

Philipps



**Universität
Marburg**

**Der humane Transporter EAAT 3 ist ein Kandidat für
die Vermittlung der L-Glutamat-Aufnahme in
Plasmodium falciparum-infizierte Erythrozyten**

Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

Dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Markus Winterberg
aus Kirchen

Marburg/Lahn, 2009

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am 27.Mai.2009 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Zweitgutachter: Prof. Dr. Uwe G. Maier

Tag der mündlichen Prüfung: 05.Juni.2009

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2005 bis Mai 2009 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg in der Abteilung Parasitologie unter Betreuung von Prof. Dr. Klaus Lingelbach durchgeführt.

Während dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

Baumeister S, Winterberg M, Duranton C, Huber SM, Lang F, Kirk K, Lingelbach K. Evidence for the involvement of Plasmodium falciparum proteins in the formation of new permeability pathways in the erythrocyte membrane. *Mol Microbiol.* (2006) vol. 60 (2) pp. 493-504

Baumeister S, Winterberg M und Lingelbach K. Plasmodium-infected erythrocytes: separation of ghosts from parasite membranes. *Methods in Malaria Research.* Fifth Edition. (2008)

Baumeister S, Winterberg M und Lingelbach K. Subcellular fractionation of iRBC: use of saponin and streptolysin O. *Methods in Malaria Research.* Fifth Edition. (2008)

Winterberg M, Przyborski JM, und Lingelbach K. Kapitel: Plasmodium and Babesia. Buch: *Intracellular Niches of Microbes.* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co (2009)

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Der humane Transporter EAAT 3 ist ein Kandidat für die Vermittlung der
L-Glutamat-Aufnahme in *Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrozyten“**

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich dabei keiner anderen als den 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.

Ort, Datum

Markus Winterberg

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abbildungen	VI
III. Tabellen	IX
IV. Abkürzungen	X
V. Zusammenfassung	XI
1. Einleitung	1
1.1 Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	1
1.1.1 Geschlechtliche Vermehrung in der <i>Anopheles</i> -Mücke.....	1
1.1.2 Ungeschlechtliche Vermehrung im Menschen.....	2
1.1.2.1 Das Leberstadium.....	2
1.1.2.2 Das Blutstadium.....	3
1.2 Der Erythrozyt.....	6
1.2.1 Entstehung und Aufbau.....	6
1.2.2 Membrantransport in reifen Erythrozyten.....	7
1.2.2.1 Nährstoff- und Aminosäuretransport.....	8
1.2.2.2 Transportwege zur Instandhaltung des Erythrozyten.....	9
1.3 Die <i>Novel Permeation Pathways</i>	10
1.3.1 Die Transportleistung des Erythrozyten deckt nicht die Anforderungen des Parasiten.....	10
1.3.2 Membrantransport in infizierten Erythrozyten.....	12
1.3.4 Wodurch werden die <i>Novel Permeation Pathways</i> vermittelt?.....	14
1.3.5 Wie viele Transportwege umfassen die <i>Novel Permeation Pathways</i> ?.....	16
1.3.6 Die <i>Novel Permeation Pathways</i> : Wirt oder Parasit?.....	17
1.4.8 Die <i>Novel Permeation Pathways</i> als Medikamententarget.....	21
1.5 Zielsetzung.....	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Materialien.....	23

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	24
2.1.3 Radioaktiv markierte Substanzen.....	26
2.1.4 Antikörper.....	26
2.1.5 Proteinmarker.....	27
2.1.6 Analysesoftware.....	27
2.1.7 Sonstiges.....	27
2.1.8 Puffer, Lösungen und Medien.....	27
2.2 Methoden.....	32
2.2.1 Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i> in humanen Erythrozyten.....	32
2.2.2 Anreicherung von Trophozitenstadien (nach Trager, 1994).....	32
2.2.3 Kultivierung der Hybridomazelllinie Klon T4.....	33
2.2.4 Gewinnung von monoklonalen Antikörpern aus der Hybridomazelllinie T4.....	33
2.2.5 Hämolyseassay.....	33
2.2.6 Natriumarsenit-Behandlung humaner Erythrozyten.....	34
2.2.7 Messung des Influx radioaktiv markierter Substrate.....	34
2.2.8 Trennung von Zellen und Medium.....	35
2.2.9 Messung der Aufnahme radioaktiv markierter Substrate über die Zeit.....	36
2.2.10 Berechnung der Verteilung von radioaktiven Substanzen zwischen Zellen und dem sie umgebende Medium.....	36
2.2.11 Messung der Aufnahme radioaktiv markierter Substrate unter dem Einfluss von Inhibitoren.....	37
2.2.12 Bestimmung des Influx radioaktiver Aminosäuren in Anwesenheit von nicht-radioaktiver Aminosäuren.....	37
2.2.13 Bestimmung der Natriumabhängigkeit der L-[³ H]-Glutamat, L-[³ H]-Alanin, D-[³ H]-Glutamat und D-[³ H]-Aspartat Aufnahme.....	38
2.2.14 Untersuchung der Wirkung des Kinaseinhibitors H-9 und des Inhibitors des Ubiquitin-aktivierenden-Enzyms (E1), PRY-41, auf die Aufnahme von L-[³ H]-Glutamat.....	38
2.2.15 Proteasebehandlung intakter Zellen.....	38
2.2.16 Bestimmung des Einflusses von Proteasen auf die Natriumarsenit-induzierbare Permeabilität in Erythrozyten.....	39

2.2.17 Bestimmung des Einflusses von Chymotrypsin auf die Induzierbarkeit von Erythrozyten mit Natriumarsenit.....	39
2.2.18 Alphaxalon-Behandlung humaner Erythrozyten und Messung der induzierten Permeabilität.....	39
2.2.19 Präparation einer <i>Ghost</i> -Fraktion aus infizierten Erythrozyten.....	40
2.2.20 SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970).....	41
2.2.21 Coomassie-Färbung.....	42
2.2.22 Western-Blot (nach Towbin <i>et al.</i> 1979).....	42
2.2.23 Immundetektion.....	43
2.2.24 Immunfluoreszenzassay.....	43
2.2.25 MALDI-TOF-Analyse von Proteinen aus Polyacryamidgelen.....	44
2.2.26 Gewinnung von Peptiden aus Oberflächenproteinen von intakten infizierten Erythrozyten mit Chymotrypsin (<i>cell shaving</i>).....	46
2.2.27 MALDI-TOF-Analyse von Peptiden aus „ <i>cell shaving</i> “ Experimenten.....	47
3. Ergebnisse	48
3.1 Durch die Analyse von Chymotrypsin-generierten Peptiden intakter, infizierter Erythrozyten können Kandidaten für die <i>Novel Permeation Pathways</i> benannt werden.....	48
3.2 NKCC 1-Inhibitoren blockieren die <i>Novel Permeation Pathways</i> in infizierten Erythrozyten.....	53
3.3 NKCC 1 ist in Erythrozyten nachweisbar.....	55
3.4 NKCC 1 ist sensitiv gegenüber Chymotrypsin.....	56
3.5 Eine Behandlung mit Natriumarsenit induziert die Lyse infizierter Erythrozyten, nicht-infizierte Erythrozyten bleiben intakt.....	57
3.6 Natriumarsenit induziert in Erythrozyten eine, den NPP ähnliche, Permeabilität für L-Glutamat und D-Aspartat, jedoch nicht für L-Alanin.....	59
3.7 Die Ausprägung der induzierbaren Permeabilität ist abhängig vom Alter der Erythrozyten, sowie der Inkubationszeit und der Konzentration des Natriumarsenits.....	64
3.8 Natriumarsenit induziert einen Influx von Pantothersäure in Erythrozyten.....	67
3.9 Natriumarsenit induziert eine Permeabilität für Fosmidomycin in Erythrozyten.....	69
3.10 Über die induzierte Permeabilität wird kein Influx von Inulin vermittelt.....	70

3.11 Inhibitoren der NPP hemmen die Aufnahme von L-Glutamat und D-Aspartat über die mit Natriumarsenit induzierten Transportwege.....	71
3.12 Die mit Natriumarsenit induzierte Permeabilität zeigt die gleiche Protease-Sensitivität wie die <i>Novel Permeation Pathways</i> in infizierten Erythrozyten.....	73
3.13 Nach einer Behandlung mit Chymotrypsin ist eine erneute Induktion der Permeabilität durch Natriumarsenit möglich.....	74
3.14 Der Influx von L-Glutamat und D-Aspartat in Natriumarsenit-behandelten Erythrozyten erfolgt über denselben Transportweg.....	76
3.15 Der Glutamattransporter EAAT3 kann in Erythrozyten nachgewiesen werden.....	78
3.16 Eine Protease-Sensitivität von EAAT3 kann im Western-Blot nicht nachgewiesen werden.....	81
3.17 Die L-Glutamat-Aufnahme in induzierte und infizierte Erythrozyten ist abhängig von Natrium.....	83
3.18 Natriumarsenit-induzierte Erythrozyten sind stereoselektiv für L-Glutamat, die NPP der infizierten Erythrozyten hingegen nicht.....	84
3.19 Die Aufnahmen von D-Glutamat und L-Alanin in infizierte Erythrozyten zeigen unterschiedliche Natriumabhängigkeiten.....	85
3.20 Die <i>Novel Permeation Pathways</i> umfassen mindestens zwei Transportwege für D-/L-Glutamat, L-Alanin und D-Aspartat.....	88
3.21 Spezifische EAAT-Inhibitoren hemmen den Influx negativ geladener Substanzen in infizierte und mit Natriumarsenit induzierte Erythrozyten.....	90
3.22 EAAT3 könnte von einer Natriumarsenit-induzierten Proteinkinase aktiviert werden.....	95
3.23 Die Aktivierung von EAAT3 mit Alphaxalon induziert eine Permeabilität für L-Glutamat in Erythrozyten, die der durch Natriumarsenit hervorgerufenen ähnelt.....	97
4. Diskussion	99
4.1 Natriumarsenit aktiviert EAAT3 in humanen Erythrozyten und induziert somit eine NPP-ähnliche Permeabilität in diesen Zellen.....	100
4.2 Die Natriumarsenit-induzierte Permeabilität und die NPP werden von Kinasen reguliert.....	103
4.3 EAAT3 könnte am NPP-vermittelten Influx von L-Glutamat in infizierte Erythrozyten beteiligt sein.....	104

4.4 Die Natriumarsenit-induzierte Permeabilität in nicht-infizierten Erythrozyten und die NPP in infizierten Erythrozyten zeigen die gleiche Proteasesensitivität.....	106
4.5 Die <i>Novel Permeation Pathways</i> umfassen mindestens drei Transportwege für Aminosäuren.....	107
4.6 Neben EAAT3 wird auch NKCC1 durch Natriumarsenit aktiviert und könnte eine Rolle bei der Vermittlung der NPP spielen.....	111
4.7 Ausblick.....	112
5. Literatur	113
VI. Danksagung	XII
V. Lebenslauf	XIII

II. Abbildungen

Abb. 1.1: Geschlechtliche Vermehrung von <i>Plasmodium falciparum</i> in der <i>Anopheles</i> -Mücke.....	2
Abb. 1.2: Ungeschlechtliche Vermehrung von <i>P. falciparum</i> im Menschen.....	4
Abb. 1.3: <i>Plasmodium falciparum</i> infizierter Erythrozyt.....	5
Abb. 1.4: Transportwege in der Erythrozytenmembran.....	8
Abb. 1.5: Drei Modelle für mögliche Permeationswege in infizierten Erythrozyten.....	15
Abb. 1.6: Verschiedene Modelle für den Ursprung der NPP.....	18
Abb. 1.7: Die Wirkung von Proteasen auf die Novel <i>Permeation Pathways</i>	20
Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Trennung von Medium und Zellen.....	35
Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Phasen die bei einer <i>Ghost</i> -Präparation entstehen.....	40
Abb. 3.1: Massenspektrum der durch die Behandlung intakter, infizierter Erythrozyten mit Chymotrypsin generierten Peptide.....	49
Abb. 3.2: Chromatogramm der aufgetrennten Peptidmischung.....	50
Abb. 3.3: Furosemid, NPPB, Bumetanid und Ouabain inhibieren die Hämolyse infizierter Erythrozyten.....	54
Abb. 3.4: NKCC1 ist in Erythrozyten mit dem von Lytle und Forbush (1995) generierten Antikörper detektierbar.....	55
Abb. 3.5: NKCC1 wird durch Chymotrypsin, jedoch nicht durch Trypsin proteolytisch gespalten.....	56
Abb. 3.6: Eine Behandlung mit Natriumarsenit führt in infizierten, jedoch nicht in uninfizierten Erythrozyten zu einer Lyse der Zellen.....	58
Abb. 3.7: Die polaren Aminosäuren L-Serin und L-Tyrosin werden in gleichem Maße von infizierten, induzierten und unbehandelten Erythrozyten aufgenommen.....	60
Abb. 3.8: Die positiv geladene Aminosäure L-Lysin wird in gleichem Maße von infizierten, induzierten und unbehandelten Erythrozyten aufgenommen.....	61
Abb. 3.9: Die unpolare Aminosäure L-Alanin wird nur von infizierten Erythrozyten und nicht von induzierten und unbehandelten Erythrozyten aufgenommen.....	62

Abb. 3.10: Infizierte und mit Natriumarsenit-behandelte Erythrozyten besitzen eine ähnliche Permeabilität für die negativ geladenen Aminosäuren L-Glutamat und D-Aspartat.	63
Abb. 3.11: Die in Erythrozyten mit Natriumarsenit induzierbare L-Glutamat-Permeabilität erreicht nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten ihr Maximum.	65
Abb. 3.12: Die Ausprägung der in Erythrozyten induzierbaren Permeabilität für L-Glutamat ist abhängig von der Natriumarsenit-Konzentration.	66
Abb. 3.13: Die Induzierbarkeit der Erythrozyten mit Natriumarsenit ist abhängig vom Alter der Zellen.	67
Abb. 3.14: Infizierte und mit Natriumarsenit induzierte Erythrozyten weisen eine Permeabilität für Pantothensäure auf.	68
Abb. 3.15: Die Induktion mit Natriumarsenit führt in Erythrozyten zu einer Permeabilität für Fosmidomycin.	69
Abb. 3.16: Methoxy- ^3H -Inulin wird nicht in Natriumarsenit-induzierte Erythrozyten aufgenommen.	71
Abb. 3.17: Der Natriumarsenit-induzierte Influx von L- ^3H -Glutamat und D- ^3H -Aspartat kann mit bekannten Inhibitoren der NPP konzentrationsabhängig inhibiert werden.	72
Abb. 3.18: Chymotrypsin, jedoch nicht Trypsin, inhibiert den Influx von L- ^3H -Glutamat in Natriumarsenit-behandelte Erythrozyten.	74
Abb. 3.19: Der Influx von L- ^3H -Glutamat in mit Natriumarsenit behandelte Erythrozyten kann nach einer Chymotrypsin-Behandlung erneut induziert werden.	75
Abb. 3.20: L-Glutamat und D-Aspartat inhibieren kompetitiv die Aufnahme von L- ^3H -Glutamat und D- ^3H -Aspartat in infizierte und Natriumarsenit-induzierte Erythrozyten.	77
Abb. 3.21: EAAT3 und PRA1 sind in Erythrozyten nachweisbar, EAAT5 nicht.	79
Abb. 3.22: Der Glutamattransporter EAAT3 ist mittels Immunfluoreszenzassay in Erythrozyten nachweisbar.	80
Abb. 3.23: EAAT3 scheint nicht sensitiv gegenüber Trypsin und Chymotrypsin.	82
Abb. 3.24: Die Aufnahme von L- ^3H -Glutamat in Natriumarsenit-induzierte Erythrozyten ist streng natriumabhängig, der Influx von L- ^3H -Glutamat in infizierte Erythrozyten nur bedingt.	83

Abb. 3.25: Natriumarsenit induziert keine Permeabilität für D-[³ H]-Glutamat in Erythrozyten.....	85
Abb. 3.26: Die Aufnahme von D-[³ H]-Glutamat in infizierte Erythrozyten ist nicht an Natrium gebunden.....	86
Abb. 3.27: Die Aufnahme von L-[³ H]-Alanin in infizierte Erythrozyten ist zu einem überwiegenden Teil abhängig von Natrium.....	87
Abb. 3.28: Konkurrenz der Aufnahme von L-[³ H]-Glutamat, D-[³ H]-Glutamat, D-[³ H]-Aspartat und L-[³ H]-Alanin in infizierten Erythrozyten mit L-Glutamat, D-Glutamat, D-Aspartat und L-Alanin.....	89
Abb. 3.29: Die EAAT-Inhibitoren <i>cis</i> -ACBD und HIP-A hemmen die Aufnahme von L-[³ H]-Glutamat und D-[³ H]-Aspartat in infizierte und Natriumarsenit-induzierte Erythrozyten.....	91
Abb. 3.30: <i>cis</i> -ACBD und HIP-A inhibieren neben der Aufnahme von L-[³ H]-Glutamat auch den Influx von [³ H]-Pantothensäure in infizierte und Natriumarsenit-induzierte Erythrozyten.....	93
Abb. 3.31: HIP-A und <i>cis</i> -ACBD haben nur minimale inhibitorische Wirkung auf die Aufnahme von D-[³ H]-Glutamat und L-[³ H]-Alanin in infizierte Erythrozyten.....	94
Abb. 3.32: Der Kinaseinhibitor H-9 verhindert die Induktion einer Permeabilität für L-[³ H]-Glutamat durch Natriumarsenit.....	96
Abb. 3.33: Das Anästhetikum Alphaxalon induziert in Erythrozyten eine zu Natriumarsenit vergleichbare Permeabilität für L-[³ H]-Glutamat, jedoch nicht für L-[³ H]-Alanin.....	98
Abb.4.1: Modell der Natriumarsenit-Induktion in nicht-infizierte Erythrozyten.....	102
Abb.4.2: Mögliche Modelle zur Beteiligung von PKA an der Induktion der NPP und der Natriumarsenit-erzeugten Permeabilität.....	104
Abb.4.3: Mögliches Modell für die Aufnahme von Aminosäuren über die NPP in infizierten Erythrozyten.....	108

III. Tabellen

Tabelle 1.1: Substanzen die über die <i>Novel Permeation Pathways</i> aufgenommen werden. ...	13
Tabelle 2.1: Zusammensetzung der in den Experimenten verwendeten Gele.	42
Tabelle 3.1: Signifikant identifizierte Proteine aus der MALDI-TOF-Analyse von Chymotrypsin-generierten Peptiden.	52
Tabelle 3.2: Vergleich der Aminosäureaufnahme in nicht-infizierte, induzierte und infizierte Erythrozyten.	64
Tabelle 3.3: Vergleich der kompetitiven Inhibition radioaktiver Aminosäuren mit 100 µM nicht-radioaktiver Aminosäuren (in Prozent der Inhibition).	88
Tabelle 4.1: Vergleich der induzierbaren Permeabilitäten in nicht-infizierten Erythrozyten.	100

IV. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
asRBC	arsenite treated Red Blood Cell (Natriumarsenit-behandelter Erythrozyt)
bzw.	beziehungsweise
CPM	Counts Per Minute
ECL	Enhanced Chemiluminescence
et. al.	und andere
h	Stunde
HRP	Horse Raddish Peroxidase
iRBC	infected Red Blood Cell (infizierter Erythrozyt)
kDa	Kilodalton
Lsg.	Lösung
mA	Milliampère
mM	Millimolar
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
min	Minuten
μ Ci	Mikrocurie
μ M	Mikromolar
NC-Membran	Nitrocellulose-Membran
NPP	Novel Permeation Pathways
PPM	Parsitenplasmamembran
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
RBC	Red Blood Cell (Erythrozyt)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel

V. Zusammenfassung

Der obligat intrazelluläre Parasit *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica, vollzieht einen Teil seiner Entwicklung in humanen Erythrozyten. Aus immunologischer Sicht stellt der Erythrozyt als Wirtszelle eine sichere Umgebung dar. Er erweist sich jedoch, mit Hämoglobin als einziger Nahrungsquelle, für die Nährstoffversorgung des Parasiten als unzureichend. Im Verlauf der Infektion induziert der Parasit daher eine umfassende Permeabilitätsänderung der Plasmamembran der befallenen Wirtszelle. Diese neu induzierten Transportwege werden kollektiv als „*Novel Permeation Pathways*“ (NPP) bezeichnet. Sie dienen dem Parasiten als Aufnahmeweg für die benötigten essentiellen Nährstoffe aus dem umgebenden Plasma und zur Ausschleusung der anfallenden toxischen Stoffwechselprodukte.

Im Fokus dieser Arbeit steht die Charakterisierung des vom Parasiten induzierten Transportwegs für L-Glutamat sowie die Identifizierung der beteiligten Transportproteine.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Natriumarsenit eine den NPP ähnliche Permeabilität für L-Glutamat, D-Aspartat und Pantothensäure in nicht-infizierten Erythrozyten induziert werden kann. Dies spricht für eine Beteiligung humaner Transportproteine an den NPP. Die induzierte Permeabilität zeigt Charakteristika eines EAAT-vermittelten Transports. Sie ist stereoselektiv für das L-Enantiomer von Glutamat und weist eine strikte Abhängigkeit von Natrium auf. Ebenso kann der vermittelte Transport mit den EAAT-spezifischen Inhibitoren *cis*-ACBD und HIP-A blockiert werden. Als möglicher Kandidat für die Vermittlung der mit Natriumarsenit induzierbaren Permeabilität konnte der Glutamattransporter EAAT3 benannt werden, der in dieser Arbeit erstmals in humanen Erythrozyten nachgewiesen wurde.

Für die NPP der infizierten Erythrozyten konnte gezeigt werden, dass sie für die Aufnahme der untersuchten Aminosäuren mindestens drei unabhängige Transportwege umfassen müssen. Hierbei konnten auch Charakteristika der Natriumarsenit-induzierbaren Permeabilität bei den NPP nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass die L-Glutamat-Aufnahme in infizierten Erythrozyten zu einem Teil abhängig von Natrium ist und partiell mit EAAT-spezifischen Inhibitoren gehemmt werden kann. Dies ist ein Hinweis auf die mögliche Beteiligung von EAAT3 an der Aufnahme von L-Glutamat in infizierte Zellen.

1. Einleitung

Der Stamm der *Apicomplexa* umfasst eine Vielzahl humanpathogener Protozoen, deren Namensgebung auf dem an einem Pol der Zelle lokalisierten Apikalkomplex, einer Gruppierung verschiedener Kompartimente, beruht. Neben *Babesia* und *Toxoplasma* zählen vor allem die *Plasmodien*, die Erreger der Malaria, zu den bedeutendsten Humanpathogenen dieses Stamms. Zu den für den Menschen relevanten Arten gehören *Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* sowie *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica. Bei Malaria tropica handelt es sich um eine der schwerwiegendsten Tropenkrankheiten, die zwei- bis drei Millionen Todesopfer jährlich fordert. Sie stellt insbesondere in Afrika neben AIDS eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten dar, zu deren Opfern, im Gegensatz zu AIDS, mehrheitlich Kinder gehören. Die Verbreitung und Übertragung von *P. falciparum* ist stark an den Vektor des Parasiten die weibliche *Anopheles*-Mücke gebunden und somit auf die Tropen und Subtropen beschränkt.

1.1 Der Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

1.1.1 Geschlechtliche Vermehrung in der *Anopheles*-Mücke

Während des Stechaktes nimmt die weibliche *Anopheles*-Mücke Gametozyten über das Blut eines mit *P. falciparum* infizierten Menschen auf. Hieraus entwickeln sich, verursacht durch pH- und Temperaturänderungen, binnen kurzer Zeit Gameten ^[Vlachou et al., 2006]. Bei den männlichen Gameten kommt es zur Exflagellation, wobei bis zu acht frei bewegliche Gameten, die sogenannten Mikrogameten, entstehen. Diese fusionieren anschließend mit den weiblichen Gameten oder Makrogameten, was die Bildung einer Zygote zur Folge hat. Im Mitteldarm der Mücke reift diese zu einem mobilen Ookineten heran. Etwa 24 Stunden nach Aufnahme der Parasiten durch die Mücke durchdringen die Ookineten das Epithel des Mitteldarms und entwickelt sich an dessen basalen Seite zu einer Oozyste. Anschließend entstehen durch eine Vielzahl von Kernteilungen ohne Zellteilung aus den Oozysten sogenannte Sporoblasten. Erst nach Abschluss der Sporoblastenreifung kommt es zur Zytokinese, was die Bildung unzähliger Sporozoiten zur Folge hat, welche nach der Lyse des Sporoblasten in die Hämolymphe des Vektors entlassen werden. Erreichen die Sporozoiten das Speicheldrüsenepithel, invadieren sie dieses und akkumulieren im Speicheldrüsenang,

von wo aus sie während einer erneuten Blutmahlzeit der Mücke auf den Menschen übertragen werden.

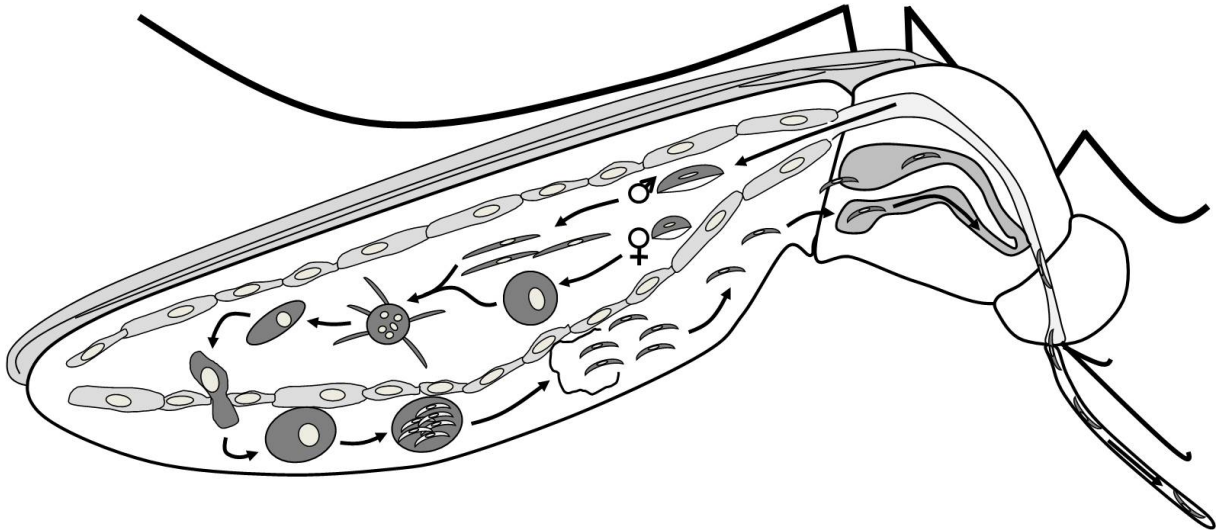


Abb. 1.1: Geschlechtliche Vermehrung von *Plasmodium falciparum* in der *Anopheles*-Mücke.

Aus den während Blutmahlzeit aufgenommenen Gametozyten entwickeln sich weiblichen und männlichen Gameten, welche durch Fusion eine Zygote bilden. Innerhalb des Mitteldarms differenziert die Zygote zum mobilen Ookineten, welcher das Darmepithel durchquert und sich an dessen basalen Seite zur Oozyste weiterentwickelt. Aus der Oozyste bilden sich mehrere Tausend Sporozoiten, die in die Hämolymphe entlassen werden. Diese invadieren anschließend die Speicheldrüse und wandern in die Speichelkanäle, von wo aus sie während einer erneuten Blutmahlzeit in den Vertebraten-Wirt injiziert werden.

1.1.2 Ungeschlechtliche Vermehrung im Menschen

Im Menschen durchläuft *P. falciparum* seine ungeschlechtliche Vermehrung. Diese ist durch zwei verschiedene Lebenszyklen, das Leberstadium und das Blutstadium, gekennzeichnet.

1.1.2.1 Das Leberstadium

Die von der Mücke beim Stechakt applizierten Sporozoiten gelangen innerhalb kürzester Zeit über Blutgefäße in die Leber (Abb. 1.2, a). Hier findet die erste der beiden ungeschlechtlichen Vermehrungsphasen, das sogenannte Leberstadium, in den Hepatozyten statt. Dabei entwickeln sich innerhalb von ein bis zwei Wochen aus jedem invadierten Sporozoiten mehrere tausende Merozoiten, die nach abgeschlossener Entwicklung in die Blutbahn entlassen werden (Abb. 1.2, b). Die vom Parasiten befallenen Zellen durchlaufen während dieses Prozesses eine dramatische Größenzunahme. Da unter physiologischen Bedingungen eine solche Anomalität zu einer Apoptose der befallenen Zelle führen würde, besteht die Annahme, dass die Regulation dieses Prozesses durch den Parasiten zu dessen

Gunsten beeinflusst wird ^[van Sand et al. 2005]. Dieses Eingreifen in den zellulären Ablauf der Wirtszelle konnte bereits für andere intrazelluläre Parasiten gezeigt werden ^[Heussler et al. 2001, 2006; Lüder et al., 2009]. Wie für *P. berghei* im Mausmodell gezeigt werden konnte, kommt es zunächst zur Ruptur der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM), die die Parasiten während ihrer Proliferation im Hepatozyten umgibt. Anschließend wird die Plasmamembran des infizierten Hepatozyten in das Lumen eines Blutgefäßes abgeschnürt, wodurch ein Merosom entsteht (Abb. 1.2, c). Dieses Merosom beinhaltet die reifen Merozoiten, die im Folgenden in die Blutbahn entlassen werden ^[Sturm et al., 2006]. Man nimmt an, dass das Merosom, welches aus Wirts-eigenem Material besteht, die in ihm enthaltenen Merozoiten vor der Erkennung durch in der Leber ansässigen Dendritischen Zellen schützt. Mit der Entlassung der Merozoiten in die Blutbahn beginnt der zweite ungeschlechtliche Vermehrungszyklus, das Blutstadium (Abb. 1.2 d).

1.1.2.2 Das Blutstadium

Beim initialen Kontakt mit dem Erythrozyten adhärirt der Merozoit an einer beliebigen Stelle der Plasmamembran der Wirtszelle. Für die Adhäsion ist das Parasiten-Oberflächenprotein MSP-1 verantwortlich ^[Goel et al., 2003]. Dieses GPI-verankerte Protein bedeckt die Oberfläche des Merozoiten und geht bei Kontakt mit dem Erythrozyten wahrscheinlich eine Interaktion mit dem Wirts-eigenen Oberflächenproteine Bande 3 ein ^[Goel et al., 2003; Li et al., 2004]. Unter Zuhilfenahme der gebildeten Adhensionspunkte rotiert der Merozoit über die Oberfläche des Erythrozyten, bis sein apikales Ende in Kontakt mit der Wirtszelloberfläche steht ^[Baum et al., 2006]. Ist der Merozoit so orientiert, dringt er aktiv unter Ausbildung der so genannten parasitophoren Vakuole (PV) in die Zelle ein. Es konnte gezeigt werden, dass die entstehende PV im späteren Verlauf der Parasitenentwicklung als Sortierungs- und Transitkompartiment für exportierte Proteine eine entscheidende Rolle spielt, was sich unter anderem in der großen Abundanz von Chaperonen äußert ^[Nyalwidhe et al., 2006].

Nach der Invasion des Erythrozyten geht der Parasit in das Ringstadium über (Abb. 1.2, e). Dieses Stadium ist vergleichsweise wenig untersucht. Es könnte zur Adaption an die veränderte Umgebung dienen, da kaum metabolische Aktivität beobachtet werden kann und der Export von Proteinen in die Wirtszelle auf wenige Proteine beschränkt bleibt ^[Bannister et al., 2006; Spielmann und Beck, 2000].

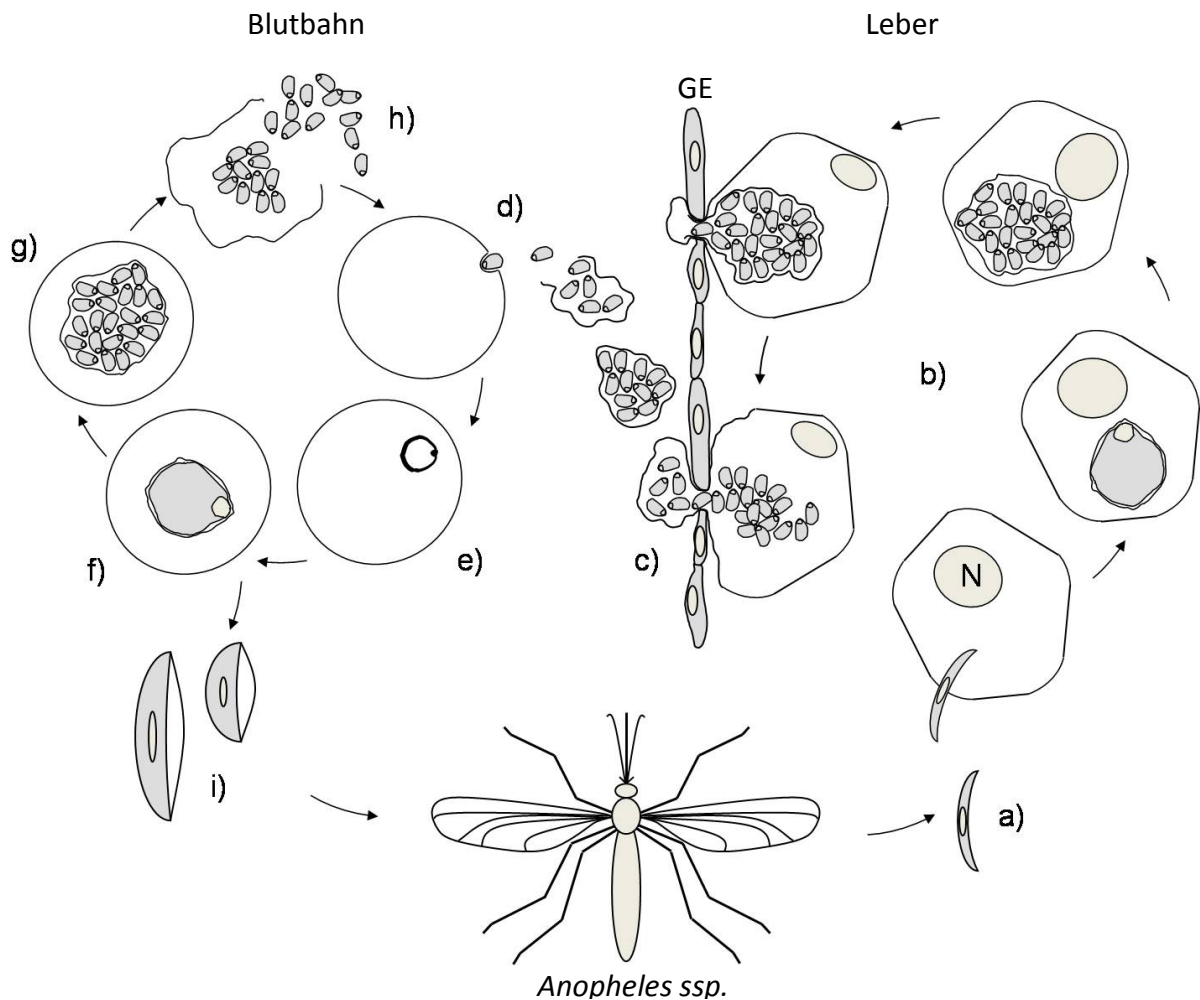


Abb. 1.2: Ungeschlechtliche Vermehrung von *P. falciparum* im Menschen.

Während der Blutmahlzeit überträgt die *Anopheles*-Mücke Sporozoiten (a), die über die Blutbahn in die Leber gelangen und dort Hepatozyten invadieren. Hier entwickeln sie sich innerhalb einer Woche zu tausenden Merozoiten (b). Am Ende des Entwicklungszyklus werden die Merozoiten in Form eines Merosoms in die Blutbahn geschleust (c), wo sie entlassen werden und Erythrozyten invadieren (d). Im Erythrozyten durchläuft der Parasit mehrere Stadien, vom Ringstadium (e) über das Trophozitenstadium (f) zum Schizontenstadium (g). Hierbei kommt es zur Entstehung neuer Merozoiten, die nach Ruptur der befallenen Zelle entlassen werden (h) und neue Erythrozyten befallen können. Unter hohen Parasitämien im Wirt kommt es durch die Differenzierung einzelner Trophoziten zur Bildung von Geschlechtszellen (i). Diese können bei der Blutmahlzeit einer *Anopheles*-Mücke auf den Vektor übertragen werden.

N: Nucleus ; GE: Gefäßwand

Ca. 20 Stunden nach der Invasion geht der Parasit in das Trophozitenstadium über (Abb. 1.2, f), was mit einer tiefgreifenden Umgestaltung des Erythrozyten durch den Parasiten verbunden ist. Neben einer hohen Proteinsynthese- und Exportrate kommt es in diesem Stadium zu einer großen Umstrukturierung der Wirtszelle. So werden, wie in Abbildung 1.3 zu erkennen, innerhalb der Wirtszelle neue Membranstrukturen, die Maurer'schen Spalten (MC) und das Tubovesikuläre Netzwerk (TVN), etabliert. Außerdem kommt es zur

1. Einleitung

Ausprägung der so genannten *knobs* (K), elektronendichten Strukturen an der Oberfläche des befallenen Erythrozyten. Diese Oberflächenstrukturen sind charakteristisch für das Trophozitenstadium. Gebildet werden sie durch die Einbindung der vom Parasiten exportierten Proteine KAHRP (Knop Associated Histidin Rich Protein) und *PfEMP3* (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 3) in das Zytoskelett des Erythrozyten. Hierdurch bildet sich die charakteristische Erhebung in der Erythrozytenmembran. Neben den strukturgebenden Proteinen KAHRP und *PfEMP3* ist *PfEMP1* (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1) das prominenteste Protein der *knobs*. *PfEMP1* gehört zu einer Familie von Proteinen, die von ca. 50 variablen Genen, den so genannten *var*-Genen, codiert werden [Smith *et al.*, 1995; Su *et al.*, 1995]. Es bindet an Rezeptoren wie ICAM-1 oder CD36 des Gefäßendothels und vermittelt so die Zytoadhärenz der infizierten Zellen [Cooke *et al.*, 2004]. Dadurch entgeht der parasitierte Erythrozyt einem Abbau in der Milz [Luse und Miller, 1971].

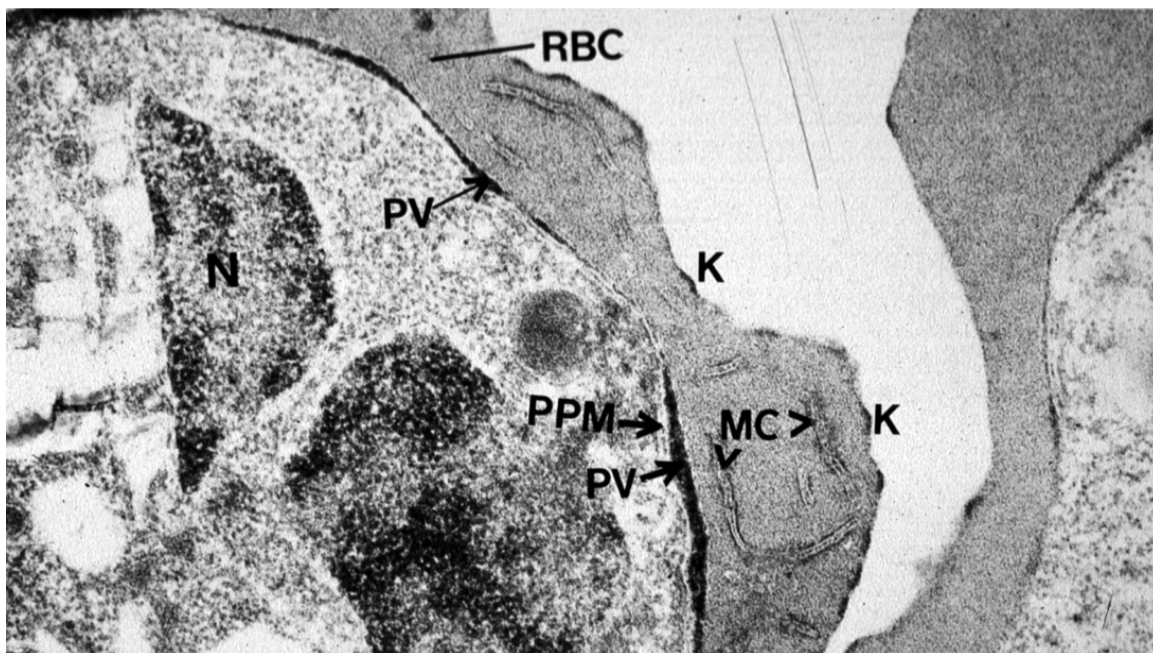


Abb. 1.3: *Plasmodium falciparum* infizierter Erythrozyt

(Nyalwidhe J., U.G. Maier und K. Lingelbach, *Zoology*, 2003. **106**: p.341-8)

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten.

K: *knobs*; MC: Maurer'schen Spalten; PPM: Parasiten Plasmamembran; PV: parasitophore Vakuole; RBC: Erythrozyt

Als Konsequenz der erhöhten Syntheseaktivität steigt auch die metabolische Aktivität des Parasiten. Neben den aus dem Abbau des Hämoglobins gewonnenen Ressourcen benötigt der Parasit eine Reihe von im Blutplasma gelösten Bestandteilen. Dazu gehören unter anderem

Isoleucin, welches im Hämoglobin nicht enthalten ist ^[Martin et al., 2007]. Im Zuge dieses erhöhten Bedarfs, beobachtet man bei mit *Plasmodium* infizierten Erythrozyten im Vergleich zu nicht infizierten Erythrozyten eine erhöhte Aufnahme einer Vielzahl von Substanzen über die Plasmamembran der infizierten Zelle ^[Kutner et al., 1983; Ginsburg et al., 1983 und 1985]. Diese vom Parasiten neu induzierten Aufnahmewege, oder *Novel Permeation Pathways* (NPP), sind ausschließlich in infizierten Erythrozyten nachweisbar und treten ab dem Trophozitenstadium auf. Sie dienen neben dem Influx von Substraten auch der Ausschleusung von Abfallprodukten, wie etwa Lactat, aus der befallenen Zelle ^[Kirk, 2001].

Ihre Bedeutung für den Parasiten wird in Kapitel 1.3 ausführlicher behandelt.

Etwa 36 Stunden nach der Invasion erreicht der Parasit das Schizontenstadium (Abb. 1.2, g). In diesem Stadium durchläuft er mehrere Kernteilungen mit anschließender Zytokinese, bei der 8-16 Merozoiten entstehen. Es gilt als wahrscheinlich, dass es durch Veränderungen des Zellmilieus im Erythrozyten zu einer Destabilisierung des erythrozytären Zytoskelettes kommt, was in Verbindung mit einem stark ansteigendem Zellinnendruck zu einer schlagartigen Ruptur des befallenen Erythrozyten und somit zur Freisetzung der entstandenen Merozoiten führt ^[Glushakova et al., 2005]. Diese können nach dem Freiwerden neue Erythrozyten befallen (Abb. 1.2, h und d).

Begünstigt durch eine hohe Parasitämie im Wirt und den daraus resultierenden Stressbedingungen kommt es nach der Differenzierung einzelner Trophoziten zur Bildung von Geschlechtszellen ^[Alano, 2007] (Abb. 1.2, i). Werden diese bei der Blutmahlzeit einer Anopheles-Mücke vom Vektor aufgenommen, so ist der Kreislauf geschlossen.

1.2 Der Erythrozyt

1.2.1 Entstehung und Aufbau

Erythrozyten entstehen während der Erythropoese aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen. Diese Stammzellen entwickeln sich unter Einfluss verschiedener Hormone von einer pluripotenten zu einer unipotenten Stammzelle. Im Fall der Erythrozyten handelt es sich um *erythropoetin responsive cells* (ERC) ^[Cantor et al., 1972; Reissmann et al. 1972; Sawyer et al., 1994], was auf ihrer Induzierbarkeit mit Erythropoetin (EPO) hinweist. Aus diesen unipotenten Stammzellen entwickeln sich im Knochenmark Proerythroblasten, große rundliche Zellen mit großem Kern, aus denen sich durch Zellteilung und Differenzierung bis zu 16 Erythroblasten

entwickeln. Einzugrenzen ist dieses Stadium durch die einsetzende Hämoglobinsynthese und die zum Ende hin stattfindende Enukleation der Zelle. Die im Knochenmark stattfindende Entwicklung von der Stammzelle bis zur Enukleation dauert etwa fünf bis neun Tage. Im Anschluss an die Enukleation wird die Zelle als Retikulozyt aus dem Knochenmark in die Blutbahn entlassen. Retikulozyten enthalten, im Gegensatz zu reifen Erythrozyten, noch Reste von RNA und Zellorganellen wie etwa Mitochondrien, welche im Verlauf der weiteren Entwicklung durch Autophagie abgebaut werden ^[Fader und Colombo, 2006].

Erythrozyten bilden mit 5×10^6 Zellen/ μl den größten zellulären Bestandteil des Blutes. Sie besitzen eine bikonkave Scheibenform, die auf dem Aufbau ihres Membranskeletts beruht. Dieses besteht aus einem flächigen Netz aus Spektrin-Filamenten, die durch kurze Aktin-Filamente zusammen gehalten werden. Durch Adaptorproteine wie Ankyrin und Bande 4.1 ist das Netz mit Bande 3 und Glykophorin, integralen Proteinen der Plasmamembran, verankert. Eine weitere Besonderheit des humanen Erythrozyten ist das Fehlen eines Zellkerns. Dieser wird während der Entwicklung der Zelle abgestoßen. Die besondere Membranstruktur und das Fehlen eines Zellkernes führen zu einer sehr starken Verformbarkeit der Zelle. Dies erlaubt es dem Erythrozyten, auch kleinste Kapillaren zu durchqueren und dort seiner wesentlichen Aufgabe gerecht zu werden, dem Transport von Sauerstoff von der Lunge zu den Geweben, sowie dem Rücktransport von CO_2 zur Lunge.

1.2.2 Membrantransport in reifen Erythrozyten

Die mit der Ausdifferenzierung der Stammzelle zum reifen Erythrozyten stattfindende Minimierung der Zelle spiegelt sich auch in den Transportern und Kanälen der Zelle wider.

Es konnte gezeigt werden, dass einige der ursprünglich in den Vorläuferzellen vorhandenen Transporter während der Erythropoese internalisiert und abgebaut werden. Dabei gelangen diese durch Endozytose über das frühe Endosom in multivesikuläre Strukturen. Hier akkumulieren sie zu Exosomen, die mit den enthaltenen Membranproteinen durch Fusion mit der Plasmamembran des Retikulozyten in das extrazelluläre Milieu abgegeben werden ^[Johnstone *et al.*, 1991 und 2005]. Die Abbildung 1.4 gibt eine Übersicht über die in der Plasmamembran des Erythrozyten verbleibenden Transportmöglichkeiten, die im Folgenden erläutert werden.

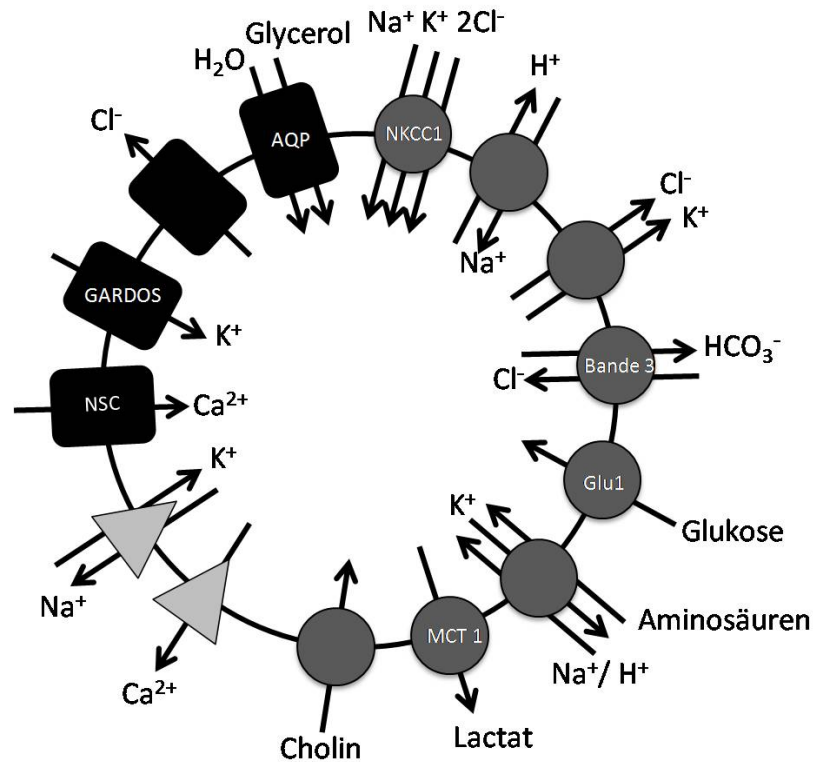


Abb. 1.4: Transportwege in der Erythrozytenmembran

(modifiziert nach Tanneur *et al.*, 2005)

In der Erythrozytenmembran finden sich eine Reihe von Proteinen, die einen Transport von Molekülen über die Plasmamembran vermitteln. Sie können in drei Gruppen, Carrier (●) wie NKCC1 oder Bande 3, Kanäle (■) wie Aquaporine und Pumpen (▲) wie etwa die Na^+/K^+ -ATPase, unterteilt werden. Abgebildet sind die Transportrichtung sowie die transportierten Substrate.

