



Philipps



Universität  
Marburg

**Proteintranslokation über die Membran der parasitophoren  
Vakuole im *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten**

DISSERTATION

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

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Stefan Charpian  
aus Stade

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
am 09.05.2008 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Zweitgutachter: Prof. Dr. Uwe G. Maier

Tag der mündlichen Prüfung am: 16.05.2008

Während dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

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

Charpian S, Przyborski JM. Protein transport across the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*: into the great wide open. *Traffic* 2008;9(2):157-165.

# I Inhaltsverzeichnis

<b>II Abkürzungen</b> .....	4
<b>III Abbildungen</b> .....	5
<b>IV Zusammenfassung</b> .....	7
<b>1 Einleitung</b> .....	8
1.1 Der Entwicklungszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	8
1.1.1 Die geschlechtliche Vermehrung innerhalb des <i>Anopheles</i> - Vektors.....	8
1.1.2 Die ungeschlechtliche Vermehrung innerhalb des humanen Wirtes.....	10
1.2 Parasiteninduzierte Modifikationen des Erythrozyten.....	13
1.2.1 Der Erythrozyt.....	14
1.2.2 Initiale Modifikation der Wirtszelle während der Invasion.....	15
1.2.3 Das Ring-Stadium.....	17
1.2.4 Das Trophozoiten-Stadium .....	19
1.3 Der Export von Proteinen des Parasiten in seine Wirtszelle .....	21
1.3.1 Der sekretorische Weg im Parasiten .....	23
1.3.2 Export in die parasitophore Vakuole.....	24
1.3.3 Der Weg in die Wirtszelle .....	26
1.4 Der Transport von Proteinen über biologische Membranen .....	29
1.4.1 Ein generalisiertes Modell für die Translokation von Proteinen über biologische Membranen .....	30
1.5 Transportstudien an <i>Plasmodium falciparum</i> .....	33
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	36
<b>2 Material und Methoden</b> .....	37
2.1 Material.....	37
2.1.1 Geräte .....	37
2.1.2 Verwendete Reagenzien .....	37
2.1.3 Verwendete Antikörper .....	39
2.1.4 Sonstiges .....	40
2.1.5 Verwendete Lösungen, Puffer und Medien .....	41
2.2 Methoden .....	43
2.2.1 Kultivierung und Anreicherung von <i>Plasmodium falciparum</i> -infizierten Erythrozyten .....	43
2.2.2 Die Permeabilisierung von Trophozoiten-infizierten Erythrozyten mit Streptolysin O .....	45
2.2.3 Behandlung von iRBC mit Brefeldin A (BFA) oder Cycloheximid (CHX).....	46
2.2.4 Der Translokationsassay .....	47

2.2.5 Trypsin-Behandlung von SLO-permeabilisierten iRBC .....	50
2.2.6 Präparation einer "Ghost"-Fraktion durch Lyse von iRBC .....	51
2.2.7 Immunpräzipitation von Proteinen mittels spezifischer Antikörper .....	52
2.2.8 Analyse von Protein-Fractionen mittels SDS-PAGE .....	53
2.2.9 Vorbereitung von SDS-Gelen für die Autoradiographie .....	53
2.2.10 Immunoblotting .....	54
2.2.11 Analyse mit ImageJ .....	55
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>56</b>
3.1 Der Translokationsassay .....	56
3.1.1 Die Verteilung von GBP in Autoradiographie und Western-Blot nach Pulse-Chase Assay	57
3.1.2 Die Verteilung von GBP im Translokationsassay ist von der gewählten SLO-Konzentration und der Wasch-Stringenz abhängig .....	59
3.1.3 Die Verwendung von CHX ermöglicht die Analyse der Translokation über die PVM .....	62
3.1.4 Validierung der Auswertung des Assays durch WB-Quantifizierung.....	65
3.1.5 Fazit .....	67
3.2 Der Einfluss von Proteinen auf die Translokation von GBP über die PVM .....	68
3.2.1 Die Inkubation von SLO-permeabilisierten iRBC mit Trypsin inhibiert die Translokation über die PVM .....	68
3.2.2 Der proteolytische Abbau von Proteinen des RBCC inhibiert die Translokation über die PVM .....	71
3.2.3 Fazit .....	73
3.3 Der Einfluss von ATP auf die Translokation von GBP über die PVM .....	74
3.3.1 Die Depletion von ATP des RBCC führt zur Arretierung der Translokation .....	74
3.3.2 Die Translokation von GBP über die PVM ist von der Hydrolyse des vorhandenen ATP abhängig .....	76
3.3.4 Fazit .....	80
3.4 Der Einfluss von Hsp90 auf die Translokation von GBP über die PVM .....	80
3.4.1 Hsp90-spezifische Inhibitoren besitzen keinen negativen Einfluss auf die Translokation über die PVM .....	81
3.4.2 Fazit .....	84
3.5 Der Einfluss von HsHsp70 auf die Translokation von GBP über die PVM.....	85
3.5.1 HsHsp70 assoziiert mit der Membran der parasitophoren Vakuole im infizierten Erythrozyten.....	85
3.5.2 Die quantitative Reduktion des löslichen HsHsp70 aus dem Zytosol führt zu keiner Inhibition der Translokation von GBP über die PVM .....	90
3.5.3 Fazit .....	93

3.6 Der Einfluss von wirtsfremden Proteinen auf die GBP-Translokation .....	93
3.6.1 Die Depletion der IgG-Fraktion hat keinen negativen Einfluss auf die rekonstitutiven Eigenschaften eines Kaninchen-Antiserums .....	94
3.6.2 Fazit .....	99
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>100</b>
4.1 Die Etablierung eines in vitro Assays zur Analyse der Translokation von GBP über die PVM .....	101
4.2 Proteinfaktoren sind essentiell für eine Translokator-vermittelte PVM-Translokation	105
4.3 Die Energieabhängigkeit der Translokation von GBP über die PVM .....	106
4.4 Die Beteiligung von molekularen Chaperonen an der Translokation von Proteinen über die PVM.....	108
4.5 Die Rekonstitution der Translokation durch wirtsfremde Faktoren .....	111
4.6 Eine mechanistische Betrachtung des Translokator-vermittelten Transports von Proteinen über die PVM.....	113
4.6 Ausblick .....	116
<b>5 Literatur .....</b>	<b>118</b>

## II Abkürzungen

Abb.	Abbildung	PfEMP-1	<i>Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1</i>
Ak	Antikörper	PIC	Protease Inhibitor Cocktail
ALD	Aldolase	PPM	Parasiten Plasma Membrane
AP	Alkalische Phosphatase	PV	Parasitophore Vakuole
ATP	Adenosintriphosphat	PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
BFA	Brefeldin A	RBCM	<i>Red Blood Cell Membrane</i>
BiP	<i>Immunoglobulin Binding Protein</i>	RT	Raumtemperatur
bzw.	beziehungsweise	sek	Sekunde
ER	Endoplasmatisches Retikulum	SERP	<i>Serine Rich Protein</i>
EXP-1	<i>Exported Protein 1</i>	SLO	Streptolysin O
g	Erdbeschleunigung	SNT	<i>Supernatant</i>
GBP	Glykophorin bindendes Protein	Tab.	Tabelle
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>	TVN	Tubovesikuläres Netzwerk
h	Stunde	U	<i>Units</i>
HE	Hämolytische Einheit	Vol.	Volumen
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>	v/v	<i>volume/volume</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>	z. B.	zum Beispiel
iRBC	<i>infected Red Blood Cell</i>	w/v	<i>weight/volume</i>
iRBCM	<i>infected Red Blood Cell Membrane</i>		
KAHRP	<i>Knob Associated Histidine Rich Protein</i>		
kDa	Kilodalton		
MC	<i>Maurer's Clefts</i>		
Met	Methionin		
min	Minute		
MVB	<i>Multi Vesicular Bodies</i>		
µg	Mikrogramm		
µl	Mikroliter		
P	<i>Pellet</i>		

## III Abbildungen

- Abb. 1.1:** Schematische Darstellung der Migration von *Plasmodium* innerhalb der *Anopheles*-Mücke (nach Vlachou *et al.*, 2006)...**S. 9**
- Abb. 1.2:** Schematische Darstellung der erythrozytären Schizogonie von *Plasmodium falciparum* (nach Bannister und Mitchell, 2003)...**S. 12**
- Abb. 1.3:** Schematische Darstellung der Kompartimentierung eines mit *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten...**S. 22**
- Abb. 1.4:** Ein- bzw. Zwei-Schritt Modell (nach Lingelbach, 1997)...**S. 27**
- Abb. 1.5:** Allgemeines Modell zur Translokation von Proteinen über Membranen (nach Agarraberes und Dice, 2001)...**S. 31**
- Abb. 1.6:** Schematische Darstellung des Pulse-Chase Assays von Ansorge *et al.* (1996)...**S. 35**
- Abb. 2.1:** Schematische Darstellung des optimierten Translokationsassays...**S. 49**
- Abb. 3.1:** Vergleich der GBP-Verteilung nach Pulse-Chase Assay in WB und ARG nach Ansorge *et al.* (1996)...**S. 58**
- Abb. 3.2:** Einfluss der SLO-Konzentration und Wasch-Stringenz auf die GBP-Verteilung nach kaltem Chase im WB...**S. 61**
- Abb. 3.3:** Einfluss von BFA und CHX auf die Verteilung von GBP nach Chase in WB und ARG...**S. 63-64**
- Abb. 3.4:** Quantifizierung der GBP-Bandenintensitäten in Abhängigkeit zur Proteinmenge definierter Zelläquivalente...**S. 66**
- Abb. 3.5:** Einfluss der Trypsinierung von SLO-permeabilisierten iRBC auf die Translokationseffizienz von GBP...**S. 69-70**
- Abb. 3.6:** Einfluss der Trypsinierung von Proteinen des RBCC auf die Translokationseffizienz von GBP...**S. 71-72**
- Abb. 3.7:** Einfluss von Apyrase im RBCC auf die Translokationseffizienz von GBP...**S. 75**
- Abb. 3.8:** Einfluss von AMP-PNP im RBCC auf die Translokationseffizienz von GBP...**S. 77**
- Abb. 3.9:** Einfluss von ATP und AMP-PNP in Apyrase-behandeltem RBCC auf die Translokationseffizienz von GBP...**S. 79**

- Abb. 3.10:** Einfluss von Geldanamycin auf die Translokationseffizienz von GBP...**S. 82**
- Abb. 3.11:** Einfluss von Novobiocin auf die Translokationseffizienz von GBP...**S. 83**
- Abb. 3.12:** Lokalisation des humanen Hsp70 durch Ghost-Fraktionierung von iRBC...**S. 87**
- Abb. 3.13:** Einfluss der Trypsinierung von SLO-permeabilisierten iRBC die membranassoziierte Population von *HsHsp70*...**S. 88**
- Abb. 3.14:** Einfluss von ATP auf die Membranassoziation von *HsHsp70*...**S. 89-90**
- Abb. 3.15:** Einfluss von *HsHsp70* im RBCC auf die Translokationseffizienz von GBP...**S. 91-92**
- Abb. 3.16:** Einfluss von anti-GBP in RPMI auf die Translokationseffizienz von GBP...**S. 95**
- Abb. 3.17:** Einfluss von Albumin verschiedener Spezies auf die Translokationseffizienz von GBP...**S. 96**
- Abb. 3.18:** Einfluss von humanem Hämoglobin auf die Translokationseffizienz von GBP...**S. 98**

## IV Zusammenfassung

Der Parasit *Plasmodium falciparum* modifiziert während des erythrozytären Entwicklungszyklus seine Wirtszelle durch den Export von Proteinen, welches ihm unter anderem das Überleben innerhalb des Erythrozyten ermöglicht. Dabei müssen die Proteine das Kompartiment der parasitophoren Vakuole durchqueren, deren Membran den Parasiten von seiner Wirtszelle abgrenzt. Auch wenn der Transport von Proteinen über die Membran der parasitophoren Vakuole seit geraumer Zeit Gegenstand intensiver Untersuchungen ist, konnte bisher nur wenig bezüglich des Mechanismus aufgeklärt werden. Abgesehen von der Signalvermittlung durch HT/PEXEL ist nicht bekannt, wie die Proteine die Membran durchqueren können. Seit einiger Zeit existiert jedoch die Annahme, dass es sich dabei um eine Translokator-vermittelte Translokation handelt, welche innerhalb dieser Arbeit einer genaueren Untersuchung unterzogen wurde.

Dabei konnte ein auf Ansorge *et al.* (1996) basierender *in vitro* Assay optimiert werden, um die Translokation des Glykophorin-bindenden Proteins über die PVM zu studieren. Unter Verwendung des Assays konnte bewiesen werden, dass sowohl Trypsin-sensitive Proteine, die der Protease auf der zytosolischen Seite der PVM zugänglich sind, als auch lösliche Proteinkomponenten des Wirtes die Translokation über die PVM vermitteln. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse von ATP als Energiequelle für den Translokationsvorgang notwendig ist. Auch wenn die beteiligten Proteinkomponenten nicht genauer spezifiziert werden konnten, so ließen weitere Ergebnisse vermuten, dass es sich um einen bei apikomplexen Parasiten generellen Mechanismus handelt, der den Parasitismus unterschiedlicher Wirtszellen ermöglicht.

Die in dieser Arbeit untersuchten Aspekte des Exports von Proteinen des Parasiten in seine Wirtszelle unterstützen die Annahme der Existenz eines Protein-Translokators innerhalb der PVM und stellen darüber hinaus einen Assay bereit, der es ermöglicht, in weiterführenden Studien Teilaspekte des Translokationsmechanismus zuverlässig zu untersuchen.

# 1 Einleitung

Am 6. November im Jahre 1880 konnte der in Algerien stationierte französische Militärarzt Alphonse Laveran im Blutaussstrich eines an Malaria erkrankten Soldaten zum ersten Mal einen einzelligen Organismus nachweisen, den er als den parasitischen Erreger der bis dahin oft als „Sumpffieber“ bezeichneten Malaria tropica identifizierte. Laveran, der damals der Meinung war, es gäbe nur einen Erreger der Malaria, gab dem Parasiten den Namen *Oscillaria malariae*. Später, nach der Entdeckung zweier weiterer Malaria verursachender Parasiten, gab der amerikanische Arzt William Henry Welch 1897 aufgrund weiterer Untersuchungen dem von Laveran gefundenen Parasiten den Namen *Plasmodium falciparum*.

Mittlerweile sind über hundert Subspezies des Erregers bekannt, die bei Menschen und Tieren Malaria hervorrufen können. Bei den 4 humanpathogenen Erregern der Malaria handelt es sich um *Plasmodium falciparum* (Malaria tropica), *Plasmodium vivax* und *ovale* (Malaria tertiana) sowie *Plasmodium malariae* (Malaria quartana).

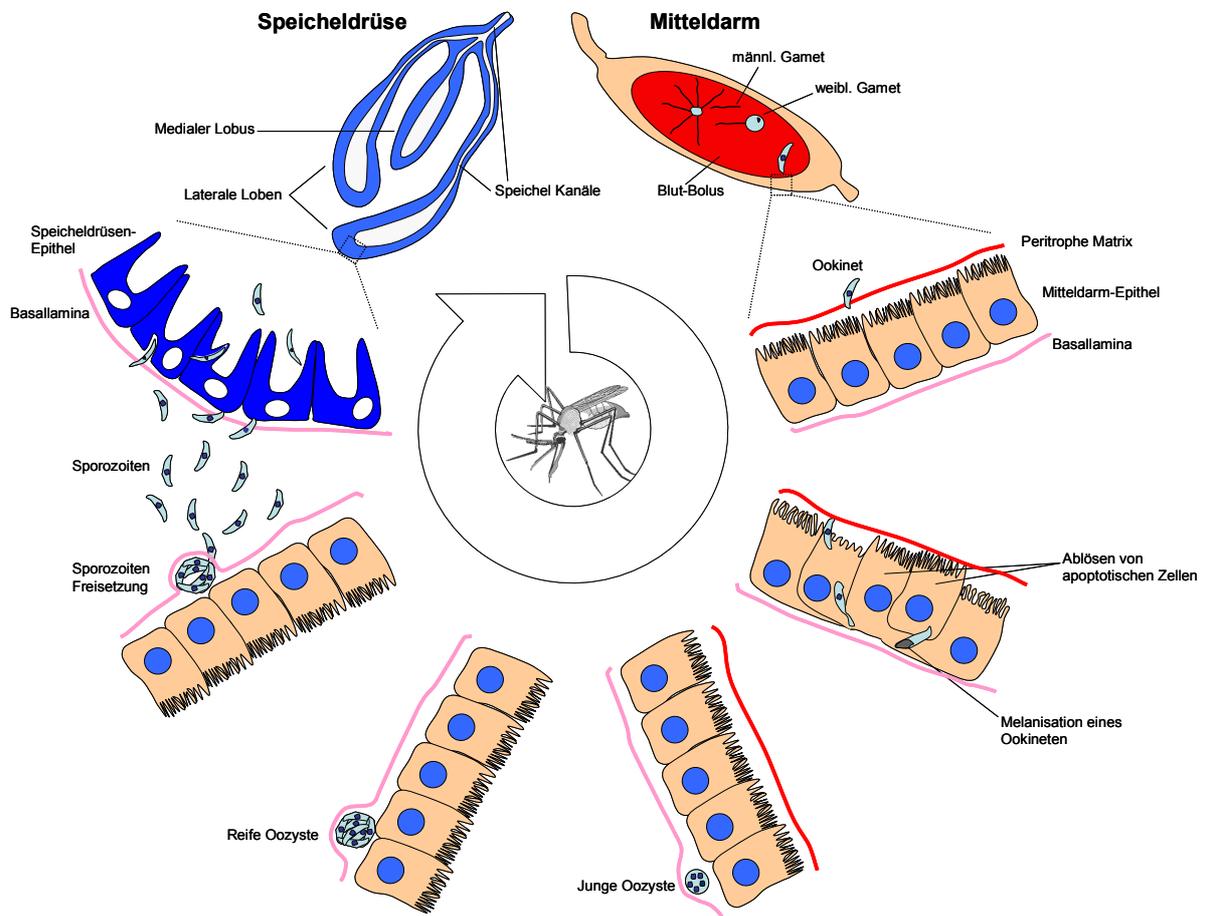
Eine anekdotische Besonderheit des damals zum ersten Male beschriebenen Erregers der Malaria tropica war die Tatsache, dass Laveran die Exflagellation eines männlichen Gametozyten beschrieb, ein Stadium, welches normalerweise im geschlechtlichen Entwicklungszyklus von *Plasmodium falciparum* im Mitteldarm einer weiblichen *Anopheles*-Mücke vorzufinden ist.

## 1.1 Der Entwicklungszyklus von *Plasmodium falciparum*

### 1.1.1 Die geschlechtliche Vermehrung innerhalb des *Anopheles*- Vektors

Der Stamm der Apicomplexa umfasst mit *Toxoplasma*, *Theileria*, *Babesia*, *Eimeria* und *Cryptosporidium* eine Vielzahl an Parasiten, denen eine große human- und veterinärmedizinische Bedeutung beigemessen wird. Diese Parasiten besitzen häufig einen sehr komplexen Lebenszyklus, wobei einige direkt zwischen ihren Vertebraten-Wirten übertragen werden können. Im Gegensatz dazu steht der Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*, bei dem die Übertragung auf einen menschlichen Wirt immer über die Blutmahlzeit des *Anopheles*-Vektors erfolgt (Cowman und Crabb, 2006). Dieser Zyklus lässt sich in einen geschlechtlichen und ungeschlechtlichen

Abschnitt unterteilen, wobei im folgenden Absatz zunächst die geschlechtliche Vermehrung beschrieben wird (siehe Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Migration von *Plasmodium* innerhalb der *Anopheles*-Mücke (nach Vlachou *et al.*, 2006).** Die nach einer Blutmahlzeit aufgenommenen Gametozyten differenzieren zu männlichen und weiblichen Gameten, welche fusionieren und die Zygote bilden. Noch innerhalb des Mitteldarms differenziert die Zygote zum mobilen Ookineten, welcher das Darm-Epithelium durchquert und sich an der basalen Seite des Epitheliums zur Oozyste weiterentwickelt. Hier reift die Oozyste heran und bildet innerhalb von ca. zwei Wochen mehrere Tausend Sporozoiteneisatz, die in das Hämocoel entlassen werden. Diese invadieren dann die Epithelzellen der Speicheldrüsen, erreichen anschließend den sekretorischen Raum der Drüsen und wandern in die Speichelkanäle, von wo aus sie während einer erneuten Blutmahlzeit in den Vertebraten-Wirt injiziert werden.

Die von der *Anopheles*-Mücke durch eine Blutmahlzeit aufgenommenen männlichen und weiblichen Gametozyten entwickeln sich innerhalb kürzester Zeit aufgrund veränderter äußerer Bedingungen wie eines pH-Wert Anstiegs und einer niedrigeren Umgebungstemperatur zu Gameten (Nijhout *et al.*, 1978; Sinden, 1983; Vlachou *et al.*, 2006). Bei den männlichen Gameten kommt es zur bereits erwähnten Exflagellation mit der einhergehenden Entstehung von acht motilen Gameten. Nach der Fusion von männlichen (Mikrogamet) mit den weiblichen Gameten (Makrogamet), die zur Bildung der Zygote führt, reift diese im Mitteldarm der Mücke

zu einem beweglichen Ookineten heran. Dieser penetriert ca. einen Tag nach der Blutmahlzeit das Epithel des Mitteldarms und entwickelt sich an der basalen Seite des Epithels zu einer sesshaften Oozyste. Im interzellulären Raum zwischen Basallamina und Epithel des Mitteldarms reift die Oozyste innerhalb von zwei Wochen heran, durchläuft mehrere Kernteilungen ohne anschließende Zytokinese und bildet dabei so genannte Sporoblasten. Am Ende der Oozysten-Reifung mit einhergehender Zytokinese und den daraus resultierenden Sporozoiten werden mehrere tausend Sporozoiten in die Hämolymphe der Stechmücke entlassen. Nach Erreichen der Speicheldrüsen adhären die Sporozoiten an die Basallamina, invadieren das Speicheldrüsenepithel und verlassen es in den Speicheldrüsengang, wo sie akkumulieren und bei einer erneuten Blutmahlzeit des Vektors in eine Blutkapillare oder in die Dermis des menschlichen Wirtes entlassen werden.

### 1.1.2 Die ungeschlechtliche Vermehrung innerhalb des humanen Wirtes

Der Abschnitt der ungeschlechtlichen Vermehrung im Lebenszyklus von Plasmodien unterteilt sich in ein Leberstadium, auch präerythrozytäre Schizogonie bezeichnet, und ein Blutstadium, welches sich durch wiederholenden Befall der Erythrozyten auszeichnet und bei Infektionen mit *Plasmodium falciparum* für den menschlichen Wirt unbehandelt häufig letal verläuft.

#### *Das Leberstadium*

Nach Erreichen eines Blutgefäßes gelangen die bei der Blutmahlzeit entlassenen Sporozoiten innerhalb weniger Minuten in die Leber des Menschen und erreichen dort nach Durchwanderung von Kupffer- oder Endothelzellen die Hepatozyten. Die Sporozoiten durchqueren mehrere Hepatozyten, bevor sie ihre Zielzelle invadieren (Mota *et al.*, 2001). Hier entwickeln und vermehren sich die Parasiten innerhalb einer parasitophoren Vakuole (PV) in einem Zeitraum von 10-14 Tagen zu tausenden Merozoiten pro invadiertem Sporozoiten. Während dieser Zeit schwillt die Wirtszelle über ihre Normalgröße hinaus an, was einen bedeutenden Stressfaktor für den Hepatozyten darstellt, der unter normalen Umständen die Apoptose des Hepatozyten nach sich ziehen würde. Da bei anderen parasitischen Erregern wie z.B. *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* und auch *Theileria* bekannt ist, dass sie den Wirtszellen Resistenz gegenüber Apoptose verleihen (Goebel *et al.*, 1998; Nakajima-Shimada *et*

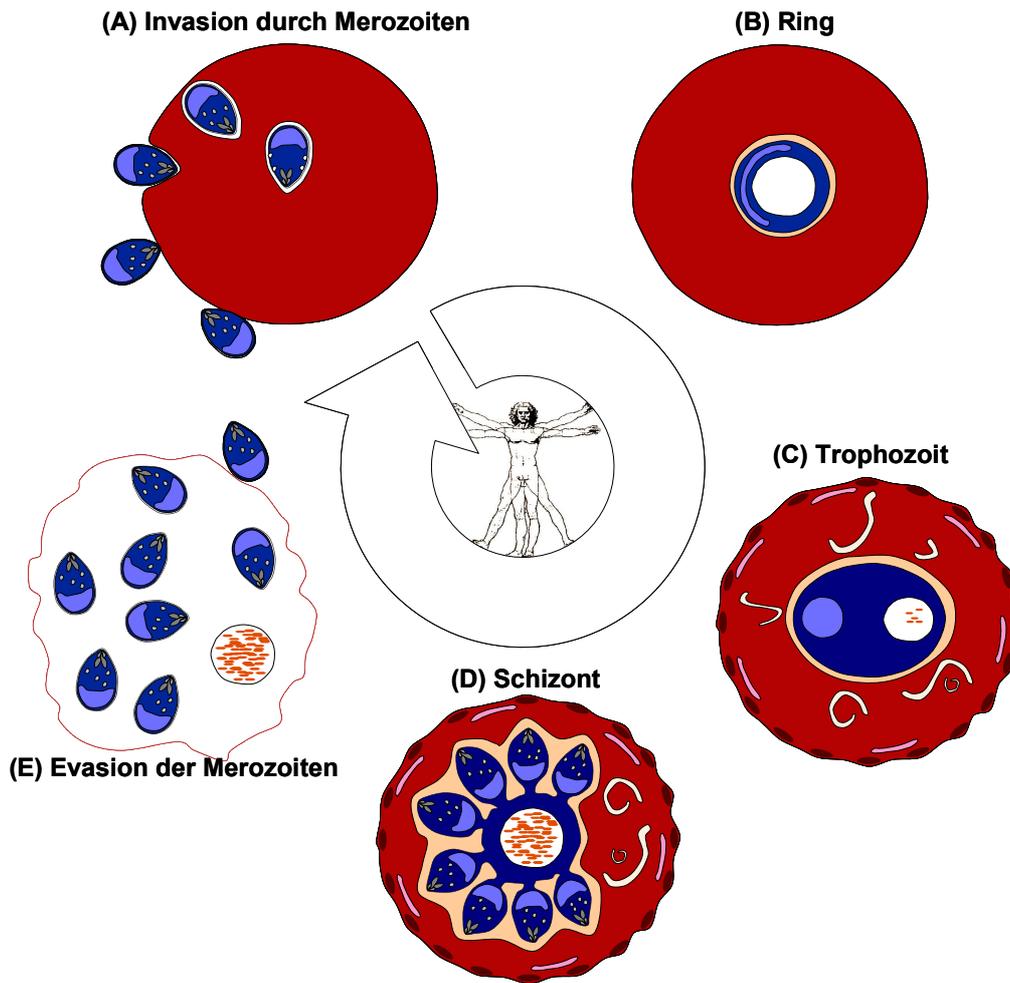
*al.*, 2000; Heussler *et al.*, 2001; Heussler *et al.*, 2002), ist es möglich, dass auch *Plasmodium* die Apoptose seiner Wirtszelle zu inhibieren vermag. Auch wenn ein möglicher Mechanismus bis zum heutigen Zeitpunkt nicht bekannt ist, so konnten van de Sand und Kollegen zeigen, dass *Plasmodium berghei* direkt in die Apoptose-Signalvermittlung der Wirtszelle eingreift (van de Sand *et al.*, 2005).

Das Leberstadium endet mit dem Entlassen der Merozoiten in den Blutstrom. Ursprünglich wurde angenommen, dass die Merozoiten durch Ruptur der Plasmamembran der Wirtszelle in den Blutstrom gelangen, jedoch konnte durch die Arbeitsgruppe um Volker Heussler gezeigt werden, dass bei einer Infektion von Hepatozyten mit *Plasmodium berghei* nach Ruptur der Membran der parasitophoren Vakuole (PVM) innerhalb des Hepatozyten die Merozoiten durch Abschnürungen der Plasmamembran, so genannten Merosomen, in die Lebersinusoide entlassen werden (Sturm *et al.*, 2006). Dieser Umstand führt dazu, dass die Merozoiten von Membranen mit Wirtszell-Ursprung umgeben sind und dadurch nicht von Kupffer- oder Dendritischen Zellen als fremd erkannt werden können. Die Existenz solcher Strukturen ist allerdings für die Infektion mit *Plasmodium falciparum* noch nicht nachgewiesen. Nach der Ruptur der Merosomenmembran gelangen die Merozoiten in den Blutstrom, wodurch das Blutstadium durch Invasion der Erythrozyten initiiert wird.

### *Das Blutstadium*

Bei der Invasion reifer Erythrozyten adhäriert ein Merozoit nach initialem Kontakt mit dem Erythrozyten an die Plasmamembran der roten Blutzelle (siehe Abb. 1.2). Anschließend orientiert sich der Merozoit mit seinem apikalen Ende vertikal zur Plasmamembran der Wirtszelle und dringt unter Ausbildung einer so genannten parasitophoren Vakuole in die Zelle ein. Nach Abschluss des Invasionsprozesses ist der Parasit vollständig von der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) innerhalb seiner Wirtszelle umgeben.

Im ca. 30 min. später beginnenden Ringstadium ist der Parasit metabolisch nur wenig aktiv, beginnt aber bereits mit dem Export einiger weniger Proteine in seine Wirtszelle (Das, 1994; Spielmann und Beck, 2000). Auch Membranstrukturen wie die Maurer'schen Spalten (MC = Maurer's Clefts) beginnen sich innerhalb des Erythrozyten auszubilden, wobei diese ihrer Definition gemäß erst im Trophozoiten-Stadium durch eine Giemsa-Färbung sichtbar werden (Haeggström *et al.*, 2007).



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der erythrozytären Schizogonie von *Plasmodium falciparum* (nach Bannister und Mitchell, 2003).** (A) Ein Merozoit adhärirt an der Erythrozytenmembran und dringt mithilfe seines Apikalkomplexes unter Ausbildung einer parasitophoren Vakuole aktiv in die Wirtszelle ein. (B) Das Wachstum des Parasiten geht mit dem Beginn der Aufnahme des Erythrozytenzytosols einher. Zusätzlich beginnt der Parasit mit dem Export verschiedener Proteine zur Oberfläche seiner Wirtszelle. (C) Das intensive Wachstum geht mit der Ablagerung von Hämozoin in der Nahrungsvakuole einher. Der Export von zahlreichen Proteinen führt unter anderem zur Bildung von Knob-Strukturen an der Wirtszelloberfläche. Darüber hinaus werden die Maurer'schen Spalten sichtbar, Membranstrukturen unterhalb der Wirtszellmembran, die möglicherweise am Transport von Proteinen zur Erythrozytenoberfläche beteiligt sind. (D) Im Stadium des Schizonten werden durch Kernteilung und Knospung die Merozoiten in der Peripherie des infizierten Erythrozyten sichtbar. (E) Nach Deintegration der Membran der parasitophoren Vakuole und der Wirtszelle werden die Merozoiten in den Blutstrom entlassen und können so neue Erythrozyten invadieren.

Nach ca. 20-24 h und dem Erreichen des Trophozoiten-Stadiums wird die Wirtszelle durch die Ausbildung neuer Membranstrukturen wie dem Tubovesikulären Netzwerk (TVN) und den Maurer'schen Spalten und den Export von Proteinen in das Zytosol und die Plasmamembran in erheblichem Maße umstrukturiert, wozu auch die Ausbildung der „Knob“-Strukturen gehört, welche das Erscheinungsbild der infizierten Zelle maßgeblich prägen und die Eigenschaft, an Zellen des Gefäßendothels zu binden, vermitteln. Für den Export in die Wirtszelle müssen die Proteine neben der

Plasmamembran des Parasiten auch die Schnittstelle zwischen Erreger und Wirtszelle, die Membran der parasitophoren Vakuole, überqueren, um zu ihren Bestimmungsorten zu gelangen. Der Translokationsvorgang über die PVM, über den bisher nur sehr wenig bekannt ist, wird in einem später folgenden Punkt ausführlicher besprochen.

Circa 36-38 h nach der Invasion erreicht der Parasit das Stadium des Schizonten, in welchem durch mehrere Kernteilungen mit später folgender Zytokinese 8-16 Merozoiten entstehen, die schließlich durch Ruptur der Wirtszelle in den Blutstrom entlassen werden. Für die Evasion der Merozoiten aus der Wirtszelle wurden drei unterschiedliche Mechanismen postuliert, die von einer koordinierten Ruptur von PVM und RBCM (Dvorak *et al.*, 1975; Wickham *et al.*, 2003) über eine vorhergehende Fusion von PVM mit RBCM (Winograd *et al.*, 1999; Sherman *et al.*, 2004) bis hin zu einem gebündelten Freiwerden von Merozoiten gehen, die von der PVM umgeben sind, welche erst nach Verlassen des Erythrozyten desintegriert (Salmon *et al.*, 2001). Neuere Fluoreszenzstudien von Glushakowa *et al.* konnten zeigen, dass wahrscheinlich ein rapider Anstieg des intrazellulären Druckes, einhergehend mit biochemischen Veränderungen des zellulären Milieus, welche die Stabilität des Zytoskeletts der Wirtszelle beeinträchtigen, zu einer explosionsartigen Ruptur der Membranen führt (Glushakowa *et al.*, 2005). Die frei werdenden Merozoiten werden in das extrazelluläre Milieu entlassen und können so weitere Erythrozyten befallen.

Durch einen noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus begünstigt eine erhöhte Parasitämie innerhalb des Wirtes und die damit verbundene Zunahme an Stressfaktoren für den Parasiten eine Differenzierung des Erregers zu Geschlechtszellen, die sich, von einer *Anopheles*-Mücke während einer Blutmahlzeit aufgenommen, in dem Vektor vermehren können, wodurch der Kreislauf abgeschlossen wird und neu beginnen kann (Nacher *et al.*, 2002).

## 1.2 Parasiteninduzierte Modifikationen des Erythrozyten

Eine Voraussetzung für das erfolgreiche Überleben und die Vermehrung innerhalb seiner Wirtszelle ist die Anpassung des Erythrozyten an die Bedürfnisse des Parasiten, wobei dieser Umstand weitgehender Modifikationen des Erythrozyten bedarf, die unter anderem durch den Export von Proteinen des Parasiten ermöglicht

werden. Die Tatsache, dass der Erreger nach der Invasion innerhalb der Zelle durch das Kompartiment der parasitophoren Vakuole noch von einer zusätzlichen Membran umgeben ist, legt die Vermutung nahe, dass die daran beteiligten Mechanismen sehr komplexer Natur sind. Für ein besseres Verständnis der besonderen Situation, mit der der Parasit durch die Invasion einer dermaßen spezialisierten Zelle wie dem Erythrozyten konfrontiert wird, ist es unerlässlich, die Entwicklung und Differenzierung der Wirtszelle genauer zu betrachten, bevor auf die einzelnen Stadien der erythrozytären Schizogonie und die Modifikationen der Wirtszelle eingegangen wird, die mit der Entwicklung des Parasiten einhergehen.

### 1.2.1 Der Erythrozyt

Die Wirtszelle des Parasiten *Plasmodium falciparum* im Blutstrom des Menschen, der reife Erythrozyt oder Normozyt, entsteht durch die Differenzierung und Vermehrung einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle, durch die so genannte Erythropoese (Haig, 1992). Dabei werden innerhalb von ca. sieben Tagen die Stadien des Erythroblasten und des Retikulozyten durchlaufen, welche innerhalb des roten Knochenmarks heranreifen.

Das Ende des Erythroblasten-Stadiums zeichnet sich durch die so genannte E nukleation aus, bei welcher die Zelle innerhalb eines Zeitraumes von ca. 10 Minuten den Zellkern vom Zytoplasma abschnürt und in das extrazelluläre Milieu entlässt. Durch diesen Vorgang entledigt sich die Zelle auch einiger weniger Mitochondrien, wobei die Mehrzahl erst in einem späteren Reifestadium abgebaut wird (Simpson und Kling, 1967).

Ist die Entwicklung der Vorläuferzellen bis zum Stadium des Retikulozyten vorangeschritten, so werden die übrigen Organellen durch Autophagie zerstört. Dabei umschließt die so genannte Phagophore, eine Membranstruktur, deren Ursprung wahrscheinlich in einer spezialisierten Region des endoplasmatischen Retikulums zu finden ist, Areale des Zytoplasmas und ganze Organellen. Dadurch entstehen als Autophagosomen bezeichnete Vakuolen, die von zwei Membranen umgeben sind. Die äußere Membran des Autophagosoms fusioniert anschließend mit dem Lysosom und bildet dadurch ein Autophagolysosom, in welchem durch die hinzugekommenen lysosomalen Enzyme der Abbau von internalisierten Proteinen und Organellen stattfindet (Mizushima *et al.*, 2001; Fader und Colombo, 2006).

Auch Proteine der Plasmamembran, die im reifen Erythrozyten keine funktionelle Bedeutung mehr haben, werden internalisiert und abgebaut. Dabei gelangen diese durch Endozytose über das frühe Endosom in multivesikuläre Strukturen (Multi Vesicular Bodies – MVB), wo intralumenale Vesikel, auch Exosomen genannt, akkumulieren und durch Fusion der MVBs mit der Plasmamembran des Retikulozyten die Exosomen mit den enthaltenen Membranproteinen in das extrazelluläre Milieu abgeben (Johnstone *et al.*, 1991).

Am Ende seiner Reifung gelangt der Retikulozyt aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf und differenziert dort zum Erythrozyten aus, um die Aufgabe des Gasaustausches innerhalb der Gewebe zu übernehmen. Die Zelle ist dann nicht mehr zur Protein- oder Lipidbiosynthese befähigt, erzeugt Energielieferanten wie ATP hauptsächlich über Glykolyse und hat Kompartimente wie ER und Golgi-Apparat abgebaut - eine Zelle ohne die für einen gerichteten Proteintransport notwendige Infrastruktur.

### 1.2.2 Initiale Modifikation der Wirtszelle während der Invasion

Die Invasion eines Erythrozyten verläuft in drei Schritten, (i) Erkennung der Wirtszelle mit der anschließenden apikalen Reorientierung, (ii) Ausbildung einer irreversiblen engen Bindung des Merozoiten an die Plasmamembran der Zielzelle und (iii) Eintritt in den Erythrozyten. Dieser Prozess zeichnet sich durch einen schnellen Verlauf innerhalb von 60 Sekunden aus. Dem liegt wohl zugrunde, dass die extrazelluläre Form des Parasiten aufgrund der Oberflächenantigene ein Ziel für die Immunantwort des Wirtes darstellt (Cowman und Crabb, 2006).

Die primäre Erkennung der Wirtszelle ist von geringer Affinität und reversibel (Bannister und Dluzewski, 1990). Das GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-verankerte Oberflächenprotein MSP-1 scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen (Goel *et al.*, 2003), obwohl ein definitiver Beweis noch fehlt. Einen wahrscheinlichen Rezeptor stellt Bande 3 auf Seiten des Erythrozyten dar (Goel *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). Auch peripher assoziierte Proteine scheinen eine Rolle beim ersten Kontakt mit der Wirtszelle zu spielen. So geht man davon aus, dass Proteine der MSP-7 Familie, SERA (Serin Rich Antigen) Proteasen, ABRA (Acid Basic Repeat Antigen) und Pf41 im Stadium des Schizonten in die parasitophore Vakuole sezerniert werden und dort mit den Oberflächenantigenen assoziieren (Pachebat *et al.*, 2001; Sanders

*et al.*, 2005). Inwiefern diese assoziierten Proteine die Erkennung des Erythrozyten vermitteln, ist allerdings noch unbekannt.

Nach der primären Adhäsion des Merozoiten an die Ziel-Plasmamembran kommt es zur Reorientierung des Parasiten mit seinem apikalen Ende senkrecht zur Oberfläche der Wirtszelle. Daran schließt sich die Ausbildung einer wesentlich engeren und stabileren Bindung unter Beteiligung von Proteinen der Rhoptrien und Micronemen an, die für den Eintritt in die rote Blutzelle essentiell ist und neben weiteren Proteinen sehr wahrscheinlich von Proteinen der Duffy binding-like (DBL) Proteinfamilie (Miller *et al.*, 2002) aus den Micronemen und den Reticulocyte Binding Protein Homologues (PfRh oder PfRBL) aus den Rhoptrien vermittelt wird (Rayner *et al.*, 2001; Duraisingh *et al.*, 2003; Stubbs *et al.*, 2005; Triglia *et al.*, 2005). Auch wenn viele Rezeptoren auf Seiten des Erythrozyten noch nicht bekannt sind, so bindet das DBL-Protein EBA-175 an Glycophorin A (Orlandi *et al.*, 1992) und EBA-140 an Glycophorin C (Maier *et al.*, 2003). Serinproteasen des Merozoiten spalten dann Bande 3 proteolytisch und sorgen so für eine lokale Abtrennung vom Zytoskelett, wodurch der Eintritt des Parasiten ermöglicht wird (Roggwiller *et al.*, 1996). Vom apikalen Ende wandert dann die durch die Adhäsine gebildete Kontaktstelle entlang des Merozoiten, vermutlich durch einen Aktin-Myosin Motor vermittelt, welcher dem, der für die sogenannte „gliding motility“ von Plasmodium ssp. Sporozoiten bzw. den Tachyzoiten von Toxoplasma gondii verantwortlich ist, ähnelt (Baum *et al.*, 2005; Baum *et al.*, 2006). Dabei wird durch Proteasen, an denen auch SUB2 aus den Micronemen beteiligt ist, der Oberflächenmantel des Merozoiten entfernt (Harris *et al.*, 2005). Während der aktiven Invasion des Erythrozyten bildet sich die den Merozoiten umgebende parasitophore Vakuole aus, wahrscheinlich unter Beteiligung von Proteinen der Rhoptrien, wobei der genaue Mechanismus nicht bekannt ist. Nach vollständigem Eintritt des Parasiten in die Wirtszelle wird die Kontaktstelle zwischen Parasit und roter Blutzelle aufgelöst, die Membranen der PVM und RBCM (Red Blood Cell Membrane) fusionieren und trennen sich anschließend. Schließlich wird der Inhalt der Dichten Granula ausgeschüttet, deren Proteine wahrscheinlich an weiteren initialen Modifikation des Erythrozyten beteiligt sind (Torii *et al.*, 1989; Culvenor *et al.*, 1991). Die so entstandene parasitophore Vakuole trennt als neues Kompartiment den Parasiten innerhalb der Wirtszelle vom umgebenden Wirtszellzytoplasma ab. Der Ursprung der Membran der parasitophoren Vakuole ist noch nicht hinreichend geklärt. Zuerst wurde

angenommen, dass sowohl Proteine (McLaren *et al.*, 1977; Atkinson *et al.*, 1987; Dluzewski *et al.*, 1989) als auch Lipide (Dluzewski *et al.*, 1992) der Wirtszelle von der PVM ausgeschlossen werden und die PVM von Proteinen und Lipiden der Rhoptrien gebildet wird (Bannister und Dluzewski, 1990; Joiner, 1991; Dluzewski *et al.*, 1992). Allerdings konnten Studien von Ward und Pouvelle zeigen, dass ein großer Anteil der Lipide der PVM sehr wohl erythrozytären Ursprungs sind (Ward *et al.*, 1993; Pouvelle *et al.*, 1994). Darüber hinaus gelang Murphy *et al.* der Nachweis von Proteinen wie Aquaporin-1 der Wirtszellmembran innerhalb der PVM (Murphy *et al.*, 2004). Die parasitophore Vakuole ist als Schnittstelle zwischen Erreger und Wirt von entscheidender Bedeutung als Barriere für die Nährstoffaufnahme aus dem Wirtszellzytosol und dem umgebenden Medium einerseits und andererseits für den Export von Proteinen des Parasiten in den Erythrozyten.

### 1.2.3 Das Ring-Stadium

Das Ringstadium umfasst mit einer Entwicklungsdauer von ca. 20 h beinahe die Hälfte des erythrozytären Zyklus. Nach der Invasion des Erythrozyten durch einen Merozoiten dehnt sich dieser scheibenförmig innerhalb der Wirtszelle aus. In einem Giemsa-gefärbten Blutausschlag stellt sich die Zellperipherie dabei dicker und der zentrale Bereich dünner dar, wodurch die Morphologie des Parasiten ringförmig erscheint. In der Peripherie befinden sich die meisten Organellen wie Nukleus, Mitochondrium, Plastide und Kompartimente wie ER und eine einzelne Golgi-Zisterne, die erst im Trophozoiten-Stadium an Komplexität gewinnt. Auch wenn der Parasit im Ring-Stadium eine geringe metabolische Aktivität und kaum Veränderungen in Größe und Morphologie zeigt (Zolg *et al.*, 1984; de Rojas und Wassermann, 1985), so beginnt dieser mit der Nährstoffaufnahme und ersten Wirtszell-Modifikationen. Zur Bereitstellung der für das Wachstum notwendigen Nährstoffe nimmt der Parasit über sein Zytostom das hauptsächlich Hämoglobin enthaltende Wirtszytosol auf. Dabei umschließen Invaginationen der Parasitenplasmamembran und der ihr aufliegenden PVM große Mengen an Wirtszytosol und schnüren sich als Doppelmembran-Endosom ab (Aikawa *et al.*, 1966; Yayon *et al.*, 1984; Slomianny, 1990), welches anschließend wiederum mit der Nahrungsvakuole des Parasiten fusioniert. Durch den Abbau des Hämoglobins innerhalb seiner Nahrungsvakuole erschließt sich dem Parasiten eine wichtige

Aminosäurequelle (Kamchongwongpaisan, 1997; Kolakovich, 1997), wobei Isoleucin dadurch nicht gewonnen werden kann. Das dabei anfallende toxische Abfallprodukt Häm wird in polymerisierter Form als kristallines Hämozoin in der Nahrungsvakuole gelagert (Slater *et al.*, 1991, 1992). Eine zusätzliche Nährstoffquelle stellt das umgebende Plasma dar, aus dem der Parasit zusätzliche Aminosäuren wie Glutamin, Glutamat, Methionin, Prolin und Tyrosin bezieht. Neben diesen Aminosäuren erschließt sich der Parasit eine Kohlenstoffquelle durch den Import von Glukose oder Fruktose. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da der Parasit über wichtige biosynthetische Stoffwechselwege, wie dem Zitronensäurezyklus, nicht verfügt (Roth, 1990) und so in erster Linie auf die Glykolyse angewiesen ist, um seinen Bedarf an ATP und Pyruvat zu decken. Die Mechanismen, welche dem Import von organischen Kationen, Zuckermolekülen und Aminosäuren zu Grunde liegen, sind nicht genau bekannt, doch weiß man, dass im mittleren Ringstadium, 8-12 Stunden nach der Invasion, infizierte Zellen eine erhöhte Permeabilität für derartige Moleküle aufweisen (Ginsburg *et al.*, 1985; Kirk *et al.*, 1994; Staines *et al.*, 2000). Man spricht bei diesem Parasiten-induzierten Phänomen auch von den so genannten „Novel Permeation Pathways“ oder NPP, da diese Permeabilität in nicht-infizierten Erythrozyten nicht messbar ist (Kirk *et al.*, 1999; Baumeister *et al.*, 2003, 2006). Auch wenn es mehrere Modellvorstellungen gibt, so gilt es doch am wahrscheinlichsten, dass es sich bei den NPP um einen sequentiellen Transportweg handelt, der sich in zwei Schritte unterteilt (Kirk, 2001). Im ersten Schritt gelangen die essentiellen Nährstoffe über bisher unbekannte Transporter der Plasmamembran der Wirtszelle in das erythrozytäre Zytosol (Baumeister *et al.*, 2003), von dort aus erreichen sie im zweiten Schritt durch die Passage einer nicht-selektiven Pore innerhalb der PVM die Plasmamembran des Parasiten (Desai und Rosenberg, 1997; Desai, 1999; Nyalwidhe *et al.*, 2002). Der Ursprung der Transporter ist Gegenstand intensiver Diskussionen, doch konnten Studien, bei denen intakte infizierte Erythrozyten mit verschiedenen Proteasen behandelt wurden, zeigen, dass aufgrund einer Wiederkehr der zuvor reduzierten Permeabilität mit großer Wahrscheinlichkeit Proteine des Parasiten daran beteiligt sind (Baumeister *et al.*, 2006).

