune transmigrants in Irian Jaya, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *52*, 479-484.
- Banerjee, R., Liu, J., Beatty, W., Pelosof, L., Klemba, M., und Goldberg DE. (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.
- Barlowe, C. (2000). Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic* *1*, 371-377.
- Baruch, D.I., Pasloske, B.L., Singh, H.B., Bi, X., Ma, X.C., Feldman, M., Taraschi, T.F., und 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., Gormely, J.A., Ma, C., Howard, R.J., und Pasloske, B.L. (1996). *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *93*, 3497-3502.
- Baruch, D.I., Gamain, B., Barnwell, J.W., Sullivan, J.S., Stowers, A., Galland, G.G., Miller, L.H., und Collins, W.E. (2002). Immunization of Aotus monkeys with a functional domain of the *Plasmodium falciparum* variant antigen induces protection against a lethal parasite line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *99*, 3860-3865.
- Baumeister, S., Endermann, T., Charpian, S., Nyalwidhe, J., Durantou, C., Huber, S., Kirk, K., Lang, F., und Lingelbach K. (2003). A biotin derivative blocks parasite induced novel permeation pathways in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* *132*, 35-45.
- Beckers, C.J., Dubremetz, J.F., Mercereau-Puijalon, O., und Joiner, K.A. (1994). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J Cell Biol.* *127*, 947-61.
- Beeson, J.G., Rogerson, S.J., Cooke, B.M., Reeder, J.C., Chai, W., Lawson, A.M., Molyneux, M.E., und Brown, G.V. (2000). Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria. *Nat. Med.* *6*, 86-90.

- Benting, J., Mattei, D., und Lingelbach, K. (1994). Brefeldin A inhibits transport of the glycoprotein-binding protein from *Plasmodium falciparum* into the host erythrocyte. *Biochem. J.* *300*, 821-826.
- Berendt, A.R., Ferguson, D.J., Gardner, J., Turner, G., Rowe, A., McCormick, C., Roberts, D., Craig, A., Pinches, R., und Elford, B.C. (1994). Molecular mechanisms of sequestration in malaria. *Parasitology* *108*, 19-28.
- Bhakdi, S., Roth, M., Szigoleit, A., und Trantum-Jensen, J. (1984): Isolation and identification of two hemolytic forms of streptolysin-O. *Infect. Immun.* *46*; 394-400.
- Bhakdi, S., Weller, U., Walev, I., Martin, E., Jonas, D., und Palmer, M. (1993). A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Med. Microbiol. Immunol.* *182*, 167-175.
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J., und Gotschlich, E.C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* *136*, 175-179.
- Bligh, G., und Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* *37*, 911-917.
- Blisnick, T., Morales-Betoulle, M.E., Barale, J.C., Uzureau, P., Berry, L., Desroses, S., Fujioka, H., Mattei, D., und Braun-Breton, C. (2000). Pfsbp1, a Maurer's cleft *Plasmodium falciparum* protein, is associated with the erythrocyte skeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* *111*, 107-121.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *7*, 248-254.
- Bras, G.L., Teschner, W., Deville-Bonne, D., und Garel, J.R. (1989). Urea-induced inactivation, dissociation, and unfolding of the allosteric phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* *28*, 6836-6841.
- Braun-Breton, C., Rosenberry, T.L., und da Silva, L.P. (1988). Induction of the proteolytic activity of a membrane protein in *Plasmodium falciparum* by phosphatidyl inositol-specific phospholipase C. *Nature* *332*, 457-459.
- Buffet, P.A., Gamain, B., Scheidig, C., Baruch, D., Smith, J.D., Hernandez-Rivas, R., Pouvelle, B., Oishi, S., Fujii, N., Fusai, T., Parzy, D., Miller, L.H., Gysin, J., und Scherf, A. (1999). Plasmodium falciparum domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placental infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *96*, 12743-12748.
- Bull, P.C., Lowe, B.S., Kortok, M., Molyneux, C.S., Newbold, C.I., und Marsh, K. (1998). Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat. Med.* *4*, 358-360.
- Bull, P.C., Lowe, B.S., Kortok, M., und Marsh, K. (1999). Antibody recognition of Plasmodium falciparum erythrocyte surface antigens in Kenya: evidence for rare and prevalent variants. *Infect. Immun.* *67*, 733-739.
- Burghaus, P.A., und 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.
- Calderwood, M.S., Gannoun-Zaki, L., Wellems, T.E., und Deitsch, K.W. (2003). Plasmodium falciparum var genes are regulated by two regions with separate promoters, one upstream of the coding region and a second within the intron. *J. Biol. Chem.* *278*, 34125-34132.
- Chasis, J.A., Mohandas, N., und Shohet SB. (1985). Erythrocyte membrane rigidity induced by glycoprotein A-ligand interaction. Evidence for a ligand-induced association between glycoprotein A and skeletal proteins. *J. Clin. Invest.* *75*, 1919-1926.
- Chen, Q., Fernandez, V., Sundstrom, A., Schlichtherle, M., Datta, S., und Hagblom, P., Wahlgren M. (1998). Developmental selection of var gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Nature* *394*, 392-395.
- Chishti, A.H., Andrabi, K.I., Derick, L.H., Palek, J., und Liu, S.C. (1992). Isolation of skeleton-associated knobs from human red blood cells infected with malaria parasite Plasmodium falciparum. *Mol. Biochem. Parasitol.* *52*, 283-287.
- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., McGready, R., Proux, S., Newton, P., Pukrittayakamee, S., Looareesuwan, S., und White, N.J. (2002). Central role of the spleen in malaria parasite clearance. *J. Infect. Dis.* *185*, 1538-1541.