1.2.2.1 Nährstoff- und Aminosäuretransport

Da reife Erythrozyten keine Proteinbiosynthese mehr betreiben und einen eingeschränkten Metabolismus besitzen, findet man in ihnen auch nur eine eingeschränkte Anzahl an aktiven Aminosäuretransportern und solchen Transportern und Kanälen, die für die Nährstoffversorgung notwendig sind [Kirk *et al.*, 1999]. Seinen Energiebedarf deckt der Erythrozyt hauptsächlich über die Glykolyse, was eine stetige Versorgung der Zelle mit Glukose unabdingbar macht. Hierfür besitzt der Erythrozyt einen mit 5×10^5 Kopien pro Zelle sehr abundanten Glukosetransporter (Glu1) für die Aufnahme des Monosaccharids [Tanner, 1993] und einen Lactattransporter (MCT1) für die Ausschleusung der bei der Glykolyse entstehenden Abfallprodukte [Deuticke, 1982; Koho *et al.*, 2006, 2008]. Für die Aufnahme von Aminosäuren sind im reifen Erythrozyten sechs unterschiedliche Transportwege bekannt [Young *et al.*, 1981, Tunncliff, 1994], wobei zwischen passiven und sekundär aktiven Transportsystemen unterschieden werden kann. Zu den passiven Aufnahmesystemen gehört der Transporter L für die Aufnahme von Leucin, der Transporter γ^+ für basische Aminosäuren wie Lysin und der

Transporter T, über den der Influx von Tryptophan vermittelt wird. Das sekundär aktive Transportsystem umfasst die Transporter N für Glutamin, ASC, der die Aufnahme von Alanin, Serin und Cystein vermittelt, sowie den Transporter Gly für die Glycin-Aufnahme. Für die Existenz eines Glutamat- oder Aspartattransporters in humanen Erythrozyten gibt es bisher keine eindeutigen Beweise. Eine neuere Kartierung des Membranproteoms humaner Erythrozyten gibt Hinweise auf die Anwesenheit eines Glutamatttransporters aus der Familie der Exzitatorischen Aminosäure Transporter (EAAT) [Pasini *et al.*, 2006], die auch in Erythrozyten von Ratten und Hunden nachgewiesen wurden [Sato *et al.* 1994; Novak *et al.*, 2002]. Die Glutamat-Aufnahme erfolgt bei diesen Transportern entgegen des elektrochemischen Gradienten und wird durch einen Natriumionen- und Protonen-Cotransport sowie Kaliumionen-Gegentransport energetisiert. Ihre Regulation findet mittels Phosphorylierung und/oder Ubiquitinierung statt [Boehmer *et al.*, 2003, 2004 und 2006; Rajamanickam *et al.*, 2007]. Dieser Familie konnten bislang fünf Na⁺-getriebene Glutamatttransporter zugeordnet werden. Dazu gehören der Glutamat-Aspartat Transporter GLAST [Storck *et al.*, 1992] und der Glutamatttransporter GLT-1 [Pines *et al.*, 1992], die beide überwiegend in Gliazellen vorkommen [Torp *et al.*, 1994]. Außerdem gehören die beiden hauptsächlich neuronal vorkommenden EAAT3 [Kanai und Hediger, 1992], der neben Nervenzellen auch in Epithelzellen von Niere und Leber eine Rolle spielt, und EAAT4 [Yamada *et al.*, 1996] dieser Gruppe an. Ferner konnten der nahezu ausschließlich in der Retina zu findende Transporter EAAT5 [Arriza *et al.*, 1997] dieser Familie zugeordnet werden.

1.2.2.2 Transportwege zur Instandhaltung des Erythrozyten

Wie auf jede Zelle im Organismus wirken auch auf Erythrozyten eine Vielzahl äußerer Einflüsse. So gilt es, auf Änderungen der Osmolarität oder des pH-Wertes im Plasma zu reagieren, so dass das Zellvolumen, das Membranpotential oder der eigene Ionengehalt konstant gehalten werden können. Hierfür besitzen Erythrozyten in ihrer Plasmamembran eine Reihe von Transportern und Kanälen, welche zur Instandhaltung der Zellintegrität beitragen. So findet man in Erythrozyten Aquaporine (AQP) [Roudier *et al.*, 1998], Calciumpumpen und Ionenaustauscher (NHE1), sowie eine Reihe an Natrium- und Kaliumkanälen [Kirk, 2001]. Für die Regulation des Zellvolumens besitzt der Erythrozyt beispielsweise vier gut beschriebene K⁺-Transportmechanismen. Einen K⁺/Cl⁻-Cotransporter, einen Na⁺/K⁺/2Cl⁻-Cotransporter, eine Na⁺/K⁺-ATPase und einen Ca²⁺ aktivierbaren K⁺ Kanal [Gardos, 1958; Lew *et al.*, 1982; Brugnara *et al.*, 1983; Bernhardt *et al.*, 1991]. Wie die Glukoseaufnahme ist auch der Mechanismus zur

Aufrechterhaltung der intrazellulären Ionenkonzentration weitestgehend aufgeklärt. So findet man in Erythrozyten eine hohe Konzentration an K^+ -Ionen (etwa 140 mM) und eine mit nur 5 mM sehr geringe Konzentration an Na^+ -Ionen. Dies steht im Gegensatz zum umgebenden Plasma, welches eine hohe Na^+ -Konzentration (142 mM) und eine geringe K^+ -Konzentration (4,5 mM) aufweist [Blacque Belair, 1991]. Um diesen Status konstant zu halten, besitzt der Erythrozyt eine Ouabain-sensitive Na^+/K^+ -ATPase [Post et al. 1967], die durch einen *pump-leak* Mechanismus Na^+ aus der Zelle und K^+ in die Zelle pumpt und dabei einen elektrochemischen Gradienten für beide Ionen erzeugt [Tosteson und Hoffman, 1960].

Ein weiteres sehr wichtiges Protein für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen stellt Bande 3 (oder AE1) dar, welches mit mehr als 10^6 Kopien pro Zelle neben Glut1 eines der prominentesten Proteine der Erythrozytenoberfläche ist [Tanner, 1993]. Als Cl^-/HCO_3^- -Anionenaustauscher spielt es eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung des intrazellulären pH-Wertes. Durch seine Ankerfunktion für das Zytoskelett sorgt er außerdem für die benötigte Stabilität und Verformbarkeit der Zelle [LaCelle und Rothsteto, 1966; Gunn et al., 1973; Cabantchik, 1999].

1.3 Die Novel Permeation Pathways

1.3.1 Die Transportleistung des Erythrozyten deckt nicht die Anforderungen des Parasiten.

Betrachtet man den Erythrozyten als Lebensraum für einen Parasiten so scheint er auf den ersten Blick ein „sicherer Hafen“ zu sein [Sinai und Joiner, 1997]. Hat der Parasit einmal die Zelle invadiert, so ist er vor der Erkennung durch das Immunsystem bestens geschützt. Zum einen ist er nicht, wie extrazelluläre Parasiten, direkt mit Zellen des Immunsystems konfrontiert. Zum anderen ist seine Wirtszelle, der Erythrozyt, anders als andere Zellen nicht zur MHC-Präsentation befähigt. Der „immunologisch sicheren Umgebung“ steht die eingeschränkte Nahrungswahl entgegen. *P. falciparum* kann nicht wie etwa *Toxoplasma gondii*, ein phylogenetisch nahe verwandter intrazellulärer Parasit, an der Syntheseleistung des Wirtes partizipieren. Reife Erythrozyten betreiben keine Proteinsynthese mehr und besitzen weder einen Nukleus noch ein Endosomales Kompartiment oder sonstige Organellen. Als Nahrungsquelle steht dem Parasiten das Hämoglobin des Erythrozyten zur Verfügung. Dieses wird durch den Parasiten aufgenommen und verwertet. Dabei umschließen Invaginationen

1. Einleitung

der Plasmamembran des Parasiten und der ihr aufliegenden PVM große Mengen an Erythrozytenzytosol und schnüren sich als Doppelmembran-Endosom ab. Diese fusionieren anschließend mit der Nahrungsvakuole des Parasiten und machen ihm somit das Erythrozytenzytosol als Nahrungsquelle zugänglich ^[Aikawa *et al.*, 1966; Yayon *et al.*, 1984; Slomianny, 1990].

Das durch den Hämoglobinabbau anfallende toxische Häm wird vom Parasiten als kristallines Hämozoïn in der Nahrungsvakuole abgelagert ^[Slater *et al.*, 1991 und 1992]. Durch den Abbau des Hämoglobins deckt der Parasit eine Bandbreite an essentiellen Aminosäuren ab, kann jedoch aus dieser Nahrungsquelle beispielsweise kein Isoleucin ^[Martin *et al.*, 2007] und nur wenig Glutamat, Methionin, Cystein, Prolin und Glutamin ^[Kirk, 2001] gewinnen. Der Parasit ist folglich gezwungen, zusätzlich Nährstoffe aus dem umgebenden Plasma zuzuführen.

Neben Aminosäuren ist der Parasit auch auf die Aufnahme anderer essentieller Substanzen angewiesen. Hierzu zählen unter anderem die Pantothersäure, als Vorläufer des Coenzym A ^[Saliba *et al.*, 1998], und Fettsäuren, zu deren *de novo* Synthese der Parasit nicht befähigt ist ^[Lauer *et al.*, 1997; Lingelbach und Joiner, 1998]. Des Weiteren ist der Parasit in erster Linie, ähnlich dem Erythrozyten, auf die Glykolyse zur Deckung seines ATP- und Pyruvat-Bedarfs angewiesen ^[Roth *et al.* 1990], was die Aufnahme von Glukose voraussetzt. Ein weiteres Problem stellt die Entsorgung der anfallenden Stoffwechselprodukte dar. Das Einlagern dieser Stoffe würde zu einem osmotischen Ungleichgewicht zwischen der befallenen Zelle und dem Plasma führen. Die Folge wäre eine osmotische Lyse der infizierten Zelle ^[Lew *et al.*, 2003].

Für eine Vielzahl der erforderlichen Substrate stellt der Erythrozyt, trotz seiner auf das Notwendigste reduzierten Transportaktivitäten, für den Parasiten brauchbare Transportwege zu Verfügung. Zur Deckung seines Glukosebedarfs könnte der Parasit beispielsweise auf den erythrozytären Glukosetransporter Glut1 zurückgreifen ^[Roth *et al.*, 1990; Kirk, 2001]. Die Ausschleusung des bei der Glykolyse entstehenden Lactats könnte über den humanen Lactattransporter MCT1 geschehen. Ebenso wäre eine Nutzung der unterschiedlichen Aminosäuretransporter des Erythrozyten für die Aufnahme von Methionin, Cystein, Prolin und Glutamin durch den Parasiten denkbar ^[Kirk, 2001].

Für die vom Parasiten benötigten essentiellen Substanzen Glutamat, Isoleucin und Pantothersäure konnten in reifen Erythrozyten bislang keine Transporter nachgewiesen werden. Daher ist der Parasit gezwungen, eigene Transportsysteme für diese Moleküle in der befallenen Zelle zu etablieren ^[Kirk, 2001].

1.3.2 Membrantransport in infizierten Erythrozyten

Vergleicht man die Permeabilität infizierter und nicht-infizierter Erythrozyten für die vom Parasiten benötigten Substrate, so ist diese bei den befallenen Zellen um ein vielfaches höher [Kunter *et al.*, 1983; Ginsburg *et al.*, 1985]. Dieser Effekt ist etwa 15-20 Stunden nach der Invasion mit dem Eintritt des Parasiten in das Trophozoitenstadium zu beobachten und kann mit der für dieses Stadium charakteristisch hohen metabolischen Aktivität des Parasitenstadiums korreliert werden. Diese vom Parasiten induzierten Permeabilitätsanstiege für unterschiedliche Substrate werden kollektiv als *Novel Permeation Pathways* (NPP) bezeichnet [Ginsburg *et al.*, 1983; Kirk *et al.*, 1999]. Die Bandbreite an Substanzen, die über die neu induzierten Aufnahmewege dem Parasiten zugänglich werden, ist enorm. Moleküle, für die die Membran des infizierten Erythrozyten permeabel ist, die des nicht-infizierten Erythrozyten jedoch nicht oder nur in sehr geringem Umfang, sind in Tabelle 1.1 aufgeführt. Zu ihnen zählen neben der erwähnten Pantothersäure [Saliba *et al.*, 1998] auch Aminosäuren [Erfold *et al.*, 1985; Sherman, 1983; Ginsburg *et al.*, 1985; Kirk *et al.*, 1994 und 1995; Martin *et al.*, 2007], Monosaccharide [Ginsburg *et al.*, 1983 und 1985; Kirk *et al.*, 1994 und 1996], Nukleoside [Upston and Gero, 1995], Di- und Tripeptide [Atamna und Ginsburg, 1997; Saliba und Kirk, 1998; Ginsburg *et al.*, 1985; El Tahir *et al.*, 2003], Anionen und Kationen [Cranmer *et al.*, 1995; Kirk *et al.* 1991a, .1993, Staines *et al.*, 2000] sowie monovalente, organische Ionen wie Cholin [Kirk *et al.*, 1991b; Staines und Kirk, 1998]. Es konnte gezeigt werden, dass sogar für synthetische Substanzen wie künstliche Ceramide [Ansorge *et al.*, 1995] oder membranimpermeable NHS-Biotinderivate [Cohn *et al.*, 2003; Baumeister *et al.*, 2003] eine erhöhte Permeabilität induziert wird.

Tabelle 1.1: Substanzen die über die *Novel Permeation Pathways* aufgenommen werden.

Zucker	Aminosäuren	Nukleoside	Anionen / Kationen	Andere
Glycerol	Alanin	D/L-Adenosin	Cl ⁻	Thioharnstoff
Erythytol	Asparagin	D/L-Thymidin	Glukonat	Phloridizin
D/L-Arabitol	Aspartat	Uridin	Lactat	Di- und Tripeptide
Arabinose	Cystein	NBMPR	DNDS	Glutathion
Ribose	Glutamat		Dipicolin-säure	GSSG
Sorbitol	Glutamin		Pantothen-säure	Polypeptide
Xylitol	Glycin		Na ⁺	Olygonukleotide
Manitol	Isoleucin		K ⁺	Chelatoren
D/L-Glukose	Leucin		Rb ⁺	NHS-Biotin
2-Deoxyglukose	Serin		Mg ²⁺	Fosmidomycin
3-OM-Glukose	Taurin		Ca ²⁺	
myo-Inositol	Threonin		Fe ²⁺ /Fe ³⁺	
Rhamnose	Valine		Cholin	
	Carnitin		Polyamine	

(nach Ginsburg *et al.*: <http://sites.huji.ac.il/malaria/>)

Betrachtet man die über die NPP aufgenommenen Substanzen, so ergibt sich das Bild einer unspezifischen Permeabilitätserhöhung der erythrozytären Plasmamembran, die sich in fundamentalen Struktur- und Ladungsunterscheiden der einzelnen Substanzgruppen widerspiegelt. So werden beispielsweise große Moleküle wie Tripeptide oder Zucker, kleine Ionen, negativ geladene Moleküle wie Glutamat, Kationen wie Fe³⁺ oder das synthetische NHS-Biotin über die Membran transportiert.

Nur für wenige Substanzen konnte bislang die Notwendigkeit für eine Aufnahme aus dem umgebenden Plasma durch den Parasiten nachgewiesen werden ^[Divo *et al.*, 1985]. Für die Mehrheit der aufgenommenen Moleküle ist der Nutzen für den Parasiten noch unklar. So gewinnt der Parasit aus dem Abbau des Hämoglobins bereits einen großen Anteil der von ihm benötigten Aminosäuren, was deren Transport über die Plasmamembran des Erythrozyten überflüssig macht ^[Kirk, 2001]. Trotzdem ist mit dem Auftreten der NPP ein enormer Influx dieser Aminosäuren feststellbar ^[Sherman *et al.*, 1977; Kirk *et al.*, 1994, 1996 und 2001]. Zu den nachweisbar essentiellen Substanzen zählen neben den bereits erwähnten Isoleucin und Pantothensäure auch Natriumionen. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass es nach der

Infektion des Erythrozyten zu einer Änderung des Na^+/K^+ -Gleichgewichts der befallenen Zelle kommt [Dunn, 1969; Sherman und Tanigoshi, 1971; Ginsburg *et al.*, 1986]. Diese Änderung führt zu einem vollständigen Verlust des Na^+/K^+ -Gradienten über die erythrozytäre Plasmamembran. Durch die niedrige Na^+ -Konzentration im Parasitenzytosol bedingt wird an der Parasitenplasmamembran ein neuer Gradient erzeugt [Ginsburg *et al.*, 1986]. Dieser Gradient wird vom Parasiten benötigt, um einen in seiner Plasmamembran exponierten Phosphattransporter zu betreiben. Dieser ist natriumabhängig und nutzt den entstandenen Gradienten für den Import von anorganischem Phosphat in den Parasiten, wo es beispielsweise der Synthese von DNA und RNA dient [Saliba *et al.*, 2006].

1.3.4 Wodurch werden die *Novel Permeation Pathways* vermittelt?

Generell gibt es für die Entstehung der NPP drei völlig verschiedene Vorstellungen, die in Abbildung 1.5 zusammengefasst sind. Ein Modell spricht die NPP-Funktion dem tubovesikulären Netzwerk (TVN) zu, welches im Kontinuum mit der parasitophoren Vakuole steht und über eine Art „metabolisches Fenster“ den Austausch mit dem extrazellulären Milieu erlaubt [Lauer *et al.*, 1997] (Abb. 1.5, C). Eine zweite Hypothese geht von einer direkten Verbindung zwischen der parasitophoren Vakuole und dem extrazellulären Milieu über einen parasitophoren Dukt aus [Pouvelle *et al.*, 1997] (Abb. 1.5, B). Eine dritte Theorie beschreibt einen sequentiellen Transportweg [Kirk, 2001] (Abb. 1.5, A). Hierbei gelangen die löslichen Moleküle zunächst mittels Translokatoren in das Erythrozytenzytosol, um in einem zweiten Schritt durch die nichtselektiven Poren in der PVM [Desai und Rosenberg, 1997; Desai, 1999; Nyalwidhe *et al.*, 2002] zur Plasmamembran des Parasiten zu gelangen.

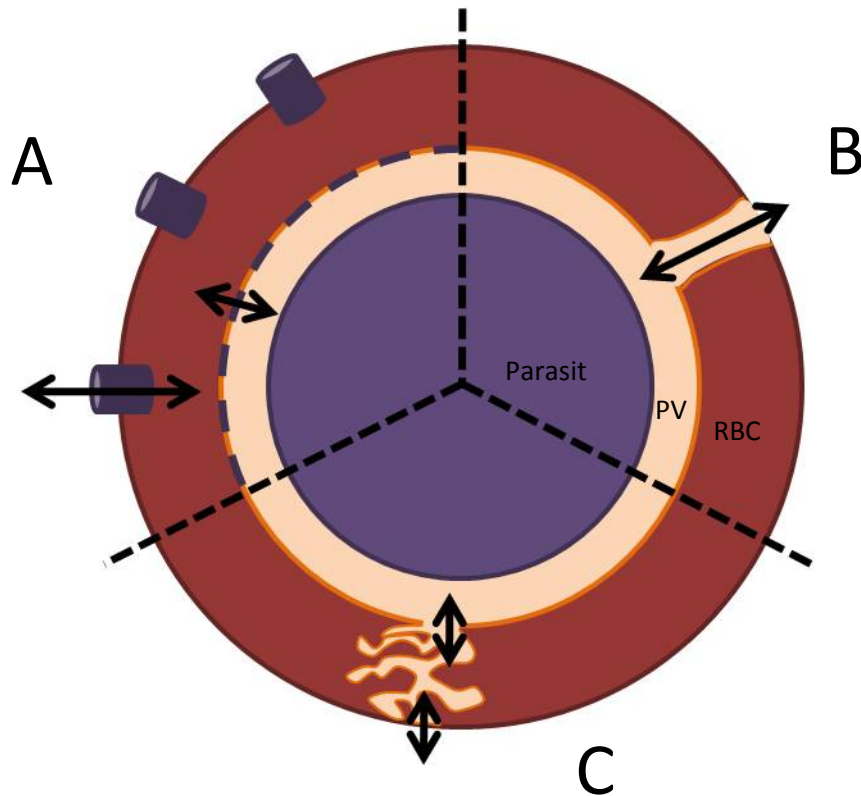


Abb. 1.5: Drei Modelle für mögliche Permeationswege in infizierten Erythrozyten.

(nach Kirk, 2001)

- a) sequentielles Modell mit den NPP als Kanal und nichtselektiven Poren in der PVM ^[Kirk,2001]
- b) Parasitophorer Dukt ^[Pouvelle et al., 1997]
- c) Das tubovesikuläre Netzwerk mit dem metabolischen Fenster als Transportweg ^[Lauer et al., 1997]

Eine Vielzahl von Hinweisen spricht für die Existenz eines sequentiellen Transportweges. So konnte gezeigt werden, dass die NPP generelle Charakteristika von Anionenkanälen besitzen ^[Kirk et al., 1994]. Sie sind zwar in der Lage Kationen und elektroneutrale Stoffe zu transportieren, vermitteln jedoch eine bevorzugte Permeabilität für Anionen ^[Ginsburg et al., 1985; Kirk et al., 1993 und 1994; Kirk und Horner, 1995]. Hierbei haben elektroneutrale Moleküle den Vorzug vor Kationen, deren Influx ihrerseits von der Anwesenheit von Anionen abhängt. Weiterhin sind die Influxraten der untersuchten Substanzen abhängig von ihrer Größe und/oder ihrer Hydrophobizität. So werden bei neutralen Aminosäuren ähnlicher Größe die hydrophoberen bevorzugt ^[Kirk et al., 1994]. Bei monovalenten organischen Kationen mit gleicher Hydrophobizität ist die Größe entscheidend ^[Staines et al., 2000]. Nicht bekannt ist, ob es Einschränkungen in der Größe der zu transportierenden Moleküle gibt. So ist zum Beispiel die Permeabilität für Saccharose (342 Da) gering, hingegen können oxidiertes Glutathion (613 Da) oder der Protease-Inhibitor Pepstatin (686 Da) die NPP passieren ^[Kirk, 2001]. Des Weiteren zeigen die NPP eine lineare Abhängigkeit von Transportrate und Konzentration der transportierten Substanzen ^{[Kirk et al.,}

^{1994]}. Die Annahme, dass die NPP Ähnlichkeit mit Anionenkanälen besitzen, wird durch die Inhibierbarkeit der NPP mittels einer Reihe von Anionenkanal-Inhibitoren wie etwa Furosonide, 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB) ^[Kirk *et al.*, 1994], 4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) ^[Kirk und Horner, 1995a und b] und 4,4'-diisothiocyano-2,2'-dihydrostilbene disulfonic acid (H₂DIDS) ^[Breuer *et al.*, 1987] bestätigt. Die Existenz von Präferenzen für bestimmte Substrate und die Wirkung von spezifischen Inhibitoren sprechen gegen einen Dukt oder ein metabolisches Fenster, da diese einen eher unregulierten Einstrom von Substanzen zur Folge hätten, der kaum durch Inhibitoren zu unterbinden wäre. Für eine von Proteinen vermittelte Aufnahme sprechen auch die durch membranundurchlässige sulfo-NHS-Biotin-Derivate erzeugten Inhibitionseffekte. Diese Derivate gehen kovalente Bindungen mit Amin-Resten in Protein ein, was eine Blockade der für die Aufnahmen von Substraten aus dem umgebenden Medium nötigen Kanäle zur Folge hat ^[Cohn *et al.*, 2003; Baumeister *et al.*, 2003]. Auch die Inhibierbarkeit der NPP durch die Aktivität der Protease Chymotrypsin lässt Rückschlüsse auf eine Vermittlung durch Translokatoren zu ^[Baumeister *et al.*, 2006].

1.3.5 Wie viele Transportwege umfassen die *Novel Permeation Pathways*?

Da die Bandbreite an transportierten Molekülen sehr groß ist, ist anzunehmen, dass nicht ausschließlich ein einzelner Kanal oder Transporter für die Permeabilität verantwortlich ist, sondern eine Vielzahl unterschiedlicher Translokatoren. Bereits kurz nach der Entdeckung der NPP wurde versucht, mittels radioaktiv markierter Moleküle und in Hämolyse-Experimenten mit isotonischen Lösungen einen Überblick über die Anzahl der beteiligten Transporter zu gewinnen ^[Kutner *et al.*, 1983; Ginsburg *et al.*, 1983 und 1985; Cabantchik *et al.* 1990], welche später durch neuere elektrophysiologische Ansätze ergänzt wurden. So konnten durch *patch-clamp*-Techniken unterschiedliche Ströme über die Plasmamembran des infizierten Erythrozyten gemessen werden, die jedoch von den einzelnen Arbeitsgruppen unterschiedlich interpretiert werden ^[Desai *et al.*, 2000; Egee *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2002; Duranton *et al.*, 2003 und 2004; Staines *et al.*, 2003 und 2004]. So entstanden aus den gewonnenen Daten zwei Modelle, ein Ein-Kanal-Modell und ein Mehrkanal-Modell. Beide stützen sich auf elektrophysiologische Studien zur Veränderung der Leitfähigkeit infizierter Erythrozyten. Als Beispiel für das Ein-Kanal-Modell wäre der von Desai *et al.* (2000) identifizierte Kanal PSAC (Plasmoidal Anion Surface Channel) zu nennen. PSAC besitzt dieselbe Leitfähigkeit für Chloridionen wie für die

NPP nachgewiesen werden konnte. Darüberhinaus ähnelt er im Bezug auf seine Hemmbarkeit den NPP [Wagner *et al.*, 2003]. Ein Mehr-Kanal-Modell hingegen wird von Duranton *et al.* (2003) postuliert. Die durchgeführten *patch-clamp*-Experimente an infizierten Erythrozyten ließen unter den gewählten Bedingungen Rückschlüsse auf das Vorhandensein mehrerer Kanäle zu, die unterschiedliche Eigenschaften im Hinblick auf die von ihnen transportierten Molekülen, sowie in ihrer Hemmbarkeit durch verschiedene Inhibitoren aufwiesen. In einer gemeinsamen Studie aller an der Elektrophysiologie des Parasiten arbeitenden Gruppen hat man sich inzwischen auf die Existenz von mindestens zwei einwärts gerichteten und einen auswärts gerichteten Strom über die Plasmamembran verständigen können [Staines *et al.*, 2007].

1.3.6 Die *Novel Permeation Pathways*: Wirt oder Parasit?

Nicht nur die Anzahl, sondern auch der Ursprung der beteiligten Transporter und Kanäle ist weiterhin unklar. Die zurzeit verbreitetsten Modelle sind in Abb. 1.6 zusammengefasst.

Da die NPP in der Regel nur im Zusammenhang mit dem Befall des Erythrozyten durch den Parasiten auftreten, liegt es nahe anzunehmen, dass es sich bei den Kanälen um vom Parasiten synthetisierte Proteinen handelt. Hierfür sprechen Arbeiten, die zeigen, dass Erythrozyten eines Spenders nach Infektion mit verschiedenen *P. falciparum*-Isolaten weitgehend identische elektrophysiologische Charakteristika aufwiesen, woraus die Autoren die Existenz eines vom Parasiten synthetisierten Anionenkanals (PSAC) ableiteten, welcher die NPP-Aktivität vermittelt [Desai *et al.*, 2000; Alkhalil *et al.*, 2004] (Abb. 1.6, A). Auf frühen Arbeiten zum Transportverhalten der induzierten Permeabilität basiert die Theorie, dass die NPP von Parasiten-eigenen Poren in der Membran der infizierten Zelle gebildet werden [Ginsburg *et al.*, 1983, 1985 und 1986]. Diese Annahme beruht auf der Vielzahl von transportierten Molekülen, die in ihrer Gesamtheit nur von einer unspezifischen Pore und nicht über einem Kanal oder Transporter angenommen werden können (Abb. 1.6, D).

Dem entgegen steht die Möglichkeit, dass an der Bildung der NPP wirtseigene Proteine beteiligt sein könnten, die unter normalen physiologischen Bedingungen in der Zelle nicht oder nur in geringem Umfang aktiv sind. Ein Beispiel für diese Art von Transporter ist der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter NKCC1 der in Erythrozyten unter physiologischen Bedingungen nicht aktiv ist [Haas und Forbush, 1998; Flatman, 2004 und 2008]. Kommt es zu stressbedingten Änderungen im Ionenhaushalt der Zelle oder zu Schwankungen im Zellvolumen wird der Transporter mit

Hilfe von Kinasen aktiviert und sorgt für den nötigen Ionenausgleich [Flatman, 2002; Matskevich *et al.*, 2005]. Es konnte gezeigt werden, dass sich unter dem Einfluss von Stress, wie er etwa durch die artifizielle Oxidation von Erythrozyten erzeugt werden kann [Huber *et al.*, 2002] oder die Inkubation von Erythrozyten in isotonischer Saccharose-Lösung [Culliford *et al.*, 1995], in nicht infizierten Erythrozyten ähnliche Permeabilitäten und Ionenströme erzeugen lassen, wie in infizierten Erythrozyten (Abb 1.6, B). In der infizierten Zelle könnte ein solcher oxidativer Stress durch den Abbau des Hämoglobins entstehen [Atamna und Ginsburg, 1993 und 1997].

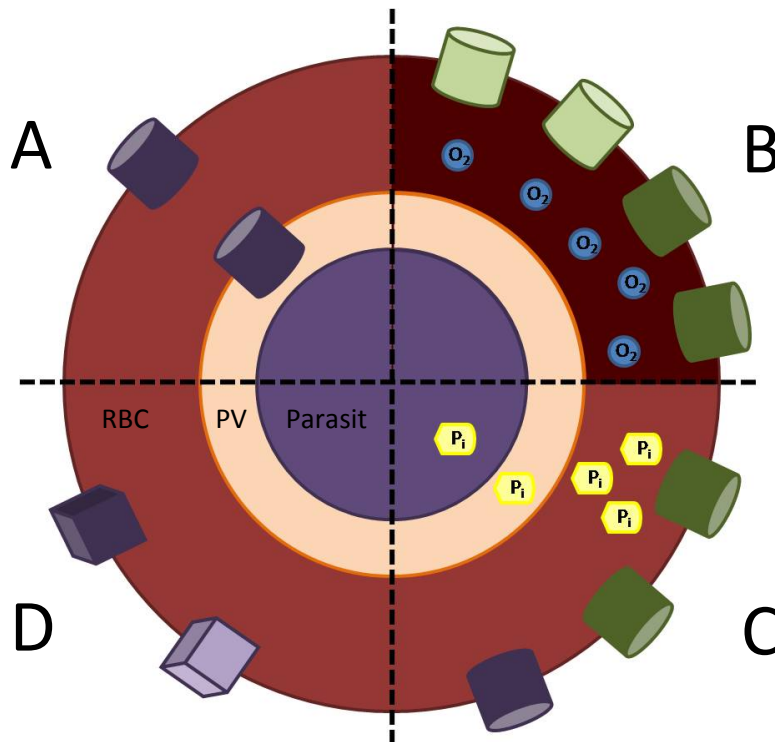


Abb. 1.6: Verschiedene Modelle für den Ursprung der NPP.

(modifiziert nach Staines *et al.*, 2007)

violett: parasitencodiertes Protein, grün: Wirts-eigener Kanal; hell: nicht essentiell; dunkel: essentiell für das Überleben des Parasiten

- a) Desai *et al.*
Ein einzelner parasitencodierter Ionenkanal (PSAC) vermittelt den Transport über die Erythrozytenmembran. Ein PSAC-ähnlicher Parasitenkanal vermittelt den Transport über die PVM.
- b) Lang *et al.*
Mindestens vier Wirts-eigene Kanäle (drei Anionen- und eine Kationenkanal), von denen zwei essentiell für den Transport von Nährstoffen für den Parasiten sind. Die Aktivierung der Kanäle erfolgt durch oxidativen Stress.
- c) Thomas *et al.* und Staines *et al.*
Drei essentielle Anionenkanäle mit einem Parasitenkanal und zwei Wirtskanälen. Die Wirtskanäle werden durch Parasitenkinasen mittels Phosphorylierung aktiviert und reguliert.
- d) Ginsburg *et al.*
Zwei vom Parasiten codierte Poren, von denen eine essentiell ist und für den Transport von Nährstoffen verantwortlich ist, die andere nichtessentielle Pore transportiert Ionen und Nucleoside.

Ein möglicher Kandidat für die Vermittlung der durch oxidativen Stress induzierten NPP-Aktivität wäre ein Chlorid-Kanal der ClC-Superfamilie. In nicht-infizierten Zellen lassen sich durch artifizielle Oxidation Ströme erzeugen, die große Ähnlichkeit zu denen bei dieser Kanalfamilie messbaren Strömen aufweisen ^[Huber *et al.*, 2002].

Neben der Beteiligung von Stressfaktoren gibt es Beweise für die Beteiligung parasiteneigener Kinasen, die durch Phosphorylierung endogener Kanäle zu deren Aktivierung beitragen ^[Egeè *et al.*, 2002; Merckx *et al.*, 2008 und 2009]. Aus Proteomstudien des infizierten Erythrozyten ^[Lasonder *et al.*, 2002] und aus biochemischen Ansätzen ^[Kun *et al.*, 1997; Hora *et al.*, 2009] kann auf die Existenz dieser Kinasen im Zytosol des Erythrozyten geschlossen werden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der parasiteneigenen R-Untereinheit der Proteinkinase A (PKA), dem negativ-Regulator dieser Kinase, zu einem nahezu vollständigen Verlust der NPP-Aktivität führt ^[Merckx *et al.*, 2008]. Somit ist eine Beteiligung der PKA an der Bildung der NPP sehr wahrscheinlich (Abb. 1.6, C).

Für ein Zusammenspiel zwischen Parasiten-codierten und Wirts-eigenen Proteinen spricht eine Studie, die sich mit der Zugänglichkeit der NPP für Proteasen beschäftigt. Diese ist in Abbildung 1.7 zusammengefasst. Es konnte gezeigt werden, dass die an der Entstehung der NPP-Aktivität beteiligten Proteine für die Proteasen Trypsin und Chymotrypsin unterschiedlich zugänglich sind ^[Baumeister *et al.*, 2006]. So hat eine Behandlung von intakten infizierten Zellen mit Trypsin, selbst bei variablen Temperaturen, keine Auswirkungen auf die NPP-Aktivität. Hingegen führt eine Behandlung mit Chymotrypsin bei 37°C zu einer völligen Inhibition der NPP. Eine Chymotrypsin-Behandlung bei 22°C zeigt keine inhibitorische Wirkung. Folgt auf die Chymotrypsin-Behandlung bei 37°C eine Inkubation der infizierten Zellen unter Kulturbedingungen, so stellt sich innerhalb von vier Stunden ein Großteil der ursprünglichen NPP-Aktivität wieder her. Dieser Effekt kann durch das Abtöten des Parasiten mit Cycloheximid oder die Inhibition des Proteintransportes durch Brefeldin A unterbunden werden. Hieraus lassen sich zwei Modelle für die Induktion der NPP ableiten. Da die Rückkehr der NPP-Aktivität immer von einem lebenden Parasiten und dessen Proteintransport abhängt, ist in jedem Fall die Beteiligung eines Parasitenproteins notwendig. Zum einen ist es denkbar, dass die Protease-Behandlung einen vom Parasiten codierten Transporter zerstört, der innerhalb der vier Stunden neu synthetisiert und an der Oberfläche des Erythrozyten exponiert wird. Zum anderen ist es möglich, dass durch den Einfluss eines Parasitenproteins, wie etwa einer Kinase, ein Wirts-Kanal aktiviert und in

seiner Konformation so geänderter wird, dass er für eine proteolytische Spaltung durch das Chymotrypsin zugänglich wird. Die Wiederkehr der NPP-Aktivität kann durch das Aktivieren zuvor inaktiver Wirtsproteine erklärt werden, die Mangels vormaliger Aktivierung keine proteolytisch spaltbaren Domänen exponiert haben und somit intakt geblieben sind.

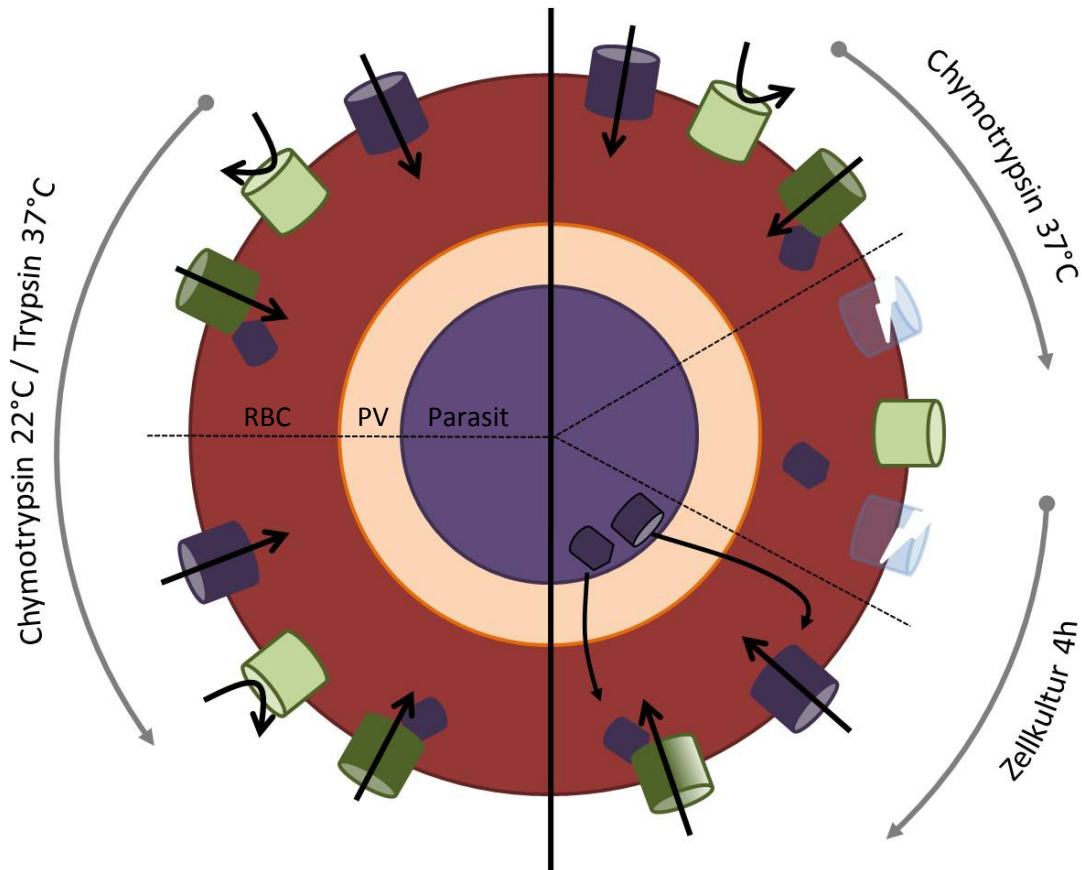


Abb. 1.7: Die Wirkung von Proteasen auf die Novel Permeation Pathways.

(modifiziert nach Baumeister *et al.* 2006)

violett: parasitencodiertes Protein, grün: Wirts-eigener Kanal; hell: nicht aktiv; dunkel: aktiv

Die proteolytischen Eigenschaften von Chymotrypsin bei 22°C und Trypsin bei 37°C zeigen keine Wirkung auf die Aktivität der NPP (linke Seite), wohingegen Chymotrypsin bei 37°C die NPP-Aktivität nahezu vollständig unterbindet (rechtes oben). Die Rückkehr der NPP-Aktivität kann zum einen durch die neue Synthese eines Parasitenkanals geschehen oder durch die Aktivierung eines stillen Wirtskanals durch einen vom Parasiten synthetisierten Aktivator (rechts unten). Die Sensitivität der Wirtskanäle gegenüber Chymotrypsin ist nur im aktivierten Zustand ausgeprägt.

Mit dieser Studie konnte eine Beteiligung des Erythrozytenproteins Bande 3 an der Vermittlung der NPP-Aktivität ausgeschlossen werden. Dieser Cotransporter galt lange als aussichtsreicher Kandidat, da im Zusammenhang mit oxidativem Stress bei dieses Protein Phosphorylierungen ^[Zipser *et al.*, 1997], Clusterbildung ^[Dumaswala *et al.*,1999; Hornig and Lutz, 2000] und die Veresterung von Methylresten ^[Ingrosso *et al.*, 2000] gezeigt werden konnten. Ähnliche Veränderungen des Bande 3-Moleküls können auch während der Infektion von Erythrozyten

mit *P. falciparum* beobachtet werden ^[Giribaldi et al., 2001]. Zwar ist Bande 3 resistent gegenüber einer Behandlung mit Trypsin, doch führt eine Chymotrypsin-Behandlung intakter Zellen bei einer Inkubationstemperatur von nur 22°C bereits nach kürzester Zeit zu einer vollständigen Spaltung des nativen Proteins in mindestens zwei Untereinheiten. Unter diesen Bedingungen ist jedoch keine Beeinträchtigung der NPP-Aktivität zu beobachten, was eine Beteiligung des Bande 3-Cotransporters an der Ausprägung der NPP äußerst unwahrscheinlich macht ^[Baumeister et al., 2006].

1.4.8 Die *Novel Permeation Pathways* als Medikamententarget

Die Tatsache, dass die NPP ausschließlich in mit *Plasmodium* infizierten Erythrozyten auftreten und absolut essentiell für die Entwicklung des Parasiten sind, macht sie zu einem ausgezeichneten Ziel für die Entwicklung neuer Anti-Malaria-Medikamente ^[Staines et al., 2005]. So wird an der Synthese neuer Inhibitoren gearbeitet, deren Wirksamkeit auf der Blockade der vom Parasiten generierten Transporter basiert ^[Patel et al., 2008]. Eine andere Alternative eröffnet sich in der Nutzung der NPP als Transportweg für die Einschleusung neuer Medikamente. Hierbei dienen die NPP lediglich der Aufnahme von Medikamenten und sind nicht selbst das Ziel des Medikaments. Als Beispiel für ein solches Medikament ist Fosmidomycin zu nennen. Fosmidomycin ist ein Antibiotikum aus *Streptomyces lavendulae*, welches in die Isoprenoidbiosynthese von *P. falciparum* eingreift. Der Parasit gewinnt Isoprenoide über den Methylerythritolphosphat (MEP) Stoffwechselweg. Hier inhibiert Fosmidomycin die DOXP-Reduktoisomerase, die für die Umsetzung von 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) zu 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) verantwortlich ist ^[Jomaa et al., 1999; Cassera et al., 2007; Wiesner et al., 2007, 2008]. Der MEP-Stoffwechselweg für die Synthese von Isoprenoiden ist auch aus anderen *Apicomplexa*, wie etwa *Toxoplasma gondii*, bekannt. Bei diesen Parasiten zeigt Fosmidomycin jedoch keine Wirkung. Ein Grund hierfür kann das Fehlen des notwendigen Transportweges, den NPP, sein ^[Seeber et al., unpubliziert]. So befällt *Toxoplasma* kernhaltige Zellen und kann an deren Transport- und Syntheseleistungen partizipieren, wodurch die Ausbildung von NPP für das Überleben des Parasiten nicht notwendig ist.

Die gezielte Inhibition der beteiligten Transportwege zur Therapie einer Malariainfektion erweist sich als schwierig. Zum einen ist die große Mehrheit der am Transport beteiligten Proteine noch unbekannt oder zeigen gleiche Transport- und Inhibitionseigenschaften wie Wirts-eigene Kanäle. Es besteht die Möglichkeit, dass Wirts- und Parasitenprotein sogar

homolog zueinander sein könnten. Als Beispiel wäre der Glukosetransporter Glut 1 zu nennen, der sowohl von Erythrozyten wie auch von Parasiten genutzt werden könnte. Zum anderen haben Inhibitoren für diese Art des Transports meist ein großes Wirkspektrum. So inhibieren Substanzen wie Furosemid und NPPB zwar schon in kleinsten Mengen die NPP, finden jedoch auch Anwendung in der Medizin als Diuretika. Dem gegenüber bietet die Nutzung der NPP als Transportroute einige entscheidende Vorteile gegenüber der Inhibition der am Transport beteiligten Kanäle. So ist das Spektrum an möglichen Substanzen nicht auf die Inhibition eines Kanals beschränkt, sondern kann, wie im Fall des Fosmidomycins, auch solche Medikamente umfassen, die beispielsweise in den Stoffwechsel des Parasiten eingreifen. Die einzigartigen Transporteigenschaften infizierter Erythrozyten ermöglichen die Verwendung von Substanzen, die auch auf andere eukaryotische Zellen toxisch wirken würden, aber aufgrund der fehlenden Aufnahmemöglichkeit für diese Zellen bedeutungslos bleiben.

1.5 Zielsetzung

Die *Novel Permeation Pathways* umfassen unterschiedliche Transportwege, über die der Parasit eine Vielzahl essentieller Moleküle aus dem Blutplasma beziehen kann. Unbekannt ist dabei die Anzahl der Transportwege, sowie die Herkunft und Identität der beteiligten Transportproteine.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der beteiligten Transportwege, sowie die Identifikation der vermittelnden Transportproteine. Basierend auf vorangegangenen Arbeiten zur Proteasesensitivität der NPP ^[Baumeister *et al.*, 2006] sollen zunächst mit proteinbiochemischer Analysen mögliche Transportproteine identifiziert werden. Zur eingehenderen Analyse und Eingrenzung möglicher NPP-Kandidaten sollen physiologische Messungen und Inhibitorassays durchgeführt werden. Im Focus der physiologischen Studien steht dabei der Transport der Aminosäure L-Glutamat, deren Aufnahme für den Parasiten essentiell ist und nachweislich einzig über die NPP geregelt werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Blotting Apparatur	Phase, Lübeck
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Expositionskassetten	rego, Augsburg
Falconröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Feinwaage 2414	Sartorius Göttingen
Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axio observer inverse epifluorescence microscope system)	Zeiss, Göttingen
Filme New RX NIF	Fuji, Japan
Gel Loader Tips	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Mikro 22R	Hettich Zentrifugen
Magnetrührer Combimag RCH	IKA
Massenspektrometer MALDI-TOF-TOF Ultraflex II	Bruker Daltonik, Bremen
Nano / Kapillar-HPLC UltiMate 3000	Dionex, Idstein
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Pasteurpipetten	COPAN (Italien)
pH-Meter 766	Calimatic, Mering
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Powersupply Power PAC 1000	Biorad
Szintillationszähler LS6500	Beckman Coulter (USA)
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super 10P	Kobe
Vortexer REAX 2000 X	Sartorius, Göttingen
Waage 1205 MP	Sartorius, Göttingen

Whatman-Papier

Schleicher & Schuell, Dassel

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure

Bruker Daltonik, Bremen

α -Chymotrypsin

AppliChem, Darmstadt

β -Mercaptoethanol

AppliChem, Darmstadt

1,4-dithio-DL-threitol (DTT)

Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm

5-[Aminosulfonyl]-4-chloro-2-[(2-furanylmethyl)amino]benzoic acid
(Furosemid)

Sigma-Aldrich, Seelze

5 α -Pregnan-3 α -ol-11,20-dione (Alfaxalone)

Sigma-Aldrich, Seelze

Acetonitril

Roth, Karlsruhe

Ameisensäure

Sigma-Aldrich, Seelze

Ammoniumhydrogencarbonat

Sigma-Aldrich, Seelze

Ammoniumpersulfat (APS)

Roth, Karlsruhe

Ammoniumsulfat

Roth, Karlsruhe

Aspartat

Fluker Chemie GmbH, Neu-Ulm

Bovines Serumalbumin (BSA)

PAA, Cölbe

Bromphenolblau

Merck, Darmstadt

Cholinchlorid

Sigma-Aldrich, Seelze

Coomassie Brilliant Blue G250

Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm

Dinatriumhydrogenphosphat

Merck, Darmstadt

Dibutylphthalat

Sigma-Aldrich, Seelze

Dulbecco's PBS (10x)

PAA, Cölbe

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Serva, Heidelberg

Gentamicin (50 mg x ml⁻¹)

PAA, Cölbe

Glutamat (Na-Salz)

Roth, Karlsruhe

Glycin

Roth, Karlsruhe

Hybridoma Express Plus Medium

PAA, Cölbe

Iodoacetamid

Amersham Biosciences, Schweden

Isopropanol

Roth, Karlsruhe

Kaliumchlorid (KCl)

Merck, Darmstadt

2. Material und Methoden

Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
L-Alanin	Roth, Karlsruhe
Luminol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Methanol (Protein Sequencing Grade)	Sigma-Aldrich, Seelze
Methanol (MeOH)	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Roth, Karlsruhe
N,N-Dimethylformamid	Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Oligo R3 (Reversed Phase Packing)	PerSeptive Biosystems, Framingham (USA)
Ouabain	Sigma, Seelze
ortho-Phosphosäure	Merck, Darmstadt
p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich, Seelze
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma-Aldrich, Seelze
Phosphatase Inhibitor Cocktail (Set V)	Calbiochem, Darmstadt
Ponceaurot S Pure	AppliChem, Darmstadt
Protease Inhibitor Cocktail (Set III)	Calbiochem, Darmstadt
Protogel (30 % Acrylamid, / 0.8 % Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Quecksilber(II)Chlorid	Sigma, Seelze
R-(+)-DIOA	Sigma, Seelze
RotisolV [®] HPLC Gradient Grade Wasser	Roth, Karlsruhe
RPMI1640	PAA, Cölbe
Salzsäure (HCl)	AppliChem, Darmstadt
Szintillationspuffer	Roth, Karlsruhe
SelfPack POROS 20 R2	PerSeptive Biosystems, Framingham, USA

Sequencing Grade Modified Trypsin, Porcine	Promega, Madison (USA)
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich, Seelze
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton [®] X-100	Sigma-Aldrich, Seelze
Trypsin	Sigma-Aldrich, Seelze
Wasserstoffperoxid	Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm

2.1.3 Radioaktiv markierte Substanzen

L-[3- ³ H]-Alanin	Perkin Elmer, Rodgau
D-[2,3- ³ H]-Aspartat	Perkin Elmer, Rodgau
[¹⁴ C]-FR900098 (Fosmidomycin)	H. Jomaa, Universität Gießen
L-[3,4- ³ H]-Glutamat	Perkin Elmer, Rodgau
D-[³ H]-Glutamat	Hartmann Analytic, Braunschweig
Methoxy-[³ H]-Inulin	Perkin Elmer, Rodgau
L-[4,5- ³ H(N)]-Lysin	Perkin Elmer, Rodgau
D-[2,3- ³ H]-Pantothensäure	Hartmann Analytic, Braunschweig
L-[³ H(G)]-Serin	Perkin Elmer, Rodgau
L-[Ring-3,5- ³ H]-Tyrosin	Perkin Elmer, Rodgau

2.1.4 Antikörper

Anti ARL6IP5 (polyklonal)	Sigma-Aldrich, Seelze
Anti Bande 3 (monoklonal)	Sigma-Aldrich, Seelze
Anti EAAT 3 (monoklonal)	Invitrogen, Karlsruhe
Anti EAAT 5 (G20) (polyklonal)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti Spektrin (monoklonal)	Sigma-Aldrich, Seelze
Kaninchen-anti-Maus-IG-Antikörper Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	DAKO A/S (Dänemark)
Schwein-anti-Kaninchen-IG-Antikörper Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	DAKO A/S (Dänemark)
Kaninchen-anti-Ziege-IG-Antikörper Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	DAKO A/S (Dänemark)
Kaninchen-anti-Ziege-IG-Antikörper	Dianova, Hamburg

Cy3 gekoppelt

Kaninchen-anti-Maus-IG-Antikörper Dianova, Hamburg

Cy3 gekoppelt

2.1.5 Proteinmarker

Peptide Calibration Standard II Bruker Daltonik, Bremen

Spectra Multicolor Protein Ladder Fermentas, St. Leon

PageRuler Prestained Protein Ladder Fermentas, St. Leon

2.1.6 Analysesoftware

Bruker Bio Tools™ Bruker Daltonics, Bremen

Bruker Daltonics Flex Analysis Bruker Daltonics, Bremen

Bruker Daltonics Flex Control Bruker Daltonics, Bremen

2.1.7 Sonstiges

Humanes Plasma (Blutgruppe A/Rh⁺) Uni-Klinikum Marburg

Humanes Erythrozytenkonzentrat
(Blutgruppe A/Rh⁺) Uni-Klinikum Marburg

2.1.8 Puffer, Lösungen und Medien

Acrylamid-Lösung:

30% (w/v) Acrylamid,

0,8% (w/v) Bisacrylamid

Alaninlösung

10 mM HEPES wird mit KOH auf pH 7.4 eingestellt

300 mM L-Alanin

Alkylierungslösung:

100 mM Ammoniumbicarbonat

50 mM Iodoacetamid

Ammoniumpersulfat:

10% APS in H₂O.