Während des Ring-Stadiums beginnt der Parasit auch mit der Umstrukturierung seiner Wirtszelle durch die Synthese und den Export von Proteinen in das Zytosol und die Plasmamembran des Erythrozyten. Zu diesen gehören Mitglieder der REX-Familie (Ring Exported Protein) und SBP (Skeleton Binding Protein), welches mit

den sich bildenden Maurer'schen Spalten assoziiert ist (Blisnick *et al.*, 2000). Gleiches gilt für MAHRP-1 (Membrane Associated Histidine Rich Protein 1) (Spycher *et al.*, 2003) und die so genannten ETRAMPS (Early Transcribed Membrane Proteins), welche in der parasitophoren Vakuolenmembran lokalisiert sind (Spielmann *et al.*, 2003, 2006).

### 1.2.4 Das Trophozoiten-Stadium

Mit dem Erreichen der Entwicklungsstufe des Trophozoiten beginnt für den Parasiten die aktivste Phase seines Wachstums. So nimmt die Zahl der freien Ribosomen als Voraussetzung für eine gesteigerte Proteinbiosynthese um ein Vielfaches zu, während das Endoplasmatische Retikulum sich als Folge dessen vergrößert (Bannister *et al.*, 2000). Auch der zuvor geringe Ausmaße besitzende Golgi-Apparat nimmt eine komplexere Gestalt an, bestehend aus Ansammlungen tubulärer Membranstrukturen und Vesikel (Van Wye *et al.*, 1996; Haldar, 1998; Lingelbach und Joiner, 1998; Mattei *et al.*, 1999). Der Anstieg der Proteinsynthese und der sich anschließende Export neu gebildeter Proteine in die Wirtszelle geht auch mit weitreichenden Veränderungen innerhalb des Zytoplasmas des Erythrozyten einher. So beschreiben Lipid-Fluoreszenzassays weit in das Zytosol bis zur Plasmamembran der Wirtszelle reichende Extensionen der Membran der parasitophoren Vakuole (Elmendorf und Haldar, 1993; Behari und Haldar, 1994; Elmendorf und Haldar, 1994), die in ihrem Erscheinungsbild sehr vielfältig sind und sich als tubus-, schleifen- oder wirbelartige Membranstrukturen manifestieren (Atkinson und Aikawa, 1990; Elford *et al.*, 1995; Lauer *et al.*, 1997; Trelka *et al.*, 2000). Die Assoziation dieser Membranstrukturen mit vesikulären Elementen führte zur Bezeichnung „Tubovesikuläres Netzwerk“ (Haldar *et al.*, 2001). Dem TVN wird eine Bedeutung für den Parasiten bei der Aufnahme von niedermolekularen Nährstoffen aus dem extrazellulären Milieu zugeschrieben. Dabei wird davon ausgegangen, dass das TVN die Effizienz des Importes einiger essentieller Nährstoffe zum Parasiten gerade in der Phase des hohen Nährstoffbedarfs im Trophozoiten-Stadium erhöht (Lauer *et al.*, 1997; Haldar, 1998). Alternativ zu der Annahme, dass die PVM in einem Kontinuum mit dem TVN steht, besteht die Vermutung, dass es sich bei PV und TVN um voneinander getrennte Kompartimente innerhalb der Wirtszelle handelt. Experimente unter Benutzung von chimären GFP-

Proteinen konnten zeigen, dass die Lokalisation des sezernierten Proteins auf das Lumen der Vakuole beschränkt ist (Waller *et al.*, 2000; Wickham *et al.*, 2001). Würden PVM und TVN ein Kontinuum bilden, so müsste man annehmen, dass sich das chimäre Protein auch innerhalb des TVN verteilen würde, was nicht der Fall war. Eine weitere mit der Invasion von *Plasmodium falciparum* einhergehende Veränderung der Wirtszelle ist die Ausbildung von sogenannten Maurer'schen Spalten, innerhalb des Erythrozytenzytosols gelegene Membranstrukturen, die erstmalig von Georg Maurer 1902 in Giemsa gefärbten Ausstrichen von *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten ausführlich beschrieben wurden. Die Maurer'schen Spalten beginnen sich schon sehr früh in der Entwicklung von Plasmodium (4-8 hpi) auszubilden (Taraschi *et al.*, 2001; Haeggström *et al.*, 2007), werden allerdings erst im Trophozitenstadium durch Giemsa Färbung vollends sichtbar, was wohl in erster Linie am Zuwachs der Proteinkonzentration in den MCs liegt. Dreidimensionale Rekonstruktionsanalysen von elektronenmikroskopischen Daten zeigten in Struktur und Größe sehr heterologe Membranstrukturen (Wickert *et al.*, 2003; Wickert *et al.*, 2004; Lanzer *et al.*, 2006). So besteht die einfachste Form der MCs aus einer einzelnen scheibenförmigen Zisterne, welche sich in der Peripherie der infizierten Zelle nahe der Erythrozytenmembran befindet. Darüber hinaus gibt es kleine Stapel von parallel angeordneten Zisternen und ausgedehnte Membrannetzwerke, die von der PVM bis zur Plasmamembran der Wirtszelle reichen (Wickert und Krohne, 2007). Über den Ursprung der Maurer'schen Spalten ist bisher nur sehr wenig bekannt. Manche halten diese Membranstrukturen für eine Teilstruktur des Tubovesikulären Netzwerkes (Behari und Haldar, 1994; Elmendorf und Haldar, 1994; Wickert *et al.*, 2003), während es ebenfalls Hinweise dafür gibt, dass es sich um distinkte Kompartimente handelt, die sich wahrscheinlich von der PVM bzw. TVN Membran abschnüren (Spycher *et al.*, 2006). Ebenfalls konnten „photobleaching“-Experimente zeigen, dass kein Lipid-Kontinuum zwischen PVM und MCs besteht (Hanssen *et al.*, 2008). Auch die funktionellen Eigenschaften der MCs sind noch nicht eindeutig geklärt, allerdings geht man mittlerweile davon aus, dass sie eine entscheidende Rolle bei dem Proteintransport von Proteinen des Parasiten an die Oberfläche der Wirtszelle spielen. Es wird zwar der Export von diversen an Proteintransportvorgängen beteiligten Proteinen, wie den COPII-Vesikelproteinen Sar1p, Sec31p, Sec23p (Albano *et al.*, 1999; Adisa *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2001; Taraschi *et al.*, 2003; Wickert *et al.*, 2003) zu diesen Membranstrukturen mittlerweile

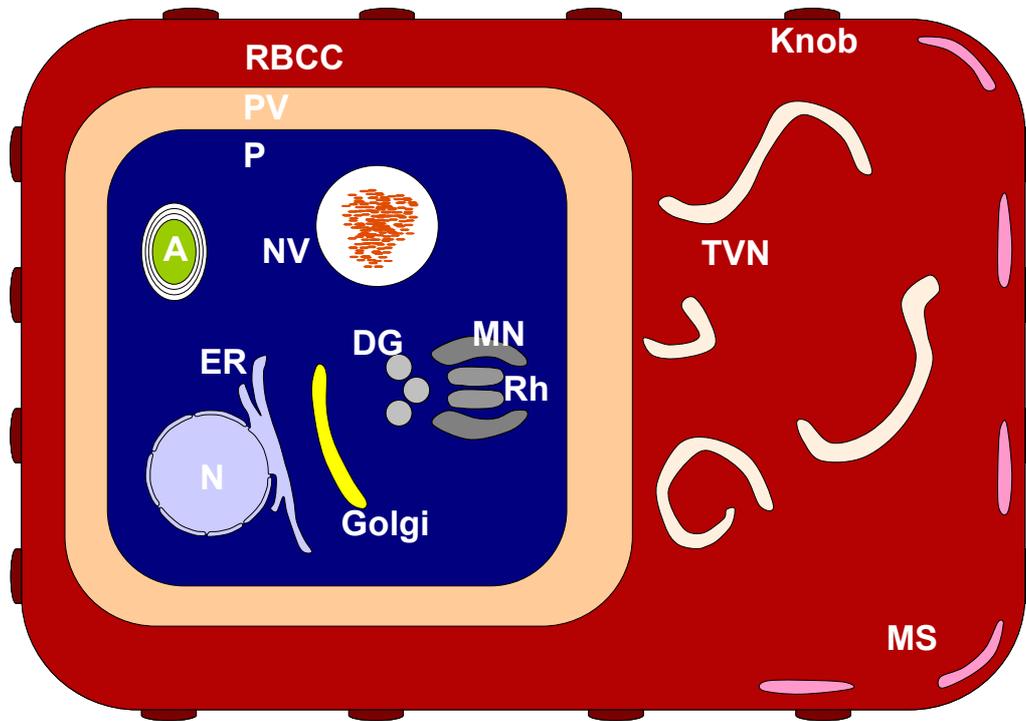
angezweifelt (Adisa *et al.*, 2007), doch scheinen in jedem Fall Proteine wie PfEMP1 über die Maurer'schen Spalten zur Wirtszelloberfläche zu gelangen (Kriek *et al.*, 2003; Knuepfer *et al.*, 2005).

Neben der Ausbildung neuer Membranstrukturen wie TVN und MCs innerhalb des Wirtszytosols kommt es auch zu einer sehr auffälligen Veränderung der Plasmamembran der Wirtszelle. So werden im Trophozoiten-Stadium so genannte „Knobs“ elektronenmikroskopisch sichtbar, elektronendichte Aggregate, die zu knopfartigen Erhebungen der Erythrozytenplasmamembran führen (Trager *et al.*, 1966). Die Knobs bestehen aus einer Reihe von Proteinen des Parasiten, die sich als hochmolekulare Komplexe in das Zytoskelett der Wirtszelle einlagern. Dazu gehören PfEMP-3 (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 3) (Pasloske *et al.*, 1993) und KAHRP (Knob Associated Histidin Rich Protein), welches ein essentieller Faktor bei der Ausbildung der Knobs ist (Crabb *et al.*, 1997). Ein weiteres Protein ist PfEMP-1, welches über elektrostatische Wechselwirkungen mit KAHRP assoziiert (Waller *et al.*, 1999; Voigt *et al.*, 2000) und an der Oberfläche der Erythrozytenplasmamembran exponiert wird. PfEMP-1 gehört zu einer Familie von Proteinen, die von ca. 50 variablen Genen, den so genannten var-Genen, codiert werden (Baruch *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995; Su *et al.*, 1995) und variiert in seiner molekularen Masse zwischen 200 und 350 kDa. Durch seine Eigenschaft, an endotheliale Rezeptoren wie ICAM-1 oder CD36 binden zu können, vermittelt es die Zytoadhärenz der infizierten Zellen und trägt so zur Pathogenese der Malaria bei (Cooke *et al.*, 2000).

### 1.3 Der Export von Proteinen des Parasiten in seine Wirtszelle

Die Grundvoraussetzung für viele der beschriebenen parasiteninduzierten strukturellen und funktionellen Modifikationen des Erythrozyten, die dem Erreger seine Vermehrung innerhalb der Wirtszelle ermöglichen, ist der gerichtete Transport von Effektormolekülen innerhalb des Parasiten und aus dem Parasiten in das Lumen der parasitophoren Vakuole und über die Grenzen der parasitophoren Vakuolenmembran hinaus in das Zytosol und die Plasmamembran der Wirtszelle (siehe Abb. 1.3). Da sich der Parasit keiner Transportmaschinerie seines Wirtes bemächtigen kann, weil diese im Laufe der Entwicklung und Differenzierung des Erythrozyten verloren gegangen ist, wird angenommen, dass dieser eine in Analogie

zu Transportvorgängen in kernhaltigen Zellen stehende Transportmaschinerie für einen gerichteten Transport von Proteinen bereitstellen muss. Dieser Umstand wirft natürlich die Frage auf, welche Mechanismen einem solchen gerichteten Proteintransport zu Grunde liegen könnten.



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Kompartimentierung eines mit *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten.** Neu-synthetisierte Proteine des Parasiten werden im Laufe seiner Entwicklung entweder innerhalb seiner Grenzen in die verschiedenen Kompartimente oder Organellen transportiert oder über die Grenze seiner Plasmamembran hinaus in das Lumen der parasitophoren Vakuole bzw. ihrer Membran oder weiter in das Erythrozytenzytosol, die Maurer'schen Spalten oder Membran des Erythrozyten. Abk.: **A** (Apikoplast); **DG** (Dichte Granula); **ER** (Endoplasmatisches Retikulum); **MN** (Micronemen); **MS** (Maurer'sche Spalte); **N** (Nukleus); **P** (Parasit); **PV** (Parasitophore Vakuole); **RBCC** (Erythrozytenzytosol); **Rh** (Rhoptrien); **TVN** (Tubovesikuläres Netzwerk).

Dazu gehört, wie ein gezielter Transport von Proteinen zu ihren Bestimmungsorten vermittelt wird, ob die Information in einer konservierten Signalsequenz innerhalb der zu exportierenden Polypeptide liegt oder ob es sich um posttranslationale Modifikationen handelt. Es stellt sich die Frage nach dem Ort der Sortierung der Proteine, die in die Wirtszelle exportiert werden müssen, ob dies innerhalb eines Kompartimentes des Parasiten oder erst an der Schnittstelle zwischen Parasit und Erythrozyt, der PV, geschieht. Zuletzt gilt es zu klären, wie die Proteine über die Membran der parasitophoren Vakuole gelangen, ob dies Vesikel-vermittelt geschieht

oder eine Translokationsmaschinerie in der PVM existiert, die eine Passage der zu exportierenden Proteine ermöglicht.

### 1.3.1 Der sekretorische Weg im Parasiten

Nach heutigem Kenntnisstand geht man davon aus, dass sich die Kompartimentierung des sekretorischen Weges innerhalb des Parasiten nur kaum von dem anderer Eukaryoten unterscheidet (Lingelbach und Przyborski, 2006). Der Parasit verfügt über ein mit der Kernhülle in einem Kontinuum stehendes (Bannister *et al.*, 2004), ausgedehntes endoplasmatisches Retikulum (Atkinson und Aikawa, 1990; Bannister *et al.*, 2000), innerhalb dessen Grenzen diverse Markerproteine wie das zur Hsp70-Familie gehörende molekulare Chaperon PfBip (Kumar *et al.*, 1991), das Calcium-bindende Protein PfERC (La Greca *et al.*, 1997) und verschiedene Untereinheiten des PfSec61 Translokons (Couffin *et al.*, 1998) durch Immunlokalisationsstudien nachgewiesen werden konnten.

Mittlerweile ist auch die über lange Zeit diskutierte Existenz eines Golgi-Apparates gesichert, obwohl immer noch keine Klarheit über dessen Morphologie, Organisation, Funktion und Lokalisation herrscht (Lingelbach, 1993; Elmendorf und Haldar, 1993; Benting *et al.*, 1994; Mattei *et al.*, 1999; Bannister *et al.*, 2000). Es wurde z.B. gezeigt, dass der KDEL-Rezeptor PfERD2, ein Markerprotein für den cis-Golgi in Säugetierzellen, in einer perinuklearen Region des Parasiten lokalisiert ist (Elmendorf und Haldar, 1993; van Wye *et al.*, 1996; Noe *et al.*, 2000). Die Verteilung des trans-Golgi Markers PfRab6 unterscheidet sich von PfERD2, woraus geschlossen wurde, dass es sich beim Golgi-Apparat des Parasiten um einen funktionelles, aber rudimentäres Kompartiment mit unterscheidbaren Funktionsbereichen handelt (de Castro *et al.*, 1996; van Wye *et al.*, 1996). Dies wurde durch elektronenmikroskopische Studien zum Teil unterstützt, in denen der sich normalerweise durch eine Reihe gestapelter Zisternen auszeichnende Golgi-Apparat durch eine einzelne diskoidale Zisterne in unmittelbarer Nähe zum Nukleus repräsentiert wurde (Bannister *et al.*, 2000, 2003), auch wenn diese im Laufe der Entwicklung des Parasiten durch zusätzliche tubuläre Membranstrukturen und Vesikel an Komplexität gewinnt (Bannister *et al.*, 2004). Studien mit dem toxischen Pilzmetaboliten Brefeldin A (BFA) konnten zeigen, dass sich die Sekretion von Proteinen des Parasiten in die parasitophore Vakuole und darüber hinaus reversibel

hemmen lässt (Benting *et al.*, 1994; Wickham *et al.*, 2001). BFA inhibiert dabei durch die Stabilisierung eines Proteinkomplexes aus ADP-Ribosylierungsfaktor (ARF) und dem ARF-Guaninnukleotid Exchange Factor (ARF-GEF) die Bildung der COPI-Hülle und damit den retrograden Vesikeltransport vom Golgi zum ER (Peyroche *et al.*, 1999; Presley *et al.*, 2002). Die Inhibition des COPI-vermittelten Vesikeltransports resultiert in dem Kollaps des Golgi-Apparates (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989) und damit in der Inhibition der Sekretion. Studien mit BFA an *Plasmodium chabaudi*, dem Erreger der Malaria bei Nagetieren, ließen ein weiteres Kompartiment in der Peripherie des Parasiten vermuten, welches ähnliche Eigenschaften wie das ER besitzt und an der Sekretion von Proteinen beteiligt ist, allerdings durch die Lokalisation von BiP vom ER zu unterscheiden war (Wiser *et al.*, 1997, 1999). Es wurde darüber spekuliert, dass dieses als sekundäres ER (sERA) bezeichnete Kompartiment für den Export von Proteinen über die Barriere der Parasitenplasmamembran hinaus in das Lumen der parasitophoren Vakuole zuständig ist. Die Existenz des sERA wurde allerdings im Laufe der Jahre angezweifelt, da Studien zeigen konnten, dass es sich dabei eher um ein frühes Stadium eines komplexer werdenden endoplasmatischen Retikulums handelt (Wickham *et al.*, 2001).

### 1.3.2 Export in die parasitophore Vakuole

Der erste Schritt der Sortierung von Proteinen, die über die Grenzen der Parasitenplasmamembran hinaus transportiert werden müssen, findet vermutlich wie bei anderen Eukaryoten im Zytoplasma an freien Ribosomen statt. Eine N-terminale Signalsequenz (bestehend aus einer positiv-geladenen Region variabler Länge, einer folgenden hydrophoben Sequenz von 6-15 Aminosäuren und einem abschließenden kurzen polaren Bereich) des naszierenden Proteins wird durch ein „Signal Recognition Particle“ (SRP) gebunden, wodurch die Translation verlangsamt und eine beginnende Faltung der Polypeptidkette verhindert wird (Walter und Blobel, 1980; Walter und Blobel, 1982). Das SRP wiederum bindet an den SRP-Rezeptor (Meyer und Dobberstein, 1980; Walter und Blobel, 1981), welcher mit dem Sec61-Translokon der ER-Membran interagiert, wodurch schließlich das Protein in die Pore des Translokons dirigiert und cotranslational in das Lumen des ER transloziert wird (Connolly und Gilmore, 1989; Gorlich und Rapoport, 1993). Proteine, welche in den

sekretorischen Weg gelangen und keine zusätzliche Markierung für den Weitertransport in ein spezifisches zelluläres Zielkompartiment tragen, werden in der Regel von eukaryotischen Zellen löslich sezerniert oder gelangen als Membranproteine in die Plasmamembran der Zelle. Man spricht dabei vom sogenannten „default pathway“.

Viele der bisher untersuchten Proteine des Parasiten, wenn auch nicht alle, die sezerniert werden, weisen eine spaltbare N-terminale Signalsequenz auf, die den Import in das ER vermittelt (Lingelbach, 1993). So konnte durch Lokalisationsstudien anhand eines Fusionsproteins, bestehend aus der Signalsequenz des exportierten Proteins HRP<sub>II</sub> (Histidine Rich Protein II) und dem Reporterprotein GFP (Green Fluorescent Protein), gezeigt werden, dass das Signalpeptid in der Lage ist, die Sekretion von GFP in die parasitophore Vakuole zu vermitteln (Lopez-Estrano *et al.*, 2003). Darüber hinaus war bei Immunoblot-Analysen neben dem unprozessierten Fusionsprotein auch das Spaltprodukt detektierbar, was eine Passage durch das ER vermuten lässt. Studien von Burghaus und Lingelbach konnten hingegen zeigen, dass eine N-terminale Signalsequenz, in diesem Fall die des Membranproteins EXP-1, gekoppelt an ein Luziferase-Reporterprotein, für den Transport des chimären Proteins nicht nur in die Vakuole, sondern darüber hinaus in das Erythrozytenzytosol ausreichend ist (Burghaus und Lingelbach, 2001). Es ist also keineswegs geklärt, ob es sich beim Transport von Proteinen in die Vakuole oder beim Transport in den Erythrozyten um den default pathway handelt.

Andere exportierte Proteine wie GBP-130 (Glycophorin Binding Protein 130) und KAHRP, deren Sekretion BFA-sensitiv ist (Benting *et al.*, 1994; Wickham *et al.*, 2001), weisen keine N-terminale Signalsequenz auf, verfügen dafür über ein dem N-Terminus um 20-80 Aminosäuren entrücktes Signalpeptid (Kilejian *et al.*, 1986; Nolte *et al.*, 1991), welches einen Import in das ER vermittelt (Nacer *et al.*, 2001; Cooke *et al.*, 2004). Allerdings bleibt unklar, ob diese internen hydrophoben Sequenzen von einer Translokationsmaschinerie ähnlich der höherer Eukaryoten erkannt wird, da Translokationsstudien in einem Zell-freien System an Säugetier-Microsomen zeigen konnten, dass Proteine wie KAHRP nicht durch ER-Membranen transloziert werden (Hinterberg *et al.*, 1994).

Des Weiteren existieren exportierte Proteine wie PfEMP1 (Baruch *et al.*, 1995) und PfEMP3 (Pasloske *et al.*, 1993), die weder über eine klassische noch eine dem N-Terminus entrückte Signalsequenz verfügen und trotzdem über den sekretorischen

Weg sezerniert werden, wie Transportstudien in Anwesenheit von BFA und Co-Immunolokalisierungen mit dem ER-residenten Protein PfERC zeigen (Wickham *et al.*, 2001). Mögliche Mechanismen, die einen ER-Import dieser Proteine vermitteln, konnten bisher nicht identifiziert werden.

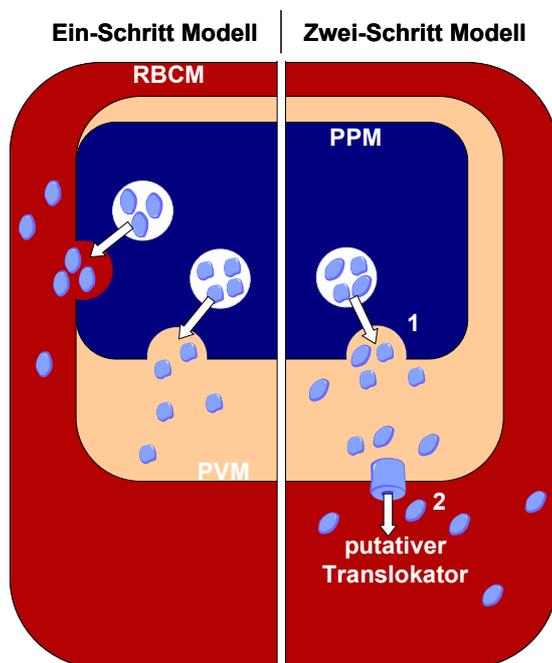
Durch Proteomanalysen wurden im Lumen der parasitophoren Vakuole eine Reihe von Proteinen gefunden, zu denen auch Chaperone der Hsp70- und Hsp90-Familie gehören (Nyalwidhe und Lingelbach, 2006), die über keinerlei Signalsequenz verfügen und sehr wahrscheinlich zytosolischen Ursprungs sind. Bisher ist nichts darüber bekannt, wie solche Proteine die Plasmamembran des Parasiten passieren, allerdings sind unkonventionelle Sekretionsmechanismen wie z.B. der Export durch Exosomen oder Exosvesikeln diskussionswürdig (Nickel, 2005).

### 1.3.3 Der Weg in die Wirtszelle

Sind die zu exportierenden Proteine des Parasiten erst einmal in den sekretorischen Weg gelangt, so gelangen lösliche Proteine vermutlich durch Fusion der Transportvesikel mit der Plasmamembran in das Lumen der parasitophoren Vakuole (Taraschi *et al.*, 2001; Bannister *et al.*, 2004). Integrale Membranproteine hingegen werden in die Plasmamembran des Parasiten integriert oder gelangen in die Membran der parasitophoren Vakuole, wie dies bei EXP-1 (Exported Protein 1) der Fall ist (Simmons *et al.*, 1987; Günther *et al.*, 1991; Ansorge *et al.*, 1997). Allerdings ist über die Mechanismen, die Membranproteine über die Plasmamembran hinaus in andere Membranstrukturen integrieren, nur sehr wenig bekannt. Eine Möglichkeit wäre die Fusion sekretorischer Vesikel an so genannten PPM-PVM Junctions, wodurch Membranproteine durch laterale Diffusion direkt in die PVM gelangen könnten. Ohne die Existenz derartiger Fusionspunkte von PPM und PVM wäre ein Vesikeltransport theoretisch möglich (Haldar und Holder, 1993), wobei die dafür notwendigen Effektormoleküle bisher nicht identifiziert werden konnten (Nyalwidhe und Lingelbach, 2006) und der definitive Beweis noch erbracht werden muss. Weiterhin wird auch darüber diskutiert, ob Proteine in löslichem Zustand über die Plasmamembran des Parasiten hinaus exportiert werden und erst mit Hilfe von Chaperonen in die Zielmembran integriert werden, ein Umstand, der von Ossorio und Kollegen für *Toxoplasma gondii* gezeigt werden konnte (Ossorio *et al.*, 1994). Darüber hinaus konnten Papakrivos *et al.* durch Analysen der

Löslichkeitseigenschaften des exportierten Proteins PfEMP1, welches als integrales Membranprotein an der Erythrozytenoberfläche exponiert ist, zeigen, dass PfEMP1 nicht als integrales, sondern vielmehr als peripher an Membranen assoziiertes Protein in einem löslichen Zustand zur Erythrozytenmembran transportiert wird, bevor es dort in die Membran integriert (Papakrivov *et al.*, 2005).

Für den Export von löslichen Proteinen über das Lumen der parasitophoren Vakuole hinaus in das Erythrozytenzytosol wurde ebenfalls die Existenz der erwähnten PPM-PVM Junctions in Betracht gezogen. Bei einer Fusion von sekretorischen Vesikeln in diesen Bereichen würden die Proteine in einem einzigen Schritt direkt in das Erythrozytenzytosol entlassen werden. Untersuchungen des Exportes von GBP an SLO-permeabilisierten iRBC konnten jedoch zeigen, dass die parasitophore Vakuole ein Transitkompartiment auf dem Weg des Proteins in die infizierte Zelle darstellt (Ansorge *et al.*, 1996). Dabei wird GBP in einem ersten Schritt in das Lumen der Vakuole sezerniert, um dann in einem zweiten Schritt über die Barriere der Vakuolenmembran transportiert zu werden, während Proteine wie SERP innerhalb der Vakuole verbleiben (Knapp *et al.*, 1989; Ragge *et al.*, 1990).



**Abb. 1.4: Ein- bzw. Zwei-Schritt Modell (nach Lingelbach, 1997):** Bei dem Ein-Schritt Modell gilt die Voraussetzung, dass zwischen der PPM und PVM Kontaktstellen existieren, an denen eine Fusion mit sekretorischen Vesikeln zur direkten Abgabe der Cargo-Proteine in das Erythrozytenzytosol führt. Im Zwei-Schritt Modell fusionieren die sekretorischen Vesikel zunächst mit der PPM und entlassen die Proteine in das Lumen der parasitophoren Vakuole (1). In einem zweiten Schritt werden die Proteine, welche über die PVM-Barriere hinaus transportiert werden müssen, über einen putativen Translokator in das Erythrozytenzytosol transloziert (2).

Dieser Zwei-Schritt Mechanismus (siehe Abb. 1.4) wurde durch Transportstudien unter Nutzung von Fluoreszenz-Reporterproteinen bestätigt (Burghaus und Lingelbach, 2001; Wickham *et al.*, 2001). Für lange Zeit war unbekannt, wie der Transport von Proteinen über die parasitophore Vakuolenmembran vermittelt wird,

welche Unterscheidungsmerkmale es bei Proteinen gibt, die im Lumen der Vakuole verbleiben und solchen, die aus diesem Kompartiment in den Erythrozyten transportiert werden. Schließlich konnte eine konservierte Signalsequenz gefunden werden, die essentiell für den Export in die infizierte Zelle ist und folglich HT (Host Targeting) Signal (Hiller *et al.*, 2004) oder PEXEL (Plasmodium Export Element) (Marti *et al.*, 2004) genannt wird. Dabei benutzten Hiller *et al.* und Marti *et al.* unterschiedliche bioinformatische Methoden, die einen Bereich von 11 Aminosäuren (Hiller *et al.*, 2004) mit einer hoch konservierten pentameren Kernsequenz identifizierten. Die pentamere Sequenz wird allgemein als RxLxE beschrieben, wobei ein Austausch der Aminosäuren R, L und E mit A den Transport über die PVM inhibiert und die Proteine in der parasitophoren Vakuole verbleiben (Hiller *et al.*, 2004; Marti *et al.*, 2004). Die x-Positionen repräsentieren weniger stark konservierte Aminosäuren, doch sind auch diese nicht vollständig zufällig. So wird die zweite Position häufig durch eine hydrophobe Aminosäure wie I oder L besetzt.

Die Position des HT/PEXEL innerhalb der Aminosäuresequenz von exportierten Proteinen ist ebenfalls hoch konserviert und befindet sich üblicherweise in der N-terminalen Region innerhalb der ersten 100 Aminosäuren, in der HT / PEXEL einer Signalsequenz folgen muss, wobei diese N-terminal oder dem N-Terminus entrückt sein kann.

Die flankierenden Regionen scheinen auch einen Einfluss auf die Exportvermittlung zu nehmen, auch wenn diese nur eine geringfügige Konservierung aufweisen (van Ooij und Haldar, 2007). So konnten Transportstudien mit GFP-Fusionsproteinen, bei denen die Aminosäuresequenz des Reporterproteins direkt auf die pentamere Kernsequenz von HT/PEXEL folgte, zeigen, dass diese nicht exportiert wurden. Erst das Einfügen einer Linkersequenz zwischen Signal und Reporterprotein führte zu einem Export über die PVM (Knuepfer *et al.*, 2005).

Die Entdeckung von HT/PEXEL konnte bisher leider keinen Aufschluss darüber geben, welche Mechanismen der Erkennung dieses Signals zu Grunde liegen und wie der Transport über die PVM abläuft (van Ooij und Haldar, 2007). So konnte noch nicht geklärt werden, an welchem Punkt des Exportes von Proteinen HT/PEXEL zum Tragen kommt. Spekulationen reichen von der Erkennung dieses Signalpeptids am ER bis hin zur PVM (Lingelbach und Przyborski, 2006; Charpian und Przyborski, 2007). Gerade der Umstand, dass HT/PEXEL sowohl in löslichen als auch integralen

Membranproteinen zu finden ist, macht es schwierig, ein theoretisches Konzept zu entwickeln (Lingelbach und Przyborski, 2006).

Geht man von der Annahme aus, dass das HT/PEXEL-Motiv erst innerhalb der parasitophoren Vakuole Erkennungsmechanismen unterliegt, die einen Transport über die Grenzen der PVM hinaus vermitteln, so würden lösliche Proteine entlang des Default-Pathway in das Lumen der Vakuole sezerniert werden. Dort würde eine spezifische, HT/PEXEL-vermittelte Erkennung durch einen putativen Translokator-Komplex innerhalb der PVM die Translokation der Proteine über die PVM in das Erythrozytenzytosol ermöglichen. Der gerichtete Transport von integralen Membranproteinen jedoch unterliegt in der Regel der Vesikelbildung und Membranfusionsprozessen. Es ist schwer vorstellbar, wie ein Signal zwei derart unterschiedliche Mechanismen vermitteln kann.

Andererseits fehlen bisher schlüssige Beweise für einen Vesikelfluss von der Plasmamembran des Parasiten zur PVM bzw. von der PVM zur Erythrozytenmembran. Die Tatsache, dass PfEMP1 als Membranprotein der Erythrozytenmembran in einem löslichen Zustand zu seinem finalen Bestimmungsort zu gelangen scheint (Papakrivov *et al.*, 2005), lässt deshalb noch eine weitere Möglichkeit für einen gemeinsamen Erkennungsmechanismus von HT/PEXEL innerhalb der PV zu. Setzt man voraus, dass Membranproteine des Parasiten mit einem HT/PEXEL-Motiv, die in den Erythrozyten exportiert werden, nicht in die ER-Membran integriert werden, sondern in einem löslichen Zustand verbleiben, vermittelt durch die Assoziation mit Chaperonen, so könnten diese durch den Default-Pathway in das Lumen der parasitophoren Vakuole gelangen und dort den gleichen Erkennungsmechanismen unterliegen, wie sie auch für lösliche Proteine postuliert werden. Die Membranproteine könnten so über einen Translokator durch die PVM transloziert werden und erst bei Erreichen ihrer Zielmembran in die Lipiddoppelschicht integriert werden.

### 1.4 Der Transport von Proteinen über biologische Membranen

Die Möglichkeit, dass eine Vielzahl an sehr unterschiedlichen Proteinen die Schnittstelle zwischen Parasit und Wirtszelle, genauer die Membran der parasitophoren Vakuole, durch einen putativen Translokator überquert, wirft natürlich die Frage nach der Beschaffenheit eines möglichen Translokators auf. Abgesehen

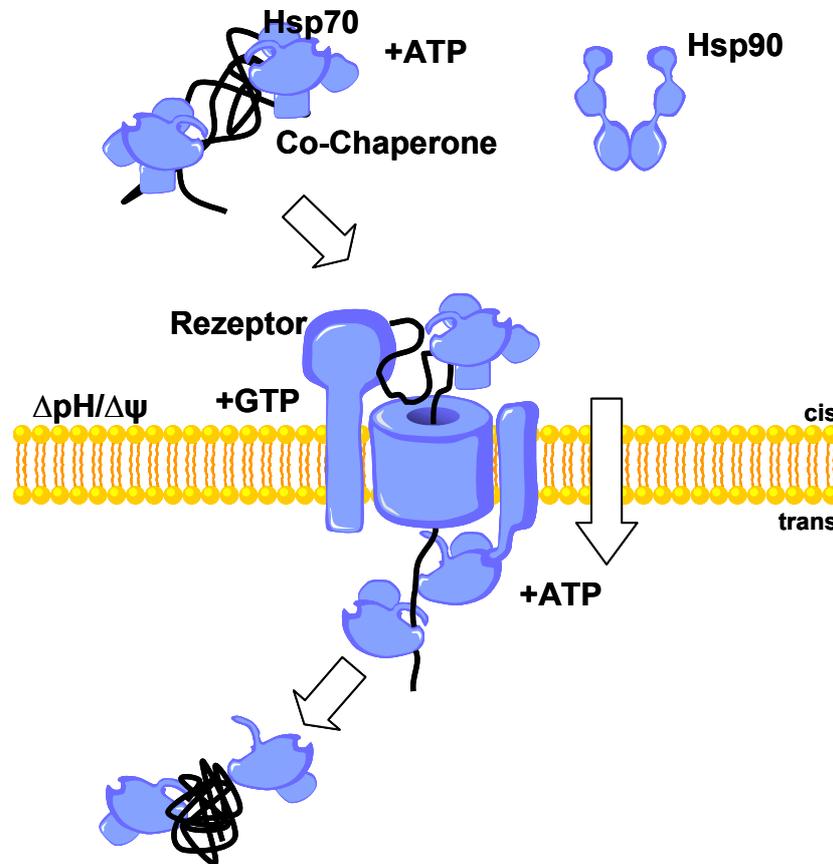
von der Signalvermittlung durch HT/PEXEL (Hiller *et al.*, 2004; Marti *et al.*, 2004) ist nur wenig darüber bekannt, wie dieser Transport mechanistisch abläuft, welche Faktoren daran beteiligt sind und welche weiteren Voraussetzungen gegeben sein müssen, damit ein Protein über die PVM transloziert wird. Dieser Umstand macht es notwendig, das Problem der Translokation über die PVM einer mechanistischen Betrachtung zu unterziehen, um Anhaltspunkte zu erlangen, die eine gezielte Analyse des Translokationsvorganges ermöglichen. Dabei bietet es sich an, den Blick auf ein Problem zu richten, zu dessen Lösung die Natur eine Reihe an Möglichkeiten anbietet.

In vielen Fällen unterscheidet sich der Ort der Synthese eines Proteins von seinem Bestimmungsort, an dem es seine Funktion ausübt. Diese Tatsache macht es notwendig, dass eine Zelle unterschiedliche Transport- und Sekretionsmechanismen bereitstellen muss, damit ein zielgerichteter Transfer dieser Effektormoleküle stattfinden kann. Dies beinhaltet den Transport zytosolisch synthetisierter Proteine in Organellen wie Mitochondrien und Chloroplasten, den Import in Kompartimente wie die Peroxisomen, Lysosomen oder in das Endoplasmatische Retikulum und damit den Eintritt in den sekretorischen Weg. Auch wenn solche Prozesse immer auf einzigartigen Prinzipien und Elementen beruhen, so weisen unterschiedliche Formen des Proteintransports über verschiedene Membranen doch eine Reihe an Gemeinsamkeiten auf. Folgend wird ein generalisiertes Modell der verschiedenen Mechanismen aufgezeigt, die bei der Translokation von Proteinen ablaufen.

### 1.4.1 Ein generalisiertes Modell für die Translokation von Proteinen über biologische Membranen

Verschiedene Translokationssysteme zeichnen sich durch eine Reihe von übereinstimmenden Mechanismen und den daran beteiligten Faktoren aus (siehe Abb. 1.5). So benötigen die meisten Systeme Energieäquivalente wie ATP und/oder GTP. Die einzige Ausnahme bildet dabei der Tat-Weg bei Bakterien und beim Import von Proteinen über die Thylakoidmembran. Ein Protonengradient an der Zielmembran, der bei der Translokation über die innere mitochondriale Membran die treibende Kraft darstellt, ist bei den verschiedenen Systemen seltener. Diese Funktion wird häufiger von molekularen Chaperonen übernommen, die sowohl auf

der cis- und trans-Seite einer Membran zu finden sind und die vollständige Translokation eines Polypeptides ermöglichen.



**Abb. 1.5: Allgemeines Modell zur Translokation von Proteinen über Membranen (nach Agarraberes und Dice, 2001).** Für die Translokation von Proteinen ist häufig ein Targeting-Signal innerhalb der Aminosäuresequenz des Proteins nötig, ein Chaperon-Komplex unter Beteiligung von Hsp70, welches das Substratprotein auf der cis-Seite der Membran in einem translokationskompetenten Zustand hält oder es für das Translokationsereignis entfaltet (Guidance-Komplex), und ATP-Hydrolyse. Die Erkennung des Substratproteins durch den Translokator kann entweder über die direkte Wechselwirkung mit einer Rezeptorkomponente oder durch Vermittlung eines Chaperons erfolgen. Das Substratprotein wird in der Regel in einem vollständig entfalteten oder einem teilgefalteten Zustand durch den wässrigen Kanal des Translokators geleitet, auf der trans-Seite der Membran häufig unter Beteiligung von Chaperonen der Hsp70-Familie, die für einen gerichteten Transport notwendig sind. GTP und Protonengradienten sind ebenfalls in manchen Translokationssystemen notwendig. Nach dem Translokationsereignis werden die Substratproteine häufig unter Beteiligung von Chaperonen in ihren nativen Zustand überführt.

Das Vorhandensein und die proteolytische Spaltung einer bestimmten Peptidsequenz, welches als Signal für eine Gruppe von Substratproteinen fungiert und den Transportvorgang initiiert, ist ebenfalls ein häufig zu findender Mechanismus, wobei die Spaltung einer solchen Signalsequenz durch eine Peptidase nicht zwingend notwendig ist, was z.B. bei dem PTS-1 Signal für

peroxisomale Proteine (Ronchi *et al.*, 1982) bzw. bei der Chaperon-vermittelten Autophagie der Fall ist (Agarraberes und Dice, 2001).

Rezeptorkomponenten sind weit verbreitete Faktoren bei den verschiedensten Transportsystemen, wobei diese sowohl löslicher als auch membrangebundener Natur sein können. Auch wenn sich in den meisten Fällen die Rezeptorkomponenten von denen des Translokons unterscheiden, so können diese durchaus, wie am Beispiel von Tic110, an der Ausbildung der Pore beteiligt sein oder sogar durch ein und dasselbe Protein repräsentiert sein, wie dies bei lamp2a des lysosomalen Transportweges vermutet wird. Die Anwesenheit einer membrandurchspannenden Pore ist für jedes der beschriebenen Translokationssysteme eine Grundvoraussetzung für den Transport über eine Membran, wobei das Translokon von sehr unterschiedlicher Beschaffenheit sein kann. So variiert der Durchmesser des ER-Translokons von 15 Å in geschlossenem Zustand bis 40-60 Å bei Initiierung des Translokationsvorganges (Hamman *et al.*, 1998). Dieser Umstand deutet darauf hin, dass es sich bei Translokationsporen nicht unbedingt um starre Strukturen handelt, sondern um Proteinkomplexe, die durchaus zu Expansion und Kontraktion befähigt sind (Meyer *et al.*, 1999). Beim Tat-Translokon, der die Passage von nativen Proteinen bzw. Proteinkomplexen erlaubt, geht man davon aus, dass sich die Proteinkomponenten, die an der ringförmigen Struktur der Pore beteiligt sind, der Größe des Substratproteins bzw. des Proteinkomplexes anpassen können (Berks *et al.*, 2000). Auf der anderen Seite wurde der Durchmesser des Translokons der äußeren Chloroplastenmembran auch in einem aktiven Zustand auf 8-9 Å bemessen (Chen *et al.*, 1999). Auch der Durchmesser der Import-Pore der äußeren mitochondrialen Membran beläuft sich auf stabile 20 Å (Schatz und Dobberstein, 1996; Dekker *et al.*, 1996; Pfanner und Meijer, 1997).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass ein genereller Translokationsapparat häufig auf der Eingangs- und Ausgangsseite des Translokons Chaperonkomplexe benötigt, die unter ATP-Verbrauch auf der Eingangsseite ein Substratprotein in einem translokationskompetenten Zustand halten, und auf der Ausgangsseite das Substratprotein in Empfang nehmen und die Richtung der Translokation bestimmen. Die Notwendigkeit von GTP oder einem Protonengradienten ist möglich. Die Translokase besteht aus porenbildenden Proteinen und einem oder mehreren Rezeptorkomponenten, wobei die dafür notwendigen Proteindomänen auch von

einem einzigen Protein zur Verfügung gestellt werden können (Agaraberres und Dice, 2001).

### 1.5 Transportstudien an *Plasmodium falciparum*

Jahrelange Bemühungen zur Klärung der Frage, wie Proteine des Parasiten über die Membran der parasitophoren Vakuole hinaus in die Wirtszelle transportiert werden, haben ergeben, dass in der Regel zwei essentielle Signale innerhalb der Aminosäure-Kette der Polypeptide diesen Transport vermitteln. Zunächst müssen die Proteine über eine N-terminale bzw. dem N-Terminus entrückte Signalsequenz verfügen, welches den Eintritt in den sekretorischen Weg über ER und Golgi des Parasiten vermittelt und zur Sezernierung in das Lumen der Vakuole führt. Darüber hinaus muss ein zusätzliches Signalpeptid folgen, als Pexel/HT bezeichnet, welches den weiteren Transport über die PVM in die Wirtszelle vermittelt (Hiller *et al.*, 2004; Marti *et al.*, 2004). Abgesehen von diesen Informationen ist nur wenig darüber bekannt, welche Transportprozesse an der Translokation von Proteinen über die PVM beteiligt sind, wobei aktuellere Überlegungen zur möglichen Existenz einer membranständigen Translokationsmaschinerie tendieren, die zu exportierende Polypeptide über die PVM-Barriere schleust (Marti *et al.*, 2005; Lingelbach und Przyborski, 2006; van Ooij und Haldar, 2007).

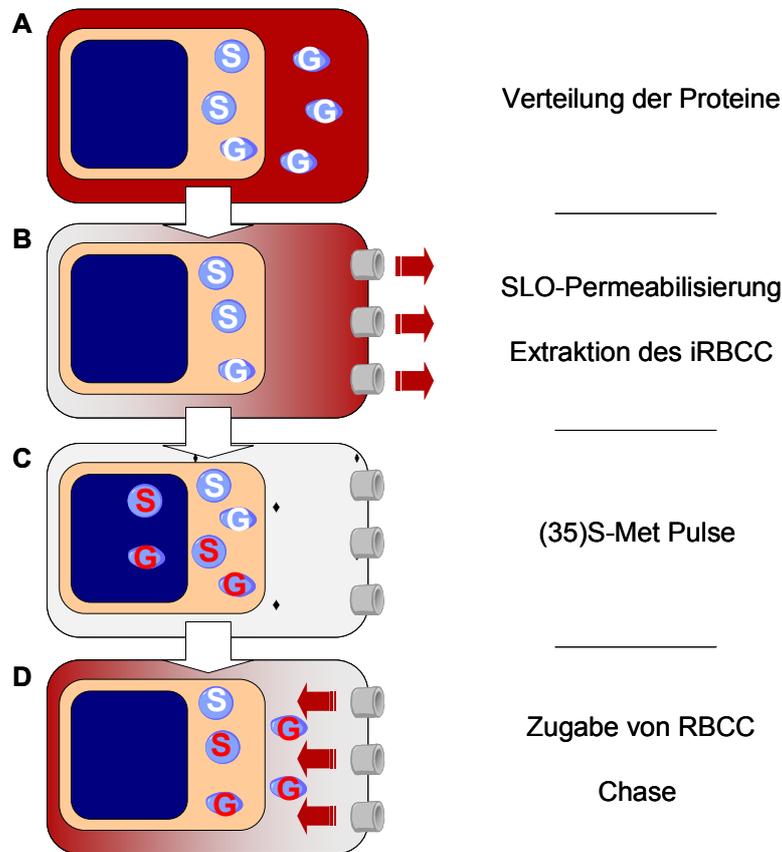
Bei den meisten bisher durchgeführten Transportstudien an *Plasmodium falciparum* wurde in erster Linie auf molekularbiologische Techniken zurückgegriffen, um Erkenntnisse über die Mechanismen und Bedingungen zu erlangen, die den Transport von Proteinen des Parasiten zu ihrem finalen Bestimmungsort innerhalb der Wirtszelle ermöglichen. Dazu gehören Knock-out Studien, die es ermöglichen, durch gezielte Genruptur die Expression von Proteinen zu unterbinden, die an Transportprozessen beteiligt sein könnten (Cooke *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 2007). Ein anderes Beispiel ist die transgene Expression von chimären fluoreszierenden Reporterproteinen im Parasiten (Crabb *et al.*, 1997; Kadekoppala *et al.*, 2000), um die Lokalisation untersuchter Proteine visualisieren zu können und die Abhängigkeit des Exports von bestimmten Aminosäuremotiven zu definieren. Da allerdings bisher nur wenige Informationen über die genauen Mechanismen zur Verfügung stehen, die die Lokalisation eines Proteins des Parasiten innerhalb des infizierten Erythrozyten beeinflussen, führen Untersuchungen unter Verwendung der genannten Methoden

nicht selten zu widersprüchlichen Interpretationen. So konnten Burghaus und Lingelbach 2001 zeigen, dass der Export eines chimären Proteins (bestehend aus der N-terminalen Signalsequenz von Exp-1 und dem Reporterprotein Luziferase) über die PVM in das Erythrozytenzytosol allein durch die Anwesenheit des Signalpeptids vermittelt wird (Burghaus und Lingelbach, 2001). Im Gegensatz dazu steht eine Studie von Adisa *et al.*, in der ein chimäres Protein, bestehend aus der gleichen N-terminalen Signalsequenz an das Reporterprotein GFP gekoppelt, das Lumen der parasitophoren Vakuole als finalen Bestimmungsort besitzt und nicht über die PVM hinaus transportiert wird (Adisa *et al.*, 2003). So führt die Verwendung unterschiedlicher Reporterproteine scheinbar zu unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb der infizierten Zelle. Weitere Arbeiten zur Analyse des Exportes von KAHRP unter Benutzung von chimären GFP-Proteinen kamen ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen. So konnten Wickham *et al.* zeigen, dass die Fusion eines 63 Aminosäuren langen N-terminalen Fragmentes an das Reporterprotein GFP den Transport über die PVM nicht vermitteln konnte, auch wenn das zu jenem Zeitpunkt noch nicht bekannte Pexel/HT-Motiv innerhalb des Fragmentes vertreten war (Wickham *et al.*, 2001). Von Marti *et al.* durchgeführte Studien hingegen, welche zur Identifikation von Pexel geführt haben, konnten zeigen, dass die Fusion eines 69 Aminosäure langen N-terminalen Fragmentes an GFP für die Vermittlung des Exportes über die PVM ausreichend ist (Marti *et al.*, 2004). Knuepfer *et al.* waren anschließend in der Lage zu zeigen, dass der Abstand zwischen dem Pexel/HT-Motiv und dem Reporterprotein innerhalb der Sequenz mindestens 10 Aminosäuren betragen muss, damit die Signaleigenschaft des Motivs nicht beeinträchtigt wird (Knuepfer *et al.*, 2005), wobei der Grund für diese Notwendigkeit bislang nicht bekannt ist.