- Civenni, G., Test, S.T., Brodbeck, U., und Butikofer, P. (1998). In vitro incorporation of GPI-anchored proteins into human erythrocytes and their fate in the membrane. *Blood* *91*, 1784-1792.
- Clark, I.A., Rockett, R.A., und Cowden, W.B. (1993a). TNF in cerebral malaria. *Q. J. Med.* *86*, 217-218.
- Clark, I.A., Cowden, W.B., und Rockett, K.A. (1993b). Nitric oxide and cerebral malaria. *Lancet*. *341*, 632-623.
- Clark, I.A., und Rockett, K.A. (1996). Nitric oxide and parasitic disease. *Adv. Parasitol.* *37*, 1-56.
- Clark, I.A., und Schofield, L. (2000). Pathogenesis of malaria. *Parasitol. Today*. *16*, 451-4.
- Cohen, S., McGregor, I.A., Carrington, S. (1961). Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nauchni Tr. Vissh. Med. Inst. Sofiia*. *192*, 733-737.
- Cooke, B.M., Nicoll, C.L., Baruch, D.I., und Coppel, R.L. (1998). A recombinant peptide based on PfEMP-1 blocks and reverses adhesion of malaria-infected red blood cells to CD36, under flow. *Mol. Microbiol.* *30*, 83-90.
- Costa, F.T., Fusai, T., Parzy, D., Sterkers, Y., Torrentino, M., Douki, J.B., Traore, B., Petres, S., Scherf, A., und Gysin, J. (2003). Immunization with recombinant duffy binding-like-gamma3 induces pan-reactive and adhesion-blocking antibodies against placental chondroitin sulfate A-binding Plasmodium falciparum parasites. *J. Infect. Dis.* *188*, 153-164.
- Crabb, B.S., Cooke, B.M., Reeder, J.C., Waller, R.F., Caruana, S.R., Davern, K.M., Wickham, M.E., Brown, G.V., Coppel, R.L., und Cowman, A.F. (1997). Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere, under physiological shear stress. *Cell* *89*, 287-296.
- Da Silva, E., Foley, M., Dluzewski, A.R., Murray, L.J., Anders, R.F., und Tilley, L. (1994). The Plasmodium falciparum protein RESA interacts with the erythrocyte cytoskeleton and modifies erythrocyte thermal stability. *Mol. Biochem. Parasitol.* *66*, 59-69.
- Day, K.P., und Marsh, K. (1991). Naturally acquired immunity to Plasmodium falciparum. *Immunol. Today* *12*, A 68-71.
- de Castro, F.A., Ward, G.E., Jambou, R., Attal, G., Mayau, V., Jaureguiberry, G., Braun-Breton, C., Chakrabarti, D., und 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.
- Deitsch, K.W., Calderwood, M.S., und Wellems, T.E. (2001). Malaria. Cooperative silencing elements in var genes. *Nature* *412*, 875-876.
- Desai, S.A., und Rosenberg, R.L. (1997). Pore size of the malaria parasite's nutrient channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *94*, 2045-2049.
- Desai, S.A. (1999). A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. *Novartis Found. Symp.* *226*, 89-95; Diskussion 95-98.
- Desai, S.A., Bezrukov, S.M., und Zimmerberg, J. (2000). A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature* *406*, 1001-1005.
- Doms, R.W., Russ, G., und Yewdell, J.W. (1989). Brefeldin A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* *109*, 61-72.
- Durantón, C., Huber, S.M., und Lang, F. (2002). Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells. *J. Physiol.* *539*, 847-55.
- Eda, S., und Sherman I.W. (2002). Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. *Cell. Physiol. Biochem.* *12*, 373-384.
- Edozien, J.C. (1964). Comments on immunization against malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *13*, 233-234.
- Egan, T.J. (2002). Four aspartic proteases occur in the Plasmodium falciparum food vacuole. *Trends Parasitol.* *18*, 150.
- Elmendorf, H.G., und 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., und 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.

- Favre, N., Da Laperousaz, C., Ryffel, B., Weiss, N.A., Imhof, B.A., Rudin, W., Lucas, R., und Piguët, P.F. (1999). Role of ICAM-1 (CD54) in the development of murine cerebral malaria. *Microbes Infect.* *1*, 961-968.
- Fischer, K., Marti, T., Rick, B., Johnson, D., Benting, J., Baumeister, S., Helmbrecht, C., Lanzer, M., und 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.
- Flick, K., Scholander, C., Chen, Q., Fernandez, V., Pouvelle, B., Gysin, J., und Wahlgren, M. (2001). Role of onimmune IgG bound to PfEMP1 in placental malaria. *Science* *293*, 2098-2100.
- Freitas-Junior, L.H., Bottius, E., Pirrit, L.A., Deitsch, K.W., Scheidig, C., Guinet, F., Nehrbass, U., Wellems, T.E., und Scherf A. (2000). Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature* *407*, 1018-1022.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S., und Lazarow, P.B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell. Biol.* *93*, 97-102.
- Gamain, B., Gratepanche, S., Miller, L.H., und Baruch, D.I. (2002). Molecular basis for the dichotomy in *Plasmodium falciparum* adhesion to CD36 and chondroitin sulfate A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *99*, 10020-10024.
- Gardner, J.P., Pinches, R.A., Roberts, D.J., und Newbold, C.I. (1996). Variant antigens and endothelial receptor adhesion in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *93*, 3503-3508.
- Garnham, P.C. (1970). The role of the spleen in protozoal infections with special reference to splenectomy. *Acta Trop.* *27*, 1-14.
- Ginsburg, H., Kutner, S., Krugliak, M., und Cabantchik, Z.I. (1985). Characterization of permeation pathways appearing in the host membrane of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* *14*, 313-322.
- Giribaldi, G., Ulliers, D., Mannu, F., Arese, P., und Turrini, F. (2001). Growth of *Plasmodium falciparum* induces stage-dependent haemichrome formation, oxidative aggregation of band 3, membrane deposition of complement and antibodies, und phagocytosis of parasitized erythrocytes. *Br. J. Haematol.* *113*, 492-499.
- Goodyer, I.D., Pouvelle, B., Schneider, T.G., Trelka, D.P., und Taraschi, T.F. (1997). Characterization of macromolecular transport pathways in malaria-infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* *87*, 13-28.
- Gormley, J.A., Howard, R.J., und 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.
- Glenister, F.K., Coppel, R.L., Cowman, A.F., Mohandas, N., und Cooke, B.M. (2002). Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. *Blood* *99*, 1060-1063.
- Graham, J. (2001). *Biological Centrifugation*. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford.
- Griffiths, M.J., Ndungu, F., Baird, K.L., Muller, D.P., Marsh, K., und Newton, C.R. (2001). Oxidative stress and erythrocyte damage in Kenyan children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Br. J. Haematol.* *113*, 486-491.
- Grobusch, M.P., Borrmann, S., Omva, J., Issifou, S., Kreamsner, P.G. (2003). Severe malaria in a splenectomised Gabonese woman. *Wien. Klein. Wochenschr.* *115*, 63-65.
- Gunther, K., Tummler, M., Arnold, H.H., Ridley, R., Goman, M., Scaife, J.G., und Lingelbach K. (1991). An exported protein of *Plasmodium falciparum* is synthesized as an integral membrane protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* *46*, 149-157.
- Gysin, J., Moisson, P., Pereira da Silva, L., und Druilhe, P. (1996). Antibodies from immune African donors with a protective effect in *Plasmodium falciparum* human infection are also able to control asexual blood forms of the parasite in Saimiri monkeys. *Res. Immunol.* *147*, 397-401.
- Haeggstrom, M., Kironde, F., Berzins, K., Chen, Q., Wahlgren, M., und Fernandez, V. (2004). Common trafficking pathway for variant antigens destined for the surface of the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte. *Mol. Biochem. Parasitol.* *133*, 1-14.
- Hann, B.C., und Walter, P. (1991). The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. *Cell* *67*, 131-144.