Blockpuffer:

3% Milchpulver in PBS pH 7,4

0,01% Natriumazid

Cholinchloridpuffer

150 mM Cholinchlorid

10 mM Tris-HCl pH 7,4

20 mM Saccharose

Colloidal Coomassie - Färbelösung:

0,08% Coomassie Brilliant Blue G250

1,6% ortho-Phosphorsäure

8% Ammoniumsulfat

20% Methanol

Chymotrypsin-Lösung für die Behandlung der Membranen intakter Erythrozyten:

1 mg α -Chymotrypsin werden in 1 ml 1x PBS pH 7,4 gelöst, so dass sich eine Endkonzentration von 1 mg x ml⁻¹ ergibt.

Diffusionslösung (MALDI-TOF- Massenspektrometrie):

10% Acetonitril in 1 % TFA

ECL Lösungen:

ECL 1:

50 mM Luminol

0,8 mM p-Coumarsiure

200 mM Tris-HCl, pH 8,8

ECL 2 :

0,01% H₂O₂ in H₂O

Gebrauchsfertige ECL-Lösung :

2 ml ECL1 und 1 μ l ECL 2

Entfärbungslösung für die Gelspots :

200 mM Ammoniumbicarbonat

50% Acetonitril

Ghostpuffer

5 mM KH_2PO_4

Laemmli-Gelelektrophoresepuffer (1x)

25 mM Tris-HCl

192 mM Glycin

0,2% SDS

Matrixlösung (MALDI-TOF- Massenspektrometrie)

0,1% TFA wird 1: 2 mit Acetonitril versetzt; darin wird solange α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure gelöst, bis eine übersättigte Lösung entsteht. Diese wird kurz zentrifugiert und der Überstand als Matrixlösung verwendet.

Natriumchloridpuffer

150 mM Natriumchlorid

10 mM Tris-HCl pH 7,4

20 mM Saccharose

PBS (1x), pH 7,4:

140 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,5 mM KH_2PO_4

8,1 mM Na_2HPO_4

Phosphatase Inhibitor Cocktail (PhosIC)

250 mM Natriumfluorid

50 mM b-Glycerophosphate

50 mM Natriumpyrophosphate Decahydrate

50 mM Natriumorthovanadat

Ponceau S – Färbelösung:

0,2% Ponceau S in 3% Trichloressigsäure

Probenpuffer (SDS-PAGE):

Stammlösung:

100 mM Tris

0,2% Bromphenolblau

5 mM EDTA

20% (v/v) Glycerin

4% (w/v) SDS

Der pH-Wert wird mit HCl auf pH 6,8 eingestellt.

Gebrauchsfertiger Probenpuffer:

100 mM DTT

1 % β -Mercaptoethanol

10 ml Probenpuffer-Stammlösung

Proteaseinhibitor Cocktail (PIC)

100 mM AEBSF

80 μ M Aprotinin

5 mM Bestatin

1.5 mM E-64

2 mM Leupeptin Hemisulfat

1 mM Pepstatin A

Arbeitsverdünnung: 1:500

Reduktionslösung (MALDI-TOF- Massenspektrometrie):

100 mM Ammoniumbicarbonat

10 mM DTT

Sammelgelpuffer (4x) für SDS-PAGE (pH 6,8):

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

0,4% SDS

Semi-Dry-Blotpuffer:

48 mM Tris-HCl

39 mM Glycin

0,037% SDS

Säulenmaterial in den „ZipTips“ für die „Reversed Phase Chromatography“:

Jeweils eine Spatelspitze Poros 50 R2 und Oligo R3 in einem 1:1-Gemisch aus MeOH (Protein Sequencing Grade) und Wasser (HPLC Gradient Grade).

Sorbitol-Lösung:

300 mM Sorbitol

10 mM HEPES/NaOH pH 7,4

Trennpuffer (4x) für SDS-PAGE (pH 8,8):

1,5 mM Tris-HCl, pH 8,8

0,4% SDS

Trypsin-Lösung für die Behandlung der Membranen intakter Erythrozyten:

1 mg Trypsin werden in 1 ml 1x PBS pH 7,4 gelöst, so dass sich eine Endkonzentration von 1 mg x ml⁻¹ ergibt.

Trypsin-Lösung für die proteolytische Spaltung Proteinen im Polyacrylamidgel:

20 ng x µl⁻¹ Trypsin (Protein Sequencing Grade) in Trypsin Resuspension Buffer (Promega)

Waschpuffer (MALDI-TOF- Massenspektrometrie):

100 mM Ammoniumbicarbonat

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von *Plasmodium falciparum* in humanen Erythrozyten

Die Kultivierung von *P.falciparum* erfolgt in sterilen 250 ml Kunststoff-Kulturflächen der Firma Greiner Bio-One. Hierzu werden humane Erythrozyten der Blutgruppe A, Rhesusfaktor positiv mit 50 ml RPS-Medium auf einen Hämatokrit von 2% eingestellt. Anschließend werden 2×10^8 Trophozoiten hinzugegeben, und die Kultur bei 37°C sowie einer speziellen Gasatmosphäre (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) ^[Trager und Jensen, 1976] inkubiert.

Es werden Parasiten des Stamms FCBR kultiviert.

2.2.2 Anreicherung von Trophozoitenstadien (nach Trager, 1994)

Die Kultur wird geerntet, wenn sie eine Parasitämie von etwa 10% aufweist.

Dies wird mittels Ausstrich aus der Kultur überprüft. Hierzu werden 5 µl sedimentierte Zellen aus der Kulturflasche entnommen und auf einem Objektträger ausgestrichen. Anschließend werden die Zellen 10 Sekunden im Methanolbad fixiert und anschließend 10 Minuten in Giemsa-Färbelösung angefärbt. Nach der Entfärbung mit Wasser und Trocknen des Objektträgers kann die Parasitämie, durch Auszählen von ca. 500 Zellen, bestimmt werden.

Ist die erforderliche Populationsdichte vorzufinden, werden die Zellen sedimentiert (1.600 x g, 2 min). Nach der Zentrifugation wird das überstehende restliche Medium abgesaugt und die zurückbleibenden Zellen in 8 ml Gelafundin/RPMI-Medium (2,4 : 1,4 (v:v)) resuspendiert. Die Sedimentation erfolgt bei 37°C für 15 Minuten.

Aufgrund der Tatsache, dass Trophozoiten-infizierte Zellen an ihrer Oberfläche *knobs* ausgebildet haben, sedimentieren solche Zellen wesentlich langsamer als nichtinfizierte oder Ring-infizierte Erythrozyten. So entstehen nach der 15-minütigen Inkubationszeit zwei Phasen. Die Obere, welche die Trophozoiten enthält, wird in ein neues Falconröhrchen überführt, die untere mit Nichtinfizierten und Ringstadien wird verworfen.

Anschließend werden die Trophozoiten mittels Zentrifugation bei 1.600 x g für 2 Minuten sedimentiert und der entstehende Überstand wird abgesaugt.

Das entstandene Zellpellet wird in RPMI-Medium aufgenommen. Aus dieser Suspension wird ein weiterer Blutausrich angefertigt, mit Giemsa gefärbt und die Parasitämie ermittelt. Diese liegt in der Regel bei 80-90%.

2.2.3 Kultivierung der Hybridomazelllinie Klon T4

Die Hybridomazelllinie T4 wurde von der „*Developmental Studies Hybridoma Bank*“ der Universität Iowa bezogen. Sie wurden generiert von Lytle und Forbush (Lytle *et al.*, 1995) aus einer männlichen BALB/c/By J Maus die dem carboxy-terminalen Ende des Cotransporters NKCC1 (SLC12A2) immunisiert wurde. Die Zellen werden bei einer Zelldichte von 10^6 Zellen / ml in 10 ml Hybridoma Express Plus Medium der Firma PAA in sterilen 75 ml Kunststoff-Kulturflächen mit Fliterdeckel der Firma Greiner Bio-One kultiviert. Die Inkubation der Zellen findet bei 37°C und einer 5%igen CO₂ Atmosphäre statt.

2.2.4 Gewinnung von monoklonalen Antikörpern aus der Hybridomazelllinie T4

Zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern werden die T4 Hybridomazellen über mehrere Teilungszyklen ohne einen Wechsel des Mediums oder Verdünnungsschritte inkubiert. Die stark überwachsene Kultur wird in einer 15 ml Falconröhre bei 1.600 x g für 2 min sedimentiert und das überstehende Medium in eine neue 15 ml Falconröhre überführt. Die sedimentierten Zellen werden verworfen und der gewonnen Überstand erneut bei 3.000 x g für 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt dient der Entfernung verbleibender Zellbestandteile. Der von Zellfragmenten befreite Überstand wird zur Extraktion der in ihm enthaltenen Monoklonalen Antikörper auf eine Säule mit Protein-G Sepharose (GE-Healthcare) gegeben. Nach Durchfluss des Kulturmediums wird die Säule zwei mal mit je 10 ml 1x PBS pH 7,4 gewaschen. Die an die Säule gebundenen Antikörper werden mittels pH-Shift von der Säule eluiert. Hierzu wird 1 ml des Elutionspuffers (0,1 M Glycin, pH 3,0) auf die Säule gegeben und der Durchfluss in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Die eluierten Antikörper werden mit 1M Tris neutralisiert und zur Lagerung mit 0,01% Na-Azid versetzt. Zur Bestimmung der Antikörperkonzentration wird ein BCA-Assay durchgeführt.

2.2.5 Hämolyseassay

Dieser Versuchsansatz nutzt die erhöhte Permeabilität von infizierten Erythrozyten. Gibt man parasitierte und nichtparasitierte Erythrozyten in eine isoosmotische Lösung, so beobachtet man nur bei den infizierten Zellen eine Hämolyse. Durch den Einstrom von Molekülen aus dem extrazellulären Milieu in die Zelle, schwillt der infizierte Erythrozyt an und lysiert schließlich. Werden der isoosmotischen Lösung bekannte Ionenkanal-Inhibitoren (z.B. Furosemid, NBBP) zugesetzt, kann die

isoosmotische Lyse nicht induziert werden und die Zelle bleibt intakt. Anhand des ausgetretenen Hämoglobins kann die Lyse photometrisch (570 nm) quantifiziert werden. Für einen Hämolyse-Assay werden 3×10^7 infizierte Erythrozyten in 120 μl einer 300 mM L-Alanin-Lösung, in Ab- oder Anwesenheit von je 100 μM Furosemid, 100 μM Bumetanide, 100 μM R-(+)-DIOA, 50 μM HgCl_2 , 100 μM Ouabain oder 100 μM NPPB resuspendiert und 10 Minuten bei 37°C im Thermomischer inkubiert. Anschließend werden die Zellen bei 3.000 x g 15 sec. sedimentiert und 100 μl des Überstandes im Photometer bei 570 nm quantifiziert. Als Richtwert für eine 100%ige Lyse wird ein Zelläquivalent von 3×10^7 infizierter Erythrozyten mit 120 μl H_2O lysiert, anschließend bei 11.000 x g für 10 min sedimentiert und 100 μl des entstandenen Überstandes ebenfalls im Photometer bei 570 nm gemessen.

2.2.6 Natriumarsenit-Behandlung humaner Erythrozyten

Die Behandlung humaner Erythrozyten mit Natriumarsenit bzw. Natriumarsenat erfolgt mit leichten Modifikationen nach Flatman und Creanor (1999). Hierzu werden humane Erythrozyten mit einem Hämatokrit von 2% in RPS-Medium für 24h inkubiert. Die Inkubationsbedingungen gleichen denen für die Kultivierung von *Plasmodium falciparum* und umfassen eine spezielle Gasatmosphäre (5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2) sowie 37°C. Zur Behandlung mit Natriumarsenit werden die Erythrozyten aus der Kultur entnommen und dreimal mit 1x PBS pH 7,4 gewaschen. Anschließend werden 5×10^8 Erythrozyten in 1ml 1x PBS pH 7,4 mit 1 mM Natriumarsenit oder Natriumarsenat (0.01, 0.1, 0.5, 1 und 1.5 mM bei Versuch 3.6) aufgenommen und für 1h (5-80 min. bei Versuch 3.6) bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Um anheftende Reste von Natriumarsenit oder Natriumarsenat zu entfernen, werden die Zellen im Anschluss an die Inkubation erneut dreimal mit 1x PBS pH 7,4 gewaschen und dem Folgeexperiment zugeführt. Erythrozyten, die eine Natriumarsenit-Behandlung unterlaufen haben, werden im Folgenden auch als asRBC (arsenite treated Red Blood Cells) bezeichnet.

2.2.7 Messung des Influx radioaktiv markierter Substrate

Gemessen wird der unidirektionale Influx in RBC, iRBC und asRBC folgender Substrate: D- ^3H -Glutamat, L- ^3H -Glutamat, L- ^3H -Alanin, D- ^3H -Aspartat, Methoxy- ^3H -Inulin, L- ^3H -Serin, L- ^3H -Lysin, L- ^3H -Tyrosin, D- ^3H -Pantothensäure und ^{14}C -FR900098. Vor der Influxmessung werden die infizierten und nichtinfizierten Erythrozyten für 30 min. bei 37°C

in 1x PBS pH 7,4 inkubiert. Hierdurch stellt sich bei den Zellen ein Zustand ohne nennenswerten Membrantransport ein. Dies ermöglicht eine spezifischere Messung der Transportleistung einzelner Transporterklassen für dem Mangelmedium zugegebene Substanzen, ohne die Störung durch parallel ablaufende Transportereignisse. Für die mit Natriumarsenit behandelten Zellen ist dieser Punkt ohne Transport durch die Inkubation in der Natriumarsenit-Lösung gegeben.

2.2.8 Trennung von Zellen und Medium

Zur Messung der Aufnahme radioaktiv markierter Moleküle in nicht-infizierte Erythrozyten, infizierte Erythrozyten und Natriumarsenit-behandelte Erythrozyten werden eine definierte Zahl an Zellen in einem Medium, welches eines der radioaktiven Substrate enthält, inkubiert. Die Zellzahl und das Volumen des Mediums sowie die Menge an zugefügtem Substrat sind für jeden Versuch konstant bei 2×10^7 Zellen pro 100 μl und 1 μCi Substrat. Um zu definierten Punkten die Menge an aufgenommenem Substrat quantifizieren zu können, müssen die Zellen von dem sie umgebenden Medium getrennt werden.

Hierzu werden 100 μl der Zellsuspension auf ein Kissen aus 600 μl Dibutylphthalat geschichtet. Durch sedimentieren der Zellen bei 18.000 x g für 2 Minuten werden die Zellen vom Medium getrennt und somit die weitere Aufnahme des radioaktiven Substrats verhindert. Im Anschluss wird das Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren, was die gebildeten Phasen im Gefäß arretiert. Hierfür werden 100 μl der Zellsuspension auf ein Kissen aus 600 μl Dibutylphthalat geschichtet. Durch sedimentieren der Zellen bei 18.000 x g für 2 Minuten werden die Zellen vom Medium getrennt und somit die weitere Aufnahme des radioaktiven Substrats verhindert. Im Anschluss wird das Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren, was die gebildeten Phasen im Gefäß arretiert.

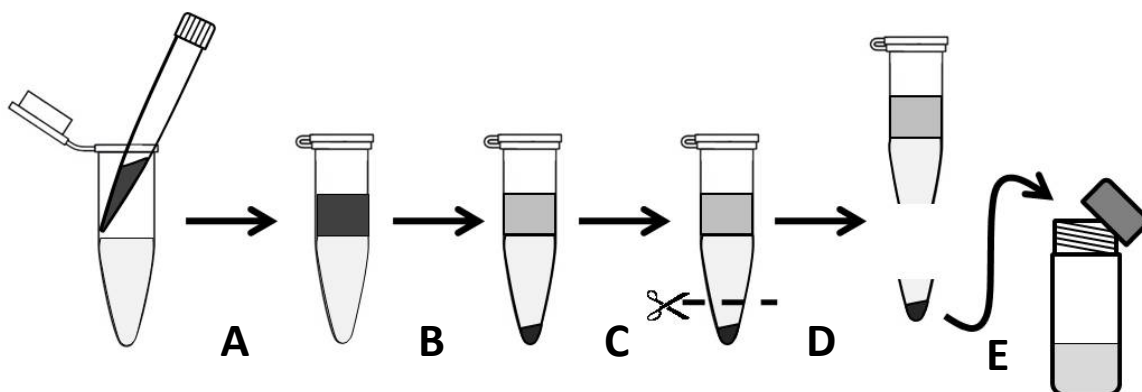


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Trennung von Medium und Zellen.

Die Suspension aus Zellen und Medium mit radioaktivem Substrat wird auf ein Dibutylphthalat-Kissen geschichtet (A) und anschließend zentrifugiert (B). Aufgrund seiner geringeren Dichte verbleibt das Medium auf dem Kissen, wohingegen die Zellen durch das Dibutylphthalat sedimentieren. Die drei entstandenen Phasen werden durch einfrieren im flüssigem Stickstoff arretiert (C) und können durch zerschneiden des Reaktionsgefäßes voneinander getrennt werden (D). Das abgetrennte Zellpellet wird in ein Szintillationsgefäß überführt (E) und die Menge an enthaltenem radioaktivem Substrat mittels Szintillationszähler bestimmt.

Um das entstandene Zellpellet von der Mediumphase zu trennen, wird das Reaktionsgefäß mit einer Zange auf Höhe der Dibutylphthalatphase abgeschnitten (siehe Abb. 2.1) und das untere Ende des Gefäßes, welches die Zellen enthält, wird in ein Szintillationsröhrchen mit 2 ml Szintillationspuffer überführt. Die Menge an intrazellulärem Substrat wird mittels Szintillationszähler festgestellt. Die Messzeit pro Probe beträgt 2 Minuten.

2.2.9 Messung der Aufnahme radioaktiv markierter Substrate über die Zeit

In diesem Assay werden $2,5 \times 10^8$ Erythrozyten, infizierte Erythrozyten und Natriumarsenit behandelte Erythrozyten in je 1,2 ml 1x PBS pH 7,4 aufgenommen die 12 μCi einer der radioaktiv markierten Substanzen enthalten. Die Zellsuspension wird bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zu den Zeitpunkten 1, 5, 10, 15 und 20 Minuten werden Aliquots von je 2×10^7 Zellen ($1 \mu\text{Ci} \times 100 \mu\text{l}^{-1}$) entnommen und wie in 2.2.8 beschrieben prozessiert.

Die Werte jedes Zeitpunktes werden aus Triplikaten ermittelt.

2.2.10 Berechnung der Verteilung von radioaktiven Substanzen zwischen Zellen und dem sie umgebenden Medium

Die graphische Darstellung der Szintillationsmessungen wird im Verhältnis von intrazellulärer und extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats über die Zeit angegeben [Saliba *et al.* 1998]. Zunächst muss die Menge an anhaftendem und nicht aufgenommenem radioaktivem Substrat aus den Zwischenräumen der Erythrozyten bestimmt werden. Hierzu werden 2×10^7 Zelle in $100 \mu\text{L}$ 1x PBS pH 7,4 mit je $1 \mu\text{Ci}$ einer der radioaktiven Substanzen vermischt und sofort wieder durch ein Dibutylphthalat-Kissen sedimentiert (Vergleich 2.2.8). Jeder Wert wird sechsfach bestimmt und ein Mittelwert gebildet. Der so gewonnene Wert wird als *Trap* bezeichnet. Von den aus den Szintillationsmessungen gewonnenen Werten werden zunächst die Traps abgezogen ($x \text{ CPM} - \text{Trap CPM} = y \text{ CPM}$). Der gewonnene Wert entspricht der intrazellulären Menge an radioaktivem Substrat pro eingesetzter Zellzahl ($y \text{ CPM} / 2 \times 10^7$ Zellen). Um die Werte für die intrazelluläre Konzentration mit denen des extrazellulären Mediums vergleichen zu können, muss das Volumen der eingesetzten Zellen ermittelt werden. Basierend auf Saliba *et al.* 1998 wird das Volumen eines einzelnen Erythrozyten mit $0,000000028 \mu\text{L}$ definiert. Bei 2×10^7 Zellen ergibt sich daher ein Volumen von $0,56 \mu\text{L}$ und somit eine intrazelluläre Konzentration von $y/0,56 \text{ CPM} \times \mu\text{L}^{-1}$.

Zur Bestimmung der im Medium eingesetzten Radioaktivitätsmenge werden 100 μL 1x PBS pH 7,4 mit je 1 μCi einer der radioaktiven Substanzen versetzt und 1 μL dieser Lösung im Szintillationszähler gemessen. Jeder Wert wird sechsfach bestimmt und ein Mittelwert gebildet ($m \text{ CPM} \times \mu\text{L}^{-1}$). Um das Verhältnis von intrazellulärer und extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats zu erhalten wird $[\text{y}/0,56 \text{ CPM} \times \mu\text{L}^{-1}]_i$ durch $[\text{m CPM} \times \mu\text{L}^{-1}]_o$ geteilt. Bei Werten < 1 ist die extrazelluläre Konzentration, bei Werten > 1 die intrazelluläre Konzentration höher. Werte = 1 stellen ein Äquilibrium dar.

2.2.11 Messung der Aufnahme radioaktiv markierter Substrate unter dem Einfluss von Inhibitoren

Für die Inhibitorstudien werden 6×10^7 iRBC und asRBC in je 300 μL 1x PBS pH 7,4 aufgenommen, die NPPB, Furosemid, Nifluminsäure, *cis*-ACBD oder HIP-A in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 μM enthalten. Zu jedem Ansatz werden 3 μCi einer der radioaktiv markierten Substanzen zugegeben und die Zellsuspension bei 37°C unter leichtem Schütteln für 10 Minuten inkubiert. Die im Anschluss an die Inkubation folgende Separation von Zellen und Medium, sowie die Quantifizierung der aufgenommenen Substratmenge erfolgt wie in 2.2.8 beschrieben und für jeden Messpunkt als Triplikat. Für die Ansätze mit *cis*-ACBD und HIP-A ist eine Inkubation von 10 Minuten vor der Zugabe des radioaktiven Substrats bei 37°C unter leichtem Schütteln notwendig, da die Inhibitionswirkung sonst verringert ist. Die graphische Darstellung erfolgt in Prozent der Aufnahme von nicht inhibierten Zellen gegen die Inhibitorkonzentration.

2.2.12 Bestimmung des Influx radioaktiver Aminosäuren in Anwesenheit von nicht-radioaktiver Aminosäuren

Zur Bestimmung der kompetitiven Inhibition radioaktiv markierter Substrate durch nicht markierte Aminosäuren werden 6×10^7 iRBC und asRBC in je 300 μL 1x PBS pH 7,4 aufgenommen, dem Konzentrationen von 1, 10, 50 oder 100 μM L-Alanin, L-Glutamat, D-Glutamat oder D-Aspartat zugefügt werden. Zu jedem Ansatz werden 3 μCi einer der radioaktiv markierten Substanzen zugegeben und die Zellsuspension bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einer 10 Minütigen Inkubation werden die Zellen wie in 2.2.8 beschrieben vom sie umgebenden Medium getrennt und die Menge an aufgenommenen radioaktivem Substrat quantifiziert. Für jeden Messpunkt werden drei Werte ermittelt. Die

graphische Darstellung erfolgt in Prozent der Aufnahme von Zellen ohne nicht-radioaktive Aminosäure gegen die Konzentration der nicht-radioaktiven Aminosäure.

2.2.13 Bestimmung der Natriumabhängigkeit der L-[³H]-Glutamat, L-[³H]-Alanin, D-[³H]-Glutamat und D-[³H]-Aspartat Aufnahme

2,5x10⁸ infizierte Erythrozyten und Natriumarsenit-behandelte Erythrozyten werden fünfmal in natriumfreiem Cholinpuffer (150 mM Cholinchlorid, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 und 20 mM Saccharose) oder Natriumchloridpuffer (150 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 und 20 mM Saccharose) gewaschen, um ein natriumfreies- oder natriumhaltiges Milieu zu erzeugen. Im Anschluss werden die Zellen in je 1,2 ml Natrium- oder Cholinpuffer aufgenommen die 12 µCi L-[³H]-Glutamat, L-[³H]-Alanin, D-[³H]-Glutamat oder D-[³H]-Aspartat enthalten. Zu den Zeitpunkten 1, 5, 10, 15 und 20 Minuten werden Aliquots von je 2x10⁷ Zellen (1 µCi x 100 µl⁻¹) entnommen und wie in 2.2.8 beschriebenen Prozessiert. Die Werte jedes Zeitpunktes werden aus Triplikaten ermittelt. Die graphische Darstellung erfolgt wie in 2.2.10 beschrieben.

2.2.14 Untersuchung der Wirkung des Kinaseinhibitors H-9 und des Inhibitors des Ubiquitin-aktivierenden-Enzyms (E1), PRY-41, auf die Aufnahme von L-[³H]-Glutamat

Je 5x10⁸ Erythrozyten werden in 1 ml einer 1 mM Natriumarsenit-Lösung inkubiert, welcher 5 µM des Kinaseinhibitors H-9 oder 20 µM PYR-41, ein Inhibitor des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1, zugesetzt wird. Die Behandlung mit Natriumarsenit folgt der unter 2.2.6 beschriebenen Prozedur. Von den so behandelten Erythrozyten werden Aliquots von 6x10⁷ Zellen in je 300 µL 1x PBS pH 7,4 aufgenommen die 3 µCi L-[³H]-Glutamat enthalten und für 10 min. bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Menge an aufgenommenen L-[³H]-Glutamat wird wie in 2.2.8 beschrieben quantifiziert. Als Kontrolle dienen asRBC die unter gleichen Bedingungen jedoch ohne Inhibitoren inkubiert werden.

2.2.15 Proteasebehandlung intakter Zellen

In der Regel werden für die Proteasebehandlung 5x10⁸ infizierte Erythrozyten und Natriumarsenit-behandelte Erythrozyten verwendet. Die Zellen werden in 500 µl 1x PBS pH 7,4 resuspendiert und bei 6.000 x g, 15 sec wieder sedimentiert. Dieser Waschschrift wird zweimal wiederholt. Anschließend werden die Zellen in 500 µl einer Protease-Lösung

resuspendiert. Als Proteasen werden Chymotrypsin und Trypsin verwendet, die in einer Endkonzentration in der Zellsuspension von $1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ eingesetzt werden.

Die Reaktionsansätze werden bei 37°C oder 22°C unter leichtem Schütteln für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert und dreimal mit $1000 \mu\text{l}$ $1\times$ PBS pH 7,4 gewaschen.

2.2.16 Bestimmung des Einflusses von Proteasen auf die Natriumarsenit-induzierbare Permeabilität in Erythrozyten

Um den Einfluss einer Chymotrypsin- oder Trypsin-Behandlung auf die Natriumarsenit-induzierbare Permeabilität in Erythrozyten mit zu untersuchen, werden Erythrozyten entweder vor oder nach der Induktion mit Natriumarsenit wie in 2.2.15 beschrieben mit Chymotrypsin oder Trypsin behandelt. Im Anschluss werden die Zellen für 10 min. in Anwesenheit von L- ^3H -Glutamat in $1\times$ PBS pH 7,4 inkubiert und die Menge an aufgenommenem L- ^3H -Glutamat wie in 2.2.8 beschrieben quantifiziert. Die graphische Darstellung erfolgt wie in 2.2.10 beschrieben.

2.2.17 Bestimmung des Einflusses von Chymotrypsin auf die Induzierbarkeit von Erythrozyten mit Natriumarsenit

3×10^8 Erythrozyten werden wie beschrieben mit Natriumarsenit behandelt (2.2.6) und die induzierte Permeabilität für L- ^3H -Glutamat kontrolliert. Die induzierten Zellen werden anschließend mit $1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ Chymotrypsin bei 37°C für 30 min. inkubiert und der Effekt der Protease auf die induzierte Permeabilität für L- ^3H -Glutamat kontrolliert. Anschließend werden die Zellen für 15min. in 5 ml RPMI im Wasserbad inkubiert. Dieser Schritt ist notwendig, da die Zellen bei einer unmittelbar folgenden Natriumarsenit-Behandlung sofort lysieren. Dieser Zyklus von Aktivierung mit Natriumarsenit und Chymotrypsinierung wird dreimal wiederholt. Nach jedem Schritt wird die Effizienz der induzierten Permeabilität überprüft.

2.2.18 Alphaxalon-Behandlung humaner Erythrozyten und Messung der induzierten Permeabilität

Humane Erythrozyten werden unter gleichen Inkubationsbedingungen wie sie für die Kultivierung von *Plasmodium falciparum* gelten inkubiert. Hierzu werden sie mit einem

Hämatokrit von 2% in RPS-Medium unter einer speziellen Gasatmosphäre (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) bei 37°C für 24h inkubiert. Zur Behandlung mit Alphaxalone werden die Erythrozyten aus der Kultur entnommen und dreimal mit 1x PBS pH 7,4 gewaschen. Anschließend werden 6x10⁷ Erythrozyten in 500 µL 1xPBS pH 7,4 mit 1 µM Alphaxalon aufgenommen und für 5 min. bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation werden die Zellen bei 11.000 x g für 1 min. sedimentiert und in 300 µL 1xPBS pH 7,4 mit 3 µCi L-[³H]-Glutamat oder L-[³H]-Alanin aufgenommen. Die Zellsuspension wird bei 37°C für 10 min. inkubiert und die aufgenommene Menge an radioaktivem Substrat wird wie in 2.2.8 beschrieben bestimmt.

2.2.19 Präparation einer *Ghost*-Fraktion aus infizierten Erythrozyten

Durch die Lyse der infizierten Zelle in hypotonischem Puffer oder Wasser ist es möglich lösliche Proteine von Membranproteinen zu trennen. Eine Unterscheidung der einzelnen Membranfraktionen in Parasit, PVM und Erythrozyt ist hiermit jedoch nicht möglich. Da die an der Vermittlung der NPP-Aktivität beteiligten Transporter und Kanäle in der Erythrozytenmembran zu vermuten sind, wäre eine Aufreinigung dieser Membran für eine biochemische Analyse dieser Transportproteine hilfreich.

Die Trennung von *Ghost* und Parasitenpellet geschieht nach Baumeister *et al.* 2008 mit einigen Modifikationen. Hierbei werden zunächst 10⁹ infizierte Erythrozyten dreimal mit 1xPBS pH 7,4 gewaschen und anschließend in 1000 µL Ghostpuffer (5 mM KH₂PO₄ + PIC) überführt und sorgfältig gemischt. Die Zellsuspension wird bei 4°C für 5 min. inkubiert und die entstehenden Zellfragmente bei 36.000 x g für 20 min. sedimentiert.

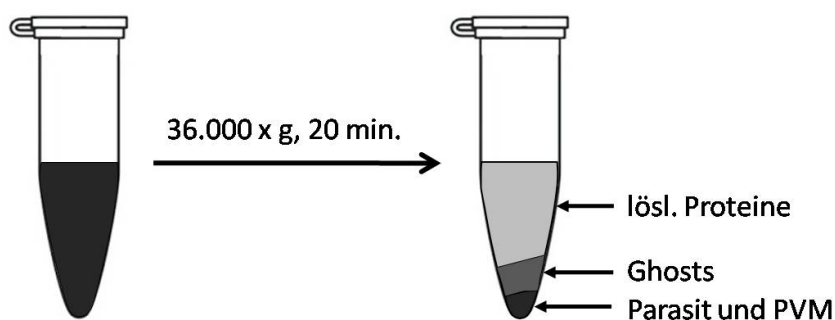


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Phasen die bei einer Ghost-Präparation entstehen.

Infizierte Erythrozyten werden in Ghostpuffer aufgenommen und nach einer kurzen Inkubation sedimentiert. Nach der Zentrifugation sind drei Phasen im Reaktionsgefäß erkennbar. Ein dunkles Pellet aus Parasit und PVM, darüber die Schicht mit den Erythrozytenmembranen oder Ghosts und als Überstand die löslichen Proteine der Parasiten und der Erythrozyten.

Es wird vermutet, dass bei dieser Art der hypotonischen Lyse die Parasiten mit der PVM durch den aufgebauten Osmotischen Druck abrupt aus dem Erythrozyten ausgestoßen werden. Die Erythrozytenmembran verschließt sich im Anschluss wieder und bildet somit die *Ghosts*. Nach der Zentrifugation haben sich im Reaktionsgefäß drei Phasen gebildet (siehe Abb. 2.1); eine Phase mit den löslichen Proteinen von Parasit und Erythrozyt, eine Phase mit den Erythrozytenmembranen, den sogenannten *Ghosts* und ein Pellet, welches die Plasmamembranen des Parasiten sowie die PVM enthält. Die Fraktion der löslichen Proteine wird verworfen und die Ghostfraktion in ein neues Reaktionsgefäß mit 1000 µL Ghostpuffer überführt und die Suspension erneut bei 36.000 x g für 20 min. sedimentiert. In Versuchsansätze, die das Parasitenpellet umfassen, wird auch dieses erneut mit 1000 µL Ghostpuffer versetzt und sedimentiert. Nach der Zentrifugation wird das überstehende Medium entfernt und die Ghostfraktion in ein neues Cup überführt. Reste von Parasitenmaterial, welche als schwarzer Punkt im Boden des Reaktionsgefäßes erkennbar sind, sind hierbei im Cup zu belassen und werden verworfen. Im Falle der Parasitenfraktion werden das überstehende Medium sowie evtl. neu gebildete *Ghosts* abgenommen und verworfen.

2.2.20 SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970)

Die aus den Separationen gewonnenen *Ghost*- und Membranfraktionen werden in Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 95°C aufgeköcht. Durch das Aufkochen werden die Membranproteine denaturiert. Das im Probenpuffer enthaltene DTT sorgt für eine Reduktion der Disulfidbrücken innerhalb der Proteine. SDS sorgt für eine einheitlich negative Ladung der Proteine. Hierdurch wird eine Auftrennung im elektrischen Feld nach Molekülmasse möglich.

Um die Größe der aufgetragenen Proteine bestimmen zu können, wird der Spectra Multicolor Broad Range Marker oder der PageRuler Prestained Protein Marker als Größenstandard mit aufgetragen.

Die Zusammensetzung der Gele, die in den Experimenten verwendet werden, ist in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der in den Experimenten verwendeten Gele.

Art des Gels	4 %	5%	7,5 %	10 %	15%
Acrylamid	3,8 ml	5 ml	7,5 ml	10 ml	15 ml
Trenngel-Puffer		7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
Sammelgel-Puffer	7,5 ml				
H ₂ O-Bidest.	18,6 ml	17,5 ml	15 ml	12,5 ml	7,5 ml
APS	150 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	50 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

2.2.21 Coomassie-Färbung

Nach der Auftrennung via SDS-PAGE werden die im Gel befindlichen Proteine angefärbt. Hierzu wird das zu färbende Gel aus der Gellaufkammer entfernt und in ein Kunststoffbehältnis überführt, welches mit 80 ml Coomassie-Färbelösung gefüllt wird. Als Farbstoff dient Coomassie Brilliant Blue G250. Der Färbeansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur und unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wird die überstehende Farblösung entfernt und das Gel mit H₂O entfärbt.

2.2.22 Western-Blot (nach Towbin *et al.* 1979)

Für eine Immundetektion ist es notwendig die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren. Hierzu werden sechs Whatman-Filterpapiere sowie eine Nitrozellulosemembran auf die exakte Gelgröße zugeschnitten. Die Filterpapiere sowie die Transfermembran werden anschließend in Blot-Puffer eingeweicht und zusammen mit dem Gel als „Sandwich“ in eine Blotting-Kammer gestapelt. Dieses Verfahren wird als Semi-Dry-Wester-Blot bezeichnet. Anschließend wird an das „Western-Blot-Sandwich“ eine Spannung von 1 mA/cm² für eine Stunde angelegt. Hierdurch kommt es zu einem Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran.

Nach dem Transfer wird die Nitrozellulosemembran aus der Kammer entnommen und für fünf Minuten in Ponceau-Färbelösung inkubiert. Hierdurch werden auf der Membran gebundene Proteine unspezifisch angefärbt. Dies ermöglicht es, die Ladespuren auf dem Blot zu markieren.

Nach dem Einzeichnen wird der Blot in H₂O für fünf Minuten entfärbt und anschließend in Blocklösung überführt. Die in der Blocklösung enthaltenen Milchproteine binden an noch

nicht proteinbedeckte Stellen auf der Nitrozellulosemembran und verhindern somit unspezifische Bindungen von Antikörpern an die Membran bei einer späteren Immundetektion.

2.2.23 Immundetektion

Für die Immundetektion werden folgende Antikörper im angegebenen Verhältnis in PBS pH 7,4 mit 2% BSA eingesetzt:

- Anti-ARL6IP5 1:1000
- Anti-EAAT 3 1:500
- Anti-EAAT 5 1:500
- Anti-NKCC 1 1:1000
- Anti-Spektrin 1:2000

Nach Entfernung der Blocklösung wird der Blot in die Antikörpersuspension transferiert und unter leichtem Schütteln für zwei Stunden bei Raumtemperatur, bzw. über Nacht bei 4°C, inkubiert. Im Anschluss wird die überstehende Antikörper-Lösung abgenommen und der Blot in der Folge 1x mit Tris-Sal-Puffer pH 7,4 mit 0,5% Tween20 und 2x mit Tris-Sal-Puffer pH 7,4 für jeweils 10 Minuten unter Schütteln gewaschen. Anschließend wird die Membran für 1,5 – 2 Stunden bei RT mit dem entsprechenden Sekundär-Antikörper inkubiert. Nach Entfernung der Antikörper-Lösung wird der Blot erneut in der Folge 1x mit Tris-Sal-Puffer pH 7,4 mit 0,5% Tween20 und 2x mit Tris-Sal-Puffer pH 7,4 für jeweils 10 Minuten unter Schütteln gewaschen.

Für eine HRP-Detektion wird der Blot mit einer Lösung aus 4 ml ECL1-Reagenz und 2 µl ECL2-Reagenz überschichtet. Die an den Antikörper gebundene Peroxidase katalysiert eine Lichtreaktion, welche auf Röntgenfilm abgelichtet werden kann.

2.2.24 Immunfluoreszenzassay

Die Präparation der Immunfluoreszenz folgt dem Protokoll von Tonkin *et al.* 2004.

Hierfür werden je 2×10^8 Erythrozyten dreimal mit 1 ml 1xPBS pH 7,4 gewaschen und anschließend in 1 ml Fixierungslösung (1x PBS pH 7,4 mit 4 % Paraformaldehyd und 0,0075 % Glutaraldehyd) aufgenommen. Die Zellsuspension wird bei Raumtemperatur für 30 min. unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen bei 3000 x g für 2 min. sedimentiert und einmal mit 1 ml 1xPBS pH 7,4 gewaschen. Um intrazelluläre Epitope für die

Antikörper zugänglich zu machen werden die gewaschenen Zellen in 1 ml Permeabilisierungspuffer (0,1 % Triton-X-100 in 1 ml 1xPBS pH 7,4) aufgenommen und 10 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die permeabilisierten Erythrozyten erneut mit 1 ml 1xPBS pH 7,4 gewaschen worden sind, werden sie in 1 ml Quenchingpuffer (125 mM Glycin in 1 ml 1xPBS pH 7,4) resuspendiert und für 10min. bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Dieser Schritt dient dem Abpuffern noch vorhandenen Paraformaldehyds, welches durch Kreuzvernetzung zu unspezifischen Bindungen des Antikörpers führen würde. An die Inkubation in Quenchinpuffer schließt ein erneuter Waschschrift mit 1 ml 1xPBS pH 7,4 an und die Aufnahme der Zellen in 1 ml Blockpuffer (3 % BSA in 1 ml 1xPBS pH 7,4). In diesem Puffer werden die Erythrozyten für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt dient ebenfalls der Unterbindung unspezifischer Reaktionen zwischen Antikörper und Erythrozytenproteinen. Im Anschluss an den Blockschrift werden die Erythrozyten in 1 ml 1xPBS pH 7,4 gewaschen und in 200 µL Antikörperlösung aufgenommen. Als Antikörper werden Anti-Bande 3 (1:2000), Anti-EAAT 5 (1:500) und Anti-EAAT 3 (1:500) eingesetzt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C. Um Überschüssige Antikörper zu entfernen, werden die Zellen dreimal für je 10 min. in 1 ml 1xPBS pH 7,4 gewaschen. Im Anschluss werden die Zellen für 1h bei Raumtemperatur mit dem 2. Antikörper (Kaninchen-anti-Maus-Cy3 1:2000 und Kaninchen-anti-Ziege-Cy3 1:2000) inkubiert. Abschließend werden die Erythrozyten dreimal mit 1xPBS pH 7,4 gewaschen und auf Objektträger aufgetragen.

Als Kontrollen dienen Erythrozyten ohne 1. und 2. Antikörper, sowie Zellen die nur in Anwesenheit des 2. Antikörpers inkubiert werden.

Die Auswertung findet mit einem inversen Epifluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss statt.

2.2.25 MALDI-TOF-Analyse von Proteinen aus Polyacrylamidgelen

Proteine die für eine MALDI-TOF-Analyse bestimmt sind, werden wie beschrieben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt.

Die Präparation der Proteine ist abgewandelt nach Hellman *et al.*, 1995.

Zum Auspicken der Gelbanden wird das entfärbte Gel auf eine Klarsichtfolie gelegt. Mit Hilfe einer blauen Pipettenspitze, deren Ende auf passende Größe zurechtgeschnitten wurde, wird die Bande von Interesse aus dem Gel getrennt und in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend folgt eine 30minütige Inkubation des Gelstückes in

Entfärbelösung (200 mM NH_4HCO_3 , 50% CH_3CN) bei 37°C unter leichtem Schütteln. Nachdem die Gelstücke entfärbt sind, wird der überstehende Entfärber abgesaugt und die Stücke im Vakuum bei 37°C für 30 min getrocknet. Die getrockneten Gelstücke werden in 200 μl Reduktionspuffer (100 mM NH_4HCO_3 , 10 mM DTT) bei 56°C für 30 min inkubiert. Dieser Schritt dient der Reduktion von Disulfidbrücken innerhalb des Proteins. Die Reaktion wird durch Entfernen der Reduktionslösung und einmaliges Waschen der Proben mit Waschpuffer (100 mM NH_4HCO_3) beendet.

Um eine erneute Rekonstitution der Disulfidbrücken zu verhindern, wird die Probe im Anschluss mit 200 μl Alkylierungspuffer versetzt und im Dunkeln bei RT für 30 min inkubiert. Nach Entfernen des Puffers und einem Waschschrift mit Waschpuffer erfolgt die erneute Trocknung der Gelstücke. Nach der Trocknung wird 15 μl Trypsin-Lösung auf die Stücke aufgetragen. Die getrockneten Stücke absorbieren die Trypsin-Lösung und schwellen bei der einstündigen Inkubation bei 4°C wieder auf ihre Originalgröße. Hierdurch kommt es zu einer gleichmäßigen Verteilung des Trypsins innerhalb des Gelstücks. Nach Ablauf der Inkubation sollte gewährleistet werden, dass die Gelstücke mit Protease-Lösung bedeckt sind. Anschließend werden die Proben auf dem Deckel des Reaktionsgefäßes für 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Invertieren der Reaktionsgefäße während der Verdauzeit verhindert, dass zuviel der Protease-Lösung verdunstet und sich am Deckel des Gefäßes niederschlägt. Nach Ablauf der 18 Stunden wird die Probe mit 15 μl Diffusions-Lösung (10% CH_3CN , 1% Trifluoressigsäure) versetzt und für 45 min bei 37°C im Ultraschallbad behandelt. Danach werden 15 μl des Überstandes, welcher die tryptisch verdauten Proteine enthält, auf „ZipTips“ geladen. Diese enthalten eine Säule für die „Reversed Phase Chromatographie“. Für die „ZipTips“ werden „Gel-Loader-Tips“ (Eppendorf) am vorderen Ende verengt, um einen Austritt von Säulenmaterial zu verhindern. Anschließend wird das Säulenmaterial in den „Tip“ appliziert und mittels Spritze zum Ende gedrückt. So entsteht eine 5 – 10 mm lange Säule. Die Säule wird in Folge mit 10 μl Methanol und 10 μl 0,5% Ameisensäure gewaschen. Ein weiterer Waschschrift mit 10 μl 0,5% Ameisensäure folgt nach Beladen der Säule mit der Probe.

Um die an die Säule gebundenen Peptide zu eluieren, werden 2 μl Matrix auf die Säule geladen. Durch Druck, welcher mit einer Spritze erzeugt wird, werden Matrix und Peptide aus dem „ZipTip“ auf ein Taget aufgebracht.

Als Standard zur Kalibrierung des MALDI-TOF-Gerätes wird ebenfalls ein Marker- Peptid-Mix auf das Target aufgebracht. Nach einer 20 min Trocknungsphase kann das Target in das MALDI-TOF-Gerät eingelesen werden.

Die Massenspektrometrie wird an einem UltraFlex MALDI-TOF-TOF II (Bruker Daltonics) mit einem Stickstofflaser (337 nm, 3 ns Puls mit 50 Hz) durchgeführt.

Die „peptid mass fingerprint“-Spektren werden mit der Software „FlexAnalysis“ und „Biotools“ bearbeitet. Hierbei werden die Spektren geglättet, um eine größere Anzahl möglicher Peptid-Peaks zu bekommen. Anschließend werden die Daten an den im Peptidgemisch und damit in den Spektren vorhandenen Trypsin-Peaks rekali­briert und diese Trypsin-Fragmente aus den Daten entfernt. Im Anschluss werden die überarbeiteten Daten mittels „Mascot-search“ gegen die „NCBI-Datenbank“ abgeglichen. Der Abgleich erfolgt unter folgenden variablen Modifikationen: Datenbank, *H. sapiens* und *P.falciparum*, Trypsin als Enzym, „methionine oxidation“ und „cysteine carbamidomethylation“.