Untersuchungen unter Verwendung der genannten Methoden führen also nicht selten zu widersprüchlichen Interpretationen und sind darüber hinaus in ihren Möglichkeiten, den Translokationsvorgang von Proteinen über die PVM zu beschreiben, limitiert.

Eine alternative methodische Herangehensweise zur Analyse des Translokationsprozesses über die PVM ist die Untersuchung des Transportes von endogenen Proteinen durch biochemische Manipulation von SLO-permeabilisierten iRBC. In diesem Zusammenhang haben die bereits erwähnten Transportstudien von

Ansorge *et al.* unter Verwendung eines Pulse-Chase Assays schon früh einen ersten möglichen Ansatz geliefert (Ansorge *et al.*, 1996; siehe Abb. 1.6).



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Pulse-Chase Assays von Ansorge *et al.* (1996).** (A) Verteilung der Proteine im infizierten Erythrozyten. (B) Die iRBCC werden mit SLO permeabilisiert und das iRBCC durch Zentrifugation extrahiert. (C) Die Proteine werden durch Zugabe von L-Methionin [35S] für 45 min metabolisch markiert. (D) Der Chase wird in Anwesenheit verschiedener Medien, unter anderem RBCC, für 45 min durchgeführt und die Verteilung des metabolisch markierten GBP in Pellet-Fraktion und Inkubationsüberstand mittels Autoradiographie visualisiert.

Dabei konnte der Assay maßgeblich dazu beitragen, verschiedene Eigenschaften des Exports vom löslichen Protein GBP des Parasiten in seine Wirtszelle zu beschreiben. Dazu gehört die Beobachtung, dass GBP in einem Zwei-Schritt Mechanismus zunächst in das Lumen der parasitophoren Vakuole gelangt und anschließend in einem zweiten Schritt über die parasitophore Vakuolenmembran transloziert. Darüber hinaus hat die Verwendung des Assays sehr häufig zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt, unter anderem bei der Klärung einer möglichen Energieabhängigkeit des Transportprozesses bzw. der Beteiligung von Proteinfaktoren, die für die Translokation von löslichen Proteinen über die PVM

notwendig sind. Es hat sich gezeigt, dass ein entscheidender Nachteil dieser Methode ihre geringe Reproduzierbarkeit ist, die eine standardmäßige Verwendung des Assays für Transportstudien unmöglich macht.

### 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die von Ansorge *et al.* durchgeführten Transportstudien bieten eine geeignete methodische Grundlage für die Identifikation von Faktoren, die an dem Translokationsprozess beteiligt sein könnten. Da sie aufgrund ihrer geringen Reproduzierbarkeit keine eindeutigen Schlussfolgerungen für und wider die Beteiligung von analysierten Faktoren an dem Translokationsprozess zulassen, ist es Ziel dieser Arbeit, den von Ansorge *et al.* durchgeführten Assay in seinen einzelnen Arbeitsschritten einer genaueren Analyse zu unterziehen. Nach Möglichkeit sollen die Schwachpunkte definiert werden, um diese als Grundlage für die Weiterentwicklung des Assays zu nehmen. Es soll ein *in vitro* Assay etabliert werden, welcher die Analyse der Voraussetzungen für die Translokation von Proteinen über die PVM anhand des Modellproteins GBP zulässt. Dabei muss die Reproduzierbarkeit derart optimiert werden, um für zukünftige Transportstudien, ergänzend zu den genannten molekularbiologischen Methoden, einen standardisierten Assay bereitzustellen. In diesem Rahmen soll ebenfalls geklärt werden, ob eine Energieabhängigkeit des Transports besteht und inwieweit Proteine als Mediatoren des Transportvorganges beteiligt sind, die im Kontext eines Translokator-vermittelten Transports über die PVM stehen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Bezogen von</b>
Biofuge Fresco	Heraeus
Blotting Apparatur	Phase
Feinwaage 2414	Sartorius
Gel-Trockner	Biotech Fischer
Inkubator	Heraeus
Kühlzentrifuge Mikro 22R	Hettich
Magnetrührer Combimag RCH	IKA
Orthoplan Mikroskop	Leitz
pH-Meter 766	Calimatic
Powersupply Power PAC 1000	Biorad
Speedvac Concentrator 5301	Eppendorf
Taumel-Rollenmischer Spiramax 5	Denley
Thermoblock	Stuart Scientific
Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultraschallbad Sonorex Super 10P	Bandelin
Vortexer REAX 2000 X	Sartorius
Waage 1205 MP	Sartorius

#### 2.1.2 Verwendete Reagenzien

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Bezogen von</b>
ADP	Sigma
Ammoniumpersulfat	Roth
Ammoniumsulfat	Roth

AMP-PNP	Sigma
Apyrase	Sigma
ATP	Sigma
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth
Brefeldin A (BFA)	Sigma
Bromphenolblau	Amersham Bioscience
Coomassie Brilliant Blau R 250	Applichem
p-Coumarsäure	Sigma
Cycloheximid (CHX)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	Applichem
EDTA	Roth
Essigsäure	Roth
Gelafundin	Braun Melsungen AG
Geldanamycin	Alexxis
Gentamycin	PAA Laboratories
Giemsa	Merck
Glycerin	Applichem
Glycin	Applichem
HEPES	Applichem
Hydrochinon	Applichem
Isopropanol	Roth
Kaliumbromid	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumhydroxid Plättchen	Merck
Magermilchpulver	Applichem
Methanol	Roth
L-Methionin, [ <sup>35</sup> S]	Hartmann Analytic
Metol	Roth
Natriumcarbonat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumethylmercurithiosalicylat	Roth

Natriumsulfit	Roth
Novobiocin	Roth
NP40	Roth
Ponceau S	Roth
Protein A Sepharose Beads	Pierce
Protein G Sepharose Beads	Amersham Bioscience
Rotiphorese Gel 30	Roth
Saccharose	Roth
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Roth
Streptolysin O (SLO)	AG Bhakdi, Universität Mainz
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Roth
Trichloressigsäure (TCA)	Roth
Tris	Roth
Triton® X-100	Roth
Trypsin (Typ I bovine pancreas)	Sigma
Trypsin-Inhibitor (Typ I soybean)	Sigma

### 2.1.3 Verwendete Antikörper

Antikörper	Bezogen von	Verdünnung	Referenz
Kaninchen- $\alpha$ - <i>Pf</i> GBP	Eigene Arbeitsgruppe	1:500	Benting <i>et al.</i> , 1994
Kaninchen- $\alpha$ - <i>Pf</i> SERP	Eigene Arbeitsgruppe	1:500	Knapp <i>et al.</i> , 1989
Kaninchen- $\alpha$ - <i>Pf</i> Aldolase	Eigene Arbeitsgruppe	1:5000	Knapp <i>et al.</i> , 1990
Kaninchen- $\alpha$ - <i>Pf</i> EXP-1C	Eigene Arbeitsgruppe	1:500	Günther <i>et al.</i> , 1991
Maus- $\alpha$ - <i>Hs</i> HSP70	Santa Cruz	1:1000	Kiang, 2003
Maus- $\alpha$ - <i>Hs</i> Bande3	Sigma	1:10000	Czerwinski <i>et al.</i> , 1988
Maus- $\alpha$ -	Sigma	1:500	Telen und Bolk,

HsGlycophorin			1987
Kaninchen- $\alpha$ - HsSpectrin	Sigma	1:500	Holzinger <i>et al.</i> , 1999
Ziege- $\alpha$ - Kaninchen HRP	DAKO	1:2000	Sellebjerg <i>et al.</i> , 1996
Huhn- $\alpha$ -Maus HRP	Santa Cruz	1:2000	Schiller <i>et al.</i> , 2006

### 2.1.4 Sonstiges

Material	Bezogen von
Expositionskassetten	rego
Glas-Objektträger	Roth
Humanplasma (A/Rh <sup>+</sup> )	Uni-Klinikum Marburg
Humane Erythrozyten (A/Rh <sup>+</sup> )	Uni-Klinikum Marburg
Inkubationsröhrchen	Greiner
Nitrocellulose-Membran	Schleicher und Schuell
Pasteurpipetten	COPAN
Pipettenspitzen	Greiner
Plastik-Pipetten	Greiner
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Röntgenfilme	Fuji
RPMI 1640	PAA Laboratories
RPMI 1640 (Methionin-frei)	PAA Laboratories
Suspensionskultur-Flaschen	Greiner
Whatman-Filterpapier	Schleicher und Schuell

### 2.1.5 Verwendete Lösungen, Puffer und Medien

#### Ammoniumpersulfat-Stammlösung:

10 % APS in H<sub>2</sub>O.

#### Blockmilch:

5 % Magermilchpulver und 0,1 % Natriimmercurythiosalicylat werden in 1x PBS pH 7,3 gelöst und bei 4 °C gelagert.

#### Coomassie-Entfärbelösung:

Die Lösung enthält 30 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure in dest. Wasser.

#### Coomassie-Färbelösung:

0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R 250 werden in 30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure und dest. Wasser gelöst.

#### ECL-Reagenz:

Stocklösungen: 250 mM Luminol in DMSO, 90 mM p-Coumarsäure in DMSO, 1 M Tris-HCl pH 8,5. Für die Gebrauchslösungen werden 400 µl Luminollösung, 178 µl p-Coumarsäurelösung und 4 ml Tris-Puffer mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 40 ml aufgefüllt und bei 4 °C gelagert. Bei Gebrauch wird ein Aliquot mit 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1000) versetzt.

#### Entwickler-Lösung für Röntgenfilme:

Die Lösung enthält 2,2 g Metol, 8,8 g Hydrochinon, 72,0 g Natriumsulfit, 48,0 g Natriumcarbonat und 4,0 g Kaliumbromid in 1 l H<sub>2</sub>O (deionisiert).

#### Elektrophorese-Puffer:

Enthält 124 mM Tris, 960 mM Glycin und 0,05 % SDS in deionisiertem Wasser.

#### Gelafundin-Lösung:

RPMI wird mit Gelafundin in einem Verhältnis von 1,4:2,4 gemischt und bei 4 °C gelagert.

### Giemsa-Färbelösung:

0,125 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>- und 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung werden bis zu einem pH von 6,8 gemischt. Dieser Puffer wird vor Gebrauch 1:10 verdünnt. Die Giemsa-Lösung wird vor der Färbung im Verhältnis 1:10 mit dem verdünnten Puffer gemischt.

### IP-Puffer A:

150 mM NaCl, 2 mM Na-EDTA und 0,2 % NP40 werden in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 gelöst.

### IP-Puffer B:

500 mM NaCl, 2 mM Na-EDTA und 0,2 % NP40 werden in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 gelöst.

### IP-Puffer C:

Dieser Puffer enthält 10 mM Tris-HCl pH 7,5.

### PBS (10x):

Der Puffer enthält 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und wird in 1 l H<sub>2</sub>O (bidest) gelöst. Der pH-Wert wird auf 7,3 eingestellt.

### Ponceau S-Färbelösung:

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

### Probenpuffer (2x):

Der Probenpuffer enthält 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % SDS, 0,2 % Bromphenol Blau, 20 % Glycerin, 5 mM EDTA und 200 mM DTT. Das DTT wird erst kurz vor Gebrauch hinzugefügt und gelöst.

### Protease Inhibitor Cocktail (PIC):

Der Cocktail enthält 50 µl Antipain (2 mg/ml), 20 µl Chymostatin (5 mg/ml), 50 µl Aprotinin (2 mg/ml), 20 µl Trypsin-Inhibitor (5 mg/ml), 50 µl Na-EDTA (2 mg/ml), 50 µl Pepstatin (2 mg/ml), 20 µl Leupeptin (5 mg/ml) und 100 µl Elastatinal (1 mg/ml). Diese Inhibitor-Mischung wird mit 140 µl HEPES-KOH auf 500 µl aufgefüllt, so dass

jeder Inhibitor in der Konzentration 200 µg/ml vorliegt. Der Cocktail wird 1:200 verdünnt eingesetzt.

### RPS:

RPMI-Medium, welches 10 % hitzeinaktiviertes Humanplasma enthält.

### Sammelgel-Puffer:

500 mM Tris werden mit HCl auf einen pH von 6,8 eingestellt, die Lösung filtriert und bei 4 °C gelagert.

### Streptolysin O:

100 µg SLO-Lyophilisat werden in 1,12 ml 1x PBS pH 7,3 bei 4 °C gelöst und aliquotiert. Lagerung bei -70°C.

### Transfer-Puffer:

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

### Trenngel-Puffer:

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

### Waschpuffer mit und ohne Detergenz:

Enthält 100 mM Tris-HCl pH 7,4 und 1,5 M NaCl. Als Detergens wird 0,05 % Triton® X-100 hinzugefügt. Vor dem Waschen wird die Stocklösung 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung und Anreicherung von *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten

In dieser Arbeit wurde der ursprünglich aus Kolumbien stammende FCBR-Stamm von *Plasmodium falciparum* verwendet und kultiviert (Raether *et al.*, 1989). Dafür wurden infizierte Erythrozyten der Blutgruppe A<sup>+</sup> in RPMI 1640-Medium, welches mit

10 % Humanserum der gleichen Blutgruppe versetzt war, und nicht-infizierten Erythrozyten der Blutgruppe A<sup>+</sup> mit einem Hämatokrit von 2 % bei 37 °C inkubiert (Trager und Jensen, 1976). Während der Phase des Ring-Stadiums wurden die infizierten Erythrozyten in unregelmäßigen Abständen wahlweise für 2-4 Stunden bei 4 °C inkubiert oder mit einer L-Alanin-Lösung behandelt, um den Synchronismus der Parasiten zu erhöhen. Dafür wurden die gesamten Erythrozyten für 2 min bei 800 x g sedimentiert, in 5 Vol. L-Alanin-Lösung resuspendiert und für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen in RPMI 1640 Medium gewaschen, um noch vorhandenes L-Alanin zu entfernen (Braun-Breton *et al.*, 1988).

Eine weitere Methode zur Erhöhung des Synchronismus der Parasiten ist die Gelafundin-Sedimentation von Trophozoiten-infizierten Erythrozyten, die gleichzeitig auch zur Anreicherung der mit dem Trophozoiten-Stadium infizierten Erythrozyten verwendet wird (Pasvol *et al.*, 1978). Dabei wurde vor der Ernte zunächst überschüssiges RPS aus der Kulturflasche abgesaugt, die Zellen in einem Rest von RPS resuspendiert und nach Überführung in ein 15 ml Inkubationsröhrchen für 2 min bei 800 x g sedimentiert. Der resultierende Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 6,5 ml Gelafundin-Lösung resuspendiert und für 20 min bei 37 °C im Wasserbad in senkrechter Orientierung inkubiert. Während dieser Inkubationsphase sedimentieren die Trophozoiten-infizierten Erythrozyten wesentlich langsamer als Ring-infizierte oder nicht-infizierte Erythrozyten und werden so von diesen getrennt und dadurch angereichert. Der die angereicherten infizierten Erythrozyten enthaltende Überstand wurde in ein neues Inkubationsröhrchen überführt und für 2 min bei 800 x g sedimentiert. Der resultierende Überstand wurde verworfen, das erhaltene Zellsediment in RPMI 1640-Medium resuspendiert und die angereicherten infizierten Erythrozyten für eine weiterführende Kultivierung oder für die Verwendung in einem Experiment genutzt.

Die Parasitämie wurde in allen Fällen mittels Giemsa-gefärbtem Blutaussstrich ermittelt und lag nach einer Anreicherung über Gelafundin-Sedimentation in der Regel bei 70-95 %. Die Anzahl der Zellen wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 2.2.2 Die Permeabilisierung von Trophozoiten-infizierten Erythrozyten mit Streptolysin O (Ansorge *et al.*, 1996)

Bei Streptolysin O (SLO) handelt es sich um ein Exotoxin Gram-positiver Bakterien mit zytolytischer Aktivität. Dieses Toxin bindet als Monomer an Cholesterol von Membranen verschiedener tierischer Zellen und inseriert in diese (Ohno Iwashita *et al.*, 1991). Durch laterale Diffusion der Monomere kommt es bei einem Aufeinandertreffen zu nicht-kovalenten Interaktionen der Toxine und damit zur Ausbildung oligomerer Ringstrukturen. Diese bestehen aus 50-80 Untereinheiten (Bhakdi *et al.*, 1985) und können eine Pore mit einem Durchmesser von 30 nm umschließen.

Das in dieser Arbeit verwendete SLO wurde für die selektive Permeabilisierung der Plasmamembran von Trophozoiten-infizierten Erythrozyten nach einem in dieser Arbeitsgruppe etablierten Protokoll (Ansorge *et al.*, 1996) eingesetzt. Zur Vorbereitung wurden die iRBC 2x mit 10 Vol. 1x PBS pH 7,3 gewaschen, dabei jeweils für 25 sec bei 10000 x g sedimentiert und die Waschüberstände verworfen. Anschließend wurden pro eingesetzten  $1 \times 10^8$  iRBC 8-16  $\mu$ l SLO verwendet, was 2-4 hämolytischen Einheiten (HE) entspricht. Dabei ist 1 HE als die Menge SLO definiert, bei der 50 % des Hämoglobingehaltes der verwendeten iRBC aus den Zellen austritt (Ansorge *et al.*, 1997). Für eine effektive Permeabilisierung konnten pro Ansatz  $1-4 \times 10^8$  iRBC genutzt werden, Zellzahlen über diese hinaus hätten zur Herabsetzung der Permeabilisierungseffizienz geführt. Die weitere Vorgehensweise wird anhand des Beispiels der Permeabilisierung von  $1 \times 10^8$  iRBC mit 2 HE SLO beschrieben. Nach den vorbereitenden Waschschritten wurden die Zellen in 92  $\mu$ l 1x PBS pH 7,3 resuspendiert und 8  $\mu$ l SLO (entspricht 2 HE) hinzugefügt. Anschließend wurde der Ansatz für 6 min bei RT inkubiert und währenddessen 3x in regelmäßigen Abständen gemischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen innerhalb des Reaktionsgemisches zu gewährleisten. Dann wurden die iRBC für 5 min bei 4000 x g (RT) sedimentiert und die Hälfte des SLO-Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 19000 x g (4 °C) erneut zentrifugiert, um möglicherweise aufgenommene Zellen vollständig zu sedimentieren. Aus dem daraus resultierenden Überstand wurde ein Aliquot erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und als SLO-SNT (SLO-supernatant) für die Analyse der Permeabilisierungseffizienz

aufbewahrt. Das Sediment der permeabilisierten iRBC wurde währenddessen 1x mit 10 Vol. 1x PBS pH 7,3 gewaschen, dabei für 25 sec bei 10000 x g (RT) sedimentiert und der Waschüberstand verworfen. Die daraus resultierenden permeabilisierten iRBC standen dann weiteren Analysen zur Verfügung.

Die Effizienz der Permeabilisierung wurde anhand der Menge des ausgetretenen Hämoglobins gemessen. Dabei wurden iRBC in 10 Vol. 1x PBS pH 7,3 resuspendiert und 3x in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufgetaut. Anschließend wurden die Membranen für 10 min bei 19000 x g sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser stand als Referenzwert für 100 % Permeabilisierungseffizienz. Die Absorptionseigenschaften des aus der SLO-Permeabilisierung resultierenden SLO-Überstandes wurden mit dem Referenzwert bei 412 nm photometrisch bestimmt und miteinander verglichen.

### 2.2.3 Behandlung von iRBC mit Brefeldin A (BFA) oder Cycloheximid (CHX)

Zur Inhibition der Sekretion von Proteinen des Parasiten wurde der Pilzmetabolit Brefeldin A verwendet, welcher in höheren Eukaryoten den Transport von Proteinen zur Plasmamembran verhindert (Doms *et al.*, 1989; Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989), während für die Inhibition der Proteinsynthese das Antibiotikum Cycloheximid verwendet wurde (Siegel und Sisler, 1963).

Die Behandlung von iRBC mit BFA bzw. CHX wurde in der Regel an SLO-permeabilisierten Zellen durchgeführt. Dabei wurde BFA in der Konzentration 5 µg/ml und CHX in der Konzentration 50 µg/ml eingesetzt (Benting *et al.*, 1994). Wichtig war dabei zu beachten, dass ein sichtbarer Effekt erst nach mindestens 15 min Inkubation mit einem dieser beiden Inhibitoren zu beobachten ist, weshalb eine Präinkubation der Zellen bei der Verwendung in einem Translokationsassay notwendig war. Die Inkubation der Zellen mit BFA und/oder CHX wurde bei 37 °C in verschiedenen Puffern oder Medien durchgeführt.

### 2.2.4 Der Translokationsassay

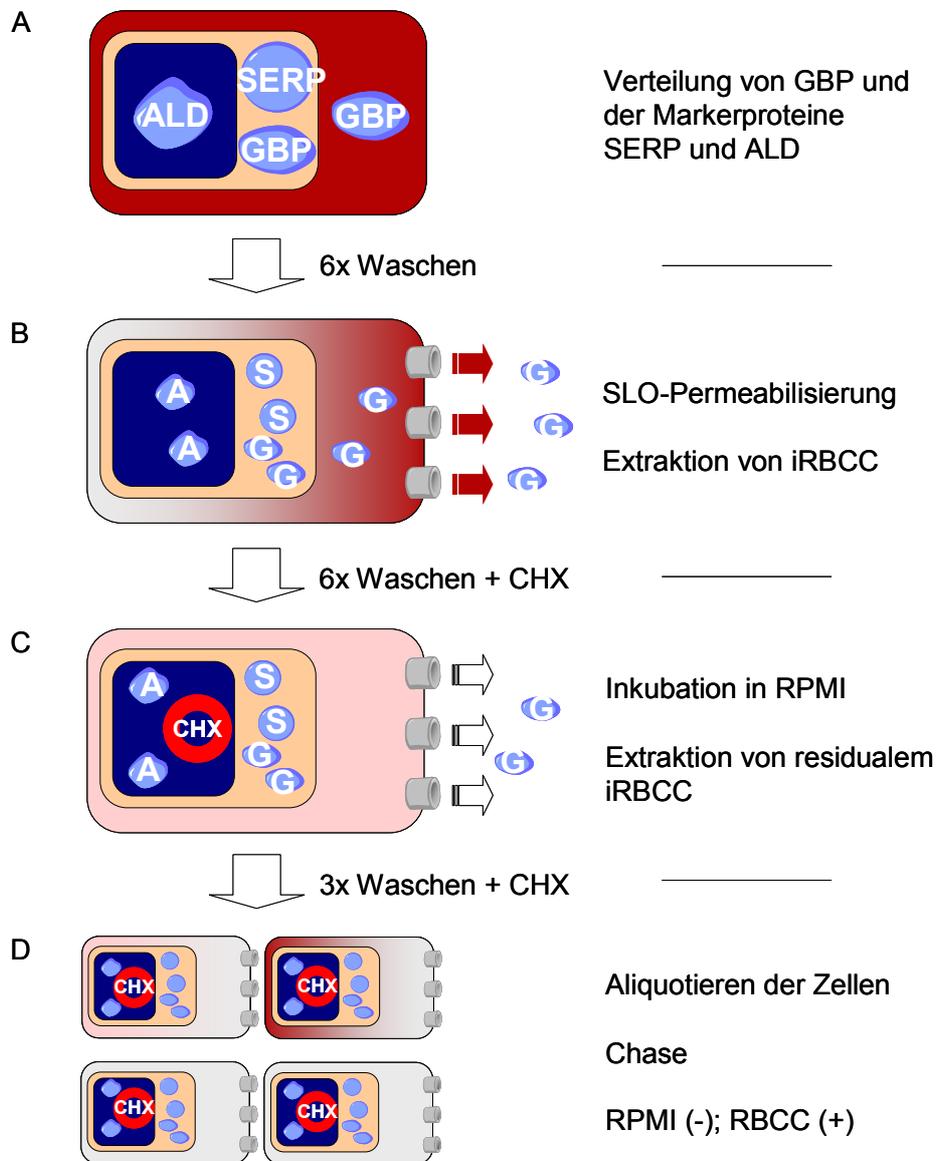
Der von Ansorge *et al.* entwickelte Translokationsassay zur Untersuchung der Eigenschaften des Translokationsprozesses von GBP über die Membran der parasitophoren Vakuole (Ansorge *et al.*, 1996) wurde im Rahmen dieser Arbeit an einigen Stellen im Ablaufprozess modifiziert bzw. erweitert. Die Gründe der Notwendigkeit dafür werden an anderer Stelle erläutert und diskutiert.

Zunächst wurden je nach Bedarf  $4-6 \times 10^8$  iRBC in Aliquots à  $2 \times 10^8$  iRBC geteilt und vorbereitend 6x in 10 Vol. 1x PBS pH 7,3 gewaschen, dabei jeweils 25 sec bei 10000 x g (RT) sedimentiert und die resultierenden Überstände verworfen. Dann wurden die Ansätze in je 168 µl 1x PBS pH 7,3 (+ PIC 1:200) resuspendiert und 32 µl SLO (4 HE) hinzugegeben. Anschließend wurden die Suspensionen für 3 sec gemischt (Vortex Stufe 3) und 6 min bei RT bei regelmäßigem Mischen inkubiert. Es erfolgte die Sedimentation der permeabilisierten iRBC für 5 min bei 4000 x g. Hundert µl der resultierenden Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 19000 x g (4 °C) zentrifugiert, um eventuell aufgenommene Zellen restlos vom Überstand zu trennen. Zuletzt wurden Aliquots à 60 µl in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert. Die Sedimente der permeabilisierten iRBC wurden in je 10 Vol. 1x PBS pH 7,3 (+ PIC 1:200 + 50 µg/ml CHX) resuspendiert und 6x gewaschen, dabei jeweils für 25 sec bei 10000 x g sedimentiert und die Waschüberstände verworfen. Danach wurden die permeabilisierten iRBC in je 200 µl RPMI 1640 (+ PIC 1:200) und 50 µg/ml Cycloheximid resuspendiert und 45 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Schritt diente der Inhibition der Proteinsynthese einerseits und andererseits der Entfernung von residualem GBP aus dem zytosolischem Raum des infizierten Erythrozyten. Dann wurden die Ansätze für 4 min bei 4000 x g (RT) sedimentiert und die resultierenden Inkubationsüberstände verworfen. Die iRBC wurden in je 200 µl 1x PBS pH 7,3 (+ PIC 1:200 + CHX 50 µg/ml) resuspendiert und in einem neuen Reaktionsgefäß zusammengeführt. Danach erfolgte eine neue Sedimentation für 4 min bei 4000 x g (RT). Dieser Schritt gewährleistet die notwendige Voraussetzung, dass im entscheidenden Inkubationsschritt, der Chase-Phase, jeder Ansatz vergleichbar behandelte permeabilisierte iRBC enthält. Die Zellen wurden nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes in 1 x PBS pH 7,3 (+ PIC 1:200 + CHX 50 µg/ml) resuspendiert und auf neue Reaktionsgefäße à  $1 \times 10^8$  iRBC aliquotiert. Anschließend

wurden die Zellen 2x mit 100 µl 1x PBS pH 7,3 (+ PIC 1:200 + CHX 50 µg/ml) gewaschen, dabei jeweils für 4 min bei 4000 x g (RT) sedimentiert und die resultierenden Waschüberstände verworfen. Für den folgenden Chase, bei dem untersucht werden soll, ob und in welchen Quantitäten GBP unter verschiedenen gewählten Bedingungen in den Inkubationsüberstand gelangt, wurden die Ansätze in 100 µl verschiedener Puffer oder Medien (+ PIC 1:200 + CHX 50 µg/ml) resuspendiert. Dabei wurde ein Ansatz für die Bestimmung eines negativen Referenzwertes immer in RPMI 1640 resuspendiert, da unter diesen Bedingungen eine minimale bis keine Translokation von GBP über die PVM in den Inkubationsüberstand stattfindet. Für die Ermittlung eines positiven Referenzwertes wurde ein Ansatz in Erythrozytenzytosol von nicht-infizierten Erythrozyten (1:10 verdünnt in RPMI 1640 = RBCC) resuspendiert, da unter diesen Bedingungen eine maximale Translokationseffizienz zu beobachten ist. Die übrigen Ansätze wurden dann in der Regel in RPMI 1640, RBCC oder 1x PBS pH 7,3 und verschiedenen zu testenden Substanzen resuspendiert. Danach erfolgte die Inkubation für 30 min bei 37 °C (=Chase). Anschließend wurden die Zellen der Ansätze für 5 min bei 4000 x g (RT) sedimentiert und 80 µl der Inkubationsüberstände in neue Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 19000 x g (4 °C) zentrifugiert. Von den resultierenden Überständen wurden 60 µl in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt. Die Zellsedimente wurden 3x in 100 µl 1x PBS pH 7,3 (+ PIC 1:200 + CHX 50 µg/ml) gewaschen, dabei jeweils für 4 min bei 4000 x g sedimentiert und die resultierenden Waschüberstände verworfen. Danach wurden die Zellen der verschiedenen Ansätze in 100 µl 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8 (+ PIC 1:200) resuspendiert und 3x für je 30 sec in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufgetaut. Die Membranen wurden folgend für 20 min bei 36000 x g (4 °C) sedimentiert und 60 µl der resultierenden Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Analyse der Translokationseffizienz unter verschiedenen Bedingungen wurden die bei den Experimenten erhaltenen Protein-Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch anschließendem Western-Blot auf die Verteilung der Proteine GBP, SERP und Aldolase innerhalb der verschiedenen Fraktionen untersucht. Die Bandenintensitäten von GBP wurden durch das Programm Image J quantifiziert und ausgewertet. Die Verteilung von SERP diente als Kontrolle für die Integrität der PVM

während des experimentellen Verlaufs, die der Aldolase für die Integrität der Plasmamembran des Parasiten (PPM).



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung des optimierten Translokationsassays.** (A) Zeigt eine Übersicht der Verteilung der Markerproteine Aldolase (ALD/A), SERP (S) und GBP (G). (B) Die iRBC werden nach intensivem Waschen mit 4 hämolytischen Einheiten SLO permeabilisiert und das Zytosol des infizierten Erythrozyten (iRBCC) extrahiert. (C) Die Zellen werden nach 6maligem Waschen in Anwesenheit von Cycloheximid (CHX) für 45 min in RPMI + CHX inkubiert, um die Proteinsynthese des Parasiten zu inhibieren und das verbliebene, zytosolische GBP aus den permeabilisierten iRBC zu entfernen. (D) Nach Waschen und Aliquotieren der Zellen wird der Chase für 30 min in Anwesenheit verschiedener Medien, CHX und Additiva durchgeführt, um den Einfluss dieser auf die Translokationsaktivität von GBP über die PVM zu analysieren.

### 2.2.5 Trypsin-Behandlung von SLO-permeabilisierten iRBC

Der proteolytische Verdau von Proteinen durch Trypsin wurde in erster Linie an SLO-permeabilisierten iRBC durchgeführt, um noch vorhandene lösliche Proteine aus dem Erythrozytenzytosol bzw. membranassoziierte oder auch integrale Membranproteine der Wirtszellmembran (RBCM = Red Blood Cell Membrane) und der PVM auf seiner zytosolischen Seite zu entfernen oder ihrer Funktionalität zu berauben.

Dabei wurden pro Ansatz  $2 \times 10^8$  iRBC nach den vorbereitenden Waschschritten zunächst nach Punkt 2.2.2 mit 4 HE SLO permeabilisiert und sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen 6x mit 1x PBS pH 7,3 gewaschen, dabei jeweils für 25 sec bei 10000 x g sedimentiert und die resultierenden Waschüberstände verworfen. Bei einer direkt folgenden Trypsin-Behandlung enthielt der PBS-Puffer keinen PIC 1:200. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Zellen in 200  $\mu$ l 1x PBS pH 7,3 + 200 ng/ml Trypsin resuspendiert und 10 min bei 37 °C unter horizontaler Agitation (Thermomixer Stufe 6) inkubiert. Dann wurden 100  $\mu$ l 1x PBS pH 7,3 + 400 ng/ml Trypsin-Inhibitor zugefügt, die Zellen erneut resuspendiert und folgend für 5 min bei 4000 x g (RT) sedimentiert. Der resultierende Inkubationsüberstand wurde verworfen und die Zellen 2x mit 100  $\mu$ l 1x PBS pH 7,3 + 400 ng/ml Trypsin-Inhibitor gewaschen, dabei für jeweils 5 min bei 4000 x g sedimentiert und die resultierenden Waschüberstände verworfen. Das resultierende Zellsediment konnte danach für weitere Analysen benutzt werden.

Bei einer Trypsin-Behandlung von SLO-permeabilisierten iRBC, die anschließend für den Translokationsassay verwendet werden sollten, wurden die Zellen nach Permeabilisierung mit PBS-Puffer gewaschen, der PIC 1:200 enthielt. Danach wurden die Zellen in 200  $\mu$ l RPMI 1640 (+ PIC 1:200 + CHX 50  $\mu$ g/ml) resuspendiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen für 4 min bei 4000 x g (RT) sedimentiert und der Inkubationsüberstand verworfen. Folgend wurden die Zellen 1x in 1x PBS pH 7,3 (+ CHX 50  $\mu$ g/ml) gewaschen, dabei für 4 min bei 4000 x g (RT) sedimentiert und der resultierende Überstand verworfen. Die Zellen wurden dann in 200  $\mu$ l 1x PBS pH 7,3 (+ CHX 50  $\mu$ g/ml) + 200 ng/ml Trypsin resuspendiert und wie oben bereits beschrieben behandelt. Die Waschschriffe mit dem Trypsin-Inhibitor enthielten ebenfalls CHX in der angegebenen Konzentration. Nach der Trypsin-Behandlung wurden die Zellen, wie in Punkt 2.2.4 beschrieben, weiter verwendet.

### 2.2.6 Präparation einer "Ghost"-Fraktion durch Lyse von iRBC

Die Ghost-Fraktionierung ist eine Methode zur Trennung der Plasmamembran des infizierten Erythrozyten (iRBCM) von den übrigen Membranen, in diesem Falle PVM und PPM (Blisnick *et al.*, 2000). Dabei wurden pro Ansatz  $4 \times 10^8$  iRBC in 10 Vol. 5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 8 lysiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Membranen für 20 min bei  $16500 \times g$  ( $4^\circ\text{C}$ ) sedimentiert und der resultierende Überstand mit den enthaltenen löslichen Proteinen verworfen. Danach wurden die oberen ca. 50 % der erhaltenen Ghost-Fraktion in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 3x mit  $500 \mu\text{l}$  5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 8 gewaschen. Dabei wurde die Ghost-Fraktion für je 20 min bei  $16500 \times g$  sedimentiert und die resultierenden Waschüberstände verworfen. Währenddessen wurden von der übrigen Membran der Rest der Ghost-Fraktion sowie ca. 50 % der Nicht-Ghost-Fraktion verworfen. Das verbliebene Membran-Sediment wurde wie die Ghost-Fraktion gewaschen. Nach Erhalt der Ghost- und Nicht-Ghost-Fraktion wurden beide in ein definiertes Volumen 2x Probenpuffer aufgenommen und 12 min bei  $95^\circ\text{C}$  erhitzt. Als Vergleichsfraktion wurde eine Gesamtmembran-Fraktion von  $4 \times 10^8$  iRBC hergestellt.

Zur Analyse der Verteilung verschiedener interessierender Proteine in Ghost-Fraktion (RBCM) und Nicht-Ghost-Fraktion (PVM/PPM) wurde zunächst das Verhältnis von Zelläquivalent zu Probenvolumen für jede Fraktion bestimmt, um vergleichbare Mengen für die Analysen verwenden zu können. Dabei wurde davon ausgegangen, dass bestimmte Markerproteine wie Glykophorin nur in der RBCM und damit der Ghost-Fraktion vorkommen, während ein anderes, in diesem Fall Exp-1, nur in der Nicht-Ghost-Fraktion (PVM) vorkommt. Folglich wurden die Bandenintensitäten dieser Markerproteine gegen die Bandenintensitäten eines definierten Zelläquivalents der Gesamtmembran-Fraktion titriert, um so das Verhältnis Zelläquivalent/Probenvolumen für Ghost- und Nicht-Ghost-Fraktion bestimmen zu können. Anschließend wurde anhand der Verteilung weiterer Markerproteine das Ergebnis überprüft und zum Schluß auf die Verteilung der interessierenden Proteine innerhalb der beiden Fraktionen analysiert.

### 2.2.7 Immunpräzipitation von Proteinen mittels spezifischer Antikörper

Die Immunpräzipitation diente zur Isolation von radioaktiv markierten Proteinen für eine anschließende Autoradiographie oder zur quantitativen Reduktion eines Proteins aus unterschiedlichen gewonnenen Zellfraktionen.

Für eine Autoradiographie von GBP wurde in der Regel pro Ansatz ein Zelläquivalent von  $2 \times 10^7$  iRBC einer Proteinfraction in 450  $\mu$ l Solubilisierungspuffer (+ PIC 1:200) aufgenommen und 5  $\mu$ l Antiserum zugefügt. Der Ansatz wurde anschließend für mind. 1 h bei RT auf einem Taumel-Rollmischer inkubiert. Nach Inkubation mit dem gegen das interessierende Protein spezifisch gerichteten Antikörper wurden 40  $\mu$ l Protein A Sepharose Beads (50 % Beads in Solubilisierungspuffer) zugefügt und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Hier wurde die Inkubationszeit auf maximal 1 h RT ausgedehnt. Während dieser Zeit bindet das Protein A der Beads an den  $F_c$ -Teil des Antikörpers, der im besten Fall vorher das Zielprotein gebunden hat. Danach wurden die Beads für 2 min bei 4000 x g sedimentiert und der resultierende Inkubationsüberstand wahlweise verworfen oder bei -20 °C aufbewahrt. Die Beads wurden folgend mit je 500  $\mu$ l Waschpuffer IP A-C gewaschen, dabei jeweils für 5 min RT bei horizontaler Agitation inkubiert, anschließend für 2 min bei 4000 x g sedimentiert und die resultierenden Waschüberstände wahlweise verworfen oder bei -20 °C aufgehoben. Zum Schluß wurden die Beads in 2x Probenpuffer aufgenommen und für 12 min bei 95 °C zur Elution des Proteins erhitzt.

Für die quantitative Reduktion des humanen Proteins Hsp70 aus dem Zytosol von nicht-infizierten Erythrozyten wurde ein Zelläquivalent von  $3 \times 10^8$  des Zytosols (1:10 in RPMI 1640 verdünnt) mit 7  $\mu$ l des Antiserums für 1,5 h bei RT auf einem Taumel-Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurde das Inkubationsgemisch in ein neues Reaktionsgefäß mit 30  $\mu$ l gepackten Protein G Sepharose Beads überführt und eine weitere Stunde bei RT inkubiert. In diesem Fall wurden Protein G gekoppelte Beads verwendet, da es sich um monoklonale IgG der Maus handelt und das Protein G zu diesen eine höhere Affinität besitzt. Nach der Inkubation wurden die Beads für 2 min bei 4000 x g sedimentiert und, wie bereits beschrieben, gewaschen. Der Inkubationsüberstand wurde weiteren Präzipitationsschritten unterzogen, um die Reduktion der Proteinmenge des humanen Hsp70 unter den gewählten Bedingungen zu maximieren.

Für die quantitative Reduktion der Immunglobuline G aus einem Kaninchen-Antiserum wurden 2 µl Antiserum 1:50 in RPMI verdünnt und in zwei aufeinanderfolgenden Schritten mit je 25 µl Protein A Sepharose Beads für jeweils 1, 5 h auf einem Taumel-Rollenmischer bei RT inkubiert. Die Beads wurden, wie bereits beschrieben sedimentiert, und der Inkubationsüberstand (RPMI+Serumproteine) für weitere Analysen verwendet.

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

Die sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteingemischen, wobei die enthaltenen Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität separiert werden. Diese wird durch die molekulare Masse, Aminosäurezusammensetzung, posttranslationale Modifikationen und Proteinfaltung beeinflusst. Die aus verschiedenen Experimenten gewonnenen Protein-Fractionen wurden in der Regel 1:1 mit 2x Probenpuffer versetzt und 12 min bei 95 °C erhitzt, um eine nahezu vollständige Denaturierung der enthaltenen Proteine zu ermöglichen und eine gleichmäßige Beladung mit SDS-Molekülen zu gewährleisten. Das SDS als anionisches Detergenz dient dabei der Auflösung von sekundären und tertiären Molekülstrukturen und verleiht den Proteinen eine negative Ladung in Relation zur Molekülgröße. Das im Probenpuffer vorhandene DTT unterstützt die Denaturierung der Proteine durch Reduktion von Disulfidbrücken, wodurch tertiäre und quartäre Strukturen aufgelöst werden können. Für die Analyse der Verteilung von verschiedenen interessierenden Proteinen innerhalb der Proteingemische wurden verschiedene Porengrößen der Polyacrylamid-Gele verwendet.

### 2.2.9 Vorbereitung von SDS-Gelen für die Autoradiographie

Zunächst wurde das Gel für 2 h in Coomassie-Färbelösung inkubiert, um die Größenstandards im Gel sichtbar zu machen. Nach Dekantierung der Färbelösung wurde das Gel wahlweise für weitere 2 h oder über Nacht in Coomassie-Entfärbelösung inkubiert, um nicht-proteingebundenes Coomassie aus der Gelmatrix

zu entfernen. Anschließend wurde das Gel auf zwei Whatman-Filterpapiere gelegt, mit Frischhaltefolie abgedeckt und für 1 h unter Vakuum und angeschalteter Heizung getrocknet. Danach wurde die Folie wieder entfernt, das getrocknete Gel in einer Filmkassette mit Klebestreifen fixiert und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Belichtung fand über einen Zeitraum von einem bis mehreren Tagen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  statt.

### 2.2.10 Immunoblotting (Towbin *et al.*, 1979)

Das in dieser Arbeit verwendete Semi-Dry Blotverfahren diente zum Transfer und zur Fixierung von Proteinen aus einer Gelmatrix auf eine aus Nitrocellulose bestehende Träger-Membran. Als Strombrücke zwischen Kathode und Anode dienten in Transferpuffer eingelegte Whatman-Filterpapiere. Die verwendete Stromstärke und Transferdauer richtete sich nach den später zu detektierenden Proteinen, wobei für die relevanten Proteine in der Regel eine Stromstärke von  $1\text{ mA/cm}^2$  bei einer Transferdauer von 60 min gewählt wurde.

Nach Ablauf des Transfers wurde die Trägermembran für wenige Minuten in einer Ponceau S-Lösung inkubiert, um die Probenspuren und Größenstandards sichtbar zu machen, was durch die vorhandene denaturierende TCA unterstützt wurde. Die Färbung wurde anschließend durch Waschlösung ohne Detergenz entfernt und die Nitrocellulose-Membran für 60 min bei RT in 5 %iger Blockmilch-Lösung inkubiert, um noch vorhandene Proteinbindungsstellen abzudecken. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem gegen das interessierende Protein spezifisch gerichteten Antikörper für wahlweise 2 h RT oder über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die Antikörper-Lösung wurde dann zur Wiederverwendung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und die Trägermembran von restlicher Antikörperlösung durch die Verwendung von Waschlösungen befreit. Dabei wurde die Membran zunächst für 5 min bei RT mit Waschlösung + TX-100 und danach 2x mit Waschlösung ohne Zusatz auf einem Wipp-Mischer inkubiert. Die jeweiligen Waschlösungen wurden verworfen. Folgend wurde die Nitrocellulose-Membran für 2 h mit einer sekundären Antikörper-Lösung inkubiert, wobei der enthaltene Antikörper den primären Antikörper spezifisch erkennt und bindet. Nach der Inkubation wurde die Membran, wie bereits beschrieben, gewaschen und stand der Detektionsreaktion zur Verfügung. In der Regel wurden in dieser Arbeit horseradish peroxidase (HRP, Meerrettich-Peroxidase) konjugierte, sekundäre Antikörper verwendet, mit denen das interessierende Protein indirekt durch

Chemilumineszenz nachgewiesen werden konnte (Ogata *et al.*, 1983). Dabei wurde die Membran nach kurzem Antrocknen für 90 sec mit ECL-Reagenz benetzt. Anschließend wurde die ECL-Lösung entfernt, die Membran mit einer Klarsicht-Folie abgedeckt und durch die entstehende Chemilumineszenz Röntgenfilme belichtet und zuletzt entwickelt.

### 2.2.11 Analyse mit ImageJ

Für die Auswertungen der Translokationsassays wurden die Intensitäten der durch Western-Blot visualisierten Proteinbanden von GBP mit der Analysesoftware ImageJ quantifiziert. Dazu wurde der zuvor im JPEG-Format digitalisierte Röntgenfilm des Western-Blots in genanntem Programm geöffnet, in ein 8-Bit Graustufen-Format umgewandelt und der Hintergrund minimiert. Danach wurde zur optimalen Kontrastierung der Banden das Bild invertiert, so dass die Banden weiß vor einem schwarzen Hintergrund erscheinen. Zuletzt wurden die Grenzen der einzelnen Banden markiert (ROI = Region Of Interest) und die Intensität der markierten Bande kalkuliert.

