

**Analyse des Proteinrepertoires intraerythrocytärer  
Membranstrukturen des Malariaerregers *Plasmodium  
falciparum*  
(WELCH 1897)**



**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von  
**Jürgen Fritsch**  
aus Eschwege

Kiel, Mai 2007

Referent/in: Prof. Dr. M. Leippe

Korreferent/in: Prof. Dr. P. Saftig

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 2007

Zum Druck genehmigt:

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Publikation vorbereitet:

Gelhaus, C., Fritsch, J., Krause, E., and Leippe, M. (2005) Fractionation and identification of proteins by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: towards proteome analysis of *Plasmodium falciparum*. *Proteomics*, 5(16), 4213-22

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Malaria und der Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	1
1.1.1	Therapie- und Vakzinierungsstrategien gegen Malaria.....	4
1.2	Ultrastruktur der Merozoiten.....	5
1.2.1	Invasion von Erythrocyten.....	7
1.2.1.1	Anlagerung an die Erythrocytenmembran.....	8
1.2.1.2	Reorientierung des apikalen Pols in Richtung Erythrocyt und Ausbildung von <i>tight junctions</i> .....	8
1.2.1.3	Invasion der Merozoiten und Bildung der parasitophoren Vakuole.....	9
1.2.1.4	Bildung der <i>moving junctions</i> .....	10
1.2.1.5	Sezernierung der <i>Dense Granule</i> Proteine und Abschluss der Invasion.....	12
1.3	Die parasitophore Vakuolenmembran und das tubovesikuläre Netzwerk.....	12
1.3.1	Die PVM und der Stofftransport.....	14
1.3.2	Die PVM und die Evasion der Merozoiten.....	16
1.3.3	Das PVM/TVN-Netzwerk als Plattform für intrazelluläres <i>Signalling</i> .....	18
1.4	Proteomics.....	19
1.5	Zielsetzung.....	21
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
2.1	Material.....	23
2.1.1	Reagenzien.....	23
2.1.2	Allgemeine Pufferlösungen.....	25
2.1.3	Immunoreagenzien.....	26
2.1.4	Geräte und sonstiges Verbrauchsmaterial.....	27
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Führung einer <i>Plasmodium falciparum</i> -Kultur.....	28
2.2.1.1	Medien, Erythrocyten und Lösungen.....	28
2.2.1.2	<i>In vitro</i> -Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	29
2.2.1.3	Einfrieren von Plasmodien.....	30
2.2.1.4	Auftauen von Plasmodien.....	30
2.2.1.5	Synchronisation der Entwicklung von <i>P. falciparum</i> mit D-Sorbitol.....	31
2.2.1.6	Anreicherung maturer Parasitenstadien mit Percoll (nach Kutner <i>et al.</i> , 1985).....	31
2.2.1.7	Anreicherung maturer Parasitenstadien mit Gelafundin (nach Pasvol <i>et al.</i> , 1978).....	32

2.2.1.8	Anreicherung maturer Parasitenstadien mit dem MACS-System.....	32
2.2.1.9	Behandlung infizierter Erythrocyten mit Brefeldin A .....	32
2.2.2	Isolierung von PEMS ( <i>Parasitophorous Vacuolar Membrane-Enclosed Merozoite Structures</i> ) (nach Salmon <i>et al.</i> , 2001).....	33
2.2.3	Präparation subzellulärer Membranen infizierter Erythrocyten .....	35
2.2.4	Extraktion von Membranen infizierter Erythrocyten .....	35
2.2.4.1	Behandlung mit Salz- und Karbonatpuffer zur Extraktion von peripheren Membranproteinen (Fujiki <i>et al.</i> , 1982; Johnson <i>et al.</i> , 1994).....	35
2.2.4.2	Extraktion von Proteinen durch temperaturabhängige Phasentrennung (Smythe <i>et al.</i> , 1988) .....	36
2.2.5	Elektronenmikroskopie.....	37
2.2.5.1	Herstellung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie.....	37
2.2.5.2	Immun-Elektronenmikroskopie (IEM).....	38
2.2.6	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	38
2.2.6.1	Konjugation von Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen .....	40
2.2.7	Reinigung von Antikörpern .....	41
2.2.7.1	HiTrap Protein A Säule.....	41
2.2.7.1	HiTrap Peptid-NHS Säule.....	42
2.2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	44
2.2.9	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	45
2.2.9.1	Die erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung).....	46
2.2.9.2	Äquilibrieren des IEF-Gelstreifens für die zweite Dimension.....	48
2.2.9.3	Die zweite Dimension (SDS-PAGE) .....	48
2.2.9.4	Besonderheiten bei der Durchführung der 2D-PAGE im präparativen Maßstab .....	49
2.2.10	Proteinfärbung mit Silbernitrat.....	49
2.2.10.1	Methode I nach Heukeshoven und Dernick (1988) .....	50
2.2.10.2	Methode II verändert nach Blum <i>et al.</i> , 1987 .....	50
2.2.10.3	Entfärbung von Silbergelten nach Gharahdaghi <i>et al.</i> , 1999.....	51
2.2.11	Proteinfärbung mit kolloidalem Commassie-Brilliant-Blue G-250.....	51
2.2.12	Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran.....	51
2.2.13	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer PVDF-Membran.....	52
2.2.14	Massenspektrometrie.....	53
2.2.14.1	<i>In-gel</i> -Fragmentierung von Proteinen, Elution von Peptiden und deren massenspektrometrische Analyse .....	53
2.2.14.2	LC-ESI MS/MS und Datenbanksuche.....	54
2.2.14.3	MALDI-TOF MS und Datenbanksuche .....	54

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>56</b>
3.1	Synchronisation der intraerythrocytären Entwicklung von <i>P. falciparum</i> und Anreicherung von murenen Schizonten .....	56
3.2	Isolation von PEMS (nach Salmon <i>et al.</i> , 2001) .....	57
3.2.1	Präparation von Merozoiten .....	58
3.3	Untersuchung der Merozoiten-Fraktion .....	58
3.4	Untersuchung subzellulärer Membranstrukturen.....	61
3.4.1	Präparation subzellulärer Membranstrukturen.....	61
3.4.2	Analyse der Proteine mit Hilfe von LC-ESI MS/MS.....	62
3.4.2.1	Analyse der Proteine aus Präp-1 .....	62
3.4.2.2	Analyse der Proteine aus Präp-2.....	67
3.4.3	Vergleich der identifizierten Proteine der Merozoitenpräparation mit den ..... Resultaten von Präp-1 und Präp-2 subzellulärer Membransysteme .....	69
3.5	Auswahl von fünf Kandidatenproteinen für die Generierung von Antikörpern.....	70
3.6	Charakterisierung der fünf Proteine .....	72
3.6.1	Das Protein <i>Pf15.2</i> .....	74
3.6.1.1	Massenspektrometrische Daten und Auswahl der Peptide für die Immunisierung.....	75
3.6.1.2	Nachweis des nativen Proteins auf einer PVDF-Membran.....	76
3.6.1.3	Immunfluoreszenz-Mikroskopie von <i>Pf15.2</i> .....	78
3.6.2	Das Protein <i>Pf17.4</i> .....	81
3.6.2.1	Massenspektrometrische Daten und Auswahl der Peptide für die Immunisierung.....	82
3.6.2.2	Nachweis des nativen Proteins auf einer PVDF-Membran.....	83
3.6.2.3	Immunfluoreszenz-Mikroskopie von <i>Pf17.4</i> .....	85
3.6.3	Das Protein <i>Pf38</i> .....	88
3.6.3.1	Massenspektrometrische Daten und Auswahl der Peptide für die Immunisierung.....	89
3.6.3.2	Nachweis des nativen Proteins auf einer PVDF-Membran.....	90
3.6.3.3	Immunfluoreszenz-Mikroskopie von <i>Pf38</i> .....	92
3.6.4	Das Protein <i>Pf13.8</i> .....	94
3.6.4.1	Massenspektrometrische Daten und Auswahl der Peptide für die Immunisierung.....	95
3.6.4.2	Nachweis des nativen Proteins auf einer PVDF-Membran.....	96
3.6.4.3	Immunfluoreszenz-Mikroskopie von <i>Pf13.8</i> .....	97
3.6.5	Das Protein <i>Pf112.5</i> .....	99

3.6.5.1	Massenspektrometrische Daten und Auswahl der Peptide für die Immunisierung.....	100
3.6.5.2	Nachweis des nativen Proteins auf einer PVDF-Membran.....	101
3.6.5.3	Nachweis von <i>Pf112.5</i> nach Behandlung infizierter Erythrocyten mit Brefeldin A.....	103
3.6.5.4	Immunfluoreszenz-Mikroskopie von <i>Pf112.5</i> .....	106
3.6.6	Verwendung affinitätsgereinigter Antikörper für den Nachweis von <i>Pf117.4</i> und <i>Pf112.5</i> .....	108
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>110</b>
4.1	Massenspektrometrische Untersuchung von angereicherten Merozoiten sowie subzellulärer Membranstrukturen.....	113
4.2	<i>Pf15.2</i> , <i>Pf117.4</i> und <i>Pf13.8</i> – Proteine der Merozoiten-Plasmamembran.....	120
4.3	<i>Pf38</i> – ein Protein der Rhoptrien.....	126
4.4	<i>Pf112.5</i> – ein Protein parasitophoren Vakuolenmembran .....	128
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>132</b>
5.1	<i>Summary</i> .....	134
<b>6.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>136</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>150</b>
7.1	Massenspektrometrische Ergebnistabellen.....	150
7.2	Vergleich der Proteinsequenzen aus der PSI-BLAST-Suche .....	186
7.3	Ergebnisse der MASCOT-Suche für die fünf neu charakterisierten Proteine.....	191
<b>8.</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>196</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>197</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>198</b>

## Abkürzungsverzeichnis

2D	zwei-dimensional
2D-PAGE	Zwei-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gramm Substanz in 100 ml Lösung
% C	Verhältnis von % T (s. u.) zu N,N'-Methylenbisacrylamid in Lösung (ausgedrückt in % (w/v)).
% T	Prozentualer Anteil (w/v) an Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid in Lösung
Abb.	Abbildung
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACHC	$\alpha$ -Cyano-3-Hydroxy-Zimtsäure
AMS	Ammoniumsulfat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxosulfat
A <sup>RH+</sup>	Blutgruppe A, Rhesus positiv
ASB-14	Amidosulfobetain-14;Tetradecanoylamido-propyl-dimethyl-ammoniopropansulfonat
ASB-16	Amidosulfobetain-16;Hexadecanoylamido-propyl-dimethyl-ammoniopropansulfonat
BCA	Bichinoninsäure (bichinonic acid)
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> , Sammlung von Algorithmen für den Vergleich von Nuclein- und Aminosäuresequenzen
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CBB G-250	Coomassie Brilliant Blue G-250
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
Da	Dalton, relative Molmasse
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octane
DB	Zellaufschluß-Puffer ( <i>disruption buffer</i> )
DMF	Dimethylformamid
dpi	Dots per inch
DTT	1,4-Dithio-L-Threitol



E64	L-Transepoxy-succinyl-leucylamido-(4-guanidino)butan
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	einfache Gravitationsbeschleunigung
GA	Glutardialdehyd für Elektronenmikroskopie, 25 %, vacuumdestilliert
HAP	<i>histo-aspartic proteinase</i> (GenBank Accession Nr. CAB40630)
HCT	Hämatokrit; Volumenprozent Erythrocyten in einer Suspension
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan-sulfonsäure Natriumsalz
Hoechst 33258	2'-[4-Hydroxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-Benzimidazol
HRP	Peroxidase, aus Meerrettich isoliert ( <i>horse radish peroxidase</i> )
IAA	Iodacetamid
IEM	Immuno-Transmissions-Elektronenmikroskopie
IFA	Immunfluoreszenz-Mikroskopie (indirect fluorescent antibody)
IgG	Immunglobulin G
IPG	Immobilisierter pH-Gradient ( <i>immobilized pH gradient</i> )
iRBC	Erythrocyt, der mit Stadien von <i>Plasmodium falciparum</i> infiziert ist ( <i>infected red blood cell</i> ); Plural: iRBCs ( <i>infected red blood cells</i> )
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanine</i>
LC-ESI-MS/MS	<i>Liquid Chromatography - Electrospray Ionisation – Tandem Mass Spectrometry</i>
mAb	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
MeOH	Methanol
Mes	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MWCO	Molekulare Ausschlußgröße in Da ( <i>molecular weight cut off</i> )
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium; 2,2'-Di-p-nitrophenyl-5,5'-diphenyl-3,3'-[3,3'-Dimethoxy-4,4'-diphenylen]-ditetrazoliumchlorid
NHS	N-(Hydroxyl)-succinimid
P	Sediment ( <i>Pellet</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (physiologischer Phosphatpuffer)
PEMS	<i>Parasitophorous Vacuolar Membrane Enclosed Merozoite Structure</i> ; Extraerythrocytäre Segmenterstadien von <i>P. falciparum</i> ; die entwickelten Merozoiten befinden sich in einem Verband, der durch die

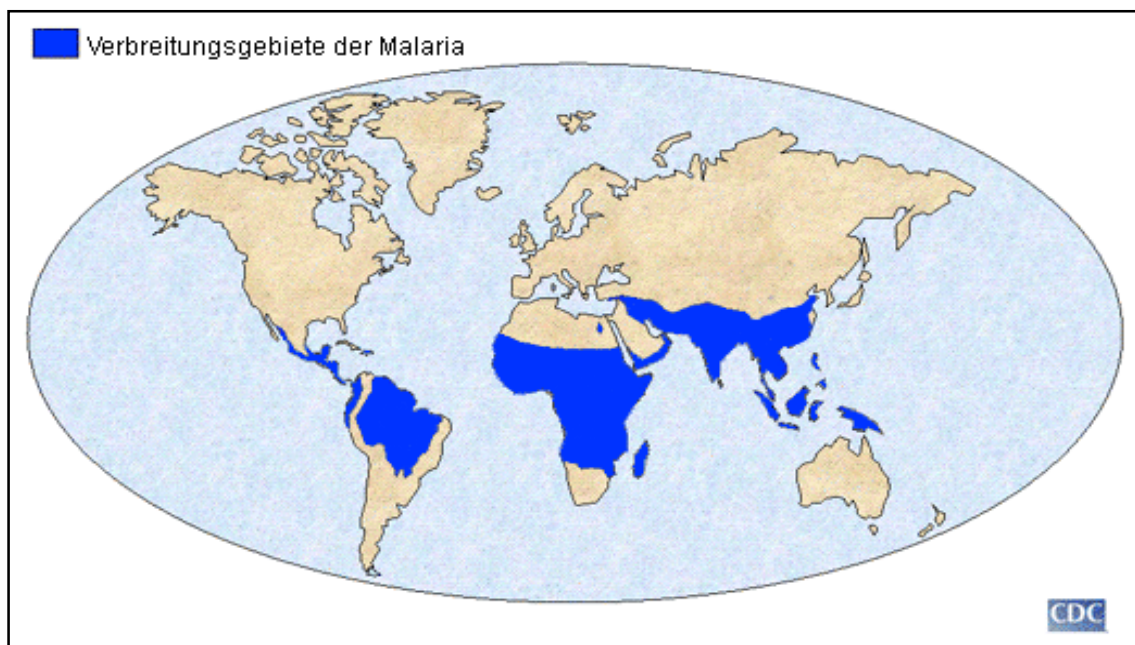
PVM umgeben ist. Erythrocytäre Membranen sind nicht vorhanden (Salmon *et al.*, 2001).