2.2.26 Gewinnung von Peptiden aus Oberflächenproteinen von intakten infizierten Erythrozyten mit Chymotrypsin (*cell shaving*)

Um Membranproteine des infizierten Erythrozyten zu identifizieren, welche an der Entstehung der NPP beteiligt sein könnten, wird die unterschiedliche Zugänglichkeit dieser Proteine gegenüber einer Behandlung mit Chymotrypsin bei 22°C und 37°C genutzt [Baumeister et al., 2006]. Hierfür werden zunächst je 1×10^{10} infizierter Erythrozyten im Trophozoitenstadium wie beschrieben aufgereinigt und dreimal mit 1xPBS pH 7,4 gewaschen. Die Zellen werden in 1000 μL 1xPBS pH 7,4 mit $0,5 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ Chymotrypsin aufgenommen und bei 22°C für 30 min. inkubiert. Anschließend werden die Zellen bei 6.000 x g, 1 min. sedimentiert, das überstehende Medium verworfen und die Zellen dreimal mit 1xPBS pH 7,4 gewaschen, um anheftende Peptide zu entfernen. Die gewaschenen Zellen werden in 500 μL 1xPBS pH 7,4 mit $0,5 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ Chymotrypsin aufgenommen und bei 37°C für 30 min inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen bei 6.000 x g, 1 min. sedimentiert und das überstehende Medium in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 mM PMSF versetzt um das enthaltene Chymotrypsin zu inhibieren. Die Inhibition der NPP durch Chymotrypsin bei 37°C wird mittels Hämolyseassay kontrolliert und die Zellen bei positivem Ergebnis verworfen. Der gewonnene Überstand wird bei 36.000 x g für 30 min. zentrifugiert um enthaltene Zellbestandteile zu entfernen. Weiterhin verbleibende Membranfragmente und intakte

Proteine wie etwa Hämoglobin werden mittels Zentrifugalkonzentrator (VivaSpin 500, Sartorius) mit einer Ausschlussgröße von 5 kDa aus dem Überstand zu entfernen.

Um das Peptidgemisch im Massenspektrometer analysieren zu können, müssen störende Salze aus der Lösung entfernt werden. Hierzu wird der Überstand über Nacht bei 4°C gegen 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat dialysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingelagert.

2.2.27 MALDI-TOF-Analyse von Peptiden aus „*cell shaving*“ Experimenten

Die durch die Behandlung von intakten infizierten Erythrozyten mit Chymotrypsin gewonnenen Peptide werden zunächst mittels Kapillar-HPLC aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt über eine 125 Å Aqua C18 Säule der Firma Phenomenex mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml x min⁻¹. Als Eluenten dienen 0,1% TFA und 0,1% TFA mit 84% ACN. Injiziert wurden je 100 µl Peptidmischung. Die aufgetrennten Peptide werden maschinell auf ein AnchorChip-Target der Firma Bruker getropft und im MALDI-TOF Massenspektrometer im automatischen Lauf analysiert. Hierbei wird für jeden Spot ein MS-Spektrum und für die fünf prominentesten Massen je ein MSMS-Spektrum erstellt. Die Gerätesetups und die zur Analyse der Spektren benötigten Software entsprechen den in 2.1.6 und 2.2.25 beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Durch die Analyse von Chymotrypsin-generierten Peptiden intakter, infizierter Erythrozyten können Kandidaten für die *Novel Permeation Pathways* benannt werden.

Diese Dissertation greift initial Ansätze und Ergebnisse meiner Diplomarbeit und der daraus resultierenden Publikation von Baumeister *et al.* 2006 auf, die sich mit der Zugänglichkeit der an der Bildung der *Novel Permeations Pathways* beteiligten Transportproteine für Proteasen beschäftigte. So konnte ich zeigen, dass die beteiligten Proteine eine Sensitivität für Chymotrypsin jedoch nicht für Trypsin besitzen. Auch die Temperatur während der Inkubation mit der Protease hat einen entscheidenden Einfluss auf die inhibitorischen Effekte der Proteasen. So bewirkt eine Inkubation intakter, infizierter Erythrozyten in einer Chymotrypsinlösung bei 37°C eine vollständige Inhibition der NPP, wohingegen eine Inkubation bei 22°C keinerlei Effekt auf die NPP-Aktivität hat. Hieraus lassen sich Vorhersagen über die Beschaffenheit der an der Vermittlung der NPP beteiligten Proteinen ableiten. Zunächst sollten die involvierten Proteine an der Oberfläche der Plasmamembran exponiert sein. Die zur Inhibition führende Chymotrypsinbehandlung wurde an intakten, infizierten Erythrozyten durchgeführt und ein Influx von Protease in die Zelle konnte nicht nachgewiesen werden. Zum anderen sollten die beteiligten Proteine unempfindlich gegenüber einer Behandlung mit Trypsin bei 37°C oder Chymotrypsin bei 22°C sein. In meiner vorhergehenden Arbeit habe ich versucht, die Unterschiede zwischen den Proteasen und den Inkubationstemperaturen zu nutzen, um aus Vergleichen des durch Auftrennen der Membranproteine auf einer SDS-PAGE erhaltenen Bandenmusters die beteiligten Proteine darzustellen. Die Benennung von Kandidatenproteinen, die an der Bildung der NPP beteiligt sind, ist mit diesem Ansatz nicht möglich. Das Bandenmuster im Coomassie-gefärbten SDS-Gel stellt sich als sehr komplex dar und die Unterschiede zwischen den einzelnen Proteasebehandlungen sind sehr gering. Einzig für Bande 3 konnte mithilfe von Western-Blots und einem spezifischen Antikörper eine klare Aussage getroffen werden, die gegen die Beteiligung des Proteins an der Bildung der NPP spricht ^[Baumeister *et al.*, 2006].

Da eine Analyse auf der Ebene von Proteinen mittels SDS-PAGE nicht möglich ist, wurde im Folgenden ein Gel-freier Ansatz gewählt, der die Analyse der durch die Proteasebehandlung entstandenen Peptide zum Ziel hatte. Hierbei wurden intakte, infizierte Erythrozyten zunächst mit Chymotrypsin bei 22°C behandelt, um Proteine, welche aufgrund ihrer

Zugänglichkeit für die Protease bei dieser Temperatur nicht an den NPP beteiligt sein können, zu entfernen. Dieser Schritt verringert zudem die Komplexibilität des zu erwartenden Spektrums der Massenanalyse. Im Anschluss wurden die Zellen einer Behandlung mit Chymotrypsin bei 37°C unterzogen. Die durch die Protease bei dieser Temperatur abgespaltenen Peptide wurden aus dem überstehenden Puffer isoliert, mittels Kapillar-HPLC aufgetrennt und im MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert.

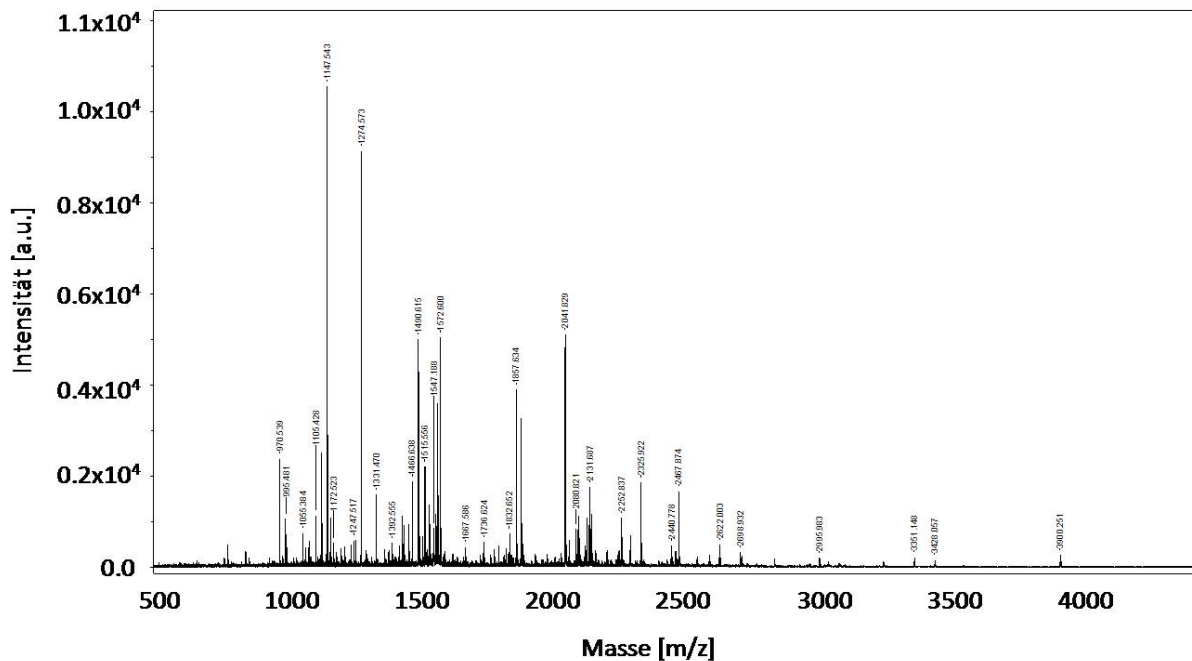


Abb. 3.1: Massenspektrum der durch die Behandlung intakter, infizierter Erythrozyten mit Chymotrypsin generierten Peptide.

Intakte, infizierte Erythrozyten wurden zunächst mit Chymotrypsin ($0,5 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$) bei 22°C inkubiert, um Proteine zu spalten, die nicht an der Vermittlung der NPP beteiligt sind. Um Peptide von NPP-relevanten Proteinen zu erhalten, wurden die Zellen im Anschluss mit Chymotrypsin ($0,5 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$) bei 37°C inkubiert und von den generierten Peptiden separiert. Weiterhin verbleibende Membranfragmente und intakte Proteine wurden mittels Zentrifugalkonzentration aus dem Überstand entfernt und das Peptidgemisch zwecks Entsalzung gegen Ammoniumhydrogencarbonat dialysiert. Vor der Auftrennung in der Kapillar-HPLC wurde das Peptidgemisch mittels MALDI-TOF auf seinen Peptidgehalt überprüft.

Das Spektrum zeigt die Komplexität des Peptidgemisches vor dessen Auftrennung mittels Kapillar-HPLC. Im Wesentlichen sind durch die Behandlung der Zellen mit Chymotrypsin bei 37°C Peptide zwischen ca. 900 Da und 4200 Da entstanden, wobei sich die Mehrheit der Peptide in einem Massenbereich von 1000 Da bis 2500 Da befindet. Als sehr prominent treten die Massen 1117 Da und 1274 Da hervor. Hierbei handelt es sich zu einen um das Oberflächenprotein Bande 3 (1117 Da), welches aufgrund seiner hohen Abundanz in der Erythrozytenmembran auch sehr prominent im Massenspektrum vertreten ist. Zum anderen

konnte Hämoglobin (1274 Da) nachgewiesen werden, welches bei der massenspektrometrischen Analyse von Erythrozytenproteinen als bekannte Kontamination auftritt [Nyalwidhe und Lingelbach, 2006].

Um die Komplexität des Gemisches zu reduzieren und die enthaltenen Peptide für eine Analyse zugängliche zu machen, wurde die nach Chymotrypsin-Behandlung intakter, infizierter Erythrozyten gewonnene Peptid-Lösung mittels Kapillar-HPLC aufgetrennt und die erhaltenen Fraktionen auf ein MALDI-TOF-Target aufgetragen.

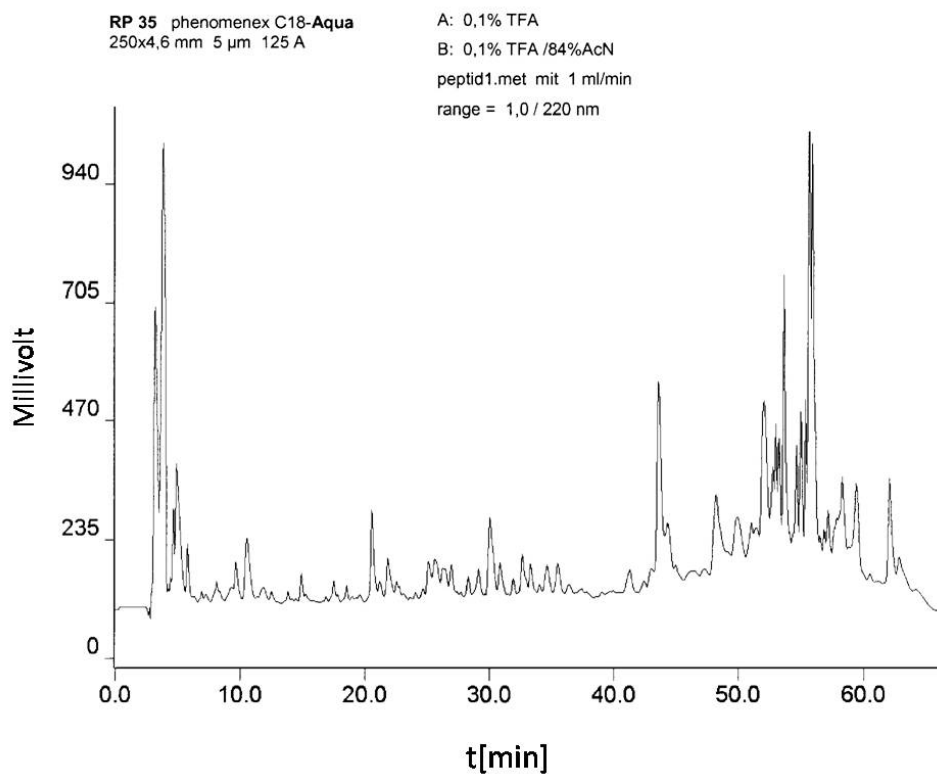


Abb. 3.2: Chromatogramm der aufgetrennten Peptidmischung.

Die nach Chymotrypsin-Behandlung intakter, infizierter Erythrozyten gewonnen Peptide wurden mittels Kapillar-HPLC aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte über eine 125 Å Aqua C18 Säule der Firma Phenomenex mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml x min⁻¹. Als Eluenten dienen 0,1% TFA und 0,1% TFA mit 84% ACN. Injiziert wurden je 100 µl Peptidmischung.

Das Chromatogramm zeigt die Konzentration an Peptiden, welche zu bestimmten Zeitpunkten und bei einem bestimmten Mischungsverhältnis der beiden Lösungsmittel von der HPLC-Säule auf das Target eluiert wurden. Auffallend ist die große Menge an Peptiden, welche zum Ende hin und mit steigender Konzentration des organischen Lösungsmittels Acetonitril von der Säule eluiert wurden. Dies spricht für die Präsenz einer Vielzahl hydrophober Peptide, welche unter Umständen ihren Ursprung in der Verwendung von Chymotrypsin als Protease haben.

Die auf dem MALDI-TOF-Target aufgetragenen Peptidfraktionen wurden im Folgenden mittels Massenspektrometer analysiert. Hierzu wurde zunächst von jeder Peptidfraktion ein Übersichtsspektrum (MS) generiert, aus welchem die fünf prominentesten Massenpeaks für eine Einzelidentifikation mit Lift-MS (MSMS) herangezogen wurden.

Insgesamt ergab diese Analyse die Identifikation von 430 Proteinen, von denen 374 humanen Ursprungs sind und 56 *Plasmodium falciparum* zugeordnet werden konnten. Nicht alle 430 Proteine können als echte Identifikationen angesehen werden, was ursächlich an der Verwendung von Chymotrypsin für die Generierung der Peptide liegt. Die durch Chymotrypsin generierten Peptide können hydrophobe N-Termini aufweisen, welche die Flugeigenschaften des Peptids im Massenspektrometer negativ beeinflussen. Ebenso ist Chymotrypsin mit seinen sechs möglichen Schnittstellen im Substrat bei weitem unspezifischer, wie das normalerweise für MALDI-TOF-Analyse verwendete rekombinante Trypsin. Beim Abgleich der generierten Peptide mit den theoretischen Peptiden der Datenbank können hieraus falsch-positive Identifikationen resultieren. So finden sich unter den identifizierten Proteinen eine Vielzahl von hypothetischen Humanproteinen und solche, die im Rahmen von Patenten generiert wurden und synthetischen Ursprungs sind. Des Weiteren finden sich Proteine, die als Organ-fremd anzusehen sind, da sie nicht in Erythrozyten vorkommen. In Tabelle 3.1 sind identifizierte Proteine zusammengefasst, die einen erythrozytären Ursprung besitzen und deren Identifizierung basierend auf dem MASCOT MOWSE-Score als eindeutig anzusehen ist ^[Nyalwidhe und Lingelbach, 2006].

Tabelle 3.1: Signifikant identifizierte Proteine aus der MALDI-TOF-Analyse von Chymotrypsin-generierten Peptiden.

Protein	Accession-No.	Score	Peptide	Herkunft
Bande 3	B3HU	809	13	Human
Glukosetransporter Glut1	Q59GX2_HUMAN	224	3	Human
Aquaporin 1	AQP1_HUMAN	92	1	Human
Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ Cotransporter (NKCC1)	S12A2_HUMAN	35	1	Human
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase alpha 4 Untereinheit	Q504T2_HU	25	1	Human
K ⁺ /Cl ⁻ -Cotransporter 1 (KCC1)	S12A4_HUMAN	17	1	Human
Glycophorin C	GFHUC	163	1	Human
PIESP2 erythrocyte surface protein	Q81488_PLAF7	140	3	Parasit
Flotillin 1	Q5ST80_HUMAN	125	2	Human
Rhesus C/E Antigen	RHCE_HUMAN	95	2	Human
PfEMP1 Fragment	Q6LF42_PLAF7	40	1	Parasit
Bande 7 (Stomatin)	STOM_HUMAN	39	1	Human
Chondroitinsulfate Synthase 1	CHSS1_HUMAN	41	1	Human
Otoferlin	OTOF_HUMAN	27	1	Human
Integrin beta-5	AAH06541	25	1	Human
Ankyrin 1	SJHUK	743	13	Human
Spectrin, beta	Q59FP5_HUMAN	412	10	Human
Dematin	I39062	153	3	Human
EPB42	Q4KKX0_HUMAN	132	3	Human
Ankyrin 3	A55575	123	3	Human
Tropomodulin	A42336	118	2	Human
Spectrin, alpha	SJHUA	116	3	Human
Alpha Adducin	ADDA_HUMAN	109	3	Human
Actin, beta	ACTB_HUMAN	40	4	Human
Bande 4.1	MMHUE4	39	1	Human
Hämoglobin, beta (Fragment)	Q4TWB7_HUMAN	321	5	Human
Hämoglobin, alpha (Fragment)	HBA_HUMAN	187	2	Human
Hämoglobin, beta (Fragment)	Q6VFAQ6_HUMAN	64	1	Human
Serumalbumin	ALBU_HUMAN	29	2	Human

Die eindeutig identifizierten Proteine können in vier Gruppen eingeteilt werden. Zum einen in lösliche Proteine (weiß), die wie Hämoglobin oder Albumin als bekannte Kontamination bei Analysen dieser Art auftreten ^[Nyalwidhe und Lingelbach, 2006]. Zum anderen finden sich Proteine mit Membranassoziation (grau), wie etwa Spectrin und Ankyrin. Sie stellen im Erythrozyten neben dem Hämoglobin eine große Population, da sie für die essentielle Verformbarkeit des Erythrozyten sorgen. Sie werden durch lysierte Erythrozyten und deren Membranfragmente, die während der Präparation entstehen, zugänglich für die Protease. Des weitern finden sich Transmembranproteine (helles Grau), welche eine oder mehrere Domänen besitzen, die die Erythrozytenmembran durchspannen. Die Peptide dieser Proteine werden durch Proteolyse der extrazellulären Domänen generiert. Zu diesen Proteinen zählen beispielsweise Glycophorin C, Flotillin 1 oder das Rhesus-Antigen C/E. In dieser Gruppe sind auch die beiden

einzigsten, eindeutig identifizierten Parasitenproteine PIESP 2 und PfEMP 1 zu finden. Von den einfachen Transmembranproteinen ist die Gruppe der Transportproteine (dunkles Grau) abzugrenzen. Diese besitzen mehrere Transmembrandomänen und können Substanzen über die Erythrozytenmembran transportieren. Die hier identifizierten Transportproteine haben mit den an der Bildung der NPP beteiligten Proteinen ihre Sensitivität gegenüber Chymotrypsin gemein, da sie aus Peptiden identifiziert wurden, welche durch eine solche Behandlung generiert wurden. Dies macht sie zu potentiellen Kandidaten für die Vermittlung der NPP-Aktivität in infizierten Erythrozyten. Basierend auf vorangegangenen Untersuchungen kann Bande 3 als Kandidat ausgeschlossen werden [Baumeister *et al.* 2006]. Für den identifizierten Glukosetransporter Glut1 gilt eine Beteiligung an den NPP als wahrscheinlich [Roth *et al.*, 1990; Kirk, 2001]. Da der von ihm vermittelte Transport bereits weitläufig untersucht ist und sich im Wesentlichen auf den Transport von Glukose beschränkt, wurde er in den folgenden Ansätzen nicht miteinbezogen.

3.2 NKCC1-Inhibitoren blockieren die *Novel Permeation Pathways* in infizierten Erythrozyten.

Von den für Chymotrypsin zugänglichen und mittels Massenspektrometrie identifizierten Transportproteinen ist theoretisch jedes in der Lage, einen Teil des Influxes im Rahmen der NPP zu übernehmen. Um den Kreis der möglichen Kandidaten aus den identifizierten Proteinen zu verringern, wurde im Folgenden die hemmende Wirkung von spezifischen Inhibitoren für die identifizierten Transportproteine auf die Funktionalität der NPP untersucht. Dies geschah mit Hilfe der isoosmotischen Lyse. Sie erlaubt mit einfachen Mitteln und in kurzer Zeit eine Aussage über die Funktionalität der NPP. Die isoosmotische Hämolyse nutzt die veränderten Permeabilitätsbedingungen in infizierten Erythrozyten. Gibt man Trophozoiten-infizierte Erythrozyten in eine 300 mM L-Alanin-Lösung, so kommt es zu einem Influx von extrazellulären Molekülen über die NPP in die Zellen. Hierdurch beginnen diese zu schwellen, bis es schließlich durch Lyse der Zelle zum Austritt von Hämoglobin in das umgebende Medium kommt. Das ausgetretene Hämoglobin lässt sich im Photometer quantifizieren. Somit können die mittels Photometer bestimmten Hämoglobinwerte in Relation zu der Funktionalität der NPP-Kanäle gesetzt werden [Kirk, 2001]. Dieser Einstrom von Molekülen und damit die Lyse der Zellen lassen sich mit Inhibitoren unterbinden, somit kann ein Ausbleiben der Lyse mit einer Inhibition der NPP korreliert werden.

3. Ergebnisse

Die Hämolyse-Assays wurden in Anwesenheit von bekannten Inhibitoren für die identifizierten Proteine durchgeführt; Bumetanid für NKCC1, Ouabain für die Na^+/K^+ -ATPase, R-(+)-DIOA für den KCC1 und Quecksilber(II)Chlorid für Aquaporin 1. Als Positivkontrollen dienten die bereits bekannten NPP-Inhibitoren NPPB und Furosemid.

Für eine 100%ige Lyse wurde eine äquivalente Anzahl infizierter Erythrozyten in destilliertem Wasser lysiert und die Menge an freigewordenem Hämoglobin mittels Photometer bestimmt.

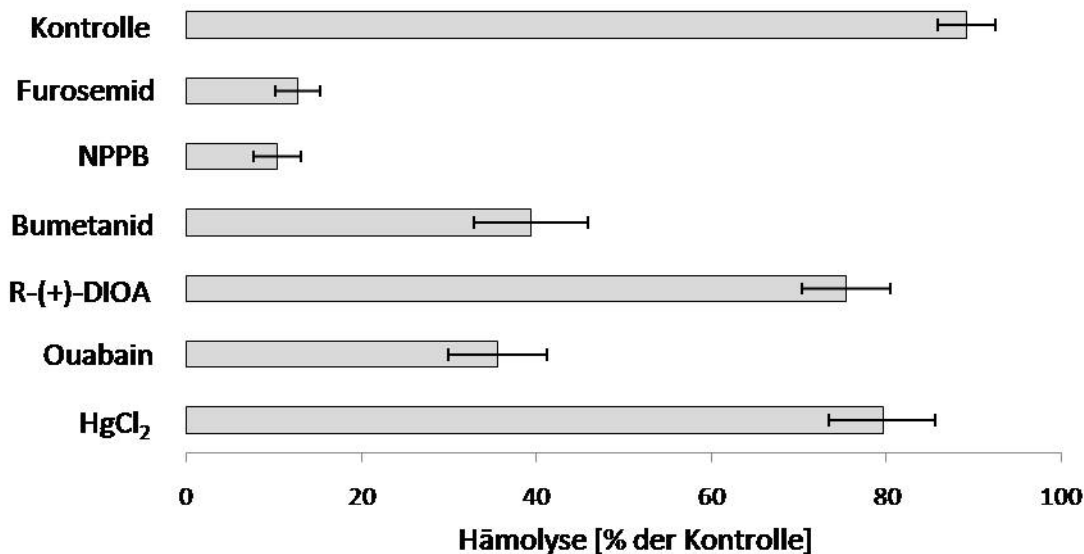


Abb. 3.3: Furosemid, NPPB, Bumetanid und Ouabain inhibieren die Hämolyse infizierter Erythrozyten.

Isoosmotische Hämolyse infizierter Erythrozyten unter dem Einfluss von Furosemid, NPPB, Bumetanid, Ouabain, R-(+)-DIOA oder Quecksilber(II)Chlorid. Die Zellen wurden in Anwesenheit der Inhibitoren bei 37°C für 10 min. in einer 300 mM L-Alanin-Lösung inkubiert und der Grad der Zelllyse über die photometrische Messung des ausgetretenen Hämoglobins im Medium bestimmt. Die Kontrolle stellen iRBC dar, die ohne Inhibitor in L-Alanin-Lösung inkubiert wurden. Als Richtwert für eine 100 %ige Lyse dienen 3×10^7 iRBC, die in Wasser lysiert wurden.

Wie zu erwarten, ist bei den unbehandelten infizierten Erythrozyten eine Hämolyse feststellbar, wobei etwa 90% der Kontrollzellen in 300 mM L-Alanin-Lösung lysieren. Die Zugabe der bekannten NPP-Inhibitoren Furosemid und NPPB führt zu der erwarteten Hemmung der Hämolyse. Weder die Inhibition von Aquaporin 1 mit HgCl_2 noch die Verwendung von DIOA zur Inhibition von KCC1 führen zur Hemmung der NPP und somit der Hämolyse. Eine Beteiligung dieser Proteine an den NPP ist somit unwahrscheinlich. Der Einsatz von Ouabain führt zu einer partiellen Inhibition der Hämolyse. Es ist bekannt, dass die NPP einen Ouabain-sensitiven und einen Ouabain-resistenten Transportweg umfassen [Kirk *et al.* 1991]. Der von der Ouabain-inhibierbaren, humanen Na^+/K^+ -ATPase vermittelte

Transport von Natrium aus der Zelle und Kalium in die Zelle steht im Gegensatz zu den Gegebenheiten bei infizierten Erythrozyten, was eine Beteiligung dieser ATPase an der Bildung der NPP unwahrscheinlich macht.

Bei den mit Bumetanid behandelten Zellen konnte eine Hämolyse von ca. 35% festgestellt werden. Wie im Fall von Ouabain umfassen die NPP einen Bumetanid-sensitiven und einen Bumetanid-resistenten Transportweg ^[Kirk et al. 1991].

Anders als die humane Na^+/K^+ -ATPase ist der durch Bumetanid inhibierbare Cotransporter NKCC1 mit seinen Transporteigenschaften in der Lage, an der Vermittlung der NPP-Aktivität zu partizipieren.

3.3 NKCC1 ist in Erythrozyten nachweisbar.

Um die Identifikation von NKCC1 in Erythrozyten mittels MADLI-TOF zu verifizieren, ist eine biochemische Analyse mittels Western-Blot und Immundetektion notwendig.

Hierzu wurden aus den Ghostfraktionen infizierter und nicht-infizierter Erythrozyten Membranproteine extrahiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden auf NC-Folie transferiert und mit einem Anti-NKCC1 Antikörper detektiert. Der zur Detektion von NKCC1 verwendete monoklonale Antikörper wurde von Lytle und Forbush (1995) generiert und wurde aus der Kultur von Hybridomazellen des Klons T4 extrahiert.

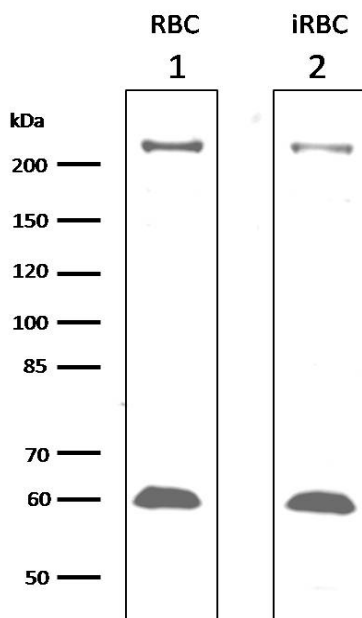


Abb. 3.4: NKCC1 ist in Erythrozyten mit dem von Lytle und Forbush (1995) generierten Antikörper detektierbar.

Detektion von NKCC 1 im Western-Blot mit dem aus der T4-Hybridomakultur aufgereinigten monoklonalen α -NKCC1-Antikörper.

1. nicht-infizierte Erythrozyten
2. infizierte Erythrozyten

7,5 %iges SDS-Gel; 2×10^7 Zellen pro Spur; α -NKCC 1 (1:1000); Kaninchen- α -Maus-HRP (1:2000)

Nach der Detektion mit dem monoklonalen NKCC1-Antikörper ist in beiden Fraktionen eine deutliche Bande bei ca. 230 kDa zu erkennen. Diese Bande korreliert mit einem von Lytle und Forbush (1995) postulierten Dimer des NKCC1-Proteins. Das bei etwa 130 kDa zu

erwartende Monomer ist nicht nachweisbar. Neben dem hochmolekularen Dimer ist in beiden Zellfraktionen eine weitere Bande bei ca. 60 kDa nachweisbar, welche ein NKCC1-Fragment darstellen könnte.

3.4 NKCC1 ist sensitiv gegenüber Chymotrypsin.

Wie bereits beschrieben, zeigen die NPP unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber Trypsin und Chymotrypsin. Auf diesem Hintergrund sollte die Beteiligung des mit MALDI-TOF und Western-Blot identifizierten Proteins NKCC1 untersucht werden. Hierzu wurden intakte infizierte und nicht-infizierte Erythrozyten mit Trypsin und Chymotrypsin behandelt und anschließend mittels SDS-PAGE und Western-Blot aufgearbeitet. Als Kontrolle dienten unbehandelte infizierte und nicht-infizierte Erythrozyten.

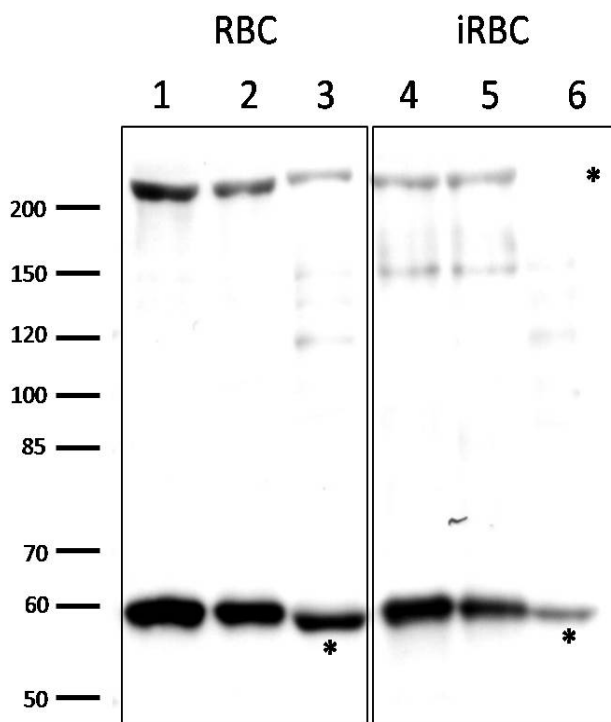


Abb. 3.5: NKCC1 wird durch Chymotrypsin, jedoch nicht durch Trypsin proteolytisch gespalten.

Detektion von NKCC1 im Western-Blot nach der Behandlung von RBC und iRBC mit Chymotrypsin ($1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$) und Trypsin ($1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$).

1. unbehandelte RBC
2. Trypsin-behandelte RBC
3. Chymotrypsin-behandelte RBC
4. unbehandelte iRBC
5. Trypsin-behandelte iRBC
6. Chymotrypsin-behandelte iRBC

7,5 %iges SDS-Gel; 2×10^7 Zellen pro Spur; α -NKCC1 (1:1000); Kaninchen- α -Maus-HRP (1:2000)

Die Detektion mit dem NKCC1-Antikörper zeigt das in 3.2 beschriebene Bandenmuster. Die zusätzliche Bande auf Höhe von ca. 130 kDa, die unter anderem bei den infizierten Kontrollzellen zu erkennen ist, könnte dem NKCC1-Monomer entsprechen.

Eine Behandlung mit Trypsin hat sowohl bei den infizierten, als auch bei den nicht-infizierten Zellen nur geringfügigen Einfluss auf die zu detektierenden Banden. Dem entgegen führt die proteolytische Aktivität von Chymotrypsin zu einem Shift der bei etwa 60 kDa nachweisbaren Bande. Diese Reduktion in der Bandengröße ist bei beiden Zelltypen

feststellbar. Das NKCC1-Dimer der infizierten Erythrozyten ist zugänglich für Chymotrypsin und nach der Behandlung mit der Protease nicht mehr nachweisbar. Im Gegensatz hierzu stellt sich das Dimer bei den nicht-infizierten Zellen resistenter gegenüber Chymotrypsin dar. Die Unterschiede in der Proteasesensitivität zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen, sowie zwischen den unterschiedlichen Proteasen, könnten ein Hinweis auf eine infektionsbedingte Modifikation des Proteins sein. Dies könnte für eine Beteiligung des Cotransporters an den NPP sprechen.

3.5 Eine Behandlung mit Natriumarsenit induziert die Lyse infizierter Erythrozyten, nicht-infizierte Erythrozyten bleiben intakt.

Wie viele Kanäle und Transporter ist NKCC1 nicht ständig aktiv. So konnte gezeigt werden, dass dieser Cotransporter, hervorgerufen durch Veränderungen im Ionenhaushalt der Zelle, mittels Kinasen phosphoryliert und somit aktiviert werden kann. Diese Aktivierung von NKCC1 in nicht-infizierten Erythrozyten kann in einem artifiziellen System, durch die Behandlung dieser Zellen mit Natriumarsenit, induziert werden [Flatman und Creanor, 1999]. Den Autoren gelang es, durch die Inkubation von Frettchen-Erythrozyten in einer 1 mM Natriumarsenit-Lösung eine oder mehrere noch unbekannte Kinasen zu aktivieren, was zu einem gesteigerten Einstrom von ^{86}Rb in die Erythrozyten führt. Da mit dem induzierten Influx von ^{86}Rb eine starke Phosphorylierung von NKCC1 einhergeht, schrieben sie dieses Phänomen einer kinaseabhängigen Aktivierung dieses Cotransporters zu.

Wie bei der Regulation von NKCC1, so scheinen Kinasen auch an der Induktion der *Novel Permeation Pathways* beteiligt zu sein. Die Überexpression der parasiteneigenen R-Untereinheit der Proteinkinase A (PKA), dem negativ-Regulator dieser Kinase, führt zu einem nahezu vollständigen Verlust der NPP-Aktivität [Merckx et al., 2008], was im Rückschluss auf eine Beteiligung der PKA an der Bildung der NPP schließen lässt. Im Folgenden sollte der von Flatman und Creanor (1999) entwickelte Ansatz zur kinasevermittelten Aktivierung von NKCC1 genutzt werden, um Rückschlüsse auf eine Beteiligung des Cotransporters an der Bildung der NPP ziehen zu können. Hierzu sollte der durch Natriumarsenit erzeugte Influx in Erythrozyten mit dem, durch die Infektion mit *P. falciparum* induzierten Permeabilitätsänderungen in der Wirtszelle verglichen werden. Da die Autoren für ihre Experimente Erythrozyten des Frettchens verwendet haben, wurde zunächst die Durchführbarkeit einer Behandlung mit Natriumarsenit an humanen Erythrozyten sowie an

infizierten humanen Erythrozyten untersucht. Basierend auf dem Protokoll von Flatman und Creanor wurden 5×10^8 infizierte und nicht-infizierte Erythrozyten mit 1 mM Natriumarsenit in PBS pH 7,4 für 1h bei 37°C inkubiert und das bei einer möglichen Lyse der Zellen austretende Hämoglobin mittels Photometer quantifiziert. Als Kontrollen wurden infizierte und nicht-infizierte Zellen mit 1 mM Natriumarsenat behandelt, welches der basierenden Publikation zur Folge, keine Permeabilität für ^{86}Rb in Erythrozyten induziert. Ebenso wurden Zellen in PBS inkubiert, um eine Lyse durch den Puffer auszuschließen. Als Richtwert für eine vollständige Lyse dienen 5×10^8 Erythrozyten, welche in Wasser lysiert wurden.

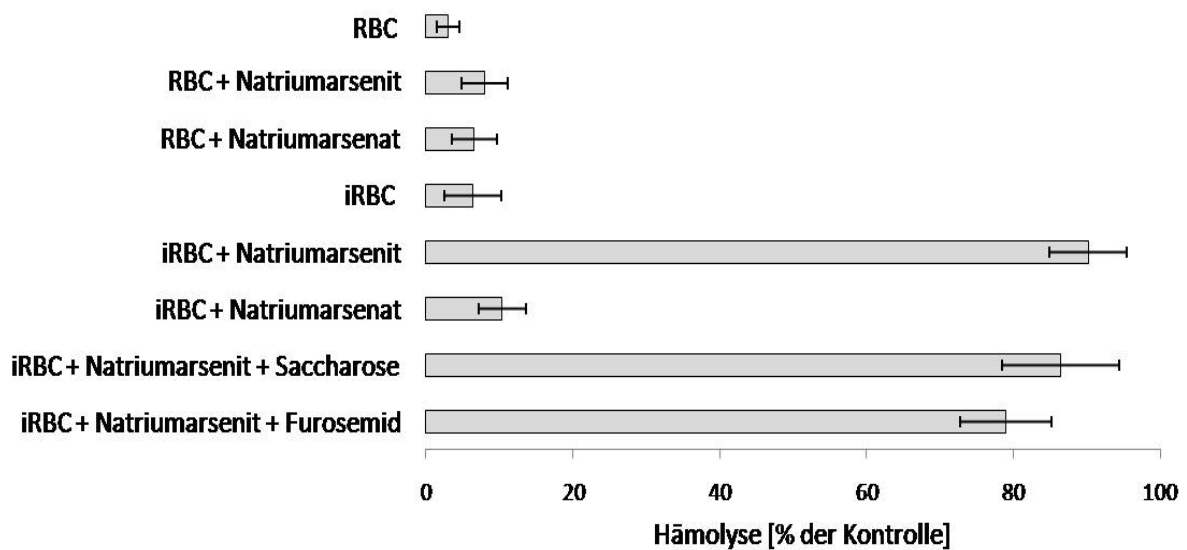


Abb. 3.6: Eine Behandlung mit Natriumarsenit führt in infizierten, jedoch nicht in nicht-infizierten Erythrozyten zu einer Lyse der Zellen.

Quantifizierung der durch die Behandlung mit Natriumarsenit hervorgerufenen Lyse infizierter und nicht-infizierter Erythrozyten. Die Zellen wurden in Anwesenheit von 1 mM Natriumarsenit, 1 mM Natriumarsenat oder PBS bei 37°C über 1h inkubiert und der Grad der Zelllyse über die photometrische Messung der Menge an Hämoglobin im Medium bestimmt. Als Richtwert für eine 100 %ige Lyse dienen 5×10^8 RBC die in Wasser lysiert wurden.

Die Behandlung von humanen Erythrozyten mit Natriumarsenit führt zu keinem nennenswerten Austritt von Hämoglobin, was gegen eine Lyse der Zellen spricht. Dies gilt im gleichen Maße für die mit Natriumarsenat-behandelten infizierten und nicht-infizierten Zellen. Im Gegensatz hierzu führt die Inkubation von infizierten Erythrozyten in der Natriumarsenit-Lösung zu einer vollständigen Lyse der Zellen. Die Lyse kann weder durch die Zugabe von 20 mM Saccharose, welche einen osmotischen Gegendruck erzeugt, noch durch die Zugabe von 100 μM Furosemid, einem Ionenkanalinhibitor, unterbunden werden.

Es besteht die Möglichkeit, dass es durch die Natriumarsenit-Behandlung zu einer Hyperaktivierung eines, in infizierten Erythrozyten aber nicht in nicht-infizierten Zellen bereits bestehenden Permeabilitätsweges kommt, was zu einem unkontrollierten Flux von Ionen und somit zur Lyse der Zelle führt.

3.6 Natriumarsenit induziert in Erythrozyten eine, den NPP ähnliche, Permeabilität für L-Glutamat und D-Aspartat, jedoch nicht für L-Alanin.

Es besteht die Möglichkeit, dass an der Bildung der NPP auch humane Kanäle und Transporter beteiligt sind. Diese Transportwege in infizierten Zellen lassen sich z.B. durch oxidativen Stress in nicht-infizierten Erythrozyten nachahmen ^[Huber et al. 2002]. Die Behandlung mit Natriumarsenit könnte zu einer Überaktivierung der NPP, und somit der bereits aktiven Wirtstransporter, in infizierten Erythrozyten führen. Demnach könnte eine Behandlung mit Natriumarsenit in nicht-infizierten Erythrozyten, ähnlich der Oxidation dieser Zellen, eine den NPP ähnliche Permeabilität für verschiedene Substrate erzeugen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden humane Erythrozyten wie beschrieben mit Natriumarsenit behandelt und der Influx von radioaktiv markierten Aminosäuren in die Zelle quantifiziert. Die gemessenen Influxraten wurden mit denen von unbehandelten und parasitierten Erythrozyten verglichen. Der Fokus dieser Untersuchung lag auf dem Transport von Aminosäuren, da diese, im besonderen Glutamat und Aspartat, in infizierten Erythrozyten einzig über die *Novel Permeation Pathways* aufgenommen werden.

Um den Influx verschiedener Aminosäuren in nicht-infizierte, infizierte und mit Natriumarsenit-behandelte Erythrozyten zu quantifizieren, wurden die verschiedenen Zellen über einen Zeitraum von 20 Minuten in Anwesenheit einer radioaktiv markierten Aminosäure inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Zellen entnommen und die aufgenommene Menge an radioaktivem Substrat mittels Szintillationszähler bestimmt. Um eine große Bandbreite an möglichen Transportwegen abzudecken, wurden Aminosäuren mit unterschiedlichen Resten und Ladungen verwendet.

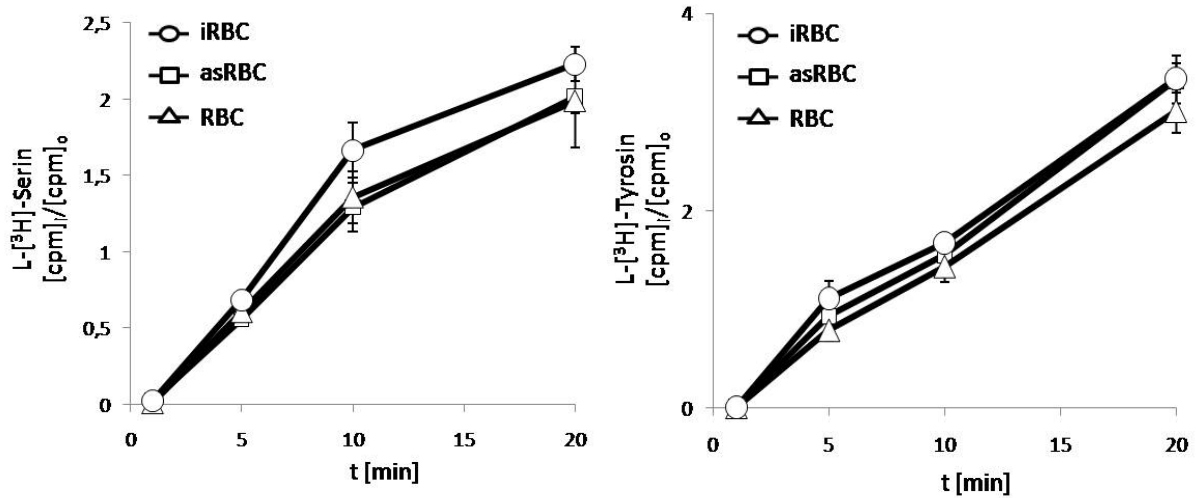
I. Polare Aminosäuren mit neutralem (L-[³H]-Serin) und aromatischen Rest (L-[³H]-Tyrosin)

Abb. 3.7: Die polaren Aminosäuren L-Serin und L-Tyrosin werden in gleichem Maße von infizierten, induzierten und unbehandelten Erythrozyten aufgenommen.

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Serin und L-[³H]-Tyrosin in infizierte (○), nicht-infizierte (△), sowie mit Natriumarsenit behandelte Erythrozyten (□). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 20 min. in der Anwesenheit einer der radioaktiv markierten Aminosäuren inkubiert. Hieraus wurden zu den Zeitpunkten 1, 5, 10, 20 Minuten je 2×10^7 Zellen entnommen und die aufgenommene Menge an radioaktivem Substrat gemessen. Die Messungen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ordinate, $[\text{cpm}]_i/[\text{cpm}]_o$, gibt das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats an. Die Abszisse gibt die Zeit (t) in Minuten an.

Für die polaren Aminosäuren Serin und Tyrosin gib es keine Unterschiede im Aufnahmemuster zwischen infizierten, nicht-infizierten und mit Natriumarsenit behandelten Erythrozyten. Die Aufnahme dieser Aminosäuren könnte über den in Erythrozyten vorhandenen natriumabhängigen ASC Transporter geregelt werden.

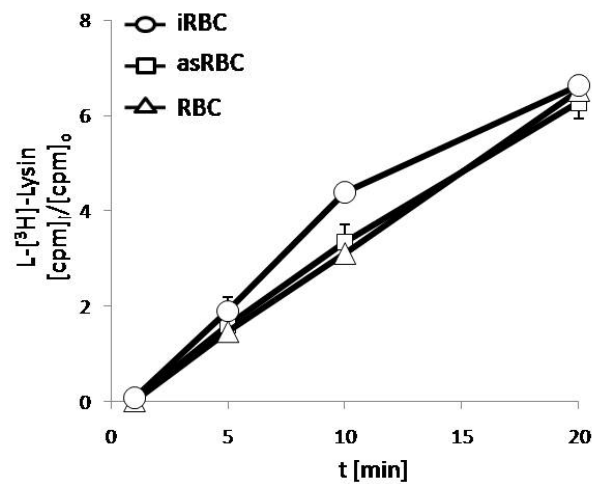
II. Positive geladene Aminosäuren (L-[³H]-Lysin)

Abb. 3.8: Die positiv geladene Aminosäure L-Lysin wird in gleichem Maße von infizierten, induzierten und unbehandelten Erythrozyten aufgenommen.

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Lysin in infizierte (○), nicht-infizierte (△), sowie mit Natriumarsenit behandelte Erythrozyten (□). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 20 min. in der Anwesenheit der radioaktiv markierten Aminosäure inkubiert. Hieraus wurden zu den Zeitpunkten 1, 5, 10, 20 Minuten je 2×10^7 Zellen entnommen und die aufgenommene Menge an radioaktivem Substrat gemessen. Die Messungen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ordinate, $[cpm]_i/[cpm]_o$, gibt das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats an. Die Abszisse gibt die Zeit (t) in Minuten an.

Wie für die polaren Aminosäuren so ist auch für die geladene Aminosäure Lysin keine signifikante Differenz im Aufnahmeverhalten zwischen den einzelnen Zelltypen erkennbar. Auch in diesem Fall könnte die Aufnahme der Aminosäure über ein humanes Protein, den Transporter γ^+ , geschehen.

III. Nicht-polare Aminosäuren mit aliphatischem Rest (L-[³H]-Alanin)

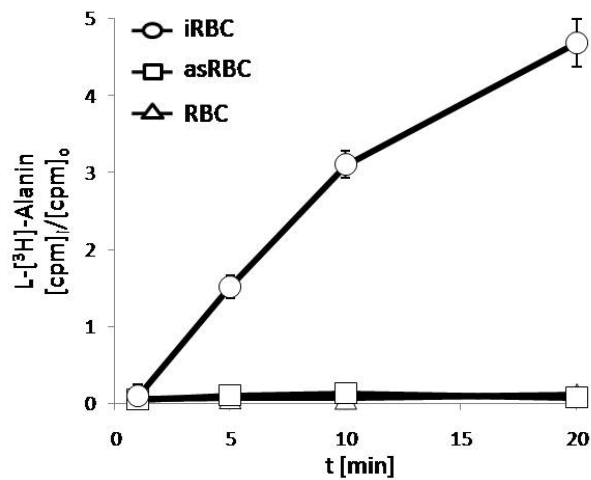


Abb. 3.9: Die unpolare Aminosäure L-Alanin wird nur von infizierten Erythrozyten und nicht von induzierten und unbehandelten Erythrozyten aufgenommen.

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Alanin in infizierte (○), nicht-infizierte (△), sowie mit Natriumarsenit behandelte Erythrozyten (□). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 20 min. in der Anwesenheit der radioaktiv markierten Aminosäure inkubiert. Hieraus wurden zu den Zeitpunkten 1, 5, 10, 20 Minuten je 2×10^7 Zellen entnommen und die aufgenommene Menge an radioaktivem Substrat gemessen. Die Messungen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ordinate, $[\text{cpm}]_i/[\text{cpm}]_o$, gibt das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats an. Die Abszisse gibt die Zeit (t) in Minuten an.

Bei der Aufnahme der unpolaren Aminosäure Alanin gibt es deutliche Unterschiede zwischen nicht-infizierten, infizierten und den mit Natriumarsenit behandelten Erythrozyten. Die mit *P. falciparum* infizierten Zellen weisen einen deutlichen Influx von Alanin auf, wohingegen bei den nicht-parasitierten Zellen kein Influx von Alanin erkennbar ist. Dies weist auf ein vom Parasiten neu induzierten Transportweg für diese Aminosäure hin, der in reifen Erythrozyten in dieser Ausprägung nicht vorhanden ist. Die Behandlung der Erythrozyten mit Natriumarsenit hat auf die Aufnahme der Aminosäure keinen Einfluss.