- Hayashi, M., Taniguchi, S., Ishizuka, Y., Kim, H.S., Wataya, Y., Yamamoto, A., und 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.
- Hemmer, C.J., Hort, G., Chiwakata, C.B., Seitz, R., Egbring, R., Gaus, W., Hogel, J., Hassemer, M., Nawroth, P.P., Kern, P., und Dietrich, M. (1997). Supportive pentoxifylline in falciparum malaria: no effect on tumor necrosis factor alpha levels or clinical outcome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 397-403.
- Hernandez-Rivas, R., Mattei, D., Sterkers, Y., Peterson, D.S., Wellems, T.E., und Scherf, A. (1997). Expressed var genes are found in *Plasmodium falciparum* subtelomeric regions. *Mol. Cell. Biol.* 17, 604-611.
- Hibbs, A., und Saul, A.J. (1994). *Plasmodium falciparum*: highly mobile small vesicles in the malaria-infected red blood cell cytoplasm. *Exp. Parasitol.* 1994 79, 260-269.
- Hill, A.V., Elvin, J., Willis, A.C., Aidoo, M., Allsopp, C.E., Gotch, F.M., Gao, X.M., Takiguchi, M., Greenwood, B.M., Townsend, A.R., et al. (1992). Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 360, 434-439.
- Hoffman, S.L., Weiss, W., Mellouk, S., und Sedegah, M. (1990). Irradiated sporozoite vaccine induces cytotoxic T lymphocytes that recognize malaria antigens on the surface of infected hepatocytes. *Immunol. Lett.* 25, 33-38.
- Hoffman, S.L., Goh, L.M., Luke, T.C., Schneider, I., Le, T.P., Doolan, D.L., Sacci, J., de la Vega, P., Dowler, M., Paul, C., Gordon, D.M., Stoute, J.A., Church, L.W., Sedegah, M., Heppner, D.G., Ballou, W.R., und Richie, T.L. (2002). Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J. Infect. Dis.* 185, 1155-1164.
- Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavanij, S., Schwartz, A.L., und Nussenzweig, R.S. (1984). Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. *J. Immunol.* 132, 909-913.
- Holt, D.C., Gardiner, D.L., Thomas, E.A., Mayo, M., Bourke, P.F., Sutherland, C.J., Carter, R., Myers, G., Kemp, D.J., 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.
- Huber, S.M., Uhlemann, A.C., Gamper, N.L., Durantón, C., Kremsner, P.G., und Lang, F. (2002). *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl(-) channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *EMBO J.* 21, 22-30.
- Ingrosso, D., D'angelo, S., di Carlo, E., Perna, A.F., Zappia, V., und Galletti, P. (2000). Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress. *Eur. J. Biochem.* 267, 4397-4405.
- Israeli, A., Shapiro, M., und Ephros, M.A. (1987). *Plasmodium falciparum* malaria in an asplenic man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 233-234.
- Jarolim, P., Lahav, M., Liu, S.C., und Palek, J. (1990). Effect of hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of heme. *Blood* 76, 2125-2131.
- Jeffrey, H.C., und Leach, R. M. (1999). *Roche Lexikon Medizin*, 4.Auflage. © Urban & Fischer Verlag, München.
- Jollow, D.J., und McMillan, D.C. (2001) Oxidative stress, glucose-6-phosphate dehydrogenase and the red cell. *Adv. Exp. Med. Biol.* 500, 595-605.
- Johnson, D., Gunther, K., Ansoorge, I., Benting, J., Kent, A., Bannister, L., Ridley, R., und Lingelbach, K. (1994). Characterization of membrane proteins exported from *Plasmodium falciparum* into the host erythrocyte. *Parasitology* 109, 1-9.
- Karunaweera, N.D., Carter, R., Grau, G.E., Kwiatkowski, D., Del Giudice, G., und Mendis, K.N. (1992a). Tumour necrosis factor-dependent parasite-killing effects during paroxysms in non-immune *Plasmodium vivax* malaria patients. *Clin. Exp. Immunol.* 88, 499-505.
- Karunaweera, N.D., Grau, G.E., Gamage, P., Carter, R., und Mendis, K.N. (1992b). Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89, 3200- 3203.