PIC	<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMF	<i>Peptide mass fingerprint</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVM	parasitophore Vakuolenmembran ( <i>parasitophorous vacuolar membrane</i> )
Rab	Kaninchen ( <i>rabbit</i> )
RBC	Erythrocyt(en) ( <i>red blood cell(s)</i> )
red	reduzierende Bedingungen
rpm	Umdrehungen in der Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulphate</i> )
SNT	Überstand ( <i>supernatant</i> )
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-Puffer mit Kochsalz, physiologische Osmolarität)
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TEMED	N,N-N.N-Tetramethylethyldiamid
Tricin	N-(2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
Triton X-100	Polyoxyethylen-(10)-isooctylphenylether
Triton X-114	Polyoxyethylen-(8)-isooctylphenylether
TTBS	TBS mit 0,05 %(v/v) Tween 20
Tween 20	Polyoxyethylene(20)-Sorbitan-Monolaurate
TVN	tubovesikuläres Netzwerk ( <i>tubovesicular network</i> )
β-MSH	β-Mercaptoethanol

## 1. Einleitung

### 1.1 Malaria und der Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

Bereits aus dem alten Ägypten liegen Berichte über Epidemien einer Krankheit vor, die noch in der heutigen Zeit unter dem Namen Malaria (*ital.*: mal'aria = „schlechte Luft“) unzählige Tote fordert. Sie ist die durch Krankheiten bedingte Haupttodesursache in den Tropen und Subtropen. Im Jahr 1880 gelang es dem damaligen Militärarzt Alphonse Laveran erstmals, den für die Krankheit verantwortlichen Erreger im Blutaussstrich eines erkrankten Soldaten zu beschreiben. Seither wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, um die Biologie des Blutparasiten besser verstehen und die Krankheit bekämpfen zu können. Doch auch nach all diesen Studien ist die Krankheit noch immer aktuell. Vor allem im tropischen Afrika, Südostasien sowie Südamerika ist der Erreger stark verbreitet, so dass beinahe die Hälfte der Weltbevölkerung von ihm bedroht ist (Abb. 1). In den betroffenen Gebieten erkranken jährlich etwa 500 Millionen Menschen mit etwa 2 Millionen Toten. Überwiegend sind Kinder bis zu 5 Jahren betroffen (WHO: World Malaria Report 2005).



**Abb. 1: Geographie von Gebieten mit hohem Malariarisiko**

Von der Malariaverbreitung sind hauptsächlich tropische und subtropische Regionen betroffen. Die in diesen Gegenden herrschende Luftfeuchtigkeit und Temperatur ist optimal für das Wachstum der die Malaria übertragende Anophelesmücke.

Die höchste Transmissionshäufigkeit findet man in Afrika, südlich der Sahara. (verändert nach: WHO: World Malaria Report 2005)

Die Bekämpfung der Malaria entpuppt sich in den betroffenen Regionen aus mehreren Gründen als sehr schwierig. Einerseits zählen diese Länder zu den ökonomisch schwächsten Regionen der Erde, was eine medizinische Unterversorgung mit sich bringt. Andererseits erschwert die zunehmende Ausbildung von Resistenzen des Erregers gegen die etablierten Chemotherapeutika effektive Maßnahmen gegen die Krankheit.

Die *Malaria tropica* ist die schwerste Form der Krankheit und weist die höchste Mortalitätsrate auf. Die durch die erythrocytären Stadien hervorgerufenen Symptome sind zunächst grippeartig, mit lang anhaltendem Fieber. Typisch ist die hohe Parasitämie, die im Krankheitsverlauf eine ausgeprägte hämolytische Anämie hervorrufen kann. Durch die zahlreichen hierbei entstehenden Zelltrümmer schwillt die Milz an, und es folgen die genannten, starken Fieberschübe (Miller *et al.*, 2002). Neben diesen Symptomen tritt häufig die zerebrale Malaria auf, welches auf eine Verstopfung der feinen Blutkapillaren im Gehirn zurückzuführen ist (Mackintosh *et al.*, 2004).

Außer der *Malaria tropica* treten beim Menschen noch drei weitere Verläufe der Krankheit in Erscheinung, die jedoch eine weniger schwere Pathologie aufweisen (Tab. 1). Die verschiedenen Malariaerkrankungen werden durch obligate, z.T. unterschiedliche Arten von Endoparasiten der Gattung *Plasmodium* verursacht (Tab. 1). Hierbei handelt es sich um protistische Haplonten, die sich im Blut durch Schizogonie vermehren.

<b>Erreger</b>	<b>Form der Malaria</b>	<b>Teilungsdauer/Fieberschübe</b>
<i>Plasmodium falciparum</i>	Malaria tropica	Unregelmäßig
<i>Plasmodium vivax</i>	Malaria tertiana	48 Stunden
<i>Plasmodium ovale</i>	Malaria tertiana	48 Stunden
<i>Plasmodium malariae</i>	Malaria quartana	72 Stunden

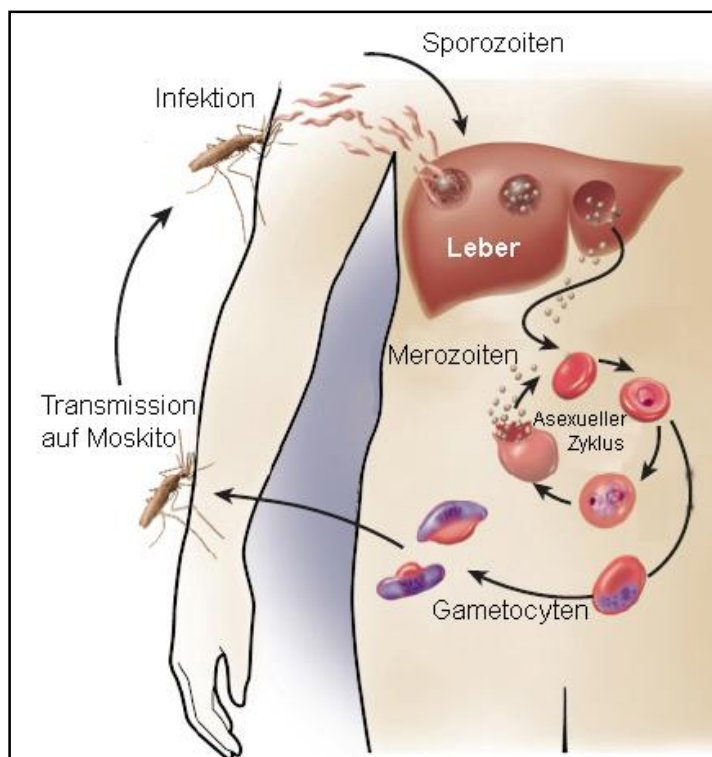
**Tab. 1: Humanpathogene Plasmodienspecies und deren Krankheitsverläufe (verändert nach Melhorn und Piekarski, 1998)**

Die *Plasmodien* gehören zum Stamm der Apicomplexa, dem unter anderen auch die Pathogene *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* oder *Babesia* zugeordnet sind.

Parasiten der Gattung *Plasmodium* entwickeln sich in einem komplizierten Lebenszyklus, der sich durch Wirts- und Generationswechsel auszeichnet (Abb. 2).

Durch den Stich einer weiblichen Mücke der Gattung *Anopheles* gelangen Sporozoiten aus deren Speicheldrüse in die Blutbahn des Menschen. Über den Blutstrom erreichen sie nach kurzer Zeit die Leber und befallen die Hepatozyten. Während dieser Phase bilden *Plasmodium falciparum* und *P. malariae* durch asexuelle Vermehrung tausende von infektiösen Merozoiten. Pathologische Symptome bleiben jedoch aus. Im Falle von *Plasmodium vivax* und *P. ovale* können in der Leberphase Dauerformen (Hypnozyten)

gebildet werden, die mitunter erst nach 2 Jahren Merozoiten bilden (Krotoski, 1989; Cogswell, 1992). Durch die Lyse der Wirtszellen werden die Merozoiten in die Blutbahn freigesetzt und invadieren dort Erythrocyten (*red blood cells*, RBC). Mit der Infektion der roten Blutzellen beginnt der intraerythrocytäre Zyklus. Innerhalb von 48 Stunden differenziert sich der Merozoit und durchläuft unterschiedliche, lichtmikroskopisch gut nachvollziehbare, Stadien.



**Abb. 2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* (verändert nach Miller *et al.*, 2002)**

Während der ersten 26 Stunden entwickelt sich der junge Trophozoit. Er wird wegen seiner Erscheinungsform im Giemsa-gefärbten Blutaussstrich auch als Ringform bezeichnet. In den kommenden 12 Stunden erfolgt die Reifung zum murenen Trophozoiten bzw. Schizonten, sodass 38 Stunden nach der Infektion bereits mehrere Kerne vorhanden sind. Der Schizont entwickelt sich nun weiter zum sogenannten Segmenter, der nach ca. 48 Stunden bis zu 20 neu gebildete Merozoiten erkennen lässt, die in die Blutbahn gelangen. Diese Merozoiten befallen anschließend erneut rote Blutzellen. Einige Schizonten differenzieren auch zu Gametocyten, welche beim nächsten Stich einer Anophelesmücke in deren Darm gelangen und sich dort zu Mikro- (männlich) und Makrogameten (weiblich) entwickeln (Bruce *et al.*, 1990). Durch die Verschmelzung der Gameten zur Zygote entstehen Ookineten, welche die Darmwand der Mücke durchdringen und anschließend Oocysten ausbilden können. In diesen Oocysten bilden sich Sporozoiten, die über die Hämolymphe in die Speicheldrüse

gelangen und beim nächsten Stich auf einen Menschen übertragen werden können (Bannister *et al.*, 2003).

### 1.1.1 Therapie- und Vakzinierungsstrategien gegen Malaria

Schenkte man einigen, um die Mitte des letzten Jahrhunderts erschienen Publikationen Glauben, so schien die Malaria weitestgehend unter Kontrolle. Zahlreiche chemotherapeutische Maßnahmen sowie der gezielte Einsatz des Insektizids *Dichlorodiphenyltrichlorethan* (DTT) führten tatsächlich zu einem Rückgang der Krankheit. Eines der besten Beispiele für diesen Optimismus spiegelt der Titel eines 1955 herausgegebenen Buches wieder: *Man's Mastery of Malaria* (P. F. Russell, New York: Oxford University Press, 1955).

Der damals vorherrschende Optimismus wurde rasch von der Realität eingeholt. Sowohl der Erreger *Plasmodium falciparum* als auch der Vektor *Anopheles gambiae* entwickelten Resistenzen gegen die eingesetzten antiplasmodialen Chemotherapeutika bzw. im Falle von *A. gambiae* gegen Insektizide (Greenwood und Mutabingwa, 2002). Die Zunahme von Migrations- und Flüchtlingsbewegungen sowie des weltweiten Tourismus führten ihrerseits zu einer weiteren Verbreitung der Krankheit (Moorthy *et al.*, 2004).

Derzeit werden abermals große Anstrengungen unternommen, um die Malaria in den Griff zu bekommen. So haben sich etwa die Vereinten Nationen zum Ziel gesetzt, bis Ende 2007 insektizidbehandelte Mückennetze an alle Kinder in den Malaria-endemischen Gebieten ausgeteilt zu haben. Neben derartigen Projekten gab es in den letzten Jahren einige vielversprechende Ansätze zur Entwicklung neuer Malariatherapeutika und -vakzine (Matuschewski, 2006).

Vielversprechende Ansätze sind die Impfung mit lebenden, aber nicht infektiösen Sporozoiten oder aber die Immunisierung mit Fragmenten oder ganzen *Plasmodium falciparum* Proteinen mit Hilfe von genetisch modifizierten Viren (Matuschewski, 2006; Zuckerman, 2006). Mehrere, die letztere Strategie verfolgende Vakzinentwicklungen befinden sich zurzeit in verschiedenen Phasen der klinischen Erprobung (Stoute *et al.*, 1997; Alonso *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2005; Smith und Milligan, 2005; Snounou *et al.*, 2005). Mit Hilfe spezieller Screening-Verfahren auf Ebene von Proteom- bzw. Microarraydaten werden derzeit Kandidatenproteine gesucht (Davies *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Sundaresh *et al.*, 2006).

Insbesondere die zahlreichen *merozoite surface proteins* (MSP), sowie die Proteine der apikalen sekretorischen Vesikel (Siddiqui *et al.*, 1986; Siddiqui *et al.*, 1987) drängen sich als Zielstrukturen für die Vakzinentwicklung auf, da die Merozoiten direkt dem menschlichen

Immunsystem zugänglich sind. Die am weitesten fortgeschrittene Studie befindet sich zurzeit in der präklinischen Entwicklungsphase. Sie beschäftigt sich mit dem Vakzinierungspotential von rekombinant exprimierten MSP-1-Fragmenten (Stoute *et al.*, 2007; Woehlbier *et al.*, 2006). Bei der natürlich entwickelten Resistenz afrikanischer Erwachsener wurden Antikörper gegen MSP-3 nachgewiesen. Eine diesbezüglich vielversprechende Studie befindet sich zurzeit in Phase I (Druilhe *et al.*, 2005).

Solange keine wirksamen Malariavakzine vorhanden sind, bleibt die Behandlung der Krankheitssymptome mit Hilfe von Chemotherapeutika die Methode der Wahl. Problematisch ist allerdings die rasche Verbreitung teilweise multiresistenter Plasmodienstämme, sowohl in Afrika als auch in Südostasien (Trape, 2001; Greenwood und Mutabingwa, 2002). Einzig gegen die Klasse der Artemisinin- basierten Medikamente wurden bislang noch keine resistenten Stämme entdeckt. In Asien durchgeführte Studien haben gezeigt, dass Kombinationstherapien von Artemisinen mit anderen Substanzen besonders erfolversprechend sind (Nosten *et al.*, 2000; Sachs, 2005).