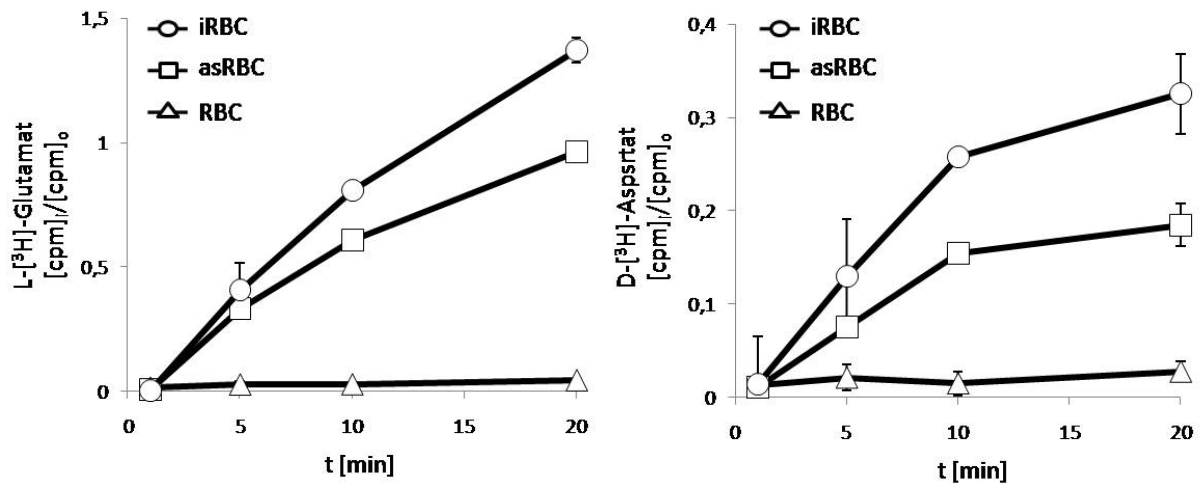
IV. Negativ geladene Aminosäuren (L-[³H]-Glutamat und D-[³H]-Aspartat)

Abb. 3.10: Infizierte und Natriumarsenit-behandelte Erythrozyten besitzen eine ähnliche Permeabilität für die negativ geladenen Aminosäuren L-Glutamat und D-Aspartat.

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Glutamat und D-[³H]-Aspartat in infizierte (○), nicht-infizierte (△), sowie mit Natriumarsenit behandelte Erythrozyten (□). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 20 min. in der Anwesenheit einer der radioaktiv markierten Aminosäuren inkubiert. Hieraus wurden zu den Zeitpunkten 1, 5, 10, 20 Minuten je 2×10^7 Zellen entnommen und die aufgenommene Menge an radioaktivem Substrat gemessen. Die Messungen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ordinate, [cpm]_i/[cpm]_o, gibt das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats an. Die Abszisse gibt die Zeit (t) in Minuten an.

Die infizierten Erythrozyten zeigen einen deutlichen Influx für negativ geladene Aminosäuren. Diese Permeabilität für Glutamat und Aspartat steht im Zusammenhang mit den *Novel Permeation Pathways* und wird vom Parasiten in den Wirtszellen induziert, die ihrerseits keinen Influx für diese Aminosäuren aufweisen. Die Behandlung der Erythrozyten mit Natriumarsenit induziert einen deutlichen Influx für diese Aminosäuren, welcher der vom Parasiten induzierten Permeabilität ähnelt.

Die Ergebnisse der Influx-Messungen für die untersuchten Aminosäuren sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Vergleich der Aminosäureaufnahme in nicht-infizierte, induzierte und infizierte Erythrozyten.

	RBC	asRBC	iRBC
L-Serin	+	+	+
L-Tyrosin	+	+	+
L-Lysin	+	+	+
L-Glutamat	-	+	+
D-Aspartat	-	+	+
L-Alanin	-	-	+

3.7 Die Ausprägung der induzierbaren Permeabilität ist abhängig vom Alter der Erythrozyten, sowie der Inkubationszeit und der Konzentration des Natriumarsenits.

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigen, dass Natriumarsenit in Erythrozyten eine Permeabilität für negativ geladene Aminosäuren wie L-Glutamat induzieren kann. Basierend auf dem Protokoll von Flatman und Creanor wurden für die Aktivierung stets Erythrozyten verwendet, die ca. vier Tage zuvor von Spendern entnommen worden sind. Diese Zellen wurden in einer 1 mM Natriumarsenit-Lösung für eine Stunde bei 37°C inkubiert und dann die Aufnahmefähigkeit für L-Glutamat bestimmt. Im Folgenden sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Inkubationsbedingungen und das Alter der Zellen auf die Ausprägung der induzierbaren Permeabilität haben.

I. Inkubationszeit

Erythrozyten wurden über einen Zeitraum von 80 Minuten in einer 1 mM Natriumarsenit-Lösung inkubiert. Zu gegebenen Zeitpunkten wurden Zellen aus dem Ansatz entnommen und in ein L-[³H]-Glutamat-haltiges Medium überführt. Nach 10 Minuten wurde die Menge an aufgenommener Aminosäure quantifiziert.

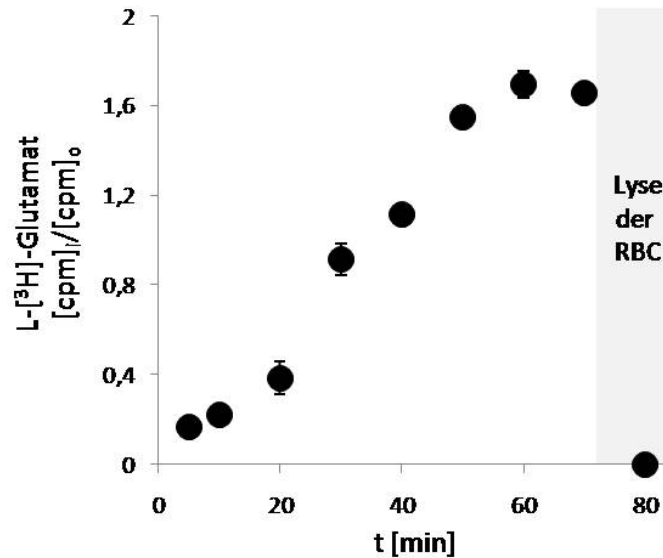


Abb. 3.11: Die in Erythrozyten mit Natriumarsenit induzierbare L-Glutamat-Permeabilität erreicht nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten ihr Maximum.

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Glutamat in Erythrozyten, die über einen Zeitraum von 80 min. in einer Natriumarsenit-Lösung inkubiert wurden. Die Zellen wurden bei 37°C über einen Zeitraum von 80 min. in der Anwesenheit von 1 mM Natriumarsenit inkubiert. Hieraus wurden zu den Zeitpunkten 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 und 80 Minuten je 2×10^7 Zellen entnommen, in einen Puffer mit L-[³H]-Glutamat überführt und die Menge an aufgenommenem radioaktivem Substrat nach einer 10 minütigen Inkubation ermittelt. Die Messungen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ordinate, $[\text{cpm}]_i/[\text{cpm}]_o$, gibt das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats an. Die Abszisse gibt die Zeit (t) in Minuten an.

Über einen Zeitraum von 60 Minuten nimmt die Permeabilität der Erythrozyten für die Aminosäure Glutamat stetig zu und erreicht nach einer Stunde ihr Maximum. Ein Weiterführen der Inkubation führt zur Lyse der Zellen.

II. Konzentration des Natriumarsenits

Für die Bestimmung der optimalen Konzentration wurden Erythrozyten in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen Natriumarsenit für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen in ein L-[³H]-Glutamat-haltiges Medium überführt und die Menge an aufgenommener Aminosäure nach 10 Minuten quantifiziert.

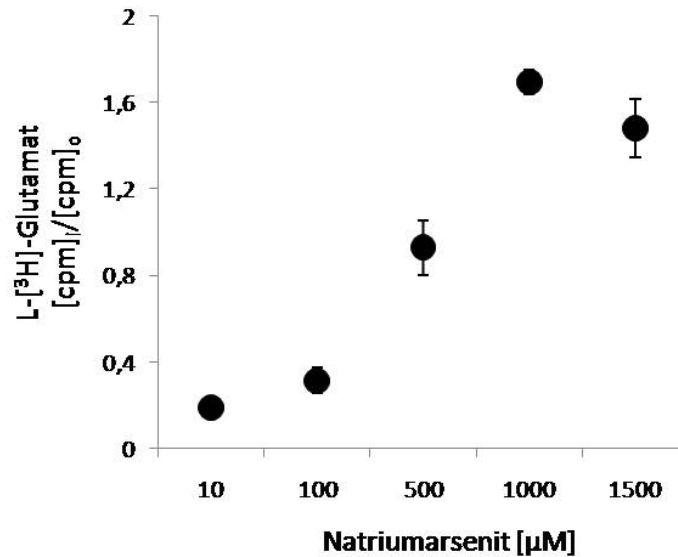


Abb. 3.12: Die Ausprägung der in Erythrozyten induzierbaren Permeabilität für L-Glutamat ist abhängig von der Natriumarsenit-Konzentration.

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Glutamat in Erythrozyten, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Natriumarsenit inkubiert wurden. Die Zellen wurden in Anwesenheit von 10, 100, 500, 1000 und 1500 µM Natriumarsenit für 1 h bei 37°C inkubiert. Aus jedem Ansatz wurden je 2×10^7 Zellen entnommen und in einen Puffer mit L-[³H]-Glutamat überführt und die aufgenommene Menge an radioaktivem Substrat nach einer 10 minütigen Inkubation ermittelt. Die Messungen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ordinate, $[\text{cpm}]_i/[\text{cpm}]_o$, gibt das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats an. Die Abszisse gibt die Konzentration des Natriumarsenits in µM an.

Die maximal induzierbare Permeabilität in Erythrozyten für L-[³H]-Glutamat wird mit einer Konzentration von 1 mM Natriumarsenit erreicht. Eine Steigerung der Konzentration hat keine Zunahme der Aufnahme zur Folge, sondern führt sogar zu einer Reduktion der Permeabilität.

III. Alter der Zellen

Um den Einfluss des Alters der Erythrozyten auf die Arsenit induzierbare Permeabilität zu untersuchen, wurde die Aufnahme von L-[³H]-Glutamat in wenige Tage alte Erythrozyten, sowie in ein bzw. zwei Wochen alte Zellen quantifiziert. Das Alter der Zellen bezieht sich auf den Entnahmezeitpunkt der Zellen aus dem Spender. Die Zellen wurden wie beschrieben mit Natriumarsenit aktiviert und die Permeabilität für L-[³H]-Glutamat über einen Zeitverlauf von 20 Minuten bestimmt.

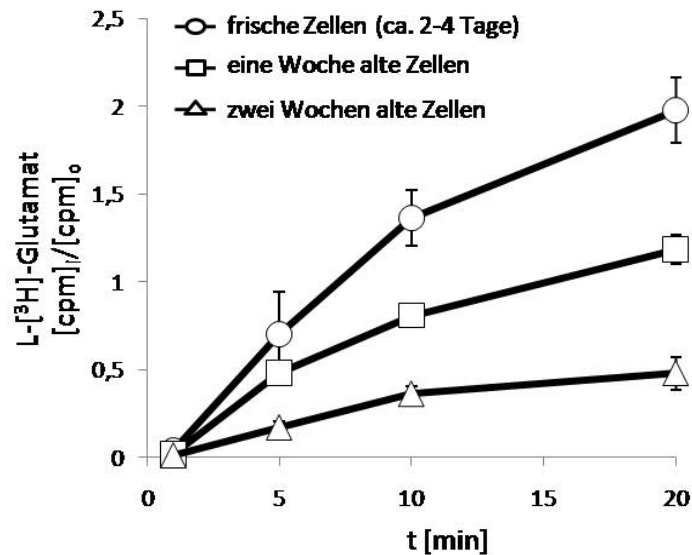


Abb. 3.13: Die Induzierbarkeit der Erythrozyten mit Natriumarsenit ist abhängig vom Alter der Zellen.

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Glutamat in induzierte Erythrozyten, die vor 2-4 Tagen (○), einer Woche (□) oder zwei Wochen (△) dem Spender entnommen wurden. Die Zellen wurden mit 1 mM Natriumarsenit behandelt und über einen Zeitraum von 20 min. in der Anwesenheit einer der radioaktiv markierten Aminosäure inkubiert. Hieraus wurden zu den Zeitpunkten 1, 5, 10, 20 Minuten je 2×10^7 Zellen entnommen und die aufgenommene Menge an radioaktivem Substrat gemessen. Die Messungen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ordinate, $[\text{cpm}]_i/[\text{cpm}]_o$, gibt das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats an. Die Abszisse gibt die Zeit (t) in Minuten an.

Das Alter der Zellen ist für die Ausprägung der Permeabilität von großer Bedeutung. Die Induzierbarkeit der Zellen nimmt mit der Lagerung stetig ab. So zeigen Zellen eine Woche nach der Entnahme aus dem Spender, im Vergleich zu frischen Zellen, eine um ca. 50% reduzierte L-[³H]-Glutamat Aufnahme nach 20-minütiger Inkubation. Bei Zellen, die zwei Wochen gelagert wurden, führt eine Induktion mit Natriumarsenit nur noch in sehr geringem Umfang zu einer Permeabilität für die untersuchte Aminosäure.

3.8 Natriumarsenit induziert einen Influx von Pantothersäure in Erythrozyten.

Eine Behandlung mit Natriumarsenit induziert in Erythrozyten eine den NPP ähnliche Permeabilität. Werden in diesem artifizialen System Aminosäuren als Substrat für den Transport angeboten, beschränkt sich deren Influx offenbar selektiv auf negativ geladene Moleküle. Eine Aufnahmefähigkeit für die unpolare Aminosäure Alanin wird in diesem Zusammenhang nicht induziert. Es gilt zu klären, ob der mit Natriumarsenit in Erythrozyten aktivierbare Transportweg auf Aminosäuren beschränkt bleibt oder auch für andere negativ geladene Substrate zugänglich ist. In diesem Zusammenhang bietet sich die Verwendung der

negativ geladenen Pantothersäure als Substrat an. Der Parasit ist auf die Aufnahme von Pantothersäure aus dem extrazellulären Medium angewiesen ^[Saliba et al., 1998] und induziert mit den NPP einen geeigneten Transportweg in seiner Wirtszelle, die unter physiologischen Bedingungen dieses Molekül nicht aufnehmen kann. Um die Induzierbarkeit eines Influx von Pantothersäure in Erythrozyten zu untersuchen, wurden Erythrozyten wie beschrieben mit Natriumarsenit behandelt und die Aufnahme von radioaktiv markierter Pantothersäure über einen Zeitraum von 20 Minuten quantifiziert. Als Richtwert diente die Aufnahme des Substrats in infizierte Erythrozyten über diesen Zeitraum.

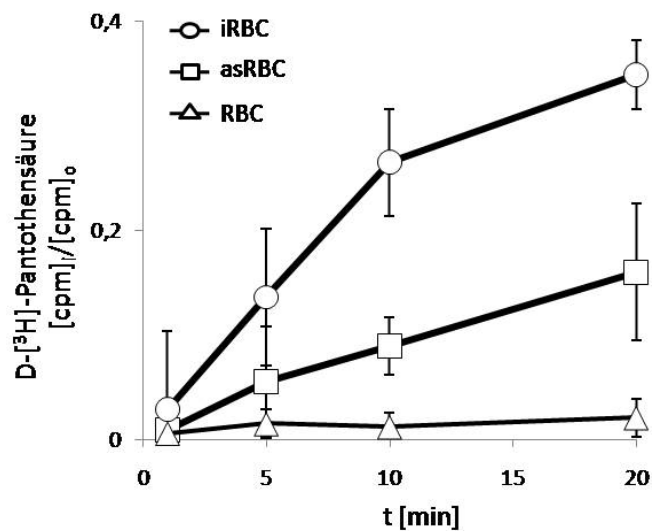


Abb. 3.14: Infizierte und mit Natriumarsenit induzierte Erythrozyten weisen eine Permeabilität für Pantothersäure auf.

Quantifizierung der Aufnahme von $[^3\text{H}]$ -Pantothersäure in infizierte (\circ), nicht-infizierte (\triangle), sowie mit Natriumarsenit behandelte Erythrozyten (\square). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 20 min. in der Anwesenheit des radioaktiv markierten Substrats inkubiert und zu den Zeitpunkten 1, 5, 10, 20 Minuten je 2×10^7 Zellen entnommen und der Influx von Pantothersäure quantifiziert. Die Messungen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ordinate, $[\text{cpm}]_i/[\text{cpm}]_o$, gibt das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats an. Die Abszisse gibt die Zeit (t) in Minuten an.

Wie bei den negativ geladenen Aminosäuren L-Glutamat und D-Aspartat kann durch die Behandlung mit Natriumarsenit in Erythrozyten ein Influx von Pantothersäure induziert werden. In seiner Ausprägung erreicht er nicht das Niveau der infizierten Zellen, hebt sich jedoch deutlich von dem der unbehandelten Erythrozyten ab, bei denen kein Influx des Substrats nachweisbar ist.

3.9 Natriumarsenit induziert eine Permeabilität für Fosmidomycin in Erythrozyten.

Die *Novel Permeation Pathways* in infizierten Erythrozyten können genutzt werden, um Medikamente in den befallenen Erythrozyten zu schleusen, welche die Membran des nicht-infizierten Erythrozyten nicht passieren können [Staines *et al.*, 2005]. Ein solcher Wirkstoff ist das in 1.4.8 beschriebene Fosmidomycin, ein Antibiotikum, welches die Isoprenoidbiosynthese des Parasiten hemmt. Dieser Wirkstoff hemmt nur das Wachstum von *Plasmodien*, obwohl auch andere Parasiten, wie etwa *Toxoplasma*, den betreffenden Stoffwechselweg besitzen. Dieser Unterschied kann mit der Ausprägung der NPP korreliert werden, da Fosmidomycin wahrscheinlich ausschließlich über diesen Permeationsweg in die Wirtszelle gelangen kann [Seeber *et al.*, unpubliziert].

Ein Influx des negativ geladenen Fosmidomycin über die Membran von Natriumarsenit-induzierten Erythrozyten wäre ein Hinweis für die Aktivierung eines an der Bildung der NPP beteiligten Transportweges in diesen Zellen. In diesem Zusammenhang wurden humane Erythrozyten wie beschrieben mit Natriumarsenit behandelt und über einen Zeitraum von 30 min. in der Anwesenheit von [¹⁴C]-FR900098, einem radioaktiven Fosmidomycinderivat inkubiert. Als Kontrolle für einen induzierten Influx diente die Aufnahme von L-[³H]-Glutamat in Natriumarsenit-aktivierte Zellen.

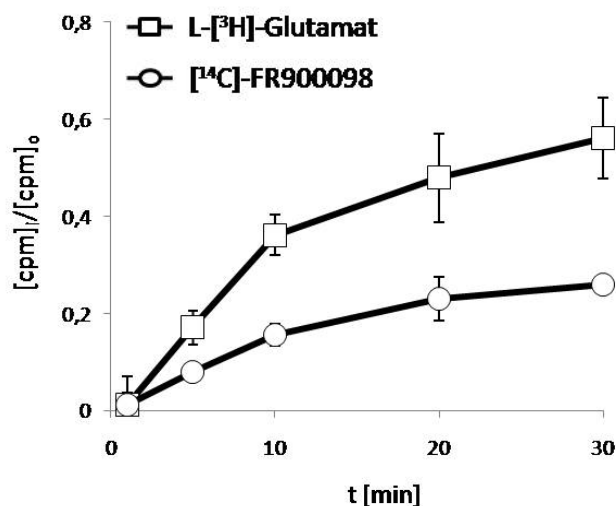


Abb. 3.15: Die Induktion mit Arsenit führt in Erythrozyten zu einer Permeabilität für Fosmidomycin. Quantifizierung der Aufnahme des Fosmidomycin-Derivats [¹⁴C]-FR900098 (○) in mit Natriumarsenit behandelte Erythrozyten. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 20 min. in der Anwesenheit des radioaktiv markierten Substrats inkubiert und zu den Zeitpunkten 1, 5, 10, 20 Minuten je 2×10^7 Zellen entnommen und der Influx des Fosmidomycins quantifiziert. Als Referenz für eine induzierte Permeabilität diente die Aufnahme von L-[³H]-Glutamat (□) in die Zellen über denselben Zeitraum. Die Messungen werden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ordinate, $[\text{cpm}]_i/[\text{cpm}]_o$, gibt das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats an. Die Abszisse gibt die Zeit (t) in Minuten an.

Die Kontrolle mit L-[³H]-Glutamat indiziert die nach der Behandlung mit Natriumarsenit zu erwartende Permeabilitätsänderung des Erythrozyten. Die induzierte Permeabilität lag in diesem Experiment unter der üblicherweise zu Messenden, was mit dem fortgeschrittenen Alter der verwendeten Erythrozyten in Zusammenhang stehen könnte. Neben Glutamat ist auch für das Fosmidomycinderivat eine Permeabilitätszunahme in den aktivierten Zellen messbar. Da Erythrozyten unter nativen Bedingungen keinen Transportweg für Fosmidomycin besitzen und dieses ausschließlich über die NPP in infizierte Zellen aufgenommen werden kann, ist der Nachweis einer Fosmidomycin-Aufnahme ein Indiz für die Aktivierung einer den NPP vergleichbaren Permeabilität durch Natriumarsenit.

3.10 Über die induzierte Permeabilität wird kein Influx von Inulin vermittelt.

Im Zuge der fortschreitenden Entwicklung des Parasiten erfährt die parasitierte Wirtszelle eine umfassende Veränderung in ihrer Permeabilität für Substanzen, die unter physiologischen Bedingungen nicht über die Plasmamembran des Erythrozyten transportiert würden. Die Zahl der aufgenommenen Stoffe ist vielfältig und reicht von Ionen über Aminosäuren bis zu komplexen Strukturen wie NHS-Biotin oder Tripeptiden. Einige Substanzen wie etwa Inulin oder Saccharose sind jedoch vom Transport nahezu ausgenommen ^[Elford *et al.*, 1985; Kirk *et al.*, 1994; Kirk, 2001]. Sie werden weder vor noch nach der Infektion mit *P. falciparum* in den Erythrozyten aufgenommen und können als Referenz für einen spezifischen Transport in induzierten Permeationssystemen verwendet werden. Um zu zeigen, dass die Permeabilität von Natriumarsenit-behandelten Erythrozyten nicht auf einer Perforation der Membran beruht, sondern einen, den NPP ähnlichen, partiell selektiven Transport darstellt, wurde die Permeabilität der induzierten Zellen für Methoxy-[³H]-Inulin untersucht. Hierzu wurden aktivierte Erythrozyten in Anwesenheit des radioaktiven Inulins inkubiert und die Aufnahme des Zuckers über einen Zeitraum von 20 Minuten gemessen. Als Kontrolle für die erfolgreiche Induktion wurde parallel die Aufnahme von L-[³H]-Glutamat über diesen Zeitraum quantifiziert.

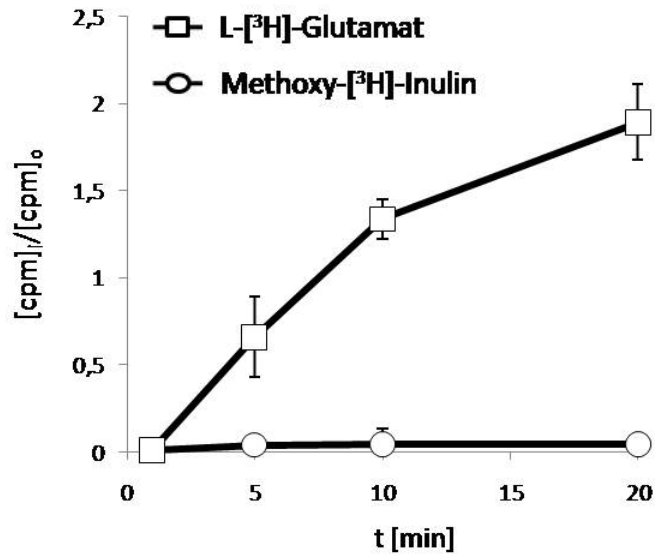


Abb. 3.16: Methoxy-[³H]-Inulin wird nicht in Natriumarsenit-induzierte Erythrozyten aufgenommen.

Quantifizierung der Aufnahme von Methoxy-[³H]-Inulin (○) in mit Natriumarsenit behandelte Erythrozyten. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 20 min. in der Anwesenheit des radioaktiv markierten Substrats inkubiert und zu den Zeitpunkten 1, 5, 10, 20 Minuten je 2×10^7 Zellen entnommen und auf ihre Permeabilität für den Zucker überprüft. Als Referenz für eine induzierte Permeabilität diente die Aufnahme von L-[³H]-Glutamat (□) in die Zellen über denselben Zeitraum. Die Messungen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ordinate, $[cpm]_i/[cpm]_o$, gibt das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats an. Die Abszisse gibt die Zeit (t) in Minuten an.

Die in der Kontrolle quantifizierte L-Glutamat-Aufnahme entspricht den bereits bekannten Werten was die Aktivierung des Transports durch Arsenit indiziert.

Nach der Inkubation der induzierten Zellen in Anwesenheit von radioaktivem Inulin ist keine nennenswerte Aufnahme des Zuckers in die Zelle zu verzeichnen, was für einen selektiven Transport und gegen den unselektiven Einstrom von Substraten durch eine perforierte Zellmembran spricht.

3.11 Inhibitoren der NPP hemmen die Aufnahme von L-Glutamat und D-Aspartat über die mit Natriumarsenit induzierten Transportwege.

Für die *Novel Permeation Pathways* gibt es eine Reihe gut charakterisierter Inhibitoren ^[Kirk et al. 1994; Kirk, 2001; Lisk et al., 2006]. Hierbei handelt es sich zu einem überwiegenden Teil um Chloridkanalblocker, die in der Medizin als Diuretika Verwendung finden. Zu den am häufigsten verwendeten Inhibitoren, die den NPP-vermittelten Transport über die Membran infizierter Erythrozyten konzentrationsabhängig unterbinden, zählen NPPB, Nifluminsäure

3. Ergebnisse

und Furosemid [Kirk *et al.* 1994]. Die Anwendbarkeit dieser bekannten NPP-Inhibitoren auf die induzierte Permeabilität in Erythrozyten wäre ein Hinweis auf die Vergleichbarkeit des erzeugten Influx mit den NPP. Im Folgenden sollte die Hemmbarkeit der L-Glutamat- und D-Aspartataufnahme in infizierte und induzierte Zellen untersucht werden. Hierzu wurde die Aufnahme von radioaktivem L-Glutamat und D-Aspartat in infizierte und Natriumarsenit-behandelte Erythrozyten unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen der Inhibitoren NPPB, Furosemid und Nifluminsäure über einen Zeitraum von zehn Minuten bestimmt. Zur Quantifizierung der inhibitorischen Wirkung wurden die gewonnenen Aufnahmewerte mit denen von nicht-inhibierten Zellen nach zehn Minuten verglichen.

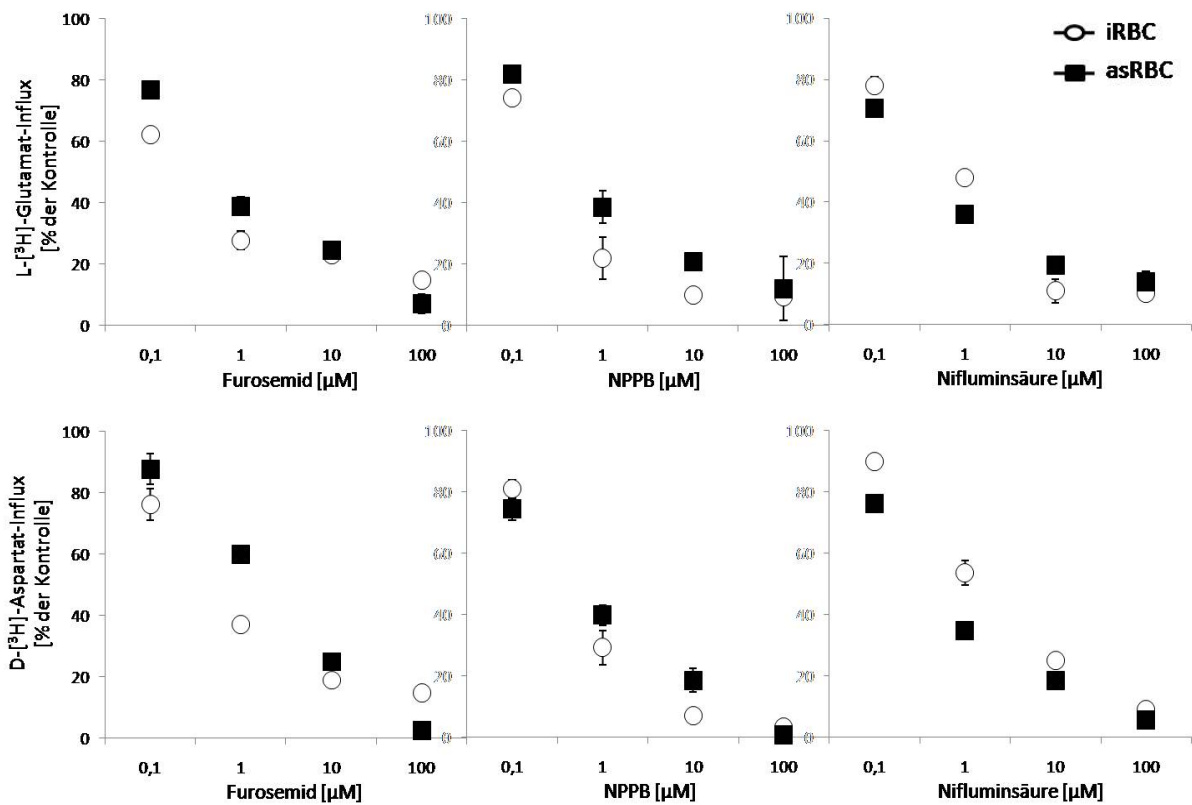


Abb. 3.17: Der Natriumarsenit-induzierte Influx von L-[³H]-Glutamat und D-[³H]-Aspartat kann mit bekannten Inhibitoren der NPP konzentrationsabhängig inhibiert werden.

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Glutamat und D-[³H]-Aspartat in infizierte Erythrozyten (○) und mit Natriumarsenit behandelte Erythrozyten (■) unter dem Einfluss von Furosemid, Nifluminsäure und NPPB. Die Zellen wurden in Anwesenheit der Inhibitoren in den Konzentrationen 0,1, 1, 10 und 100 μM inkubiert und der Influx der radioaktiv markierten Aminosäuren über einen Zeitraum von 10 min. quantifiziert. Als Richtwert dienten Zellen, die für den gegebenen Zeitraum mit radioaktiven Aminosäuren, jedoch ohne Inhibitoren inkubiert wurden.

Die Inhibitoren Furosemid, NPPB und Nifluminsäure hemmen in infizierten Erythrozyten die Aufnahme der Aminosäuren L-Glutamat und D-Aspartat. Die Inhibition ist konzentrationsabhängig und erreicht ihr Maximum bei einer Inhibitorkonzentration von 100 µM. Die gemessenen Werte stehen im Einklang mit den für diese Inhibitoren bekannten Kinetiken. Auch der mit Natriumarsenit induzierbare Influx von L-Glutamat und D-Aspartat in nicht-infizierte Zellen kann mit den verwendeten Inhibitoren unterbunden werden.

Die Inhibition ist wie bei den infizierten Erythrozyten konzentrationsabhängig und weicht nur geringfügig von den für diese Zellen ermittelten Werten ab.

3.12 Die mit Natriumarsenit induzierte Permeabilität zeigt die gleiche Protease-Sensitivität wie die *Novel Permeation Pathways* in infizierten Erythrozyten.

Die *Novel Permeation Pathways* zeigen unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber den Proteasen Trypsin und Chymotrypsin ^[Baumeister et al., 2006]. So unterbindet eine Behandlung intakter infizierter Erythrozyten mit Chymotrypsin den Influx über die NPP nahezu komplett, wohingegen Trypsin keine Wirkung auf die NPP-Aktivität hat. Ebenso hat eine Behandlung der infizierten Zellen vor Ausprägung der NPP mit den Proteasen nahezu keinen Einfluss auf die entstehenden Permeabilitäten. Kommt es durch die Behandlung von Zellen mit Natriumarsenit zu einer Aktivierung von Transportproteinen, die auch an der Bildung der NPP in infizierten Erythrozyten beteiligt sind, müsste ein den NPP entsprechendes Sensitivitätsmuster gegenüber den beiden Proteasen auf die aktivierten Erythrozyten übertragbar sein. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden humane Erythrozyten vor oder nach der Induktion durch Natriumarsenit mit Trypsin oder Chymotrypsin behandelt und ihre Aufnahmefähigkeit für radioaktiv markiertes L-Glutamat bestimmt. Als Richtwert diente der Influx von Glutamat in aktivierte Erythrozyten. Als Kontrolle für eine Inhibition wurden aktivierte Zellen in Anwesenheit von Furosemid inkubiert und der Influx von L-Glutamat in diese Zellen quantifiziert.

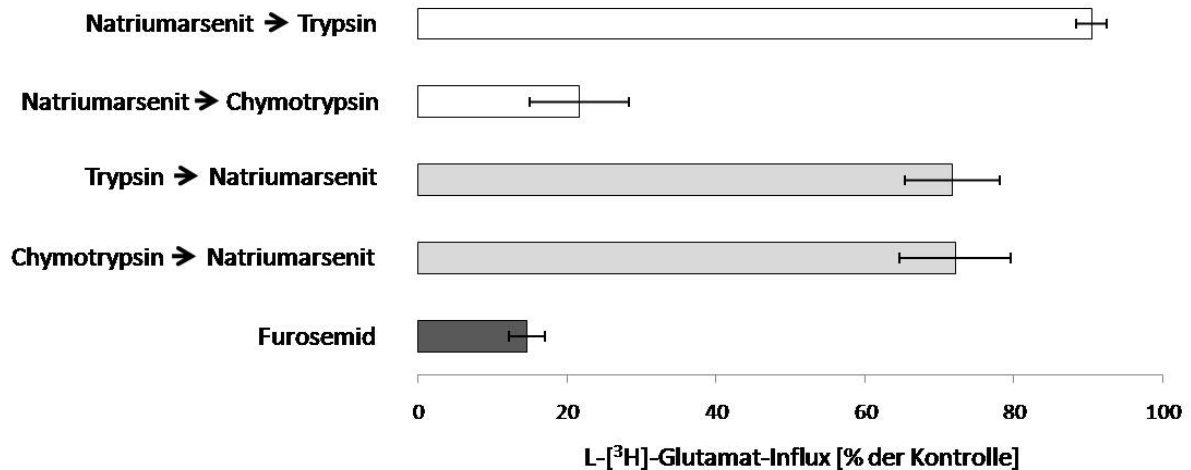


Abb. 3.18: Chymotrypsin, jedoch nicht Trypsin, inhibiert den Influx von L-[³H]-Glutamat in Natriumarsenit-behandelte Erythrozyten.

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Glutamat in Natriumarsenit-induzierte Erythrozyten, die mit Chymotrypsin oder Trypsin behandelt wurden. Die Zellen wurden vor der Induktion (□) oder nach der Induktion (■) mit Natriumarsenit mit Trypsin (1 mg x ml⁻¹) oder Chymotrypsin (1 mg x ml⁻¹) behandelt und ihre Aufnahmefähigkeit für L-[³H]-Glutamat über einen Zeitraum von 10 min. bestimmt. Die gewonnenen Werte wurden mit denen von unbehandelten Zellen verglichen. Als Kontrolle für die Inhibition der induzierbaren Permeabilität wurden induzierte Zellen in Anwesenheit von 100 μM Furosemid (■) inkubiert und die Aufnahme der Aminosäure quantifiziert. Die Messungen wurden jeweils Dreifachbestimmung durchgeführt

Die Behandlung Natriumarsenit-aktivierter Erythrozyten mit Trypsin hat nahezu keinen Einfluss auf die induzierte Permeabilität für L-[³H]-Glutamat. Die Inkubation der aktivierten Zellen in einer Chymotrypsin-Lösung führt hingegen im Mittel zu einer 80 %igen Hemmung der induzierten Permeabilität, vergleichbar mit der durch den Inhibitor Furosemid vermittelten Hemmung. Dieses Sensitivitätsmuster ist mit dem der NPP in infizierten Erythrozyten identisch. Wie bei den NPP der infizierten Zellen, hat auch eine Behandlung mit den Proteasen vor der Induktion der Permeabilität nur minimalen Einfluss auf die Ausprägung der NPP-Aktivität, beziehungsweise auf die Induzierbarkeit mit Natriumarsenit. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass nur jene Transportproteine eine Sensitivität gegenüber Chymotrypsin besitzen, die sich in einem aktivierten Zustand befinden.

3.13 Nach einer Behandlung mit Chymotrypsin ist eine erneute Induktion der Permeabilität durch Natriumarsenit möglich.

Die Behandlung infizierter Erythrozyten mit Chymotrypsin führt zu einer Inhibition der *Novel Permeation Pathways*. Diese Hemmung könnte ursächlich in der Proteolyse der an der Vermittlung der Permeabilität beteiligten Proteine begründet sein. Werden diese Zellen

wieder unter Kulturbedingungen gegeben, so stellt sich nach etwa vier Stunden eine erneute NPP-Aktivität ein, die wesentlich vom Vitalstatus des Parasiten abhängt [Baumeister *et al.* 2006]. Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden konnte, ist auch die durch Arsenit induzierbare Permeabilität für L-Glutamat, ebenso wie die NPP, sensitiv gegenüber Chymotrypsin. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der bei infizierten Zellen beschriebene Wiederkehrereffekt nach einer Chymotrypsin-Behandlung auch bei aktivierten Erythrozyten durch eine erneute Natriumarsenit-Behandlung hervorgerufen werden kann. Hierzu wurden Erythrozyten mit Natriumarsenit aktiviert und anschließend einer Chymotrypsin-Behandlung unterzogen. Dieser Zyklus wurde dreimal wiederholt. Nach jedem Behandlungsschritt wurde die Permeabilität der Zellen für L-³H]-Glutamat quantifiziert.

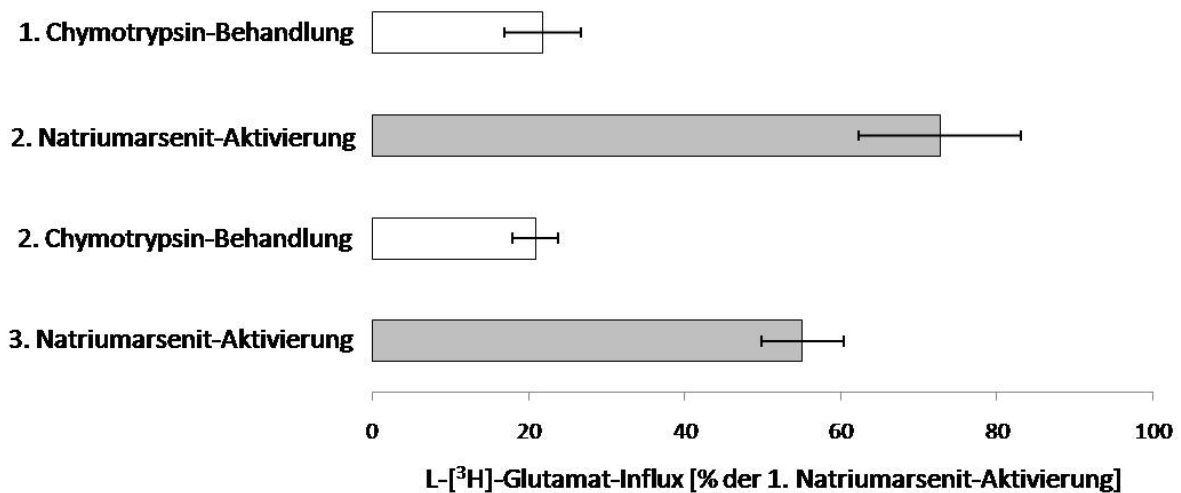


Abb. 3.19: Der Influx von L-³H]-Glutamat in mit Natriumarsenit-behandelte Erythrozyten kann nach einer Chymotrypsin-Behandlung erneut induziert werden.

Quantifizierung des L-³H]-Glutamat-Influx in mit Chymotrypsin behandelte Natriumarsenit-induzierte Erythrozyten. Die Erythrozyten wurden Natriumarsenit behandelt und ihre Aufnahmefähigkeit für L-³H]-Glutamat quantifiziert (■). Im Anschluss wurden die Zellen mit Chymotrypsin behandelt und der inhibitorische Effekt des Chymotrypsin anhand der L-³H]-Glutamat Aufnahme überprüft (□). Dieser Zyklus wurde dreimal wiederholt.

Wie bereits gezeigt, führt die Behandlung der Zellen mit Chymotrypsin zu einem Verlust der induzierten Permeabilität. Diese lässt sich durch eine erneute Aktivierung mit Natriumarsenit wiederherstellen. Dies ist vergleichbar mit der Wiederkehr der NPP-Aktivität in infizierten Zellen nach deren Inkubation unter Zellkulturbedingungen.

Bei jeder neuen Induktion mit Natriumarsenit verringert sich die Aufnahmefähigkeit für L-³H]-Glutamat. So beträgt die Permeabilität für die Aminosäure nach der 2. Aktivierung

etwa 70% und nach der 3. Aktivierung nur noch ca. 50% der ursprünglich induzierten Permeabilität. Weitere Aktivierungszyklen sind nicht möglich, da diese zur Lyse der Zellen führen. Die Möglichkeit zur erneuten Induktion der Permeabilität nach einer Chymotrypsin-Behandlung könnte bedeuten, dass immer nur ein kleiner Pool an Transportproteinen aktiv ist. Dieser besitzt eine exklusive Sensitivität gegenüber der Protease, wohingegen Inaktive resistent gegenüber einer Behandlung sind. Da mit jeder Behandlung ein neuer Pool an Proteinen aktiviert und somit zugänglich für die Protease wird, nimmt die Induzierbarkeit des Transportweges mit der Zeit ab.

3.14 Der Influx von L-Glutamat und D-Aspartat in Natriumarsenit-behandelten Erythrozyten erfolgt über denselben Transportweg.

Durch die Behandlung mit Natriumarsenit kann in Erythrozyten eine selektive Permeabilität für negativ geladene Substanzen induziert werden. Unklar ist, ob der Influx der Substrate über ein und denselben oder über getrennte Transportwege vermittelt wird. Sollte durch die Behandlung lediglich ein Transportweg für beide Aminosäuren induziert werden, so ständen die Substrate beim Transport in Konkurrenz zueinander, was die Kompetitierung der Substrate untereinander ermöglichen würde. Zur Klärung dieses Sachverhalts wurde die Aufnahme von L-[³H]-Glutamat und D-[³H]-Aspartat in Natriumarsenit behandelte Zellen in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von L-Glutamat und D-Aspartat quantifiziert. Als Kontrolle wurde der Influx der radioaktiven Aminosäuren in Anwesenheit von L-Alanin bestimmt. L-Alanin wird nicht in mit Natriumarsenit behandelte Zellen aufgenommen und sollte daher keine inhibitorische Wirkung haben.

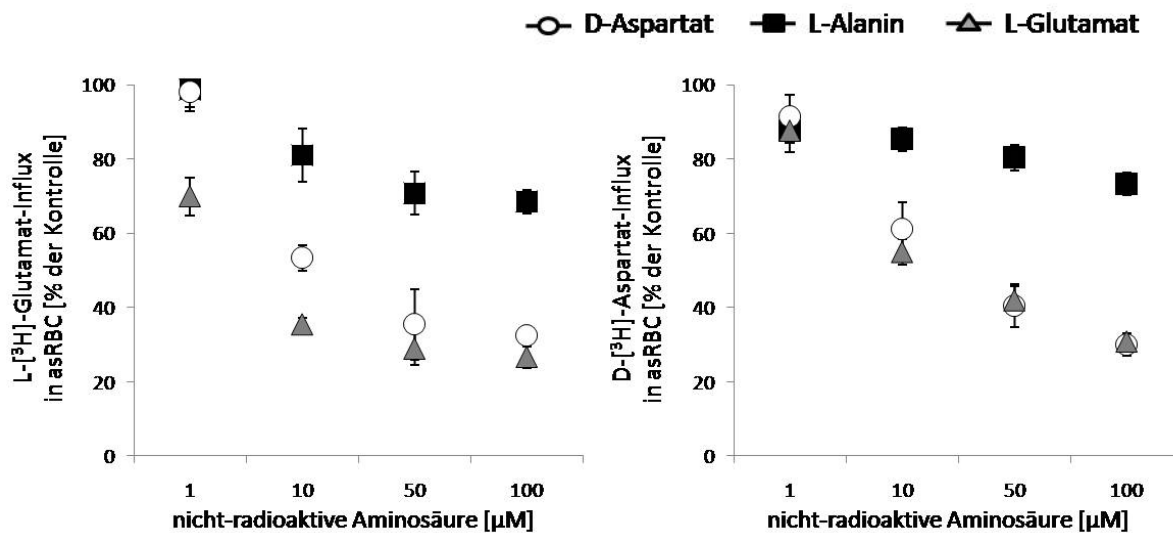


Abb. 3.20: L-Glutamat und D-Aspartat inhibieren kompetitiv die Aufnahme von L-[³H]-Glutamat und D-[³H]-Aspartat in infizierte und Natriumarsenit-induzierte Erythrozyten

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Glutamat und D-[³H]-Aspartat in mit Natriumarsenit behandelte Erythrozyten unter dem Einfluss von nicht-radioaktivem L-Glutamat, D-Aspartat und L-Alanin. Die Zellen wurden in Anwesenheit von L-Glutamat (▲), D-Aspartat (○) oder L-Alanin (■) in den Konzentrationen 1, 10, 50 und 100 µM inkubiert und der Influx der radioaktiv markierten Aminosäuren über einen Zeitraum von 10 min. quantifiziert. Als Richtwert dienten Zellen, die für den gegebenen Zeitraum ausschließlich mit radioaktiven Aminosäuren inkubiert wurden.

Die Kompetition der radioaktiv markierten Aminosäure mit ihrem jeweiligen nicht-radioaktivem Analog führt erwartungsgemäß zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition des Influx. So hemmt L-Glutamat bereits bei einer Konzentration von 10 µM die Aufnahme von L-[³H]-Glutamat um etwa 65 %. 50 mM D-Aspartat führen zu einer 60 %igen Inhibition der D-[³H]-Aspartat-Aufnahme. Über dies hinaus kommt es zu einer Hemmung der beiden Aminosäuren untereinander, die in ihrer Ausprägung dem nicht-radioaktiven Analog der radioaktiven Aminosäure ähnelt. Die kompetitive Hemmung von L-Glutamat und D-Aspartat mit der jeweils anderen Aminosäure wäre durch einen gemeinsamen Transportweg erklärbar. Im Gegensatz zu L-Glutamat und D-Aspartat führt die Zugabe von L-Alanin nur zu einer minimalen Hemmung der Aufnahme der radioaktiven Aminosäuren. Bei einer Alanin-Konzentration von 100 µM wird lediglich eine Inhibition von ca. 30 % der L-[³H]-Glutamat-Aufnahme und nur ca. 20 % der D-[³H]-Aspartat-Aufnahme erreicht. In mit Natriumarsenit aktivierte Erythrozyten wird kein Transportweg für L-Alanin induziert, was eine Kompetition zwischen den Aminosäuren L-Glutamat / D-Aspartat und L-Alanin ausschließt, da sie nicht über denselben Permeationsweg in die Zelle gelangen können.

3.15 Der Glutamatttransporter EAAT3 kann in Erythrozyten nachgewiesen werden.

Die Inkubation humaner Erythrozyten in einer 1 mM Natriumarsenit-Lösung induziert eine Permeabilität, die den in *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten beschriebenen *Novel Permeation Pathways* in wesentlichen Punkten gleicht. Anders als die vom Parasiten induzierten NPP offenbart die Permeabilität in den behandelten Zellen eine Selektivität für negativ geladene Substanzen. So werden beispielsweise L-Glutamat und D-Aspartat in die Zelle aufgenommen, wohingegen L-Alanin vom Transport gänzlich ausgeschlossen ist. Die Möglichkeit zur gegenseitigen Kompetition von Glutamat und Aspartat lässt Rückschlüsse auf die Induktion eines einzelnen Transportweges für diese Substrate zu.

Es stellt sich folglich die Frage, welche Proteine an der Vermittlung der mit Natriumarsenit induzierbaren Permeabilität, und basierend auf den Ähnlichkeiten des Transports, auch an den NPP in infizierten Erythrozyten beteiligt sind. Für den in 3.2 identifizierte Cotransporter NKCC1 konnte eine Aktivierung durch Natriumarsenit bereits nachgewiesen werden ^[Flatman und Creanor, 1999], seine Limitierung auf den Transport von Ionen wie Kalium, Natrium und Chlorid verringert jedoch die Wahrscheinlichkeit einer Beteiligung an der Permeabilitätsvermittlung von Aminosäuren wie L-Glutamat und D-Aspartat.