- Kaul, D.K., Roth, E.F. Jr., Nagel, R.L., Howard, R.J., und Handunnetti, S.M. (1991). Rosetting of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells with uninfected red blood cells enhances microvascular obstruction, under flow conditions. *Blood* 78, 812-821.
- Kilejian, A., Rashid, M.A., Aikawa, M., Aji, T., und Yang, Y.F. (1991). Selective association of a fragment of the knob protein with spectrin, actin and the red cell membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 175-181.
- Kim, H., Melen, K., und von Heijne, G. (2003). Topology models for 37 *Saccharomyces cerevisiae* membrane proteins based on C-terminal reporter fusions and predictions. *J. Biol. Chem.* 278, 10208-10213.
- Kirk, K., und Horner, H.A. (1995). In search of a selective inhibitor of the induced transport of small solutes in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: effects of arylaminobenzoates. *Biochem. J.* 311, 761-768.
- Kirk, K., Tilley, L., und Ginsburg, H. (1999). 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.
- Knapp, B., Nau, U., Hundt, E., und Kupper, H.A. (1991). A new blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* highly homologous to the serine-stretch protein SERP. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 1-13.
- Knowles, D.W., Tilley, L., Mohandas, N., und Chasis, J.A. (1997). Erythrocyte membrane vesiculation: model for the molecular mechanism of protein sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94, 12969-12974.
- Kolakovich, K.A., Gluzman, I.Y., Duffin, K.L., und Goldberg, D.E. (1997). Generation of hemoglobin peptides in the acidic digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* implicates peptide transport in amino acid production. *Mol. Biochem. Parasitol.* 87, 123-135.
- Kreier, J.P. (1977). The isolation and fractionation of malaria-infected cells. *Bull. World Health Organ.* 55, 317-331.
- Kriek, N., Tilley, L., Horrocks, P., Pinches, R., Elford, B.C., Ferguson, D.J., Lingelbach, K., und Newbold, C.I. (2003). Characterization of the pathway for transport of the cytoadherence-mediating protein, PfEMP1, to the host cell surface in malaria parasite-infected erythrocytes. *Mol. Microbiol.* 50, 1215-1227.
- Kuhlman, P.A. (2000). Characterization of the actin filament capping state in human erythrocyte ghost and cytoskeletal preparations. *Biochem. J.* 349, 105-111.
- Kutay, U., Hartmann, E., und Rapoport, T.A. (1993). A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Cell. Biol.* 3, 72-75.
- Kutay, U., Ahnert-Hilger, G., Hartmann, E., Wiedenmann, B., und Rapoport, T.A. (1995). Membrane insertion and targeting of a v-SNARE. *Trends Cell. Biol.* 5, 151.
- Kwiatkowski, D., Cannon, J.G., Manogue, K.R., Cerami, A., Dinarello, C.A., und Greenwood B.M. (1989). Tumour necrosis factor production in *Falciparum* malaria and its association with schizont rupture. *Clin. Exp. Immunol.* 77, 361-366.
- Kwiatkowski, D., Hill, A.V., Sambou, I., Twumasi, P., Castracane, J., Manogue, K.R., Cerami, A., Brewster, D.R., und Greenwood B.M. (1990). TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, und uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet.* 336, 1201-1204.
- Kwiatkowski, D., Molyneux, M.E., Stephens, S., Curtis, N., Klein, N., Pointaire, P., Smit, M., Allan, R., Brewster, D.R. Grau, G.E., et al. (1993). Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria. *Q. J. Med.* 86, 91-98.
- Kyes, S.A., Rowe, J.A., Kriek, N., und Newbold, C.I. (1999). Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96, 9333-9338.
- Kyes, S., Pinches, R., und Newbold, C. (2000). A simple RNA analysis method shows var and rif multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 105, 311-315.
- Laemmli, U.K. (1979). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Langreth, S.G., Jensen, J.B., Reese, R.T., und Trager W. (1978). Fine structure of human malaria in vitro. *J. Protozool.* 25, 443-452.