Die den Parasiten während des gesamten intraerythrocytären Entwicklungszyklus umgebende parasitophore Vakuolenmembran (PVM) bildet die Schnittstelle zwischen diesem und der Wirtszelle. Alle Protein- oder Nährstofftransportvorgänge müssen diese PVM-Barriere überwinden. Die hieran beteiligten, bisher jedoch gänzlich unbekanntenen Mechanismen, stellen potentielle Ziele für Chemotherapeutika dar (Saliba und Kirk, 2001; Staines *et al.*, 2007).

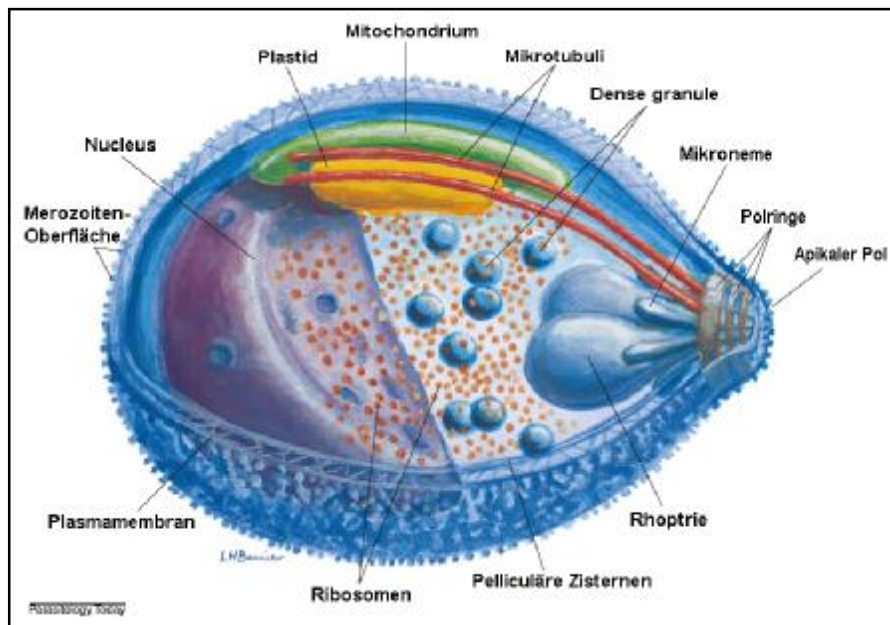
## 1.2 Ultrastruktur der Merozoiten

Merozoiten sind, je nach Species, etwa 1,5 bis 2,5  $\mu\text{m}$  lange Zellen, die während der Schizogonie sowohl in infizierten Hepatocyten als auch in infizierten Erythrocyten gebildet werden. Verschiedene Untersuchungen lassen darauf schließen, dass sich die in den unterschiedlichen Gewebetypen gebildeten Zellen sowohl strukturell als auch funktionell ähneln (Szarfmann *et al.*, 1988a, Szarfmann *et al.*, 1988b; Preiser *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004).

Auf mikroskopischer Ebene erkennt man typische Merkmale eukaryotischer Zellen, wie Nukleus, Ribosomen oder Mitochondrium (Bannister *et al.*, 2000). Zusätzlich sind noch besondere Strukturen auffällig (Abb. 3).

Der sogenannte „Apicoplast“ ähnelt pflanzlichen Plastiden und ist vermutlich ein Resultat einer sekundären Endosymbiose eines Vorläufers der Apicomplexa und einer Rotalge (Fast *et al.*, 2001; Williamson *et al.*, 2002; Waller und McFadden, 2005; van Dooren *et al.*, 2005). Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass der Apicoplast eine zusammenhängende

Struktur mit dem Mitochondrium des Merozoiten bildet (Kobayashi *et al.* 2006). Sowohl der Apicoplast, als auch das Mitochondrium weisen ein sehr reduziertes Genom auf und sind darauf angewiesen, dass Proteine aus dem Cytosol in das entsprechende Organell transferiert werden (Vaidya und Mather, 2005; Ralph *et al.*, 2004).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der subzellulären Organisation eines Merozoiten von *Plasmodium falciparum* (verändert nach Bannister *et al.*, 2000)**

Unter der Plasmamembran der Merozoiten wurde eine flache, zisternenähnliche Doppelmembranstruktur beschrieben, deren Funktion jedoch unbekannt ist. Diese ist über Filamente mit der Plasmamembran verbunden und wird als Pellicula oder *Inner-membrane Complex* (IMC) bezeichnet (Abb. 3) (Bannister *et al.*, 2000).

Die Oberfläche der Merozoiten erscheint in der Elektronenmikroskopie rau (Abb. 3). Dies ist auf eine aus Proteinbündeln gebildete Hülle zurückzuführen, die vermutlich für das Erkennen und Binden von Erythrocyten benötigt wird (Langreth *et al.*, 1978, Bannister *et al.*, 1986b; Galinski und Barnwell, 1996). Mittlerweile sind zahlreiche Proteine bekannt, die Bestandteil dieses Mantels sind. MSP-1 (*merozoite surface protein 1*) ist dabei das wohl am besten Beschriebene (Cowman und Crabb, 2006).

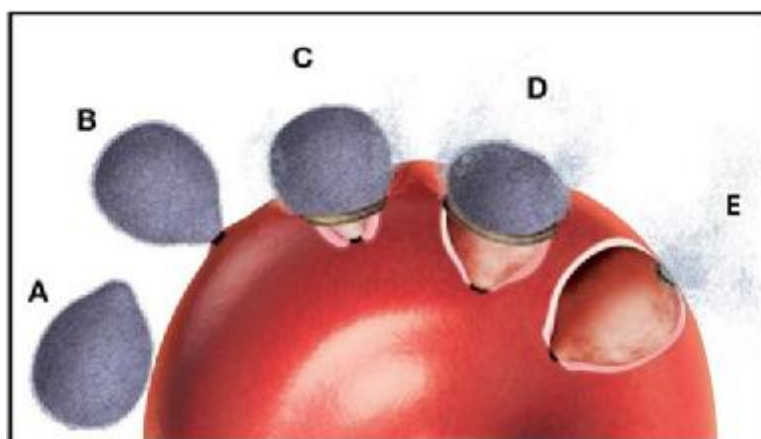
Die morphologisch auffälligsten Strukturen, und damit auch Namensgeber des Phylums der Apicomplexa, sind am apikalen Pol der Merozoiten zu finden, also der Stelle, die bei der Invasion der Wirtszelle zugewandt ist. Hier befindet sich der sogenannte Apikalkomplex. Er wird aus speziellen sekretorischen Organellen mit jeweils einer Einzelmembran wie den Rhoptrien, Micronemen und den mehr im Cytoplasma verteilten *Dense Granules* gebildet (Abb. 3). Sowohl Rhoptrien als auch Mikronemen verfügen über einen an die Oberfläche des



Merozoiten mündenen Ausgangskanal. Über diesen Kanal wird während der Invasion der Inhalt der Organellen in den Spalt zwischen dem invadierenden Merozoiten der naszierenden parasitophoren Vakuole sezerniert (Bannister *et al.*, 1986a; Sam-Yellowe *et al.*, 1988; Bannister und Mitchell, 1989). Die *Dense Granules* verfügen über keine solche Verbindung an die Zelloberfläche. Um ihren Inhalt abzugeben, fusioniert ihre Membran mit der Plasmamembran des Merozoiten (Bannister *et al.*, 1975; Bannister und Mitchell, 1989; Torii *et al.*, 1989). Die Inhaltsstoffe dieser drei sekretorischen Organellen werden vermutlich benötigt, um in der Wirtszelle das für das Wachstum des Parasiten benötigte Milieu zu schaffen. Hierzu zählen im Besonderen die parasitophore Vakuole sowie die sie umgebende Membran (Cowman und Crabb, 2006).

### 1.2.1 Invasion von Erythrocyten

Durch die Degradation der erythrocytären Plasmamembran, sowie der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) werden die Merozoiten in die Blutbahn entlassen. Dieser Prozess der Freisetzung wird vermutlich durch eine Kaskade proteolytischer Ereignisse kontrolliert (Salmon *et al.*, 2001; Wickham *et al.*, 2003), und geht mit einer Veränderung der Lipidzusammensetzung der PVM einher (Palacpac *et al.*, 2004). Die genauen Abläufe der Merozoiten-Freisetzung sind noch recht wenig bekannt und werden derzeit heiss diskutiert. Da die Merozoiten nun der körpereigenen Immunabwehr ausgeliefert sind, müssen sie rasch in neue RBC eindringen. Dieser komplexe Vorgang dauert etwa 20 Sekunden und umfasst folgende Schritte: 1) Anlagerung an die Erythrocytenmembran, 2) Orientierung des apikalen Pols in Richtung Erythrocyt und Ausbildung von *moving junctions*, 3) Eindringen in den Erythrocyten und Ausformung der parasitophoren Vakuole (Abb. 4) (Pasvol, 2003).



**Abb. 4: Invasion von Merozoiten**

A) Anlagerung des Merozoiten an die RBC-Oberfläche; B) Orientierung des apikalen Pols zur RBC und Bildung der *moving junction*; C-E) Eindringen des Merozoiten und Bildung der parasitophoren Vakuole. (verändert nach Cowman und Crabb, 2006)

### 1.2.1.1 Anlagerung an die Erythrocytenmembran

Nach der Freisetzung kann der Kontakt zu Erythrocyten an jeder beliebigen Stelle der Merozoitenoberfläche geschehen (Abb. 4). An diesem initialen Kontakt sind vermutlich einige der zehn bisher beschriebenen *merozoite surface proteins* (MSP 1-10) beteiligt. Ein Hinweis hierfür ist, dass der Einsatz von Antikörpern gegen MSP's die Anlagerung verhindern kann (Cowman und Crabb, 2002).

Zusätzlich weisen einige MSPs EGF-ähnliche Domänen auf, die als Bindestellen für Proteine der Erythrocytenoberfläche wie etwa Bande 3 fungieren (Kushwaha *et al.*, 2002; Goel *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Kariuki *et al.*, 2005).

### 1.2.1.2 Reorientierung des apikalen Pols in Richtung Erythrocyt und Ausbildung von *tight junctions*

Sofern sich der Merozoit noch nicht in der für die Invasion korrekten Position befindet, folgt nun die Reorientierung. Das bedeutet, dass sich der apikale Pol mit seinen sekretorischen Organellen zur Plasmamembran des Erythrocyten hin ausrichtet (Abb. 4 A-B). Dieser Mechanismus wird durch ein Actin-Myosin-System reguliert (Opitz und Soldati, 2002; Morrissette und Sibley, 2002).

Als nächstes erfolgt die Sezernierung des Proteininhalts der Mikronemen, unter denen sich Vertreter der erythrocyte binding like (EBL) bzw. duffy-binding-like (DBL)-Superfamilie (EBA-140, EBA-165, EBA-175, EBA-181, EBL-1), der reticulocyte binding like (RBL)-Familie (NBP-1, -2a/b, -4) sowie AMA-1 befinden. Die EBL/DBL-Proteine binden unter anderem Glycophorin A und C sowie vermutlich noch andere Proteine der Erythrocytenmembran, wodurch die Bildung von moving junctions vermittelt wird (Adams *et al.*, 2001; Mayer *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002; Duraisingh *et al.*, 2003; Gilberger *et al.*, 2003; Maier *et al.*, 2003). Die Funktionen der RBL-Proteine sind weitgehend unbekannt, könnten jedoch denen der ebl/dbl-Proteine ähneln (Triglia *et al.*, 2005).

Auch AMA-1 gehört zu den in dieser Phase abgegebenen Proteinen. Es ist in den Mikronemen lokalisiert (Healer *et al.*, 2002; Bannister *et al.*, 2003) und die Invasion der Merozoiten kann durch Antikörper gegen dieses Protein inhibiert werden (Dutta *et al.*, 2003; Healer *et al.*, 2004). Auf welche Weise AMA-1 in *P. falciparum* mit Erythrozyten- oder Merozoitenproteinen interagiert, ist ungeklärt. Untersuchungen in *P. knowlesi* Merozoiten lassen vermuten, dass AMA-1 an der Bildung der *moving junctions* beteiligt ist (Mitchell *et al.*, 2004). Die Expression von AMA-1 wurde auch in Sporozoiten nachgewiesen und legt

somit nahe, dass das Protein auch an der Invasion von Hepatocytten beteiligt ist (Silvie *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004).

### 1.2.1.3 Invasion der Merozoiten und Bildung der parasitophoren Vakuole

Die Invasion der Merozoiten muss allein durch dessen Proteine reguliert werden, da Erythrocyten nicht zur Endocytose fähig sind. Die Invasion beginnt am apikalen Pol, von wo aus sich die dort gebildeten Zell-Zell-Kontakte in Form einer *moving junction* (siehe 1.2.1.4) über deren Oberfläche zu bewegen beginnen (Abb. 5) (Aikawa *et al.*, 1978). Hierdurch wird die Oberfläche des Erythrocyten ins Zellinnere gewölbt, und die parasitophore Vakuole (PV) entsteht (Abb. 4 B-E).

Die Internalisierung ist von einem Actin-Myosin System abhängig, da Merozoiten, die mit Cytochalasin behandelt wurden, zwar noch an RBC binden, jedoch nicht mehr eindringen können (Miller *et al.*, 1979; Field *et al.*, 1993). Zusätzlich wurde *PfMyo-1* (*P. falciparum* Myosin-1) im Cortex der Merozoiten nachgewiesen und seine Funktion mit dem Myosin-ATPase-Inhibitor BDM blockiert (Pinder *et al.*, 1998; Opitz und Soldati, 2002).

Während der Invasion wird der Protein- und Lipidinhalt der Rhoptrien in den entstehenden Spalt sezerniert (Bannister *et al.*, 1986a; Sam-Yellowe *et al.*, 1988; Bannister und Mitchell 1989). Einige dieser Proteine sind bereits zum Teil charakterisiert, so etwa ein Mitglied der *rbf*-Familie. Dieses 240 kDa, nach Prozessierung 225 kDa, große Protein *PfNBP*, lokalisiert am Ausführungsgang der Rhoptrien (Roger *et al.*, 1988) und ist durch Bindung eines unbekanntes, trypsinresistenten Rezeptors an der Invasion beteiligt (Rayner *et al.*, 2001; Rayner *et al.*, 2005).