Für jeden einzelnen im Translokationsassay analysierten Ansatz wurden die Werte der Bandenintensitäten aus Pelletfraktion und Inkubationsüberstand addiert und dem Wert 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden damit die prozentualen Werte der einzelnen Fraktionen ermittelt und die dadurch erhaltene prozentuale Verteilung des Proteins GBP in den einzelnen Fraktionen eines Ansatzes in einem Balkendiagramm graphisch dargestellt. Bei Durchführung mehrerer Versuche zur Reproduktion der erhaltenen Daten wurden die entsprechenden Mittelwerte mit korrespondierender Standardabweichung ermittelt.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Der Translokationsassay

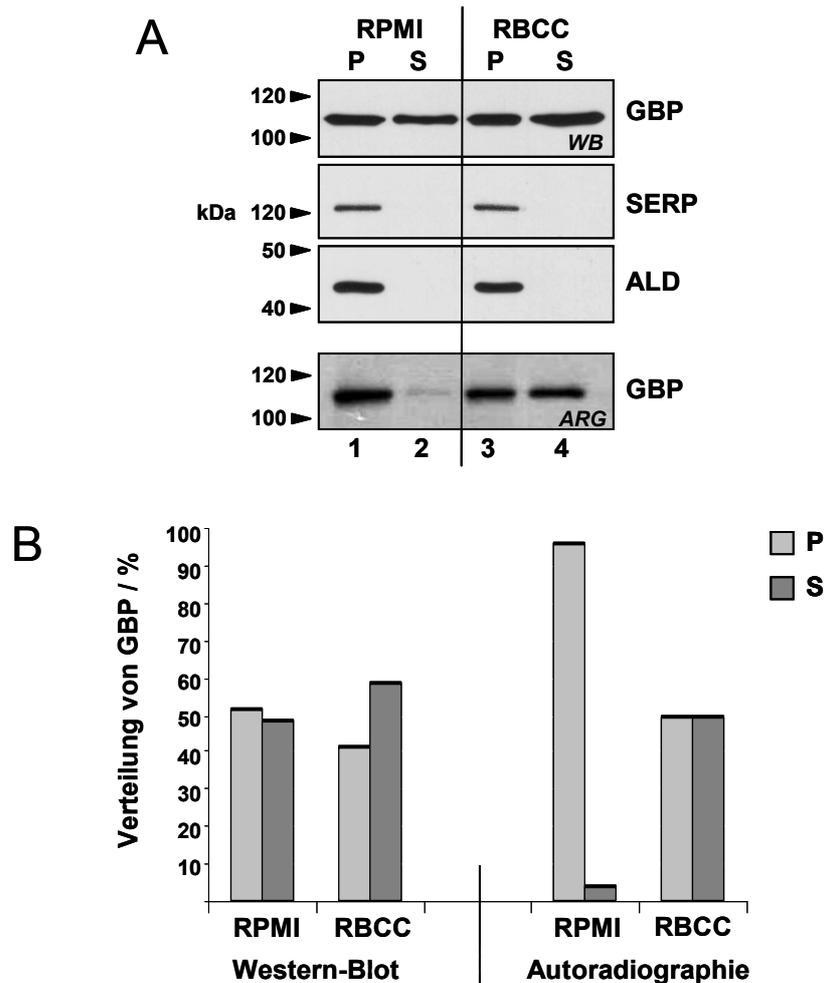
Die von Ansorge *et al.* 1996 durchgeführten Transportstudien am Translokationsvorgang des Glykophorin-bindenden Proteins (GBP) über die PVM basierten auf Pulse-Chase Experimenten, in denen die Effizienz der Translokation des Proteins unter gewählten Bedingungen mittels Autoradiographie visualisiert werden konnte. Die drei essentiellen Schritte des experimentellen Ablaufs waren die SLO-Permeabilisierung, die radioaktive Markierung des Proteins und die Präzipitation desselben unter Verwendung eines gegen das Protein gerichteten polyklonalen Antikörpers. Einen erheblichen Schwachpunkt stellt dabei die Immunpräzipitation des Proteins GBP dar. So wurden die Protein A-Sepharose Beads, an die der Antikörper mit dem Zielprotein bindet, am Ende der Prozedur in Probenpuffer aufgenommen und aufgeköcht, um durch die Denaturierung die Bindung zwischen Protein A und Antikörper bzw. Antikörper und GBP zu zerstören und so das GBP in die Probenpuffer-Lösung zu entlassen, damit es für die spätere Autoradiographie mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden konnte. Eigens durchgeführte Experimente haben allerdings gezeigt, dass unter den gewählten Bedingungen ein nicht zu vernachlässigender Anteil des Proteins GBP nicht von den Beads zu lösen war und somit auch nicht in der Autoradiographie berücksichtigt wurde. Darüber hinaus waren die Mengen des an den Beads verbleibenden GBPs häufig sehr unterschiedlich, so dass auch die Kontrollen zur Richtwertbestimmung für Arretierung und Rekonstitution der Translokation oft nicht die erwartete Verteilung des radioaktiv-markierten GBPs in den zu untersuchenden Fraktionen gezeigt hat. Diese Tatsache macht deutlich, warum mehrfach durchgeführte Experimente unter Verwendung des Pulse-Chase Assays zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können bzw. nicht auswertbar sind, wenn die Kontrollen nicht die erwartete Verteilung des Proteins zeigen, obwohl eine Arretierung bzw. Rekonstitution der Translokation von GBP über die PVM stattgefunden hat. Eine Alternative zur radioaktiven Markierung von GBP mit anschließender Immunpräzipitation ist die Visualisierung der Verteilung von GBP in den zu untersuchenden Fraktionen mittels Western-Blot Detektion. Dies hat den Vorteil, dass die Gesamtmenge des

synthetisierten GBPs eines definierten Zelläquivalents betrachtet werden kann und so die Verteilung von GBP in den untersuchten Fraktionen nicht durch weitere präparative Schritte beeinflusst wird.

### 3.1.1 Die Verteilung von GBP in Autoradiographie und Western-Blot nach Pulse-Chase Assay

Um zu untersuchen, ob die von Ansorge *et al.* im Pulse-Chase Assay erhobenen Daten zur Arretierung und Rekonstitution der Translokationsaktivität von GBP, visualisiert durch Autoradiographie, auch durch die Visualisierung mittels Western-Blot wiedergegeben werden können, wurde ein Pulse-Chase Experiment wie in Ansorge *et al.* (1996) durchgeführt und die Verteilung von GBP in den erhaltenen Fraktionen einerseits durch Autoradiographie, andererseits durch Western-Blot Analyse gezeigt.

Dafür wurden  $2 \times 10^8$  iRBC mit 2 HE SLO permeabilisiert und 1x in Methionin-freiem RPMI gewaschen. Anschließend wurden die Proteine der Zellen für 45 Minuten metabolisch markiert (Pulse) und erneut gewaschen. Für den Chase wurden die Zellen auf zwei Ansätze à  $1 \times 10^8$  iRBC aliquotiert und für weitere 45 Minuten in RPMI bzw. RBCC inkubiert. Nach Erhalt der Überstände (S) und der löslichen Proteine (P) der jeweiligen erneut 1x mit RPMI gewaschenen Zellsedimente wurden die Proteine der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Verteilung der Proteine GBP, SERP und ALD durch Western-Blotting visualisiert. Zur Analyse der Verteilung des radioaktiv markierten GBP wurde eine Immunpräzipitation des Proteins aus jeweils  $2 \times 10^7$  iRBC Zelläquivalent der erhaltenen Fraktionen durchgeführt. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und von dem anschließend getrockneten Gel eine Autoradiographie entwickelt. Die Bandenintensitäten des Proteins GBP von Autoradiographie und Western-Blot wurden mit der Analyse-Software ImageJ quantifiziert und ausgewertet.



**Abb. 3.1: Vergleich der GBP-Verteilung nach Pulse-Chase Assay in WB und ARG nach Ansorge et al. (1996).** Trophozoiten-infizierte Erythrozyten wurden mit 2 HE SLO permeabilisiert, die Proteine für 45 min in Met-freiem RPMI und 100  $\mu$ Ci L-Methionin [ $^{35}$ S] metabolisch markiert und die Zellen anschließend in RPMI oder RBCC für weitere 45 min inkubiert. **(A)** Western-Blot (WB) und Autoradiographie (ARG) zur Visualisierung der Verteilung von GBP (7,5 %iges SDS-Gel), SERP und ALD (10 %iges SDS-Gel). **(WB)** Auftrag pro Spur:  $1 \times 10^7$  Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen- $\alpha$ -GBP, Kaninchen- $\alpha$ -SERP, Kaninchen- $\alpha$ -ALD; 2. Ak Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP). **(ARG)** Auftrag pro Spur:  $2 \times 10^7$  Zelläquivalent nach IP von GBP. **(B)** Verteilung von GBP in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Für jeden einzelnen im Translokationsassay analysierten Ansatz wurden die Werte der Bandenintensitäten aus Pelletfraktion und Inkubationsüberstand addiert und dem Wert 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden damit die prozentualen Werte der einzelnen Fraktionen ermittelt und die dadurch erhaltene prozentuale Verteilung des Proteins GBP in den einzelnen Fraktionen eines Ansatzes in einem Balkendiagramm graphisch dargestellt. Abk.: **P** (Pellet = lösliche Proteine aus Parasit und parasitophore Vakuole), **S** (Supernatant = lösliche Proteine aus Inkubationsüberstand).

Die Abbildung 3.1 A zeigt die Western-Blot Detektion der Verteilung der Proteine GBP, SERP und ALD. SERP und ALD können aufgrund ihrer bekannten Lokalisation als Markerproteine zur Untersuchung der Integrität der Membranen PVM bzw. PPM während der Chase-Phase des Experimentes verwendet werden. Eine sinnvolle Analyse der GBP-Verteilung ist nur möglich, wenn diese ausschließlich in den P-Fractionen der einzelnen Ansätze zu detektieren sind. Einer Detektion dieser

Proteine in den S-Fractionen ist in aller Regel eine Ruptur der beiden genannten Membranen vorausgegangen. Da bei diesem Experiment die beiden Kontroll-Proteine ausschließlich in den P-Fractionen detektiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die PVM als auch die PPM intakt geblieben sind. Der Vergleich von Autoradiographie und Western-Blot zeigt in der Verteilung von GBP in den Fractionen der einzelnen Ansätze deutliche Unterschiede. In den Spuren 3 und 4 ist zu sehen, dass innerhalb der Inkubationsdauer der permeabilisierten iRBC in RBCC das neu synthetisierte, radioaktiv markierte GBP über die PVM transportiert wird, was sich auch in der Betrachtung der Verteilung von GBP in der Western-Blot Analyse widerspiegelt. In den Spuren 1 und 2 zeigt die Inkubation der permeabilisierten iRBC in Anwesenheit von RPMI in der Autoradiographie eine deutliche Arretierung der Translokationsaktivität, das radioaktiv markierte GBP wird nicht über die PVM in das umgebende Medium transloziert. Die Western-Blot Analyse hingegen zeigt eine deutliche Bande in Spur 2 des RPMI-Ansatzes, was auf eine durchaus vorhandene Translokationsaktivität in Anwesenheit von RPMI schließen lässt. Die Auswertung der Bandenintensitäten in Abbildung 3.1 B gibt an, dass 4 % des neu synthetisierten, radioaktiv markierten GBP in Anwesenheit von RPMI transloziert werden, während im Gegensatz dazu 48 % der Gesamtmenge von GBP über die PVM transportiert werden. Darüber hinaus zeigt die Western-Blot Analyse bei der Inkubation der SLO-permeabilisierten iRBC in Anwesenheit von RBCC eine höhere Translokationsaktivität im Vergleich zur Autoradiographie. Dieser Widerspruch macht eine genauere Analyse der Voraussetzungen für die Translokation über die PVM notwendig, da auch das Ersetzen des Zytosols der infizierten Zelle durch RPMI scheinbar zu keiner Arretierung des Transports von GBP über die PVM führt.

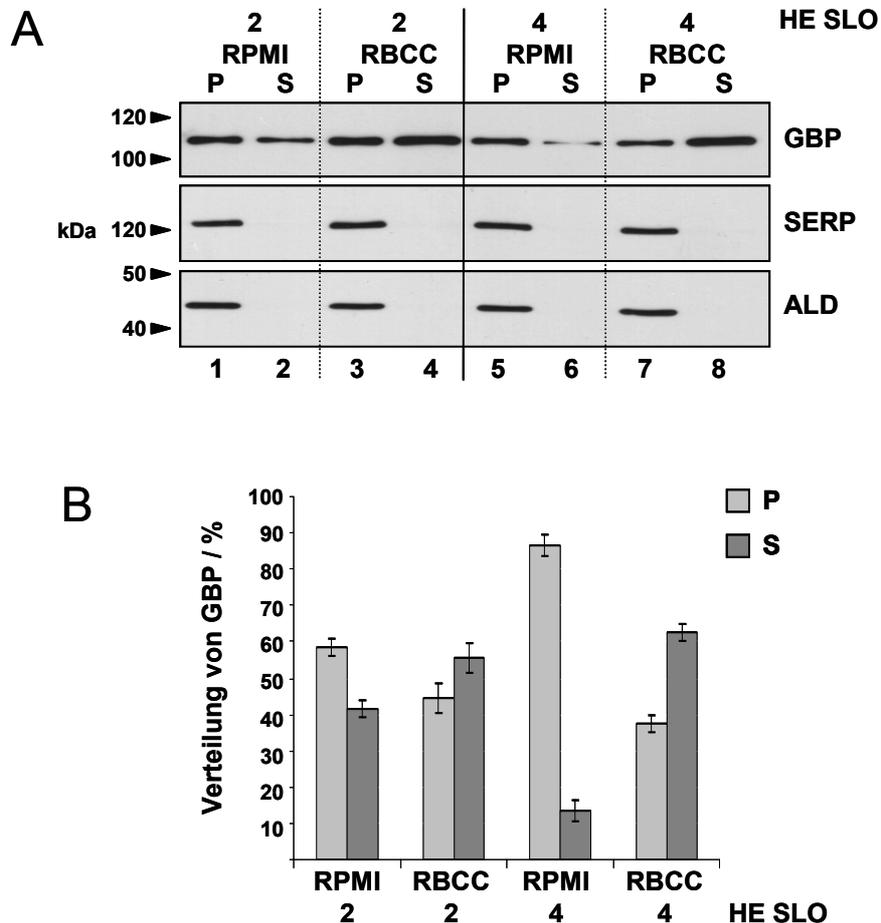
#### 3.1.2 Die Verteilung von GBP im Translokationsassay ist von der gewählten SLO-Konzentration und der Wasch-Stringenz abhängig

Als Voraussetzung für die Arretierung der Translokation von radioaktiv markiertem GBP über die PVM durch die Anwesenheit von RPMI gilt, dass durch die Permeabilisierung der Erythrozytenmembran mit Streptolysin O ein effizienter Austausch des Erythrozytenzytosols mit RPMI durchgeführt werden kann. Dabei spielt die verwendete Konzentration von SLO eine entscheidende Rolle.

Um die Möglichkeit zu untersuchen, dass dieses bei dem vorherigen Experiment nicht der Fall war, wurde der Einfluss der gewählten SLO-Konzentration und einer erhöhten Wasch-Stringenz auf die Verteilung von GBP im Western-Blot nach Durchführung eines Translokationsassays getestet. Dazu wurden 2 Ansätze à  $2 \times 10^8$  iRBC mit 2 bzw. 4 HE SLO permeabilisiert und die Zellen nach Entfernung des Inkubationsüberstandes 6x anstatt 1x mit RPMI gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 45 min in RPMI inkubiert, um die Pulse-Phase zu simulieren. Dann wurden die Zellen nach Entfernung der Inkubationsüberstände 3x anstatt 1x mit RPMI gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen der beiden Ansätze geteilt und jeweils in Anwesenheit von RPMI oder RBCC für weitere 45 Minuten inkubiert (Chase). Nach Erhalt der Überstände (S) und der löslichen Proteine (P) der jeweiligen erneut 3x mit RPMI gewaschenen Zellsedimente wurden die Proteine der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Verteilung der Proteine GBP, SERP und ALD durch Western-Blotting visualisiert und quantifiziert.

Die Abbildung 3.2 A zeigt einen repräsentativen Western-Blot von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Betrachtet man die Verteilung von GBP in den Fraktionen der jeweiligen in RPMI und RBCC inkubierten Ansätze, so zeigt besonders der Vergleich der RPMI-Ansätze in den Spuren 1 und 2 bzw. 5 und 6 die deutlichsten Unterschiede, was auch die statistische Auswertung in Abbildung 3.2 B dokumentiert. So ist nach Permeabilisierung der iRBC mit 2 HE SLO und dem Chase in RPMI durchschnittlich 42 % der Gesamtmenge von GBP im Inkubationsüberstand zu detektieren, während nach Verwendung von 4 HE SLO nur ca. 13 % der Gesamtmenge von GBP in den Überstand gelangt sind. Die Permeabilisierung mit unterschiedlichen SLO-Konzentrationen führte nach dem Chase in RBCC zu keinen wesentlichen Unterschieden, wie der Vergleich der Spuren 3 und 4 mit 7 und 8 zeigt. So gelangten nach Permeabilisierung mit 2 HE SLO durchschnittlich 55 % GBP durch Inkubation in RBCC in den Überstand, bei der Verwendung von 4 HE SLO waren es ca. 63 %. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass auch bei Betrachtung der gesamten Proteinmenge von GBP eine Arretierung der Translokation über die PVM in Anwesenheit von RPMI stattfindet, wie dies bereits für neu synthetisiertes, radioaktiv markiertes GBP im Pulse-Chase Assay gezeigt wurde. Allerdings sind für die Analyse der Translokation von GBP bei Betrachtung der gesamten Proteinmenge zusätzliche Parameter zu berücksichtigen. So kann nur die Verwendung von mindestens der zweifachen Konzentration an SLO, bezogen auf die Menge, die für

die Freisetzung von 100 % des Hämoglobingehaltes von iRBC notwendig ist, bei gleichzeitig drastischer Erhöhung der Waschfrequenz zwischen den einzelnen Inkubationsschritten die Arretierung der Translokation von GBP in Anwesenheit von RPMI mittels Western-Blot visualisiert werden.



**Abb. 3.2: Einfluss der SLO-Konzentration und Wasch-Stringenz auf die GBP-Verteilung nach kaltem Chase im WB.** Trophozoiten-infizierte Erythrozyten wurden mit je 2 oder 4 HE SLO permeabilisiert, für 45 min in RPMI inkubiert und die Zellen anschließend in RPMI oder RBCC für weitere 30 min inkubiert. **(A)** Western-Blot (WB) zur Visualisierung der Verteilung von GBP (7,5 %iges SDS-Gel), SERP und ALD (10 %iges SDS-Gel). Auftrag pro Spur:  $1 \times 10^7$  Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen- $\alpha$ -GBP, Kaninchen- $\alpha$ -SERP, Kaninchen- $\alpha$ -ALD; 2. Ak Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP). **(B)** Verteilung von GBP in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Für jeden einzelnen im Translokationsassay analysierten Ansatz wurden die Werte der Bandenintensitäten aus Pelletfraktion und Inkubationsüberstand addiert und dem Wert 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden damit die prozentualen Werte der einzelnen Fraktionen und die Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Abk.: **P** (Pellet = lösliche Proteine aus Parasit und parasitophore Vakuole), **S** (Supernatant = lösliche Proteine aus Inkubationsüberstand).

Werden diese Parameter nicht beachtet, so wird der Translokationsassay nicht auswertbar, da residuales GBP durch unzureichende Permeabilisierung bzw. Waschschrte innerhalb des Erythrozyten verbleibt und den Inkubationsüberstand für den negativen Referenzwert (RPMI) im Chase kontaminiert.

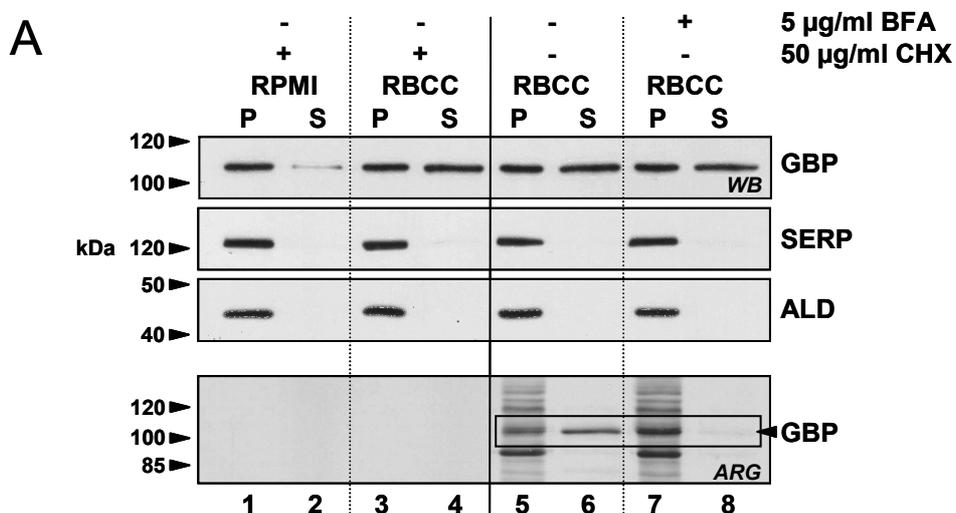
### 3.1.3 Die Verwendung von CHX ermöglicht die Analyse der Translokation über die PVM

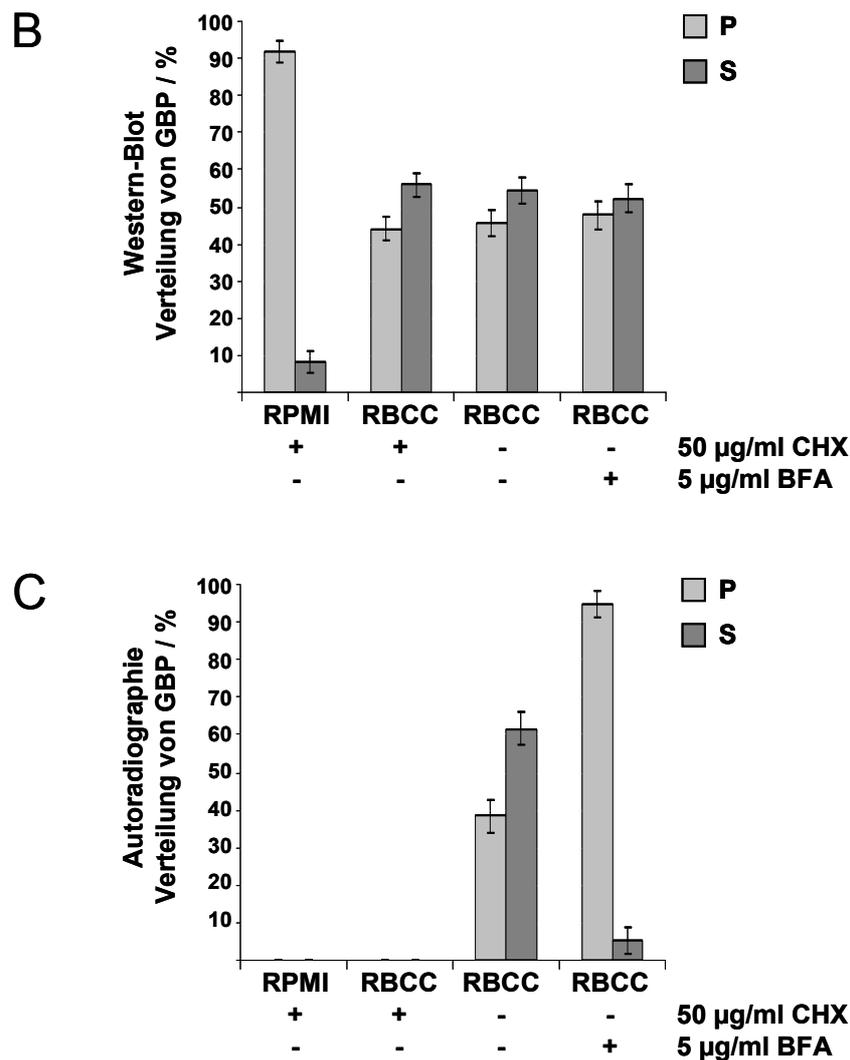
Bisher konnte gezeigt werden, dass die Arretierung des Transportvorganges über die PVM auch bei der notwendigen Betrachtung der GBP-Gesamtpopulation mittels Western-Blot visualisiert werden kann. Allerdings ist noch nicht geklärt, ob während der Inkubation der SLO-permeabilisierten iRBC in RBCC und dem damit einhergehenden Transport von GBP in den Inkubationsüberstand die Translokation aufgrund von zugeführten Faktoren stattfindet, die exklusiv für die Translokation des Proteins über die PVM notwendig sind oder zusätzlich auch für den Transport aus dem Parasiten in das Lumen der Vakuole verantwortlich sind. Es ist zwar bekannt, dass GBP innerhalb des infizierten Erythrozyten eine duale Verteilung besitzt und quantitativ in der parasitophoren Vakuole und dem Erythrozytenzytosol vorkommt (Ansong *et al.*, 1996), doch ist es durchaus vorstellbar, dass während der zeitaufwändigen Vorbereitungsprozedur der iRBC für die Chase-Phase des Translokationsassays GBP synthetisiert wird, aber aufgrund bestimmter fehlender Faktoren, die der Parasit aus dem Zytosol des Erythrozyten beziehen könnte, nicht mehr aus dem Parasiten exportiert wird und dort akkumuliert. Erst die Zuführung solcher Faktoren durch die Inkubation in RBCC könnte den Export des Proteins in die parasitophore Vakuole zulassen, während wiederum andere die Translokation über die PVM ermöglichen. Um zu untersuchen, ob die extern zugeführten Faktoren des RBCC ausschließlich Einfluss auf den Transportvorgang über die PVM üben, wurde der Einfluss von Cycloheximid (CHX) zur Inhibition der Proteinbiosynthese und Brefeldin A (BFA) zur Inhibition des GBP-Export aus dem Parasiten auf die Verteilung von GBP im Translokationsassay analysiert.

Dafür wurden 2 Ansätze à  $2 \times 10^8$  iRBC zunächst mit 4 HE SLO permeabilisiert und gewaschen. In einem Zwischenschritt wurden die Zellen gepoolt und erst im letzten Waschriff auf 4 Ansätze à  $1 \times 10^8$  iRBC aliquotiert, um in jedem Ansatz einen homogenen Zellbestand zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen für die Dauer des Experimentes, Waschriffte einbezogen, wahlweise in Anwesenheit von 50 µg/ml CHX oder 5 µg/ml BFA inkubiert. Nach Permeabilisierung und Waschen der Zellen wurden diese für 45 Minuten in Methionin-freiem RPMI + 100 µCi L-Methionin [ $^{35}\text{S}$ ] inkubiert, um neu synthetisiertes GBP radioaktiv zu markieren. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und für den Chase in Anwesenheit von RPMI oder

RBCC für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach Erhalt der P- und S-Fractionen der einzelnen Ansätze wurden die darin enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Verteilung von GBP in den Fraktionen durch Autoradiographie und Western-Blotting visualisiert.

Abbildung 3.3 zeigt einen repräsentativen Western-Blot mit korrespondierender Autoradiographie und die dazugehörige statistische Auswertung der Bandenintensitäten von GBP. Bei Betrachtung der Autoradiographie fällt auf, dass die Inkubation der ersten beiden Ansätze (Spuren 1 und 2 bzw. 3 und 4) mit CHX erwartungsgemäß zu keiner Neusynthese von Proteinen bzw. GBP geführt hat. Die korrespondierende Western-Blot Analyse zeigt jedoch die erwartete Verteilung von GBP in den jeweiligen Fraktionen des RPMI- bzw. RBCC-Ansatzes. Die Inkubation in RPMI führte zu einem Arrest der Translokation, während die Anwesenheit von RBCC zu einer Translokation von durchschnittlich 56 % GBP in den Inkubationsüberstand geführt hat. Die fehlende Neusynthese von GBP läßt keine mögliche Akkumulation des Proteins innerhalb des Parasiten zu, weshalb das in der P-Fraktion detektierte GBP dem Lumen der Vakuole zuzuordnen ist. Daher stimuliert die Zufuhr der im RBCC enthaltenen Faktoren ausschließlich die Translokation von GBP über die PVM. Auch die Inkubation von iRBC in RBCC mit BFA unterstützt diese Schlussfolgerung, wie in den Spuren 7 und 8 zu sehen ist. Neu-synthetisiertes, radioaktiv markiertes GBP akkumuliert durch die Inhibition des sekretorischen Weges durch BFA innerhalb des Parasiten. Die Inkubation der iRBC in RBCC zeigt jedoch mit ca. 52 % eine fast identische Transportrate im Vergleich mit den unter CHX-Einfluss inkubierten iRBC.





**Abb. 3.3: Einfluss von BFA und CHX auf die Verteilung von GBP nach Chase in WB und ARG.** Trophozoiten-infizierte Erythrozyten wurden mit 4 HE SLO permeabilisiert, die Proteine für 45 min in Methionin-freiem RPMI und 100 µCi L-Methionin [<sup>35</sup>S] metabolisch markiert und die Zellen anschließend in RPMI oder RBCC für weitere 30 min inkubiert. Für die Dauer des Experimentes wurden die Zellen wahlweise in Anwesenheit von 5 µg/ml BFA oder 50 µg/ml CHX inkubiert. **(A)** Western-Blot (WB) und Autoradiographie (ARG) zur Visualisierung der Verteilung von GBP (7,5 %iges SDS-Gel), SERP und ALD (10 %iges SDS-Gel). **(WB)** Auftrag pro Spur: 1x10<sup>7</sup> Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen-α-GBP, Kaninchen-α-SERP, Kaninchen-α-ALD; 2. Ak Ziege-α-Kaninchen (HRP). **(ARG)** Von Nitrocellulose-Membran des Western-Blots. **(B)** und **(C)** Verteilung von GBP in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Für jeden einzelnen im Translokationsassay analysierten Ansatz wurden die Werte der Bandenintensitäten aus Pelletfraktion und Inkubationsüberstand addiert und dem Wert 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden damit die prozentualen Werte der einzelnen Fraktionen und die Standardabweichung aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Abk.: **P** (Pellet = lösliche Proteine aus Parasit und parasitophore Vakuole), **S** (Supernatant = lösliche Proteine aus Inkubationsüberstand).

Allerdings zeigt die Verwendung von CHX im Translokationsassay ein scheinbares Defizit in der Auswertbarkeit der Translokationseffizienz von GBP über die PVM durch Western-Blot Analyse. Betrachtet man die Bandenintensitäten von GBP in den Spuren 1 und 3 genauer, so wird deutlich, dass eine Abnahme der GBP-Menge in

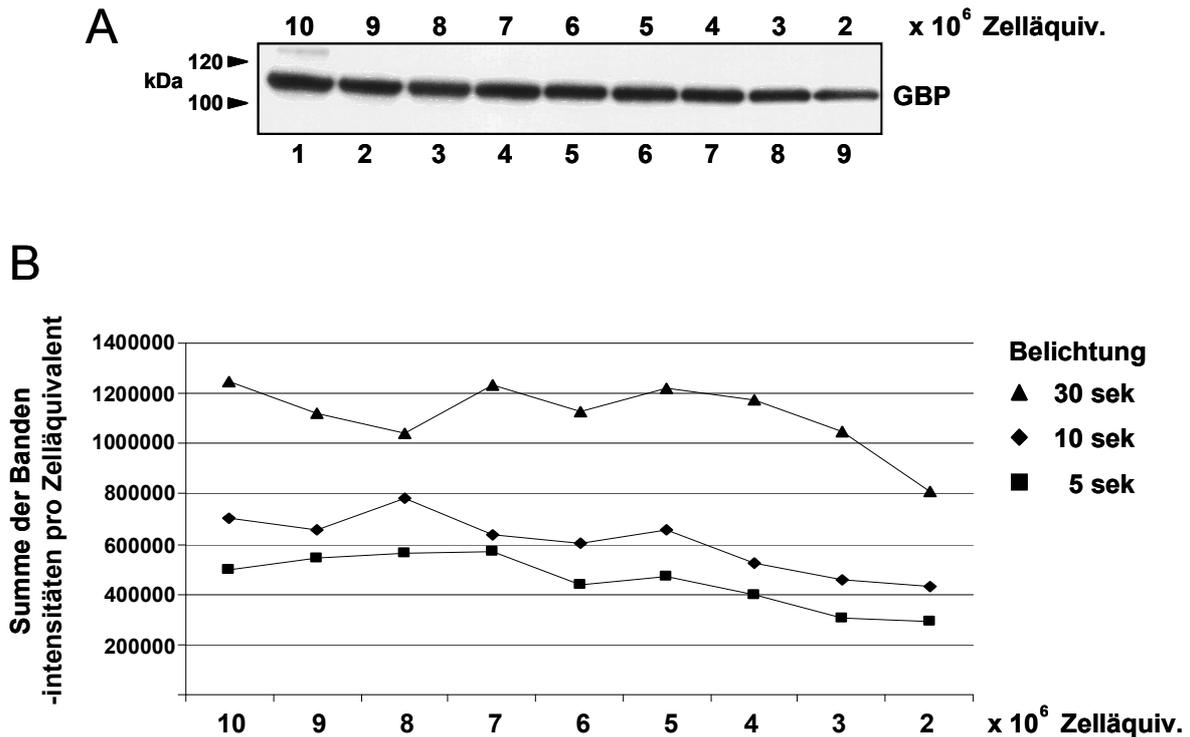
Spur 3 nicht erkennbar ist, auch wenn scheinbar über 50 % der Gesamtmenge von GBP in den Überstand transloziert wurden und keine Neu-Synthese von GBP stattgefunden hat.

#### 3.1.4 Validierung der Auswertung des Assays durch WB-Quantifizierung

Im vorigen Experiment konnte beobachtet werden, dass die Bandenintensität in der P-Fraktion eines RBCC Ansatzes auch in Anwesenheit von CHX trotz einer deutlich sichtbaren Translokation von GBP in den Überstand nicht abnimmt. Dies hätte man bei dem Vergleich mit den in RPMI inkubierten Zellen erwarten können. Um sicherzustellen, dass die Quantifizierung der Bandenintensitäten einer Western-Blot Analyse eine Aussage über die Translokationseffizienz von GBP über die PVM in den zu untersuchenden Ansätzen zulässt, musste untersucht werden, ob die im Western-Blot visualisierten Bandenintensitäten bei fallender GBP-Konzentration linear zur GBP-Menge abnehmen.

Dafür wurden  $2 \times 10^8$  iRBC mit 4 HE SLO permeabilisiert, gewaschen und für 45 min in Anwesenheit von RPMI und 50  $\mu\text{g/ml}$  CHX inkubiert, um residuales GBP zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die löslichen Proteine der SLO-permeabilisierten iRBC durch Sedimentation der Membranen erhalten. Danach wurden von dieser Proteinfraction Zelläquivalente in absteigender Konzentration mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Bandenintensitäten von GBP durch Western-Blotting visualisiert und quantifiziert.

Die Abbildung 3.4 zeigt einen repräsentativen Western-Blot mit der graphischen Auswertung der Summe der gemessenen Bandenintensitäten von drei verschiedenen Belichtungszeiten (5, 10 und 30 sek). Der Vergleich der Spuren 1 und 5 zeigt deutlich, dass der Western-Blot keine Abnahme der Bandenintensitäten bei fallender GBP-Konzentration linear zur GBP-Menge darstellen kann. So nimmt die Bandenintensität von GBP bei einem Zelläquivalent von  $10^7$  zu  $5 \times 10^6$  nur um maximal 10 % ab. Dies bedeutet, dass eine Reduktion der GBP-Quantität um die Hälfte eine Reduktion der Bandenintensität um 1/10 zur Folge hat.



**Abb. 3.4: Quantifizierung der GBP-Bandenintensitäten in Abhängigkeit zur Proteinmenge definierter Zelläquivalente.** Zur Quantifizierung der GBP-Bandenintensitäten wurden Trophoziten-infizierte Erythrozyten mit 4 HE SLO permeabilisiert und für 45 min in RPMI + 50  $\mu\text{g/ml}$  CHX inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Membranfragmente sedimentiert und der lösliche Überstand auf die verschiedenen angegebenen Zelläquivalente aliquotiert und über SDS-PAGE aufgetrennt **(A)** Western-Blot zur Visualisierung der Verteilung von GBP (7,5 %iges SDS-Gel); Auftrag pro Spur:  $1 \times 10(7)$  –  $2 \times 10(6)$  Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen- $\alpha$ -GBP; 2. Ak Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP). **(B)** Summe der Bandenintensitäten von GBP in Abhängigkeit zu definierten Zelläquivalenten nach drei verschiedenen Belichtungszeiten (5, 10, 30 sek).

Daraus lässt sich folgern, dass das Reziprozitätsgesetz von Bunsen und Roscoe, nach dem z.B. die halbe Lichtintensität bei doppelter Belichtungszeit die gleiche Schwärzung des Films bewirkt wie die doppelte Lichtintensität bei halber Belichtungszeit, bei Belichtungszeiten etwa oberhalb 1 Sekunde nicht mehr gilt. Vielmehr spielt hier der Schwarzschild-Effekt eine Rolle, der besagt, dass die Schwärzung eines Films ab einer bestimmten Belichtungszeit nicht mehr proportional zunimmt. Unter Berücksichtigung dieser Daten lässt die Auswertung der Bandenintensitäten keine genaue Quantifizierung der Verteilung von GBP im Translokationsassay zu, allerdings kann sie deutlich qualitative Unterschiede zeigen. Darüber hinaus hat dies für die Interpretation dieser Experimente die Konsequenz, dass der inhibierende Einfluss bzw. Unterschiede in verschiedenen Proben sehr viel größer ist als die densitometrischen Werte vermuten lassen.

### 3.1.5 Fazit

Mit den bisher durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass der von Ansorge *et al.* etablierte Assay nicht geeignet ist, den Transport von GBP über die PVM bei Betrachtung der GBP-Gesamtpopulation zu studieren. Es konnte bei dem Vergleich der Verteilung von GBP unter arretierenden bzw. rekonstituierenden Bedingungen in Autoradiographie und Western-Blot eine Diskrepanz zwischen radioaktiv-markiertem und kaltem GBP festgestellt werden, die eine Analyse der Translokationseffizienz unter verschiedenen gewählten Bedingungen mittels Western-Blot unmöglich macht. Diese Diskrepanz konnte auf residuales GBP innerhalb der SLO-permeabilisierten Erythrozyten zurückgeführt werden, welches erst nach Erhöhung sowohl der zu verwendenden SLO-Konzentration als auch der Wasch-Stringenz entfernt werden konnte und so zu Ergebnissen führte, die mit der Analyse des Transportes von metabolisch markiertem GBP konform gingen. Die zusätzliche Einführung von Cycloheximid in das experimentelle Design und die damit verbundene Inhibition der Proteinsynthese lässt zu, dass bei einer Untersuchung des Einflusses von extern zugeführten Faktoren nur ihr Einfluss auf den Transportvorgang über die PVM analysiert wird und nicht auch der über die Plasmamembran des Parasiten analysiert wird. Die Tatsache, dass aufgrund des Schwarzschild-Effekts die im Western-Blot visualisierten Bandenintensitäten nicht proportional zur GBP-Konzentration zu- bzw. abnehmen, lässt keine genaue quantitative Bestimmung Translokationseffizienz zu, wohl aber eine qualitative. Darüber hinaus konnte unter Berücksichtigung des Schwarzschild-Effekts gezeigt werden, dass ein im Western-Blot visualisierter inhibierender Effekt mit einer wesentlich stärkeren quantitativen Reduktion der Translokationseffizienz einhergeht, als bisher angenommen. Die Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse ist die Voraussetzung für einen optimierten, standardisierten *in vitro* Translokationsassay, der die folgenden Analysen erst möglich macht und in seinen einzelnen Schritten unter Punkt 2.2.4 des Kapitels Material & Methoden beschrieben ist.

### 3.2 Der Einfluss von Proteinen auf die Translokation von GBP über die PVM

Nach der Etablierung eines geeigneten und reproduzierbaren Assays, welcher die Möglichkeit bietet, das Translokationsereignis des löslichen Proteins GBP über die PVM genauer zu analysieren, sollte in weiteren Experimenten unter Verwendung des Assays untersucht werden, inwiefern die Anwesenheit von Proteinen für die Translokation von GBP erforderlich ist.

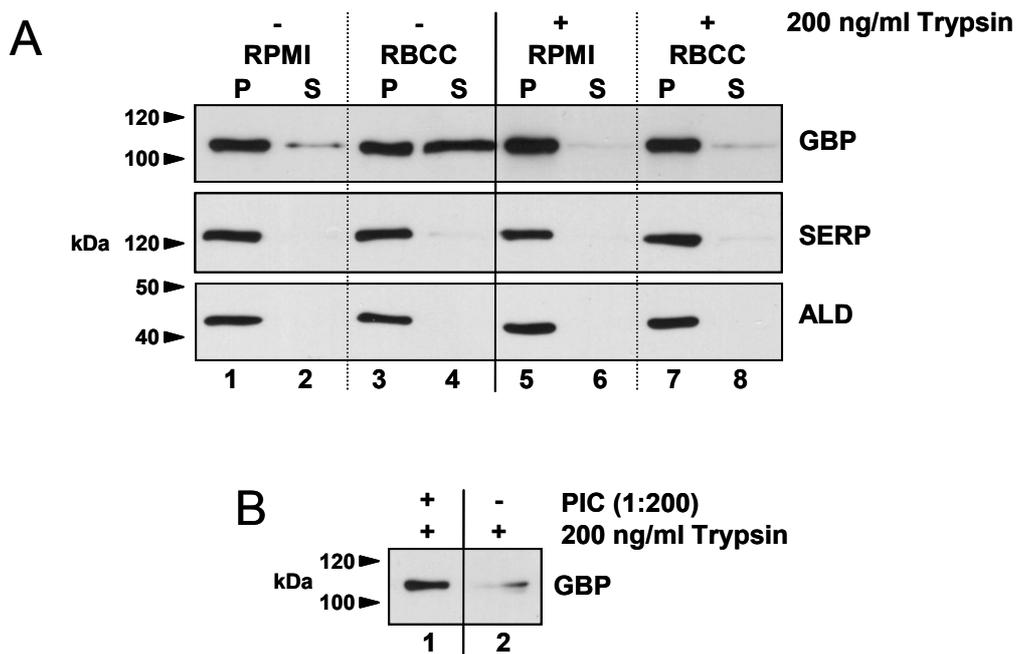
Die Translokation von Proteinen über biologische Membranen erfordert in der Regel die Anwesenheit eines Kanal-bildenden Proteinkomplexes, der die Lipiddoppelschicht durchspannt und einem Protein die Passage durch die Membran ermöglicht. Für die Vermittlung des Translokationsprozesses sind ebenfalls häufig membranständige Rezeptorkomponenten oder auch membranassoziierte Proteine nötig, wie z.B. Chaperone der Hsp70-Familie, die als Motorproteine für verschiedene Translokationsprozesse den gerichteten Transport eines Proteins ermöglichen. Von Walter *et al.* schon 1979 durchgeführte Translokationsstudien in einem Zell-freien System unter Verwendung von Microsomen haben gezeigt, dass die Inkubation der Microsomenmembran mit der Protease Trypsin zur Inhibition der Translokation von Proteinen in die Microsomen führt (Walter *et al.*, 1979). Deshalb sollte getestet werden, ob die Inkubation von SLO-permeabilisierten iRBC mit Trypsin einen negativen Einfluss auf die Translokationseffizienz von GBP unter rekonstituierenden Bedingungen hat.

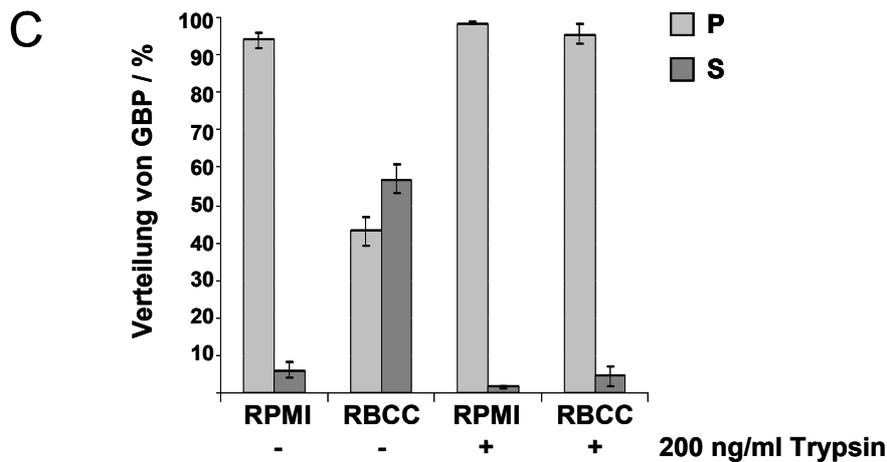
#### 3.2.1 Die Inkubation von SLO-permeabilisierten iRBC mit Trypsin inhibiert die Translokation über die PVM

Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden  $4 \times 10^8$  iRBC mit 4 HE SLO permeabilisiert und gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf zwei Ansätze à  $2 \times 10^8$  iRBC geteilt und in RPMI für 30 Minuten, statt der üblichen 45 Minuten, inkubiert. Daraufhin wurde 1 Ansatz mit Trypsin in einer Konzentration von 200 ng/ml für 10 Minuten inkubiert, während der andere zur Kontrolle in PBS resuspendiert und inkubiert wurde. Danach wurden beide Ansätze 3x mit 400 ng/ml Trypsin-Inhibitor gewaschen und zum Schluss auf je zwei Ansätze à  $1 \times 10^8$  aliquotiert. Für den Chase wurden die

unbehandelten Zellen in RPMI und RBCC inkubiert, um die Referenzwerte für die Translokationsarretierung und Rekonstitution zu erhalten. Die mit Trypsin behandelten Zellen wurden ebenfalls in RPMI und RBCC inkubiert, um zu testen, ob der Verdau membranständiger Proteine der PVM einen negativen Einfluss auf die Translokationsaktivität besitzt. Nach der Chase-Phase und dem Erhalt der Proteine aus den einzelnen Fraktionen der verschiedenen Ansätze wurden diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Verteilung der Proteine GBP, SERP und ALD durch Western-Blot Analyse visualisiert. Zusätzlich dazu wurde ein GBP-enthaltender RPMI-Inkubationsüberstand mit 200 ng/ml Trypsin in An- bzw. Abwesenheit von PIC (Protease Inhibitor Cocktail/Trypsin-Inhibitor 1 µg/ml) inkubiert. Dies dient als Kontrolle für den Beweis, dass nach der Trypsinierung der SLO-permeabilisierten iRBC eventuell noch vorhandenes Trypsin durch die Anwesenheit von PIC inaktiviert wird.

Die Abbildung 3.5 zeigt einen repräsentativen Western-Blot und die statistische Auswertung der GBP-Verteilung in den einzelnen Fraktionen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Bei den unbehandelten iRBC in den Spuren 1 und 2 bzw. 3 und 4 zeigt der Chase von GBP in Anwesenheit von RPMI und RBCC die erwartete Arretierung bzw. Rekonstitution der Translokationsaktivität. Bei den mit Trypsin behandelten Ansätzen ist zu beobachten, dass die Inkubation in Anwesenheit von RBCC nicht mehr zu einer Rekonstitution der Translokationsaktivität führt.





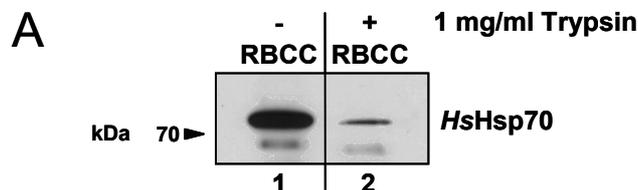
**Abb. 3.5: Einfluss der Trypsinierung von SLO-permeabilisierten iRBC auf die Translokationseffizienz von GBP.** Trophozoiten-infizierte Erythrozyten wurden mit 4 HE SLO permeabilisiert, für 45 min in RPMI inkubiert, dabei für die letzten 10 min in An- oder Abwesenheit von 200 ng/ml trypsiniert und die Zellen anschließend in RPMI oder RBCC für weitere 30 min inkubiert. **(A)** Western-Blot (WB) zur Visualisierung der Verteilung von GBP (7,5 %iges SDS-Gel), SERP und ALD (10 %iges SDS-Gel). Auftrag pro Spur:  $1 \times 10^7$  Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen- $\alpha$ -GBP, Kaninchen- $\alpha$ -SERP, Kaninchen- $\alpha$ -ALD; 2. Ak Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP). **(B)** Kontrolle für die inhibierende Wirkung des Trypsin-Inhibitors in PIC (Konz.: 1  $\mu$ g/ml). WB wie in A. **(C)** Verteilung von GBP in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Für jeden einzelnen im Translokationsassay analysierten Ansatz wurden die Werte der Bandenintensitäten aus Pelletfraktion und Inkubationsüberstand addiert und dem Wert 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden damit die prozentualen Werte der einzelnen Fraktionen und die Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Abk.: **P** (Pellet = lösliche Proteine aus Parasit und parasitophore Vakuole), **PIC** (Protease Inhibitor Cocktail), **S** (Supernatant = lösliche Proteine aus Inkubationsüberstand).