- Larsson, T., Norbeck, J., Karlsson, H., Karlsson, K.A., und Blomberg, A. (1997). Identification of two-dimensional gel electrophoresis resolved yeast proteins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* *18*, 418-423.
- Lauer, S.A., Rathod, P.K., Ghori, N., und Haldar, K. (1997). A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science* *276*, 1122-1125.
- Lauer, S., VanWye, J., Harrison, T., McManus, H., Samuel, B.U., Hiller, N.L., Mohandas, N., und Haldar, K. (2000). Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *EMBO J.* *19*, 3556-3564.
- Leech, J.H., Barnwell, J.W., Miller, L.H., und Howard, R.J. (1984). Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Exp. Med.* *159*, 1567-1575.
- Lingelbach, K. (1997). Protein trafficking in the *Plasmodium-falciparum*-infected erythrocyte-from models to mechanisms. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* *91*, 543-549.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L.C., Bonifacino, J.S., und Klausner, R.D. (1989). Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell*, *56* 801-813.
- Looareesuwan, S., Wilairatana, P., Vannaphan, S., Wanaratana, V., Wenisch, C., Aikawa, M., Brittenham, G., Graninger, W., und Wernsdorfer, W.H (1998). Pentoxifylline as an ancillary treatment for severe falciparum malaria in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *58*, 348-353.
- Ma, N., Hunt, N.H., Madigan, M.C., und Chan-Ling, T. (1996). Correlation between enhanced vascular permeability, up-regulation of cellular adhesion molecules and monocyte adhesion to the endothelium in the retina during the development of fatal murine cerebral malaria. *Am. J. Pathol.* *149*, 1745-1762.
- Macintyre, S.S. (1992). Regulated export of a secretory protein from the ER of the hepatocyte: a specific binding site retaining C-reactive protein within the ER is downregulated during the acute phase response. *J. Cell. Biol.* *118*, 253-265.
- Magowan, C., Coppel, R.L., Lau, A.O., Moronne, M.M., Tchernia, G., und Mohandas, N. (1995). Role of the *Plasmodium falciparum* mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA/PfEMP-2) in malarial infection of erythrocytes. *Blood* *86*, 3196-3204.
- Marsh, K., Otoo, L., Hayes, R.J., Carson, D.C., und Greenwood, B.M. (1989). Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *83*, 293-303.
- Martinez, S.L., Clavijo, C.A., und 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., und 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; Diskussion 227-230.
- Mattei, D., Ward, G.E., Langsley, G., und Lingelbach, K. (1999b). Novel secretory pathways in *Plasmodium*? *Parasitol. Today* *15*, 235-237.
- Mazier, D., Miltgen, F., Nudelman, S., Nussler, A., Renia, L., Pied, S., Goma, J., und Gentilini, M. (1988). Pre-erythrocytic stages of plasmodia. Role of specific and nonspecific factors. *Biol. Cell.* *64*, 165-172.
- McGregor, I.A. (1964). The passive transfer of human malarial immunity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *13*, 237-239.
- Melen, K., Krogh, A., und von Heijne, G. (2003). Reliability measures for membrane protein topology prediction algorithms. *J. Mol. Biol.* *327*, 735-744.
- Menard, R. (2001). Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite. *Cell. Microbiol.* *3*, 63-73.
- Mohandas, N., Chasis, J.A., und Shohet, S.B. (1983). The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. *Semin. Hematol.* *20*, 225-242.
- Nacer, A., Berry, L., Slomianny, C., und Mattei, D. (2001). *Plasmodium falciparum* signal sequences: simply sequences or special signals? *Int. J. Parasitol.* *31*, 1371-1379.

- Nacher, M., Singhasivanon, P., Silachamroon, U., Treeprasertsuk, S., Tosukhowong, T., Vannaphan, S., Gay, F., Mazier, D., und Looareesuwan, S. (2002). Decreased hemoglobin concentrations, hyperparasitemia, und severe malaria are associated with increased *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage. *J. Parasitol.* *88*, 97-101.
- Nagao, E., Kaneko, O., und Dvorak, J.A. (2000). *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: qualitative and quantitative analyses of parasite-induced knobs by atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* *130*, 34-44.
- Naik, R.S., Branch, O.H., Woods, A.S., Vijaykumar, M., Perkins, D.J., Nahlen, B.L., Lal, A.A., Cotter, R.J., Costello, C.E., Ockenhouse, C.F., Davidson, E.A., und Gowda, D.C. (2000). Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J. Exp. Med.* *192*, 1563-1576.
- Nussenzweig, V., und Nussenzweig, R.S. (1989). Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine. *Adv. Immunol.* *45*, 283-334.
- Nyalwidhe, J., Baumeister, S., Hibbs, A.R., Tawill, S., Papakrivov, J., Volker, U., und Lingelbach, K. (2002). A nonpermeant biotin derivative gains access to the parasitophorous vacuole in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes permeabilized with streptolysin O. *J. Biol. Chem.* *277*, 40005-40011.
- Ockenhouse, C.F., Klotz, F.W., Tandon, N.N., und 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.
- Ouvray, C., Bouharoun-Tayoun, H., Gras-Masse, H., Bottius, E., Kaidoh, T., Aikawa, M., Filgueira, M.C., Tartar, A., und Druilhe, P. (1994). Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood* *84*, 1594-1602.
- Ogata, K., Arakawa, M., Kasahara, T., Shioiri-Nakano, K., und Hiraoka, K. (1983). Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods. *J. Immunol. Methods* *65*, 75-82.
- Oh, S.S., Chishti, A.H., Palek, J., und Liu, S.C. (1997). Erythrocyte membrane alterations in *Plasmodium falciparum* malaria sequestration. *Curr. Opin. Hematol.* *4*, 148-154.
- Oh, S.S., Voigt, S., Fisher, D., Yi, S.J., LeRoy, P.J., Derick, L.H., Liu, S., und Chishti, A.H. (2000). *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is anchored to the actin-spectrin junction and knob-associated histidine-rich protein in the erythrocyte skeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* *108*, 237-247.
- Omodeo-Sale, F., Motti, A., Basilico, N., Parapini, S., Olliaro, P., und Taramelli, D. (2003). Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with *Plasmodium falciparum*. *Blood* *102*, 705-711.
- Ott, C.M., und Lingappa, V.R. (2002). Integral membrane protein biosynthesis: why topology is hard to predict. *J. Cell Sci.* *115*, 2003-2009.
- Pagola, S., Stephens, P.W., Bohle, D.S., Kosar, A.D., und Madsen, S.K. (2000). The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature* *404*, 307-310.
- Pasloske, B.L., Baruch, D.I., van Schravendijk, M.R., Handunnetti, S.M., Aikawa, M., Fujioka, H., Taraschi, T.F., Gormley, J.A., und Howard, R.J. (1993). Cloning and characterization of a *Plasmodium falciparum* gene encoding a novel high-molecular weight host membrane-associated protein, PfEMP3. *Mol. Biochem. Parasitol.* *59*, 59-72.
- Pasternack, G.R., Anderson, R.A., Leto, T.L., Marchesi, V.T. (1985). Interactions between protein 4.1 and band 3. An alternative binding site for an element of the membrane skeleton. *J. Biol. Chem.* *260*, 3676-3683.
- Pasvol, G., Wilson, R.J., Smalley, M.E., und Brown, J. (1978). Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* *72*, 87-88.
- Patankar, S., Munasinghe, A., Shoaibi, A., Cummings, L.M., und Wirth DF. (2001). Serial analysis of gene expression in *Plasmodium falciparum* reveals the global expression profile of erythrocytic stages and the presence of anti-sense transcripts in the malarial parasite. *Mol. Biol. Cell* *12*, 3114-3125.