Auch der als RhopH bezeichnete Proteinkomplex ist rhoptrienlokalisiert und besteht aus mindestens drei Untereinheiten: RhopH-1, RhopH-2 sowie RhopH-3 (Holder *et al.*, 1985; Cooper *et al.*, 1988). Für RhopH-1 wurde gezeigt, dass es zur *cytoadherence-linked asexual gene*-Familie (*clag*) gehört. Deren Namensgeber *clag9* ist ebenfalls an der Bindung von Erythrocyten beteiligt (Holt *et al.*, 1999) und im basalen Teil der Rhoptrien lokalisiert (Gardiner *et al.*, 2004). In Präzipitationen mit *clag9*-spezifischen Antikörpern wurde RhopH copräzipitiert, während *clag9* in einem mit RhopH-2 spezifischen Antikörper-präzipitierten Komplex identifiziert wurde. Dies weist darauf hin, dass der RhopH-Komplex aus weiteren *clag*-Komponenten konstituiert wird (Ling *et al.*, 2004). Für einige RhopH-Komponenten wurde gezeigt, dass sie *in vitro* mit Lipiden der RBC-Membran interagieren (Sam-Yellowe und Perkins, 1991). RhopH ist kurz nach der Invasion an der Plasmamembran des Parasiten sowie an der neu gebildeten PVM nachweisbar (Sam-Yellowe *et al.*, 1988; Ling *et al.*, 2003).

Ein weiterer Proteinkomplex besteht aus den Proteinen RAP-1, RAP-2 und RAP-3 (Ridley *et al.*, 1990; Howard und Reese, 1990). Die für die drei Proteine codierenden Gene weisen keine Transmembran- oder anderen auffälligen Motive auf und es gibt keine Hinweise darauf, wie sie interagieren können. Durch Disruption des *rap-1* Gens ist es jedoch möglich, den Transport von RAP-2 in die Rhoptrien zu blockieren (Ridley *et al.*, 1990; Baldi *et al.*, 2000; Baldi *et al.*, 2002), während die Merozoiten invasiv bleiben. Mit Hilfe von RAP-1 spezifischen Antikörpern wurde die Invasion inhibiert. Hieraus war zu schließen, dass RAP-1 selbst nicht essentiell für die Invasion ist, die Bindung von Antikörpern jedoch eine sterische Barriere darstellt (Baldi *et al.*, 2000; Cowman *et al.*, 2000). Eventuell ist der RAP-Komplex an der Modifizierung der Plasmodien-Plasmamembran oder dem Aufbau der PVM beteiligt. Diese Thesen werden durch die Beobachtung gestützt, dass der Komplex in den Rhoptrien mit membranähnlichen Strukturen assoziiert vorliegt, bei denen man davon ausgeht, dass sie ebenfalls sezerniert werden, um dann mit der Plasmamembran oder der PVM zu fusionieren (Bannister *et al.*, 1986a; Bannister und Mitchell, 1989).

Weitere aus den Rhoptrien sezernierte Proteine sind: RAMA (*rhoptry-associated membrane antigen*), das in seiner Pro-Form über einen GPI-Anker an der Innenseite der Rhoptrien assoziiert, proteolytisch prozessiert wird, und nach der Sezernierung an der RBC-Membran nachgewiesen werden kann (Smythe *et al.*, 1988; Topolska *et al.*, 2004). Desweiteren sind eine Serin-Proteinase (Braun-Breton und Pereira da Silva, 1988), ein 52 kDa großes, nicht weiter charakterisiertes Protein (Storey, 1992), sowie das asparaginreiche PfRhop148 (Lobo *et al.*, 2003) in der Literatur beschrieben. Hiller und Kollegen haben außerdem ein Oligomere bildendes Stomatin-Ortholog charakterisiert, welches nach der Invasion in die PVM inseriert wird (Hiller *et al.*, 2003).

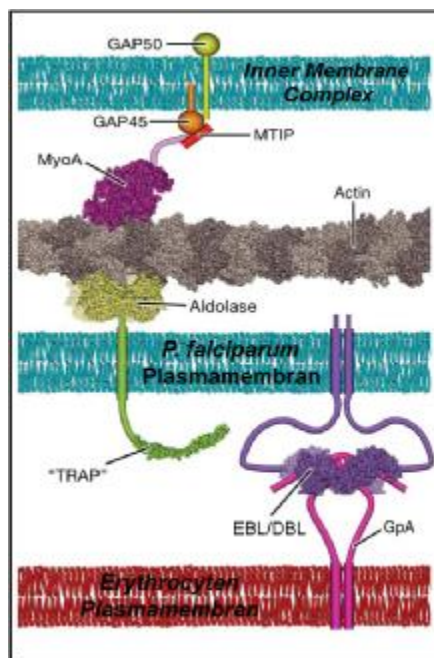
Es wurde gezeigt, dass Rhoptrien neben Proteinen auch Lipide sezernieren, die als lamellare Strukturen in Erscheinung treten. Vermutlich werden diese in die Membran der sich bildenden parasitophoren Vakuole (PV) integriert. Dies führt zu einer raschen Volumenzunahme der PV und zur Umwandlung der ehemaligen Plasmamembran des Erythrocyten zur parasitophoren Vakuolenmembran (PVM, siehe 1.3) (Bannister *et al.*, 1975; Aikawa *et al.*, 1978; Aikawa und Miller, 1983; Bannister *et al.*, 1986a; Bannister und Mitchell, 1989).

### 1.2.1.4 Bildung der *moving junctions*

Sobald der Merozoit mit seinem apikalen Pol zur RBC-Membran ausgerichtet ist, bilden sich dort stabile Zell-Zell-Kontakte (*moving junctions*) aus (Abb. 5). Einige der dort lokalisierten Proteine wurden identifiziert und beschrieben. Unter anderen Myosin-A (Myo-A) sowie ein

Myo-A *tail interacting protein* (MTIP) (Bergmann *et al.*, 2003). MTIP ist vermutlich über *gliding-associated proteins* (GAP50/GAP45) mit dem *Inner-membrane complex* verbunden (Abb. 5) (Morrisette und Sibley 2002; Gaskins *et al.*, 2004).

Der Myo-A Kopf ist an Actinfilamente angelagert, die zwischen der Merozoiten-Plasmamembran und dem IMC lokalisiert sind (Abb. 5) (Field *et al.*, 1993). Als weiterer F-Actin-Interaktionspartner wurde das Enzym Aldolase beschrieben. Es fungiert vermutlich als Brücke zwischen dem Actincytoskelett und dem cytoplasmatischen Teil eines plasmodialen Liganden für Erythrocyten-Oberflächenmoleküle (Abb. 5) (Jewett und Sibley, 2003; Baum *et al.*, 2006; Bosch *et al.*, 2007). Aufgrund der Resultate von Bindungsstudien könnte es sich um das von den Micronemen sezernierte Protein TRAP (*trombospondin related anonymous protein*) handeln, das allerdings nicht mit absoluter Sicherheit in Merozoiten nachgewiesen wurde (Abb. 5) (Buscaglia *et al.*, 2003; Bosch *et al.*, 2007). Neben TRAP wurden noch weitere Merozoitenproteine in die Diskussion gebracht, diese weisen allerdings keine Transmembrandomäne auf sondern sind über GPI-Anker in der Membran lokalisiert. Darunter etwa EBL, das *plasmodium thrombospondin related apical merozoite protein* (PTRAMP) sowie das *merozoite capping protein 1* (MCP-1) (Thompson *et al.*, 2001; Klotz *et al.*, 1989). MCP-1 war sowohl in der Immunfluoreszenz- als auch Elektronenmikroskopie in den *moving junctions* nachweisbar. Es weist einige strukturelle Besonderheiten auf, mit deren Hilfe das Protein und die oben erwähnten Aldolasemoleküle interagieren könnten (Hudson-Taylor *et al.*, 1995).



**Abb. 5: Modell des Motorkomplexes der *moving junctions* bei der Invasion von Merozoiten**  
 GAP: *gliding associated protein*; MTIP: *Myo-A tail interacting protein*; MyoA: Myosin-A; TRAP: *trombospondin related anonymous protein*; EBL/DBL: Protein der *erythrocyte binding like/duffy binding like* Familie; GpA: Glycophorin A (verändert nach Cowman und Crabb, 2006)

Neben den bereits Genannten diskutiert man auch einige, nicht von den Micronemen sezernierte, Proteine als potentielle Liganden für Proteine der Erythrocytenoberfläche. Darunter sind auch MSP-1 und MSP-8 zu finden, die durch ihre C-terminal liegenden EGF-ähnlichen Domänen mit erythrocytären Proteinen, wie Glycophorin- oder Bande 3-Moleküle, interagieren könnten (Goel *et al.*, 2003).

### 1.2.1.5 Sezernierung der *Dense Granule* Proteine und Abschluss der Invasion

Sobald sich der Merozoit vollends im Erythrocyten befindet, muss die neu gebildete parasitophore Vakuolenmembran (PVM) von der RBC-Plasmamembran separiert und beide Membranen zu zwei eigenständigen Strukturen geschlossen werden. Dies geschieht am posterioren Ende des Merozoiten (Aikawa *et al.*, 1978; Aikawa und Miller, 1983).

Wenn die Erythrocytenmembran und die PVM geschlossen sind, kann die Fusion der *dense granules* (DG) mit der Plasmamembran der Merozoiten und damit die Freisetzung der in den DG gespeicherten Proteine beobachtet werden (Bannister *et al.*, 1975; Bannister und Mitchell, 1989; Torii *et al.*, 1989).

Bei einem der DG-Proteine handelt es sich um RESA (*ring-infected erythrocyte membrane antigen*). Seine Funktion ist nicht bekannt. Nach seiner Sezernierung kolokalisiert es jedoch mit Elementen des Cytoskeletts an der Plasmamembran der RBC. Durch den Einsatz von anti-RESA Antikörpern wurde die Merozoiteninvasion inhibiert, was jedoch nicht mit der späten Entleerung der DG in diesem Prozess in Einklang zu bringen ist (Anders *et al.*, 1987; Aikawa *et al.*, 1981; Culvenor *et al.*, 1991). Außerdem wurde noch ein 14 kDa Protein, das in der Membran der frühen Trophozoiten lokalisiert bleibt (Trager *et al.*, 1992), sowie zwei Subtilisin-ähnliche Proteasen (SUB-1 und SUB-2) beschrieben. Bei SUB-2 handelt es sich um ein Typ-I Membranprotein, das als *Sheddase* für die proteolytische Prozessierung von AMA-1 und MSP-1 sowie eventuell anderen Proteinen benötigt wird (Withers-Martinez *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 2006).

## 1.3 Die parasitophore Vakuolenmembran und das tubovesikuläre Netzwerk

Die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) wird während der Invasion der Merozoiten durch Einstülpen der Plasmamembran des Erythrocyten gebildet. Sie umschließt den Parasiten während der gesamten intraerythrocytären Differenzierung und bildet somit die

Schnittstelle zwischen ihm und der Wirtszelle. Über die genaue Protein- und Lipidzusammensetzung sowie funktionelle Aufgaben der PVM ist bisher nur sehr wenig bekannt und bedarf daher einer ausführlicher Untersuchung.

Eine Theorie besagt, dass die Lipidzusammensetzung der PVM aufgrund ihrer Herkunft zunächst der Plasmamembran der Erythrocyten ähnelt. Mit fortschreitender Invasion soll sie nachhaltig durch Lipidkomponenten der Rhoptrien modifiziert werden (Bannister *et al.*, 1975; Aikawa *et al.*, 1978; Aikawa und Miller, 1983; Bannister *et al.*, 1986a; Bannister und Mitchell, 1989). Eine alternative Theorie geht davon aus, dass die PVM kaum verändert wird und nur etwa 20 % der Lipide parasitären Ursprungs sind (Ward *et al.*, 1993; Lingelbach und Joiner, 1998). Die genaue Zusammensetzung der Lipiddoppelmembran im Laufe der Entwicklung des Pathogens ist bis dato nicht geklärt.

Das Proteinrepertoire der PVM unterscheidet sich grundlegend von dem der RBC-Plasmamembran. Die meisten Proteine der Wirtszelle werden während der PVM-Bildung an der *moving junction* „abgestreift“, (Aikawa *et al.*, 1981; Atkinson *et al.*, 1988; Haldar und Uyetake, 1992; Dluzewski *et al.*, 1989; Dluzewski *et al.*, 1995). Der Großteil der bisher in der PVM lokalisierten Proteine ist plasmodialen Ursprungs. Mindestens 10 erythrocytäre Proteine, die normalerweise in der RBC-Plasmamembran lokalisiert sind, wurden jedoch während der Entwicklung des Parasiten in diesem Membransystem nachgewiesen (Lauer *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2004).

Im Laufe der Entwicklung des Parasiten dehnt sich die PVM immer mehr im Cytoplasma der Wirtszelle aus und bildet eine als tubovesikuläres Netzwerk (TVN) bezeichnete Struktur aus (Elmendorf und Haldar, 1994). Die hierfür benötigten Lipide entstammen vermutlich *detergent-resistant membrane Rafts* (DRM-Rafts), welche Mikrodomänen in der Plasmamembran der Erythrocyten und anderer Zellen bilden (Lauer *et al.*, 2000; Samuel *et al.*, 2001; Nagao *et al.*, 2002; Harrison *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2006a). Wegen ihres hohen Gehalts an Sphingomyelin und Cholesterol sind sie anscheinend am Aufbau und Erhalt des PVM-TVN Netzwerks beteiligt, da dieses vermutlich *DRM-Rafts* enthält (Brown und London., 1998; Friedrichson und Kurzchalia, 1998; Simons und Ikonen, 1997; Varma und Mayor, 1998). Auch die bereits weiter oben erwähnten Wirtsproteine werden vermutlich durch *Rafts* in die PVM integriert.

Neben dem eigentlichen Parasiten und des ihn umgebenden PVM-TVN Netzwerks wurden noch zwei weitere intraerythrocytäre Membranstrukturen beschrieben. Zum einen handelt es sich hierbei um flache Membranzisternen, die als *Maurer's clefts* (MC) bezeichnet werden. Bei dieser Struktur ist noch nicht geklärt, ob es sich um eine Ausstülpung der PVM handelt. Eine Alternative wäre die Bildung von Vesikeln. Diese könnten von der PVM abgeschnürt werden und erst nach deren erneuten Fusion als *Maurer's Clefts* in Erscheinung treten (Przyborski *et al.*, 2003; Wickert *et al.*, 2004; Przyborski *et al.*, 2005; Lanzer *et al.*, 2006).

Zum anderen handelt es sich um große Doppelmembranschleifen, die *circular clefts* genannt werden. Sie entspringen der PVM und erstrecken sich in das Cytoplasma neu-infizierter Erythrocyten (Atkinson und Aikawa, 1990; Langreth *et al.*, 1978).