In anderen Zelltypen wird der Influx von negativ geladenen Aminosäuren wie L-Glutamat über die Familie der Exzitatorischen Aminosäure Transporter (EAAT) vermittelt, welcher bislang fünf Glutamatttransporter zugeordnet werden konnten. Die Aufnahme von Glutamat über EAATs ist abhängig von Natrium und mit einem Gegentransport von Kalium verbunden. Reguliert werden die Transporter über Phosphorylierung und Ubiquitinierung. Die Existenz von EAATs in Erythrozyten konnte bereits in Ratten und Hunden gezeigt werden ^[Sato et al. 1994; Novak et al., 2002], für die Anwesenheit des Transporters in humanen Erythrozyten gibt es bislang jedoch keine Beweise. Eine neuere Studie, deren Ziel die Kartierung des Gesamtproteoms der Erythrozytenmembran war, gibt Hinweise auf die Existenz eines solchen Glutamatttransporters ^[Pasini et al., 2006]. Nach tryptischem Verdau der Erythrozytenmembran und Analyse der hierdurch gewonnenen Peptide im Massenspektrometer, konnte ein Peptid des Glutamatttransporters EAAT5 sowie des Negativregulators für EAAT3, das PRA1 family 3 Protein (JWA) ^[Lin et al., 2001], nachgewiesen werden. Die Identifikation eines Regulators für EAAT3 könnte auf die Anwesenheit dieses Subtyps des Glutamatttransporters hinweisen. Zwischen den einzelnen Transportern der EAAT-Familie bestehen große Homologien, was bei

der Untersuchung eines ungeeigneten Peptids zu Verwechslungen zwischen den Subtypen führen kann.

Sollte ein Protein der EAAT-Familie in Erythrozyten vorhanden sein, so könnte es an der Mediation der durch Natriumarsenit induzierten Permeabilität für Glutamat und den NPP in infizierten Zellen beteiligt sein. Um die Präsenz eines solchen Proteins in Erythrozyten nachzuweisen, wurde eine Membranfraktion aus Erythrozyten gewonnen und die enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE und Western-Blot separiert. Im Anschluss wurde die Membranfraktion mit einem Anti-EAAT3, Anti-EAAT5 und Anti-PRA1 Antikörper (ARL6IP5) auf die Existenz dieser Proteine detektiert.

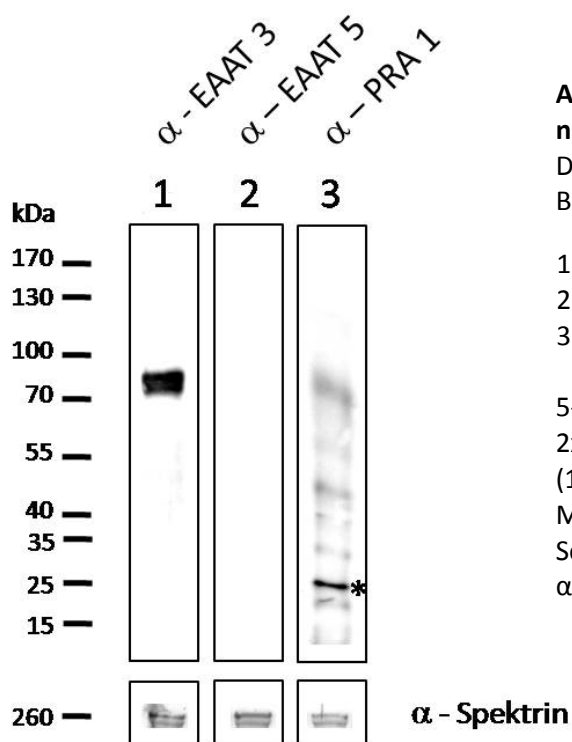


Abb. 3.21: EAAT3 und PRA1 sind in Erythrozyten nachweisbar, EAAT5 nicht.

Detektion von EAAT3, EAAT5 und PRA1 im Western-Blot.

1. α -EAAT3
2. α -EAAT5
3. α -PRA1

5-15 %iges Gradienten-Gel; Membranfraktion von 2×10^7 Zellen pro Spur; α -EAAT3 (1:500); α -EAAT5 (1:500); α -ARL6IP5 (PRA1)(1:1000); Kaninchen- α -Maus-HRP (1:2000); Kaninchen- α -Ziege-HRP (1:2000); Schwein- α -Kaninchen-HRP (1:2000); Ladekontrolle: α -Spektrin (1:2000)

Die Detektion mit einem Anti-EAAT3-Antikörper zeigt eine deutliche Proteinbande bei ca. 70 kDa. Zwar wird die Masse des Transporters mit ca. 60 kDa vorhergesagt, jedoch entspricht die detektierte Proteinbande bei 70 kDa der von Shashidharan *et al.* (1997) in Neuronen mit diesem monoklonalen Antikörper nachgewiesenen EAAT3-Bande. Der Unterschied in der Masse kann mit der starken Glykosylierung des Transporters korreliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer Deglykosylierung der Membranproteine EAAT3 bei der vorhergesagten Masse von ca. 60 kDa nachgewiesen werden kann ^[Shashidharan *et al.*, 1997]. Ein Nachweis für die Anwesenheit von EAAT5 in der Membran von Erythrozyten kann, entgegen den massenspektrometrischen Daten nicht erbracht werden. Der Negativregulator für

EAAT3, PRA1 erscheint nach der Detektion mit dem Anti-ARL6IP5 Antikörper als schwache Bande bei ca. 25 kDa.

Da weder eine Immunpräzipitation mit den verwendeten Antikörpern, noch der Versuch einer MALDI-TOF-Analyse von Banden entsprechender Masse aus Acrylamidgelen zu verwertbaren Ergebnissen führten, wurde als zusätzlicher Nachweis für eine Existenz von EAAT3 in Erythrozyten ein Immunfluoreszenzassay mit den Antikörpern durchgeführt. Der Anti-ARL6IP5 Antikörper eignet sich laut Hersteller leider nicht für eine solche Analyse und wurde daher nicht mit einbezogen. Für den Assay wurden die Proteine des Erythrozyten zunächst mit Paraformaldehyd und Glutaraldehyd fixiert und die Zelle anschließend mit TX-100 permeabilisiert. Die perforierten Zellen wurden mit dem Anti-EAAT3 und Anti-EAAT5 Antikörpern inkubiert und die gebundenen Antikörper mit einem Cy3-gekoppelten 2. Antikörper nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente ein Anti-Bande3-Antikörper, als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Antikörper oder nur mit dem 2. Antikörper inkubiert.

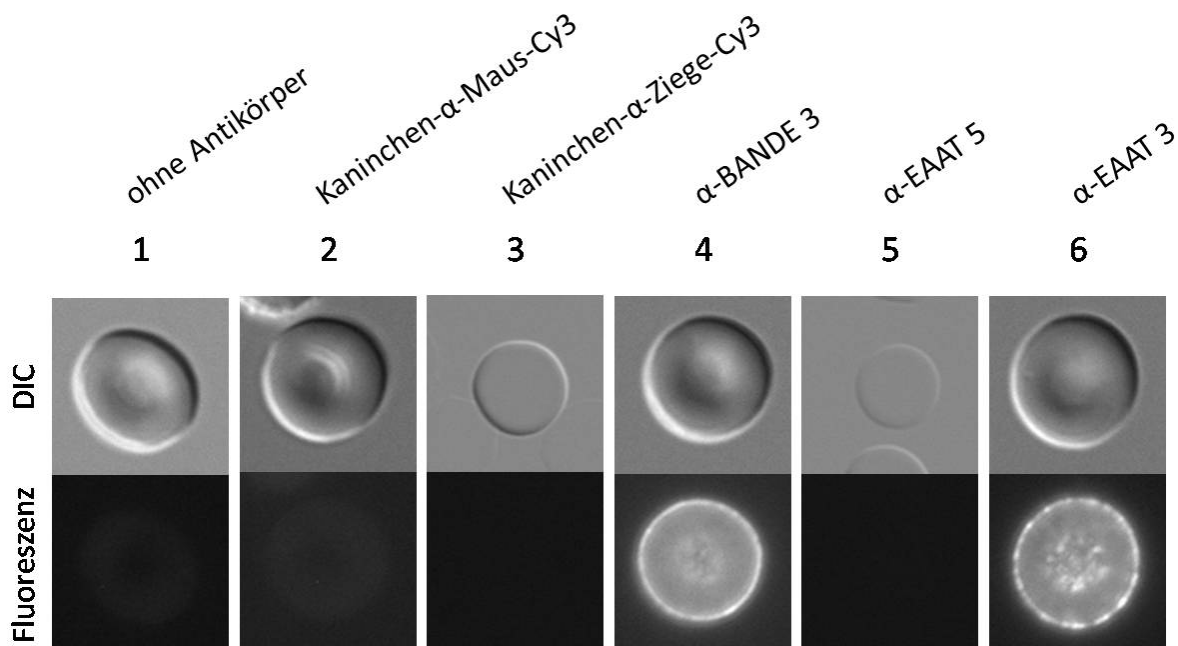


Abb. 3.22: Der Glutamatttransporter EAAT3 ist mittels Immunfluoreszenzassay in Erythrozyten nachweisbar.

Detektion von EAAT3 in Erythrozyten mittels Immunfluoreszenz.

Erythrozyten wurden nach dem Protokoll von Tonkin *et al.* 2004 aufgearbeitet und eine Lokalisation von EAAT3, EAAT5 und Bande3 mit den jeweiligen Antikörpern untersucht.

1. ohne Antikörper
2. Kaninchen- α -Maus-Cy3
3. Kaninchen- α -Ziege-Cy3
4. α -EAAT3
5. α -EAAT5
6. α -Bande3

Wie im Western-Blot ist auch in der Immunfluoreszenz der Glutamattransporter EAAT5 nicht nachweisbar, den Negativkontrollen entsprechend ist nur eine leichte Autofluoreszenz der Erythrozyten erkennbar. Dem entgegen ist bei der Detektion mit dem Anti-EAAT3-Antikörper eine deutliche Fluoreszenz erkennbar, die in ihrer Ausprägung der Positivkontrolle Bande3 entspricht, jedoch etwas unregelmäßiger gepunktet erscheint. Im Vergleich der Fluoreszenzmuster kann, basierend auf der bekannten Membranlokalisation von Bande 3, auch für das mit dem Anti-EAAT3-Antikörper generierten Muster von einer Membranständigkeit des detektierten Proteins ausgegangen werden.

3.16 Eine Protease-Sensitivität von EAAT3 kann im Western-Blot nicht nachgewiesen werden.

Der Nachweis von EAAT3 im Western-Blot und im Immunfluoreszenzassay sprechen für die Anwesenheit dieses Glutamattransporters in der Erythrozytenmembran. Wie gezeigt werden konnte, besitzen sowohl die vom Parasiten induzierten NPP, als auch die durch eine Natriumarsenit-Behandlung hervorgerufene Permeabilität, unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber Trypsin und Chymotrypsin. Sollte der identifizierte Transporter EAAT3 ein ähnliches Sensitivitätsmuster zeigen, wäre dies ein eindeutiger Hinweis auf die Beteiligung dieses Proteins an der Vermittlung der induzierten Permeabilität für Glutamat.

Um die Zugänglichkeit von EAAT3 für die verschiedenen Proteasen zu untersuchen, wurden intakte infizierte, Natriumarsenit-behandelte und unbehandelte nicht infizierte Erythrozyten mit Trypsin und Chymotrypsin behandelt und anschließend mit SDS-PAGE und Western-Blot aufgearbeitet. Der Nachweis von EAAT3 wurde mit dem beschriebenen Antikörper geführt.

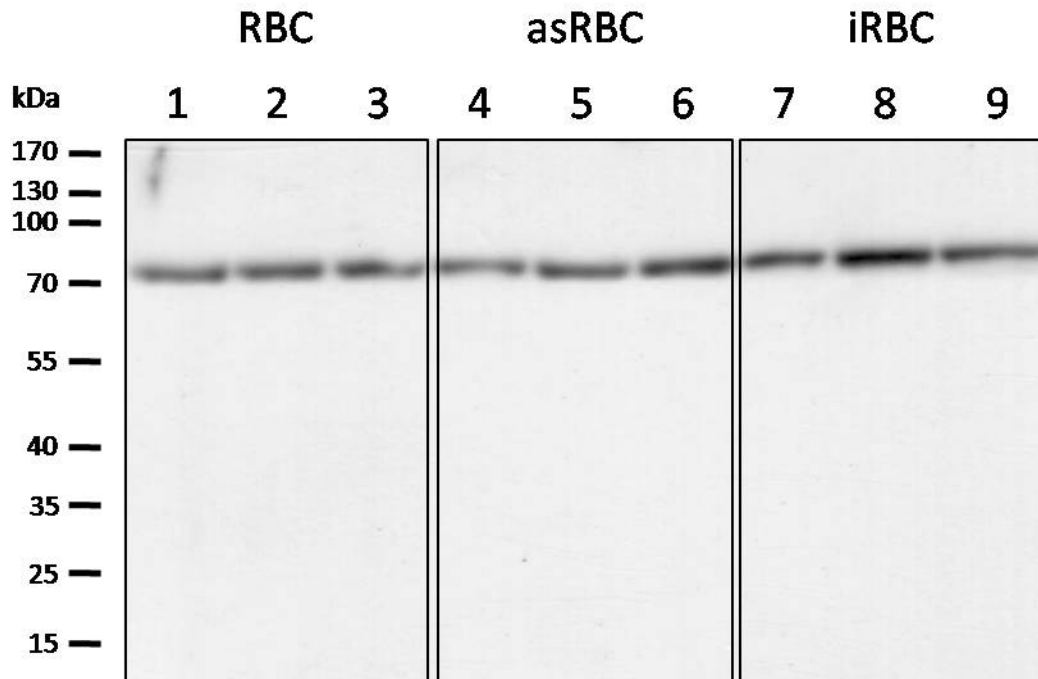


Abb. 3.23: EAAT3 scheint nicht sensitiv gegenüber Trypsin und Chymotrypsin.

Detektion von EAAT3 im Western-Blot nach Behandlung von RBC, asRBC und iRBC mit Chymotrypsin ($1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$) und Trypsin ($1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$).

- | | | |
|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 1. unbehandelte RBC | 4. unbehandelte asRBC | 7. unbehandelte iRBC |
| 2. Trypsin-behandelte RBC | 5. Trypsin-behandelte asRBC | 8. Trypsin-behandelte iRBC |
| 3. Chymotrypsin-behandelte RBC | 6. Chymotrypsin-behandelte asRBC | 9. Chymotrypsin-behandelte iRBC |

12 %iges SDS-Gel; 2×10^7 Zellen pro Spur; α -EAAT 3 (1:500); Kaninchen- α -Maus-HRP (1:2000)

Die Detektion mit dem Anti-EAAT3-Antikörper zeigt die bekannte Bande auf einer Höhe von ca. 70 kDa. Weder eine Behandlung der intakten Zellen mit Chymotrypsin noch mit Trypsin führt zu einem Verlust oder einer Reduktion der nachzuweisenden Proteinbande. Wie in 3.13 durch die mehrfache Induzierbarkeit der Erythrozyten mit Natriumarsenit nach einer Chymotrypsin-Behandlung gezeigt werden konnte, sind offensichtlich nur bereits aktive Transportproteine zugänglich für die Protease Chymotrypsin. Es besteht die Möglichkeit, dass die Zahl der gespaltenen aktiven Transporter unter der Detektionsgrenze im Acrylamidgel liegt. Eine Aussage über die Beteiligung von EAAT3 an der Vermittlung des Glutamattransports in infizierten und aktivierten Erythrozyten kann aus diesen Ergebnissen daher nicht abgeleitet werden.

3.17 Die L-Glutamat-Aufnahme in induzierte und infizierte Erythrozyten ist abhängig von Natrium.

Der Influx von L-Glutamat über einen Transporter der EAAT-Familie in eine Zelle ist immer an den Cotransport von Natrium gebunden [Kanner, 1994; O'Shea, 2002; Ryan und Vandenberg, 2005]. Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um eine Verbindung zwischen dem identifizierten Glutamattransporter EAAT3 und der durch Natriumarsenit aktivierbaren Permeabilität, sowie den NPP in infizierten Erythrozyten, herstellen zu können. Wenn EAAT3 durch den Parasiten oder die Natriumarsenit-Behandlung aktiviert wird und somit zu der Permeabilität des Erythrozyten für L-Glutamat beiträgt, müsste in beiden Fällen die Aufnahme der Aminosäure von der Anwesenheit von Natrium abhängen. Um diese Abhängigkeit aufzuzeigen, wurden infizierte und induzierte Erythrozyten in einem natriumfreien Cholinpuffer inkubiert und die Aufnahmefähigkeit für L- ^3H -Glutamat über einen Zeitraum von 20 Minuten bestimmt. Als Vergleichswert diente die Aufnahme der Aminosäure in Zellen die in natriumhaltigem Puffer über denselben Zeitraum inkubiert wurden.

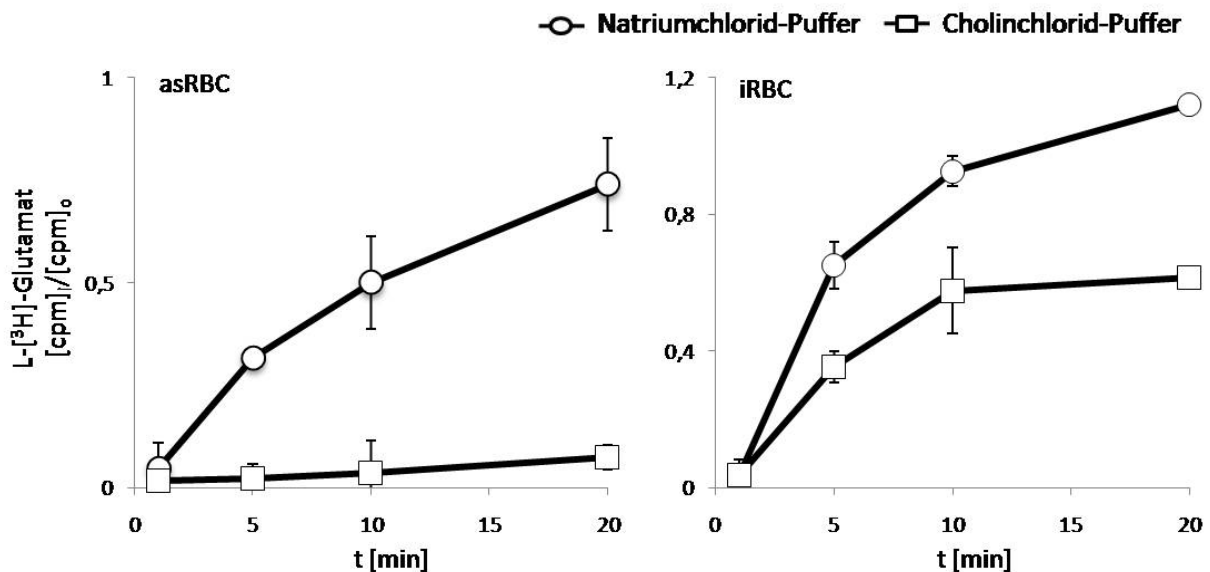


Abb. 3.24: Die Aufnahme von L- ^3H -Glutamat in Natriumarsenit-induzierte Erythrozyten ist streng natriumabhängig, der Influx von L- ^3H -Glutamat in infizierte Erythrozyten nur bedingt.

Quantifizierung der Aufnahme von L- ^3H -Glutamat in infizierte Erythrozyten sowie mit Natriumarsenit behandelte Erythrozyten in An- oder Abwesenheit von Natrium. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 20 min. in Natriumchlorid-Puffer (○) oder natriumfreiem Cholinchlorid-Puffer (□) inkubiert und die Aufnahme des im Puffer befindlichen L- ^3H -Glutamat in je 2×10^7 Zellen zu den Zeitpunkten 1, 5, 10, 20 Minuten gemessen. Die Messungen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ordinate, $[\text{cpm}]_i/[\text{cpm}]_o$, gibt das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats an. Die Abszisse gibt die Zeit (t) in Minuten an.

Die aktivierten Zellen nehmen über einen Zeitraum von 20 Minuten in natriumfreiem Cholinpuffer kaum L-[³H]-Glutamat auf. Dem entgegen zeigen die Zellen im natriumhaltigen Puffer den zu erwartenden Influx. Offensichtlich reduziert das Fehlen von Natrium die Aufnahme von L-[³H]-Glutamat in die mit Natriumarsenit behandelten Erythrozyten auf ein Minimum, was für eine Natriumabhängigkeit des Glutamattansports und somit einer Vermittlung des Transports durch EAAT3 spricht. Die Inkubation von infizierten Erythrozyten in natriumfreiem Puffer führt lediglich, anders als bei den induzierten Zellen, zu einer Reduktion der L-[³H]-Glutamat-Aufnahme. Dies spricht zum einen für die Beteiligung von EAAT3 am Glutamat-Influx über die NPP, ist jedoch auch ein Indiz für die Existenz eines zweiten, natriumunabhängigen Aufnahmewegs für L-Glutamat in infizierten Erythrozyten.

3.18 Natriumarsenit-induzierte Erythrozyten sind stereoselektiv für L-Glutamat, die NPP der infizierten Erythrozyten hingegen nicht.

Exzitatorische Aminosäure Transporter weisen neben einer strikten Natriumabhängigkeit auch eine Stereoselektivität für Glutamat auf ^[Arriza et al., 1994]. Zwar vermitteln EAATs den Transport von L-Glutamat sowie beider Enantiomere von Aspartat, D-Glutamat ist jedoch vom Transport gänzlich ausgeschlossen. Eine Beteiligung des identifizierten Glutamattansportes EAAT3 an der Vermittlung der Permeabilität in infizierten und aktivierten Erythrozyten sollte sich im Transportverhalten von D-Glutamat widerspiegeln. Um diesen Sachverhalt zu klären wurden nicht-infizierte, infizierte und mit Natriumarsenit induzierte Erythrozyten in Anwesenheit von D-[³H]-Glutamat über einen Zeitraum von 20 Minuten inkubiert und zu gegebenen Zeitpunkten die Aufnahme der Aminosäure in die Zellen quantifiziert.

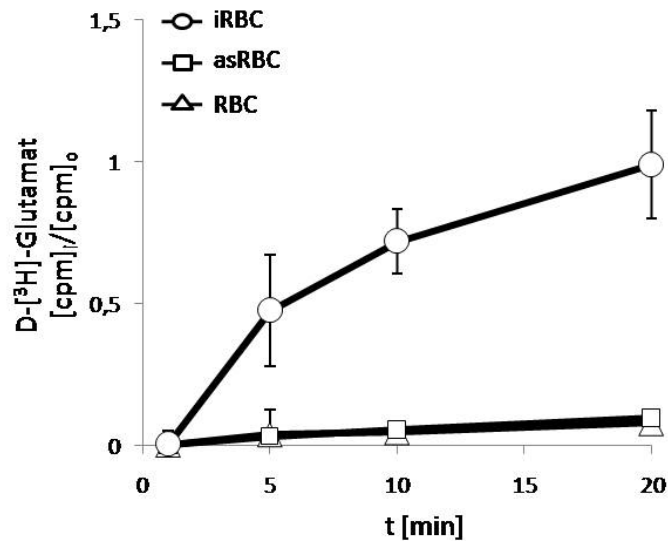


Abb. 3.25: Natriumarsenit induziert keine Permeabilität für D-[³H]-Glutamat in Erythrozyten.

Quantifizierung der Aufnahme von D-[³H]-Glutamat in infizierte (○), nicht-infizierte (△), sowie mit Natriumarsenit behandelte Erythrozyten (□). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 20 min. in der Anwesenheit der radioaktiv markierten Aminosäure inkubiert. Hieraus wurden zu den Zeitpunkten 1, 5, 10, 20 Minuten je 2×10^7 Zellen entnommen und die aufgenommene Menge an radioaktivem Substrat gemessen. Die Messungen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ordinate, $[\text{cpm}]_i/[\text{cpm}]_o$, gibt das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats an. Die Abszisse gibt die Zeit (t) in Minuten an.

In den mit Natriumarsenit induzierten Erythrozyten ist, vergleichbar den unbehandelten Zellen, kein Influx von D-[³H]-Glutamat feststellbar. Dies ist ein Hinweis auf eine Aktivierung des nachgewiesenen EAAT3 durch die Behandlung der Zellen mit Natriumarsenit.

Im Gegensatz zu den anderen Zelltypen weisen die parasitierten Zellen eine Permeabilität für D-[³H]-Glutamat auf, der dem zu messenden Influx für L-[³H]-Glutamat in diesen Zellen ähnelt.

3.19 Die Aufnahmen von D-Glutamat und L-Alanin in infizierte Erythrozyten zeigen unterschiedliche Natriumabhängigkeiten.

Anders als induzierte Zellen nehmen mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten beide Enantiomere von Glutamat auf. Da der Transport von D-Glutamat nicht über den vermutlich aktivierten EAAT3 vermittelt werden kann, müssen im Rahmen der NPP mindestens zwei Transportwege für Glutamat vorhanden sein. Ein Hinweis für zwei unabhängige Transportsysteme ist bereits durch die in 3.17 gezeigte, nur teilweise vorhandene Natriumabhängigkeit des L-Glutamat-Influx in infizierte Erythrozyten gegeben. Dieser natriumunabhängige Transportweg für L-Glutamat könnte auch für den Influx von

D-Glutamat in die infizierte Zelle eine Rolle spielen. Dies würde zunächst die Unabhängigkeit der D-Glutamat-Aufnahme von Natrium voraussetzen. Dieser Sachverhalt sollte im Folgenden durch die Bestimmung der Aufnahmefähigkeit von D-[³H]-Glutamat in infizierte Zellen über einen Zeitraum von 20 Minuten in natriumhaltigem sowie natriumfreiem Puffer geklärt werden.

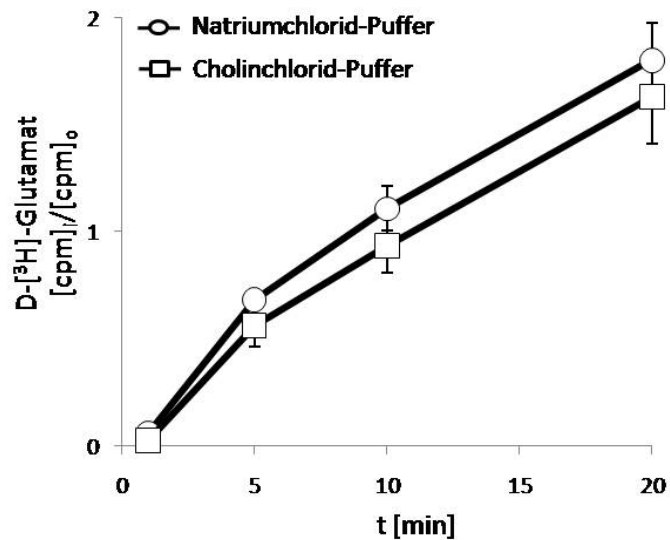


Abb. 3.26: Die Aufnahme von D-[³H]-Glutamat in infizierte Erythrozyten ist nicht an Natrium gebunden.

Quantifizierung der Aufnahme von D-[³H]-Glutamat in infizierte Erythrozyten in An- oder Abwesenheit von Natrium. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 20 min. in Natriumchlorid-Puffer (○) oder natriumfreiem Cholinchlorid-Puffer (□) inkubiert und die Aufnahme des im Puffer befindlichen D-[³H]-Glutamat in je 2×10^7 Zellen zu den Zeitpunkten 1, 5, 10, 20 Minuten gemessen. Die Messungen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ordinate, $[\text{cpm}]_i/[\text{cpm}]_o$, gibt das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats an. Die Abszisse gibt die Zeit (t) in Minuten an.

Sowohl in natriumhaltigem wie auch in natriumfreiem Puffer ist ein Influx von D-[³H]-Glutamat in die infizierten Zellen nachweisbar, wobei die Aufnahmekinetiken nahezu identisch sind. Die Aufnahme dieser Aminosäure ist folglich nicht an die Anwesenheit von Natrium gebunden. D-Glutamat könnte über denselben Transportweg die Zellmembran passieren, wie der Anteil an L-Glutamat, der unabhängig von Natrium in die infizierte Zelle aufgenommen wird. Über diesen Permeationsweg könnte auch der Influx des L-Alanins vermittelt werden, welches nicht in Natriumarsenit-behandelte Erythrozyten und somit wahrscheinlich auch nicht über EAAT3 in die infizierte Zelle aufgenommen wird. In diesem Fall sollte auch die Aufnahme von L-Alanin in infizierte Erythrozyten nicht an die Anwesenheit von Natrium gebunden sein. Zur Klärung dieses Sachverhalts wurden infizierte

Zellen in natriumfreiem und natriumhaltigem Puffer inkubiert und der Influx von L-[³H]-Alanin in diese Zellen quantifiziert.

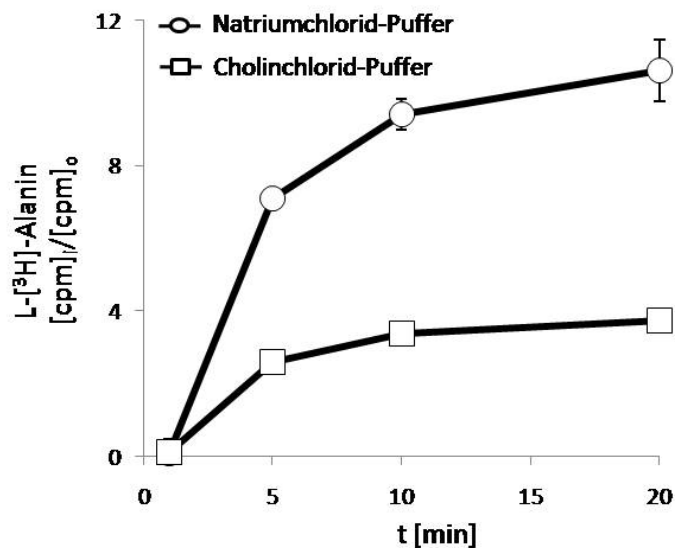


Abb. 3.27: Die Aufnahme von L-[³H]-Alanin in infizierte Erythrozyten ist zu einem überwiegenden Teil abhängig von Natrium.

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Alanin in infizierte Erythrozyten in An- oder Abwesenheit von Natrium. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 20 min. in Natriumchlorid-Puffer (○) oder natriumfreiem Cholinchlorid-Puffer (□) inkubiert und die Aufnahme des im Puffer befindlichen L-[³H]-Alanin in je 2×10^7 Zellen zu den Zeitpunkten 1, 5, 10, 20 Minuten gemessen. Die Messungen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ordinate, $[\text{cpm}]_i/[\text{cpm}]_o$, gibt das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer Konzentration des radioaktiven Substrats an. Die Abszisse gibt die Zeit (t) in Minuten an.

Anders als die Aufnahme von D-[³H]-Glutamat ist der Influx von L-[³H]-Alanin in infizierte Erythrozyten stark an die Präsenz von Natrium gebunden. In der Anwesenheit von Natrium ist bereits nach fünf Minuten ein um das dreifache höherer Influx von L-[³H]-Alanin nachweisbar, der sich innerhalb von 20 Minuten auf ein vierfaches vergrößert. Da der Transport der Aminosäure nicht gänzlich zum Erliegen kommt, scheint es wie im Falle des L-Glutamats einen residualen Anteil an Transport zu geben, der nicht von Natrium abzuhängen scheint. Da sie sich bezüglich ihrer Natriumabhängigkeit unterscheiden, sind die Aufnahmewege von L-Alanin und D-Glutamat offensichtlich nicht unmittelbar gekoppelt.

3.20 Die *Novel Permeation Pathways* umfassen mindestens zwei Transportwege für D-/L-Glutamat, L-Alanin und D-Aspartat.

Die mit *P. falciparum* infizierten Zellen entwickeln im Zusammenhang mit den *Novel Permeation Pathways* eine Permeabilität für eine große Bandbreite an Substraten. Neben L-Glutamat und D-Aspartat gelangen unter anderem D-Glutamat und L-Alanin über die NPP in die infizierte Zelle, Substrate, für die mit Natriumarsenit keine Permeabilität in Erythrozyten erzeugt werden kann. Für diese Moleküle scheint es in den infizierten Zellen andere Transportmechanismen zu geben. Diese sind entweder nicht mit Natriumarsenit induzierbar oder werden von Parasiten-eigenen Transportproteinen vermittelt. Zudem unterscheiden sich die Aufnahmesysteme für die verschiedenen Stoffe in ihrer Bindung an die Anwesenheit von Natrium. So ist die Aufnahme von L-Alanin und L-Glutamat natriumabhängig, wohingegen die Aufnahme von D-Glutamat nicht an Natrium gebunden ist. Um Rückschlüsse auf gemeinsam verwendete Transportwege für die unterschiedlichen Substanzen ziehen zu können, wurden im Folgenden die Kompetitierbarkeit der einzelnen Moleküle untereinander untersucht, wobei Stoffe, die denselben Transportweg benutzten die Aufnahme des jeweils anderen hemmen sollten. Hierfür wurde der Influx von L-[³H]-Glutamat, L-[³H]-Alanin, D-[³H]-Aspartat und D-[³H]-Glutamat in infizierte Erythrozyten in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von L-Glutamat, L-Alanin, D-Aspartat und D-Glutamat quantifiziert. Die Ergebnisse der Kompetitionen sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tabelle 3.3: Vergleich der kompetitiven Inhibition radioaktiver Aminosäuren mit 100 µM nicht-radioaktiver Aminosäuren (in Prozent der Inhibition).

	L-[³ H]-Glutamat	D-[³ H]-Aspartat	L-[³ H]-Alanin	D-[³ H]-Glutamat
L-Glutamat	X	73,2 %	49 %	93,8 %
D-Aspartat	66,8 %	X	45 %	69,4 %
L-Alanin	53,3 %	34,9 %	X	66,4 %
D-Glutamat	42 %	37,2 %	43,7 %	X

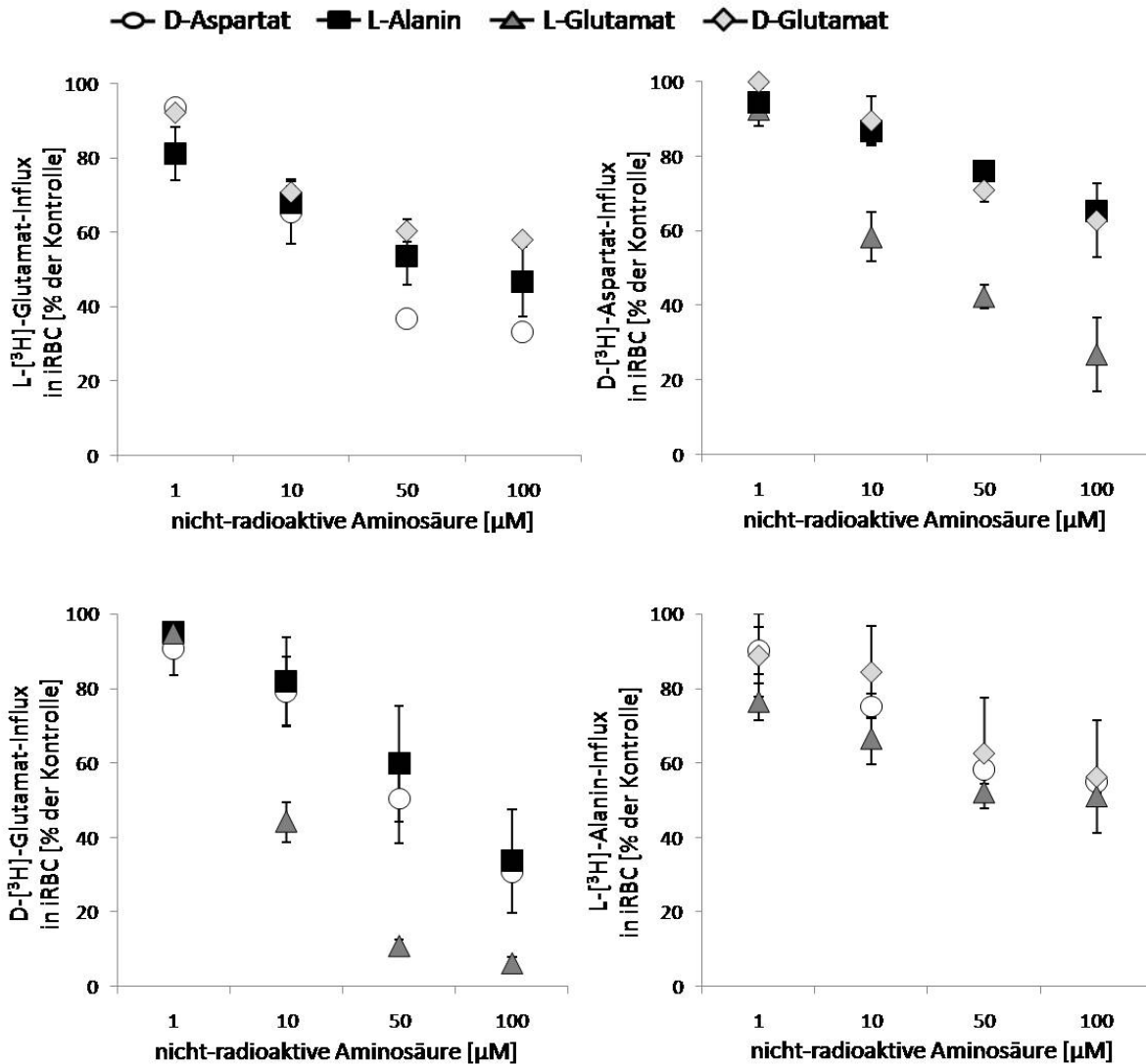


Abb. 3.28: Konkurrenz der Aufnahme von L-[³H]-Glutamat, D-[³H]-Glutamat, D-[³H]-Aspartat und L-[³H]-Alanin in infizierten Erythrozyten mit L-Glutamat, D-Glutamat, D-Aspartat und L-Alanin.

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Glutamat, D-[³H]-Glutamat, D-[³H]-Aspartat und L-[³H]-Alanin in infizierte Erythrozyten in Anwesenheit von L-Glutamat, D-Glutamat, D-Aspartat und L-Alanin. Infizierte Zellen wurden mit Konzentrationen von 1, 10, 50 und 100 µM L-Glutamat (▲), D-Glutamat (◇), D-Aspartat (○) oder L-Alanin (■) inkubiert und der Influx der radioaktiv markierten Aminosäuren über einen Zeitraum von 10 min. quantifiziert. Als Richtwert dienten Zellen, die für den gegebenen Zeitraum ausschließlich mit radioaktiver Aminosäure inkubiert wurden.

L-[³H]-Glutamat

Die verwendeten nicht radioaktiven Aminosäuren hemmen nahezu im gleichen Maße den Transport von L-[³H]-Glutamat in die infizierte Zelle. Bei der maximal eingesetzten Konzentration der nicht-radioaktiven Aminosäuren ist eine etwa 50 %ige Inhibition der L-Glutamat-Aufnahme feststellbar. Hieraus ist abzuleiten, dass zumindest die Hälfte des aufgenommenen L-Glutamats über denselben Transportweg wie die anderen Aminosäuren

abgewickelt wird und dass für die Aufnahme dieser Aminosäure mindestens zwei Permeationswege in infizierten Zellen existieren.

D-[³H]-Aspartat

Wie die Aufnahme von L-[³H]-Glutamat so inhibieren die verwendeten nicht radioaktiven Aminosäuren auch den Influx von D-[³H]-Aspartat. Bei der maximal eingesetzten Konzentration der nicht-radioaktiven Aminosäuren verbleibt ein Influx von ca. 60 %. Auch hier kann von einem partiell gemeinsamen Transportweg der Aminosäuren ausgegangen werden. Die Konkurrenz mit L-Glutamat führt bei der maximal eingesetzten Konzentration zu einer fast 80 %igen Hemmung der L-[³H]-Aspartat-Aufnahme, was darauf hinweist, dass der Transportweg der beiden Aminosäuren identisch sein könnte.

L-[³H]-Alanin

Die Konkurrenz von L-[³H]-Alanin mit den nicht radioaktiven Aminosäuren ähnelt in ihrer Ausprägung der bei L-[³H]-Glutamat festzustellenden. Die maximal eingesetzte Konzentration an nicht-radioaktiven Aminosäuren führt auch hier zu einer ca. 50 %igen Inhibition. Somit kann hier ebenfalls von einem zumindest teilweise gleichen Transportweg der Aminosäuren ausgegangen werden.

D-[³H]-Glutamat

Bei der maximal eingesetzten Konzentration inhibieren L-Alanin und D-Aspartat ca. 70 %, L-Glutamat sogar ca. 95 % des D-[³H]-Glutamat-Influx. Dies lässt vermuten, dass in infizierten Erythrozyten lediglich ein Transportweg für D-Glutamat existieren könnte.

3.21 Spezifische EAAT-Inhibitoren hemmen den Influx negativ geladener Substanzen in infizierte und mit Natriumarsenit induzierte Erythrozyten.

Bereits kurz nach der ersten Beschreibung der Exzitatorische Aminosäure Transporter wurden spezifische Inhibitoren entwickelt, die für die Charakterisierung dieser Transporter von entscheidender Bedeutung sind. Im Wesentlichen ist zwischen zwei Arten von EAAT-Inhibitoren zu unterscheiden, den nicht-kompetitiven Inhibitoren wie WAY 213613 oder HIP-A und den kompetitiven Inhibitoren wie L-*trans*-2,4-PDC, L-CCG-III, DL-TBOA oder *cis*-ACBD die ein, dem Glutamat oder Aspartat ähnliches Rückgrat besitzen und deshalb Substrateigenschaften aufweisen ^[Griffiths *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2001; Dunlop *et al.*, 2003; Funicello *et al.*, 2004].

Die Beteiligung eines EAATs an den NPP und der induzierbaren Permeabilität in Erythrozyten würde auch die Anwendbarkeit dieser Inhibitoren bedingen und wäre neben der

Natriumabhängigkeit und der Stereoselektivität als weiterer Beweis für diese Beteiligung zu sehen. Um die hemmende Wirkung von EAAT-Inhibitoren auf die induzierte Permeabilität und die NPP zu untersuchen, wurden infizierte und aktivierte Erythrozyten mit verschiedenen Konzentrationen eines EAAT-Inhibitors inkubiert und die Aufnahme von L-[³H]-Glutamat und D-[³H]-Aspartat quantifiziert. Zur Inhibition wurden der nicht-kompetitive Inhibitor HIP-A und der kompetitive Inhibitor *cis*-ACBD verwendet.

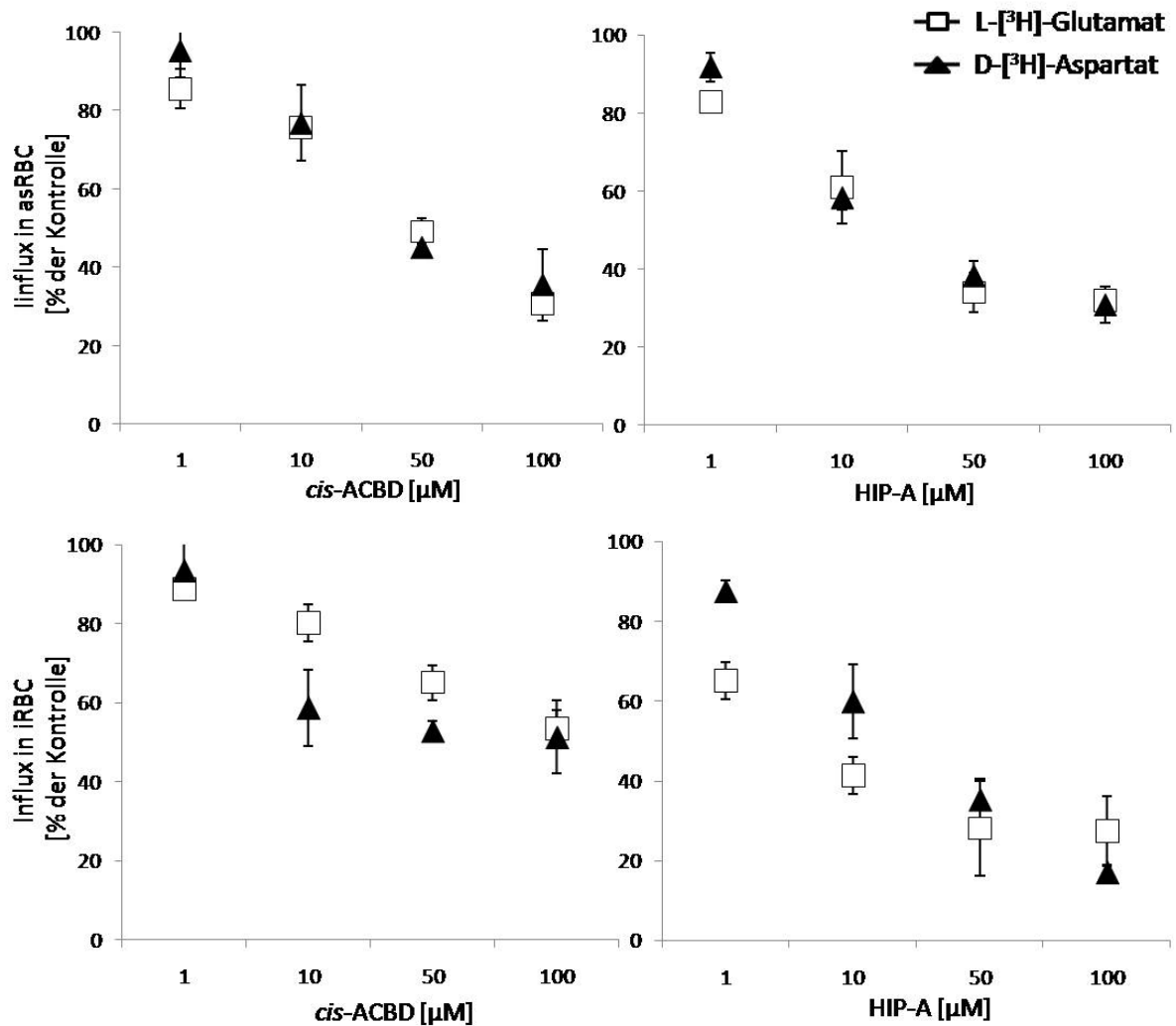


Abb. 3.29: Die EAAT-Inhibitoren *cis*-ACBD und HIP-A hemmen die Aufnahme von L-[³H]-Glutamat und D-[³H]-Aspartat in infizierte und Natriumarsenit-induzierte Erythrozyten.

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Glutamat (□) und D-[³H]-Aspartat (▲) in infizierte und mit Natriumarsenit-behandelte Erythrozyten unter dem Einfluss von *cis*-ACBD und HIP-A. Die Zellen wurden in Anwesenheit von 1, 10, 50 und 100 μM des Inhibitors inkubiert und der Influx der radioaktiv markierten Aminosäuren über einen Zeitraum von 10 min. quantifiziert. Als Richtwert dienten Zellen, die für den gegebenen Zeitraum mit radioaktiven Aminosäuren, jedoch ohne Inhibitoren inkubiert wurden.

Beide Inhibitoren besitzen eine hemmende Wirkung, sowohl auf den induzierten wie auch den über die NPP vermittelten Influx von L-[³H]-Glutamat und D-[³H]-Aspartat. In ihrer Ausprägung gleichen sich die durch HIP-A und *cis*-ACBD bei den mit Natriumarsenit behandelten Zellen hervorgerufenen Inhibitionen. Beide Inhibitoren hemmen bei der maximal eingesetzten Konzentration etwa 70% der Aminosäure-Aufnahme.

Die Anwendbarkeit dieser spezifischen EAAT-Inhibitoren ist ein klarer Hinweis auf die mögliche Vermittlung der induzierten L-Glutamat- und D-Aspartat-Permeabilität durch den identifizierten EAAT3 in nicht-infizierten Erythrozyten.

Bei den infizierten Erythrozyten ist der inhibitorische Effekt von *cis*-ACBD auf die Aufnahme von L-[³H]-Glutamat und D-[³H]-Aspartat nicht so ausgeprägt. Bei diesen Zellen wird mit einer Konzentration von 100 µM dieses Inhibitors lediglich eine ca. 50 %ige Hemmung der Aminosäureaufnahme induziert. Ein Transporter der EAAT-Familie könnte somit auch an der Vermittlung der L-Glutamat- und D-Aspartat-Aufnahme im Rahmen der NPP beteiligt sein. Die nur halbmaximale Inhibition der Aminosäureaufnahme ist überdies hinaus ein Hinweis auf einen weiteren, nicht EAAT-vermittelten Transportweg für L-Glutamat und D-Aspartat.

Wie bei den Natriumarsenit-behandelten Zellen bewirkt eine 100 µM Konzentration von HIP-A eine etwa 70 %ige Inhibition des Influx. Möglicherweise ist der nicht-kompetitive Inhibitor HIP-A ebenfalls in der Lage, einen Teil des nicht EAAT-vermittelten Influx von L-Glutamat und D-Aspartat zu hemmen.

Durch die Induktion mit Natriumarsenit lässt sich neben den bereits getesteten Aminosäuren auch ein Influx für andere negativ geladene Substrate erzeugen, die auch über die NPP der infizierten Zelle transportiert werden. Im Folgenden wurde die hemmende Wirkung der beiden verwendeten EAAT-Inhibitoren auch auf die Aufnahme dieser Substanzen untersucht. Hierzu wurde die Aufnahme von [³H]-Pantothensäure in induzierte und infizierte Erythrozyten unter dem Einfluss der Inhibitoren quantifiziert und mit den gewonnenen Werten für L-[³H]-Glutamat verglichen.