- Petersen, E., Hogh, B., Marbiah, N.T., Dolopaie, E., Gottschau, A., Hanson, A.P., und Bjorkman, A. (1991). Clinical and parasitological studies on malaria in Liberian adults living, under intense malaria transmission. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 85, 577-584.
- Peyroche, A., Antonny, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J., und Jackson, C.L. (1999). Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol. Cell.* 3, 275-85.
- Pied, S., Nussler, A., Pontent, M., Miltgen, F., Matile, H., Lambert, P.H., und Mazier, D. (1989). C-reactive protein protects against preerythrocytic stages of malaria. *Infect. Immun.* 57, 278-282.
- Pologe, L.G., und Ravetch, J.V. (1986). A chromosomal rearrangement in a *P. falciparum* histidine-rich protein gene is associated with the knobless phenotype. *Nature* 322, 474-47
- Presley, J.F., Ward, T.H., Pfeifer, A.C., Siggia, E.D., Phair, R.D., und Lippincott-Schwartz, J. (2002). Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport. *Nature* 417, 187-193.
- Pryer, N.K., Salama, N.R., Schekman, R., Kaiser, und C.A. (1993). Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum in vitro. *J. Cell. Biol.* 120, 865-875.
- Raether, W., Enders, B., Hofmann, J., Schwannecke, U., Seidenath, H., Hanel, H., und Uphoff, M. (1989). Antimalarial activity of new floxacrine-related acridinedione derivatives: studies on blood schizontocidal action of potential candidates against *P. berghei* in mice and *P. falciparum* in vivo and in vitro. *Parasitol. Res.* 75, 619-26.
- Ramasamy, R. (1998). Molecular basis for evasion of host immunity and pathogenesis in malaria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1406, 10-27.
- Ramwani, J., und Mishra, R.K. (1986). Purification of bovine striatal dopamine D-2 receptor by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 261, 8894-8898.
- Reeder, J.C., Rogerson, S.J., al-Yaman, F., Anders, R.F., Coppel, R.L., Novakovic, S., Alpers, M.P., und Brown, G.V. (1994). Diversity of agglutinating phenotype, cytoadherence, and rosette-forming characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates from Papua New Guinean children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 45-55.
- Reeder, J.C., Hodder, A.N., Beeson, J.G., und Brown, G.V. (2000). Identification of glycosaminoglycan binding domains in *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 of a chondroitin sulfate A-adherent parasite. *Infect. Immun.* 68, 3923-3926.
- Riley, E.M., Allen, S.J., Wheeler, J.G., Blackman, M.J., Bennett, S., Takacs, B., Schonfeld, H.J., Holder, A.A., und Greenwood, B.M. (1992). Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol.* 14, 321-337.
- Roberts, D.J., Craig, A.G., Berendt, A.R., Pinches, R., Nash, G., Marsh, K., und Newbold, C.I. (1992). Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature.* 357, 689-692.
- Rogier, C., Ly, A.B., Tall, A., Cisse, B., und Trape, J.F. (1999). *Plasmodium falciparum* clinical malaria in Dielmo, a holoendemic area in Senegal: no influence of acquired immunity on initial symptomatology and severity of malaria attacks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 410-420.
- Romero, P., Maryanski, J.L., Cordey, A.S., Corradin, G., Nussenzweig, R.S., und Zavala, F. (1990). Isolation and characterization of protective cytolytic T cells in a rodent malaria model system. *Immunol. Lett.* 25, 27-31.
- Rosenthal, P.J., McKerrow, J.H., Aikawa, M., Nagasawa, H., und Leech, J.H. (1988). A malarial cysteine proteinase is necessary for hemoglobin degradation by *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Invest.* 82, 1560-1566.
- Roth, E. Jr. (1990). *Plasmodium falciparum* carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite. *Blood Cells* 16, 453-460; Diskussion 461-466.
- Rowe, J.A., Moulds, J.M., Newbold, C.I., und Miller, L.H. (1997). *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature* 388, 292-295.
- Rubio, J.P., Thompson, J.K., und Cowman, A.F. (1996). The var genes of *Plasmodium falciparum* are located in the subtelomeric region of most chromosomes. *EMBO J.* 15, 4069-4077.
- Sabchareon, A., Burnouf, T., Ouattara, D., Attanath, P., Bouharoun-Tayoun, H., Chantavanich, P., Foucault, C., Chongsuphajaisiddhi, T., und Druilhe,