*Maurer's clefts* sind in der Peripherie der Wirtszelle lokalisiert und ähneln strukturell als auch in ihrem Proteinrepertoire dem Golgiapparat von Säugerzellen (Elmendorf und Haldar, 1994; Li *et al.*, 1995; Blisnick *et al.*, 2000). Zahlreiche sekretorische Plasmodienproteine waren während ihres Transports ins Erythrocytocytoplasma transient in MCs nachweisbar (Hinterberg *et al.*, 1994; Waterkeyn *et al.*, 1999; Adisa *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2001; Wickham *et al.*, 2001; Haldar *et al.*, 2002). Vincensini und Kollegen gelang es in einer Proteomanalyse einer subzellulären Fraktion 78 plasmodiale Proteine zu identifizieren. Davon waren sieben bis zu dem Zeitpunkt als hypothetische Proteine annotierte Kandidaten in MC's lokalisiert: *PfJ13*, *PfJ23*, *PfE60*, *PfD80*, *PfJ323*, *PfA680*, *PfG174* sowie die bereits beschriebenen MC-Proteine *PfSBP1* und *PfPDI* (Vincensini *et al.*, 2005). Dieselbe Gruppe wies das Erythrocytenprotein LANCL1 in den Maurer's Clefts nach, das vermutlich mit *PfSBP1* interagiert und eine vorzeitige Ruptur der RBC-Membran verhindert (Blisnick *et al.*, 2005). *PfSBP1* ist unter anderem am Transport von *erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1)* an die RBC-Membran beteiligt (Maier *et al.*, 2007). Es wurde außerdem gezeigt, dass MCs häufig mit speziellen, an der Zytoadhärenz beteiligten, Proteinkomplexen (KNOBS) der Erythrocytenmembran interagieren (Waterkeyn *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 2001; Lanzer *et al.*, 2006).

Die der PVM entspringenden *Circular clefts* (CC) sind weit weniger gut untersucht als MC's. Die einzigen bis heute bekannten Proteine, die in dieser Struktur sowie der PVM lokalisieren, sind *exported protein 1* und *2 (EXP-1 und EXP-2)*: Fischer *et al.*, 1998; Günther *et al.*, 1991) sowie *ETRAPM 10.2* (Spielmann *et al.*, 2003).

### 1.3.1 Die PVM und der Stofftransport

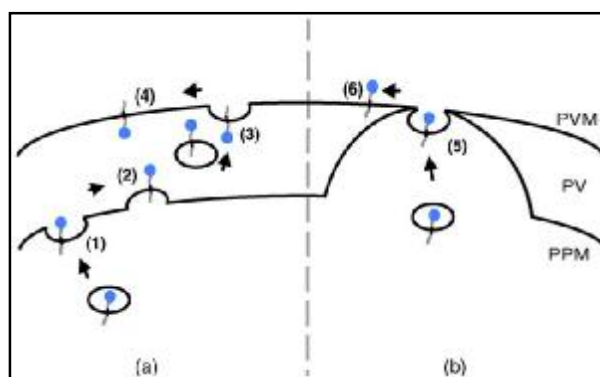
Da die parasitophore Vakuolenmembran den Parasiten vom Cytosol des Erythrocyten trennt, muss es Mechanismen geben, über die Nährstoffe durch diese Barriere transportiert werden können. Zunächst wurde das Vorhandensein eines sogenannten „parasitophoren Ducts“ postuliert, der den Parasiten direkt mit der Plasmamembran des Erythrocyten verbinden sollte (Pouvelle *et al.*, 1991). Diese Theorie wurde jedoch verworfen (Hibbs *et al.*, 1997; Kirk *et al.*, 2001).

Mit Hilfe des *Patch-clamp* Verfahrens formulierten Desai und Kollegen die Theorie einer Pore in der PVM, die nicht-selektiv Moleküle bis zu 14 kDa diffundieren lässt (Desai *et al.*, 1993). Um dieses Postulat zu stützen, führten Nyalwidhe *et al.* eine Untersuchung durch, bei der die RBC-Plasmamembran selektiv mit Streptolysin O permeabilisiert wurde, während die PVM



intakt blieb. Anschließend wurde Biotin zugegeben, um Proteine der parasitophoren Vakuole zu markieren. Dies sollte nur gelingen, wenn die postulierte Pore existierte. Bei der folgenden Analyse wurden tatsächlich biotinylierte PV-Proteine nachgewiesen (Anesorge *et al.*, 1996; Nyalwidhe *et al.*, 2002). Diese Untersuchung unterstützte die These der Existenz einer Pore in der PVM. Welche Proteine an deren Bildung beteiligt sind, ist bisher nicht bekannt.

Die PVM muss auch von zahlreichen, für den Export in die Wirtszelle bestimmten, Proteinen überquert werden. Eine von Marti und Kollegen auf Basis der PEXEL/VTS-Sequenzmotivs (*plasmodium export element/vacuolar targeting signal*) durchgeführte Studie geht von etwa 400 Plasmodienproteinen aus, welche die PVM überqueren müssen, um zu ihrem Ziel zu gelangen (Marti *et al.*, 2004; Nielsen und Krogh, 1998a). Zurzeit wird die Theorie des vesikelvermittelten Transports zur PVM auch durch praktische Studien unterstützt (Trelka *et al.*, 2000; Taraschi *et al.*, 2001).



**Abb. 6: Transport membranassoziierter Proteine über die PVM**

a) Vom ER/Trans-Golgi kommende Vesikel fusionieren zunächst mit der PM des Parasiten(1). Durch erneute Vesikelbildung(2) werden Proteine durch die PV transportiert und es kommt zur Fusion mit der PVM(3).  
 b) Alternativ könnten PM, PVM und der Transportvesikel direkt fusionieren(5). Wichtig ist, dass die Membrantopologie je nach Modell variiert(4 bzw. 6). (verändert nach Lingelbach und Przyborski, 2006)

Von Bedeutung ist noch die Frage, wie Membranproteine in die PVM integriert bzw. über sie hinaus transportiert werden. Aus Abbildung 6 wird ersichtlich, dass sich hierfür zwei Möglichkeiten bieten: a) Entweder werden Exportvesikel von der plasmodialen Plasmamembran (PPM) abgeschnürt, woraufhin diese anschließend wieder mit der PVM fusionieren, oder b) es kommt zu einer transienten Verschmelzung der PVM mit der PPM und dem Transportvesikel, wodurch die Integration in die PPM umgangen werden kann. Der essentielle Unterschied zwischen den beiden Modellen ist die unterschiedliche resultierende Membrantopologie sowohl in der PVM und den MCs als auch in der Plasmamembran des Erythrocyten (Lingelbach und Przyborski, 2006).

Der Transport löslicher Proteine ist ebenfalls noch nicht geklärt. Für lösliche MC Proteine ist entweder ein vesikelabhängiger Mechanismus denkbar oder der Transport per Diffusion,

wenn PVM und MCs ein kontinuierliches Netzwerk bilden (Wickert *et al.*, 2003; Wickert *et al.*, 2004; Lingelbach und Przyborski, 2006). Lösliche Proteine, deren Ziel das RBC-Cytosol ist, akkumulieren zunächst in der parasitophoren Vakuole und werden anschließend auf bisher unbekanntem Weg durch die PVM geschleust (Ansorge *et al.*, 1996; Wickham *et al.*, 2001). Eine Hypothese postuliert eine Pore oder sonstigen Transporter, der mit dem PEXEL/VTS-Motiv interagiert und die Proteine durch die PVM schleust (Nielsen und Krogh, 1998a; Marti *et al.*, 2004; Przyborski und Lanzer, 2004). Eine weitere Theorie geht zunächst von der Interaktion des PEXEL/VTS-Motivs mit Proteinen des ER/Golgi Komplexes aus, woraufhin der Transport über ein bisher unbekanntes „Translocon“ in der PVM führt (Horrocks und Muhia, 2005). Über die PVM-Proteine, die eine solche Pore oder Transporter bilden, ist bisher nichts bekannt.

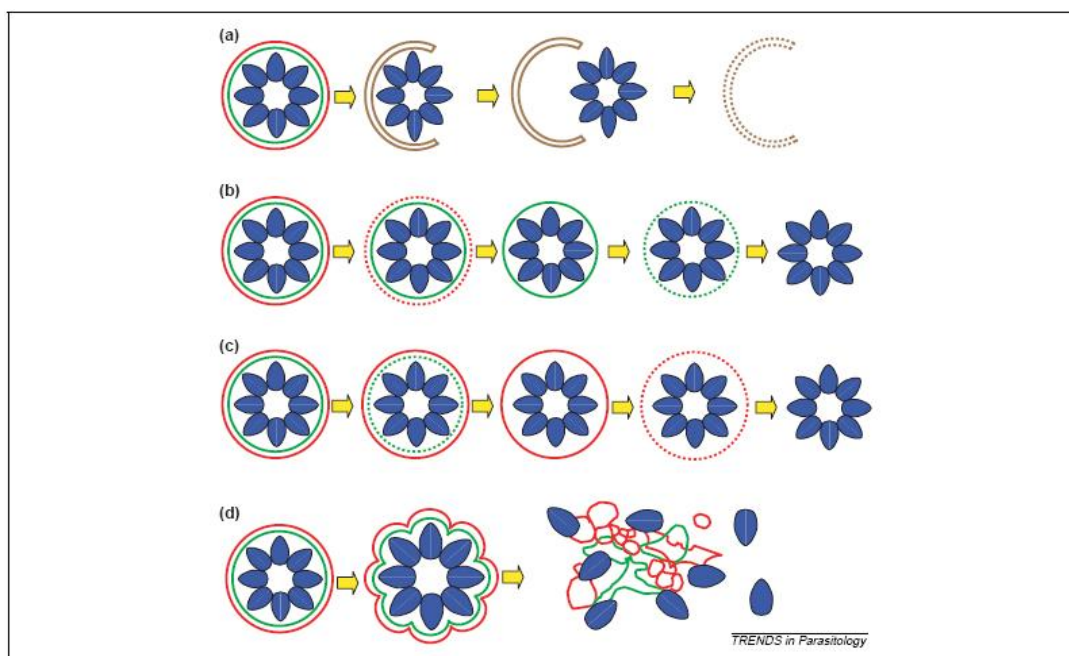
Murphy und Kollegen zeigten, dass von der erythrocytären Plasmamembran DRM-Rafts in das PVM/TVN-Netzwerk integriert werden. In diesen Rafts lokalisierte unter anderen das humane Protein Flotillin 1, das normalerweise an der Bildung von Caveolae beteiligt ist (Murphy *et al.*, 2004; Bauer und Pelkmans, 2006). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass an der PVM Vesikel gebildet werden, die an den bisher nur unzureichend untersuchten Transportvorgängen über die PVM beteiligt sein könnten.

### 1.3.2 Die PVM und die Evasion der Merozoiten

Nach dem Durchlaufen der intraerythrocytären Schizogonie müssen die Merozoiten aus der infizierten Zelle freigesetzt werden, um neue Erythrocyten infizieren zu können. Hierbei muss einerseits die Plasmamembran (PM) der Wirtszelle andererseits die PVM überwunden werden. Bisher ist dieser Mechanismus der Evasion nicht im Detail geklärt. Zurzeit werden drei unterschiedliche Theorien diskutiert: A) Verschmelzung von PVM und RBC-Membran; B/C) Sequentielle Degradation der RBC- bzw. der parasitophoren Vakuolenmembran in Abhängigkeit von Proteasen; D) Explosionsartige Freisetzung der Merozoiten aufgrund der Zunahme der Merozoitengröße sowie Änderungen des osmotischen Druckes.

Die Theorie der stufenweisen Merozoiten-Freisetzung basiert auf folgenden Untersuchungen: Salmon und Kollegen gelang es durch Behandlung maturer Schizonten mit E64, einem Cysteinprotease-Inhibitor, sogenannte *Parasitophorous Vacuole Membrane-Enclosed Merozoite Structures* (PEMS) nachzuweisen. In diesen Strukturen wird nur die PM des Erythrocyten lysiert, während die PVM intakt bleibt und die maturen Merozoiten beinhaltet (Salmon *et al.*, 2001). In weiteren Studien wurde demonstriert, dass die Lyse der Erythrocyten-PM offensichtlich durch Beteiligung von Serin- als auch Cysteinproteinasen vermittelt wird (Wickham *et al.*, 2003). Durch Einsatz entsprechender Inhibitoren wird die

Degradation der PVM aber nicht die Destabilisierung der Erythrocytenmembran gehemmt, was zur Bildung sogenannter *Red Blood Cell Membrane-Enclosed Merozoite Structures* (REMS) führt (Wickham *et al.*, 2003; Gelhaus *et al.*, 2005b). Bisher ist noch nicht geklärt, in welcher Reihenfolge die Membranen unter *in vivo* Bedingungen lysiert werden (Abb. 7 b+c).



**Abb. 7: Modelle zum Entlassen von *P. falciparum* Merozoiten aus ihren Wirtszellen**

a) Durch Fusion von RBC-Plasmamembran (rot) und PVM (grün) werden Merozoiten freigesetzt, während das erythrocytäre Cytosol eingeschlossen bleibt. Sequenzielle Degradation der die Merozoiten einschließenden Membranen: b) RBC-Membran zuerst, gefolgt von der PVM, c) oder umgekehrt. d) Anschwellen des infizierten Erythrocyten, gefolgt von der explosionsartigen Freisetzung der Merozoiten. (verändert nach Rayner 2006).

In früheren Untersuchungen war keine Freisetzung von Hämoglobin nachweisbar. Das deutet darauf hin, dass, wenn PVM und RBC-Membran miteinander fusionieren, alle Wirtszell-Proteine eingeschlossen werden (Abb. 7 A) (Clavijo *et al.*, 1998; Winograd *et al.*, 1999), oder alles Hämoglobin bis zur Evasion vom Parasiten für seinen eigenen Proteinstoffwechsel verbraucht ist (Krugliak *et al.*, 2002).

Glushakova und Kollegen gelang es, in ihren Untersuchungen einzelne Bilder sowie Zeitreihen von Evasionsereignissen aufzunehmen. Diese lassen auf eine explosionsartige Freisetzung der Merozoiten infolge von osmotischen Veränderungen in der Zelle schließen (Abb. 7 D) (Glushakova *et al.*, 2005).

Der tatsächlichen Mechanismus der Evasion sowie die daran beteiligten Proteine sind weitestgehend unerforscht

### 1.3.3 Das PVM/TVN-Netzwerk als Plattform für intrazelluläres *Signalling*

Zahlreiche intrazelluläre Vorgänge wie Signaltransduktion, Endocytose bzw. vesikuläre Transportprozesse aber auch die Lokalisation von Ionenkanälen und Enzymen in eukaryotischen Zellen sind mit DRM-Rafts assoziiert (Zajichowski und Robbins, 2002; Brown, 2006; Noble *et al.*, 2006). Bei diesen DRM-Rafts handelt es sich um Membranarrealie, die sich durch ihren besonders hohen Anteil an Cholesterol und Sphingomyelin auszeichnen. In dieser speziellen Umgebung aggregieren oftmals Proteine, die mit einem GPI-Anker versehen sind (Butikofer *et al.*, 2001; Shaw, 2006).