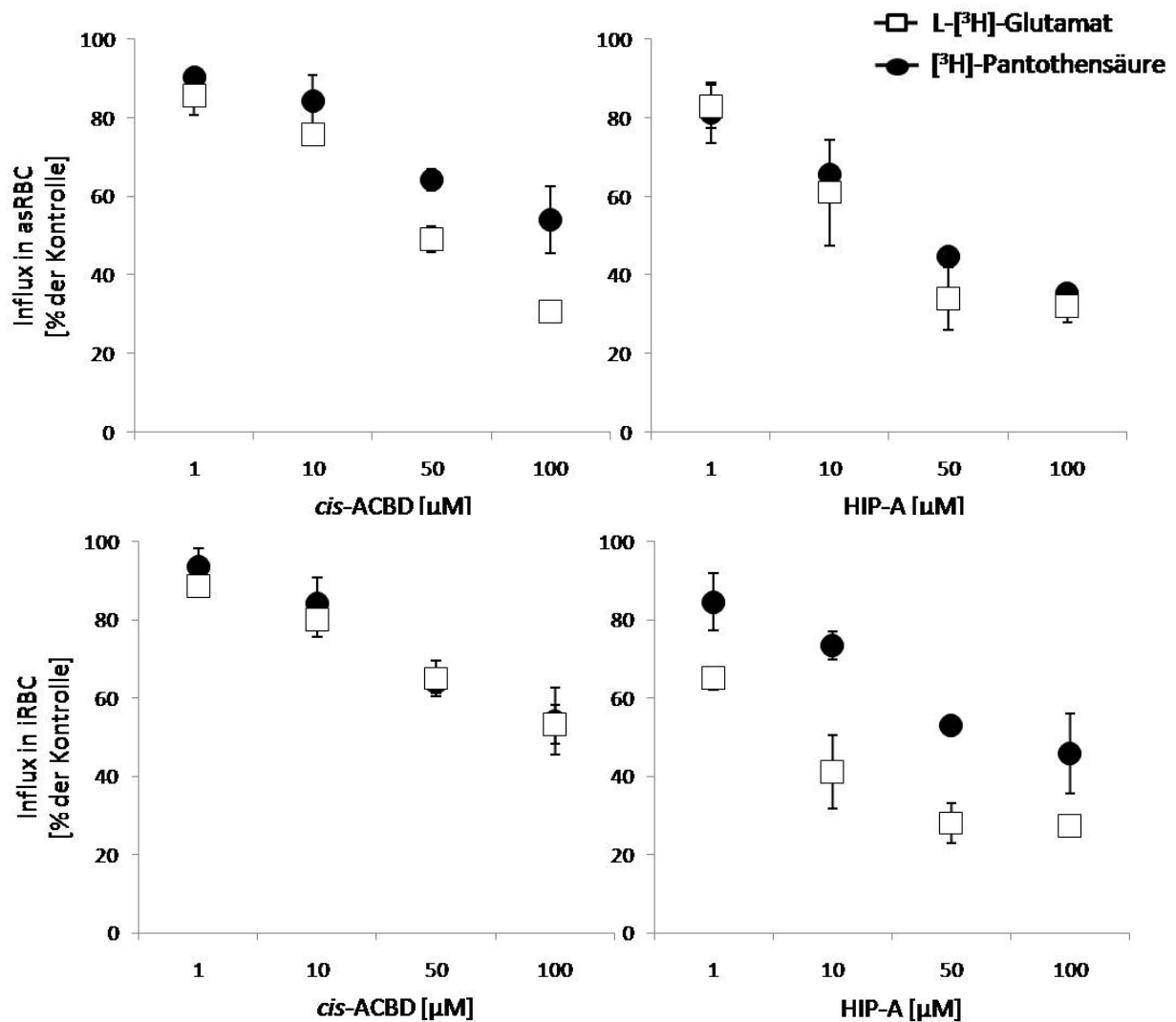


Abb. 3.30: *cis*-ACBD und HIP-A inhibieren neben der Aufnahme von L-[³H]-Glutamat auch den Influx von [³H]-Pantoithensäure in infizierte und Natriumarsenit-induzierte Erythrozyten.

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Glutamat (□) und [³H]-Pantoithensäure (●) in infizierte und mit Natriumarsenit-behandelte Erythrozyten unter dem Einfluss von *cis*-ACBD und HIP-A. Die Zellen wurden in Anwesenheit von 1, 10, 50 und 100 μM des Inhibitors inkubiert und der Influx der radioaktiv markierten Substrate über einen Zeitraum von 10 min. quantifiziert. Als Richtwert dienten Zellen, die für den gegebenen Zeitraum mit radioaktivem Substrat, jedoch ohne Inhibitoren inkubiert wurden.

Bei den mit Natriumarsenit induzierten Erythrozyten wird der Influx der negativ geladenen [³H]-Pantoithensäure durch die Inhibitoren *cis*-ACBD und HIP-A konzentrationsabhängig gehemmt. Mit geringfügigen Abweichungen entspricht die Inhibition der Pantoithensäure-Aufnahme in ihrer Ausprägung der für L-Glutamat feststellbaren Hemmung, was Rückschlüsse auf einen gemeinsamen Transportweg zulässt. Wie bei den induzierten Zellen kann auch bei den infizierten Erythrozyten der Pantoithensäure-Influx mit den verwendeten EAAT-Inhibitoren gehemmt werden. Dabei entspricht die Inhibition der [³H]-Pantoithensäure-

Aufnahme durch *cis*-ACBD der für L-[³H]-Glutamat gemessenen Hemmung. Wie *cis*-ACBD blockiert auch der nicht-kompetitive Inhibitor HIP-A die Pantothensäure-Aufnahme. Im Vergleich zu der Inhibition der L-Glutamat-Aufnahme ist der inhibitorische Effekt von HIP-A auf die Pantothensäure-Aufnahme nicht so ausgeprägt. Die Anwendbarkeit von EAAT-Inhibitoren auf die Pantothensäure-Aufnahme lässt vermuten, dass auch ein Teil dieser Aufnahme im Rahmen der NPP über den identifizierten EAAT3 vermittelt wird.

Neben den negativ geladenen Substraten werden über die NPP auch solche Moleküle transportiert, für die mit einer Natriumarsenit-Behandlung in Erythrozyten keine Permeabilität erzeugt werden kann. Die Aufnahme dieser Substrate unterscheidet sich in Natriumabhängigkeit und Kompetitierbarkeit von dem für L-Glutamat ermittelten Werten, was Grund zu der Annahme gibt, dass diese Substanzen über einen anderen Weg transportiert werden. Ein nicht-EAAT vermittelter Transport sollte sich auch in der Wirksamkeit von EAAT-spezifischen Inhibitoren widerspiegeln. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurde die Aufnahme von L-[³H]-Alanin und D-[³H]-Glutamat im Vergleich zu L-[³H]-Glutamat unter dem Einfluss von *cis*-ACBD und HIP-A in infizierte Zellen untersucht.

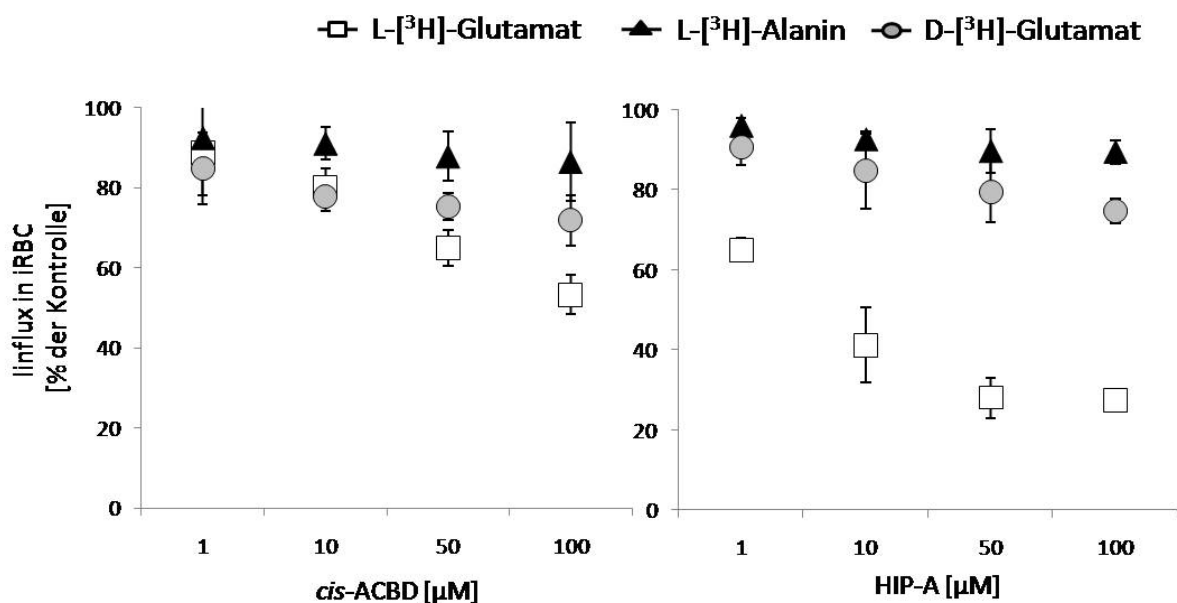


Abb. 3.31: HIP-A und *cis*-ACBD haben nur minimale inhibitorische Wirkung auf die Aufnahme von D-[³H]-Glutamat und L-[³H]-Alanin in infizierte Erythrozyten.

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Glutamat (□), D-[³H]-Glutamat (●) und L-[³H]-Alanin (▲) in infizierte Erythrozyten unter dem Einfluss von *cis*-ACBD und HIP-A. Die infizierten Zellen wurden in Anwesenheit des Inhibitors in Konzentrationen von 1, 10, 50 und 100 µM inkubiert und der Influx der radioaktiv markierten Aminosäure über einen Zeitraum von 10 min. quantifiziert. Als Richtwert dienten Zellen, die für den gegebenen Zeitraum mit radioaktivem Substrat, jedoch ohne Inhibitoren inkubiert wurden.

Die Inhibitoren HIP-A und *cis*-ACBD zeigen weder auf die L-Alanin- noch auf die D-Glutamat-Aufnahme eine hemmende Wirkung. Der Influx von D-Glutamat lässt sich maximal zu ca. 20 % und die L-Alanin-Aufnahme zu ca. 10 % hemmen, was gegen den Transport der beiden Aminosäuren über einen EAAT spricht.

3.22 EAAT3 könnte von einer Natriumarsenit-induzierten Proteinkinase aktiviert werden.

Nach einer Behandlung von Erythrozyten mit Natriumarsenit konnten Flatman und Creanor (1999) eine gesteigerte Phosphorylierung des Cotransporters NKCC1 nachweisen. Hieraus schlossen sie, dass das Natriumarsenit aktivierend auf Proteinkinasen wirkt, welche durch Phosphorylierung die Transportaktivität von NKCC1 steigern. Bekräftigt wurde diese Annahme durch die von ihnen beobachtete inhibierende Wirkung von Staurosporin, einem Inhibitor der Proteinkinasen A und C, auf die Induktion des über NKCC1 vermittelten ⁸⁶Rb-Influx [Flatman und Creanor, 1999].

Neben dem von NKCC1 vermittelten ⁸⁶Rb-Influx induziert die Natriumarsenit-Behandlung in nicht-infizierten Erythrozyten auch die Aufnahme von L-Glutamat und D-Aspartat. Diese könnte von dem identifizierten Glutamattransporter EAAT3 vermittelt werden.

Im Folgenden gilt es zu klären, wie EAAT3 durch Natriumarsenit aktiviert werden könnte.

Unter physiologischen Bedingungen kann EAAT3 durch die Proteinkinasen A und C [Gegelashvili *et al.*, 2001; Susarala *et al.*, 2004; Berry *et al.*, 2005; Guillet *et al.*, 2005; Gonzáles *et al.*, 2005] sowie über Ubiquitinierung durch eine Nedd4-2 Ubiquitinligase reguliert werden [Boehmer *et al.*, 2003, 2005 und 2006].

Um festzustellen, welche der beiden Effekte letztlich zu der Permeabilitätsänderung führt, wurde im Folgenden die Wirkung des Kinaseinhibitors H-9 und die des Inhibitors PYR-41, der die Aktivität des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1 hemmt, auf die Entstehung der L-[³H]-Glutamat Permeabilität untersucht. Hierzu wurden Erythrozyten in der Anwesenheit der beiden Inhibitoren mit Natriumarsenit behandelt und die entstandene Permeabilität für L-[³H]-Glutamat quantifiziert. Als Kontrolle wurde die Permeabilität in Erythrozyten bestimmt, welche ohne Inhibitoren mit Natriumarsenit aktiviert wurden.

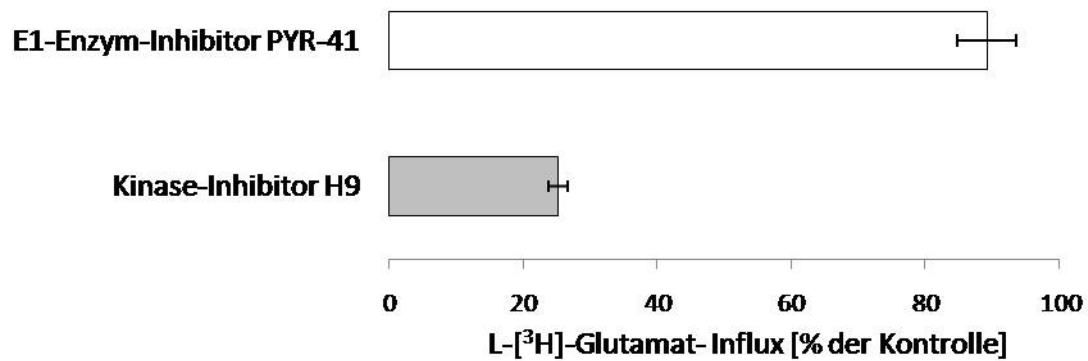


Abb. 3.32: Der Kinaseinhibitor H-9 verhindert die Induktion einer Permeabilität für L-[³H]-Glutamat durch Natriumarsenit.

Quantifizierung der Aufnahme von L-[³H]-Glutamat in mit Natriumarsenit behandelte Erythrozyten unter dem Einfluss von H-9 und PYR-41. Die Zellen wurden während der Behandlung mit Natriumarsenit mit dem Kinaseinhibitor H-9 oder PYR-41, einem Inhibitor des Ubiquitin aktivierenden Enzyms E1, inkubiert. Im Anschluss an die Natriumarsenit-Behandlung wurden je 2×10^7 Zellen entnommen und auf ihre Permeabilität für L-[³H]-Glutamat untersucht. Als Kontrolle diente die Aufnahme von L-[³H]-Glutamat in Zellen, die ohne Inhibitor mit Natriumarsenit behandelt wurden. Die Messungen wurden jeweils Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Zugabe von PYR-41 hat nahezu keine Auswirkungen auf die Ausprägung der Permeabilität. Als Inhibitor des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1 unterbindet er die Ubiquitin-Kaskade und somit eine mögliche Ubiquitinierung von Transportproteinen. Da trotz Inhibition dieses Enzyms eine Permeabilität nachweisbar ist, wird eine Beteiligung von Ubiquitin an der Induktion der Permeabilität unwahrscheinlich. Dem entgegen kann in Anwesenheit des Kinaseinhibitors H-9, ein spezifischer Inhibitor der cAMP/cGMP abhängigen Proteinkinasen A und G sowie der Proteinkinase C, während der Natriumarsenit-Behandlung eine Permeabilität induziert werden, die lediglich ca. 20 % der Kontrolle entspricht.

Die Möglichkeit die Induktion einer Permeabilität durch Natriumarsenit über die Inhibition von Kinase unterbinden zu können, deutet auf eine Aktivierung dieser Kinasen im Zuge der Natriumarsenit-Behandlung hin. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der von Flatman und Creanor (1999) postulierten Aktivierung einer unbekanntes Kinase durch Natriumarsenit und der damit verbundenen Phosphorylierung von NKCC1.

3.23 Die Aktivierung von EAAT3 mit Alphaxalon induziert eine Permeabilität für L-Glutamat in Erythrozyten, die der durch Natriumarsenit hervorgerufenen ähnelt.

Durch eine Behandlung mit Natriumarsenit kann in humanen Erythrozyten eine Permeabilität für die negativ geladene Aminosäure L-Glutamat generiert werden. Der in Erythrozyten nachweisbare Glutamattransporter EAAT3 könnte als Vermittler dieser induzierbaren Permeabilität fungieren. Hierfür spricht vor allem die Anwendbarkeit von spezifischen EAAT-Inhibitoren auf den Influx von L-Glutamat und D-Aspartat, wie auch die zu beobachtende Stereoselektivität für das L-Enantiomer von Glutamat und die bestehende Natriumabhängigkeit der Aminosäureaufnahme. Da die Behandlung mit Natriumarsenit offensichtlich nur indirekt, über die Aktivierung von Kinasen, auf den Glutamattransporter wirkt, kann die Induktion anderer Transportwege für die Vermittlung der L-Glutamat-Aufnahme nicht ausgeschlossen werden. Um eine eindeutige Verbindung zwischen dem Influx von L-Glutamat und dem nachgewiesenen Glutamattransporter aufzeigen zu können, wäre eine spezifische Aktivierung von EAAT3 hilfreich. Die Möglichkeit der spezifischen Aktivierung von EAAT3 wurde von Ryu *et al.* 2009 für das Anästhetikum Alphaxalon (5 α -Pregnan-3 α -ol-11,20-dione) nachgewiesen. Die Autoren konnten mit Alphaxalon eine direkte Aktivierung von in *Xenopus* Oocyten exprimiertem EAAT3 erzielen und diese mit Hilfe von *patch-clamp*-Techniken quantifizieren. Die von ihnen beobachtete Permeabilität für L-Glutamat entspricht dabei der, die sie durch die Aktivierung der Proteinkinase C und die damit verbundenen Regulation von EAAT3 erzielen konnten.

Im Folgenden wurde die Möglichkeit zur Induktion einer Permeabilität für L-Glutamat durch Alphaxalon in humanen Erythrozyten untersucht. Hierfür wurden Erythrozyten in Anwesenheit von 1 μ M Alphaxalon für fünf Minuten inkubiert und anschließend die Aufnahmefähigkeit der Zellen für L-[³H]-Glutamat bestimmt. Diese wurde mit dem Influx dieser Aminosäure in Natriumarsenit-behandelte Zellen verglichen. Als Kontrolle für die Vergleichbarkeit des induzierten Influx mit dem durch Natriumarsenit erzeugten Effekt wurde die Inhibierbarkeit mit *cis*-ACBD und die Induktion einer möglichen Aufnahme von L-[³H]-Alanin bestimmt.

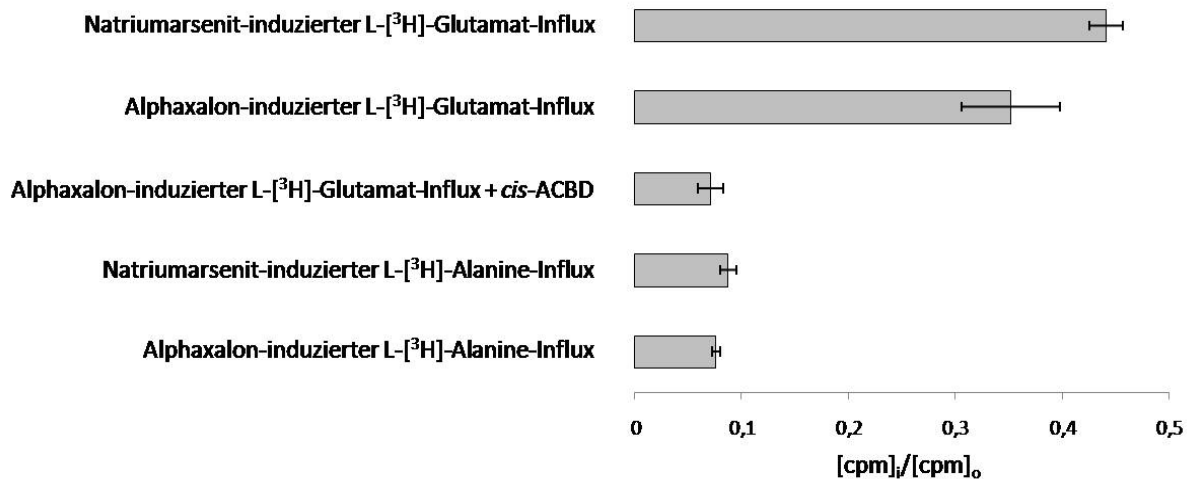


Abb. 3.33: Das Anästhetikum Alphaxalon induziert in Erythrozyten eine zu Natriumarsenit vergleichbare Permeabilität für L-[³H]-Glutamat, jedoch nicht für L-[³H]-Alanin.

Quantifizierung der durch Natriumarsenit und Alphaxalon induzierten Permeabilität für L-[³H]-Glutamat und L-[³H]-Alanin. Die Zellen wurden mit Natriumarsenit oder Alphaxalon induziert und über einen Zeitraum von 10 min in Anwesenheit von L-[³H]-Glutamat oder L-[³H]-Alanin inkubiert und der Influx der radioaktiv markierten Aminosäuren quantifiziert. Als Kontrolle für die Spezifität der durch Alphaxalon induzierten Permeabilität wurden so behandelte Zellen in Anwesenheit von *cis*-ACBD inkubiert und die Menge an aufgenommenem L-[³H]-Glutamat quantifiziert.

Durch die Behandlung humaner Erythrozyten mit Alphaxalon wird eine, den Natriumarsenit-behandelten Zellen ähnliche, Permeabilität für L-[³H]-Glutamat induziert. Die Möglichkeit zur Hemmung des Influx mit dem EAAT-Inhibitor *cis*-ACBD spricht für die Aktivierung des nachgewiesenen EAAT3. Eine weitere Übereinstimmung zwischen den induzierten Permeationswegen zeigt sich bei der Aufnahme von L-[³H]-Alanin. Wie die Natriumarsenit-Behandlung so erzeugt auch die Zugabe von Alphaxalon nur einen minimalen Influx von L-[³H]-Alanin in die behandelten Zellen. Aufgrund der bestehenden Übereinstimmungen zwischen den induzierten Permeabilitäten und der bekannten Aktivierung von EAAT3 durch Alphaxalon, kann auch auf die Aktivierung dieses Glutamattransporters durch die Natriumarsenit-Behandlung geschlossen werden.

4. Diskussion

Etwa 15 Stunden nach der Infektion geht der Parasit vom Ring- in das metabolisch aktivere Trophozitenstadium über. Dieser Übergang ist von einer umfassenden Permeabilitätssteigerung der Membran des befallenen Erythrozyten begleitet [Kunter *et al.*, 1983; Ginsburg *et al.*, 1985]. Die vom Parasiten induzierte Permeabilitätserhöhung betrifft eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen und wird in ihrer Gesamtheit als *Novel Permeation Pathways* (NPP) bezeichnet [Ginsburg *et al.*, 1983; Kirk *et al.*, 1999]. Sie dienen dem Parasiten als Transportweg für die Aufnahme essentieller Nährstoffe und die Entsorgung toxischer Stoffwechselprodukte. Die Aufnahme von Substanzen erfolgt dabei sequentiell in zwei Schritten: mittels Translokatoren zunächst über die Erythrozytenmembran in das Zytosol des Erythrozyten und anschließend über Poren in der PVM in das Lumen der parasitophoren Vakuole, wodurch der unmittelbare Zugang zur Plasmamembran des Parasiten gewährleistet ist [Kirk, 2001]. Die in der Erythrozytenmembran lokalisierten Transportproteine besitzen generelle Charakteristika von Anionenkanälen [Kirk *et al.*, 1994]. Sie sind zwar in der Lage, Kationen und elektroneutrale Stoffe zu transportieren, vermitteln jedoch eine bevorzugte Permeabilität für Anionen [Ginsburg *et al.*, 1985; Kirk *et al.*, 1993 und 1994; Kirk und Horner, 1995]. Darüber hinaus können sie mit bekannten Anionenkanal-Inhibitoren wie etwa Furosemid und NPPB inhibiert werden [Kirk *et al.*, 1994]. Bisher strittig ist die Anzahl der an der Vermittlung der NPP beteiligten Transportproteine. So wurde versucht, mittels radioaktiv markierter Moleküle und Hämolyse-Experimenten mit isotonischen Lösungen [Kutner *et al.*, 1983; Ginsburg *et al.*, 1983, 1985; Cabantchik *et al.* 1990; Kirk *et al.*, 1993, 1994], sowie durch *patch-clamp*-Techniken [Desai *et al.*, 2000; Egee *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2002a, b; Duranton *et al.*, 2003, 2004; Staines *et al.*, 2003, 2004], einen Überblick über die Anzahl der beteiligten Transporter zu gewinnen. Weder die Anzahl der beteiligten Transporter noch deren Herkunft konnte bislang eindeutig geklärt werden.

Einerseits wird die Vermittlung der NPP-Aktivität vom Parasiten synthetisierten Transportproteinen wie Poren [Ginsburg *et al.*, 1983, 1985 und 1986] oder dem Anionenkanal PSAC [Desai *et al.*, 2000; Alkhalil *et al.*, 2004] zugeschrieben, andererseits lassen sich in nicht-infizierten Erythrozyten NPP-ähnliche Permeabilitäten erzeugen, was auf eine Beteiligung humaner Transportproteine an den NPP hindeutet [Culliford *et al.*, 1995; Huber *et al.*, 2002].

4.1 Natriumarsenit aktiviert EAAT3 in humanen Erythrozyten und induziert somit eine NPP-ähnliche Permeabilität in diesen Zellen.

Die Induktion der NPP-Aktivität in nicht-infizierten Erythrozyten beruht auf Stress, der auf diese Zellen ausgeübt wird. Beispielsweise lassen sich nach der Oxidation von Erythrozyten Ionenströme messen, wie sie auch bei den NPP nachweisbar sind [Huber *et al.*, 2002]. Darüber hinaus induziert diese Behandlung eine Sensitivität der behandelten Zellen gegenüber isoosmotischer Hämolyse mit Sorbitol, wie sie bei infizierten Erythrozyten beobachtet werden kann. Wie die Oxidation erzeugt auch die Inkubation in einer isotonischen Saccharose-Lösung eine den NPP vergleichbare Permeabilität [Culliford *et al.*, 1995]. So kann ein Transport unterschiedlicher Aminosäuren und Zucker induziert werden, der den NPP infizierter Zellen gleicht. Eine Permeabilität für Sorbitol ist jedoch bei der Induktion durch osmotischen Stress nicht nachweisbar (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Vergleich der induzierbaren Permeabilitäten in nicht-infizierten Erythrozyten.

		Art der Induktion	
		oxidativer Stress (Huber <i>et al.</i> , 2002)	isoosmotische Saccharose-Lösung (Culliford <i>et al.</i> , 1995)
induzierte Permeabilität	mit den NPP identische Ionenströme und isoosmotische Hämolyse mit Sorbitol		Natriumarsenit
		Alanin	
		Carnitin	
		Cholin	L-Glutamat
		Glutamat	D-Aspartat
		Glutamin	Pantothensäure
		Glycin	Fosmidomycin
		Histidin	⁸⁶ Rb [Flatman und Creanor, 1999]
		Lactat	
		Taurin	
keine Permeabilität		Sorbitol	Alanin D-Glutamat Sorbitol (Daten nicht gezeigt)

Die Induzierbarkeit NPP-ähnlicher Aktivität in nicht-infizierten Erythrozyten gibt einen Hinweis auf die Beteiligung humaner Transporter an den NPP. Die Vielfalt der hierbei induzierten Transportwege lässt aber kaum Rückschlüsse auf Anzahl und Identität der beteiligten Transportproteine zu.

Hierin liegt der klare Vorteil des in dieser Arbeit vorgestellten Induktionssystems mittels Natriumarsenit. Durch die Behandlung nicht-infizierter Erythrozyten mit Natriumarsenit kann, wie durch oxidativen oder osmotischen Stress, eine Permeabilität erzeugt werden, die in Teilen den NPP infizierter Erythrozyten ähnelt. Im Gegensatz zu den beiden anderen Induktionssystemen, bleibt die hervorgerufene Permeabilität weitestgehend, neben dem von NKCC1 vermittelten ^{86}Rb -Influx [Flatman und Creanor, 1999], auf negativ geladene Moleküle beschränkt (vergleiche Tabelle 4.1). Hierdurch wird die Zahl der in Frage kommenden Transportproteine minimiert.

Für die mit Natriumarsenit induzierte Permeabilität in nicht-infizierten Erythrozyten ergibt sich aus den gewonnenen Daten das in Abbildung 4.1 zusammengefasste Modell.

In diesem Modell wird die Vermittlung des induzierten Influx von negativ geladenen Molekülen dem *Exzitatorische Aminosäure Transporter 3* (EAAT3) zugesprochen, der neben dem Cotransporter NKCC1 [Flatman und Creanor, 1999] durch Natriumarsenit aktiviert wird. EAAT3 ist in diversen humanen Geweben vertreten und konnte in dieser Arbeit erstmals mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz in humanen Erythrozyten nachgewiesen werden. Der Transporter vermittelt den Influx von Glutamat und Aspartat, wobei er eine Stereoselektivität für das L-Enantiomer von Glutamat aufweist [Arriza et al., 1994]. Zudem ist der von ihm vermittelte Transport strikt natriumabhängig [Kanner, 1994; O'Shea, 2002; Ryan und Vandenberg, 2005]. Beide Eigenschaften finden sich in der von Natriumarsenit induzierten Permeabilität wieder. Hierbei wird L-Glutamat in strikter Abhängigkeit von Natrium aufgenommen, wohingegen D-Glutamat von der Aufnahme gänzlich ausgeschlossen ist.

Unter physiologischen Bedingungen wird EAAT3 mittels der Proteinkinasen A und C reguliert [Susarala et al., 2004; Berry et al., 2005; Guillet et al., 2005; Gonzales et al., 2005]. Die Zugabe des Kinaseinhibitors H-9 unterbindet die Ausprägung der L-Glutamat-Permeabilität während der Natriumarsenit-Behandlung. Dieser Inhibitor ist spezifisch für die Proteinkinasen A, G und C [Inagaki et al., 1985], was auf eine Beteiligung dieser Kinasen an der Aktivierung schließen lässt. Diese Abhängigkeit von den Proteinkinasen A und C konnte auch von Flatman und Creanor (1999) für den mit Natriumarsenit induzierten ^{86}Rb -Influx über NKCC1 gezeigt werden. Die

Möglichkeit, die Entstehung der Permeabilität durch Inhibition von Kinasen zu unterbinden zeigt zudem, dass das Natriumarsenit nicht unmittelbar auf die beteiligten Transportproteine wirkt, sondern deren Regulatoren beeinflusst.

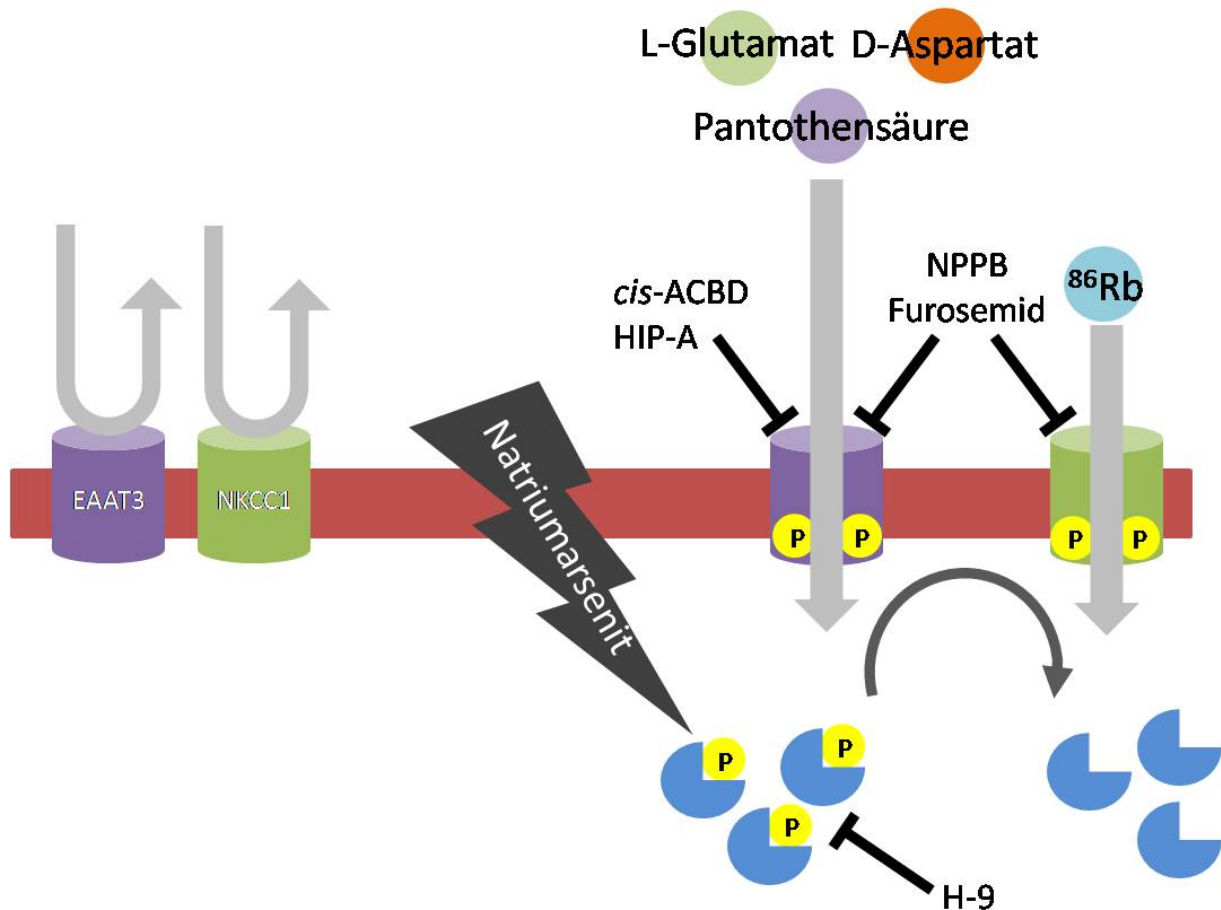


Abb.4.1: Modell der Natriumarsenit-Induktion in nicht-infizierte Erythrozyten.

Die Behandlung nicht-infizierter Erythrozyten mit Natriumarsenit führt zu einer Aktivierung der Proteinkinasen A, G oder C. Diese aktivieren mittels Phosphorylierung die in der Erythrozytenmembran befindlichen nicht aktiven Transporter EAAT3 und NKCC1. Als Folge dieser Aktivierung wird in den behandelten Zellen eine Permeabilität für ^{86}Rb [Flatman und Creanor, 1999] über NKCC1, sowie für negativ geladene Moleküle über EAAT3 induziert. Der EAAT3-vermittelte Influx ist dabei mit den spezifischen EAAT-Inhibitoren *cis*-ACBD und HIP-A hemmbar. Auf beide Transportwege wirken zudem die bekannten NPP-Inhibitoren NPPB und Furosemid.

Eine der Natriumarsenit-Behandlung gleichwertige Permeabilität kann auch mit dem Anästhetikum Alphaxalon induziert werden. Da Alphaxalon nachweislich aktivierende Wirkung auf den Glutamattransporter EAAT3 besitzt [Ryu *et al.* 2009], kann auf die Beteiligung dieses Glutamattransporters an der Natriumarsenit-induzierten Permeabilität in nicht-infizierten Erythrozyten geschlossen werden.

Der eindeutigste Hinweis auf die Beteiligung des identifizierten Glutamattransporters liegt in der Anwendbarkeit von spezifischen EAAT-Inhibitoren auf die Natriumarsenit-induzierte Permeabilität. Sowohl der kompetitive Inhibitor *cis*-ACBD wie auch der nicht-kompetitive Inhibitor HIP-A hemmen konzentrationsabhängig den Influx von L-Glutamat und D-Aspartat in induzierten Zellen.

4.2 Die Natriumarsenit-induzierte Permeabilität und die NPP werden von Kinasen reguliert.

Die Ausprägung der Natriumarsenit-induzierten Permeabilität kann mit Kinaseinhibitoren unterbunden werden. Dies lässt Rückschlüsse auf eine Beteiligung von Proteinkinasen an der Induktion der Permeabilität zu. Wie das Natriumarsenit dabei auf die Kinasen wirkt, ist unbekannt [Flatman und Creanor, 1999]. Aus der Spezifität des in dieser Arbeit verwendeten Kinaseinhibitors H-9 kann auf eine Beteiligung der Proteinkinasen A, G oder C geschlossen werden [Inagaki *et al.*, 1985]. Diese Kinasen sind im Erythrozyten nachweisbar [Roux-Dalvai *et al.*, 2008] und aktivieren wahrscheinlich mittels Phosphorylierung die für den Influx verantwortlichen Transportproteine.

Wie im Fall der Natriumarsenit-Behandlung sind auch an der Regulation der NPP Kinasen beteiligt. Als möglicher Kandidat gilt die Parasiten-eigene cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) [Merckx *et al.*, 2009]. Für diese Proteinkinase konnte gezeigt werden, dass die Überexpression ihrer negativ-regulierenden R-Untereinheit zu einem nahezu vollständigen Verlust der NPP-Aktivität in infizierten Erythrozyten führt [Merckx *et al.*, 2008]. Für die Aktivierung der NPP und damit des humanen EAAT3 mittels einer PKA sind dabei drei Szenarien denkbar, die in Abb. 4.2 zusammengefasst sind.

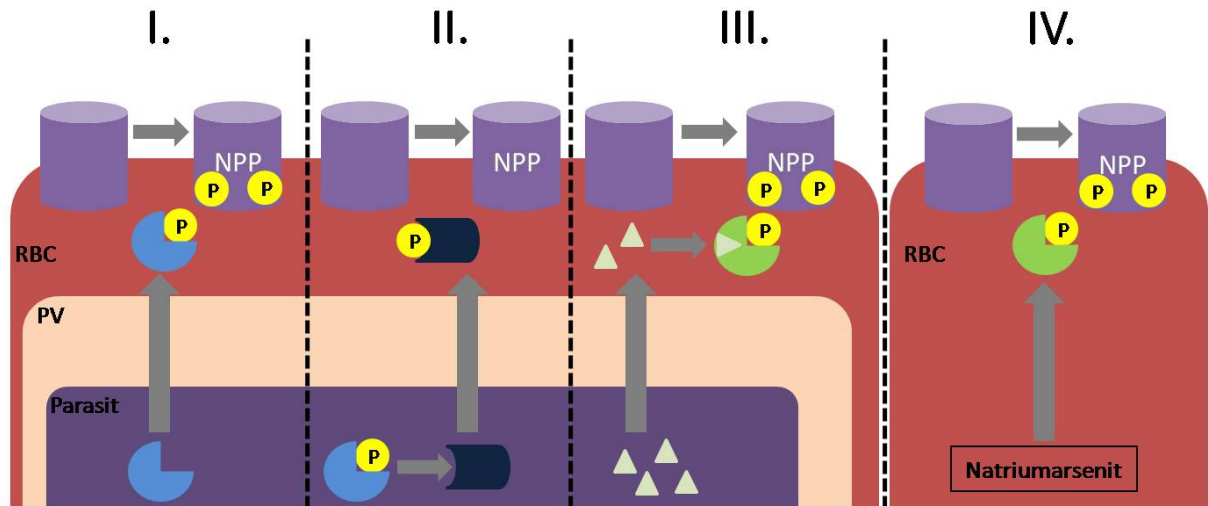


Abb.4.2: Mögliche Modelle zur Beteiligung von PKA an der Induktion der NPP und der Natriumarsenit-erzeugten Permeabilität

(modifiziert nach Merckx *et al.*, 2009)

- I. Die Proteinkinase A wird vom Parasiten exportiert und induziert mittels Phosphorylierung die NPP-Aktivität.
- II. Die Parasiten-eigene PKA phosphoryliert einen Mediator, der daraufhin exportiert wird und die NPP aktiviert.
- III. Der Parasit sezerniert cAMP in das Zytosol des Erythrozyten. Dieses aktiviert die humane PKA, die anschließend die NPP-Aktivität induziert.
- IV. Natriumarsenit aktiviert die humane PKA, welche ebenso wie die Parasiten-eigenen PKA die NPP induziert.

Zum einen kann die Parasiten-eigene PKA ins Zytosol des Erythrozyten exportiert werden und dort direkt durch Phosphorylierung die beteiligten Transportproteine aktivieren (Abb. 4.2, I.). Im Falle der Natriumarsenit-Behandlung könnte dies durch die mit Natriumarsenit aktivierte humane PKA geschehen. Diese stellt somit ein Äquivalent zur PKA des Parasiten dar. Zum anderen ist die PKA-vermittelte Phosphorylierung eines unbekanntem Mediators denkbar, der nach seiner Aktivierung exportiert wird und die NPP-Transporter aktiviert (Abb. 4.2, II.). Auch besteht die Möglichkeit der NPP-Aktivierung durch die humanen PKA, welche durch vom Parasiten synthetisiertes cAMP reguliert wird ^[Merckx *et al.*, 2009] (Abb. 4.2, III.).

4.3 EAAT3 könnte am NPP-vermittelten Influx von L-Glutamat in infizierte Erythrozyten beteiligt sein.

Die in nicht-infizierten Erythrozyten durch Natriumarsenit induzierte Permeabilität und die NPP in infizierten Erythrozyten weisen bezüglich der L-Glutamat-Aufnahme Ähnlichkeiten auf. So generiert die Natriumarsenit-Behandlung eine den NPP sehr ähnliche Permeabilität

für L-Glutamat und D-Aspartat, die mit bekannten NPP-Inhibitoren wie Furosemid und NPPB geblockt werden kann. Über dies hinaus wird mit Natriumarsenit ein Influx von Fosmidomycin und Pantothersäure induziert, Substanzen, die bekanntermaßen nur über die NPP in den Erythrozyten gelangen können [Saliba *et al.*, 1998, Seeber *et al.*, unpubliziert]. Diese Ähnlichkeiten lassen die Vermutung zu, dass die Natriumarsenit-induzierte Permeabilität in nicht-infizierten Erythrozyten einen Teil der NPP infizierter Erythrozyten widerspiegelt.

Wenn man für den Natriumarsenit-induzierten L-Glutamat-Transport in nicht-infizierten Erythrozyten die Beteiligung des EAAT3 postuliert, dann ergibt sich die Frage, ob dieser auch an der L-Glutamat-Aufnahme im Zusammenhang mit den NPP beteiligt ist.

Ähnlich der Natriumarsenit-induzierten Permeabilität finden sich auch bei den NPP Charakteristika eines EAAT3-vermittelten Transports. Die NPP-vermittelte L-Glutamat-Aufnahme erweist sich als partiell natriumabhängig und kann zu einem gewissen Teil mit den spezifischen EAAT-Inhibitoren *cis*-ACBD und HIP-A gehemmt werden. Diese Inhibition ist in ähnlichem Umfang auch für D-Aspartat und Pantothersäure feststellbar. Dies könnte ein Hinweis auf die Beteiligung eines Transportproteins der EAAT-Familie an den NPP sein. Dieser natriumabhängige Transporter könnte somit im Rahmen der NPP-Aktivität einen Teil des L-Glutamat- und D-Aspartat-Influges vermitteln. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass der Parasit über diesen Transporter einen Teil der essentiellen Pantothersäure bezieht. Neben dem Transport negativ geladener Moleküle könnte der postulierte Glutamattransporter auch zur nachweisbaren Anion-Kanal-Charakteristik der NPP [Kirk *et al.*, 1994, Kirk, 2001] beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass Transporter der EAAT-Familie neben der Aufnahme von Glutamat und Aspartat auch den Flux von Chloridionen vermitteln können [Arriza *et al.*, 1997; Fairman und Amara, 1999; Torres-Salazar und Fahlke, 2007]. Dieser Flux ist nicht mit dem Glutamattransport gekoppelt und bei allen EAAT-Subtypen nachweisbar. Somit können EAATs als Glutamattransporter und Anionenkanal fungieren [Ryan und Vandenberg, 2005; Vandenberg *et al.*, 2008].

Jeder Transport von Glutamat oder Aspartat über einen EAAT ist mit einem Cotransport von drei Natriumionen und dem Gegentransport eines Kaliumions verbunden [Kanai und Hediger, 1992; Shigeri *et al.*, 2004]. Es ist bekannt, dass es nach der Infektion des Erythrozyten zu einer Änderung des Na^+/K^+ -Gleichgewichts der befallenen Zelle kommt [Dunn, 1969; Sherman und Tanigoshi, 1971; Ginsburg *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1988], die zu einem vollständigen Verlust des Na^+/K^+ -Gradienten über die Plasmamembran des Erythrozyten führt. So könnte der von einem EAAT vermittelte

Transport von Natrium und Kalium auch zu den in infizierten Erythrozyten vorhandenen Verteilungen dieser Ionen beitragen.

4.4 Die Natriumarsenit-induzierte Permeabilität in nicht-infizierten Erythrozyten und die NPP in infizierten Erythrozyten zeigen die gleiche Proteasesensitivität.

Eine weitere Übereinstimmung mit den NPP zeigt sich in der Sensitivität gegenüber unterschiedlichen Proteasen. In meiner vorangegangenen Diplomarbeit und der daraus resultierenden Publikation von Baumeister *et al.* (2006) konnte ich zeigen, dass die in der Erythrozytenmembran postulierten Translokatoren, die in Form eines Kanals oder Transporters dem Parasiten einen Stofftransport ermöglichen, durch eine Behandlung mit Chymotrypsin inhibiert werden können. Eine Behandlung mit Trypsin hat hingegen keine Auswirkung auf die NPP-Aktivität. Die Inhibition beruht dabei auf der proteolytischen Aktivität, die das Chymotrypsin auf die an der Vermittlung der NPP beteiligten Proteine ausübt. Wie die NPP so ist auch die Natriumarsenit-induzierte Permeabilität sensitiv gegenüber Chymotrypsin und resistent gegen Trypsin. Diese Sensitivität ist wie bei infizierten Erythrozyten erst nach der Induktion feststellbar.

Gibt man die infizierten Erythrozyten nach der Behandlung mit Chymotrypsin für eine gewisse Zeit in Kultur, so stellt sich ein Teil der ursprünglichen NPP-Aktivität wieder ein [Baumeister *et al.*, 2006]. Auch durch die erneute Behandlung mit Natriumarsenit kann bei den nicht-infizierten Erythrozyten nach der Chymotrypsin-Behandlung diese Wiederkehr der Permeabilität stimuliert werden. Wie bei den infizierten Erythrozyten kehrt die Permeabilität nur zu einem gewissen Teil wieder. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass nur ein geringer Anteil der im Erythrozyten vorliegenden Transportproteine aktiviert wird. Dadurch lässt sich die Beobachtung erklären, dass für den identifizierten Glutamattransporter keine Degradationsprodukte in Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden konnten. Es besteht die Möglichkeit, dass die Zahl der gespaltenen aktiven Transporter unter der Detektionsgrenze des Western-Blots liegt.

Aus den aufgeführten Ergebnissen lässt sich eine weitere zentrale Schlussfolgerung ableiten. Da in nicht-infizierten Erythrozyten ohne die Anwesenheit eines Parasiten NPP-ähnliche Aktivität nach Chymotrypsin-Behandlung induzieren werden kann, muss es sich bei den Transportern um humane Proteinen handeln, die durch *P. falciparum* - oder experimentell

durch Natriumarsenit-Behandlung - induziert werden und so die Versorgung des Parasiten im Erythrozyten sicherstellen.

4.5 Die *Novel Permeation Pathways* umfassen mindestens drei Transportwege für Aminosäuren.

Der mit Natriumarsenit induzierbare Permeationsweg stellt nur einen Teil der NPP infizierter Erythrozyten dar. Über diesen Transportweg bezieht der Parasit möglicherweise einen Teil des über die NPP aufgenommenen L-Glutamats, D-Aspartats sowie der benötigten Pantothenensäure. Dieser Transportweg könnte von dem humanen Glutamattransporter EAAT3 gebildet und durch Parasiten-eigene Proteinkinasen oder vom Parasiten aktivierte humane Proteinkinasen reguliert werden. Neben diesem Transportweg für L-Glutamat, Aspartat und Pantothenensäure müssen die NPP weitere unabhängige Aminosäuretransporter umfassen.

Dies wird aus den nachweisbaren Unterschieden zwischen den beiden Permeationssystemen deutlich. Zum einen ist in Natriumarsenit-induzierten Erythrozyten, im Gegensatz zu infizierten Erythrozyten, kein Influx von D-Glutamat nachweisbar. Zum anderen gibt es Unterschiede in der Aufnahmekinetik der von beiden Permeationssystemen transportierten Moleküle. So erzeugt Natriumarsenit zwar eine den NPP sehr ähnliche Permeabilität für negativ geladene Moleküle, die dabei aufgenommene Menge ist bei den NPP jedoch höher. Auch in ihrer Hemmbarkeit mit EAAT-spezifischen Inhibitoren, sowie der Abhängigkeit von Natrium, werden Unterschiede deutlich. So ist beispielsweise die Aufnahme von L-Glutamat in Natriumarsenit-behandelte Erythrozyten strikt natriumabhängig, die im Rahmen der NPP vermittelte Permeabilität jedoch nur zu einem gewissen Teil. Anhand dieser Unterschiede im Transport können Aussagen über die beteiligten Transportproteine getroffen werden. Ein mögliches Modell für den Aminosäuretransport über die NPP ist in Abb. 4.3 dargestellt.