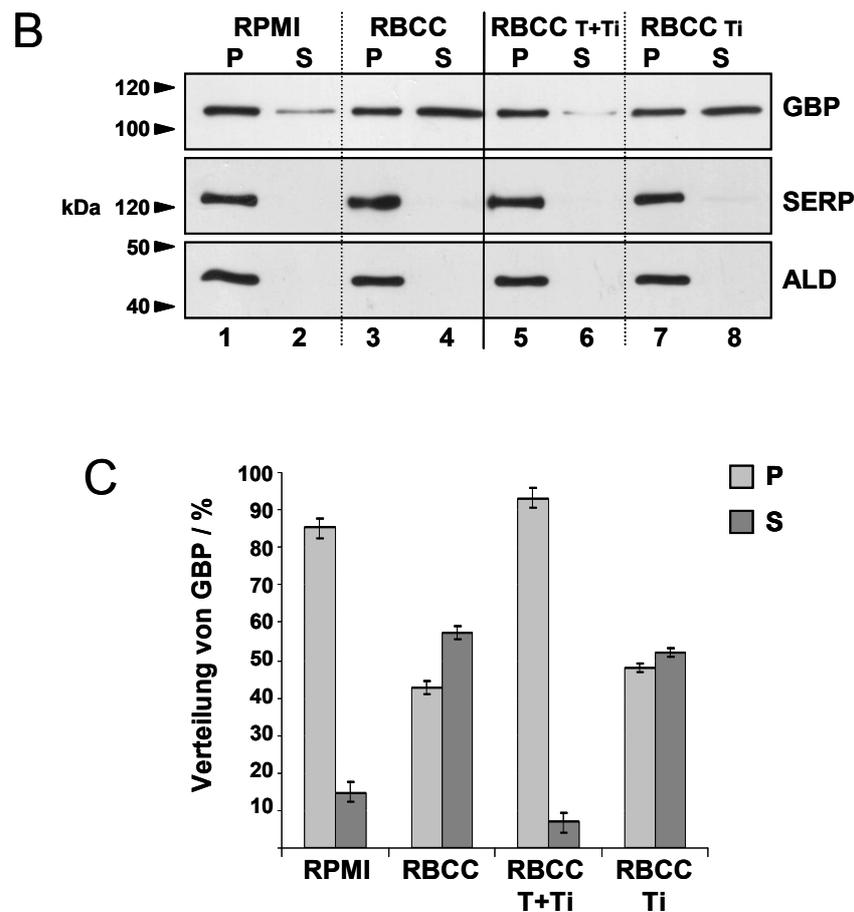
So ist in Spur 8 zu sehen, dass nach Trypsinierung der permeabilisierten iRBC in Anwesenheit von RBCC nur ca. 5 % der gesamten Bandenintensität von GBP in diesem Ansatz im Inkubationsüberstand detektiert wird. Das Fehlen von GBP in diesem Inkubationsüberstand kann nicht auf in den iRBC verbliebenes Trypsin zurückgeführt werden, da einerseits durch die hohe Waschfrequenz eine starke Verdünnung des verwendeten Trypsins stattgefunden hat und andererseits durch die Verwendung eines spezifischen Trypsin-Inhibitors in den Waschschritten bzw. während der Chase-Phase durch die Anwesenheit von PIC möglicherweise zurückgebliebenes Trypsin inaktiviert wurde, wie Abbildung 3.5 B deutlich macht. All dies deutet darauf hin, dass der proteolytische Verdau von membranständigen Proteinen der PVM auf der zytosolischen Seite zu einer Inhibition der Translokation unter rekonstitutiven Bedingungen geführt hat.

### 3.2.2 Der proteolytische Abbau von Proteinen des RBCC inhibiert die Translokation über die PVM

Um klären zu können, ob auch lösliche Proteine des Wirtes am Translokationsprozess über die PVM beteiligt sind, sollten durch die Verwendung von Trypsin die im RBCC enthaltenen Proteine proteolytisch verdaut werden und das so präparierte RBCC auf seine rekonstitutiven Eigenschaften im Translokationsassay getestet werden.

Zunächst wurde das Zytosol von nicht-infizierten Erythrozyten für 4 Stunden mit 1 mg/ml Trypsin inkubiert, um die darin enthaltenen, Trypsin-sensitiven Proteine zu fragmentieren. Anschließend wurden  $4 \times 10^8$  iRBC mit 4 HE SLO permeabilisiert und für den Translokationsassay vorbereitet. Für den Chase wurden die Zellen auf vier Ansätze à  $1 \times 10^8$  iRBC aliquotiert und neben den Kontroll-Ansätzen RPMI und RBCC für die Referenzwerte in trypsiniertem RBCC inkubiert, wobei die Protease-Aktivität durch die Zugabe von 2 mg/ml Trypsin-Inhibitor gestoppt wurde. In einem weiteren Kontroll-Ansatz wurden iRBC mit RBCC inkubiert, welches ausschließlich den Trypsin-Inhibitor in der Konzentration 2 mg/ml enthielt. Nach Erhalt der Proteine aus den einzelnen Fraktionen der unterschiedlichen Ansätze wurden diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Verteilung der Proteine GBP, SERP und ALD durch Western-Blot Detektion visualisiert und die Bandenintensitäten von GBP quantifiziert und ausgewertet. Zusätzlich dazu wurde die Aktivität des verwendeten Trypsins anhand des Verdaus des Wirtsproteins *HsHsp70* im Western-Blot kontrolliert.





**Abb. 3.6: Einfluss der Trypsinierung von Proteinen des RBCC auf die Translokationseffizienz von GBP.** Trophoziten-infizierte Erythrozyten wurden mit 4 HE SLO permeabilisiert, für 45 min in RPMI inkubiert und die Zellen anschließend in RPMI, RBCC, trypsiniertem RBCC bzw. RBCC und Trypsin-Inhibitor für weitere 30 min inkubiert. **(A)** Kontrolle für die Trypsinierung von Proteinen des RBCC. Das RBCC wurde 4 h mit 1 mg/ml Trypsin inkubiert und die Protease anschließend durch Zugabe von 2 mg/ml Trypsin-Inhibitor inaktiviert. Der Western-Blot zeigt das humane Hsp70 des RBCC vor und nach Trypsin-Behandlung. (WB) 7, 5 %iges SDS-Gel; Auftrag pro Spur:  $1 \times 10^7$  Zelläquivalent; 1. Ak Maus- $\alpha$ -HsHsp70, 2. Ak Huhn- $\alpha$ -Maus (HRP). **(B)** Western-Blot (WB) zur Visualisierung der Verteilung von GBP (7,5 %iges SDS-Gel), SERP und ALD (10 %iges SDS-Gel). Auftrag pro Spur:  $1 \times 10^7$  Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen- $\alpha$ -GBP, Kaninchen- $\alpha$ -SERP, Kaninchen- $\alpha$ -ALD; 2. Ak Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP). **(C)** Verteilung von GBP in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Für jeden einzelnen im Translokationsassay analysierten Ansatz wurden die Werte der Bandenintensitäten aus Pelletfraktion und Inkubationsüberstand addiert und dem Wert 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden damit die prozentualen Werte der einzelnen Fraktionen und die Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Abk.: P (Pellet = lösliche Proteine aus Parasit und parasitophore Vakuole), S (Supernatant = lösliche Proteine aus Inkubationsüberstand), T (Trypsin); Ti (Trypsin-Inhibitor).

Die Abbildung 3.6 zeigt einen repräsentativen Western-Blot und die statistische Auswertung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Detektion von HsHsp70 in Abbildung 3.6 A bestätigt die proteolytische Aktivität des verwendeten Trypsins. Der Vergleich der Bandenintensitäten des Proteins in der unbehandelten und der Protease-behandelten RBCC-Fraktion macht deutlich, dass

durch die Inkubation des RBCC mit der Protease die Menge an intaktem Protein stark verringert wurde.

Die während des Chase in RPMI inkubierten iRBC zeigen eine erwartete sehr geringe Translokationsrate, repräsentiert durch durchschnittlich 14 % GBP-Bandenintensität in Spur 2. Dieser Wert gilt als Richtlinie für die Inhibition der Translokation über die PVM. Durch die Inkubation der permeabilisierten iRBC in RBCC zeigt sich in Spur 4 im Mittel eine Zunahme der Bandenintensität auf 57 %. Dies ist der Richtwert für eine optimale Translokationseffizienz in diesem System. Die Inkubation der iRBC in RBCC, dessen Proteine durch die Protease Trypsin fragmentiert wurden, führt zu einer wesentlich geringeren Transportrate im Vergleich zum positiven Richtwert, so dass in Spur 8 nur eine Bandenintensität von ca. 7 % der Gesamtintensität in diesem Ansatz im Überstand detektiert wird. Der Kontroll-Ansatz RBCC+Trypsin-Inhibitor zeigt keine nennenswerten Unterschiede in der Translokationseffizienz zur Inkubation in RBCC allein.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass durch den proteolytischen Abbau der im RBCC enthaltenen Trypsin-sensitiven Proteine die rekonstituierenden Eigenschaften des RBCC minimiert werden können. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass lösliche Proteine des Wirtes am Translokationsvorgang von GBP über die PVM beteiligt sind.

#### 3.2.3 Fazit

Die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses von Trypsin im Translokationsassay konnten zeigen, dass bisher noch nicht identifizierte lösliche Proteine des Wirtes als Mediatoren des Translokationsvorganges essentiell sind. Darüber hinaus sind ebenfalls membranständige Proteinkomponenten der PVM an der Translokation von GBP beteiligt, eine Grundvoraussetzung für die Existenz eines Translokators innerhalb der PVM.

### 3.3 Der Einfluss von ATP auf die Translokation von GBP über die PVM

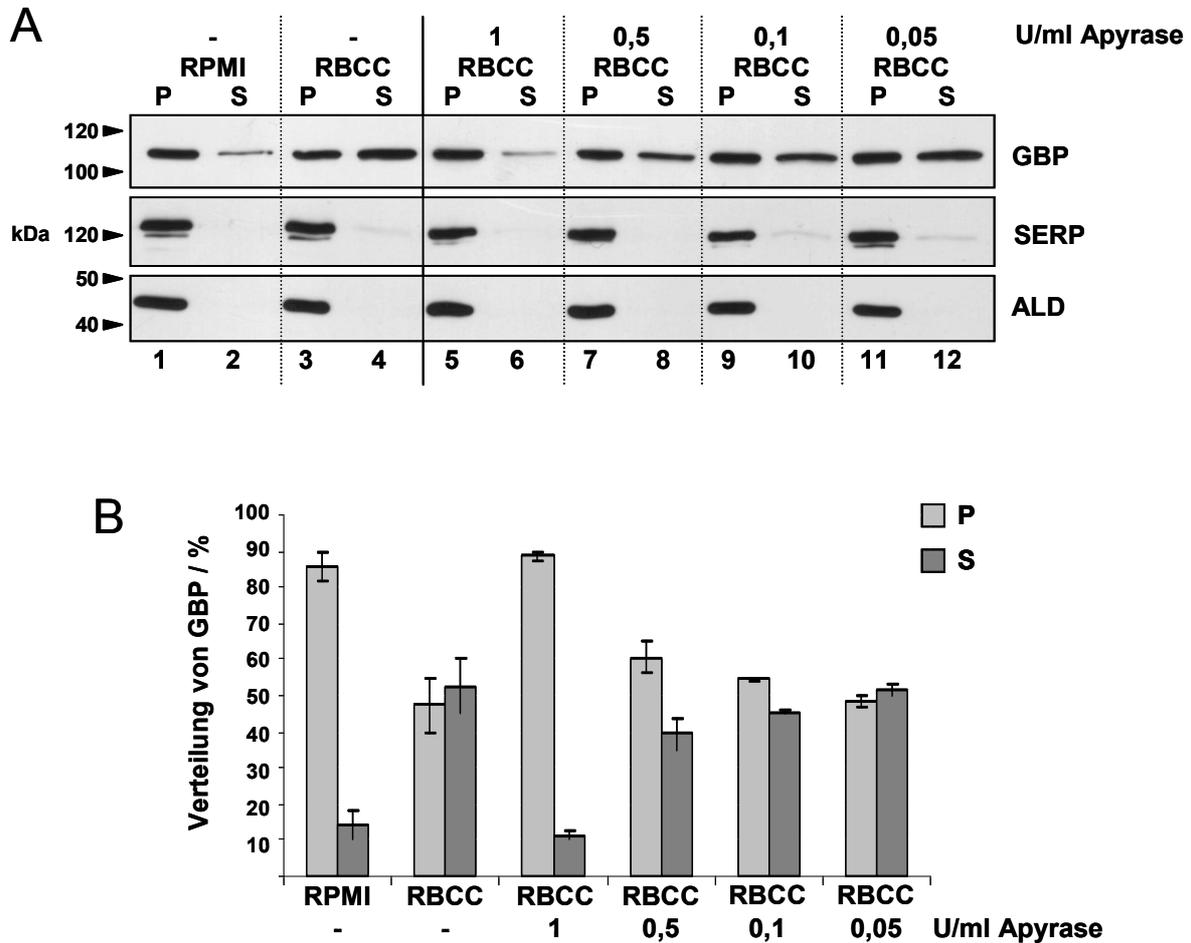
Die posttranslationale Translokation von Proteinen über Membranen ist in vielen Fällen ein energieabhängiger Prozess, bei dem verschiedene Faktoren wie molekulare Chaperone oder Rezeptorproteine durch die Bindung und Hydrolyse von Energieäquivalenten wie ATP oder GTP die Translokation eines Substratproteins vermitteln. Ziel der folgenden Experimente ist es zu untersuchen, ob es sich bei der Translokation des Parasitenproteins GBP über die Membran der parasitophoren Vakuole um einen ATP-abhängigen Prozess handelt.

#### 3.3.1 Die Depletion von ATP des RBCC führt zur Arretierung der Translokation

Um den Einfluss von ATP des RBCC auf die Translokation zu klären, soll zunächst untersucht werden, ob eine Depletion von ATP aus dem RBCC zur Inhibition der Translokationsaktivität führt. Da der Erythrozyt zur ATP-Synthese durch Glykolyse befähigt ist und die ATP-Konzentration innerhalb eines nicht-infizierten Erythrozyten bei ca. 0,5 – 0,67 mM liegt (Kanaani *et al.*, 1988), wäre es durchaus denkbar, dass bei einem energieabhängigen Translokationsprozess das Erythrozytenzytosol vom Parasiten als Energiequelle benutzt wird.

Dazu wurde RBCC mit Apyrase in unterschiedlichen Konzentrationen von 1 - 0,05 U/ml für 1 h bei 37 °C inkubiert, um dadurch die Hydrolyse von ATP zu ADP und in geringerem Umfang auch von ADP zu AMP zu erzielen. Gleichzeitig wurden für den Translokationsassay  $6 \times 10^8$  iRBC mit 4 HE SLO permeabilisiert und für den Chase vorbereitet. Anschließend wurden die iRBC zu sechs Ansätzen à  $1 \times 10^8$  aliquotiert. Zwei Ansätze wurden für den Chase mit RPMI für die Ermittlung des Referenzwertes der Translokationsarretierung bzw. mit RBCC für den Richtwert der Translokationsrekonstitution inkubiert. Die übrigen Ansätze wurden mit den verschiedenen Apyrase-behandelten RBCC-Fractionen inkubiert. Nach Erhalt der Überstände (S) und der löslichen Proteine der jeweiligen gewaschenen Zellsedimente (P) wurden die Proteine der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Verteilung der Proteine GBP, SERP und ALD durch Western-

Blotting ermittelt. Die Abbildung 3.7 zeigt eine repräsentative Western-Blot Analyse der Verteilung der verschiedenen genannten Proteine und die statistische Auswertung der Bandenintensitäten von GBP zweier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.



**Abb. 3.7: Einfluss von Apyrase im RBCC auf die Translokationseffizienz von GBP.** Für den Einsatz im Translokationsassay wurde RBCC zunächst mit den verschiedenen angegebenen Konzentrationen Apyrase für 1 h bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurden Trophozoiten-infizierte Erythrozyten mit 4 HE SLO permeabilisiert, für 45 min in RPMI inkubiert und die Zellen anschließend in RPMI, RBCC oder RBCC mit Apyrase in den angegebenen Konzentrationen für weitere 30 min inkubiert. **(A)** Western-Blot (WB) zur Visualisierung der Verteilung von GBP (7,5 %iges SDS-Gel), SERP und ALD (10 %iges SDS-Gel). Auftrag pro Spur: 1x10<sup>7</sup> Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen- $\alpha$ -GBP, Kaninchen- $\alpha$ -SERP, Kaninchen- $\alpha$ -ALD; 2. Ak Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP). **(B)** Verteilung von GBP in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Für jeden einzelnen im Translokationsassay analysierten Ansatz wurden die Werte der Bandenintensitäten aus Pelletfraktion und Inkubationsüberstand addiert und dem Wert 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden damit die prozentualen Werte der einzelnen Fraktionen und die Standardabweichung aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Abk.: **P** (Pellet = lösliche Proteine aus Parasit und parasitophore Vakuole), **S** (Supernatant = lösliche Proteine aus Inkubationsüberstand).

Betrachtet man die Verteilung von GBP in den Abbildungen 3.7 A und B, so zeigt die Inkubation in RPMI in Spur 1 und 2 einen Richtwert für die Arretierung der Translokation von durchschnittlich 14 %, während die Inkubation der permeabilisierten iRBC in RBCC in Spur 3 und 4 zu einer Detektion von ca. 52 % (positiver Richtwert) Bandenintensität des Proteins GBP im Inkubationsüberstand geführt hat. Des Weiteren ist zu erkennen, dass durch die Depletion von ATP des RBCC durch Hydrolyse mittels Apyrase die Arretierung der Translokation von GBP über die PVM erreicht wurde.

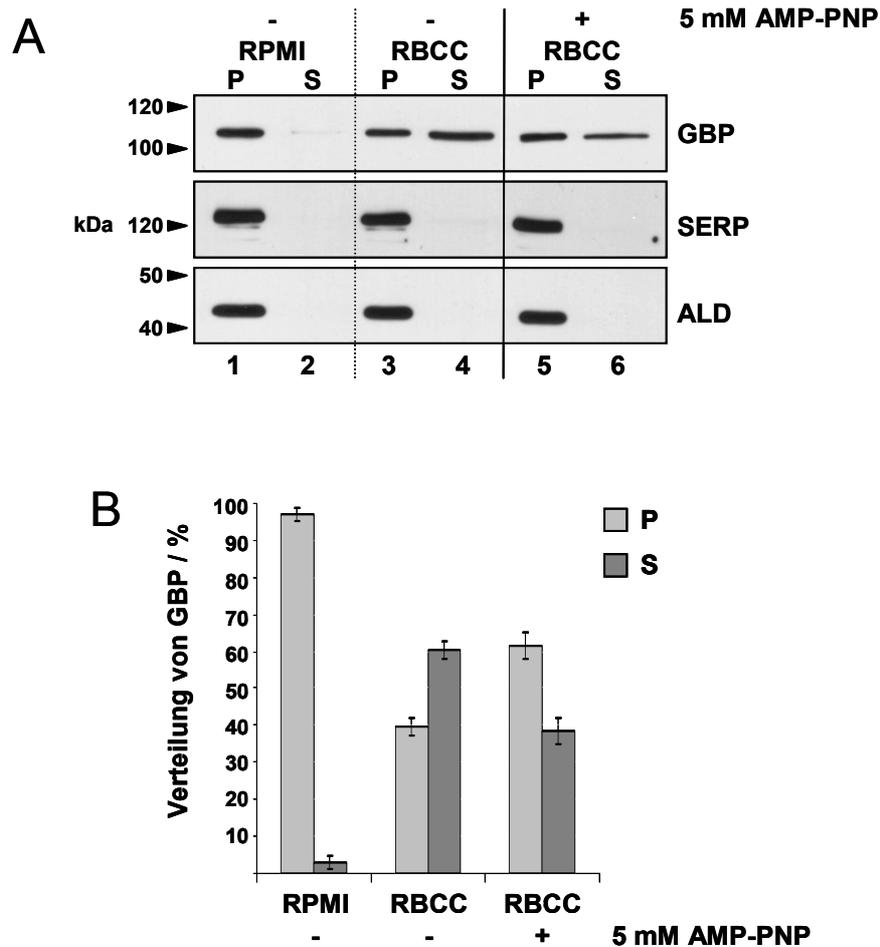
Dabei nimmt die Translokationseffizienz mit steigender Apyrase-Konzentration ab. Während das mit 1 U/ml Apyrase inkubierte RBCC in Spur 5 und 6 die Translokation nur in sehr geringem Maße induzieren kann und so nur durchschnittlich 12 % der Gesamtintensität der GBP-Banden im Inkubationsüberstand detektiert werden konnten und dieser Wert mit dem Referenzwert für die Translokationsarretierung vergleichbar ist, so liegt der Wert des mit 0,5 U/ml Apyrase inkubierten RBCC ca. 13 % unter dem des positiven Richtwertes. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass die Depletion von ATP aus dem Zytosol von nicht-infizierten RBC durch Apyrase konzentrationsabhängig zur Inhibition der Translokation von GBP über die PVM führt und geben so einen ersten Hinweis auf die Energieabhängigkeit des Translokationsmechanismus.

#### 3.3.2 Die Translokation von GBP über die PVM ist von der Hydrolyse des vorhandenen ATP abhängig

Da aus dem vorangegangenen Experiment deutlich hervorgeht, dass das Vorhandensein von ATP im Zytosol von nicht-infizierten Erythrozyten essentielle Voraussetzung für die Translokation von GBP über die PVM ist, sollte in dem folgenden Experiment untersucht werden, inwiefern die Hydrolyse von ATP erforderlich ist, um die Translokation zu vermitteln. Daher wurde der Einfluss vom ATP-Analogon AMP-PNP getestet, welches gleiche Bindungseigenschaften wie ATP besitzt, sich allerdings durch eine nicht-hydrolysierbare Phosphat-Gruppe auszeichnet.

Zunächst wurden  $3 \times 10^8$  iRBC mit 4 HE SLO permeabilisiert und für die Chase-Phase im Translokationsassay vorbereitet. Die Zellen wurden auf drei Ansätze à  $1 \times 10^8$  iRBC aliquotiert und zwei davon in RPMI bzw RBCC für die Ermittlung der Richtwerte

inkubiert. Der dritte Ansatz wurde in RBCC unter Zugabe von 5 mM AMP-PNP inkubiert. Nach Ende der Chase-Phase und dem Erhalt der einzelnen Fraktionen wurden die Proteingemische mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Verteilung der Proteine GBP, SERP und ALD durch Western-Blotting visualisiert. Die Bandenintensitäten des Proteins GBP in den Pellet- und Überstand-Fractionen wurden quantifiziert und statistisch ausgewertet.



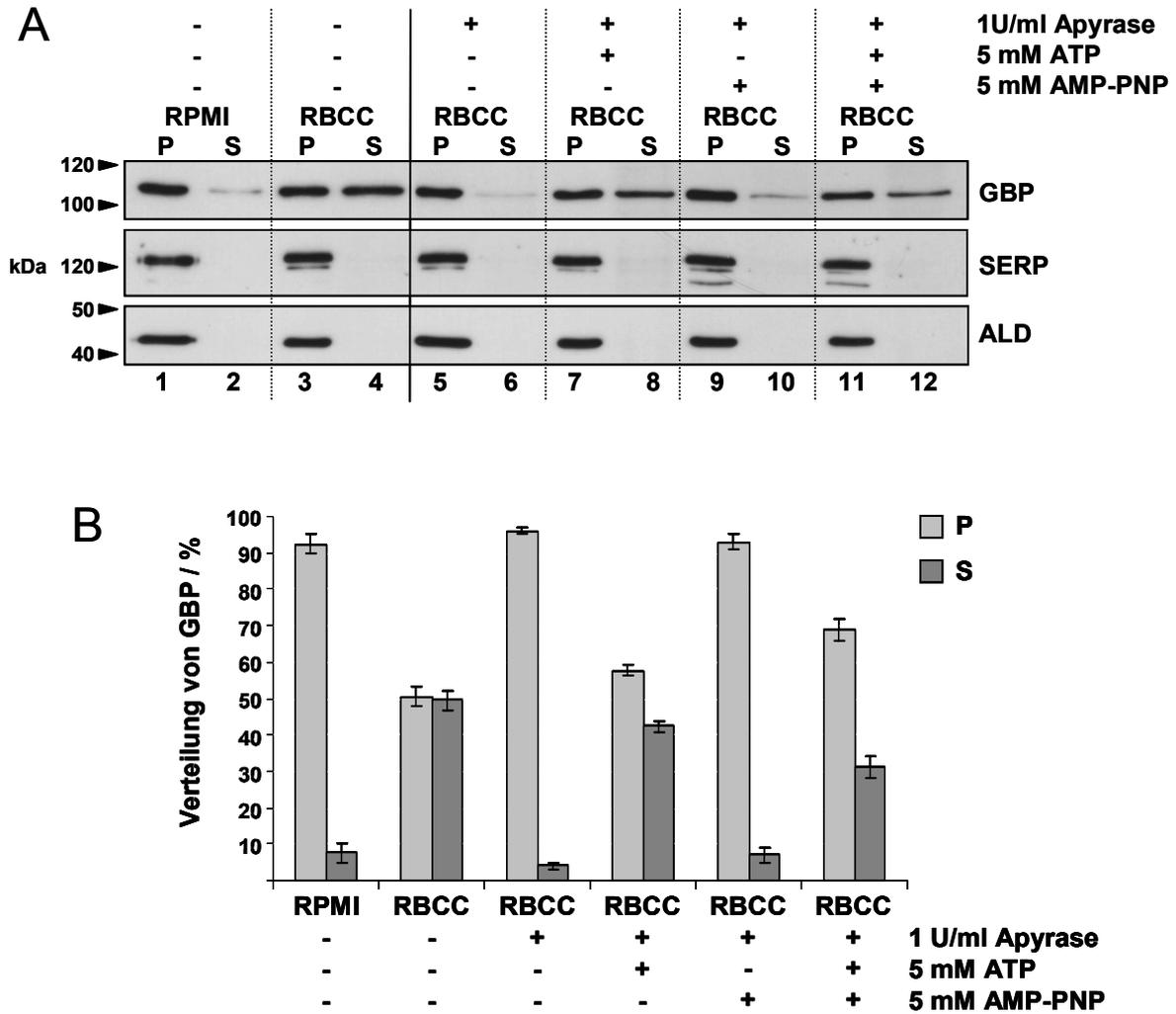
**Abb. 3.8: Einfluss von AMP-PNP im RBCC auf die Translokationseffizienz von GBP.**

Für den Einsatz im Translokationsassay wurden Trophoziten-infizierte Erythrozyten mit 4 HE SLO permeabilisiert, für 45 min in RPMI inkubiert und die Zellen anschließend in RPMI, RBCC oder RBCC mit 5 mM AMP-PNP für weitere 30 min inkubiert. **(A)** Western-Blot (WB) zur Visualisierung der Verteilung von GBP (7,5 %iges SDS-Gel), SERP und ALD (10 %iges SDS-Gel). Auftrag pro Spur:  $1 \times 10^7$  Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen- $\alpha$ -GBP, Kaninchen- $\alpha$ -SERP, Kaninchen- $\alpha$ -ALD; 2. Ak Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP). **(B)** Verteilung von GBP in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Für jeden einzelnen im Translokationsassay analysierten Ansatz wurden die Werte der Bandenintensitäten aus Pelletfraktion und Inkubationsüberstand addiert und dem Wert 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden damit die prozentualen Werte der einzelnen Fraktionen und die Standardabweichung aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Abk.: **P** (Pellet = lösliche Proteine aus Parasit und parasitophore Vakuole), **S** (Supernatant = lösliche Proteine aus Inkubationsüberstand).

Die Abbildung 3.8 A zeigt eine repräsentative Western-Blot Analyse von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die statistische Auswertung der Verteilung von GBP in Abb. 3.8 B verdeutlicht die Arretierung der Translokation in Anwesenheit von RPMI durch die Detektion von durchschnittlich 3 % der gesamten Bandenintensität von GBP im Inkubationsüberstand. Auch der positive Richtwert, repräsentiert durch die Inkubation in RBCC, zeigt eine erwartete hohe Translokationseffizienz. Die Zugabe von 5 mM AMP-PNP zum RBCC hat einen sichtbaren negativen Einfluss auf die Translokationseffizienz und führt zu einer Reduktion der GBP-Bandenintensität um ca. 20 % im Vergleich zum positiven Richtwert.

In einem weiteren Ansatz sollte überprüft werden, ob extern zugeführtes ATP und AMP-PNP in direkter Konkurrenz zu einer freien Bindungsstelle eines ATP-hydrolysierenden Proteins stehen, welches an der Translokation von GBP über die PVM beteiligt ist. Dafür wurden  $6 \times 10^8$  iRBC mit 4 HE SLO permeabilisiert, gewaschen und für den Translokationsassay vorbereitet. Die Zellen wurden auf sechs Ansätze à  $1 \times 10^8$  iRBC aliquotiert und neben den Kontrollen in Apyrase-behandeltem RBCC unter Zusatz von 5 mM ATP, 5 mM AMP-PNP oder beidem für den Chase inkubiert. Nach Erhalt der einzelnen Fraktionen der jeweiligen Ansätze wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Verteilung der Markerproteine SERP und ALD sowie GBP durch Western-Blotting visualisiert und ausgewertet.

Die Abbildung 3.9 zeigt einen repräsentativen Western-Blot und die statistische Auswertung von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die in RPMI inkubierten Zellen zeigen in Spur 2 die erwartete geringe Bandenintensität von durchschnittlich 7 %, während die Inkubation der Zellen in RBCC in Spur 4 zur Detektion von ca. 50 % der Gesamintensität des Proteins GBP im Inkubationsüberstand geführt hat. Auch die Depletion von ATP durch eine dem Chase vorhergehende Behandlung des RBCC mit Apyrase hat zu der erwarteten Arretierung der Translokationsaktivität geführt, so dass nur ca. 4% der Bandenintensität in Spur 6 gemessen wurden. Die Zugabe von 5 mM ATP zu dem Apyrase-behandeltem RBCC konnte die rekonstitutiven Eigenschaften des RBCC wieder herstellen, was durch die Detektion von GBP in Spur 8 im Inkubationsüberstand deutlich dokumentiert ist.



**Abb. 3.9: Einfluss von ATP und AMP-PNP in Apyrase-behandeltem RBCC auf die Translokationseffizienz von GBP.** Für den Einsatz im Translokationsassay wurde RBCC zunächst mit 1 U/ml Apyrase für 1 h bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurden Trophozoiten-infizierte Erythrozyten mit 4 HE SLO permeabilisiert, für 45 min in RPMI inkubiert und die Zellen anschließend in RPMI, RBCC oder Apyrase-behandeltem RBCC mit 5 mM ATP bzw AMP-PNP in den angegebenen Kombinationen für weitere 30 min inkubiert. **(A)** Western-Blot (WB) zur Visualisierung der Verteilung von GBP (7,5 %iges SDS-Gel), SERP und ALD (10 %iges SDS-Gel). Auftrag pro Spur: 1x10<sup>7</sup> Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen- $\alpha$ -GBP, Kaninchen- $\alpha$ -SERP, Kaninchen- $\alpha$ -ALD; 2. Ak Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP). **(B)** Verteilung von GBP in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Für jeden einzelnen im Translokationsassay analysierten Ansatz wurden die Werte der Bandenintensitäten aus Pelletfraktion und Inkubationsüberstand addiert und dem Wert 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden damit die prozentualen Werte der einzelnen Fraktionen und die Standardabweichung aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Abk.: **P** (Pellet = lösliche Proteine aus Parasit und parasitophore Vakuole), **S** (Supernatant = lösliche Proteine aus Inkubationsüberstand).

Die Zugabe von 5 mM AMP-PNP zu Apyrase-behandeltem RBCC hatte keinen positiven Einfluss auf die Translokationseffizienz, so dass die Transportrate dem des Apyrase-Ansatzes ähnlich ist. Die Zugabe von sowohl ATP als auch AMP-PNP in gleichen Konzentrationen zum ATP-depletierten RBCC führte zu einem intermediären Effekt auf die Translokationsaktivität. Die Detektion von

durchschnittlich 31 % der Gesamtintensität der GBP-Banden dieses Ansatzes im Inkubationsüberstand (Spur 12) deutet darauf hin, dass die Anwesenheit von AMP-PNP die Eigenschaften des ATP zur Wiederherstellung der Translokationsaktivität von RBCC negativ beeinflusst. Dies liegt vermutlich an dem Umstand, dass durch die Verwendung gleicher Konzentrationen von ATP und AMP-PNP die Wahrscheinlichkeit für ATP, von einem an der Translokation beteiligten Protein gebunden und hydrolysiert zu werden, theoretisch um die Hälfte reduziert ist.

#### 3.3.4 Fazit

Die unter Abschnitt 3.3 aufgeführten Daten belegen, dass es sich bei ATP um einen essentiellen Faktor des Translokationsvorganges von GBP über die PVM handelt. Dabei ist neben der Bindung auch eine sich daran anschließende Hydrolyse von ATP durch einen noch unbekanntem Faktor notwendig, um die Translokation zu ermöglichen.

### 3.4 Der Einfluss von Hsp90 auf die Translokation von GBP über die PVM

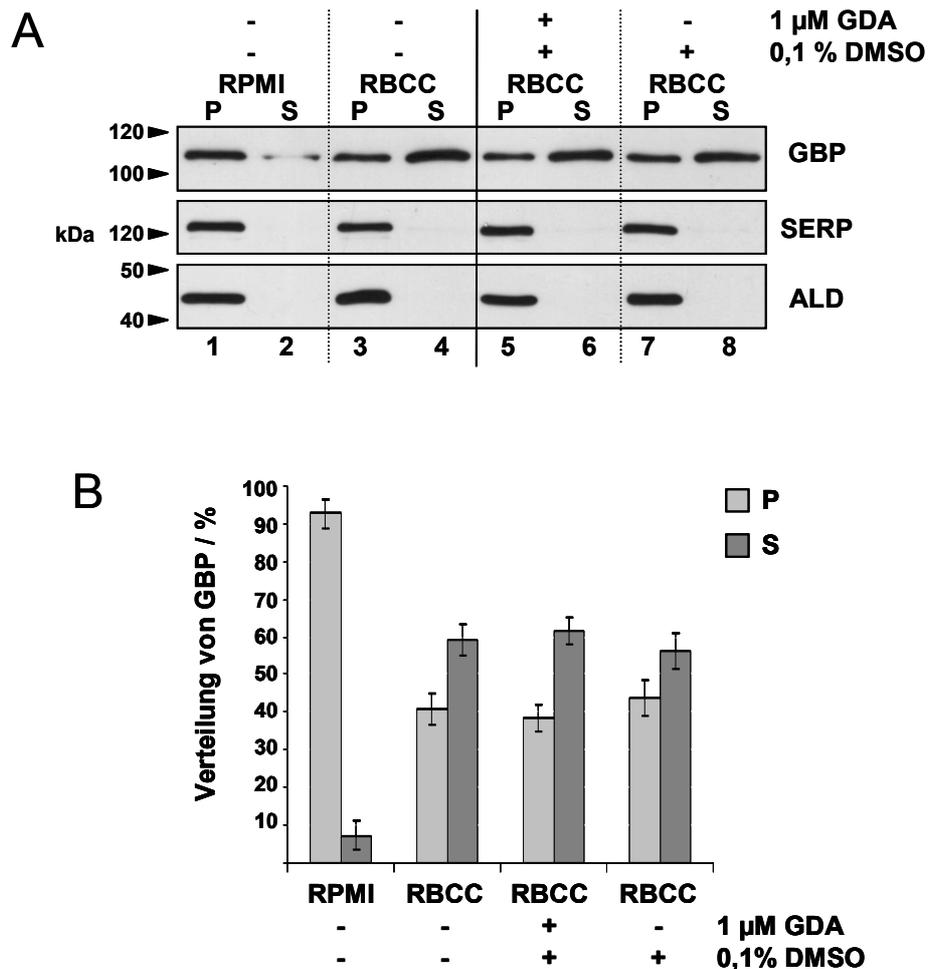
Nachdem gezeigt wurde, dass sowohl lösliche Proteine des Wirtes als auch membranständige Proteine der PVM als Mediatoren des Translokationsvorganges involviert sein müssen und die Bindung und Hydrolyse von ATP eine Notwendigkeit für den Transport von GBP über die PVM darstellt, sollte untersucht werden, um welche Proteine es sich handeln könnte, die am Translokationsprozess beteiligt sind. Aus genannten Gründen sollte die Rolle von Hsp90 genauer analysiert. Dieses Chaperon verfügt über die Eigenschaft, ATP zu binden und zu hydrolysieren und ist darüber hinaus bei diversen posttranslationalen Translokationsprozessen an der Ausbildung eines Guidance-Komplexes beteiligt, wie z.B. beim Import von Substratproteinen in Mitochondrien, Chloroplasten, Lysosomen und in das Endoplasmatische Retikulum.

#### 3.4.1 Hsp90-spezifische Inhibitoren besitzen keinen negativen Einfluss auf die Translokation über die PVM

Zunächst sollte analysiert werden, ob der Hsp90-Inhibitor Geldanamycin einen inhibitorischen Einfluss auf die Rekonstitution der Translokation besitzt. Geldanamycin ist in der Lage, die ATP-Bindedomäne im N-terminalen Bereich von Hsp90 zu besetzen (Stebbins *et al.*, 1997), was dazu führt, dass das Chaperon ATP nicht mehr binden kann und so in seiner Funktionalität gehemmt ist.

Für die Analyse wurden  $4 \times 10^8$  iRBC mit 4 HE SLO permeabilisiert, gewaschen und vorbereitet. Während der primären Inkubation der Zellen in RPMI wurde ein Ansatz mit 1  $\mu$ M Geldanamycin, ein weiterer zur Kontrolle in RPMI + 0,1 % DMSO präinkubiert. Die Präinkubation sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass auch PV-residentes Hsp90 inhibiert wird. Für den Chase wurden die Zellen neben den Referenz-Ansätzen RPMI und RBCC in RBCC + 1  $\mu$ M Geldanamycin bzw. RBCC + 0,1 % DMSO inkubiert. Nach Erhalt der Proteine aus den einzelnen Fraktionen der verschiedenen Ansätze wurden diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Verteilung der Proteine GBP, SERP und ALD mittels Western-Blotting visualisiert. Die Bandenintensitäten von GBP wurden quantifiziert und statistisch ausgewertet.

Abbildung 3.10 zeigt einen repräsentativen Western-Blot mit der dazugehörigen statistischen Auswertung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Inkubation der iRBC in RPMI zeigt in Spur 2 einen durchschnittlichen Referenzwert von 7 % der Gesamt-Bandenintensität von GBP im Inkubationsüberstand unter arretierenden Bedingungen. Der RBCC-Ansatz in Spur 3 und 4 hingegen zeigt eine Rekonstitution der Translokation des Proteins GBP über die PVM und wird als Richtwert für die Rekonstitution des Translokationsvorganges verwendet. Bei den in RBCC + Geldanamycin inkubierten iRBC ist eine Bandenintensität des Proteins GBP von durchschnittlich 61 % im Inkubationsüberstand (Spur 6) gemessen worden, welche dem Referenzwert der in RBCC inkubierten iRBC nahezu entspricht. Hieraus lässt sich zunächst folgern, dass Geldanamycin als Inhibitor von Hsp90 innerhalb der verwendeten Parameter keinen negativen Einfluss auf die rekonstitutiven Eigenschaften des RBCC besitzt.

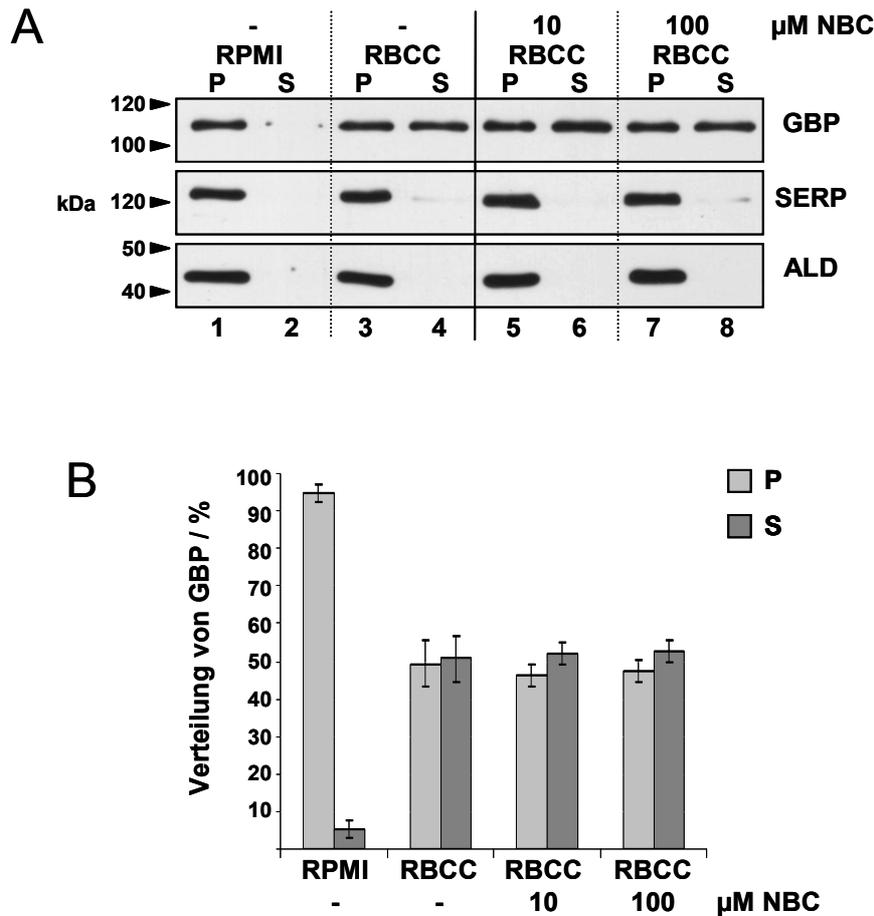


**Abb. 3.10: Einfluss von Geldanamycin auf die Translokationseffizienz von GBP.** Trophozoiteninfizierte Erythrozyten wurden mit 4 HE SLO permeabilisiert, für 45 min in RPMI inkubiert und die Zellen anschließend in RPMI, RBCC oder RBCC mit 1  $\mu$ M Geldanamycin/0,1 % DMSO bzw. 0,1 % DMSO allein für weitere 30 min inkubiert. **(A)** Western-Blot (WB) zur Visualisierung der Verteilung von GBP (7,5 %iges SDS-Gel), SERP und ALD (10 %iges SDS-Gel). Auftrag pro Spur: 1x10<sup>7</sup> Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen- $\alpha$ -GBP, Kaninchen- $\alpha$ -SERP, Kaninchen- $\alpha$ -ALD; 2. Ak Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP). **(B)** Verteilung von GBP in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Für jeden einzelnen im Translokationsassay analysierten Ansatz wurden die Werte der Bandenintensitäten aus Pelletfraktion und Inkubationsüberstand addiert und dem Wert 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden damit die prozentualen Werte der einzelnen Fraktionen und die Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Abk.: **GDA** (Geldanamycin) **P** (Pellet = lösliche Proteine aus Parasit und parasitophore Vakuole), **S** (Supernatant = lösliche Proteine aus Inkubationsüberstand).

Neben Geldanamycin sollte folgend der Einfluss eines weiteren Inhibitors von Hsp90 untersucht werden. Dafür wurde Novobiocin verwendet, welches die ATP-Bindedomäne im C-terminalen Bereich des molekularen Chaperons besetzt und dadurch seine Funktionalität beeinträchtigt (Marcu *et al.*, 2000; Allan *et al.*, 2006).

Für die Analyse wurden zunächst 4x10<sup>8</sup> iRBC mit 4 HE SLO permeabilisiert und gewaschen. Während der primären Inkubation der Zellen in RPMI wurde ein Ansatz mit 10  $\mu$ M, ein weiterer mit 100  $\mu$ M Novobiocin präinkubiert. Für den Chase wurden

die Zellen auf vier Ansätze à  $1 \times 10^8$  iRBC aliquotiert und neben den Referenz-Ansätzen RPMI und RBCC in RBCC + 10 bzw. 100  $\mu\text{M}$  Novobiocin (NBC) inkubiert. Die anschließend erhaltenen Proben wurden durch SDS-Page aufgetrennt und die Verteilung der Proteine GBP, SERP und ALD mittels Western-Blot Analyse visualisiert. Die Bandenintensitäten von GBP in den einzelnen Fraktionen wurden quantifiziert und statistisch ausgewertet.



**Abb. 3.11: Einfluss von Novobiocin auf die Translokationseffizienz von GBP.** Trophozoiten-infizierte Erythrozyten wurden mit 4 HE SLO permeabilisiert, für 45 min in RPMI inkubiert und die Zellen anschließend in RPMI, RBCC oder RBCC mit 10 bzw. 100  $\mu\text{M}$  Novobiocin für weitere 30 min inkubiert. **(A)** Western-Blot (WB) zur Visualisierung der Verteilung von GBP (7,5 %iges SDS-Gel), SERP und ALD (10 %iges SDS-Gel). Auftrag pro Spur:  $1 \times 10^7$  Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen- $\alpha$ -GBP, Kaninchen- $\alpha$ -SERP, Kaninchen- $\alpha$ -ALD; 2. Ak Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP). **(B)** Verteilung von GBP in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Für jeden einzelnen im Translokationsassay analysierten Ansatz wurden die Werte der Bandenintensitäten aus Pelletfraktion und Inkubationsüberstand addiert und dem Wert 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden damit die prozentualen Werte der einzelnen Fraktionen und die Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Abk.: **NBC** (Novobiocin), **P** (Pellet = lösliche Proteine aus Parasit und parasitophore Vakuole), **S** (Supernatant = lösliche Proteine aus Inkubationsüberstand).

Die Abbildung 3.11 zeigt einen repräsentativen Western-Blot und die statistische Auswertung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Der Chase von GBP in Anwesenheit von RPMI und RBCC führte zu einer Detektion von durchschnittlich 5 (Spur 2) bzw. 51 % (Spur 4) der Gesamtintensität der GBP-Banden der jeweiligen Ansätze im Inkubationsüberstand. Diese Werte fungieren als Referenz für die Arretierung bzw. Rekonstitution der Translokation von GBP über die PVM. Sowohl die mit 10  $\mu\text{M}$  als auch die mit 100  $\mu\text{M}$  NBC inkubierten RBCC-Ansätze zeigen in Spur 6 bzw. 8 Bandenintensitäten des Proteins GBP von ca. 52 % und stimmen mit dem Referenzwert nahezu überein. Daraus lässt sich folgern, dass auch Novobiocin innerhalb der gewählten Parameter keinen negativen Einfluss auf die Rekonstitution der Translokation von GBP über die PVM besitzt.

#### 3.4.2 Fazit

Durch die Verwendung der Hsp90-Inhibitoren Geldanamycin und Novobiocin im Translokationsassay konnte keine inhibierende Wirkung auf die Rekonstitution der Translokationsaktivität beobachtet werden. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass Hsp90 nicht unmittelbar in die posttranslationale Translokation von GBP über die PVM involviert ist. Weiterhin ist es durchaus möglich, dass die Verwendung der genannten Parameter keinen inhibitorischen Einfluss von Geldanamycin oder Novobiocin zulässt. Es wäre denkbar, dass die Bindungsstellen für die Inhibitoren bereits besetzt sind und deshalb innerhalb der gewählten Inkubationsdauer im Translokationsassay keine detektierbare Inhibition stattfinden kann. Darüber hinaus ist es möglich, dass aufgrund des nachgewiesenen Schwarzschild-Effekts, der die Bandenintensitäten im Western-Blot beeinflusst, kein inhibierender Effekt der Inhibitoren qualitativ dargestellt werden kann, auch wenn ein negativer Einfluss von Geldanamycin und Novobiocin auf die Translokationsaktivität von GBP über die PVM bestünde.