In jüngster Vergangenheit wurde nachgewiesen, dass DRM-Rafts sowie assoziierte Proteine von der Erythrocytenmembran in das PVM/TVN-Netzwerk integriert werden (Murphy *et al.*, 2004). Unter diesen Proteinen befinden sich unter anderem Flotillin 1 und 2 sowie Stomatin. Diese Proteine sind vermutlich an der Stabilisierung von DRM-Rafts sowie der Vesikelbildung beteiligt, die mitunter für Signaltransduktionsprozesse notwendig sind (Anderson und Jacobson, 2002; Helms und Zurzolo, 2004; Murphy *et al.*, 2004; Bauer und Pelkmans, 2006).

Zwei weitere erythrocytäre DRM-Proteine, die an der Invasion beteiligt sind, wurden in der PVM lokalisiert. Zum einen der  $\beta_2$ -Adrenerge-Rezeptor ( $\beta_2$ AR), zum anderen  $G_{\alpha_s}$ , die GTP-bindende Untereinheit eines G-Proteins (Lauer *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2006b). G-Protein gekoppelte Signaltransduktionsprozesse sind in anderen Zelltypen unter anderem an Prozessen der Reorganisation von Cytoskelettelementen beteiligt (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Callera *et al.*, 2007).

Zwei weitere plasmodiale Proteine, PfStomatin und RhopH2, wurden zunächst in den Rhoptrien der Merozoiten lokalisiert und später ebenfalls als DRM-Raft assoziiert beschrieben. Beide Proteine waren nach der Invasion in der PVM nachweisbar (Hiller *et al.*, 2003; Ling *et al.*, 2003).

Die genannten Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die parasitophore Vakuolenmembran und das tubovesikuläre Netzwerk maßgeblich an intraerythrocytären Signalprozessen beteiligt sind. Um diese bisher unbekanntenen Mechanismen besser verstehen und charakterisieren zu können, ist es notwendig, das Proteinrepertoire von PVM und TVN möglichst umfassend zu analysieren.

## 1.4 Proteomics

Schon seit geraumer Zeit gibt es Ansätze, verschiedene Plasmodienstämme oder die Auswirkung von Behandlung mit Chemotherapeutika auf Proteinebene mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese zu untersuchen (Pinswasdi *et al.*, 1987; Horgan *et al.*, 1992). Limitierend an diesen Untersuchungen war, dass nicht jedes Protein einfach zu identifizieren gewesen ist.

Mit der Veröffentlichung der Genomsequenzdaten von *Plasmodium falciparum* im Jahr 2002 war der Weg frei für umfassende Proteomanalysen (Gardner *et al.*, 2002). Sehr rasch folgten zwei Hochdurchsatzanalysen unterschiedlicher Entwicklungsstadien des Malariaerregers, mit deren Hilfe zahlreiche plasmodiale Proteine identifiziert, spezifischen Stadien zugeordnet und in funktionelle Gruppen einsortiert wurden. In beiden Fällen wurden die Peptide von trypsinisierten Proteinen mit Hilfe der Flüssigphasen-Chromatographie (LC) fraktioniert und anschließend per ESI-MS/MS (Elektrospray-Ionisations Tandem-Massenspektrometrie) analysiert (Florens *et al.*, 2002; Lasonder *et al.*, 2002). Diese Verfahren ermöglichen eine exakte Identifizierung auch seltener Proteine. Sie lassen jedoch per se keine quantitativen Aussagen zu (Washburn, 2004). Um quantitative Analysen durchführen zu können, müssen Proteine zunächst chemisch oder metabolisch modifiziert werden. Die chemische Markierung wie etwa das ICAT-Verfahren (*isotope-codes affinity tagging*) erfordert jedoch Cysteinreste, die im Proteom von *Plasmodium falciparum* selten vorkommen (Gygi *et al.*, 1999; Gygi *et al.*, 2002; Sims und Hyde, 2006). Diese Schwäche wurde mit der Einführung der an primären Aminen durchgeführten iTRAQ<sup>TM</sup>-Markierung behoben (DeSouza *et al.*, 2005). Die so genannte SILAC-Markierung (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) hat gegenüber ICAT und iTRAQ<sup>TM</sup> den Vorteil, dass bereits während der Kultur von *P. falciparum* Isotopen-markierte Aminosäuren als Nahrungsquelle verwendet werden können, so dass keine nachträgliche chemische Modifizierung erfolgen muss (Nirmalan *et al.*, 2004; Ong und Mann, 2006; Wu und Craig, 2006).

Weitere Studien folgten, in denen LC-ESI-MS/MS für die Proteinanalytik eingesetzt wurde. Sam-Yellowe und Kollegen reicherten Rhoptrien von *P. berghei*, *P. chabaudi* bzw. *P. yoelii yoelii* mittels Dichtegradientenzentrifugation an und identifizierten so insgesamt 148 Proteine, von denen 36 vermutlich in den Rhoptrien lokalisieren (Sam-Yellowe *et al.*, 2004a). Die gleiche Gruppe führte eine Koimmunopräzipitation gegen ein *Maurer's Clefts* Protein durch, woraufhin 10 neue, bis dahin als hypothetisch bezeichnete, Proteine identifiziert wurden, die vermutlich ebenfalls in den MCs lokalisieren (Sam-Yellowe *et al.*, 2004b). Florens und Kollegen untersuchten die Modifizierung der erythrocytären Plasmamembran durch exportierte Plasmodienproteine. Hierfür wurden die Proteine der Zelloberfläche biotinyliert, affinitätsgereinigt und mittels LC-ESI-MS/MS identifiziert. Insgesamt wurden 423 Proteine

identifiziert, von denen 164 als spezifisch für die gewünschte Fraktion angesehen wurden. Aus dieser Studie gingen zwei neu beschriebene, so genannte *parasite-infected erythrocyte surface proteins* (PIESP) hervor (Florens *et al.*, 2004). Im Jahr 2005 erfolgte eine Analyse isolierter *DRM-Rafts* später Schizonten. Insgesamt waren hier 122 Proteine einwandfrei identifizierbar (Sanders *et al.*, 2005). Ein weiterer Ansatz war die Untersuchung einer mit *Maurer's Clefts*/RBC-Membran angereicherten Präparation. Hier wurden 78 plasmodiale Proteine identifiziert, von denen einige als MCs assoziiert bekannt waren. Zusätzlich waren 7 neue MC Proteine beschrieben worden (Vincensini *et al.*, 2005). Ebenfalls in 2005 erfolgte eine Analyse saparierter männlicher und weiblicher *P. berghei* Gametocyten, durch die zahlreiche geschlechtsspezifische Proteine identifiziert wurden (Khan *et al.*, 2005).

Ein Ansatz, um physiologische Proteininteraktionen zu identifizieren, ist die sogenannte Tandem-Affinitäts-Reinigung (TAP; *tandem affinity purification*). Für diese Technik wird ein Protein mit einem so genannten *TAPtag* versehen. Dieser besteht aus einer Calmodulin-Binde-Domäne, einer *TEV*-Protease-Schnittstelle (*tobacco etch virus*) sowie der Protein A IgG-Bindungsdomäne. Der erste Affinitätsreinigungsschritt erfolgt über eine IgG-Matrix, als zweites wird die Protein A-Domäne mit Hilfe der *TEV*-Protease abgespalten. Hierauf folgt eine zweite Affinitätschromatographie über eine Calmodulin-Matrix. Alle Schritte werden hierbei unter nativen Bedingungen durchgeführt, so dass an das Zielprotein bindende Partner ebenfalls mit gereinigt und anschließend elektrophoretisch getrennt werden können (Rigaut *et al.*, 1999). Auf diese Weise gelang kürzlich die Identifizierung zweier neuer plasmodialer Translations Elogantionsfaktor-Untereinheiten (Takebe *et al.*, 2007).

Eine 2D-PAGE/MALDI-TOF-MS (zweidimensionale Gelelektrophorese / *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation time-of-flight mass spectrometry*) basierte Untersuchung der Proteinzusammensetzung der parasitophoren Vakuole wurde 2006 von Nyalwidhe *et al.* veröffentlicht (Nyalwidhe *et al.*, 2006). Eine Kombination von metabolischer Markierung und 2D-PAGE/MALDI-TOF-MS wurde verwendet, um Plasmodienstämme mit unterschiedlichen Zelladhäsionseigenschaften zu vergleichen (Wu und Craig, 2006). In einer weiteren Studie wurden 2D-Gele geblottet und anschließend mit Patientenseren inkubiert. Auf diese Weise wurde die Interaktion spezifischer Immunglobulin-Subklassen mit den präsentierten Antigenen nachgewiesen (Eisenhut, 2007).

Ein großer Vorteil des 2D-PAGE Ansatzes ist, dass posttranslationale Modifikationen direkt im Gel in Form von unterschiedlichen Punktmustern zu erkennen sind. Werden etwa einige Proteine durch Glycosylierung, Phosphorylierung oder Acetylierung verändert, sind diese unterschiedlichen Populationen meist in Form unterschiedlicher „Proteinspots“ erkennbar (Jones *et al.*, 1990; Suetterlin *et al.*, 1991; Gowda und Dawidson, 1999; Freitas-Junior *et al.*, 2005; Schmitz *et al.*, 2005).

Erst kürzlich wurden die Resultate einer Studie veröffentlicht, in der Chloroquinresistente und -sensitive *P. falciparum*-Stämme mittels SELDI-TOF-MS (*Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) untersucht wurden. Hierbei wurde Zellysate zunächst chromatographisch separiert und anschließend auf einen Proteinchip aufgebracht. Die folgende massenspektrometrische Analyse förderte eine Gruppe von 12 Proteinen zu Tage, die nach Chloroquinbehandlung reguliert werden. Zehn dieser Proteine gelten als Markerproteine für die Chloroquinresistenz (Koncarevic *et al.*, 2007).

### 1.5 Zielsetzung

Mit der Invasion von Merozoiten in rote Blutzellen beginnt der intraerythrocytäre Zyklus von *Plasmodium falciparum*. Bei diesem Vorgang wird die Plasmamembran des Erythrocyten durch das Eindringen des Merozoiten nach innen gestülpt. Einhergehend mit diesem Vorgang wird eine der bisher am ungenügendsten untersuchten Strukturen der infizierten Blutzelle (iRBC) gebildet - die parasitophore Vakuole (PV) sowie das sie umgebende tubovesikuläre Netzwerk (TVN) inklusive der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM). Während der gesamten, 48 Stunden andauernden, intraerythrocytären Differenzierung entwickelt sich der Parasit *P. falciparum* innerhalb dieser parasitophoren Vakuole. Ebenfalls während der gesamten Dauer wird die Wirtszelle, insbesondere deren Plasmamembran, einerseits umfassend modifiziert, um etwa Nährstoffe aus dem umgebenden Milieu aufnehmen zu können, andererseits werden Proteine des erythrocytären Cytoplasmas von dem parasitierenden Malariaerreger metabolisch verwertet. Bei all diesen Prozessen des Nährstoff- und Proteintransports fungiert das PVM/TVN-Netzwerk als Schnittstelle zwischen Wirt und Parasit (Miller *et al.*, 2002; Bannister und Mitchell 1989; Lingelbach und Przyborski, 2006). Bis heute sind jedoch weder die Mechanismen bekannt, die hinter dem Proteintransport über PVM/TVN hinweg stehen, noch die möglicherweise daran beteiligten Proteine. Ebenso wenig ist über die Proteinmaschinerie bekannt, die für den Nährstofftransport zum Parasiten hin benötigt wird. In den letzten Jahren wurden zwei Studien durchgeführt, die auf die Existenz einer Pore in der PVM hinwiesen (Desai *et al.*, 1993; Nyalwidhe *et al.*, 2003). Die Hinweise gehen dahin, dass offenbar die freie Diffusion von Substanzen bis zu 14 kDa über die Membran hinweg möglich ist. Über die möglicherweise an ihrer Bildung beteiligten Proteine gibt es jedoch allenfalls Spekulationen. So kommen immer wieder in den Rhoptrien der Merozoiten lokalisierte Proteine ins Gespräch, da diese offensichtlich während der Invasion sezerniert und teilweise die PVM integriert werden (Bannister *et al.*, 1986a; Sam-Yellowe *et al.*, 1988; Bannister und Mitchell, 1989). Unter anderen auch der RhopH- sowie der RAP(1-3)-Komplex, deren Proteine kurz

nach der Invasion an der PVM lokalisiert wurden (Bannister *et al.*, 1986a; Sam-Yellowe *et al.*, 1988; Bannister und Mitchell, 1989; Ling *et al.*, 2003).

Auch für die Maurer's Clefts (MC) gibt es vermehrt Hinweise auf eine Beteiligung am Proteintransport. Zahlreiche Proteine, die an der Modifizierung der Plasmamembran der Wirtszelle beteiligt sind, lokalisieren transient in den MC (Vincensini *et al.*, 2005; Lanzer *et al.*, 2006, Meier *et al.*, 2007).

Neben den genannten Transportmechanismen sowie daran beteiligten Proteinen wird seit einigen Jahren die intrazelluläre Signaltransduktion als weitere potentielle Funktion des PVM/TVN-Netzwerks diskutiert. Dies ist vor allem auf den Nachweis erythrocytärer DRM-Rafts assoziierter Proteine zurückzuführen, die unter anderem für ihre Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen bekannt sind (Lauer *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2004).

Aufgrund des offensichtlichen Mangels an konkreten Informationen über Proteinzusammensetzung und Funktionen der subzellulären Membranstrukturen infizierter Erythrocyten wurde das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit darauf gerichtet: die Anreicherung dieser Strukturen, Charakterisierung deren Proteine sowie die Beschreibung bisher unbekannter Proteine. Hierfür sollte zunächst ein auf der Basis der von Salmon *et al.*, (2001) durchgeführten Studien erweitertes Protokoll zur Anreicherung von sogenannten PEMS (*PVM enclosed merozoite structures*) angewendet werden. Ausgehend von dieser Präparation sollten PEMS als Startmaterial eingesetzt werden, um Membranen sowie Merozoiten anzureichern und zu separieren. Beide Fraktionen sollten anschließend massenspektrometrisch analysiert werden, um Informationen über das jeweilige Proteom zu bekommen. Dabei sollten einerseits 2D-PAGE / MALDI-TOF-MS für die Untersuchung des Merozoitenproteoms sowie für die PVM/TVN-Präparation 1D-PAGE LC-ESI-MS/MS basierte Analysemethoden eingesetzt werden.