- P. (1991). Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45, 297-308.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182, 389-400.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*, Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanni, L.A. (2001). The role of cerebral oedema in the pathogenesis of cerebral malaria. *Redox. Rep.* 6, 137-142.
- Scherf, A., Hernandez-Rivas, R., Buffet, P., Bottius, E., Benatar, C., Pouvelle, B., Gysin, J., and Lanzer, M. (1998). Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J.* 17, 5418-5426.
- Schlenstedt, G., Gudmundsson, G.H., Boman, H.G., and Zimmermann R. Structural requirements for transport of preprocecropinA and related presecretory proteins into mammalian microsomes. *J. Biol. Chem.* 267, 24328-24332.
- Schofield, L., Vivas, L., Hackett, F., Gerold, P., Schwarz, R.T., and Tachado, S. (1993). Neutralizing monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol, the dominant TNF-alpha-inducing toxin of *Plasmodium falciparum*: prospects for the immunotherapy of severe malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 87, 617-626.
- Schofield, L., Novakovic, S., Gerold, P., Schwarz, R.T., McConville, M.J., and Tachado, S.D. (1996). Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J. Immunol.* 156, 1886-1896.
- Scholtz, J.M., Barrick, D., York, E.J., Stewart, J.M., and Baldwin RL (1995). Urea unfolding of peptide helices as a model for interpreting protein unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92, 185-189.
- Schwab, J.C., Beckers, C.J., and Joiner, K.A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91, 509-513.
- Shaffer, N., Grau, G.E., Hedberg, K., Davachi, F., Lyamba, B., Hightower, A.W., Breman, J.G., and Phuc, N.D. (1991). Tumor necrosis factor and severe malaria. *J. Infect. Dis.* 163, 96-101.
- Sharma, Y.D. (1997). Knob proteins in falciparum malaria. *Indian. J. Med. Res.* 106, 53-62.
- Sherman, I.W. (1998). *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection*. ASM Press, Washington
- Singh, B., Ho, M., Looareesuwan, S., Mathai, E., Warrell, D.A., and Hommel, M. (1988). *Plasmodium falciparum*: inhibition/reversal of cytoadherence of Thai isolates to melanoma cells by local immune sera. *Clin. Exp. Immunol.* 72, 145-150.
- Slomianny, C. (1990). Three-dimensional reconstruction of the feeding process of the malaria parasite. *Blood Cells.* 16, 369-378.
- Smith, J.D., Chitnis, C.E., Craig, A.G., Roberts, D.J., Hudson-Taylor, D.E., Peterson, D.S., Pinches, R., Newbold, C.I., and Miller, L.H. (1995). Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 82, 101-110.
- Smith, J.D., Kyes, S., Craig, A.G., Fagan, T., Hudson-Taylor, D., Miller, L.H., Baruch, D.I., and Newbold, C.I. (1998). Analysis of adhesive domains from the A4VAR *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 identifies a CD36 binding domain. *Mol. Biochem Parasitol.* 97, 133-148.
- Smith, J.D., Gamain, B., Baruch, D.I., and Kyes, S. (2001). Decoding the language of var genes and *Plasmodium falciparum* sequestration. *Trends Parasitol.* 17, 538-545.
- Spitz, S. (1946). The pathology of acute falciparum malaria. *Milit. Surgeon* 99, 555.
- Spycher, C., Klonis, N., Spielmann, T., Kump, E., Steiger, S., Tilley, L., and Beck, H.P. (2003). MAHRP-1, a novel *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein, binds ferriprotoporphyrin IX and localizes to the Maurer's clefts. *J. Biol. Chem.* 278, 35373-35383.

- Su, X.Z., Heatwole, V.M., Wertheimer, S.P., Guinet, F., Herrfeldt, J.A., Peterson, D.S., Ravetch, J.A., and Wellems, T.E. (1995). The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* *82*, 89-100.
- 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.
- Svoboda, K., Schmidt, C.F., Branton, D., and Block, S.M. (1992). Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton. *Biophys. J.* *63*, 784-793.
- Swihart, A.H., Mikrut, J.M., Ketterson, J.B., and Macdonald, R.C. (2001). Atomic force microscopy of the erythrocyte membrane skeleton. *J. Microsc.* *204*, 212-25.
- Tachado, S.D., Gerold, P., McConville, M.J., Baldwin, T., Quilici, D., Schwarz, R.T., and Schofield L. (1996). Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J. Immunol.* *156*, 1897-1907.
- Tachado, S.D., Gerold, P., Schwarz, R., Novakovic, S., McConville, M., and Schofield, L. (1997). Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *94*, 4022-4027.
- Takeuchi, M., Miyamoto, H., Sako, Y., Komizu, H., and Kusumi, A. (1998). Structure of the erythrocyte membrane skeleton as observed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* *74*, 2171-2183.
- Tanaka, K., Usui, Y., and Kojo, S. (2001). Role of serum components in the binding and phagocytosis of oxidatively damaged erythrocytes by autologous mouse macrophages. *Cell. Mol. Life Sci.* *58*, 1727-1733.
- 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* *102*, 3420-3426.
- Taylor, D.W., Parra, M., Chapman, G.B., Stearns, M.E., Rener, J., Aikawa, M., Uni, S., Aley, S.B., Panton, L.J., and Howard, R.J. (1987). Localization of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 1 in the erythrocyte skeleton, under knobs. *Mol. Biochem. Parasitol.* *25*, 165-174.
- Taylor, H.M., Kyes, S.A., and Newbold, C.I. (2000). Var gene diversity in *Plasmodium falciparum* is generated by frequent recombination events. *Mol. Biochem. Parasitol.* *110*, 391-397.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *76*, 4350-4354.
- Trager, W., and Jensen, J.B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* *193*, 673-675.
- Trager, W., Zung, J., and Tershakovec, M. (1990). Initial extracellular development in vitro of erythrocytic stages of malaria parasites (*Plasmodium falciparum*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *87*, 5618-5622.
- Trager, W., and Williams, J. (1992). Extracellular (axenic) development in vitro of the erythrocytic cycle of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *89*, 5351-5355.
- 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.
- Trenholme, K.R., Gardiner, D.L., Holt, D.C., Thomas, E.A., Cowman, A.F., and Kemp, D.J. (2000). clag9: A cytoadherence gene in *Plasmodium falciparum* essential for binding of parasitized erythrocytes to CD36. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *97*, 4029-4033.
- Turner, G. (1997). Cerebral malaria. *Brain Pathol.* *7*, 569-582.