### 3.5 Der Einfluss von *HsHsp70* auf die Translokation von GBP über die PVM

Ein für die posttranslationale Translokation von Proteinen über Membranen oftmals essentieller Faktor ist das molekulare Chaperon Hsp70. Neben der Aufgabe, das Substratprotein innerhalb eines sogenannten „Guidance-Komplexes“ in einen translokationskompetenten Zustand zu bringen und zu stabilisieren, ist es auch für die Unidirektionalität des Translokationsprozesses verantwortlich. Dabei verhilft das oft auch als „Motor-Protein“ bezeichnete Hsp70 dem Substratprotein durch den sich wiederholenden Zyklus des Bindens und Lösens durch die wässrige Pore einer Translokase zu gelangen. Die Bindung des Substratproteins durch das Chaperon an der Ausgangsseite der Translokase verhindert die rückwärtige Bewegung des Proteins und gibt so die Richtung der Translokation vor. Da bisherige *in silico* Analysen des Genoms von *Plasmodium falciparum* keinerlei Hinweise auf die Existenz von exportierten Proteinen der Hsp70-Familie aus dem Parasiten in die Wirtszelle ergaben, sollte untersucht werden, ob das Wirtszell-eigene Hsp70 vom Parasiten rekrutiert wird, um die Translokation von Proteinen über die Membran der parasitophoren Vakuole zu vermitteln. Es wäre durchaus denkbar, dass bei einer möglichen Existenz eines PVM-ständigen Translokationsapparates das humane Hsp70 mit diesem assoziiert und die Translokation von Substratproteinen des Parasiten ermöglicht. Bereits Banumathy *et al.* konnten zeigen, dass das humane Hsp70 im Ringstadium von *Plasmodium falciparum* an die Erythrozytenmembran einer infizierten Zelle rekrutiert wird und dort scheinbar an der Ausbildung der Knob-Strukturen beteiligt ist (Banumathy *et al.*, 2002).

#### 3.5.1 *HsHsp70* assoziiert mit der Membran der parasitophoren Vakuole im infizierten Erythrozyten

Um einen ersten Hinweis auf eine mögliche Beteiligung des Chaperons am Translokationsvorgang von GBP über die PVM zu erhalten, sollte das membranassoziierte humane Hsp70 innerhalb des Trophozoiten-infizierten Erythrozyten lokalisiert werden. Da für diese Studien kein spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, der eine Lokalisation mittels Immunfluoreszenz ermöglicht hätte,

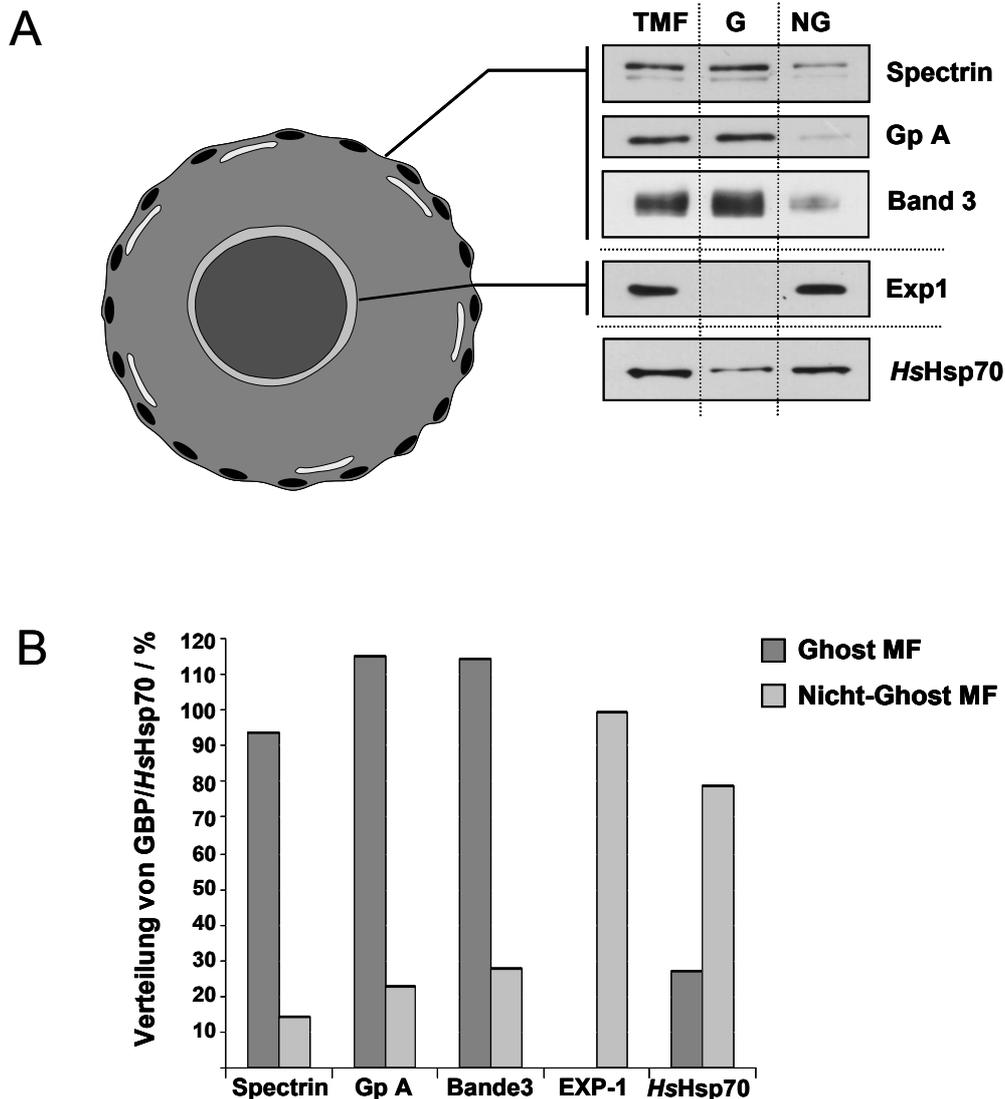
wurde die Lokalisation mittels Subfraktionierung der Membranen einer infizierten Zelle durch die Präparation von sogenannten „Ghosts“ durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.6). Diese Methode erlaubt die Trennung der Erythrozytenmembran des infizierten Erythrozyten von der Plasmamembran des Parasiten und der PVM (Blisnick *et al.*, 2000; Vincensini *et al.*, 2005).

Dafür wurden von  $4 \times 10^8$  iRBC Ghost-Membranen generiert und die übrigen Membranen als Nicht-Ghost Fraktion weiter verwendet. Zusätzlich dazu wurde eine Total-Membranfraktion generiert, um einen Vergleichswert für die quantitative Bestimmung der Gesamtmenge eines Proteins innerhalb der verschiedenen Membranen der iRBC zu erhalten.

Die Proteine der generierten Membranfraktionen wurden durch SDS-Page aufgetrennt und die Verteilung der Proteine Spectrin, Glycophorin A, Bande 3, EXP-1 und *HsHsp70* mittels Western-Blot Analyse visualisiert. Die Bandenintensitäten der Proteine in den jeweiligen Fraktionen wurden quantifiziert und ausgewertet.

Wie in Abbildung 3.12 zu sehen ist, verteilen sich die detektierten Markerproteine, ihrer bekannten Lokalisation folgend, innerhalb der analysierten Membranfraktionen. Dabei sind die Markerproteine der Erythrozytenmembran, in diesem Fall Spectrin, Glycophorin A und Bande 3, erwartungsgemäß vorwiegend in der Ghost-Fraktion detektierbar. Es sind darüber hinaus auch geringe Mengen der Proteine innerhalb der Nicht-Ghost-Fraktion vertreten, doch handelt es sich hierbei wahrscheinlich um Kontaminationen von Ghosts, da diese zu einem geringen Anteil ebenfalls innerhalb der Nicht-Ghost-Fraktion sedimentieren. Nicht auszuschließen ist ebenfalls die Möglichkeit, dass es sich um internalisierte Proteine handelt, die während des Invasionsprozesses in die sich bildende PVM integriert werden.

Die Detektion des PVM-Markers EXP-1 zeigt eine klare Verteilung innerhalb der analysierten Fraktionen. So ist das Protein vollständig in der Nicht-Ghost-Fraktion sedimentiert und daher auch nur dort detektierbar. Aus der Verteilung der Markerproteine lässt sich folgern, dass die Trennung der Membranen erfolgreich war und eine Lokalisation der membranassoziierten Population des Proteins *HsHs70* möglich ist.

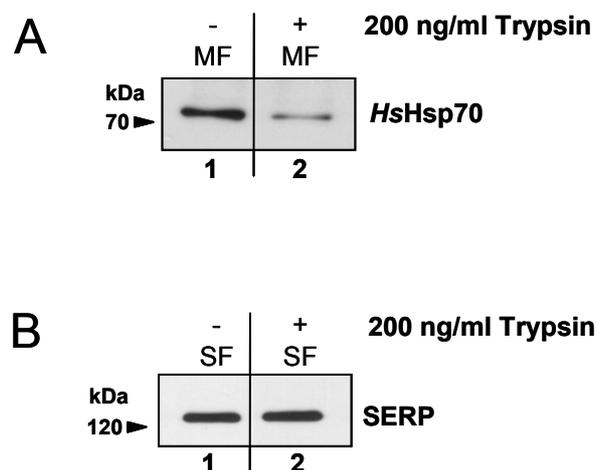


**Abb. 3.12: Lokalisation des humanen Hsp70 durch Ghost-Fraktionierung von iRBC.** Trophozoiten-infizierte Erythrozyten wurden mit 5 mM Na-Phosphatpuffer lysiert und die Membranen anschließend bei 16500 x g sedimentiert. Die differenziell sedimentierten Membranfraktionen (Ghost-Membran bzw. Nicht-Ghost-Membran) wurden separiert und gewaschen. **(A)** Western-Blot (WB) zur Visualisierung der Verteilung von Spectrin, Bande 3, HsHsp70 (7,5 %iges SDS-Gel), Glycophorin A und EXP-1 (12 %iges SDS-Gel). Auftrag pro Spur: (Bande 3)  $1 \times 10^6$ , (Spectrin)  $5 \times 10^6$ , (Glycophorin A)  $1 \times 10^7$ , (EXP-1)  $1 \times 10^7$ , (HsHsp70)  $2 \times 10^7$  Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen- $\alpha$ -EXP-1C, Kaninchen- $\alpha$ -Spectrin, Maus- $\alpha$ -Bande 3; Maus- $\alpha$ -Glycophorin AB, Maus- $\alpha$ -HsHsp70; 2. Ak Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP), Huhn- $\alpha$ -Maus (HRP). **(B)** Verteilung der angegebenen Proteine in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Abk.: **G** (Ghost-Membranfraktion), **NG** (Nicht-Ghost-Membranfraktion), **TMF** (Total-Membranfraktion).

Das Chaperon HsHsp70 verteilt sich zu 80 % bzw. 25 % auf Nicht-Ghost-Fraktion und Ghost-Fraktion. Dies zeigt, dass das Protein in jedem Fall neben seiner bereits bekannten Assoziation mit der Erythrozytenmembran auch mit der PVM oder der Plasmamembran des Parasiten assoziiert vorliegt.

In einem weiteren Experiment sollte analysiert werden, ob die membranassoziierte Population des humanen Hsp70 innerhalb von SLO-permeabilisierten iRBC der Protease Trypsin zugänglich ist. Dadurch soll ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem in der Membranfraktion der iRBC detektierten Protein um möglicherweise internalisiertes Protein handelt, welches mit der Plasmamembran des Parasiten assoziiert.

Dafür wurden pro Ansatz  $2 \times 10^8$  iRBC mit 4 HE SLO permeabilisiert und gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit und ohne Trypsin inkubiert und danach sowohl die löslichen als auch die Membranproteine durch Lyse der Zellen erhalten. Die so generierten Proben wurden durch SDS-Page aufgetrennt und die Quantitäten der Proteine HsHsp70 und SERP mittels Western-Blot Analyse visualisiert.



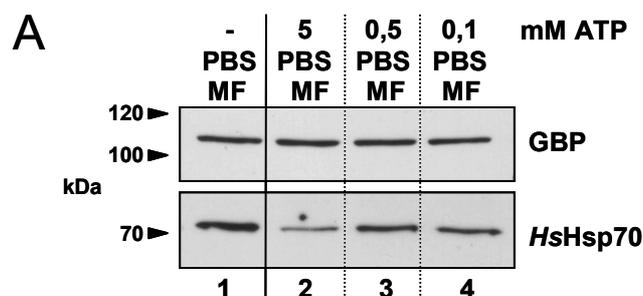
**Abb. 3.13: Einfluss der Trypsinierung von SLO-permeabilisierten iRBC die membranassoziierte Population von HsHsp70.** Trophozoiten-infizierte Erythrozyten wurden mit 4 HE SLO permeabilisiert und für 10 min in An- oder Abwesenheit von 200 ng/ml trypsiniert und die Zellen anschließend lysiert, um die löslichen Proteine und die Membranfraktion der permeabilisierten iRBC zu erhalten. Western-Blot zur Visualisierung der Quantitäten von **(A)** HsHsp70 (7,5 %iges SDS-Gel) und **(B)** SERP (10 %iges SDS-Gel). Auftrag pro Spur: (HsHsp70)  $2 \times 10^7$ , (SERP)  $1 \times 10^7$  Zelläquivalent; 1. Ak Maus- $\alpha$ -HsHsp70, Kaninchen- $\alpha$ -SERP; 2. Ak Huhn- $\alpha$ -Maus (HRP), Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP). Abk.: **MF** (Membranfraktion der SLO-permeabilisierten iRBC), **SF** (lösliche Proteine der SLO-permeabilisierten iRBC).

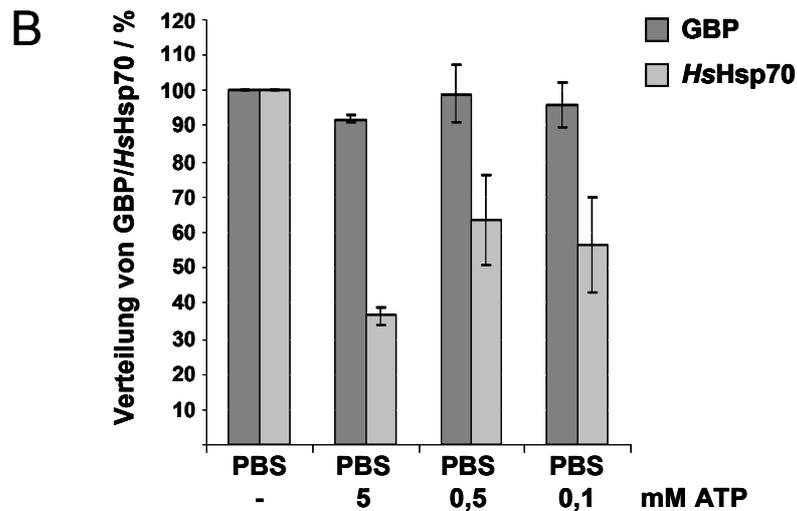
Die Abbildung 3.13 zeigt, dass während der Inkubation von SLO-permeabilisierten iRBC mit Trypsin die membranassoziierte Population von HsHsp70 gegenüber dem proteolytischen Verdau durch die Protease sensitiv ist, im Gegensatz zur Kontrolle mit dem PV-residenten SERP, welches vor der Protease geschützt bleibt. Somit kann eine Internalisierung des Chaperons ausgeschlossen werden. Dadurch ist

gezeigt, dass das in der Nicht-Ghost-Fraktion detektierte humane Hsp70 der Wirtszelle (Abb. 3.12) an der zytosolische Seite der PVM membranassoziiert vorliegt. Ausgehend von der Tatsache, dass das Protein neben seinem löslichen Zustand auch mit der zytosolischen Seite der PVM assoziiert, stellt sich die Frage, ob diese Membranassoziation unspezifischer Natur ist oder ob sie durch die Fähigkeit des Chaperons, an Proteine zu binden, verursacht wird. Da die Stärke der Bindung von Hsp70 an ein Substratprotein durch Bindung und Hydrolyse von ATP reguliert wird, sollte der Einfluss von ATP auf die Membranassoziation des humanen Hsp70 getestet werden.

Dazu wurden  $4 \times 10^8$  iRBC mit 4 HE SLO permeabilisiert und gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf 4 Ansätze à  $1 \times 10^8$  iRBC aliquotiert und wahlweise in 1x PBS pH 7,3 oder 1x PBS pH 7,3 + ATP in den Konzentrationen 5; 0,5 und 0,1 mM für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Sedimentation der Zellen wurden diese lysiert und die Proteine der erhaltenen Membranfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Quantitäten des humanen Hsp70 mittels Western-Blot visualisiert. Da das Parasitenprotein GBP innerhalb des Erythrozyten ebenfalls membranassoziiert vorliegt, wurde es als Kontrolle verwendet.

In Spur 2 der Abbildung 3.14 ist zu sehen, dass durch die Inkubation der SLO-permeabilisierten iRBC in Anwesenheit von 5 mM ATP die Bandenintensität des membranassoziierten humanen Hsp70 auf unter 40 % reduziert wird. Auch die Konzentrationen von 0,5 bzw. 0,1 mM ATP (Spur 3 bzw. 4) führen zur Reduktion der detektierbaren Proteinmenge in der Membranfraktion, wenn auch zu einer deutlich geringeren. Die Anwesenheit von ATP zeigt gegenüber dem membranassoziierten GBP erwartungsgemäß keinerlei Auswirkung, da dieses Protein über keine bekannten ATP-Bindungseigenschaften verfügt.





**Abb. 3.14: Einfluss von ATP auf die Membranassoziation von HsHsp70.** Trophozoiten-infizierte Erythrozyten wurden mit 4 HE SLO permeabilisiert und anschließend für 30 min bei 37 °C in PBS mit den angegebenen Konzentrationen ATP inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert, die Membranfraktionen erhalten und analysiert. **(A)** Western-Blot (WB) zur Visualisierung der Verteilung von GBP und HsHsp70 (7,5 %iges SDS-Gel). Auftrag pro Spur: (GBP) 1x10(7), (HsHsp70) 2x10(7) Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen- $\alpha$ -GBP, Maus- $\alpha$ -HsHsp70, 2. Ak Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP), Huhn- $\alpha$ -Maus (HRP). **(B)** Verteilung von GBP und HsHsp70 in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Die prozentuale Verteilung der Proteine und die Standardabweichung wurde aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Abk.: **MF** (Membranfraktion von SLO-permeabilisierten iRBC).

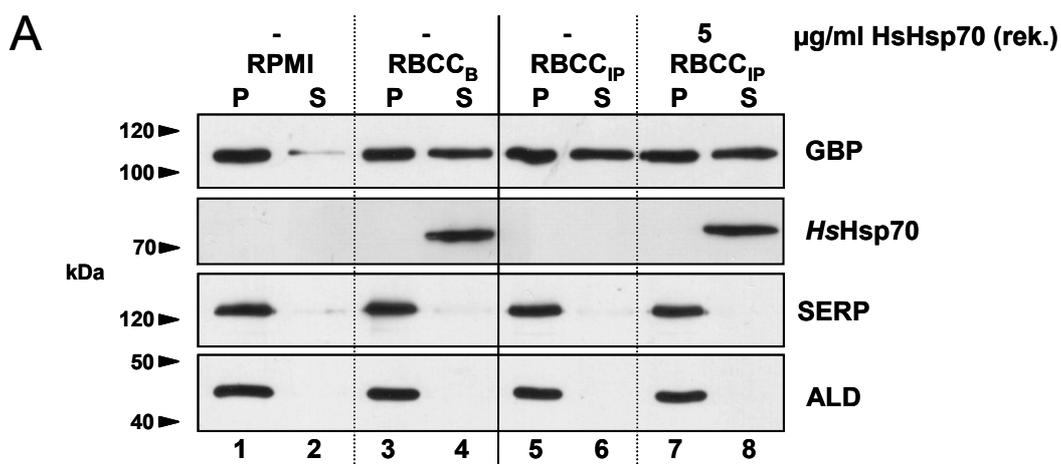
Aus diesem Ergebnis lässt sich folgern, dass die Membranassoziation des wirtseigenen Hsp70 auf seine ATP-regulierte Bindung an Substratproteinen zurückzuführen ist.

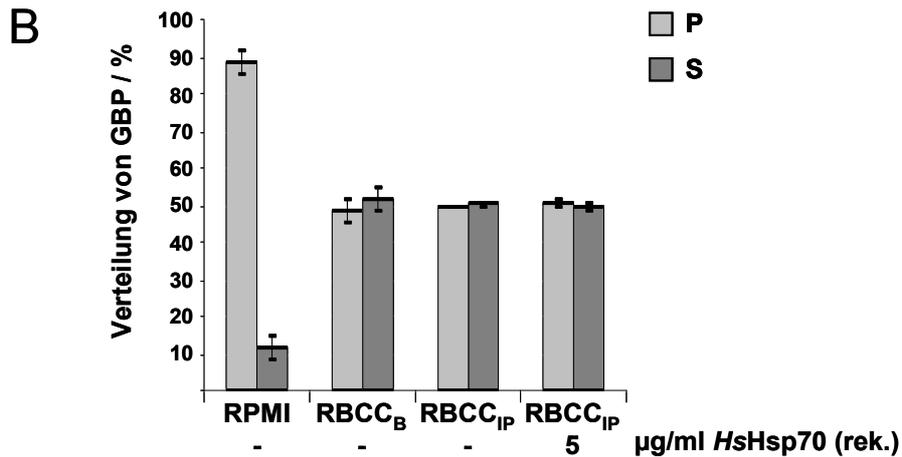
### 3.5.2 Die quantitative Reduktion des löslichen HsHsp70 aus dem Zytosol führt zu keiner Inhibition der Translokation von GBP über die PVM

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Hsp70 der Wirtszelle neben seinem löslichen Zustand auch an die zytosolische Seite der PVM bindet und diese Assoziation auf seine Eigenschaft zurückzuführen ist, Substratproteine in einer ATP-abhängigen Weise zu binden, sollte nun untersucht werden, ob eine Reduktion der Hsp70 Konzentration im RBCC einen negativen Einfluss auf die Translokationseffizienz von GBP über die PVM im Translokationsassay hat. Ist das humane Hsp70 an dem Translokationsprozess von Proteinen beteiligt, so wäre es möglich, dass eine verringerte Präsenz des Proteins im Zytosol der Wirtszelle zur Arretierung der Translokation führt.

Dazu wurde zunächst die Konzentration des *HsHsp70* im RBCC durch 5 aufeinander folgende Immunpräzipitationen (IP) mit einem spezifisch gegen das Protein gerichteten, monoklonalen Antikörper reduziert (RBCC<sub>IP</sub>). Für die Ermittlung des positiven Richtwerts wurde parallel dazu RBCC in 5 aufeinander folgenden Schritten ausschließlich mit Protein G Sepharose Beads inkubiert (RBCC<sub>B</sub>). Western-Blot Analysen konnten zeigen, dass nach der fünften IP in einem Zelläquivalent von  $1 \times 10^7$  kein humanes Hsp70 im RBCC mehr detektierbar war (Daten nicht gezeigt). Da das Detektionslimit für *HsHsp70* im Western-Blot bei einem Zelläquivalent von  $1 \times 10^6$  RBCC liegt, bedeutet dies, dass die Konzentration des Chaperons im RBCC mindestens um das Zehnfache abgenommen hat. Es bedeutet jedoch nicht, dass das Protein depletiert wurde.

Für den Translokationsassay wurden zunächst  $4 \times 10^8$  iRBC mit 4 HE SLO permeabilisiert und vorbereitet. Für den Chase wurden die Zellen auf vier Ansätze à  $1 \times 10^8$  iRBC aliquotiert und neben den Referenz-Ansätzen RPMI und RBCC<sub>B</sub> in RBCC<sub>IP</sub> bzw. RBCC<sub>IP</sub> + 5 µg/ml rekombinantes *HsHsp70* inkubiert. Die anschließend erhaltenen Proben wurden durch SDS-Page aufgetrennt und die Verteilung der Proteine GBP, *HsHsp70*, SERP und ALD mittels Western-Blot Analyse visualisiert. Die Bandenintensitäten von GBP in den einzelnen Fraktionen wurden aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten quantifiziert und statistisch ausgewertet.





**Abb. 3.15: Einfluss von HsHsp70 im RBCC auf die Translokationseffizienz von GBP.** Für den Einsatz im Translokationsassay wurde die Konzentration von HsHsp70 im RBCC durch 5 aufeinander folgende IP um mindestens das Zehnfache reduziert (RBCC<sub>IP</sub>). Gleichzeitig wurde für den positiven Richtwert RBCC in 5 aufeinander folgenden Schritten ausschließlich mit Protein G Sepharose Beads inkubiert. Anschließend wurden Trophoziten-infizierte Erythrozyten mit 4 HE SLO permeabilisiert, für 45 min in RPMI inkubiert und die Zellen anschließend in RPMI, RBCC<sub>B</sub> oder RBCC<sub>IP</sub> bzw. RBCC<sub>IP</sub> + 5 µg/ml HsHsp70 (rek.) für weitere 30 min inkubiert. **(A)** Western-Blot (WB) zur Visualisierung der Verteilung von GBP und HsHsp70 (7,5 %iges SDS-Gel), SERP und ALD (10 %iges SDS-Gel). Auftrag pro Spur: 1x10(7) Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen-α-GBP, Maus-α-HsHsp70, Kaninchen-α-SERP, Kaninchen-α-ALD; 2. Ak Ziege-α-Kaninchen (HRP), Huhn-α-Maus (HRP). **(B)** Verteilung von GBP in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Für jeden einzelnen im Translokationsassay analysierten Ansatz wurden die Werte der Bandenintensitäten aus Pelletfraktion und Inkubationsüberstand addiert und dem Wert 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden damit die prozentualen Werte der einzelnen Fraktionen und die Standardabweichung aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Abk.: **P** (Pellet = lösliche Proteine aus Parasit und parasitophore Vakuole), **S** (Supernatant = lösliche Proteine aus Inkubationsüberstand).

Betrachtet man die Verteilung von GBP in den Abbildungen 3.15, so zeigt die Inkubation in RPMI einen Richtwert für die Arretierung der Translokation in Spur 2 von durchschnittlich 10 %, während die Inkubation der permeabilisierten iRBC in RBCC<sub>B</sub> zur Detektion von ca. 52 % Bandenintensität des Proteins GBP im Inkubationsüberstand geführt hat (Spur 4).

Darüber hinaus ist zu erkennen, dass die Reduktion der humanen Hsp70-Konzentration im RBCC (RBCC<sub>IP</sub>) über keinen sichtbaren negativen Einfluss auf die Translokationseffizienz verfügt, was sich in der Bandenintensität von ca 51% des Proteins GBP im Inkubationsüberstand widerspiegelt. Erwartungsgemäß hat deshalb auch die Zuführung von rekombinantem HsHsp70 keinen sichtbaren positiven Einfluss auf die Translokationseffizienz von GBP. Somit hat dieses Experiment gezeigt, dass die minimal zehnfache Reduktion der humanen Hsp70-Konzentration im RBCC keinen Einfluss auf die Translokationseffizienz von GBP über die PVM besitzt.

### 3.5.3 Fazit

Zur Klärung einer möglichen Rekrutierung des wirtseigenen Chaperons Hsp70 zur Translokation von Proteinen über die PVM konnte gezeigt werden, dass das HsHsp70 nicht nur, wie zuvor durch Banumathy *et al.* beschrieben, an die Erythrozytenmembran bindet, sondern auch ATP-abhängig an der zytosolischen Seite der PVM assoziiert vorliegt. Die zehnfache Reduktion der HsHsp70-Konzentration des im Translokationsassay verwendeten RBCC zeigte keinen arretierenden Einfluss auf die Translokation von GBP über die PVM. Da vermutlich keine vollständige Depletion des Proteins aus dem RBCC erreicht werden konnte, kann deshalb nicht eindeutig geklärt werden, ob das Wirtschaperon am Transport von Proteinen des Parasiten beteiligt ist. Darüber hinaus ist auch hier möglich, dass der Schwarzschild-Effekt einen negativen Einfluss maskiert und dieser so nicht visualisiert werden kann.

## 3.6 Der Einfluss von wirtsfremden Proteinen auf die GBP-Translokation

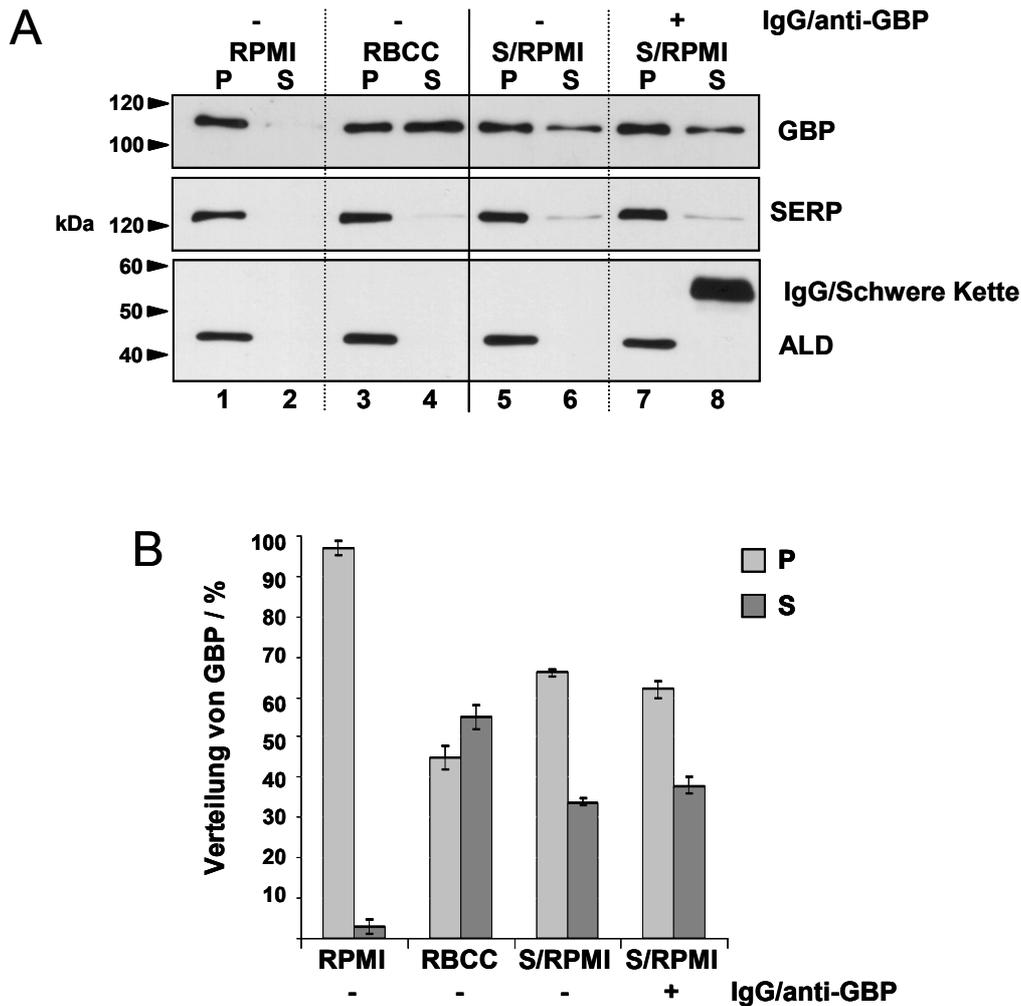
Da ein direkter Nachweis der Beteiligung von wirtseigenem Chaperon Hsp70 an der Translokation von GBP über die Membran der parasitophoren Vakuole durch die vorigen Experimente nicht möglich war, sollte ein indirekter Nachweis über die mechanistische Wirkungsweise von Hsp70 bei Translokationsprozessen über biologische Membranen erbracht werden. Matlack und Kollegen konnten zeigen, dass gegen ein Zielprotein gerichtete spezifische Antikörper in der Lage sind, die Funktion von Hsp70 bei Translokationsprozessen als „molecular ratchet“ nachzuahmen und die Translokation des Zielproteins über eine Membran zu ermöglichen (Matlack *et al.*, 1999).

### 3.6.1 Die Depletion der IgG-Fraktion hat keinen negativen Einfluss auf die rekonstitutiven Eigenschaften eines Kaninchen-Antiserums

Um das von Matlack *et al.* verwendete System auf die Translokation von GBP über die PVM zu übertragen, wurde zunächst die IgG-Fraktion mit dem darin enthaltenen gegen GBP gerichteten polyklonalen Antikörper aus einem Kaninchen-Antiserum (1:50 in RPMI verdünnt = S/RPMI) durch 2 aufeinander folgende Inkubationen mit Protein A Sepharose Beads depletiert.

Für den Translokationsassay wurden  $4 \times 10^8$  iRBC mit 4 HE SLO permeabilisiert und vorbereitet. Für den Chase wurden die Zellen auf vier Ansätze à  $1 \times 10^8$  iRBC aliquotiert und neben den Referenz-Ansätzen RPMI und RBCC in S/RPMI – bzw. + IgG-Fraktion inkubiert. Die anschließend erhaltenen Proben wurden durch SDS-Page aufgetrennt und die Verteilung der Proteine GBP, SERP und ALD mittels Western-Blot Analyse visualisiert. Die Bandenintensitäten von GBP in den einzelnen Fraktionen wurden aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten quantifiziert und statistisch ausgewertet.

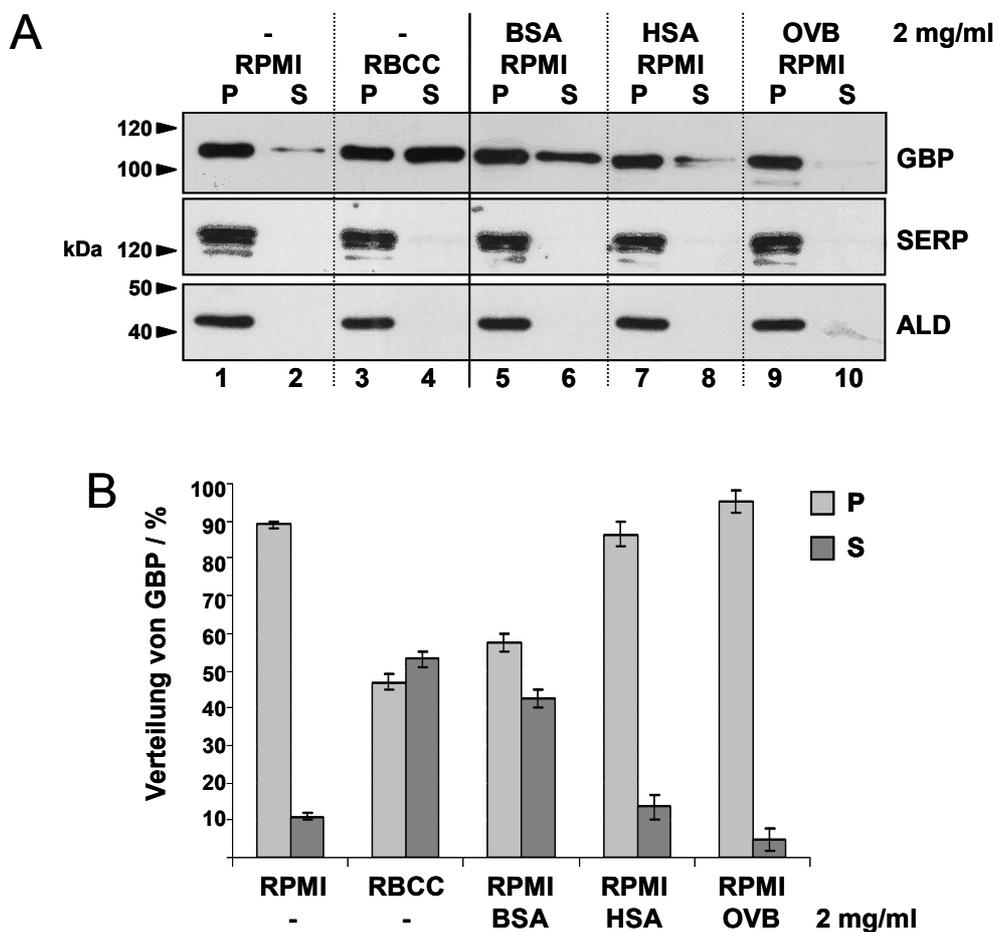
Betrachtet man die Verteilung von GBP in der Abbildung 3.16, so zeigt die Inkubation in RPMI einen Richtwert für die Arretierung der Translokation in Spur 2 von weniger als 5 %, während die Inkubation der permeabilisierten iRBC in RBCC zur Detektion über 55 % Bandenintensität des Proteins GBP im Inkubationsüberstand geführt hat (Spur 4). Der Vergleich der Bandenintensitäten in den Spuren 6 und 8 mit dem negativen Referenzwert zeigt, dass durch die Zugabe des Kaninchen-Antiserums die Translokationsaktivität rekonstituiert wird, wenn auch geringer als dies bei RBCC der Fall ist. Vergleicht man Spur 6 und 8, so ist anhand der Detektion der schweren Kette der IgG in Spur 8 und dem Fehlen dieser Bande in Spur 6 deutlich sichtbar, dass die IgG-Fraktion depletiert wurde. Allerdings ist zu bemerken, dass die Depletion der IgG-Fraktion (Spur 6) keinen negativen Einfluss auf die rekonstitutiven Eigenschaften des Antiserums besitzt. Dies deutet darauf hin, dass nicht die Antikörper bzw. der GBP-spezifische Antikörper die Rekonstitution der Translokation entscheidend vermittelt, sondern vermutlich Proteine aus dem Serum selbst rekonstitutive Eigenschaften besitzen.



**Abb. 3.16: Einfluss von anti-GBP in RPMI auf die Translokationseffizienz von GBP.** Für den Einsatz im Translokationsassay wurde die IgG-Fraktion eines in RPMI verdünnten (1:50) GBP-Antiserums aus Kaninchen durch 2 aufeinander folgende Inkubationsschritte mit Protein A Sepharose Beads depletiert. Anschließend wurden Trophoziten-infizierte Erythrozyten mit 4 HE SLO permeabilisiert, für 45 min in RPMI inkubiert und die Zellen anschließend in RPMI, RBCC oder S/RPMI bzw. S/RPMI + IgG für weitere 30 min inkubiert. **(A)** Western-Blot (WB) zur Visualisierung der Verteilung von GBP (7,5 %iges SDS-Gel); SERP, Kaninchen-IgG und ALD (10 %iges SDS-Gel). Auftrag pro Spur:  $1 \times 10^7$  Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen- $\alpha$ -GBP, Kaninchen- $\alpha$ -SERP, Kaninchen- $\alpha$ -ALD; 2. Ak Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP). **(B)** Verteilung von GBP in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Für jeden einzelnen im Translokationsassay analysierten Ansatz wurden die Werte der Bandenintensitäten aus Pelletfraktion und Inkubationsüberstand addiert und dem Wert 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden damit die prozentualen Werte der einzelnen Fraktionen und die Standardabweichung aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Abk.: **P** (Pellet = lösliche Proteine aus Parasit und parasitophore Vakuole), **S** (Supernatant = lösliche Proteine aus Inkubationsüberstand), **S/RPMI** (Kaninchen-Serum 1:50 in RPMI verdünnt).

Da offensichtlich Proteine des Kaninchen-Antiserums neben den wirtseigenen Proteinen ebenfalls in der Lage sind, die Translokation von GBP über die PVM zu induzieren, sollte analysiert werden, ob das im Serum abundante Protein Albumin dabei involviert ist. Dazu sollten Albumine verschiedener Spezies im *in vitro* Assay auf ihre rekonstitutiven Eigenschaften getestet werden.

Zunächst wurden Trophozoiten-infizierte iRBC mit 4 HE SLO permeabilisiert, gewaschen und für den Translokationsassay vorbereitet. Für den Chase wurden die Zellen auf fünf Ansätze à  $1 \times 10^8$  iRBC aliquotiert und neben den Referenz-Ansätzen RPMI und RBCC in RPMI + 2 mg/ml BSA (bovines Serumalbumin), HSA (humanes Serumalbumin) oder OVB (Ovalbumin) inkubiert. Die anschließend erhaltenen Proben wurden durch SDS-Page aufgetrennt und die Verteilung der Proteine GBP, SERP und ALD mittels Western-Blot Analyse visualisiert. Die Bandenintensitäten von GBP in den einzelnen Fraktionen wurden aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten quantifiziert und statistisch ausgewertet.



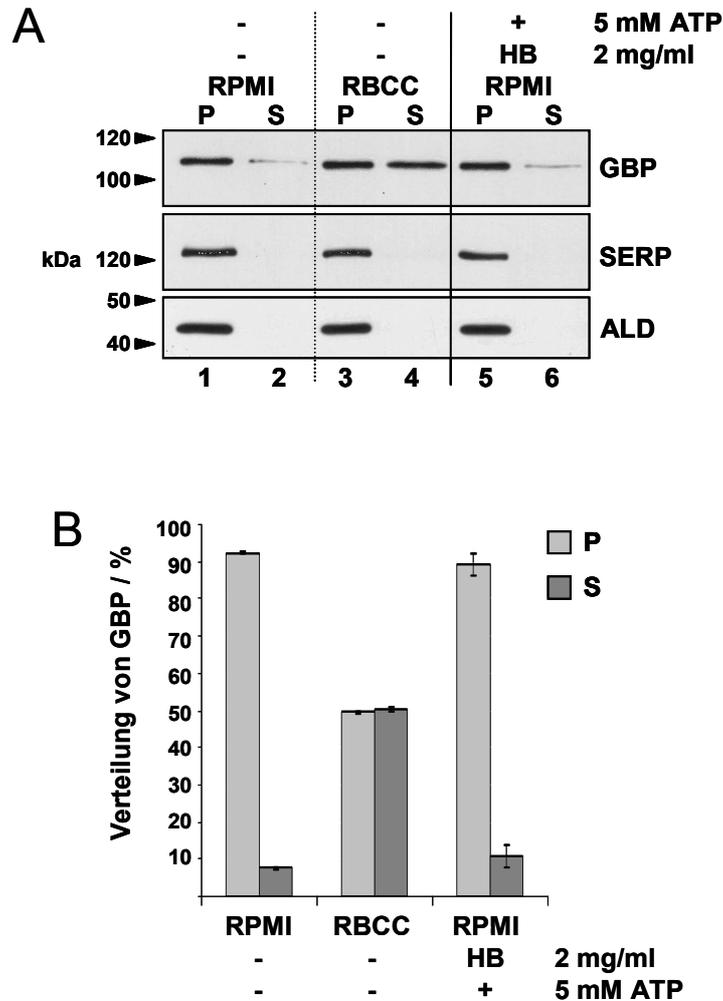
**Abb. 3.17: Einfluss von Albumin verschiedener Spezies auf die Translokationseffizienz von GBP.** Trophozoiten-infizierte Erythrozyten wurden mit 4 HE SLO permeabilisiert, für 45 min in RPMI inkubiert und die Zellen anschließend in RPMI, RBCC oder RPMI mit 2 mg/ml der verschiedenen Albumine für weitere 30 min inkubiert. **(A)** Western-Blot (WB) zur Visualisierung der Verteilung von GBP (7,5 %iges SDS-Gel), SERP und ALD (10 %iges SDS-Gel). Auftrag pro Spur:  $1 \times 10^7$  Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen- $\alpha$ -GBP, Kaninchen- $\alpha$ -SERP, Kaninchen- $\alpha$ -ALD; 2. Ak Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP). **(B)** Verteilung von GBP in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Für jeden einzelnen im Translokationsassay analysierten Ansatz wurden die Werte der Bandenintensitäten aus Pelletfraktion und Inkubationsüberstand addiert und dem Wert 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden damit die prozentualen Werte der einzelnen Fraktionen und die Standardabweichung aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Abk.: **BSA** (Bovines Serumalbumin), **HSA** (Humanes Serumalbumin), **OVB** (Ovalbumin), **P** (Pellet = lösliche Proteine aus Parasit und parasitophore Vakuole), **S** (Supernatant = lösliche Proteine aus Inkubationsüberstand).

Die Abbildung 3.17 zeigt einen repräsentativen Western-Blot mit der korrespondierenden statistischen Auswertung. Die während des Chase in RPMI inkubierten iRBC zeigen eine erwartete sehr geringe Translokationsrate, repräsentiert durch durchschnittlich 10 % GBP-Bandenintensität in Spur 2 (negativer Richtwert). Durch die Inkubation der permeabilisierten iRBC in RBCC zeigt sich in Spur 4 im Mittel eine Zunahme der Bandenintensität auf 53 % (positiver Richtwert). Die Inkubation der iRBC in RPMI + 2 mg/ml der verschiedenen Albumine zeigt nur bei der Verwendung von BSA einen rekonstitutiven Einfluss auf die Translokationsaktivität, die Zugabe von HSA oder OVB führte zu keiner Erhöhung der Translokationseffizienz, was der Vergleich der Spuren 8 und 10 mit dem Wert aus Spur 2 des negativen Referenzwertes belegt. Die Tatsache, dass die Zugabe von BSA zu RPMI unter normalerweise arretierenden Bedingungen einen positiven Einfluss auf die Translokationsaktivität von GBP über die PVM hat, könnte einerseits dadurch erklärt werden, dass es aufgrund der Abundanz des BSA in RPMI häufig zu unspezifischen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen kommen kann und BSA durch die Bindung an ein translozierendes Protein einen gerichteten Transport in den Inkubationsüberstand vermitteln kann. Dagegen spricht die Tatsache, dass dies bei HSA bzw. OVB nicht der Fall ist. Andererseits ist es durchaus denkbar, dass in der verwendeten BSA-Fraktion Kontaminationen anderer Serumproteine vorhanden sind, wie z.B. Proteine, bei denen unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eine funktionelle Voraussetzung ist, oder auch Hsp70, welches ebenfalls im Serum vorhanden ist. In jedem Fall zeigt dieses Experiment, dass auch Proteine, die keinen humanen Ursprung besitzen, in der Lage sind, die Translokation von GBP über die PVM zu vermitteln.

Um zu untersuchen, ob das Hämoglobin (HB) des Wirtes aufgrund seiner Abundanz im verwendeten RBCC und der dadurch wahrscheinlichen unspezifischen Wechselwirkung mit anderen Proteinen in der Lage ist, die Translokation von GBP zu vermitteln, wurde der Einfluss von humanem HB in Anwesenheit von ATP auf die Translokationsaktivität analysiert.

Dazu wurden  $3 \times 10^8$  iRBC mit 4 HE SLO permeabilisiert und für die Chase-Phase im Translokationsassay vorbereitet. Die Zellen wurden auf drei Ansätze à  $1 \times 10^8$  iRBC aliquotiert und zwei davon in RPMI bzw RBCC für die Ermittlung der Richtwerte inkubiert. Der dritte Ansatz wurde in RPMI unter Zugabe von 2 mg/ml HB und 5 mM ATP inkubiert. Nach Ende der Chase-Phase und dem Erhalt der einzelnen

Fractionen wurden die Proteingemische mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Verteilung der Proteine GBP, SERP und ALD durch Western-Blotting visualisiert. Die Bandenintensitäten des Proteins GBP in den Pellet- und Überstand-Fractionen wurden quantifiziert und statistisch ausgewertet.