Aufgrund der erhaltenen Daten sowie bestimmter Auswahlkriterien,

- vorhergesagtes Signalpeptid,
- vorhergesagte Transmembrandomäne,
- konservierte orthologe Proteine,
- Abwesenheit bekannter Proteinstrukturmerkmale,

sollten als hypothetische Proteine annotierte Kandidaten aus der Analyse angereicherter Membranen ausgewählt werden, um Antikörper generieren zu lassen. Die daraus resultierenden Seren sollten verwendet werden, die Proteine biochemisch und zellbiologisch zu charakterisieren, um neue Erkenntnisse über Aufbau und Funktion der zu untersuchenden Membranstrukturen zu erzielen.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien

ABC	Sigma, Deisenhofen
Aceton	Roth, Karlsruhe
ACHC	Sigma
Acrylamid-Lösungen	Appllichem, Darmstadt
Agarose NA	Amersham Bioscience, Freiburg
AlbuMAX II	Invitrogen, Karlsruhe
Albumin Fraktion V	Appllichem
Ammoniumacetat	Sigma
AMS	VWR Merck, Darmstadt
APS	VWR Merck, Darmstadt
ASB-14	Calbiochem, Schwalbach
ASB-16	Calbiochem, Schwalbach
BPB	Sigma
BCIP	Promega, Mannheim
Bleinitrat	Sigma
BPB, Bromphenolblau	VWR Merck
BSA	Sigma
CHAPS	Calbiochem
<i>Complete Protease Inhibitor</i>	
<i>Cocktail Tablets</i>	Roche Applied Science, Mannheim
Coomassie-Brillant-Blue G250	Serva, Heidelberg
D(+)-Sorbitol	Sigma
DABCO	Sigma
Dikaliumhydrogenphosphat	Fluka, über Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	VWR Merck
DTT	Sigma
E64	Sigma
EDTA, Dinatriumsalz	VWR Merck
Epon 812	Serva
Erythrocyten-Konzentrat, Human, Blutgruppe A; Rhesus (D)-positiv	Institut für Transfusionsmedizin, UKSH Kiel

Essigsäure	Appllichem
Ethanol	Appllichem
Formaldehyd	Appllichem
GA	VWR Merck
Gelatine	Sigma
Gelafundin	B. Braun, Melsungen
Gentamycinsulfat	Invitrogen
Giemsa-Lösung	VWR Merck
Glycerin	Amersham Bioscience
Harnstoff	Amersham Bioscience
HCl, 37 %(w/v)	VWR Merck
Hepes	Biomol, Hamburg
Hoechst33258	Sigma
IAA	Calbiochem
IPG Cover Fluid	Amersham Bioscience
IPG Puffer (versch. pH-Bereiche)	Amersham Bioscience
Kaliumchlorid	VWR Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	VWR Merck
L-Alanin	VWR Merck
LC-Gefäße	Ziemer GmbH, Langerwehe
LR-White	London Resin Company, UK
MeCN	Roth
Methanol	VWR Merck
Magermilchpulver	Saliter
Mowiol 4-88	Calbiochem
NaOH-Plätzchen	VWR Merck
Natrium-Cacodylat-Trihydrat	Sigma
Natriumcarbonat	VWR Merck
Natriumchlorid	VWR Merck
Natriumcitrat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	VWR Merck
Natriumhydrogencarbonat (Bicarbonat)	Sigma
Natriumthiosulfat	VWR Merck
NBT	Promega
Osmiumtetroxid	Serva
Phosphorsäure, 87 %(w/v)	Roth
Protein-Größenstandards:	

<i>SeeBlue plus2, Pre-stained Standard</i>	Invitrogen Life Technologies
<i>Prestained Molecular Weight Marker</i>	MBI Fermentas
<i>Molecular Weight Protein Ladder</i>	MBI Fermentas
PVDF-Membran Immun-Blot™	Roth
RPMI 1640, mit 25 mM HEPES	Gibco BRL, Invitrogen Life Technologies
Saccharose	VWR Merck
Saponin (aus <i>Gypsophila</i> )	Sigma
SDS	Amersham Bioscience
Silbernitrat	VWR Merck, Sigma
TEMED	Sigma
TFA	Sigma
Thioharnstoff	Fluka
Tricin	Serva
Tris	Amersham Bioscience
Triton X-100	Sigma
Triton X-114	Serva
Trizma	Sigma
Trypsin (bovin, <i>sequential grade</i> )	Roche
Tween20	Sigma
β-MSH	Serva

### 2.1.2 Allgemeine Pufferlösungen

PBS: NaCl 137 mM  
 KCl 2,7 mM  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,24 mM  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,14 mM  
 pH 7,2

TBS: Tris-HCl 20 mM  
 NaCl 150 mM  
 pH 7,4

TTBS: TBS mit 0,05 % (w/v) Tween 20

### 2.1.3 Immunoreagenzien

Anti-Bande 3 Monoklonaler Maus-Antikörper (IgG2a; Klon BIII-136) gegen humanes, erythrocytäres Bande 3-Protein (Sigma)

Anti-Glycophorin A+B Monoklonaler Maus-Antikörper (IgG1) gegen humanes, erythrocytäres Glycophorin A und B, Klon E3 (Sigma)

Kaninchen-anti-EXP-1 Kaninchenserum gegen EXP-1, einem Protein der parasitophoren Vakuolenmembran aus *P. falciparum* (Prof. Dr. K. Lingelbach, Universität Marburg)

Kaninchen-anti-EXP-2 einem Protein der parasitophoren Vakuolenmembran aus *P. falciparum* (Prof. Dr. K. Lingelbach, Universität Marburg)

Ziege-anti-Kaninchen Cy3 Konjugat (Dianova)

Ziege-anti-Maus Cy2 Konjugat (Dianova)

Ziege-anti-Kaninchen Alkalische Phosphatase Konjugat (Sigma)

Ziege-anti-Maus Alkalische Phosphatase Konjugat (Sigma)

Maus-anti-RAP-1, Monoklonaler Antikörper gegen RAP-1 einem Protein der Rhoptrien (Dr. R. G. Ridley, Genf)

Maus-anti-RhopH2, Monoklonaler Antikörper (mAb 61.3) gegen RhopH2, einem Protein der Rhoptrien (Dr A. A. Holder, London)

Kaninchen-anti *Pf*15.2; SA5052 und SA5053 (Eurogentec)

Kaninchen-anti *Pf*17.4; SA5060 und SA5061 (Eurogentec)

Kaninchen-anti *Pf*38; SA5062 und SA 5063 (Eurogentec)

Kaninchen-anti *Pf*13.8; SA5066 und SA5067 (Eurogentec)

Kaninchen-anti *Pf*112.5; SA5076 und SA5077 (Eurogentec)

## 2.1.4 Geräte und sonstiges Verbrauchsmaterial

Airfuge™, Air Driven Ultracentrifuge AB901	Beckman
Elektrophorese Spannungsgeber , E835/E861	Consort
Elektrophorese-Apparatur	Peqlab
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M mit Apotome und MRm Rev. 2D Kamera	Zeiss
Konfokales Laserscanning Mikroskop Leica TCS SP	Leica
Kunststoffküvetten	Saarstedt
IPGphor Isoelectric Focusing System	Amersham Bioscience
Laborzentrifuge 5417 R	Eppendorf
Lichtmikroskop, Axioskop 40	Zeiss
MALDI-TOF Massenspektrometer Voyager DE STR Biospectrometry Workstation	Perseptive Biosystems, Framingham, USA
MALDI-TOF-TOF-MS: 4700 Proteomics Analyzer	Applied Biosystems
Membranvacuumpumpe	KNF Neuberger
Neubauer-Zählkammer	Invitrogen
Q-Tof Ultima API	Micromass
Quarzglasküvetten 108.002B-QS, 10 mm Schichtdicke	Hellma
Schräghals-Zellkulturflächen	Greiner
Semi-Dry-Blotting Apparatur 22 x 20 cm	PHASE, Lübeck
Semi-Dry-Blotting Apparatur Semiphor	Hoefer, über Amersham Pharmacia
Software für Konfokal-Mikroskopie Leica TCS NT V 1.5.451	Leica
Software für Axiovert 200M und Axioskop 40:	
Axiovision Rel 4.5	Zeiss
SpeedVac Savant SPD131DDA	Thermo Electron, USA
Sterilfilter 60 Filter Unit	Pall Corporation, Dreiech
Tischzentrifuge, Minispin	Eppendorf, Hamburg
Transmissions-Elektronenmikroskop 208 S	Philips
Transmissions-Elektronenmikroskop CM 10	Philips
Ultraschallbad Sonorex Super RK106	Bandelin Sonorex, Berlin
Ultrazentrifuge L7-65	Beckmann
Vivaspin, Ultrafiltrationseinheiten	Vivascience, Göttingen
Zentrifuge, Rotanta 460 R	Hettich
ZipTipC18	Millipore

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Führung einer *Plasmodium falciparum*-Kultur

Die Kultur wurde nach den Methoden von Trager und Jensen (1976) sowie Lambros und Vanderberg (1979) durchgeführt.

Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### 2.2.1.1 Medien, Erythrocyten und Lösungen

Ungepuffertes RPMI 1640-Medium: 15,43 g RPMI 1640 mit 25 mM HEPES wurden in 900 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$  gelöst und steril filtriert.

$\text{NaHCO}_3$ -Lösung: 8,125 % (w/v)  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung in  $\text{ddH}_2\text{O}$

Gepuffertes RPMI 1640-Medium: 900 ml ungepuffertes RPMI 1640-Medium wurden mit 40 ml  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung versetzt

Albumax II: 5 % (w/v) Albumax II in ungepuffertem RPMI 1640. Bei 37°C unter gelegentlichem Rühren gelöst und sterilfiltriert.

Komplettmedium: gepuffertes RPMI 1640 Medium mit 0,25 % (w/v) Albumax II

Giemsa-Lösung: 10 % (v/v) Giemsa-Färbelösung in Giemsa-Puffer (0,49 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,09 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in 1 l)

Methanol: 100 %, zur Fixierung

Erythrocyten: Je 30 ml des Erythrocyten-Konzentrates (Blutgruppe A<sup>RH+</sup>) wurden unter sterilen Bedingungen auf 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und mit Komplettmedium auf einen Hämatokrit von 50 % gebracht.

Für die Kultur wurden nur Erythrocytenkonzentrate verwendet, die nicht älter als eine Woche waren.

Die Erythrocyten wurden maximal 4 Wochen lang verwendet.

### 2.2.1.2 *In vitro*-Kultivierung von *Plasmodium falciparum*

Für die durchgeführten Arbeiten wurden Parasiten der Stämme FCBR (Raether *et al.*, 1989) sowie 3D7 (Rosario, 1981) verwendet. Der FCBR Stamm hat seinen Ursprung in Kolumbien und wurde von Herrn Prof. Dr. K. Lingelbach (Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt. Die 3D7 Parasiten stammen von einem Patientenisolat vom Flughafen Amsterdam und wurden vom Herrn Prof. Dr. R. D. Walter (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm wurde für das *Plasmodium falciparum*-Genomprojekt verwendet (Gardner *et al.*, 2002).

Stammhaltung und Kulturbedingungen:

Die Parasiten wurden in Zellkulturflaschen (Greiner) bei einem Hämatokrit von 2,5 % kultiviert (5 ml 50 % HCT RBC in 100 ml Komplettmedium). Diese wurden mit einem Gemisch aus 90 % N<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> begast und bei 37°C im Brutschrank (Binder) inkubiert.

Passagen:

Synchronisierte Kulturen wurden im Ringstadium bei einer Parasitämie von > 10 % verdünnt, Trophozoiten und Schizonten wurden ab einer Parasitämie von > 5 % verdünnt.

Nicht synchronisierte Kulturen wurden ab einer Parasitämie von 7 % verdünnt.

Höhere Parasitämien wurden nur zugelassen, wenn die Zellen am nächsten Tag geerntet werden sollten.

Mediumwechsel:

Das Medium wurde in der Regel alle 48 Stunden gewechselt, indem die Flasche leicht angekippt, und das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt wurde. Anschließend wurde frisches, vorgewärmtes Komplettmedium zugegeben.

Bei geringen Parasitämien (< 1 %) und einem Hämatokrit von 2,5 % war die Kultur für drei Tage ohne Mediumwechsel inkubierbar.

Bestimmung der Parasitämie:

Aus der Kante einer Kulturflasche wurde Zellmaterial mit einer sterilen Pasteurpipette entnommen und ein Tropfen auf einem Objektträger ausgestrichen. Der Ausstrich wurde an der Luft getrocknet und anschließend 30 s in MeOH fixiert. Anschließend folgte eine 10 min Färbung in einer 10 %-igen Giemsa-Lösung. Nach der Färbung wurde der Objektträger mit Wasser abgespült und getrocknet.

In dem Ausstrich wurde bei 1000-facher Vergrößerung, mit einem Ölimmersionsobjektiv, der prozentuale Anteil der Infizierten RBC ermittelt.

### **2.2.1.3 Einfrieren von Plasmodien**

Lösungen:

30 %(w/v) Glycerin in PBS

PBS

Kulturen einer Parasitämie ab 3 %, die vor allem Ringstadien enthalten, können eingefroren werden. Zuvor sollte ein Medienwechsel durchgeführt werden. Die Kultur wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und bei RT für 10 min bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ein Sedimentvolumen abgenommen und zwei Sedimentvolumen an 30 %(w/v) Glycerin in PBS-Lösung zugegeben und vorsichtig resuspendiert.

Je 500 µl dieser Suspension wurden in sterile Cryogefäße gefüllt und für 10 min auf Eis gestellt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.2.1.4 Auftauen von Plasmodien**

Lösungen:

5 % bzw. 27 %(w/v) Sorbitol in 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 (sterilfiltriert)

Die gefrorene Probe wurde im Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schütteln aufgetaut und anschließend sofort auf Eis gelagert. Die Zellen wurden in ein steriles, kalibriertes Röhrchen überführt (15 ml Falcon-Röhrchen). Es wurden tropfenweise unter Schütteln 2 Volumenteile (VT) kalte 5 %(w/v) Sorbitol-Lösung zugegeben und die Zellsuspension weitere 10 min auf Eis stehen gelassen. Wie oben beschrieben wurden nochmals 2 VT kaltes 5 %(w/v) Sorbitol zugegeben und weitere 10 min auf Eis stehen gelassen. Danach wurde für 5 min bei 800 x g bei 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in 2 VT kaltem 5 %(w/v) Sorbitol-Lösung vorsichtig resuspendiert, 8 min auf Eis stehengelassen und dann für 5 min bei 800 x g bei 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde zweimal mit je 1 ml Kompletmedium gewaschen. Zur Kultivierung wurden die Zellen in eine frische 2,5 %-ige Erythrocytensuspension überführt.