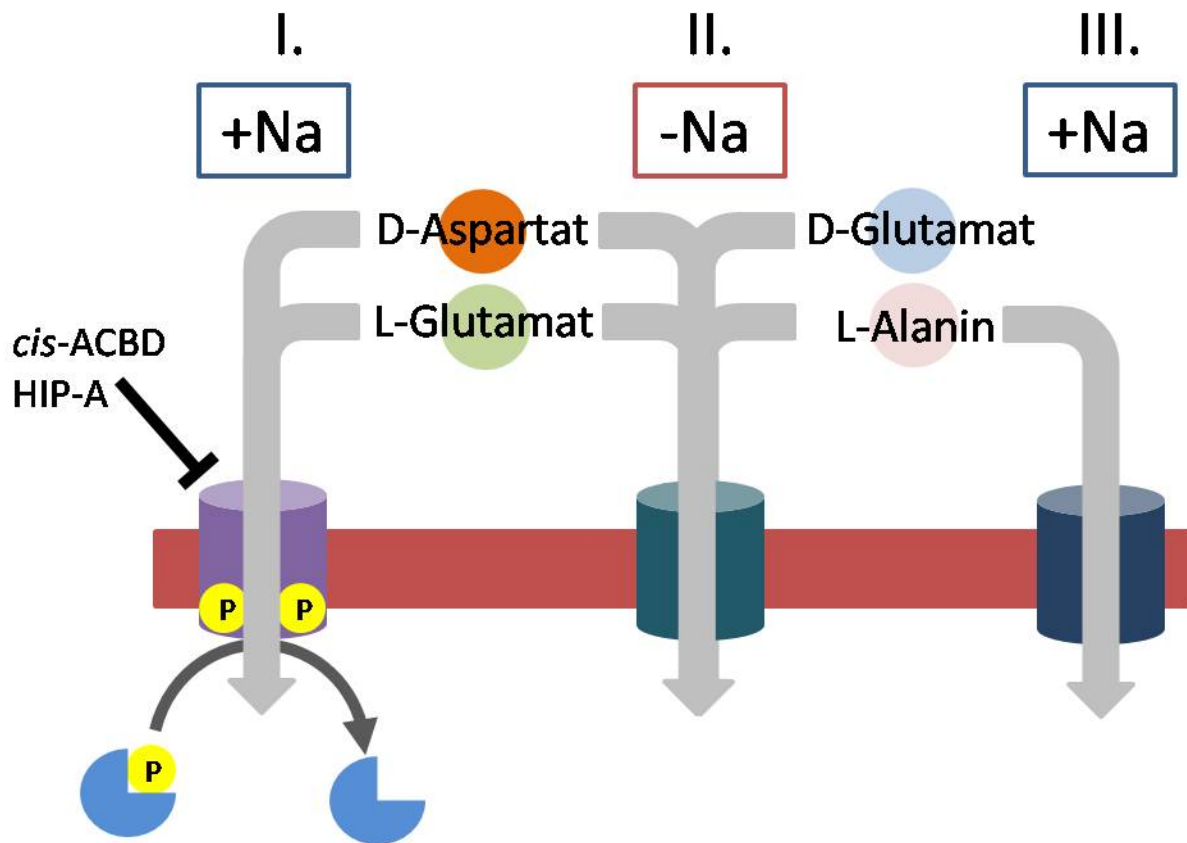


Abb.4.3: Mögliches Modell für die Aufnahme von Aminosäuren über die NPP in infizierten Erythrozyten.

- I. EAAT3 vermittelt in Abhängigkeit von Natrium einen Teil der L-Glutamat- und D-Aspartat-Aufnahme. Der Transporter wird über Kinasen aktiviert und der von ihm vermittelte Influx kann mit *cis*-ACBD und HIP-A inhibiert werden.
- II. Ein unbekannter Aminosäure-Transportweg über den L-/D-Glutamat, D-Aspartat und L-Alanin in die infizierte Zelle aufgenommen werden kann. Die Aufnahme der Aminosäuren ist dabei nicht an Natrium gebunden.
- III. Ein Alanintransporter vermittelt in Abhängigkeit von Natrium eine Permeabilität für L-Alanin.

Das Modell sieht für die Vermittlung des Aminosäurertransports im Rahmen der NPP mindestens drei Transportwege vor:

- I. Der humane EAAT3: Er kann durch eine Behandlung mit Natriumarsenit über Kinasen aktiviert werden und vermittelt den natriumabhängigen Influx von L-Glutamat und D-Aspartat. Neben diesen Aminosäuren kann der Parasit über ihn auch einen Teil der essentiellen Pantothensäure aufnehmen. Über diesen Transporter werden weder L-Alanin noch D-Glutamat aufgenommen, da ihr Influx nicht mit den EAAT-spezifischen Inhibitoren *cis*-ACBD und HIP-A blockiert werden kann. Auch kann durch die Aktivierung von EAAT3 mit Natriumarsenit in nicht-

infizierten Erythrozyten keine Permeabilität für diese Aminosäuren erzeugt werden.

- II. Ein unbekannter Transportweg für Aminosäuren: Der von ihm vermittelte Transport ist nicht an die Anwesenheit von Natrium gebunden und kann nicht mit *cis*-ACBD oder HIP-A inhibiert werden. Dieser Transportweg könnte einen oder mehrere Transporter umfassen. Über diesen Aufnahmeweg kann der Parasiten L-/D-Glutamat, D-Aspartat und L-Alanin aufnehmen.

D-Glutamat:

Der unter I. genannte EAAT3 transportiert dieses Enantiomer von Glutamat nicht [Arriza *et al.*, 1994]. Auch ist der EAAT3 vermittelte Transport strikt natriumabhängig [Kanner, 1994; O'Shea, 2002; Ryan und Vandenberg, 2005]. Die Aufnahme von D-Glutamat ist, wie gezeigt werden konnte, nicht natriumabhängig und sein Influx kann nicht mit den genannten EAAT-spezifischen Inhibitoren gehemmt werden. Dies setzt einen anderen, nicht EAAT3 vermittelten, Transportweg für diese Aminosäure voraus.

L-Glutamat / D-Aspartat:

Neben D-Glutamat wird über diesen Transportweg auch ein Teil des L-Glutamats und D-Aspartats aufgenommen. Für diese Annahme gibt es mehrere Gründe: Zum einen wird ein Teil dieser Aminosäuren in infizierten Erythrozyten unabhängig von Natrium aufgenommen. Dies spricht gegen einen EAAT-vermittelten Transport, da EAATs strikt natriumabhängig sind [Kanner, 1994; O'Shea, 2002; Ryan und Vandenberg, 2005]. Zum anderen kann die Aufnahme dieser Aminosäuren mit D-Glutamat kompetitiert werden, was für eine gemeinsame Aufnahme dieser Aminosäuren über einen Transportweg spricht. Außerdem wird nur ein Teil der L-Glutamat- und D-Aspartat-Aufnahme von EAAT-spezifischen Inhibitoren blockiert, was die Existenz eines weiteren, nicht EAAT vermittelten, Aufnahmewegs für diese Aminosäuren voraussetzt.

L-Alanin:

Über diesen Transportweg wird auch ein Teil des L-Alanins aufgenommen. Die Aufnahme von L-Alanin kann mit den anderen getesteten Aminosäuren kompetitiert werden, was für einen gemeinsamen Transportweg spricht. Wie L-Glutamat ist auch die Aufnahme von L-Alanin in infizierte Erythrozyten

partiell abhängig von Natrium. Der natriumunabhängige Teil der L-Alanin-Aufnahme könnte über diesen Transportweg geregelt werden.

III. Der Alanintransporter: Er vermittelt den natriumabhängigen Influx von L-Alanin in infizierte Erythrozyten. Für seine Beteiligung an der Aminosäureaufnahme in infizierten Erythrozyten gibt es verschiedene Hinweise.

Zum einen ist die Aufnahme von L-Alanin nur zu einem Teil und nicht komplett mit anderen Aminosäuren kompetitiv hemmbar, was für mindestens zwei Transportwege für diese Aminosäure spricht. Zum anderen ist die Aufnahme von L-Alanin zu einem großen Teil an die Anwesenheit von Natrium gebunden. Zwar zeigt auch EAAT3 diese Natriumabhängigkeit, vermittelt jedoch keinen L-Alanin-Influx. Dies geht einerseits aus der fehlenden Aufnahme von L-Alanin über den Natriumarsenit-aktivierten EAAT3 in nicht-infizierten Erythrozyten hervor, andererseits aus der fehlenden Hemmbarkeit des L-Alanin-Influx mit EAAT-spezifischen Inhibitoren.

Die neben EAAT3 postulierten Transportwege für Aminosäuren können sowohl humanen Ursprungs sein oder Parasiten-eigene Transportproteine darstellen. Für einen humanen Ursprung spricht jedoch die Tatsache, dass sowohl oxidativer wie auch osmotischer Stress in nicht-infizierten Erythrozyten eine Permeabilität für die von ihnen transportierten Moleküle induziert [Culliford *et al.*, 1995; Huber *et al.*, 2002].

So wäre ein denkbarer Kandidat für die L-Alanin-Aufnahme der humane ASC-Transporter. Er wurde in humanen Erythrozyten nachgewiesen und vermittelt in Abhängigkeit von Natrium den Influx von L-Alanin [Young *et al.*, 1981, Tunnicliff, 1994].

Die Unterschiede zur Natriumarsenit-induzierten Permeabilität könnten zum einen in der Aktivierung anderer oder zusätzlicher Kinasen liegen. Die Natriumarsenit-Behandlung hat offensichtlich nur Einfluss auf die Proteinkinasen A, C und G, da die Entstehung der Permeabilität nur von Inhibitoren dieser Kinasen gehemmt wird. Andere Kinase-Inhibitoren haben keine Wirkung [Flatman und Creanor, 1999]. Zum anderen ist ein Kinase-unabhängiger Einfluss auf die Transportproteine denkbar. Dies trifft im Besonderen auf die durch Oxidation erzeugte Permeabilität zu. So könnte die Oxidation zu einer direkten Modifikation des Transporters und somit zu seiner Aktivierung führen.

4.6 Neben EAAT3 wird auch NKCC1 durch Natriumarsenit aktiviert und könnte eine Rolle bei der Vermittlung der NPP spielen.

Neben dem EAAT3-vermittelten Influx von negativ geladenen Molekülen ist nach der Natriumarsenit-Behandlung auch ein gesteigerter Influx von ^{86}Rb nachweisbar. Dieser wird über den Cotransporter NKCC1 vermittelt [Flatman und Creanor, 1999]. Wie EAAT3 könnte auch NKCC1 zur der Vermittlung der NPP in infizierten Erythrozyten beitragen. NKCC1 könnte den Bumetanid-sensitiven Transport von Natrium, Kalium und Chlorid vermitteln, wie er in infizierten Erythrozyten nachweisbar ist [Kirk et al., 1991 und 1994]. Eine Beteiligung am Transport von Aminosäuren ist jedoch aufgrund seiner Eigenschaft als Ionentransporter und der fehlenden Inhibierbarkeit mit EAAT-spezifischen Inhibitoren eher unwahrscheinlich.

NKCC1 konnte im Rahmen dieser Arbeit durch MALDI-TOF-Analysen von Chymotrypsin-generierten Peptiden der Oberflächenproteine infizierter Erythrozyten identifiziert werden. Unter den identifizierten Proteinen fanden sich sechs Transportproteine die aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Chymotrypsin eine mögliche Rolle bei der Vermittlung der NPP-Aktivität spielen könnten. Um den Kreis der möglichen Kandidaten einzugrenzen wurde die Wirkung spezifischer Inhibitoren für die identifizierten Proteine auf die NPP-Aktivität untersucht. Hierbei zeigte sich, dass von den identifizierten Transportern lediglich NKCC1 eine mögliche Beteiligung an den NPP zugesprochen werden kann. Beispielsweise wirken auf NKCC1 und die NPP die gleichen Inhibitoren. So kann mit dem spezifischen NKCC1-Inhibitor Bumetanid die NPP-vermittelte Hämolyse gehemmt werden, und bekannte NPP-Inhibitoren wie Furosemid und NPPB sind in der Lage NKCC1 zu blockieren [Hannaert et al. 2002].

Bestärkt wird die mögliche Beteiligung von NKCC1 an den NPP im Western-Blot. Mittels eines spezifischen NKCC1-Antikörpers kann das für ein NPP-Protein zu erwartende Bandenmuster nach Protease-Behandlung detektiert werden. So zeigt sich NKCC1, wie die NPP, resistent gegenüber Trypsin und sensitiv gegenüber Chymotrypsin.

4.7 Ausblick

Diese Arbeit gibt Hinweise auf die Beteiligung eines Transporters der EAAT-Familie an der Vermittlung der *Novel Permeation Pathways* in infizierten Erythrozyten. Durch die Natriumarsenit-Behandlung konnte ein geeignetes Werkzeug zur selektiven Induktion dieses Transportwegs in nicht-infizierten Erythrozyten etabliert werden. Dabei beruht die Induktion der nachweisbaren Permeabilität wahrscheinlich auf der Aktivierung von Proteinkinasen durch das Natriumarsenit. Diese Annahme stützt sich auf die Beobachtung, dass die Permeabilität nach Natriumarsenit-Behandlung durch Kinaseinhibitoren unterbunden wird. Außerdem ist anzunehmen, dass die Aktivierung von Kinasen nicht ausschließlich zur Induktion eines einzelnen Transportwegs führt. Wie bereits gezeigt werden konnte, wird neben der in dieser Arbeit identifizierten Permeabilität für negativ geladene Moleküle auch ein Influx von ^{86}Rb induziert [Flatman und Creanor, 1999]. Es gilt daher in weiterführenden Experimenten, die Bandbreite an aufgenommenen Molekülen näher zu charakterisieren. Auch gilt es zu klären, warum im Gegensatz zur vergleichsweise unspezifischen Aufnahme nach Oxidation von Erythrozyten nur bestimmte Moleküle aufgenommen werden. Hinzu kommt, dass auch die Wirkung des Natriumarsenits auf die beteiligten Kinasen noch unbekannt ist. Wie bei der Natriumarsenit-induzierten Permeabilität sind auch an der Bildung der NPP Kinasen beteiligt [Merckx et al., 2009]. Über die vermittelnden Kinasen kann in beiden Fällen jedoch nur spekuliert werden. Zukünftige Experimente sollten daher auch auf die Identifikation der beteiligten Kinasen ausgerichtet sein. Hierfür könnte der identifizierte EAAT3 als wahrscheinlicher Kandidat für die Vermittlung der NPP dienlich sein. EAAT3 besitzt fünf interne Schleifen mit 14 möglichen Phosphorylierungsstellen. Diese Schleifen könnten in *E. coli* oder Hefe exprimiert werden und als Beute für die Identifikation der beteiligten Kinasen aus dem Zytosol infizierter und Natriumarsenit-induzierter Erythrozyten dienen. Diese Versuche könnten mittels einer Co-Präzipitation oder eines Hefe-Zwei-Hybrid-System durchgeführt werden.

5. Literatur

Aikawa M, Hepler PK, Huff CG und Sprinz H. The feeding mechanism of avian malarial parasites. *J Cell Biol* (1966) vol. 28 (2) pp. 355-73

Alano P. Plasmodium falciparum gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Mol Microbiol* (2007) vol. 66 (2) pp. 291-302

Alkhalil A, Cohn JV, Wagner MA, Cabrera JS, Rajapandi T und Desai SA. Plasmodium falciparum likely encodes the principal anion channel on infected human erythrocytes. *Blood* (2004) vol. 104 (13) pp. 4279-86

Anderson CM, Bridges RJ, Chamberlin AR, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y und Swanson RA. Differing effects of substrate and non-substrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal. *J Neurochem* (2001) vol. 79 (6) pp. 1207-16

Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP und Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) vol. 94 (8) pp. 4155-60

Atamna H und Ginsburg H. Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* (1993) vol. 61 (2) pp. 231-41

Atamna H und Ginsburg H. The malaria parasite supplies glutathione to its host cell-- investigation of glutathione transport and metabolism in human erythrocytes infected with Plasmodium falciparum. *Eur J Biochem* (1997) vol. 250 (3) pp. 670-9

Bannister LH, Hopkins JM, Margos G, Dluzewski AR und Mitchell GH. Three-dimensional ultrastructure of the ring stage of Plasmodium falciparum: evidence for export pathways. *Microsc Microanal* (2004) vol. 10 (5) pp. 551-62

Baum J, Richard D, Healer J, Rug M, Krnajski Z, Gilberger TW, Green JL, Holder AA und Cowman AF. A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across

malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. *J Biol Chem* (2006) vol. 281 (8) pp. 5197-208

Baumeister S, Endermann T, Charpian S, Nyalwidhe J, Duranton C, Huber S, Kirk K, Lang F und Lingelbach K. A biotin derivative blocks parasite induced novel permeation pathways in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* (2003) vol. 132 (1) pp. 35-45

Baumeister S, Winterberg M, Duranton C, Huber SM, Lang F, Kirk K, Lingelbach K. Evidence for the involvement of Plasmodium falciparum proteins in the formation of new permeability pathways in the erythrocyte membrane. *Mol Microbiol.* (2006) vol. 60 (2) pp. 493-504

Baumeister S, Winterberg M und Lingelbach K. Plasmodium-infected erythrocytes: separation of ghosts from parasite membranes. *Methods in Malaria Research.* Fifth Edition. 2008

Bernhardt I, Hall AC und Ellory JC. Effects of low ionic strength media on passive human red cell monovalent cation transport. *J Physiol (Lond)* (1991) vol. 434 pp. 489-506

Berry CB, Hayes D, Murphy A, Wiessner M, Rauen T und McBean GJ. Differential modulation of the glutamate transporters GLT1, GLAST and EAAC1 by docosahexaenoic acid. *Brain Res* (2005) vol. 1037 (1-2) pp. 123-33

Boehmer C, Henke G, Schniepp R, Palmada M, Rothstein JD, Bröer S und Lang F. Regulation of the glutamate transporter EAAT1 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1/3 and protein kinase B. *J Neurochem* (2003) vol. 86 (5) pp. 1181-8

Boehmer C, Palmada M, Rajamanickam J, Schniepp R, Amara S und Lang F. Post-translational regulation of EAAT2 function by co-expressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is

impacted by SGK kinases. *J Neurochem* (2006) vol. 97 (4) pp. 911-21

Boehmer C, Rajamanickam J, Schniepp R, Kohler K, Wulff P, Kuhl D, Palmada M und Lang F. Regulation of the excitatory amino acid transporter EAAT5 by the serum and glucocorticoid dependent kinases SGK1 and SGK3. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) vol. 329 (2) pp. 738-42

Breuer WV, Kutner S, Sylphen J, Ginsburg H und Cabantchik ZI. Covalent modification of the permeability pathways induced in the human erythrocyte membrane by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *J Cell Physiol* (1987) vol. 133 (1) pp. 55-63

Bru gnara C, Corrocher R, Foroni L, Steinmayr M, Bonfanti F und De Sandre G. Lithium-sodium countertransport in erythrocytes of normal and hypertensive subjects. Relationship with age and plasma renin activity. *Hypertension* (1983) vol. 5 (4) pp. 529-34

Cabantchik ZI. Erythrocyte membrane transport. *Novartis Found Symp* (1999) vol. 226 pp. 6-16; discussion 16-9

Cabantchik ZI. Properties of permeation pathways induced in the human red cell membrane by malaria parasites. *Blood Cells* (1990) vol. 16 (2-3) pp. 421-32

Cantor LN, Morris AJ, Marks PA und Rifkind RA. Purification of erythropoietin-responsive cells by immune hemolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* (1972) vol. 69 (6) pp. 1337-41

Cassera MB, Merino EF, Peres VJ, Kimura EA, Wunderlich G und Katzin AM. Effect of fosmidomycin on metabolic and transcript profiles of the methylerythritol phosphate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2007) vol. 102 (3) pp. 377-83

Cohn JV, Alkhalil A, Wagner MA, Rajapandi T und Desai SA. Extracellular lysines on the plasmodial surface anion channel involved in Na⁺ exclusion. *Mol Biochem Parasitol* (2003) vol. 132 (1) pp. 27-34

Cooke BM, Mohandas N, Coppel RL. Malaria and the red blood cell membrane.

Semin Hematol. (2004) vol. 41 (2) pp. 173-88.

Cranmer SL, Conant AR, Gutteridge WE und Halestrap AP. Characterization of the enhanced transport of L- and D-lactate into human red blood cells infected with *Plasmodium falciparum* suggests the presence of a novel saturable lactate proton cotransporter. *J Biol Chem* (1995) vol. 270 (25) pp. 15045-52

Culliford SJ, Bernhardt I und Ellory JC. Activation of a novel organic solute transporter in mammalian red blood cells. *J Physiol (Lond)* (1995) vol. 489 (Pt 3) pp. 755-65

Desai SA und Rosenberg RL. Pore size of the malaria parasite's nutrient channel. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) vol. 94 (5) pp. 2045-9

Desai SA, Bezrukov SM und Zimmerberg J. A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature* (2000) vol. 406 (6799) pp. 1001-5

Desai SA. A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. *Novartis Found Symp* (1999) vol. 226 pp. 89-95; discussion 95-8

Deuticke B. Monocarboxylate transport in erythrocytes. *J Membr Biol* (1982) vol. 70 (2) pp. 89-103

Divo AA, Geary TG, Davis NL und Jensen JB. Nutritional requirements of *Plasmodium falciparum* in culture. I. Exogenously supplied dialyzable components necessary for continuous growth. *J Protozool* (1985) vol. 32 (1) pp. 59-64

Dumaswala UJ, Zhuo L, Jacobsen DW, Jain SK und Sukalski KA. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. *Free Radic Biol Med* (1999) vol. 27 (9-10) pp. 1041-9

Dunlop J, Eliasof S, Stack G, McIlvain HB, Greenfield A, Kowal D, Petroski R und Carrick T. WAY-855 (3-amino-tricyclo[2.2.1.0^{2,6}]heptane-1,3-dicarboxylic acid): a novel, EAAT2-preferring, nonsubstrate

- inhibitor of high-affinity glutamate uptake. *Br J Pharmacol* (2003) vol. 140 (5) pp. 839-46
- Dunn MJ. Alterations of red blood cell sodium transport during malarial infection. *J Clin Invest* (1969) vol. 48 (4) pp. 674-84
- Durantón C, Huber S, Tanneur V, Lang K, Brand V, Sandu C und Lang F. Electrophysiological properties of the *Plasmodium falciparum*-induced cation conductance of human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* (2003) vol. 13 (4) pp. 189-98
- Durantón C, Huber SM, Tanneur V, Brand VB, Akkaya C, Shumilina EV, Sandu CD und Lang F. Organic osmolyte permeabilities of the malaria-induced anion conductances in human erythrocytes. *J Gen Physiol* (2004) vol. 123 (4) pp. 417-26
- Egée S, Lapaix F, Decherf G, Staines HM, Ellory JC, Doerig C und Thomas SL. A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Physiol (Lond)* (2002) vol. 542 (Pt 3) pp. 795-801
- El Tahir A, Malhotra P und Chauhan VS. Uptake of proteins and degradation of human serum albumin by *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Malar J* (2003) vol. 2 pp. 11
- Elford BC, Haynes JD, Chulay JD und Wilson RJ. Selective stage-specific changes in the permeability to small hydrophilic solutes of human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* (1985) vol. 16 (1) pp. 43-60
- Fader CM und Colombo MI. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ* (2009) vol. 16 (1) pp. 70-8
- Fairman WA und Amara SG. Functional diversity of excitatory amino acid transporters: ion channel and transport modes. *Am J Physiol* (1999) vol. 277 (4 Pt 2) pp. F481-6
- Flatman PW und Creanor J. Stimulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport by arsenite in ferret erythrocytes. *J Physiol (Lond)* (1999) vol. 519 Pt 1 pp. 143-52
- Flatman PW. Cotransporters, WNKs and hypertension: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2008) vol. 17 (2) pp. 186-92
- Flatman PW. Regulation of Na-K-2Cl cotransport by phosphorylation and protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* (2002) vol. 1566 (1-2) pp. 140-51
- Flatman PW. Regulation of Na-K-2Cl cotransport in red cells. *Adv Exp Med Biol* (2004) vol. 559 pp. 77-88
- Funicello M, Conti P, De Amici M, De Micheli C, Mennini T und Gobbi M. Dissociation of [3H]L-glutamate uptake from L-glutamate-induced [3H]D-aspartate release by 3-hydroxy-4,5,6,6a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-d]isoxazole-4-carboxylic acid and 3-hydroxy-4,5,6,6a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-d]isoxazole-6-carboxylic acid, two conformationally constrained aspartate and glutamate analogs. *Mol Pharmacol* (2004) vol. 66 (3) pp. 522-9
- Gardos G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* (1958) vol. 30 (3) pp. 653-4
- Gegelashvili G, Robinson MB, Trotti D und Rauen T. Regulation of glutamate transporters in health and disease. *Prog Brain Res* (2001) vol. 132 pp. 267-86
- Ginsburg H, Krugliak M, Eidelman O und Cabantchik ZI. New permeability pathways induced in membranes of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* (1983) vol. 8 (2) pp. 177-90
- Ginsburg H, Kutner S, Krugliak M und Cabantchik ZI. Characterization of permeation pathways appearing in the host membrane of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *Mol Biochem Parasitol* (1985) vol. 14 (3) pp. 313-22
- Ginsburg H, Kutner S, Zangwil M und Cabantchik ZI. Selectivity properties of pores induced in host erythrocyte membrane by *Plasmodium falciparum*. Effect of parasite

maturation. *Biochim Biophys Acta* (1986) vol. 861 (1) pp. 194-6

Giribaldi G, Ulliers D, Mannu F, Arese P und Turrini F. Growth of *Plasmodium falciparum* induces stage-dependent haemichrome formation, oxidative aggregation of band 3, membrane deposition of complement and antibodies, and phagocytosis of parasitized erythrocytes. *Br J Haematol* (2001) vol. 113 (2) pp. 492-9

Glushakova S, Yin D, Li T und Zimmerberg J. Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. *Curr Biol* (2005) vol. 15 (18) pp. 1645-50

Goel VK, Li X, Chen H, Liu SC, Chishti AH und Oh SS. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) vol. 100 (9) pp. 5164-9

González MI, Susarla BT und Robinson MB. Evidence that protein kinase Calpha interacts with and regulates the glial glutamate transporter GLT-1. *J Neurochem* (2005) vol. 94 (5) pp. 1180-8

Griffiths R, Dunlop J, Gorman A, Senior J und Grieve A. L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate and cis-1-aminocyclobutane-1,3-dicarboxylate behave as transportable, competitive inhibitors of the high-affinity glutamate transporters. *Biochem Pharmacol* (1994) vol. 47 (2) pp. 267-74

Guillet BA, Velly LJ, Canolle B, Masméjean FM, Nieoullon AL und Pisano P. Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochem Int* (2005) vol. 46 (4) pp. 337-46

Gunn RB, Dalmark M, Tosteson DC und Wieth JO. Characteristics of chloride transport in human red blood cells. *J Gen Physiol* (1973) vol. 61 (2) pp. 185-206

Haas M und Forbush D 3rd. The Na-K-Cl cotransporters. *J Bioenerg Biomembr* (1998) vol. 30 (2) pp. 161-72

Hannaert P, Alvarez-Guerra M, Pirot D, Nazaret C und Garay RP. Rat NKCC2/NKCC1 cotransporter selectivity for loop diuretic drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (2002) vol. 365 (3) pp. 193-9

Heussler V, Sturm A und Langsley G. Regulation of host cell survival by intracellular *Plasmodium* and *Theileria* parasites. *Parasitology* (2006) vol. 132 Suppl pp. S49-60

Heussler VT, Küenzi P und Rottenberg S. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *International Journal for Parasitology* (2001) vol. 31 (11) pp. 1166-76

Hora R, Bridges DJ, Craig A und Sharma A. Erythrocytic casein kinase II regulates cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *J Biol Chem* (2009) vol. 284 (10) pp. 6260-9

Hornig R und Lutz HU. Band 3 protein clustering on human erythrocytes promotes binding of naturally occurring anti-band 3 and anti-spectrin antibodies. *Exp Gerontol* (2000) vol. 35 (8) pp. 1025-44

Huber SM, Uhlemann AC, Gamper NL, Durantón C, Kremsner PG und Lang F. *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl⁻ channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *EMBO J* (2002) vol. 21 (1-2) pp. 22-30

Inagaki M, Watanabe M und Hidaka H. N-(2-Aminoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide, a newly synthesized protein kinase inhibitor, functions as a ligand in affinity chromatography. Purification of Ca²⁺-activated, phospholipid-dependent and other protein kinases. *J Biol Chem* (1985) vol. 260 (5) pp. 2922-5

Ingrosso D, D'angelo S, di Carlo E, Perna AF, Zappia V und Galletti P. Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress. *Eur J Biochem* (2000) vol. 267 (14) pp. 4397-405

Jackson M, Song W, Liu MY, Jin L, Dykes-Hoberg M, Lin CI, Bowers WJ, Federoff HJ, Sternweis PC und Rothstein JD. Modulation of

the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18. *Nature* (2001) vol. 410 (6824) pp. 84-8

Johnstone RM, Mathew A, Mason AB und Teng K. Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *J Cell Physiol* (1991) vol. 147 (1) pp. 27-36

Johnstone RM. Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells Mol Dis* (2005) vol. 34 (3) pp. 214-9

Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, Altincicek B, Weidemeyer C, Hintz M, Türbachova I, Eberl M, Zeidler J, Lichtenthaler HK, Soldati D und Beck E. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* (1999) vol. 285 (5433) pp. 1573-6

Kanai Y und Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* (1992) vol. 360 (6403) pp. 467-71

Kanner BI. Structure and function of sodium-coupled neurotransmitter transporters. *Ren Physiol Biochem* (1994) vol. 17 (3-4) pp. 208-11

Kirk K und Horner HA. In search of a selective inhibitor of the induced transport of small solutes in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: effects of arylaminobenzoates. *Biochem J* (1995) vol. 311 (Pt 3) pp. 761-8

Kirk K und Horner HA. Novel anion dependence of induced cation transport in malaria-infected erythrocytes. *J Biol Chem* (1995) vol. 270 (41) pp. 24270-5

Kirk K, Ashworth KJ, Elford BC, Pinches RA und Ellory JC. Characteristics of 86Rb⁺ transport in human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Biochim Biophys Acta* (1991) vol. 1061 (2) pp. 305-8

Kirk K, Horner HA und Kirk J. Glucose uptake in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is an equilibrative not an active process. *Mol*

Biochem Parasitol (1996) vol. 82 (2) pp. 195-205

Kirk K, Horner HA, Elford BC, Ellory JC und Newbold CI. Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. *J Biol Chem* (1994) vol. 269 (5) pp. 3339-47

Kirk K, Horner HA, Spillett DJ und Elford BC. Glibenclamide and meglitinide block the transport of low molecular weight solutes into malaria-infected erythrocytes. *FEBS Lett* (1993) vol. 323 (1-2) pp. 123-8

Kirk K, Tilley L und Ginsburg H. Transport and trafficking in the malaria-infected erythrocyte. *Parasitol Today* (1999) vol. 15 (9) pp. 355-7

Kirk K, Wong HY, Elford BC, Newbold CI und Ellory JC. Enhanced choline and Rb⁺ transport in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* (1991) vol. 278 (Pt 2) pp. 521-5

Kirk K. Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Rev* (2001) vol. 81 (2) pp. 495-537

Koho NM, Hyyppä S und Pösö AR. Monocarboxylate transporters (MCT) as lactate carriers in equine muscle and red blood cells. *Equine Vet J Suppl* (2006) (36) pp. 354-8

Koho NM, Raekallio M, Kuusela E, Vuolle J und Pösö AR. Lactate transport in canine red blood cells. *Am J Vet Res* (2008) vol. 69 (8) pp. 1091-6

Kun JF, Hibbs AR, Saul A, McColl DJ, Coppel RL und Anders RF. A putative *Plasmodium falciparum* exported serine/threonine protein kinase. *Mol Biochem Parasitol* (1997) vol. 85 (1) pp. 41-51

Kutner S, Ginsburg H und Cabantchik ZI. Permselectivity changes in malaria (*Plasmodium falciparum*) infected human red blood cell membranes. *J Cell Physiol* (1983) vol. 114 (2) pp. 245-51

- LaCelle PL und Rothsteto A. The passive permeability of the red blood cell in cations. *J Gen Physiol* (1966) vol. 50 (1) pp. 171-88
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) vol. 227 (5259) pp. 680-5
- Lasonder E, Ishihama Y, Andersen JS, Vermunt AM, Pain A, Sauerwein RW, Eling WM, Hall N, Waters AP, Stunnenberg HG und Mann M. Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature* (2002) vol. 419 (6906) pp. 537-42
- Lauer SA, Rathod PK, Ghori N und Haldar K. A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science* (1997) vol. 276 (5315) pp. 1122-5
- Lew VL, Macdonald L, Ginsburg H, Krugliak M und Tiffert T. Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood* (2003) vol. 101 (10) pp. 4189-94
- Lew VL, Muallem S und Seymour CA. Properties of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in one-step inside-out vesicles from human red cell membranes. *Nature* (1982) vol. 296 (5859) pp. 742-4
- Li X, Chen H, Oo TH, Daly TM, Bergman LW, Liu SC, Chishti AH und Oh SS. A co-ligand complex anchors *Plasmodium falciparum* merozoites to the erythrocyte invasion receptor band 3. *J Biol Chem* (2004) vol. 279 (7) pp. 5765-71
- Lingelbach K und Joiner KA. The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* (1998) vol. 111 (Pt 11) pp. 1467-75
- Lisk G, Kang M, Cohn JV und Desai SA. Specific inhibition of the plasmodial surface anion channel by dantrolene. *Eukaryotic Cell* (2006) vol. 5 (11) pp. 1882-93
- Lüder CG, Stanway RR, Chaussepied M, Langsley G und Heussler VT. Intracellular survival of apicomplexan parasites and host cell modification. *International Journal for Parasitology* (2009) vol. 39 (2) pp. 163-73
- Luse SA und Miller LH. *Plasmodium falciparum* malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. *Am J Trop Med Hyg* (1971) vol. 20 (5) pp. 655-60
- Lytle C, Xu JC, Biemesderfer D und Forbush B 3rd. Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies. *Am J Physiol* (1995) vol. 269 (6 Pt 1) pp. C1496-505
- Martin RE und Kirk K. Transport of the essential nutrient isoleucine in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Blood* (2007) vol. 109 (5) pp. 2217-24
- Matskevich I, Hegney KL und Flatman PW. Regulation of erythrocyte Na-K-2Cl cotransport by threonine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* (2005) vol. 1714 (1) pp. 25-34
- Merckx A, Bouyer G, Thomas SL, Langsley G und Egée S. Anion channels in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and protein kinase A. *Trends Parasitol* (2009) vol. 25 (3) pp. 139-44
- Merckx A, Nivez MP, Bouyer G, Alano P, Langsley G, Deitsch K, Thomas S, Doerig C und Egée S. *Plasmodium falciparum* regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance. *PLoS Pathog* (2008) vol. 4 (2) pp. e19
- Novak D, Beveridge M und Verlander-Reed J. Rat erythrocytes express the anionic amino acid transport protein EAAC1. *Blood Cells Mol Dis* (2002) vol. 29 (3) pp. 261-6
- Nyalwidhe J und Lingelbach K. Proteases and chaperones are the most abundant proteins in the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Proteomics* (2006) vol. 6 (5) pp. 1563-73
- Nyalwidhe J, Baumeister S, Hibbs AR, Tawill S, Papakrivos J, Volker U und Lingelbach K. A nonpermeant biotin derivative gains access to the parasitophorous vacuole in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes

- permeabilized with streptolysin O. *J Biol Chem* (2002) vol. 277 (42) pp. 40005-11
- Nyalwidhe J, Maier UG und Lingelbach K. Intracellular parasitism: cell biological adaptations of parasitic protozoa to a life inside cells. *Zoology (Jena)* (2003) vol. 106 (4) pp. 341-8
- O'Shea RD. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2002) vol. 29 (11) pp. 1018-23
- Pasini EM, Kirkegaard M, Mortensen P, Lutz HU, Thomas AW und Mann M. In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood* (2006) vol. 108 (3) pp. 791-801
- Patel AP, Staines HM und Krishna S. New antimalarial targets: the example of glucose transport. *Travel medicine and infectious disease* (2008) vol. 6 (1-2) pp. 58-66
- Pines G, Danbolt NC, Bjørås M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E und Kanner BI. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* (1992) vol. 360 (6403) pp. 464-7
- Post RL, Albright CD und Dayani K. Resolution of pump and leak components of sodium and potassium ion transport in human erythrocytes. *J Gen Physiol* (1967) vol. 50 (5) pp. 1201-20
- Pouvelle B und Gysin J. Presence of the parasitophorous duct in *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* parasitized Saimiri monkey red blood cells. *Parasitol Today (Regul Ed)* (1997) vol. 13 (9) pp. 357-61
- Rajamanickam J, Palmada M, Lang F und Boehmer C. EAAT4 phosphorylation at the SGK1 consensus site is required for transport modulation by the kinase. *J Neurochem* (2007) vol. 102 (3) pp. 858-66
- Reissmann KR und Udupa KB. Effect of erythropoietin on proliferation of erythropoietin-responsive cells. *Cell and tissue kinetics* (1972) vol. 5 (6) pp. 481-9
- Roth E Jr. *Plasmodium falciparum* carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite. *Blood Cells* (1990) vol. 16 (2-3) pp. 453-60; discussion 461-6
- Roudier N, Verbavatz JM, Maurel C, Ripoche P und Tacnet F. Evidence for the presence of aquaporin-3 in human red blood cells. *J Biol Chem* (1998) vol. 273 (14) pp. 8407-12
- Roux-Dalvai F, Gonzalez de Peredo A, Simó C, Guerrier L, Bouyssié D, Zanella A, Citterio A, Burlet-Schiltz O, Boschetti E, Righetti PG und Monsarrat B. Extensive analysis of the cytoplasmic proteome of human erythrocytes using the peptide ligand library technology and advanced mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* (2008) vol. 7 (11) pp. 2254-69
- Ryan RM und Vandenberg RJ. A channel in a transporter. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2005) vol. 32 (1-2) pp. 1-6
- Ryu J, Cheong IY, Do SH und Zuo Z. Alphaxalone, a neurosteroid anaesthetic, increases the activity of the glutamate transporter type 3 expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol.* (2009) vol. 602 (1) pp. 23-7.
- Saliba KJ und Kirk K. Uptake of an antiplasmodial protease inhibitor into *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes via a parasite-induced pathway. *Mol Biochem Parasitol* (1998) vol. 94 (2) pp. 297-301
- Saliba KJ, Horner HA und Kirk K. Transport and metabolism of the essential vitamin pantothenic acid in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* (1998) vol. 273 (17) pp. 10190-5
- Saliba KJ, Martin RE, Bröer A, Henry RI, McCarthy CS, Downie MJ, Allen RJ, Mullin KA, McFadden GI, Bröer S und Kirk K. Sodium-dependent uptake of inorganic phosphate by the intracellular malaria parasite. *Nature* (2006) vol. 443 (7111) pp. 582-5
- Sato K, Inaba M und Maede Y. Characterization of Na(+)-dependent L-

- glutamate transport in canine erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* (1994) vol. 1195 (2) pp. 211-7
- Sawyer ST und Penta K. Erythropoietin cell biology. *Hematol Oncol Clin North Am* (1994) vol. 8 (5) pp. 895-911
- Schniepp R, Kohler K, Ladewig T, Guenther E, Henke G, Palmada M, Boehmer C, Rothstein JD, Bröer S und Lang F. Retinal colocalization and in vitro interaction of the glutamate transporter EAAT3 and the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2004) vol. 45 (5) pp. 1442-9
- Shashidharan P, Kramer BC, Walker RH, Olanow CW und Brin MF. Immunohistochemical localization of the neuron-specific glutamate transporter EAAT3 (EAAT3) in rat brain and spinal cord revealed by a novel monoclonal antibody. *Brain Res* (1997) vol. 773 (1-2) pp. 139-48
- Sherman IW und Tanigoshi L. Alterations in sodium and potassium in red blood cells and plasma during the malaria infection (*Plasmodium lophurae*). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* (1971) vol. 40 (2) pp. 543-6
- Sherman IW. Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites. *Bull World Health Organ* (1977) vol. 55 (2-3) pp. 265-76
- Sherman IW. Metabolism and surface transport of parasitized erythrocytes in malaria. *Ciba Found Symp* (1983) vol. 94 pp. 206-21
- Shigeri Y, Seal RP und Shimamoto K. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* (2004) vol. 45 (3) pp. 250-65
- Sinai AP und Joiner KA. Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu Rev Microbiol* (1997) vol. 51 pp. 415-62
- Slater AF und Cerami A. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* (1992) vol. 355 (6356) pp. 167-9
- Slater AF, Swiggard WJ, Orton BR, Flitter WD, Goldberg DE, Cerami A und Henderson GB. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) vol. 88 (2) pp. 325-9
- Slomianny C. Three-dimensional reconstruction of the feeding process of the malaria parasite. *Blood Cells* (1990) vol. 16 (2-3) pp. 369-78
- Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, Pinches R, Newbold CI und Miller LH. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* (1995) vol. 82 (1) pp. 101-10
- Spielmann T. und Beck HP. Analysis of stage-specific transcription in *plasmodium falciparum* reveals a set of genes exclusively transcribed in ring stage parasites. *Mol Biochem Parasitol* (2000) vol. 111 (2) pp. 453-8
- Staines HM und Kirk K. Increased choline transport in erythrocytes from mice infected with the malaria parasite *Plasmodium vinckei vinckei*. *Biochem J* (1998) vol. 334 (Pt 3) pp. 525-30
- Staines HM, Alkhalil A, Allen RJ, De Jonge HR, Derbyshire E, Egée S, Ginsburg H, Hill DA, Huber SM, Kirk K, Lang F, Lisk G, Oteng E, Pillai AD, Rayavara K, Rouhani S, Saliba KJ, Shen C, Solomon T, Thomas SL, Verloo P und Desai SA. Electrophysiological studies of malaria parasite-infected erythrocytes: current status. *International Journal for Parasitology* (2007) vol. 37 (5) pp. 475-82
- Staines HM, Ellory JC und Chibale K. The new permeability pathways: targets and selective routes for the development of new antimalarial agents. *Comb Chem High Throughput Screen* (2005) vol. 8 (1) pp. 81-8
- Staines HM, Powell T, Ellory JC, Egée S, Lapaix F, Decherf G, Thomas SL, Duranton C, Lang F und Huber SM. Modulation of whole-cell currents in *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by holding potential

- and serum. *J Physiol (Lond)* (2003) vol. 552 (Pt 1) pp. 177-83
- Staines HM, Powell T, Thomas SL und Ellory JC. Plasmodium falciparum-induced channels. *Int J Parasitol* (2004) vol. 34 (6) pp. 665-73
- Staines HM, Rae C und Kirk K. Increased permeability of the malaria-infected erythrocyte to organic cations. *Biochim Biophys Acta* (2000) vol. 1463 (1) pp. 88-98
- Storck T, Schulte S, Hofmann K und Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) vol. 89 (22) pp. 10955-9
- Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R und Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* (2006) vol. 313 (5791) pp. 1287-90
- Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, Ravetch JA und Wellems TE. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell* (1995) vol. 82 (1) pp. 89-100
- Susarla BT, Seal RP, Zeleniaia O, Watson DJ, Wolfe JH, Amara SG und Robinson MB. Differential regulation of GLAST immunoreactivity and activity by protein kinase C: evidence for modification of amino and carboxyl termini. *J Neurochem* (2004) vol. 91 (5) pp. 1151-63
- Tanner MJ. The major integral proteins of the human red cell. *Baillieres Clin Haematol* (1993) vol. 6 (2) pp. 333-56
- Tanneur V, Duranton C, Brand VB, Sandu CD, Akkaya C, Kasinathan RS, Gachet C, Sluyter R, Barden JA, Wiley JS, Lang F und Huber SM. Purinoceptors are involved in the induction of an osmolyte permeability in malaria-infected and oxidized human erythrocytes. *FASEB J* (2006) vol. 20 (1) pp. 133-5
- Tonkin CJ, van Dooren GG, Spurck TP, Struck NS, Good RT, Handman E, Cowman AF und McFadden GI. Localization of organellar proteins in Plasmodium falciparum using a novel set of transfection vectors and a new immunofluorescence fixation method. *Mol Biochem Parasitol* (2004) vol. 137 (1) pp. 13-21
- Torp R, Danbolt NC, Babaie E, Bjørås M, Seeberg E, Storm-Mathisen J und Ottersen OP. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* (1994) vol. 6 (6) pp. 936-42
- Torres-Salazar D und Fahlke C. Neuronal glutamate transporters vary in substrate transport rate but not in unitary anion channel conductance. *J Biol Chem* (2007) vol. 282 (48) pp. 34719-26
- Tostenson DC und Hoffman JF. Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J Gen Physiol* (1960) vol. 44 pp. 169-94
- Towbin H, Staehelin T und Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) vol. 76 (9) pp. 4350-4
- Trager W und Jensen JB. Continuous culture of Plasmodium falciparum: its impact on malaria research. *Int J Parasitol* (1997) vol. 27 (9) pp. 989-1006
- Trager W. Cultivation of malaria parasites. *Methods Cell Biol* (1994) vol. 45 pp. 7-26
- Tunncliffe G. Amino acid transport by human erythrocyte membranes. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* (1994) vol. 108 (4) pp. 471-8
- Upston JM und Gero AM. Parasite-induced permeation of nucleosides in Plasmodium falciparum malaria. *Biochim Biophys Acta* (1995) vol. 1236 (2) pp. 249-58
- van de Sand C, Horstmann S, Schmidt A, Sturm A, Bolte S, Krueger A, Lütgehetmann M, Pollok JM, Libert C und Heussler VT. The liver stage of Plasmodium berghei inhibits host cell apoptosis. *Mol Microbiol* (2005) vol. 58 (3) pp. 731-42

5. Literatur

Vandenberg RJ, Huang S und Ryan RM. Slips, leaks and channels in glutamate transporters. *Channels (Austin)* (2008) vol. 2 (1) pp. 51-8

Vlachou D, Schlegelmilch T, Runn E, Mendes A und Kafatos FC. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Curr Opin Genet Dev* (2006) vol. 16 (4) pp. 384-91

Wagner MA, Andemariam B und Desai SA. A two-compartment model of osmotic lysis in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Biophys J* (2003) vol. 84 (1) pp. 116-23

Wiesner J, Reichenberg A, Heinrich S, Schlitzer M und Jomaa H. The plastid-like organelle of apicomplexan parasites as drug target. *Curr Pharm Des* (2008) vol. 14 (9) pp. 855-71

Yamada K, Watanabe M, Shibata T, Tanaka K, Wada K und Inoue Y. EAAT4 is a post-synaptic glutamate transporter at Purkinje cell

synapses. *Neuroreport* (1996) vol. 7 (12) pp. 2013-7

Yayon A, Cabantchik ZI und Ginsburg H. Identification of the acidic compartment of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. *EMBO J* (1984) vol. 3 (11) pp. 2695-700

Young JD, Jones SE und Ellory JC. Amino acid transport in human and in sheep erythrocytes. *Proc R Soc Lond, B, Biol Sci* (1980) vol. 209 (1176) pp. 355-75

Zipser Y, Piade A und Kosower NS. Erythrocyte thiol status regulates band 3 phosphotyrosine level via oxidation/reduction of band 3-associated phosphotyrosine phosphatase. *FEBS Lett* (1997) vol. 406 (1-2) pp. 126-30

VI. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können und die Freiheiten, die er mir bei der Bearbeitung der Fragestellung gegeben hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Uwe G. Maier bedanke ich mich für die bereitwillige Erstellung des Zweitgutachtens.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ralph Schwarz und Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer für ihre Bereitschaft, meiner Prüfungskommission anzugehören.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. Julius Nyalwidhe für die engagierte Einführung in die Welt der MALDI-TOF-Massenspektrometrie und seine nie endende Unterstützung. Asante Sana!

Ich danke Herrn Prof. Dr. Kieran Kirk von der Australian National University für seine Gastfreundschaft während meines kurzen Aufenthalts und für die Möglichkeit, als PostDoc in sein Labor zurückzukehren.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Omid Azimzadeh, ein Freund und guter Kollege in Höhen und Tiefen.

Sven Bietz und Irine Montilla danke ich für ihre Freundschaft und die Tatsache, dass man sich immer auf sie verlassen kann.

Bedanken möchte ich mich ganz besonders bei meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen: Dr. Stefan Charpian, Sandra Marx, Dr. Frank Seeber, Dr. Petra Burghaus, Dr. Nina Gehde, Simone Külzer, Trang Chu, Simone Spork, Lothar Kremp, Daniela Heussner, Kathrin Stelter, Elisabeth Schmitt-Nau, Silke Fröhlich, Galina Bauer und Dr. Jude Przyborski für die netten Jahre und die super Atmosphäre im Labor.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich immer in jeglicher Hinsicht unterstützt hat.

Ich danke Britta für die wunderschöne Zeit die wir zusammen verbringen, und dafür, dass sie immer für mich da ist.

VII. Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Markus Winterberg geb. Wallmeroth
Geburtsdatum: 21.04.1978
Geburtsort: Kirchen
Familienstand: verheiratet

Schulischer und universitärer Werdegang:

1988 bis 1993 Hauptschule Betzdorf

1993 bis 1995 Berufsbildende Schule Betzdorf - Kirchen

1995 bis 1999 Gymnasium Auf der Morgenröthe, Siegen

Okt. 2000 – Sept. 2005 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
Schwerpunkte in den Fächern Parasitologie, Zellbiologie und
Medizinische Mikrobiologie (Infektionsbiologie)

Diplomarbeit im Fach Parasitologie an der
Philipps-Universität Marburg

Thema der Diplom-Arbeit:
*„Plasmodium falciparum: Die Bildung der Novel Permeation
Pathways in der Plasmamembran infizierter Erythrozyten ist
abhängig von extrazellulär exponierten, Chymotrypsin-
sensitiven Parasitenproteinen“*

Abschlussnote: „sehr gut (1,0)“

Nov. 2005 – Mai 2009 Anfertigung der Doktorarbeit am Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg in der AG Parasitologie
betreut durch Prof. Dr. Lingelbach