**Abb. 3.18: Einfluss von humanem Hämoglobin auf die Translokationseffizienz von GBP.** Trophozoiten-infizierte Erythrozyten wurden mit 4 HE SLO permeabilisiert, für 45 min in RPMI inkubiert und die Zellen anschließend in RPMI, RBCC oder RPMI mit 2 mg/ml humanem Hämoglobin und 5 mM ATP für weitere 30 min inkubiert. **(A)** Western-Blot (WB) zur Visualisierung der Verteilung von GBP (7,5 %iges SDS-Gel), SERP und ALD (10 %iges SDS-Gel). Auftrag pro Spur:  $1 \times 10^7$  Zelläquivalent; 1. Ak Kaninchen- $\alpha$ -GBP, Kaninchen- $\alpha$ -SERP, Kaninchen- $\alpha$ -ALD; 2. Ak Ziege- $\alpha$ -Kaninchen (HRP). **(B)** Verteilung von GBP in den analysierten Fraktionen nach Quantifizierung der Bandenintensitäten. Für jeden einzelnen im Translokationsassay analysierten Ansatz wurden die Werte der Bandenintensitäten aus Pelletfraktion und Inkubationsüberstand addiert und dem Wert 100 % gleichgesetzt. Anschließend wurden damit die prozentualen Werte der einzelnen Fraktionen und die Standardabweichung aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Abk.: **HB** (Humanes Hämoglobin), **P** (Pellet = lösliche Proteine aus Parasit und parasitophore Vakuole), **S** (Supernatant = lösliche Proteine aus Inkubationsüberstand).

Die Abbildung 3.18 A zeigt eine repräsentative Western-Blot Analyse von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die statistische Auswertung der Verteilung von GBP in Abb. 3.18 B verdeutlicht die Arretierung der Translokation in Anwesenheit von RPMI durch die Detektion von durchschnittlich 8 % der gesamten Bandenintensität von GBP im Inkubationsüberstand (Spur 2). Auch der positive Richtwert, repräsentiert durch die Inkubation in RBCC, zeigt die erwartete hohe Translokationseffizienz (Spur 4). Die Zugabe von 2 mg/ml HB und 5 mM ATP zu RPMI hat keinen messbaren positiven Einfluss auf die Translokationseffizienz und führt zu keiner Rekonstitution der Translokation von GBP über die PVM, wie der durchschnittliche Wert von 10 % für die GBP-Bandenintensität aus Spur 6 verdeutlicht. Somit kann ausgeschlossen werden, dass das Hämoglobin des RBCC bei der Translokation von GBP über die PVM eine Rolle spielt.

#### 3.6.2 Fazit

Durch die Übertragung des von Matlack *et al.* verwendeten Systems auf den Translokationsassay unter Benutzung spezifisch gegen GBP gerichteter Antikörper konnte kein rekonstitutiver Einfluss der Antikörper auf die Translokation von GBP über die PVM unter normalerweise arretierenden Bedingungen nachgewiesen werden. Allerdings scheinen Proteine des verwendeten Kaninchenserum einen positiven Einfluss auf die Translokationsaktivität von GBP zu besitzen. Die Analyse der Albumine verschiedener Spezies konnte nur für die BSA-Fraktion einen rekonstitutiven Effekt auf die Translokation von GBP über die PVM zeigen, wobei dieses weniger auf das Protein selbst sondern auf mögliche Kontaminationen mit anderen Serumproteinen zurückzuführen ist. In jedem Fall konnte gezeigt werden, dass nicht nur wirtseigene Proteine sondern auch Proteine anderer Spezies in der Lage sind, die Translokation von GBP über die PVM zu vermitteln. Darüber hinaus konnte ausgeschlossen werden, dass das im RBCC enthaltene abundante Hämoglobin aufgrund von unspezifischen Wechselwirkungen mit translozierenden Proteinen einen gerichteten Transport von GBP über die PVM ermöglicht.

# 4 Diskussion

Die morphologischen und biochemischen Veränderungen von humanen Erythrozyten durch eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* gehen mit dem Export von Proteinen zu verschiedenen Zielorten innerhalb der Wirtszelle einher (zusammengefasst in Lingelbach und Przyborski, 2006; van Ooij und Haldar, 2007). Während einige der sezernierten Proteine des Parasiten innerhalb der parasitophoren Vakuole verbleiben, stellt für eine Vielzahl an Proteinen die während der Invasion generierte PVM eine Barriere zwischen dem Zytosol des Erythrozyten und dem Parasiten dar, die sie überwinden müssen, um zu ihrem Zielort zu gelangen. Zu diesen Proteinen zählen molekulare Chaperone (Hiller *et al.*, 2004), Zytoskelett-assoziierte Proteine wie KAHRP und an der Wirtszelloberfläche exponierte Proteine, zu denen unter anderem das einer antigenen Variation unterliegende PfEMP1 gehört, welches für die Pathogenese der Malaria-Infektion mit verantwortlich ist (Miller *et al.*, 1994). Darüber hinaus werden vermutlich einige Proteine exportiert, die für den Parasiten eine Nährstoffaufnahme aus der Wirtszelle und dem umgebenden Milieu ermöglichen (Kirk *et al.*, 1994; Baumeister *et al.*, 2006) und so das Überleben von *Plasmodium falciparum* innerhalb des Erythrozyten gewährleisten.

Es konnte bereits für einige exportierte Proteine gezeigt werden, dass die parasitophore Vakuole ein Transitkompartiment auf ihrem Weg in die Wirtszelle darstellt und die Proteine daher in einem zwei Schritte umfassenden Prozess exportiert werden, wobei sie zunächst in das Lumen der Vakuole sezerniert werden, bevor die Translokation über die PVM stattfindet (Ansorge *et al.*, 1996; Wickham *et al.*, 2001).

Die meisten der 300 - 400 vorhergesagten exportierten Proteine verfügen über ein N-terminales bzw. dem N-Terminus entrücktes Signalpeptid für den Eintritt in den sekretorischen Weg des Parasiten und ein zusätzliches Signal, als PEXEL oder HT bezeichnet (Hiller *et al.*, 2004; Marti *et al.*, 2004), welches den Transport der Polypeptide auf bislang unbekannte Weise über die PVM in die Wirtszelle vermittelt. Darüber hinaus ist nur wenig darüber bekannt, welche Transportmechanismen einen Export von Proteinen des Parasiten in seine Wirtszelle ermöglichen und welche Voraussetzungen für die Translokation von Proteinen aus dem Lumen der Vakuole über die PVM in das Erythrozytenzytosol gegeben sein müssen.

Zu diesem Thema sollte innerhalb der vorliegenden Arbeit ein *in vitro* Assay auf der von Ansorge *et al.* entwickelten Methodik (Ansorge *et al.*, 1996) etabliert werden, der eine standardisierte und reproduzierbare Analyse des Transportprozesses von löslichen Proteinen des Parasiten über die PVM in das Erythrozytenzytosol anhand des Modellproteins GBP zulässt. Unter Verwendung dieses Assays wurde ebenfalls die Notwendigkeit von ATP als Energielieferant und die Beteiligung von molekularen Chaperonen im Kontext eines Translokator-vermittelten Exports über die PVM untersucht.

### 4.1 Die Etablierung eines *in vitro* Assays zur Analyse der Translokation von GBP über die PVM

Die von Ansorge *et al.* 1996 durchgeführten Transportstudien am Modellprotein GBP und seine Translokation über die Membran der parasitophoren Vakuole wurden mit Hilfe von Pulse-Chase Experimenten durchgeführt. Dabei wurden Bedingungen definiert, unter denen das radioaktiv-markierte, neu-synthetisierte Protein in SLO-permeabilisierten iRBC einerseits aus der Vakuole über die PVM in den Inkubationsüberstand transloziert wird (in Anwesenheit von RBCC), und andererseits die Translokation des Proteins arretiert wird (in Anwesenheit von RPMI). Die Verteilung des radioaktiv-markierten Proteins wurde nach der Chase-Phase innerhalb der analysierten Fraktionen (lösliche Proteine des SLO-Sedimentes bzw. Inkubationsüberstand) durch IP mit anschließender Autoradiographie visualisiert.

Eine Grundvoraussetzung für einen standardisierten Assay ist seine Reproduzierbarkeit. Dazu gehört, dass die genannten Bedingungen für die Arretierung und die Rekonstitution des Translokationsprozesses in jedem Assay als Kontrollen für die Bestimmung eines Richtwertes anhand der GBP-Verteilung in den genannten Fraktionen für minimale (RPMI) und maximale (RBCC) Translokationseffizienz des Proteins eingesetzt werden können. Dies ermöglicht erst die Analyse von veränderten Bedingungen und zugefügten Faktoren innerhalb des Assays in Bezug auf ihren inhibitorischen bzw. rekonstitutiven Einfluss auf die Translokation von GBP über die PVM.

Eben diese Kontrollen wiesen in nach Ansorge *et al.* durchgeführten Assays erhebliche Schwankungen in der Translokationseffizienz auf. Gerade die

Verwendung von RBCC zur Bestimmung des Richtwertes für eine maximale Translokationseffizienz war problematisch, da oftmals kein Unterschied zwischen RBCC und RPMI festgestellt werden konnte. Bezüglich der experimentellen Vorgehensweise stellte sich bereits vor dieser Arbeit die Immunpräzipitation des Proteins GBP als erheblicher Schwachpunkt heraus. So waren die an Protein A gebundenen Antikörper + GBP oftmals nur unzureichend von den Sepharose Beads zu lösen, wodurch ein nicht zu vernachlässigender Anteil des radioaktiv-markierten GBPs in der Autoradiographie nicht detektiert wurde. Dies hatte zur Folge, dass die in der Autoradiographie visualisierte Verteilung des radioaktiv-markierten GBPs in den zu untersuchenden Fraktionen nicht die tatsächliche Verteilung widerspiegeln konnte. Dadurch war die Richtwert-Bestimmung für die Kontrollansätze häufig undurchführbar. Darüber hinaus hatte dieser Umstand dazu geführt, dass bei weiterführenden Analysen der notwendigen Bedingungen für die Translokation von GBP über die PVM unter mehrmaliger Durchführung des Assays widersprüchliche Daten erhoben wurden.

Eine Alternative zum Pulse-Chase Assay war die Visualisierung der GBP-Verteilung mittels Western-Blot Detektion. Diese Vorgehensweise hatte den Vorteil, dass die quantitativ wenig reproduzierbare Immunpräzipitation ersetzt werden konnte. Voraussetzung war allerdings, dass die oben genannten Kontrollen bei einer Detektion von GBP im Western-Blot die Arretierung und Rekonstitution der Translokation über die PVM widerspiegeln.

Der Vergleich der Verteilung von GBP in der löslichen Fraktion der permeabilisierten iRBC und Inkubationsüberstand nach Durchführung des Assays von Ansorge *et al.* in Autoradiographie und Western-Blot (ohne vorherige IP) konnte allerdings diese Voraussetzung nicht bestätigen. Während die Autoradiographie die Arretierung der Translokation von GBP über die PVM durch Inkubation der SLO-permeabilisierten iRBC in RPMI und die Rekonstitution der Translokation durch Inkubation in RBCC widerspiegeln konnte, zeigte die Western-Blot Analyse keine Arretierung der Translokation nach Inkubation der iRBC in RPMI. Dies ließ vermuten, dass bereits synthetisiertes GBP, welches nicht radioaktiv markiert wurde, andere Eigenschaften als das neu-synthetisierte, radioaktiv-markierte GBP besitzt, welches es ihm ermöglicht, transloziert zu werden.

Diese Eigenschaften wurden zunächst dadurch erklärt, dass das Zielprotein für die Translokation über die PVM in einen translokationskompetenten Zustand überführt

werden muss, bevor der eigentliche Prozess der Translokation stattfinden kann. Für das neu-synthetisierte GBP (radioaktiv) würde dann gelten, dass in Anwesenheit von RPMI kein translokationskompetenter Zustand erreicht werden kann und so der Transport über die PVM arretiert wird. Dies setzt voraus, dass im RBCC Faktoren enthalten sind, die die Translokationskompetenz des zu translozierenden Proteins vermitteln. Das bereits vorhandene GBP (nicht radioaktiv) jedoch mag bereits in einem kompetenten Zustand vorliegen und ist somit in der Lage, auch in Anwesenheit von RPMI transloziert zu werden.

Neben der Möglichkeit der Translokationskompetenz des Proteins wurde auch in Betracht gezogen, dass dem Vorhandensein von nicht-radioaktiv markiertem GBP im Inkubationsüberstand von RPMI kein Translokationsereignis zugrunde liegt, sondern es sich vielmehr um bereits im Erythrozyten befindliches, residuales Protein handelt, welches aufgrund einer zu geringen Waschstringenz im SLO-permeabilisierten Erythrozyten verbleibt und erst innerhalb der Chase-Inkubationsphase in den Überstand diffundiert.

Die Verwendung der zweifachen SLO-Konzentration bei höherer Waschfrequenz konnte diesen Verdacht bestätigen. Die Ergebnisse zeigen, dass bei Veränderung der genannten Parameter der Anteil des im Western-Blot detektierten GBP im Inkubationsüberstand von RPMI minimiert wird. Da neben diesen Modifikationen keine weiteren Veränderungen an der experimentellen Durchführung vorgenommen wurden, konnte die mögliche Erklärung der Translokationskompetenz verworfen werden. Wäre diese Erklärung tatsächlich zutreffend gewesen, dann wäre auch bei einer erhöhten Waschfrequenz GBP in deutlichen Mengen im RPMI-Inkubationsüberstand zu detektieren, was nicht der Fall war. Darüber hinaus geben die Ergebnisse eine weitere Erklärung für die geringe Reproduzierbarkeit des von Ansorge *et al.* entwickelten Assays. So muss man annehmen, dass aufgrund der verwendeten geringen Waschfrequenz ein nicht zu vernachlässigender Anteil des bereits in den Erythrozyten exportierten GBPs innerhalb des SLO-permeabilisierten iRBC verbleibt. Diffundiert dieses dann in der Chase-Phase in einen RBCC-Inkubationsüberstand, so wird dieses neben dem radioaktiv-markierten GBP in der sich anschließenden Immunpräzipitation ebenfalls von den verwendeten Antikörpern gebunden. Dadurch verringert sich wiederum anteilig die Menge des präzipitierten, radioaktiv-markierten GBP, wodurch, neben den bereits genannten Gründen, erklärt werden kann, dass bei einer Inkubation von SLO-permeabilisierten iRBC in RBCC

oftmals die rekonstitutiven Eigenschaften des verwendeten RBCCs in der Autoradiographie nicht nachgewiesen werden konnten.

Ansorge *et al.* konnten durch die Subfraktionierung von iRBC mit Saponin und SLO nachweisen, dass GBP quantitativ sowohl in der Vakuole als auch innerhalb des Erythrozyten zu finden ist, nicht aber im Parasiten. Darüber hinaus wurde an SLO-permeabilisierten iRBC gezeigt, dass eine Inkubation der Zellen in RPMI zu einer Akkumulation von neu-synthetisiertem GBP innerhalb der parasitophoren Vakuole führt (Ansorge *et al.*, 1996). Erst die Zugabe von Zytosol nicht-infizierter Erythrozyten führte zu einem Transport des Proteins über die PVM in den Inkubationsüberstand. Dies ist ein sehr wichtiger Umstand, da bei den Translokationsstudien gewährleistet sein muss, dass die beobachtete Translokationseffizienz von GBP unter verschiedenen Bedingungen auf die Manipulation des Transportvorganges über die PVM zurückzuführen ist und nicht aufgrund der Möglichkeit, dass veränderte Bedingungen den Transport von GBP aus dem Parasiten in das Lumen der Vakuole beeinflussen. Daher musste gewährleistet sein, dass für die Dauer des Experimentes keine weitere Synthese von GBP stattfinden kann.

Durch die sich der SLO-Permeabilisierung anschließenden, permanenten Verwendung von Cycloheximid konnte gezeigt werden, dass während der im Assay durchgeführten Inkubationsphasen keine weitere Synthese des analysierten Proteins GBP stattfindet, und dass daher das bereits in der Vakuole vorhandene GBP in Anwesenheit von RBCC in den Überstand gelangt.

Die Inkubation der SLO-permeabilisierten Zellen in Anwesenheit von BFA in RBCC führte zur Inhibition des Exportes von neu-synthetisiertem GBP aus dem Parasiten bei gleichzeitiger Rekonstitution der Translokation von bereits in der Vakuole vorhandenem GBP über die PVM in den Inkubationsüberstand. Durch die Tatsache, dass der Wert der Translokationseffizienz mit dem des in Anwesenheit von Cycloheximid inkubierten Ansatzes vergleichbar ist, konnte gezeigt werden, dass auch bei inhibitorischen Einflüssen auf die Sezernierung von neu-synthetisiertem GBP aus dem Parasiten in die Vakuole unter rekonstitutiven Bedingungen der Wert der Translokationseffizienz über die PVM nicht negativ beeinflusst wird.

Eine weitere Quelle der schwierig quantifizierbaren Daten war der in vorigen Studien nicht beachtete Schwarzschild-Effekt, der zu einer Unterschätzung quantitativer Unterschiede beitrug. So nimmt die Translokationseffizienz unter inhibierenden Einflüssen quantitativ wesentlich stärker ab, als die Darstellung durch den Western-

Blot bisher vermuten ließ. Allerdings können aufgrund des Schwarzschild-Effekts quantitative Unterschiede von weniger als dem Zehnfachen wohl nicht verlässlich gemessen werden, wodurch eventuell vorhandene inhibierende Einflüsse in einigen Experimenten nicht erfasst werden können.

So konnte durch eine genauere Analyse der einzelnen Arbeitsschritte des von Ansorge *et al.* entwickelten Assays Fehlerquellen bestimmt und durch die notwendigen Modifikation der Arbeitsschritte ein neuer, verbesserter *in vitro* Assay etabliert werden, der, umgekehrt zu zellfreien *in vitro* Systemen unter Verwendung von Microsomen oder aufgereinigten Organellen oder Kompartimenten, die Analyse der Translokation von löslichen Proteinen über die PVM erlaubt.

### 4.2 Proteinfaktoren sind essentiell für eine Translokatorvermittelte PVM-Translokation

Im Kontext der Translokation von Proteinen des Parasiten aus der Vakuole über die Membran der parasitophoren Vakuole wurde in den letzten Jahren häufig über die Existenz eines Translokatorkomplexes innerhalb der PVM diskutiert, der eine Passage der Proteine in das Erythrozytenzytosol ermöglicht (Marti *et al.*, 2005; Lingelbach und Przyborski, 2006; van Ooij und Haldar, 2007). Diese Annahme setzt voraus, dass Proteine sowohl in der PVM als auch auf lumenaler (cis-Seite) bzw. zytosolischer Seite (trans) existieren müssen, die einen derartigen Translokationsprozess vermitteln.

Frühere Transportstudien zur Untersuchung der Translokation von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum (Walter *et al.*, 1979) oder in Lysosomen (Terlecky und Dice, 1993) konnten unter Verwendung der Serin-Protease Trypsin eine Inhibition der Translokation aufgrund der Proteolyse beteiligter Faktoren beobachten.

Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Trypsin auf die Translokationseffizienz von GBP über die PVM im neuen *in vitro* Assay getestet, da dieses Enzym in der Lage ist, ein breites Spektrum an Proteinen proteolytisch zu verdauen. Sind Trypsin-sensitive und dem Enzym zugängliche Proteine an dem Translokationsprozess beteiligt, so müsste dies zur Inhibition der Translokation führen.

Die Inkubation von SLO-permeabilisierten iRBC mit geringen Mengen Trypsin führte dabei zur vollständigen Inhibition der Translokationseffizienz von GBP bei

anschließender Inkubation der Zellen unter rekonstituierenden Bedingungen in RBCC. Dies lässt vermuten, dass integrale Membranproteine der PVM oder solche, die an der trans-Seite assoziiert vorliegen, durch proteolytischen Verdau funktionell inaktiviert wurden, so dass eine Translokation von GBP nicht mehr stattfinden konnte. Einerseits könnte ein Proteinkomplex zur Bildung eines wässrigen Kanals durch die Protease destabilisiert werden, andererseits könnten auch Bindungsstellen für Proteine verlorengegangen sein, die für die Rekrutierung von löslichen Proteinfaktoren aus dem RBCC notwendig sind, um die Translokation über die PVM zu ermöglichen.

Der proteolytische Verdau von Proteinen des RBCC zeigte in einem weiteren Assay ebenfalls inhibitorische Wirkung auf die Translokationseffizienz von GBP über die PVM. Dadurch konnte bewiesen werden, dass neben membranständigen Proteinen der PVM auch lösliche Proteine aus dem Wirtszytosol für den Translokationsprozess essentiell sind und der Parasit somit vermutlich Proteine seines Wirtes für den Export von eigenen Proteinen aus der Vakuole in den Erythrozyten rekrutiert.

Die durch die Verwendung der Serin-Protease im *in vitro* Assay nachgewiesene Beteiligung von Proteinen unterstützt die Annahme der Existenz eines Translokator-vermittelten Transports von löslichen Proteinen über die PVM.

### 4.3 Die Energieabhängigkeit der Translokation von GBP über die PVM

Das Nucleosidtriphosphat ATP spielt in vielen Translokator-vermittelten Transportvorgängen von Proteinen über biologische Membranen eine entscheidende Rolle als Energielieferant für verschiedene, darin involvierte Teilprozesse. So ist es essentiell für die Chaperon-vermittelte Translokationskompetenz von Substratproteinen, die den Transit entfalteter Proteine durch einen kanalbildenden Translokator ermöglicht, wie dies beim posttranslationalen Import von Proteinen in Chloroplasten (Soll und Schleiff, 2004; Qbadou *et al.*, 2006) oder Lysosomen (Cuervo *et al.*, 1994; Agarraberes und Dice, 2001) der Fall ist. Darüber hinaus liefert ATP die Energie für den auf der trans-Seite eines Translokators assoziierten Translokationsmotor, dessen Hauptfaktor in der Regel durch Hsp70 repräsentiert wird. Dabei bindet das Chaperon unter ATP-Verbrauch wiederholt an das

Substratprotein und ermöglicht so einen unidirektionalen Transport (zusammengefasst in Tomkiewicz *et al.*, 2007).

Geht man von der Annahme aus, dass der Transport von Proteinen des Parasiten aus der Vakuole über die PVM in das Erythrozytenzytosol durch einen PVM-ständigen Translokator ermöglicht wird, so wäre der Nachweis einer ATP-Abhängigkeit des Transports von GBP über die PVM neben der bereits gezeigten Abhängigkeit von Proteinfaktoren ein weiterer Hinweis auf die mögliche Existenz einer Translokator-vermittelten Translokation.

Die Verwendung von Apyrase-behandeltem RBCC im *in vitro* Assay zeigte eine Dosis-abhängige Inhibition der Translokationseffizienz von GBP über die PVM. So führte die Inkubation des RBCC mit steigender Apyrase-Konzentration zu einer Abnahme der Translokationseffizienz von GBP über die PVM. Da durch die ATP-hydrolysierenden Eigenschaften von Apyrase die ATP-Konzentration innerhalb des Erythrozytenzytosols herabgesetzt wird, konnte dadurch gezeigt werden, dass die Depletion des Energielieferanten ATP zur Arretierung der Translokation führt und diese deshalb ATP-abhängig sein muss. Diese Tatsache wurde dadurch unterstützt, dass in einem weiteren Assay die Zufuhr von ATP zu ATP-depletiertem RBCC die rekonstituierenden Eigenschaften des Zytosols wieder herstellen konnte. Da dies bei der Zugabe des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analog AMP-PNP nicht der Fall war und AMP-PNP weiterhin den kompensierenden Einfluss einer externen Zufuhr von ATP zu depletiertem RBCC kompetitiv hemmen konnte, wurde dadurch der Beweis erbracht, dass auch die Hydrolyse von ATP für die Translokation des Proteins GBP über die PVM essentiell ist. Es ist wahrscheinlich, dass in intakten iRBC auch der Parasit ATP für den Translokationsvorgang über die PVM zur Verfügung stellt, da Kanaani und Ginsburg (1989) zeigen konnten, dass ein ATP/ADP-Austauscher in der Plasmamembran des Parasiten existiert, der einen Netto-Fluss von ATP aus dem Parasiten in die Wirtszelle vermittelt. Es wäre denkbar, dass die in dem *in vitro* Assay verwendete Apyrase auch das vom Parasiten für die trans-Seite der PVM zur Verfügung gestellte ATP hydrolysiert und erst dadurch die Inhibition der Translokation ermöglicht werden kann. Dagegen sprechen allerdings von Ansorge *et al.* durchgeführte Experimente, nach denen eine ATP-Depletion des RBCC durch Dialyse zur Inhibition der Translokation geführt hat (Ansorge *et al.*, 1996).

Da aufgrund der Existenz von nicht-selektiven Poren innerhalb der PVM, die eine Diffusion von Molekülen bis zu einer Masse von 1400 Da zulassen (Desai und

Rosenberg, 1997; Nyalwidhe *et al.*, 2002), war nicht eindeutig zu bestimmen, auf welcher Seite oder ob auf beiden Seiten der PVM die Hydrolyse von ATP den Translokationsprozess antreibt.

### 4.4 Die Beteiligung von molekularen Chaperonen an der Translokation von Proteinen über die PVM

Der Nachweis der Notwendigkeit von löslichen, Trypsin-sensitiven Proteinen des Wirtes und solchen, die der Protease auf der trans-Seite der PVM zugänglich sind, um die Translokation von GBP über die PVM zu ermöglichen, sowie die Abhängigkeit dieses Prozesses von der Hydrolyse des Adenosintriphosphats ATP, sind Voraussetzungen für eine mögliche Beteiligung von molekularen Chaperonen am Translokationsprozess. Proteine, die in einem entfalteten Zustand über eine Membran transloziert werden müssen, werden häufig auf der cis-Seite der Membran Chaperon-vermittelt in einem transportkompetenten Zustand gehalten, welcher den Zugang des Proteins zur Translokationspore und den sich daran anschließenden Transit ermöglicht (zusammengefasst in Agarraberes und Dice, 2001; Wickner und Shekman, 2005). Daran sind in der Regel Chaperone der Hsp70-Familie beteiligt, wobei häufig auch Hsp90 unter Ausbildung eines Multichaperon-Komplexes involviert ist. Die Existenz von Hsp90 innerhalb des Lumens der PV konnte bereits durch Proteom-Analysen der parasitophoren Vakuole und der Identifikation von drei Vertretern der Hsp90-Familie des Parasiten nachgewiesen werden (Nyalwidhe und Lingelbach, 2006).

Daher wurde der Einfluss der beiden Hsp90-spezifischen Inhibitoren Geldanamycin und Novobiocin (zusammengefasst in Blagg und Kerr, 2006) auf die Translokationseffizienz von GBP über die PVM im Translokationsassay untersucht. Diese sind aufgrund ihrer molekularen Masse von 560,6 Da (Geldanamycin) bzw. 634,6 Da (Novobiocin) in der Lage, durch den von Desai und Rosenberg beschriebenen nicht-selektiven Kanal innerhalb der PVM, welcher eine Passage von Molekülen bis 1400 Da zulässt, in das Lumen der Vakuole zu gelangen (Desai und Rosenberg, 1997). Beide Inhibitoren zeigten im Assay keinen inhibitorischen Effekt auf die Translokationseffizienz von GBP unter rekonstituierenden Bedingungen. Dies kann einerseits auf die Möglichkeit zurückgeführt werden, dass das Hsp90 des

Parasiten im Lumen der Vakuole bei der Translokation von GBP über die PVM keine Rolle spielt. Andererseits besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass die getesteten Inhibitoren innerhalb der für den Assay gewählten Zeitparameter keinen Zugang zu den C- und N-terminalen ATP-Bindedomänen von Hsp90 gefunden haben, welcher für einen inhibitorischen Effekt essentiell ist. Geht man von der Annahme aus, dass GBP innerhalb der Vakuole unter Beteiligung von Hsp90 in einer transportkompetenten Konformation gehalten wird, so wäre das in der Vakuole vorhandene GBP vermutlich bereits mit Hsp90 komplexiert. Da die Bindung von Hsp90 an ein Substratprotein ATP-vermittelt ist, wären die Bindungstaschen für die Inhibitoren bereits durch ATP oder ADP besetzt. Darüber hinaus könnte es aufgrund des Exports von ATP aus dem Parasiten (Kanaani und Ginsburg, 1989) zu einer hohen lokalen ATP-Konzentration innerhalb der parasitophoren Vakuole kommen, wodurch die Bindung der Inhibitoren an Hsp90 kompetitiv gehemmt sein könnte. Ebenso können die ATP-Bindedomänen von Hsp90 durch die Assoziation zusätzlicher Co-Faktoren maskiert sein. Sind die im Translokationsassay gewählten Zeitparameter zu kurz, um einen Austausch von ATP und Inhibitor an Hsp90 zu ermöglichen, so könnte auch bei einer Beteiligung von Hsp90 innerhalb der Vakuole an der Translokation von GBP über die PVM kein inhibitorischer Effekt durch Geldanamycin oder Novobiocin gemessen werden. Daher kann eine mögliche Beteiligung von Hsp90 des Parasiten innerhalb der Vakuole am Translokationsprozess über die PVM nicht ausgeschlossen werden, bleibt allerdings bis auf weiteres ungeklärt.

Bei einer weiteren, an Translokationsprozessen häufig beteiligten molekularen Chaperon-Familie handelt es sich um Hsp70. Neben seiner Funktion der Generierung und Erhaltung eines translokationskompetenten Zustands des Substratproteins auf der cis-Seite der Membran ist es häufig auch als Motorprotein auf der trans-Seite tätig, wie bereits am posttranslationalen Transport von Proteinen in Mitochondrien und in das ER gezeigt wurde (zusammengefasst in Tomkiewicz *et al.*, 2007). Für den genauen Mechanismus der Hsp70 getriebenen Translokation gibt es unterschiedliche Vorstellungen. Einerseits erklärt man sich die durch Hsp70 vermittelte unidirektionale Translokation von Proteinen dadurch, dass durch die ATPase-Aktivität des Chaperons neben der Substratbindung auch eine Konformationsänderung im Chaperon induziert wird, die das zu translozierende Protein auf die trans-Seite der Membran zieht („Power-stroke“ Modell). In einer

anderen Erklärung reicht die Substratbindung von Hsp70 allein aus, die Unidirektionalität der Translokation zu vermitteln. So blockiert hier die zyklische Bindung von Hsp70 an das Protein die durch Brown'sche Molekularbewegung verursachte rückwärtige Bewegung, während Bewegungen Richtung Ausgangsseite der Translokationspore möglich bleiben („Brownian Ratchet“ Modell) (zusammengefasst in Tomkiewicz *et al.*, 2007).

Ist ein Chaperon der Hsp70-Familie tatsächlich an der Translokation von Proteinen über die PVM in das Erythrozytenzytosol beteiligt, so müsste man die Assoziation eines solchen Proteins an der trans-Seite der PVM nachweisen können. Da bisherige *in silico* Studien keinen Hinweis darauf geben, dass Chaperone der Hsp70-Familie des Parasiten in die Wirtszelle exportiert werden, die eine solche Aufgabe übernehmen könnten, wurde das wirtseigene Hsp70 (*HsHsp70*) einer genaueren Betrachtung unterzogen, dessen Membranassoziation an die Plasmamembran des Erythrozyten ausschließlich in infizierten Zellen bereits nachgewiesen werden konnte (Banumathy *et al.*, 2002).

Die Subfraktionierung der Membranen von iRBC durch die Generierung von Ghosts zeigte eine vorwiegende Sedimentation des membranassoziierten *HsHsp70* in der Nicht-Ghost Fraktion, wie dies auch für das PVM-ständige Markerprotein EXP-1 nachgewiesen werden konnte. Die Tatsache, dass das membranassoziierte humane Hsp70 innerhalb SLO-permeabilisierter iRBC der Protease Trypsin zugänglich ist, schließt die Möglichkeit aus, dass es sich um internalisiertes Protein handeln könnte, welches an der luminalen Seite der PVM oder an der Plasmamembran des Parasiten assoziiert vorliegt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das humane Hsp70 in der Tat an der zytosolischen oder trans-Seite der PVM membranassoziiert vorliegt.

Die Inkubation von SLO-permeabilisierten iRBC mit ATP konnte ebenfalls zeigen, dass diese Membranassoziation einen funktionellen Hintergrund besitzt. Da Hsp70 in ATP-abhängiger Weise Substratproteine bindet und die stärkste Affinität des Chaperons zum Protein in ADP-gebundener Form vorliegt (Mayer und Bukau, 2005), konnte die Zugabe eines Überschusses an ATP das Gleichgewicht zugunsten einer ATP-gebundenen Form verschieben, wodurch die Affinität des Chaperons zum Substratprotein verringert wird und das humane Hsp70 in den Inkubationsüberstand dissoziiert.

Nachdem die ATP-abhängige Assoziation des humanen Hsp70 an die trans-Seite der PVM nachgewiesen werden konnte, wurde die Beteiligung des Proteins an der Translokation von GBP über die PVM im Translokationsassay untersucht.

Dabei zeigte die mehr als zehnfache Reduktion der *HsHsp70*-Konzentration im RBCC keinerlei inhibitorischen Effekt auf die Translokationseffizienz von GBP über die PVM in den Inkubationsüberstand. Da eine vollständige Depletion des Proteins aus dem RBCC nicht nachgewiesen werden konnte, bestehen zwei Erklärungsmöglichkeiten. Einerseits wäre es möglich, dass das humane Hsp70 nicht an der Translokation von GBP über die PVM beteiligt ist. Andererseits kann es auch sein, dass die minimal zehnfache Reduktion der *HsHsp70*-Konzentration im RBCC nicht ausreicht, um dem Translokationssystem genug Hsp70 zu entziehen und dadurch die Translokationseffizienz von GBP negativ zu beeinflussen.

Es gibt also erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des wirtseigenen Hsp70 an einem Translokator-vermittelten Transport von Proteinen des Parasiten, insofern, als dass das Chaperon ATP-vermittelt an die trans-Seite der PVM rekrutiert wird. Eine direkte Beteiligung am Translokationsprozess konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

### 4.5 Die Rekonstitution der Translokation durch wirtsfremde Faktoren

Da die Experimente zur Analyse der Rolle von *HsHsp70* bei der Translokation von GBP über die PVM keinen definitiven Beweis für eine Beteiligung dieses Chaperons liefern konnten, sollte ein indirekter Nachweis versucht werden. Matlack *et al.* konnten zeigen, dass gegen ein Substratprotein gerichtete spezifische Antikörper, welche in Proteoliposomen inkorporiert wurden, in der Lage sind, durch einen „molecular ratchet“-Mechanismus das Substratprotein in die Proteoliposomen zu translozieren (Matlack *et al.*, 1999). Überträgt man dieses System auf den *in vitro* Assay, so könnte die Verwendung eines gegen GBP gerichteten Antiserums eventuell die Translokation des Proteins über die PVM stimulieren.

Die Ergebnisse dieses Assays zeigten jedoch, dass auch nach Depletion der IgG-Fraktion aus dem Antiserum eine deutliche Translokationsaktivität zu detektieren war. Es konnte zwar nicht ausgeschlossen werden, dass die gegen GBP gerichteten

Antikörper eine Translokation des Proteins vermitteln könnten, doch wurde deutlich, dass auch bislang unbekannte Proteine des Kaninchen-Serums in der Lage sind, die Translokation von GBP über die PVM zu vermitteln. Hierbei könnte es sich durchaus um ein im Serum vorhandenes Chaperon der Hsp70-Familie handeln, da die Existenz dieses Proteins im Serum verschiedener Spezies bekannt ist. Es ist davon auszugehen, dass neben Hsp70 auch Co-Faktoren enthalten sind, die für die Funktion von Hsp70 notwendig sind. Neben dieser Möglichkeit wäre es ebenfalls denkbar, dass das im Serum abundanteste Protein Albumin durch eventuell unspezifische Wechselwirkungen mit dem zu translozierenden Protein einen vektoriellen Transport über die PVM ermöglicht. Daher wurde der Einfluss von Albumin verschiedener Spezies (humanes und bovines Serumalbumin sowie Ovalbumin) auf die Translokationsaktivität von GBP über die PVM getestet. Hier konnte nur das bovine Serumalbumin eine Translokation von GBP vermitteln. Da es sich dabei allerdings um eine BSA Fraktion V (Cohn Fraktionierung) handelt, konnte auch hier nicht die induzierte Translokationsaktivität nicht ausschließlich dem BSA zugeschrieben werden, da in dieser Fraktion auch das Chaperon Hsp70 vorhanden ist (Schlicher und Soll, 1997).

In einem weiteren Assay sollte untersucht werden, ob das im RBCC enthaltene Hämoglobin durch unspezifische Wechselwirkungen mit dem zu translozierenden GBP eine gerichtete Translokation über die PVM vermitteln kann. Es wäre denkbar, dass GBP in einem ATP-abhängigen Prozess der Translokationsmaschinerie der PVM zugeführt wird und durch die Abundanz des Hämoglobins bedingte unspezifische Wechselwirkung mit GBP dieses in den Inkubationsüberstand transloziert wird. Der Assay zeigte jedoch, dass Hämoglobin in Anwesenheit von ATP keine Translokation von GBP über die PVM vermittelt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch Proteine wirts- und wirtszellfremden Ursprungs in der Lage sind, die Translokation von GBP zu vermitteln, wobei eine klare Zuordnung, um welche Proteine es sich hierbei handeln könnte, nicht möglich war. Es wäre denkbar, dass es sich bei der Rekrutierung von Wirtsproteinen für die Translokation parasiteneigener Proteine über die Membran der parasitophoren Vakuole um einen bei apikomplexen Parasiten generellen Mechanismus handelt, der einen Parasitismus unterschiedlicher Zellen verschiedener Wirtsspezies ermöglicht hat.

### 4.6 Eine mechanistische Betrachtung des Translokatorvermittelten Transports von Proteinen über die PVM

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse konnten durch die Etablierung und Verwendung eines *in vitro* Assays die Notwendigkeit von Proteinen für die Translokation von GBP über die PVM beweisen. Diese Proteine sind der Serin-Protease Trypsin auf der zytosolischen Seite der PVM zugänglich und damit integral in der PVM verankert oder mit dieser assoziiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass lösliche Proteine der Wirtszelle für den Translokationsprozess rekrutiert werden. Neben der Notwendigkeit von Proteinen wurde bewiesen, dass die Translokation von GBP über die PVM von der ATP-Hydrolyse auf mindestens einer der beiden Seiten der PVM abhängig ist. Da die Ergebnisse zur Untersuchung der Beteiligung von molekularen Chaperonen der Hsp70- und Hsp90-Familie keine eindeutigen Schlüsse zuließen, das humane Hsp70 aber zumindest in einer ATP-abhängigen Weise an die trans-Seite der PVM bindet, kann ihre Involvierung nicht ausgeschlossen werden und bleibt daher weiterhin ungeklärt. Jedoch unterstützen die in dieser Arbeit erhobenen Daten die Annahme der Existenz eines Protein-Translokators in der PVM. Daher soll hier ein mechanistisches Konzept entwickelt werden, wie eine solche Translokator-vermittelte Translokation von löslichen Proteinen über die PVM ablaufen könnte.

Ausgehend von der Annahme, dass die meisten über die PVM exportierten löslichen Proteine des Parasiten durch den sekretorischen Weg in das Lumen der parasitophoren Vakuole gelangen, können mehrere Mechanismen möglich sein, wie diese Proteine durch einen Translokator der PVM in das Erythrozytenzytosol gelangen. Entweder ermöglicht der putative Translokator ausschließlich den Transport von Proteinen in einem entfalteten Zustand oder er ist in der Lage, eine Passage von Proteinen in ihrer nativen Konformation zu ermöglichen. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass für eine erfolgreiche Translokation von GBP über die PVM lösliche Proteinkomponenten des Wirtes auf der trans-Seite erforderlich sind, ist die Passage von Proteinen in ihrer nativen Konformation unwahrscheinlich, da alle bisher beschriebenen Translokationssysteme, die gefaltete Proteine transportieren (z.B. PEX/TAT), nicht auf trans-Komponenten angewiesen sind (zusammengefasst in Schnell und Hebert, 2003). Geht man also davon aus, dass die

Proteine des Parasiten in einer entfalteten Konformation durch die PVM passagiert werden, so müssen sie das Lumen der Vakuole entweder in einem bereits translokationskompetenten Zustand erreichen oder innerhalb der parasitophoren Vakuole in einen transportkompetenten Zustand gebracht werden. Für die erste Möglichkeit müsste das Protein bereits im sekretorischen Weg des Parasiten mit Faktoren komplexiert sein, die den entfalteten Zustand stabilisieren und zusätzlich die Aggregation solch entfalteter Proteine verhindern können, was in der Regel durch molekulare Chaperone erreicht wird. Es ist vorstellbar, dass ein Protein schon während der cotranslationalen Translokation in das endoplasmatische Retikulum als ein zu exportierendes Protein erkannt wird, eventuell HT/PEXEL-vermittelt, durch Chaperone des ER gebunden und durch den sekretorischen Weg bis in die parasitophore Vakuole geleitet wird, um dort, vermutlich Rezeptor-vermittelt, dem putativen Translokationsapparat der PVM zugeführt zu werden. Für einen solchen Mechanismus käme nach bisherigem Kenntnisstand nur das von Nyalwidhe und Lingelbach in der Vakuole identifizierte Endoplasmin in Frage (Nyalwidhe und Lingelbach, 2006). Die Bindung an ein Substratprotein könnte das ER-Retentionssignal des Endoplasmin maskieren und so den Eintritt des ER-residenten Proteins in den sekretorischen Weg ermöglichen.

Erreicht das zu translozierende Protein das Lumen der Vakuole in seiner nativen Konformation, so gibt es zwei Möglichkeiten. Es könnte über einen noch unbekanntem Mechanismus als Export-Protein erkannt werden, vielleicht durch HT/PEXEL oder eine damit verbundene Modifikation vermittelt, welche die Bindung von molekularen Chaperonen unter möglicher Ausbildung eines Multichaperon-Komplexes an das Substratprotein initiiert und so durch diesen entfaltet werden kann. Dieser Komplex könnte dann das zu translozierende Protein über die Interaktion mit einem Rezeptorprotein oder der Translokase selbst der Translokationsmaschinerie übergeben. Solch ein Mechanismus ist z.B. beim Import von Proteinen in Lysosomen durch die sogenannte Chaperon-vermittelte Autophagie bekannt. Hierbei werden Substratproteine im Zytosol einer Zelle durch das Vorhandensein einer pentameren Peptidsequenz von zytosolischem Hsp70 erkannt und gebunden (Chiang *et al.*, 1989; Terlecky *et al.*, 1992; Cuervo *et al.*, 1994). Anschließend formiert sich ein Multichaperon-Komplex, der sich aus weiteren Komponenten wie Hsp90 und diversen Co-Chaperonen zusammensetzt (Agarraberes und Dice, 2001). Dieser Komplex initialisiert die Entfaltung des

Substratproteins und begleitet es gleichzeitig zur lysosomalen Membran und damit zu Lamp2a, einer Translokator Komponente innerhalb dieser Membran. Es muss dabei erwähnt werden, dass neben Hsp70 und Hsp90 bisher keine weiteren Komponenten im Lumen der parasitophoren Vakuole gefunden wurden, die für die Ausbildung eines solchen funktionellen Komplexes notwendig wären (Nyalwidhe und Lingelbach, 2006). Dazu würden Hip (Hsp70/Hsp90 interacting protein), Hop (Hsp70/Hsp90 organising protein), Hsp40 und ein Nukleotid-Austauschfaktor zählen, Co-Faktoren, die im Parasitengenom kodiert sind. Wird ein natives Protein des Parasiten nicht durch lösliche Faktoren wie molekulare Chaperone in einen transportkompetenten Zustand gebracht und gehalten, könnte die initiale Entfaltung erst am Translokator selbst induziert werden. Hierfür müssten die zu exportierenden Proteine vom Translokator selbst oder einer assoziierten Rezeptorkomponente erkannt werden, die das Substratprotein zum Translokator überführt. Dies könnte erneut HT/PEXEL-vermittelt ablaufen. Das zu translozierende Protein müsste allerdings über einen in seiner Polypeptidkette terminalen Bereich verfügen, der in der Molekülstruktur einerseits exponiert vorliegt und darüber hinaus lang genug ist, um durch die Pore der Translokase zu reichen. Für den Import von Präproteinen in die mitochondriale Matrix besitzen diese in der Regel ein positiv geladenes, N-terminales Signal, welches sich bei dem gefalteten Protein exponiert darstellt. Dieses wird vom Rezeptor Tom20 erkannt und der Translokase Tom40 zugeführt (zusammengefasst in van der Laan *et al.*, 2006). Da diese Signalpeptide lang genug sind, um zur inneren Membran des Mitochondriums und damit zur Tim23 Translokase zu reichen, wird das Signalpeptid aufgrund seiner positiven Ladung und dem elektrochemischen Gradienten der inneren Membran in Richtung Matrix gezogen und dadurch initial am N-Terminus entfaltet (Huang *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2002). Eine solche initiale Entfaltung durch einen elektrochemischen Gradienten ist für die Proteine des Parasiten unwahrscheinlich, doch könnte eine Exposition der Polypeptidkette durch die Translokase auf der trans-Seite der PVM die Bindung eines für die gerichtete Translokation notwendigen Motorproteins ermöglichen, was ebenfalls zu einer initialen Entfaltung des Polypeptids führen könnte.

Ist das Substratprotein erst einmal der Translokase zugeführt worden, so spielt sich alles weitere auf der trans-Seite der Membran ab. Hier übernimmt in der Regel Hsp70 die Hauptrolle (zusammengefasst in Tomkiewicz *et al.*, 2007). Für einen Translokationsvorgang über die PVM wäre die Anwesenheit eines derartigen

Chaperons auf der trans-Seite die logische Konsequenz. Da bisher kein Hsp70-homologes Parasitenprotein identifiziert werden konnte, welches über die typischen Eigenschaften eines exportierten Proteins verfügt, käme eines der Wirtschaperone in Frage, was unter anderem Thema dieser Arbeit war und ebenfalls durch van Ooij und Haldar erwähnt wurde (van Ooij und Haldar, 2007). Dieses müsste natürlich in die unmittelbare Nähe der Translokationspore rekrutiert werden, damit es seine Funktion optimal ausüben kann. Diese Aufgabe übernimmt beim TIM-Komplex des Mitochondriums z. B. Tim44, welches peripher an der Translocase Tim23 assoziiert ist (Schneider *et al.*, 1994; Rassow *et al.*, 1994). Des Weiteren wäre ein Protein der Hsp40-Familie notwendig, um die ATP-Hydrolyse des Hsp70 zu stimulieren. Dies wiederum könnte entweder durch eines der zahlreichen putativ exportierten Parasiten-Hsp40 übernommen werden oder durch eine mögliche membranständige Proteinkomponente, die über eine J-Domäne verfügt, wie das beim mitochondrialen Matrix-Import bei Pam18 der Fall ist (D'Silva *et al.*, 2003; Truscott *et al.*, 2003). Eine Kombination aus beidem wäre ein Protein wie Sec63, welches sowohl ein Hsp70-Molekül rekrutiert als auch seine ATPase-Aktivität stimuliert (Feldheim *et al.*, 1992). Das Chaperon selbst würde Zyklen der Proteinbindung und des Ablösens durchlaufen, wodurch die unidirektionale Translokation durch die putative Translokationspore ermöglicht wird. Dieser bei anderen Translokationsprozessen bekannte Mechanismus ist noch nicht in allen Einzelheiten geklärt und beinhaltet z.B. die Modellvorstellungen eines „Molecular ratchet“ oder „Power stroke“. Bei der Modellvorstellung des „Entropic pulling“ geht man mittlerweile davon aus, dass die Bindung eines Hsp70-Moleküls die Bewegungsfreiheit der translozierenden Polypeptidkette einschränkt. Als Konsequenz daraus vermindert sich die Entropie, was wiederum die freie Energie in diesem System erhöht, die in die gerichtete Bewegung des Proteins Richtung Exit-Seite des Translokators fließt. Darüber hinaus fungiert Hsp70 als „molecular ratchet“, welches eine Rückwärtsbewegung der Polypeptidkette durch sogenanntes „molecular breathing“ verhindert (De Los Rios *et al.*, 2006).