- Tusnady, G.E., und Simon, I. (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J. Mol. Biol.* *283*, 489-506
- Udeinya, I.J., Miller, L.H., McGregor, I.A., und Jensen, J.B. (1983). Plasmodium falciparum strain-specific antibody blocks binding of infected erythrocytes to amelanotic melanoma cells. *Nature* *303*, 429-431.
- Urban, B.C., Ferguson, D.J., Pain, A., Willcox, N., Plebanski, M., Austyn, J.M., und Roberts, D.J. (1999). Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature* *400*, 73-77.
- Vachon, V., Pouliot, J.F., Laprade, R., und Beliveau, R. (1991). Fractionation of renal brush border membrane proteins with Triton X-114 phase partitioning. *Biochem. Cell. Biol.* *69*, 206-211.
- van Hensbroek, M.B., Palmer, A., Onyiorah, E., Schneider, G., Jaffar, S., Dolan, G., Memming, H., Frenkel, J., Enwere, G., Bennett, S., Kwiatkowski, D., und Greenwood B. (1996). The effect of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor on survival from childhood cerebral malaria. *J. Infect. Dis.* *174*, 1091-1097.
- Van Wye, J., Ghori, N., Webster, P., Mitschler, R.R., Elmendorf, H.G., und 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.
- Voigt, S., Hanspal, M., LeRoy, P.J., Zhao, P.S., Oh, S.S., Chishti, A.H., und Liu, S.C. (2000). The cytoadherence ligand Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) binds to the P. falciparum knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) by electrostatic interactions. *Mol. Biochem. Parasitol.* *110*, 423-428.
- Waller, D., Krishna, S., Crawley, J., Miller, K., Nosten, F., Chapman, D., ter Kuile, F.O., Craddock, C., Berry, C., Holloway, P.A., et al. (1995). Clinical features and outcome of severe malaria in Gambian children. *Clin. Infect. Dis.* *21*, 577-587.
- Waller, K.L., Cooke, B.M., Nunomura, W., Mohandas, N., und Coppel, R.L. (1999). Mapping the binding domains involved in the interaction between the Plasmodium falciparum knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and the cytoadherence ligand P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). *J. Biol. Chem.* *274*, 23808-23813.
- Waller, K.L., Nunomura, W., Cooke, B.M., Mohandas, N., und Coppel, R.L. (2002). Mapping the domains of the cytoadherence ligand Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) that bind to the knob-associated histidine-rich protein (KAHRP). *Mol. Biochem. Parasitol.* *119*, 125-129.
- Waterkeyn, J.G., Wickham, M.E., Davern, K.M., Cooke, B.M., Coppel, R.L., Reeder, J.C., Culvenor, J.G., Waller, R.F., und 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.
- Werner-Meier, R., und Entzeroth, R. (1997). Diffusion of microinjected markers across the parasitophorous vacuole membrane in cells infected with Eimeria nieschulzi (Coccidia, Apicomplexa). *Parasitol. Res.* *83*, 611-613.
- Wickert, H., Wissing, F., Andrews, K.T., Stich, A., Krohne, G., und Lanzer, M. (2003). Evidence for trafficking of PfEMP1 to the surface of P. falciparum-infected erythrocytes via a complex membrane network. *Eur. J. Cell. Biol.* *82*, 271-284.
- Wickham, M.E., Rug, M., Ralph, S.A., Klonis, N., McFadden, G.I., Tilley, L., und Cowman, A.F. (2001). Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes. *EMBO J.* *20*, 5636-5649.
- Wiech, H., Stuart, R., und Zimmermann, R. (1990). Role of cytosolic factors in the transport of proteins across membranes. *Semin. Cell. Biol.* *1*, 55-63.
- Wiser, M.F., Lanners, H.N., Bafford, R.A., und 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.
- Xu, X., und Colombini, M. (1996). Self-catalyzed insertion of proteins into phospholipid membranes. *J. Biol. Chem.* *271*, 23675-23682.
- Yayon, A., Cabantchik, Z.I., und Ginsburg, H. (1984). Identification of the acidic compartment of Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. *EMBO J.* *3*, 2695-2700.

Zung, J.M., Trager, W., und Gubert, E. (1991). Initial extracellular forms of *Plasmodium falciparum*: their ultrastructure and their definition with monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88, 89-92.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Möglichkeit, unabhängig arbeiten zu können und für die kontinuierlich konstruktive Kritik. Sehr danke ich ihm auch für die Möglichkeit, für drei Monate am NIH, Washington D. C. und für 6 Wochen am IMM, Oxford, arbeiten zu können.

Herrn Prof. Dr. Uwe Maier danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens über diese Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Chris Newbold danke ich für die Möglichkeit, in seinem Labor arbeiten zu dürfen, für die Bezahlung meiner Unterkunft und für die wertvollen Diskussionen.

Herrn Dr. Nahid Azzouz danke ich für die wertvolle Hilfe bei der Lipid-Analyse. Herrn Prof. Dr. Ralph Schwarz danke ich für die Möglichkeit, die Lipidanalyse in seinem Labor durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. David Ferguson danke ich für die Einarbeitung in das Negative Staining und die Elektronenmikroskopie, sowie für die Möglichkeit, eigenständig am Elektronenmikroskop arbeiten zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Erhard Mörschel danke ich für die Hilfe bei der Elektronenmikroskopie und den fachlichen Gesprächen über Biomembranen.

Frau Marianne Johannsen und Frau Sonja Heck danke ich für die Hilfe bei der Elektronenmikroskopie und für die Entwicklung der Bilder.

Herrn Dr. Stefan Baumeister danke ich für die Hilfe bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie.

Herrn Dr. Paul Horrocks danke ich für die Hilfestellung bei der FACS-Analyse und Frau Dr. Sue Kyes für die Einarbeitung in die Northern-Analyse. Beiden danke ich für die fachlichen Gespräche über PfEmp1.

Ferner gilt mein Dank Herrn Stefan Chapien, Frau Dr. Sabine Wiek, Herrn Dr. Julius Nyalwidhe und Frau Dr. Petra Burghaus für die gute Zusammenarbeit, für wertvolle Diskussionen und eine gute Atmosphäre.

Allen weiteren Mitarbeitern danke ich für die freundliche Unterstützung und die offenen Gespräche über Wissenschaft und Allgemeines.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mich immer, und vor allem in schwierigen Zeiten, unterstützten.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Die biochemische Analyse des *Plasmodium falciparum* Zytoadhärenz Moleküls PfEmp1 zeigt einen potentiell neuen Mechanismus für die Insertion von Oberflächenproteinen in Membranen“

selbständig, 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, 3. Februar 2004

Janni Papakrivos