### 4.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nach einer Optimierung des von Ansorge *et al.* verwendeten Pulse-Chase Assay ein standardisierter und reproduzierbarer *in vitro*

Assay etabliert werden, durch den die Abhängigkeit von einer ATP-Hydrolyse und die Notwendigkeit von Proteinen sowohl der PVM als auch löslichen Proteinen des Wirtes für die Translokation des Glykophorin-bindenden Proteins GBP über die PVM nachgewiesen werden konnte. Beides sind Voraussetzungen für einen Translokatorvermittelten Transport über die Membran der parasitophoren Vakuole. Die darüber hinaus durchgeführten Analysen zur möglichen Beteiligung von Chaperonen der Hsp70- und Hsp90-Familie konnten die Involvierung weder ausschließen noch definitiv bestätigen.

Für weitere Analysen zur Klärung der Frage, ob die Translokation von löslichen Proteinen des Parasiten tatsächlich von der Existenz eines PVM-ständigen Translokators abhängt, wäre es zunächst sinnvoll zu untersuchen, ob die durch den Assay definierten Voraussetzungen für die Translokation von GBP in das Erythrozytenzytosol auch für andere Proteine des Parasiten oder Reportergenkonstrukte gelten.

Darüber hinaus kann mit diesem Assay getestet werden, ob ein minimales zugeführtes System, bestehend aus Hsp70, Hsp40, einem geeigneten Nukleotid-Austauschfaktor und ATP, in der Lage ist, die rekonstitutiven Eigenschaften des RBCC im Assay zu simulieren, da erste Experimente gezeigt haben, dass Hsp70 und ATP allein dazu nicht in der Lage sind (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wäre es notwendig zu klären, ob GBP innerhalb der parasitophoren Vakuole mit den dort bereits nachgewiesenen Chaperonen komplexiert vorliegt. Dabei würden Co-Immunpräzitationsstudien unter Einsatz von Crosslinkern in Frage kommen, die solche putativen Komplexe stabilisieren könnten. Vorläufige Experimente konnten bereits Komplexe von GBP und anderen Proteinen innerhalb der parasitophoren Vakuole stabilisieren, wobei eine Identifikation der beteiligten Proteine bisher aufgrund unzulänglicher Mengen nicht möglich war.

Bereits durchgeführte Analysen konnten zeigen, dass GBP innerhalb des infizierten Erythrozyten neben seiner primär löslichen Form auch PVM-assoziiert vorliegt. Erste Studien unter Verwendung von Crosslinkern und *Blue-Native* PAGE konnten auch hier GBP in größeren Proteinkomplexen nachweisen. Die Analyse solcher Komplexe könnte Aufschluss darüber geben, welche Membrankomponenten für die Translokation von GBP über die PVM eine Rolle spielen.

# 5 Literatur

Adisa, A., Albano, F. R., Reeder, J., Foley, M., and Tilley, L. (2001). Evidence for a role for a Plasmodium falciparum homologue of Sec31p in the export of proteins to the surface of malaria parasite-infected erythrocytes. *J Cell Sci* *114*, 3377-3386.

Adisa, A., Frankland, S., Rug, M., Jackson, K., Maier, A. G., Walsh, P., Lithgow, T., Klonis, N., Gilson, P. R., Cowman, A. F., and Tilley, L. (2007). Re-assessing the locations of components of the classical vesicle-mediated trafficking machinery in transfected Plasmodium falciparum. *Int J Parasitol* *37*, 1127-1141.

Adisa, A., Rug, M., Klonis, N., Foley, M., Cowman, A. F., and Tilley, L. (2003). The signal sequence of exported protein-1 directs the green fluorescent protein to the parasitophorous vacuole of transfected malaria parasites. *J Biol Chem* *278*, 6532-6542.

Agarraberes, F. A., and Dice, J. F. (2001a). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* *114*, 2491-2499.

Agarraberes, F. A., and Dice, J. F. (2001b). Protein translocation across membranes. *Biochim Biophys Acta* *1513*, 1-24.

Aikawa, M., Huff, C. G., and Spinz, H. (1966). Comparative feeding mechanisms of avian and primate malarial parasites. *Mil Med* *131*, Suppl:969-983.

Albano, F. R., Berman, A., La Greca, N., Hibbs, A. R., Wickham, M., Foley, M., and Tilley, L. (1999). A homologue of Sar1p localises to a novel trafficking pathway in malaria-infected erythrocytes. *Eur J Cell Biol* *78*, 453-462.

Allan, R. K., Mok, D., Ward, B. K., and Ratajczak, T. (2006). Modulation of chaperone function and cochaperone interaction by novobiocin in the C-terminal domain of Hsp90: evidence that coumarin antibiotics disrupt Hsp90 dimerization. *J Biol Chem* *281*, 7161-7171.

Ansorge, I., Benting, J., Bhakdi, S., and Lingelbach, K. (1996). Protein sorting in Plasmodium falciparum-infected red blood cells permeabilized with the pore-forming protein streptolysin O. *Biochem J* *315* ( Pt 1), 307-314.

Ansorge, I., Paprotka, K., Bhakdi, S., and Lingelbach, K. (1997). Permeabilization of the erythrocyte membrane with streptolysin O allows access to the vacuolar membrane of Plasmodium falciparum and a molecular analysis of membrane topology. *Mol Biochem Parasitol* *84*, 259-261.

Atkinson, C. T., and Aikawa, M. (1990). Ultrastructure of malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells* *16*, 351-368.

Atkinson, C. T., Aikawa, M., Fujino, T., Tam, L. Q., Hui, G. S., and Siddiqui, W. A. (1987). Ultrastructural localization of protective and nonprotective Plasmodium falciparum proteins using serum samples from vaccinated Aotus monkeys. *J Parasitol* *73*, 1235-1240.

Bannister, L., and Mitchell, G. (2003). The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends Parasitol* *19*, 209-213.

Bannister, L. H., and Dluzewski, A. R. (1990). The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells* *16*, 257-292; discussion 293-257.

Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S., and Mitchell, G. H. (2000). A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages. *Parasitol Today* *16*, 427-433.

Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Margos, G., Dluzewski, A. R., and Mitchell, G. H. (2004). Three-dimensional ultrastructure of the ring stage of Plasmodium falciparum: evidence for export pathways. *Microsc Microanal* *10*, 551-562.

Banumathy, G., Singh, V., and Tatu, U. (2002). Host chaperones are recruited in membrane-bound complexes by Plasmodium falciparum. *J Biol Chem* *277*, 3902-3912.

Baruch, D. I., Pasloske, B. L., Singh, H. B., Bi, X., Ma, X. C., Feldman, M., Taraschi, T. F., and Howard, R. J. (1995). Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* *82*, 77-87.

Baum, J., Maier, A. G., Good, R. T., Simpson, K. M., and Cowman, A. F. (2005). Invasion by P. falciparum merozoites suggests a hierarchy of molecular interactions. *PLoS Pathog* *1*, e37.

Baum, J., Richard, D., Healer, J., Rug, M., Krnjanski, Z., Gilberger, T. W., Green, J. L., Holder, A. A., and Cowman, A. F. (2006). A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. *J Biol Chem* *281*, 5197-5208.

Baumeister, S., Endermann, T., Charpian, S., Nyalwidhe, J., Duranton, C., Huber, S., Kirk, K., Lang, F., and Lingelbach, K. (2003). A biotin derivative blocks parasite induced novel permeation

- pathways in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 132, 35-45.
- Baumeister, S., Winterberg, M., Duranton, C., Huber, S. M., Lang, F., Kirk, K., and Lingelbach, K. (2006). Evidence for the involvement of *Plasmodium falciparum* proteins in the formation of new permeability pathways in the erythrocyte membrane. *Mol Microbiol* 60, 493-504.
- Behari, R., and Haldar, K. (1994). *Plasmodium falciparum*: protein localization along a novel, lipid-rich tubovesicular membrane network in infected erythrocytes. *Exp Parasitol* 79, 250-259.
- Benting, J., Mattei, D., and Lingelbach, K. (1994). Brefeldin A inhibits transport of the glycoporphin-binding protein from *Plasmodium falciparum* into the host erythrocyte. *Biochem J* 300 ( Pt 3), 821-826.
- Berks, B. C., Sargent, F., and Palmer, T. (2000). The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* 35, 260-274.
- Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J., and Szegoleit, A. (1985). Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect Immun* 47, 52-60.
- Blagg, B. S., and Kerr, T. D. (2006). Hsp90 inhibitors: small molecules that transform the Hsp90 protein folding machinery into a catalyst for protein degradation. *Med Res Rev* 26, 310-338.
- Blisnick, T., Morales Betoulle, M. E., Barale, J. C., Uzureau, P., Berry, L., Desroses, S., Fujioka, H., Mattei, D., and Braun Breton, C. (2000). Pfsbp1, a Maurer's cleft *Plasmodium falciparum* protein, is associated with the erythrocyte skeleton. *Mol Biochem Parasitol* 111, 107-121.
- Braun-Breton, C., Rosenberry, T. L., and da Silva, L. P. (1988). Induction of the proteolytic activity of a membrane protein in *Plasmodium falciparum* by phosphatidyl inositol-specific phospholipase C. *Nature* 332, 457-459.
- Burghaus, P. A., and Lingelbach, K. (2001). Luciferase, when fused to an N-terminal signal peptide, is secreted from transfected *Plasmodium falciparum* and transported to the cytosol of infected erythrocytes. *J Biol Chem* 276, 26838-26845.
- Charpian, S., and Przyborski, J. M. (2008). Protein Transport Across the Parasitophorous Vacuole of *Plasmodium falciparum*: Into the Great Wide Open. *Traffic* 9(2), 157-165.
- Chen, X., and Schnell, D. J. (1999). Protein import into chloroplasts. *Trends Cell Biol* 9, 222-227.
- Chiang, H. L., Terlecky, S. R., Plant, C. P., and Dice, J. F. (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246, 382-385.
- Connolly, T., and Gilmore, R. (1989). The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell* 57, 599-610.
- Cooke, B. M., Buckingham, D. W., Glenister, F. K., Fernandez, K. M., Bannister, L. H., Marti, M., Mohandas, N., and Coppel, R. L. (2006). A Maurer's cleft-associated protein is essential for expression of the major malaria virulence antigen on the surface of infected red blood cells. *J Cell Biol* 172, 899-908.
- Cooke, B. M., and Cowman, A. F. (2000). Molecular approaches to malaria. *Parasitol Today* 16, 177-178.
- Cooke, B. M., Lingelbach, K., Bannister, L. H., and Tilley, L. (2004). Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Trends Parasitol* 20, 581-589.
- Couffin, S., Hernandez-Rivas, R., Blisnick, T., and Mattei, D. (1998). Characterisation of PfSec61, a *Plasmodium falciparum* homologue of a component of the translocation machinery at the endoplasmic reticulum membrane of eukaryotic cells. *Mol Biochem Parasitol* 92, 89-98.
- Cowman, A. F., and Crabb, B. S. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 124, 755-766.
- Crabb, B. S., Cooke, B. M., Reeder, J. C., Waller, R. F., Caruana, S. R., Davern, K. M., Wickham, M. E., Brown, G. V., Coppel, R. L., and Cowman, A. F. (1997). Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell* 89, 287-296.
- Cuervo, A. M., Terlecky, S. R., Dice, J. F., and Knecht, E. (1994). Selective binding and uptake of ribonuclease A and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by isolated rat liver lysosomes. *J Biol Chem* 269, 26374-26380.
- Culvenor, J. G., Day, K. P., and Anders, R. F. (1991). *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. *Infect Immun* 59, 1183-1187.
- Czerwinski, M., Wasniowska, K., Steuden, I., Duk, M., Wiedlocha, A., and Lisowska, E. (1988). Degradation of the human erythrocyte membrane band 3 studied with monoclonal antibody directed against an epitope on the cytoplasmic fragment of band 3. *Eur J Biochem* 174, 647-654.
- Das, A., Elmendorf, H. G., Li, W. I., and Haldar, K. (1994). Biosynthesis, export and processing of a 45 kDa protein detected in membrane clefts of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* 302 ( Pt 2), 487-496.

## 5 Literatur

---

- de Castro, F. A., Ward, G. E., Jambou, R., Attal, G., Mayau, V., Jaureguiberry, G., Braun-Breton, C., Chakrabarti, D., and Langsley, G. (1996). Identification of a family of Rab G-proteins in *Plasmodium falciparum* and a detailed characterisation of pfrab6. *Mol Biochem Parasitol* *80*, 77-88.
- De Los Rios, P., Ben-Zvi, A., Slutsky, O., Azem, A., and Goloubinoff, P. (2006). Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 6166-6171.
- de Rojas, M. O., and Wasserman, M. (1985). Temporal relationships on macromolecular synthesis during the asexual cell cycle of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* *79*, 792-796.
- Dekker, P. J., Muller, H., Rassow, J., and Pfanner, N. (1996). Characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane by blue native electrophoresis. *Biol Chem* *377*, 535-538.
- Desai, S. A. (1999). A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. *Novartis Found Symp* *226*, 89-95; discussion 95-88.
- Desai, S. A., and Rosenberg, R. L. (1997). Pore size of the malaria parasite's nutrient channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 2045-2049.
- Dluzewski, A. R., Fryer, P. R., Griffiths, S., Wilson, R. J., and Gratzner, W. B. (1989). Red cell membrane protein distribution during malarial invasion. *J Cell Sci* *92 ( Pt 4)*, 691-699.
- Dluzewski, A. R., Mitchell, G. H., Fryer, P. R., Griffiths, S., Wilson, R. J., and Gratzner, W. B. (1992). Origins of the parasitophorous vacuole membrane of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, in human red blood cells. *J Cell Sci* *102 ( Pt 3)*, 527-532.
- Doms, R. W., Russ, G., and Yewdell, J. W. (1989). Brefeldin A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* *109*, 61-72.
- D'Silva, P. D., Schilke, B., Walter, W., Andrew, A., and Craig, E. A. (2003). J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13839-13844.
- Duraisingh, M. T., Triglia, T., Ralph, S. A., Rayner, J. C., Barnwell, J. W., McFadden, G. I., and Cowman, A. F. (2003). Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *Embo J* *22*, 1047-1057.
- Dvorak, J. A., Miller, L. H., Whitehouse, W. C., and Shiroishi, T. (1975). Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science* *187*, 748-750.
- Elford, B. C., Cowan, G. M., and Ferguson, D. J. (1995). Parasite-regulated membrane transport processes and metabolic control in malaria-infected erythrocytes. *Biochem J* *308 ( Pt 2)*, 361-374.
- Elmendorf, H. G., and Haldar, K. (1993). Identification and localization of ERD2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: separation from sites of sphingomyelin synthesis and implications for organization of the Golgi. *Embo J* *12*, 4763-4773.
- Elmendorf, H. G., and Haldar, K. (1994). *Plasmodium falciparum* exports the Golgi marker sphingomyelin synthase into a tubovesicular network in the cytoplasm of mature erythrocytes. *J Cell Biol* *124*, 449-462.
- Fader, C. M., and Colombo, M. I. (2006). Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation. *Autophagy* *2*, 122-125.
- Feldheim, D., Rothblatt, J., and Schekman, R. (1992). Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol Cell Biol* *12*, 3288-3296.
- Gilmore, R., Walter, P., and Blobel, G. (1982). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* *95*, 470-477.
- Ginsburg, H., Kutner, S., Krugliak, M., and Cabantchik, Z. I. (1985). Characterization of permeation pathways appearing in the host membrane of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *Mol Biochem Parasitol* *14*, 313-322.
- Glushakova, S., Yin, D., Li, T., and Zimmerberg, J. (2005). Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. *Curr Biol* *15*, 1645-1650.
- Goebel, S., Luder, C. G., Lugert, R., Bohne, W., and Gross, U. (1998). *Toxoplasma gondii* inhibits the in vitro induced apoptosis of HL-60 cells. *Tokai J Exp Clin Med* *23*, 351-356.
- Goel, V. K., Li, X., Chen, H., Liu, S. C., Chishti, A. H., and Oh, S. S. (2003). Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 5164-5169.
- Gorlich, D., and Rapoport, T. A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* *75*, 615-630.
- Gunther, K., Tummler, M., Arnold, H. H., Ridley, R., Goman, M., Scaife, J. G., and Lingelbach, K.

## 5 Literatur

---

- (1991). An exported protein of *Plasmodium falciparum* is synthesized as an integral membrane protein. *Mol Biochem Parasitol* **46**, 149-157.
- Haeggstrom, M., A. V. O. N. E., Kironde, F., Fernandez, V., and Wahlgren, M. (2007). Characterization of Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg* **76**, 27-32.
- Haig, D. M. (1992). Haemopoietic stem cells and the development of the blood cell repertoire. *J Comp Pathol* **106**, 121-136.
- Haldar, K. (1998). Intracellular trafficking in *Plasmodium*-infected erythrocytes. *Curr Opin Microbiol* **1**, 466-471.
- Haldar, K., and Holder, A. A. (1993). Export of parasite proteins to the erythrocyte in *Plasmodium falciparum*-infected cells. *Semin Cell Biol* **4**, 345-353.
- Haldar, K., Samuel, B. U., Mohandas, N., Harrison, T., and Hiller, N. L. (2001). Transport mechanisms in *Plasmodium*-infected erythrocytes: lipid rafts and a tubovesicular network. *Int J Parasitol* **31**, 1393-1401.
- Hamman, B. D., Hendershot, L. M., and Johnson, A. E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the lumenal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* **92**, 747-758.
- Hanssen, E., Sougrat, R., Frankland, S., Deed, S., Klonis, N., Lippincott-Schwartz, J., and Tilley, L. (2008). Electron tomography of the Maurer's cleft organelles of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes reveals novel structural features. *Mol Microbiol* **67**, 703-718.
- Harris, P. K., Yeoh, S., Dluzewski, A. R., O'Donnell, R. A., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Bannister, L. H., Mitchell, G. H., and Blackman, M. J. (2005). Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. *PLoS Pathog* **1**, 241-251.
- Hayashi, M., Taniguchi, S., Ishizuka, Y., Kim, H. S., Wataya, Y., Yamamoto, A., and Moriyama, Y. (2001). A homologue of N-ethylmaleimide-sensitive factor in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is exported and localized in vesicular structures in the cytoplasm of infected erythrocytes in the brefeldin A-sensitive pathway. *J Biol Chem* **276**, 15249-15255.
- Heussler, V. T., Kuenzi, P., and Rottenberg, S. (2001). Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int J Parasitol* **31**, 1166-1176.
- Heussler, V. T., Rottenberg, S., Schwab, R., Kuenzi, P., Fernandez, P. C., McKellar, S., Shiels, B., Chen, Z. J., Orth, K., Wallach, D., and Dobbelaere, D. A. (2002). Hijacking of host cell IKK signalosomes by the transforming parasite *Theileria*. *Science* **298**, 1033-1036.
- Hiller, N. L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estrano, C., and Haldar, K. (2004). A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* **306**, 1934-1937.
- Hinterberg, K., Scherf, A., Gysin, J., Toyoshima, T., Aikawa, M., Mazie, J. C., da Silva, L. P., and Mattei, D. (1994). *Plasmodium falciparum*: the Pf332 antigen is secreted from the parasite by a brefeldin A-dependent pathway and is translocated to the erythrocyte membrane via the Maurer's clefts. *Exp Parasitol* **79**, 279-291.
- Holzinger, A., De Ruijter, N., Emons, A. M., and Lutz-Meindl, U. (1999). Spectrin-like proteins in green algae (Desmidiaceae). *Cell Biol Int* **23**, 335-344.
- Huang, S., Ratliff, K. S., and Matouschek, A. (2002). Protein unfolding by the mitochondrial membrane potential. *Nat Struct Biol* **9**, 301-307.
- Huang, S., Ratliff, K. S., Schwartz, M. P., Spenner, J. M., and Matouschek, A. (1999). Mitochondria unfold precursor proteins by unraveling them from their N-termini. *Nat Struct Biol* **6**, 1132-1138.
- Johnstone, R. M., Mathew, A., Mason, A. B., and Teng, K. (1991). 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* **147**, 27-36.
- Joiner, K. A. (1991). Rhoptry lipids and parasitophorous vacuole formation: a slippery issue. *Parasitol Today* **7**, 226-227.
- Kadekoppala, M., Kline, K., Akompong, T., and Haldar, K. (2000). Stable expression of a new chimeric fluorescent reporter in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* **68**, 2328-2332.
- Kamchonwongpaisan, S., Samoff, E., and Meshnick, S. R. (1997). Identification of hemoglobin degradation products in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **86**, 179-186.
- Kanaani, J., and Ginsburg, H. (1989). Metabolic interconnection between the human malarial parasite *Plasmodium falciparum* and its host erythrocyte. Regulation of ATP levels by means of an adenylate translocator and adenylate kinase. *J Biol Chem* **264**, 3194-3199.
- Keeley, A., and Soldati, D. (2004). The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol* **14**, 528-532.

- Kiang, J. G. (2003). Genistein inhibits herbimycin A-induced over-expression of inducible heat shock protein 70 kDa. *Mol Cell Biochem* **245**, 191-199.
- Kilejian, A., Sharma, Y. D., Karoui, H., and Naslund, L. (1986). Histidine-rich domain of the knob protein of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7938-7941.
- Kirk, K. (2001). Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Rev* **81**, 495-537.
- Kirk, K., Horner, H. A., Elford, B. C., Ellory, J. C., and Newbold, C. I. (1994). Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. *J Biol Chem* **269**, 3339-3347.
- Kirk, K., Staines, H. M., Martin, R. E., and Saliba, K. J. (1999). Transport properties of the host cell membrane. *Novartis Found Symp* **226**, 55-66; discussion 66-73.
- Knapp, B., Hundt, E., and Kupper, H. A. (1990). *Plasmodium falciparum* aldolase: gene structure and localization. *Mol Biochem Parasitol* **40**, 1-12.
- Knapp, B., Hundt, E., Nau, U., and Kupper, H. A. (1989). Molecular cloning, genomic structure and localization in a blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by a serine stretch. *Mol Biochem Parasitol* **32**, 73-83.
- Knuepfer, E., Rug, M., and Cowman, A. F. (2005a). Function of the plasmodium export element can be blocked by green fluorescent protein. *Mol Biochem Parasitol* **142**, 258-262.
- Knuepfer, E., Rug, M., Klonis, N., Tilley, L., and Cowman, A. F. (2005b). Trafficking of the major virulence factor to the surface of transfected *P. falciparum*-infected erythrocytes. *Blood* **105**, 4078-4087.
- Kolakovich, K. A., Gluzman, I. Y., Duffin, K. L., and Goldberg, D. E. (1997). Generation of hemoglobin peptides in the acidic digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* implicates peptide transport in amino acid production. *Mol Biochem Parasitol* **87**, 123-135.
- Kriek, N., Tilley, L., Horrocks, P., Pinches, R., Elford, B. C., Ferguson, D. J., Lingelbach, K., and Newbold, C. I. (2003). Characterization of the pathway for transport of the cytoadherence-mediating protein, PfEMP1, to the host cell surface in malaria parasite-infected erythrocytes. *Mol Microbiol* **50**, 1215-1227.
- Kumar, N., Koski, G., Harada, M., Aikawa, M., and Zheng, H. (1991). Induction and localization of *Plasmodium falciparum* stress proteins related to the heat shock protein 70 family. *Mol Biochem Parasitol* **48**, 47-58.
- La Greca, N., Hibbs, A. R., Riffkin, C., Foley, M., and Tilley, L. (1997). Identification of an endoplasmic reticulum-resident calcium-binding protein with multiple EF-hand motifs in asexual stages of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **89**, 283-293.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lanzer, M., Wickert, H., Krohne, G., Vincensini, L., and Braun Breton, C. (2006). Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Int J Parasitol* **36**, 23-36.
- Lauer, S. A., Rathod, P. K., Ghori, N., and Haldar, K. (1997). A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science* **276**, 1122-1125.
- Li, X., Chen, H., Oo, T. H., Daly, T. M., Bergman, L. W., Liu, S. C., Chishti, A. H., and Oh, S. S. (2004). A co-ligand complex anchors *Plasmodium falciparum* merozoites to the erythrocyte invasion receptor band 3. *J Biol Chem* **279**, 5765-5771.
- Lingelbach, K., and Joiner, K. A. (1998). The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* **111 ( Pt 11)**, 1467-1475.
- Lingelbach, K., and Przyborski, J. M. (2006). The long and winding road: protein trafficking mechanisms in the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte. *Mol Biochem Parasitol* **147**, 1-8.
- Lingelbach, K. R. (1993). *Plasmodium falciparum*: a molecular view of protein transport from the parasite into the host erythrocyte. *Exp Parasitol* **76**, 318-327.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L. C., Bonifacino, J. S., and Klausner, R. D. (1989). Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* **56**, 801-813.
- Lopez-Estrano, C., Bhattacharjee, S., Harrison, T., and Haldar, K. (2003). Cooperative domains define a unique host cell-targeting signal in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12402-12407.
- Maier, A. G., Duraisingh, M. T., Reeder, J. C., Patel, S. S., Kazura, J. W., Zimmerman, P. A., and Cowman, A. F. (2003). *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. *Nat Med* **9**, 87-92.
- Maier, A. G., Rug, M., O'Neill, M. T., Beeson, J. G., Marti, M., Reeder, J., and Cowman, A. F. (2007). Skeleton-binding protein 1 functions at the parasitophorous vacuole membrane to traffic

- PfEMP1 to the Plasmodium falciparum-infected erythrocyte surface. *Blood* 109, 1289-1297.
- Marcu, M. G., Chadli, A., Bouhouche, I., Catelli, M., and Neckers, L. M. (2000). The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. *J Biol Chem* 275, 37181-37186.
- Marti, M., Baum, J., Rug, M., Tilley, L., and Cowman, A. F. (2005). Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte. *J Cell Biol* 171, 587-592.
- Marti, M., Good, R. T., Rug, M., Knuepfer, E., and Cowman, A. F. (2004). Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* 306, 1930-1933.
- Matlack, K. E., Misselwitz, B., Plath, K., and Rapoport, T. A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* 97, 553-564.
- Mattei, D., Ward, G. E., Langsley, G., and Lingelbach, K. (1999). Novel secretory pathways in Plasmodium? *Parasitol Today* 15, 235-237.
- Mayer, M. P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62, 670-684.
- McLaren, D. J., Bannister, L. H., Trigg, P. I., and Butcher, G. A. (1977). A freeze-fracture study on the parasite-erythrocyte interrelationship in Plasmodium knowlesi infections. *Bull World Health Organ* 55, 199-203.
- Meyer, D. I., and Dobberstein, B. (1980). Identification and characterization of a membrane component essential for the translocation of nascent proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 87, 503-508.
- Meyer, T. H., Menetret, J. F., Breitling, R., Miller, K. R., Akey, C. W., and Rapoport, T. A. (1999). The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eukaryotic Sec61p complex. *J Mol Biol* 285, 1789-1800.
- Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., and Doumbo, O. K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415, 673-679.
- Miller, L. H., Good, M. F., and Milon, G. (1994). Malaria pathogenesis. *Science* 264, 1878-1883.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 152, 657-668.
- Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., and Rodriguez, A. (2001). Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* 291, 141-144.
- Murphy, S. C., Samuel, B. U., Harrison, T., Speicher, K. D., Speicher, D. W., Reid, M. E., Prohaska, R., Low, P. S., Tanner, M. J., Mohandas, N., and Haldar, K. (2004). Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. *Blood* 103, 1920-1928.
- Nacer, A., Berry, L., Slomianny, C., and Mattei, D. (2001). Plasmodium falciparum signal sequences: simply sequences or special signals? *Int J Parasitol* 31, 1371-1379.
- Nacher, M., Singhasivanon, P., Silachamroon, U., Treeprasertsuk, S., Tosukhowong, T., Vannaphan, S., Gay, F., Mazier, D., and Looareesuwan, S. (2002). Decreased hemoglobin concentrations, hyperparasitemia, and severe malaria are associated with increased Plasmodium falciparum gametocyte carriage. *J Parasitol* 88, 97-101.
- Nakajima-Shimada, J., Zou, C., Takagi, M., Umeda, M., Nara, T., and Aoki, T. (2000). Inhibition of Fas-mediated apoptosis by Trypanosoma cruzi infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1475, 175-183.
- Nickel, W. (2005). Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic* 6, 607-614.
- Nijhout, M. M., and Carter, R. (1978). Gamete development in malaria parasites: bicarbonate-dependent stimulation by pH in vitro. *Parasitology* 76, 39-53.
- Noe, A. R., Fishkind, D. J., and Adams, J. H. (2000). Spatial and temporal dynamics of the secretory pathway during differentiation of the Plasmodium yoelii schizont. *Mol Biochem Parasitol* 108, 169-185.
- Nolte, D., and Knapp, B. (1991). Partial sequences of three new asparagine-rich blood stage proteins of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* 46, 319-321.
- Nyalwidhe, J., Baumeister, S., Hibbs, A. R., Tawill, S., Papakrivov, J., Volker, U., and Lingelbach, K. (2002). A nonpermeant biotin derivative gains access to the parasitophorous vacuole in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes permeabilized with streptolysin O. *J Biol Chem* 277, 40005-40011.
- Nyalwidhe, J., and Lingelbach, K. (2006). Proteases and chaperones are the most abundant proteins in the parasitophorous vacuole of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Proteomics* 6, 1563-1573.

- Ogata, K., Arakawa, M., Kasahara, T., Shioiri-Nakano, K., and Hiraoka, K. (1983). Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods. *J Immunol Methods* **65**, 75-82.
- Ohno-Iwashita, Y., Iwamoto, M., Mitsui, K., Ando, S., and Iwashita, S. (1991). A cytolysin, theta-toxin, preferentially binds to membrane cholesterol surrounded by phospholipids with 18-carbon hydrocarbon chains in cholesterol-rich region. *J Biochem* **110**, 369-375.
- Orlandi, P. A., Klotz, F. W., and Haynes, J. D. (1992). A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac(alpha 2-3)Gal- sequences of glycophorin A. *J Cell Biol* **116**, 901-909.
- Ossorio, P. N., Dubremetz, J. F., and Joiner, K. A. (1994). A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *J Biol Chem* **269**, 15350-15357.
- Pachebat, J. A., Ling, I. T., Grainger, M., Trucco, C., Howell, S., Fernandez-Reyes, D., Gunaratne, R., and Holder, A. A. (2001). The 22 kDa component of the protein complex on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites is derived from a larger precursor, merozoite surface protein 7. *Mol Biochem Parasitol* **117**, 83-89.
- Papakrivos, J., Newbold, C. I., and Lingelbach, K. (2005). A potential novel mechanism for the insertion of a membrane protein revealed by a biochemical analysis of the *Plasmodium falciparum* cytoadherence molecule PfEMP-1. *Mol Microbiol* **55**, 1272-1284.
- Pasloske, B. L., Baruch, D. I., van Schravendijk, M. R., Handunnetti, S. M., Aikawa, M., Fujioka, H., Taraschi, T. F., Gormley, J. A., and Howard, R. J. (1993). Cloning and characterization of a *Plasmodium falciparum* gene encoding a novel high-molecular weight host membrane-associated protein, PfEMP3. *Mol Biochem Parasitol* **59**, 59-72.
- Pasvol, G., Wilson, R. J., Smalley, M. E., and Brown, J. (1978). Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Ann Trop Med Parasitol* **72**, 87-88.
- Peyroche, A., Antonny, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J., and Jackson, C. L. (1999). Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell* **3**, 275-285.
- Pfanner, N., and Meijer, M. (1997). The Tom and Tim machine. *Curr Biol* **7**, R100-103.
- Pouvelle, B., Gormley, J. A., and Taraschi, T. F. (1994). Characterization of trafficking pathways and membrane genesis in malaria-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* **66**, 83-96.
- Presley, J. F., Ward, T. H., Pfeifer, A. C., Siggia, E. D., Phair, R. D., and Lippincott-Schwartz, J. (2002). Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport. *Nature* **417**, 187-193.
- Qbadou, S., Becker, T., Mirus, O., Tews, I., Soll, J., and Schleiff, E. (2006). The molecular chaperone Hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor Toc64. *Embo J* **25**, 1836-1847.
- Raether, W., Enders, B., Hofmann, J., Schwannecke, U., Seidenath, H., Hanel, H., and Uphoff, M. (1989). Antimalarial activity of new floxacrine-related acridinedione derivatives: studies on blood schizontocidal action of potential candidates against *P. berghei* in mice and *P. falciparum* in vivo and in vitro. *Parasitol Res* **75**, 619-626.
- Ragge, K., Arnold, H. H., Tummler, M., Knapp, B., Hundt, E., and Lingelbach, K. (1990). In vitro biosynthesis and membrane translocation of the serine rich protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **42**, 93-100.
- Rassow, J., Maarse, A. C., Krainer, E., Kubrich, M., Muller, H., Meijer, M., Craig, E. A., and Pfanner, N. (1994). Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J Cell Biol* **127**, 1547-1556.
- Rayner, J. C., Vargas-Serrato, E., Huber, C. S., Galinski, M. R., and Barnwell, J. W. (2001). A *Plasmodium falciparum* homologue of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein (PvRBP1) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway. *J Exp Med* **194**, 1571-1581.
- Roggwiller, E., Betoulle, M. E., Blisnick, T., and Braun Breton, C. (1996). A role for erythrocyte band 3 degradation by the parasite gp76 serine protease in the formation of the parasitophorous vacuole during invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **82**, 13-24.
- Ronchi, S., Minchiotti, L., Galliano, M., Curti, B., Swenson, R. P., Williams, C. H., Jr., and Massey, V. (1982). The primary structure of D-amino acid oxidase from pig kidney. II. Isolation and sequence of overlap peptides and the complete sequence. *J Biol Chem* **257**, 8824-8834.
- Roth, E., Jr. (1990). *Plasmodium falciparum* carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite. *Blood Cells* **16**, 453-460; discussion 461-456.
- Salmon, B. L., Oksman, A., and Goldberg, D. E. (2001). Malaria parasite exit from the host

- erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 271-276.
- Sanders, P. R., Gilson, P. R., Cantin, G. T., Greenbaum, D. C., Nebl, T., Carucci, D. J., McConville, M. J., Schofield, L., Hodder, A. N., Yates, J. R., 3rd, and Crabb, B. S. (2005). Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in Raft-like membranes of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 280, 40169-40176.
- Schatz, G., and Dobberstein, B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519-1526.
- Schiller, M., Bohm, M., Dennler, S., Ehrchen, J. M., and Mauviel, A. (2006). Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 is critical for interleukin-1-induced, CREB-mediated, c-fos gene expression in keratinocytes. *Oncogene* 25, 4449-4457.
- Schlicher, T., and Soll, J. (1997). Chloroplastic isoforms of DnaJ and GrpE in pea. *Plant Mol Biol* 33, 181-185.
- Schneider, H. C., Berthold, J., Bauer, M. F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M., and Neupert, W. (1994). Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* 371, 768-774.
- Schnell, D. J., and Hebert, D. N. (2003). Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell* 112, 491-505.
- Sellebjerg, F., and Christiansen, M. (1996). Qualitative assessment of intrathecal IgG synthesis by isoelectric focusing and immunodetection: interlaboratory reproducibility and interobserver agreement. *Scand J Clin Lab Invest* 56, 135-143.
- Sherman, I. W., Eda, S., and Winograd, E. (2004). Erythrocyte aging and malaria. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50, 159-169.
- Siegel, M. R., and Sisler, H. D. (1963). Inhibition of Protein Synthesis in Vitro by Cycloheximide. *Nature* 200, 675-676.
- Simmons, D., Woollett, G., Bergin-Cartwright, M., Kay, D., and Scaife, J. (1987). A malaria protein exported into a new compartment within the host erythrocyte. *Embo J* 6, 485-491.
- Simpson, C. F., and Kling, J. M. (1967). The mechanism of denucleation in circulating erythroblasts. *J Cell Biol* 35, 237-245.
- Sinden, R. E. (1983). Sexual development of malarial parasites. *Adv Parasitol* 22, 153-216.
- Slater, A. F., and Cerami, A. (1992). Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* 355, 167-169.
- Slater, A. F., Swiggard, W. J., Orton, B. R., Flitter, W. D., Goldberg, D. E., Cerami, A., and Henderson, G. B. (1991). An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 325-329.
- Slomianny, C. (1990). Three-dimensional reconstruction of the feeding process of the malaria parasite. *Blood Cells* 16, 369-378.
- Smith, J. D., Chitnis, C. E., Craig, A. G., Roberts, D. J., Hudson-Taylor, D. E., Peterson, D. S., Pinches, R., Newbold, C. I., and Miller, L. H. (1995). Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 82, 101-110.
- Soll, J., and Schleiff, E. (2004). Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 198-208.
- Spielmann, T., and Beck, H. P. (2000). Analysis of stage-specific transcription in *Plasmodium falciparum* reveals a set of genes exclusively transcribed in ring stage parasites. *Mol Biochem Parasitol* 111, 453-458.
- Spielmann, T., Ferguson, D. J., and Beck, H. P. (2003). etramps, a new *Plasmodium falciparum* gene family coding for developmentally regulated and highly charged membrane proteins located at the parasite-host cell interface. *Mol Biol Cell* 14, 1529-1544.
- Spielmann, T., Gardiner, D. L., Beck, H. P., Trenholme, K. R., and Kemp, D. J. (2006). Organization of ETRAMPs and EXP-1 at the parasite-host cell interface of malaria parasites. *Mol Microbiol* 59, 779-794.
- Spycher, C., Klonis, N., Spielmann, T., Kump, E., Steiger, S., Tilley, L., and Beck, H. P. (2003). MAHRP-1, a novel *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein, binds ferriprotoporphyrin IX and localizes to the Maurer's clefts. *J Biol Chem* 278, 35373-35383.
- Spycher, C., Rug, M., Klonis, N., Ferguson, D. J., Cowman, A. F., Beck, H. P., and Tilley, L. (2006). Genesis of and trafficking to the Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol Cell Biol* 26, 4074-4085.
- Staines, H. M., Rae, C., and Kirk, K. (2000). Increased permeability of the malaria-infected erythrocyte to organic cations. *Biochim Biophys Acta* 1463, 88-98.
- Stebbins, C. E., Russo, A. A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F. U., and Pavletich, N. P. (1997). Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 89, 239-250.
- Stubbs, J., Simpson, K. M., Triglia, T., Plouffe, D., Tonkin, C. J., Duraisingh, M. T., Maier, A. G.,

- Winzeler, E. A., and Cowman, A. F. (2005). Molecular mechanism for switching of *P. falciparum* invasion pathways into human erythrocytes. *Science* 309, 1384-1387.
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J. M., Menard, R., and Heussler, V. T. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 313, 1287-1290.
- Su, X. Z., Heatwole, V. M., Wertheimer, S. P., Guinet, F., Herrfeldt, J. A., Peterson, D. S., Ravetch, J. A., and Wellems, T. E. (1995). The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 82, 89-100.
- Taraschi, T. F., O'Donnell, M., Martinez, S., Schneider, T., Trelka, D., Fowler, V. M., Tilley, L., and Moriyama, Y. (2003). Generation of an erythrocyte vesicle transport system by *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Blood* 102, 3420-3426.
- Taraschi, T. F., Trelka, D., Martinez, S., Schneider, T., and O'Donnell, M. E. (2001). Vesicle-mediated trafficking of parasite proteins to the host cell cytosol and erythrocyte surface membrane in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Int J Parasitol* 31, 1381-1391.
- Telen, M. J., and Bolk, T. A. (1987). Human red cell antigens. IV. The abnormal sialoglycoprotein of Gerbich-negative red cells. *Transfusion* 27, 309-314.
- Terlecky, S. R., Chiang, H. L., Olson, T. S., and Dice, J. F. (1992). Protein and peptide binding and stimulation of in vitro lysosomal proteolysis by the 73-kDa heat shock cognate protein. *J Biol Chem* 267, 9202-9209.
- Terlecky, S. R., and Dice, J. F. (1993). Polypeptide import and degradation by isolated lysosomes. *J Biol Chem* 268, 23490-23495.
- Tomkiewicz, D., Nouwen, N., and Driessen, A. J. (2007). Pushing, pulling and trapping--modes of motor protein supported protein translocation. *FEBS Lett* 581, 2820-2828.
- Torii, M., Adams, J. H., Miller, L. H., and Aikawa, M. (1989). Release of merozoite dense granules during erythrocyte invasion by *Plasmodium knowlesi*. *Infect Immun* 57, 3230-3233.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Trager, W., and Jensen, J. B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673-675.
- Trager, W., Rudzinska, M. A., and Bradbury, P. C. (1966). The fine structure of *Plasmodium falciparum* and its host erythrocytes in natural malarial infections in man. *Bull World Health Organ* 35, 883-885.
- Trelka, D. P., Schneider, T. G., Reeder, J. C., and Taraschi, T. F. (2000). Evidence for vesicle-mediated trafficking of parasite proteins to the host cell cytosol and erythrocyte surface membrane in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 106, 131-145.
- Triglia, T., Duraisingh, M. T., Good, R. T., and Cowman, A. F. (2005). Reticulocyte-binding protein homologue 1 is required for sialic acid-dependent invasion into human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 55, 162-174.
- Truscott, K. N., Voos, W., Frazier, A. E., Lind, M., Li, Y., Geissler, A., Dudek, J., Muller, H., Sickmann, A., Meyer, H. E., et al. (2003). A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J Cell Biol* 163, 707-713.
- van de Sand, C., Horstmann, S., Schmidt, A., Sturm, A., Bolte, S., Krueger, A., Lutgehetmann, M., Pollok, J.-M., Libert, C., and Heussler, V. T. (2005). The liver stage of *Plasmodium berghei* inhibits host cell apoptosis  
doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04888.x. *Molecular Microbiology* 58, 731-742.
- van der Laan, M., Rissler, M., and Rehling, P. (2006). Mitochondrial preprotein translocases as dynamic molecular machines. *FEMS Yeast Res* 6, 849-861.
- van Ooij, C., and Haldar, K. (2007). Protein export from *Plasmodium* parasites. *Cell Microbiol* 9, 573-582.
- Van Wye, J., Ghori, N., Webster, P., Mitschler, R. R., Elmendorf, H. G., and Haldar, K. (1996). Identification and localization of rab6, separation of rab6 from ERD2 and implications for an 'unstacked' Golgi, in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 83, 107-120.
- Vincensini, L., Richert, S., Blisnick, T., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Rabilloud, T., and Braun Breton, C. (2005). Proteomic analysis identifies novel proteins of the Maurer's clefts, a secretory compartment delivering *Plasmodium falciparum* proteins to the surface of its host cell. *Mol Cell Proteomics* 4, 582-593.
- Vlachou, D., Schlegelmilch, T., Runn, E., Mendes, A., and Kafatos, F. C. (2006). The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Curr Opin Genet Dev* 16, 384-391.

## 5 Literatur

---

- Voigt, S., Hanspal, M., LeRoy, P. J., Zhao, P. S., Oh, S. S., Chishti, A. H., and Liu, S. C. (2000). The cytoadherence ligand Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) binds to the P. falciparum knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) by electrostatic interactions. *Mol Biochem Parasitol* 110, 423-428.
- Waller, K. L., Cooke, B. M., Nunomura, W., Mohandas, N., and Coppel, R. L. (1999). Mapping the binding domains involved in the interaction between the Plasmodium falciparum knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and the cytoadherence ligand P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). *J Biol Chem* 274, 23808-23813.
- Waller, R. F., Reed, M. B., Cowman, A. F., and McFadden, G. I. (2000). Protein trafficking to the plastid of Plasmodium falciparum is via the secretory pathway. *Embo J* 19, 1794-1802.
- Walter, P., and Blobel, G. (1980). Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 7112-7116.
- Walter, P., and Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* 91, 551-556.
- Walter, P., and Blobel, G. (1982). Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* 299, 691-698.
- Walter, P., Jackson, R. C., Marcus, M. M., Lingappa, V. R., and Blobel, G. (1979). Tryptic dissection and reconstitution of translocation activity for nascent presecretory proteins across microsomal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1795-1799.
- Ward, G. E., Miller, L. H., and Dvorak, J. A. (1993). The origin of parasitophorous vacuole membrane lipids in malaria-infected erythrocytes. *J Cell Sci* 106 (Pt 1), 237-248.
- Wickert, H., Gottler, W., Krohne, G., and Lanzer, M. (2004). Maurer's cleft organization in the cytoplasm of plasmodium falciparum-infected erythrocytes: new insights from three-dimensional reconstruction of serial ultrathin sections. *Eur J Cell Biol* 83, 567-582.
- Wickert, H., and Krohne, G. (2007). The complex morphology of Maurer's clefts: from discovery to three-dimensional reconstructions. *Trends Parasitol* 23, 502-509.
- Wickert, H., Wissing, F., Andrews, K. T., Stich, A., Krohne, G., and Lanzer, M. (2003). Evidence for trafficking of PfEMP1 to the surface of P. falciparum-infected erythrocytes via a complex membrane network. *Eur J Cell Biol* 82, 271-284.
- Wickham, M. E., Culvenor, J. G., and Cowman, A. F. (2003). Selective inhibition of a two-step egress of malaria parasites from the host erythrocyte. *J Biol Chem* 278, 37658-37663.
- Wickham, M. E., Rug, M., Ralph, S. A., Klonis, N., McFadden, G. I., Tilley, L., and Cowman, A. F. (2001). Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes. *Embo J* 20, 5636-5649.
- Wickner, W., and Schekman, R. (2005). Protein translocation across biological membranes. *Science* 310, 1452-1456.
- Winograd, E., Clavijo, C. A., Bustamante, L. Y., and Jaramillo, M. (1999). Release of merozoites from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes could be mediated by a non-explosive event. *Parasitol Res* 85, 621-624.
- Wiser, M. F., Lanners, H. N., and Bafford, R. A. (1999). Export of proteins via a novel secretory pathway. *Parasitol Today* 15, 194-198.
- Wiser, M. F., Lanners, H. N., Bafford, R. A., and Favaloro, J. M. (1997). A novel alternate secretory pathway for the export of Plasmodium proteins into the host erythrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9108-9113.
- Yayon, A., Timberg, R., Friedman, S., and Ginsburg, H. (1984). Effects of chloroquine on the feeding mechanism of the intraerythrocytic human malarial parasite Plasmodium falciparum. *J Protozool* 31, 367-372.
- Zolg, J. W., Macleod, A. J., Scaife, J. G., and Beaudoin, R. L. (1984). The accumulation of lactic acid and its influence on the growth of Plasmodium falciparum in synchronized cultures. *In Vitro* 20, 205-215.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach danke ich für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit, unabhängig daran zu arbeiten. Darüber hinaus möchte ich mich für die lange Unterstützung bedanken.

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

Dr. Jude Przyborski danke ich für die Möglichkeit, an dem Traffic-Review mitzuwirken, die vielen interessanten Diskussionen und seinen überschäumenden Enthusiasmus.

Dr. Julius Nyalwidhe danke ich für seine nie endende Unterstützung, sein Vertrauen und die MALDI-Analysen.

Dr. Stefan Baumeister danke ich für die vielen interessanten Gespräche und die angenehme Zeit im Büro.

Ich danke meinen ehemaligen Mitstreitern Dr. Janni Papakrivos und Dr. Sabine Wiek für die Einführung in das Doktorandendasein, für all das, was ich von Ihnen lernen durfte und die gute Zeit im Labor.

Ich danke allen, die ich zurücklassen werde, Omid Azimzadeh, Markus Winterberg, Simone Külzer, Nina Gehde, Simone Spork, Chu Trang und den vielen anderen für die nette Zeit im Labor.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und die gute Zeit.

Ich danke Verena für alles.

# Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Proteintranslokation über die Membran der parasitophoren Vakuole im  
*Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten“**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

**15.04.2008**  
(Ort/Datum)

**Stefan Charpian**  
(Unterschrift mit Vor- und Zunahme)