### 2.2.1.5 Synchronisation der Entwicklung von *P. falciparum* mit D-Sorbitol

Lösungen:

Komplettmedium

5 %(w/v) Sorbitol in ddH<sub>2</sub>O (steril)

Die Behandlung von Parasiten mit einer D-Sorbitol-Lösung erlaubt die Synchronisation der Kultur durch Eliminierung später Trophozoiten und Schizonten und damit der Selektionierung auf Ringstadien (junge Trophozoiten) (Lambros und Vanderberg, 1979)

Zellen aus der Kultur mit 2,5 % HCT und möglichst vielen Ringstadien wurden sedimentiert (5 min 550 x g, RT). Das Zellsediment wurde in einem 10-fachen Volumen 5 % Sorbitol-Lösung resuspendiert und für 10 min bei RT unter gelegentlichem Schwenken inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde 1 Volumen vorgewärmtes Komplettmedium zugegeben und gemischt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und rekultiviert. Um eine synchrone Kultur beizubehalten wurde die Prozedur mindestens einmal wöchentlich durchgeführt.

### 2.2.1.6 Anreicherung maturer Parasitenstadien mit Percoll (nach Kutner et al., 1985)

Lösungen:

PBS

65 % Percoll (Amersham) (10 ml 10x PBS; 65 ml Percoll; 25 ml ddH<sub>2</sub>O)

Zellen aus einer synchronen Kultur mit möglichst vielen Schizonten wurden sedimentiert (5 min 550 g, RT) und in einem geringen Volumen PBS resuspendiert. Die Suspension wurde vorsichtig auf ein 25 ml Kissen einer vorgewärmten 65 % Percoll-Lösung geschichtet (50 ml Falcon-Röhrchen) und für 20 min bei 1500 rpm (Hettich, Rotanta 460 R), RT ohne Bremse zentrifugiert.

Anschließend wurden die Röhrchen vorsichtig aus der Zentrifuge (Hettich) geholt und der helle, an der Phasengrenze von Percoll und PBS befindliche Überstand in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die hierin enthaltenen maturen Parasitenstadien wurden in vorgewärmten PBS gewaschen (5 min 550 g, RT) und die Parasitämie per Ausstrich bestimmt.

Die Anzahl angereicherten Schizonten war abhängig von der Ausgangsparasitämie. In der Regel lag die Parasitämie bei 90 bis 95 %.

### **2.2.1.7 Anreicherung maturer Parasitenstadien mit Gelafundin (nach Pasvol *et al.*, 1978)**

Lösungen:

RPMI-Komplettmedium

Gelafundin-Lösung (B. Braun)

Mischung: 25 ml 4 % Gelafundin + 15 ml RPMI-Komplettmedium

Diese Methode eignete sich ausschließlich für Parasitenlinien die Knobs ausbilden.

Zellen aus einer synchronen Kultur mit möglichst vielen Schizonten wurden sedimentiert (5 min 550 g, RT) und das Sediment nach Abnahme des Überstands in vorgewärmter Gelafundin-Lösung in einem 15 ml Falcon-Röhrchen resuspendiert (10 ml Gelafundin-Lösung bei einem Sediment aus einer 100 ml Kultur mit 2,5 % HCT). Die Zellsuspension wurde für 15 min aufrecht in einem 37°C warmen Wasserbad stehen gelassen. Nicht infizierte RBCs sedimentierten, während sich infizierte Erythrocyten flotierend im Überstand befanden. Der Überstand wurde in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und mit frischem Komplettmedium gewaschen (5 min 550 g, RT). Anschließend wurde die Parasitämie im Ausstrich überprüft. In der Regel lag sie bei 80-90%. Ein Milliliter gepacktes Material entsprach ca.  $1 \times 10^9$  Zellen.

### **2.2.1.8 Anreicherung maturer Parasitenstadien mit dem MACS-System**

Lösungen:

RPMI-Medium ohne AlbuMAX II

Während in der plasmodialen Nahrungsvakuole Hämoglobin abgebaut wird, entsteht als Nebenprodukt zytotoxisches Fe-Protoporphyrin IX. Zur Entgiftung wird dies in Form von inerten Hemozinkristallen eingelagert (Pagola *et al.*, 2000). Diese Hemozinkristalle weisen paramagnetische Eigenschaften auf, mit deren Hilfe mature Trophozoiten und Schizonten von Ring- und frühen Trophozoitenstadien sowie nicht infizierten Erythrocyten separiert werden können (Staalsoe *et al.*, 1999).

Für die Separation wurden *QuadroMACS* Magnethalter sowie *LS*-Säulen der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) verwendet.

Die *LS*-Säulen wurden zunächst mit 5 ml inkompletem RPMI-Medium gespült und anschließend in dem *QuadroMACS* Magnethalter fixiert.

Für die Separation wurden synchrone Kulturen mit einer Parasitämie von etwa 5% verwendet. Der Kulturüberstand wurde bis auf etwa 30 ml Restvolumen abgenommen und

die Zellen in Suspension gebracht. Diese Suspension wurde auf die vorbereiteten LS-Säulen geladen, und diese anschließend mit zwei Säulenvolumen inkompletten RPMI-Medium gewaschen.

Als nächstes wurden die Säulen aus dem Magnethalter entfernt, und die gebundenen Zellen mit zwei Volumen RPMI-Medium eluiert. Da die Säulen während des Gebrauchs langsam verstopften, wurde die Elution ggf. mit Hilfe der beigefügten Stempel unterstützt. In der Regel wurden die Säulen für drei Separationen verwendet. Für die Lagerung wurden sie mit inkomplettem RPMI-Medium gespült und im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Reinheit der angereicherten Zellen wurde mittels Giemsa-gefärbter Blutausstriche überprüft und lag in der Regel bei 90%.

### 2.2.1.9 Behandlung infizierter Erythrocyten mit Brefeldin A

Durch die Behandlung von Zellen mit Brefeldin A wird der anterograde Transport von Vesikeln vom ER zum Golgi blockiert, wodurch der Golgi kollabiert (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989; Peyroche *et al.*, 1999; Presley *et al.*, 2002).

Für die hier durchgeführten Experimente wurden synchrone, infizierte Erythrocyten mit 7.5 µg/ml BFA unter Standardbedingungen kultiviert. Ring-infizierte Erythrocyten waren bis zu 24 h mit BFA behandelt worden, während spätere Stadien nur für einen kürzeren Zeitraum inkubiert wurden.

Im Anschluss an die Inkubation wurde ein Aliquot der iRBC weiterkultiviert, um die Viabilität zu überprüfen.

### 2.2.2 Isolierung von PEMS (*Parasitophorous Vacuolar Membrane-Enclosed Merozoite Structures*) (nach Salmon *et al.*, 2001)

Lösungen:

*Disruption-Buffer*

10 mM Tris-HCl, pH 7,6

150 mM NaCl

10 mM α-D-Glucose

1 mM CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O

pH 7,6 mit 1 M HCl einstellen, ad 500 ml

Lösung sterilfiltrieren und bei 4 °C aufbewahren

Die PEMS-Präparation wurde im Wesentlichen gemäß Salmon *et al.* (2001) durchgeführt. Parasiten wurden mit 2,5 % HCT unter normalen Kulturbedingungen mit 0,5 % Albumax II im

Medium kultiviert. Die Kultur wurde mittels Sorbitol-Behandlung synchronisiert. Es wurden mindestens 2 Behandlungen im Abstand von ca. 48 h durchgeführt. Im Giemsa-gefärbten Ausstrich wurde der Zeitpunkt bestimmt, an dem sich hauptsächlich Schizonten mit 5 bis 7 Kernen in der Kultur befanden. Die synchronen Kulturen wurden für 8 h bis 10 h in komplettem Kulturmedium gehalten, das 10  $\mu$ M E64 (Sigma, Stock: 10 mM in 50 % EtOH) enthielt.

Nach der Inkubation wurden die intakten Zellen sedimentiert (5 min, 900 x g, RT) und ggf. nochmals für 8 h mit 10 mM E64 behandelt. Der PEMS enthaltende Überstand wurde vorsichtig abgenommen, sedimentiert (10 min, 2000 x g, RT, „soft spin“) und ein Mal in 1,5 ml *Disruption-Buffer* gewaschen (10 min, 2000 x g, RT, „soft spin“).

Die PEMS-Präparation wurde durch Ausstriche überprüft und bei -80°C eingefroren oder sofort weiterverwendet (siehe Kapitel 2.2.3).

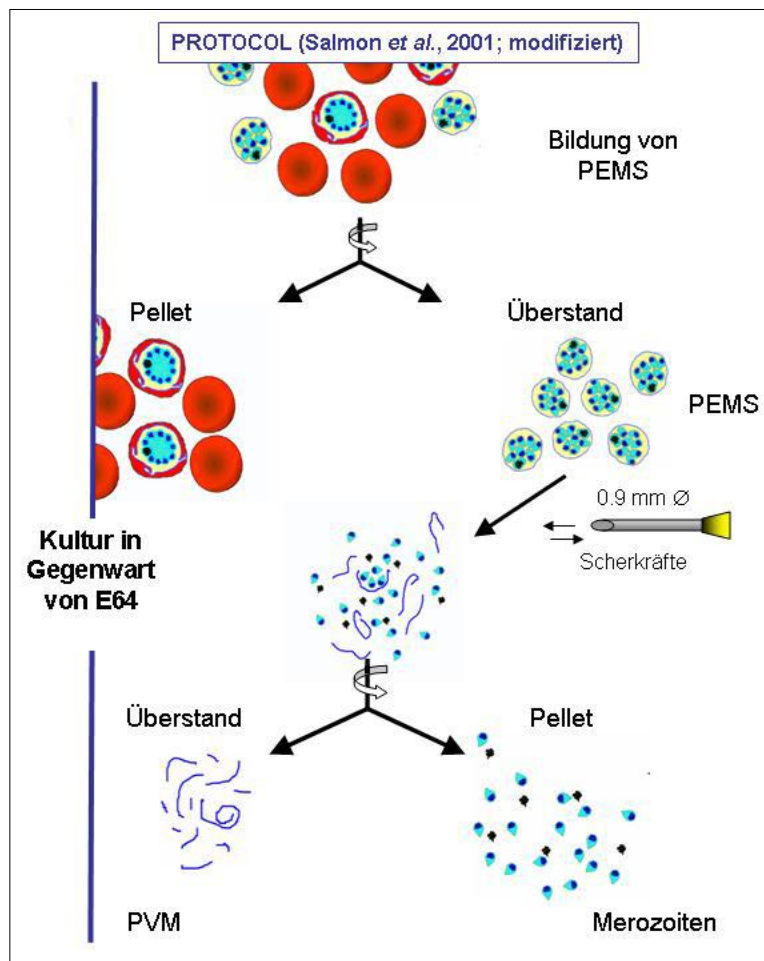


Abb. 8: Schematische Darstellung des Präparationsverlaufs zur Isolierung von PEMS und die weiterführende Präparation vom PVM/TVN-Membransystem und von Merozoiten (verändert nach Gelhaus, Dissertation 2003)

### 2.2.3 Präparation subzellulärer Membranen infizierter Erythrocyten

Für die Präparation der PVM/TVN wurden PEMS verwendet, die wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, gewonnen wurden.

Gewaschene PEMS wurden in 1 ml DB inklusive Protease Inhibitor-Cocktail (Roche) resuspendiert und dann 10 Mal durch eine Kanüle (27 G; 0,9 mm) gepresst (Abb. 9). Die so aus den PEMS freigesetzten Merozoiten wurden für 5 min bei 3000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und nochmals bei 3000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einer Ultrazentrifuge (Airfuge; Beckmann) für 30 min bei 100.000 x g (20.000 PSI) sedimentiert. Das Sediment wurde bei -80°C gelagert.

Die Schritte des Protokolls zur Isolierung von PEMS, ausgehend von der Arbeit von Salmon *et al.*, (2001) sind in Abb. 8 schematisch dargestellt. Dieses Protokoll wurde von uns für die Anreicherung von PVM/TVN und Merozoiten weiterentwickelt und publiziert (Gelhaus *et al.*, 2005a)

### 2.2.4 Extraktion von Membranen infizierter Erythrocyten

Lösungen:

#### Lysepuffer

10 mM Tris pH 8

1 mM EDTA

+ Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

Für die Präparation von Gesamtmembranen infizierter Erythrocyten wurden  $10^8$  Zellen aus einer synchronen Kultur abgenommen und mit TBS gewaschen (5 min, 800 x g, RT). Die Lyse der Zellen erfolgte durch 10 *freeze and thaw* Zyklen in Lysepuffer. Anschließend wurden die Membranen in der Ultrazentrifuge sedimentiert (1 h, 40.000 rpm, 4°C)

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

Lösungen:

#### Hochsalzpuffer

10 mM HEPES pH 7,5

0,6 M KCl

3 mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM DTT (frisch zugeben)  
+ Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

### **Karbonatpuffer**

0.1M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
pH 11,0  
1 mM EDTA

Etwa 10<sup>8</sup> infizierte Erythrocyten wurden wie in 2.2.4 beschrieben lysiert und sedimentiert. Das Pellet wurde in 100 µl Hochsalzpuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Membranen in der Ultrazentrifuge abermals sedimentiert (1 h, 40.000 rpm, 4°C), woraufhin das Sediment in 10 Vol Karbonatpuffer resuspendiert wurde. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Membranen nochmals sedimentiert (1 h, 40.000 rpm, 4°C). Die Proteine aus dem Überstand wurden mit TCA präzipitiert.

#### **2.2.4.2 Extraktion von Proteinen durch temperaturabhängige Phasentrennung (Smythe *et al.*, 1988)**

Das Protokoll wurde verändert nach Smythe *et al.* (1988) durchgeführt. Triton X-114 wurde in TBS vorkondensiert. Dazu wurden 1,5 g Triton X-114 mit 50 ml TBS versetzt und auf Eis gestellt bis eine klare Lösung entstand. Dann wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt bis die Lösung trübe wurde. Schließlich wurde bei RT für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert und die obere Phase verworfen. Die untere Phase wurde mit dem gleichen Volumen eiskalter TBS versetzt und auf 37°C erwärmt. Die Prozedur wurde dreimal wiederholt.

Ein Sediment aus angereicherten Schizonten (250 µl) wurde mit 250 µl TBS und 55 µl vorkondensiertem Triton X-114 versetzt. Die Lyse der Zellen fand für 1 h auf Eis statt. Das Lysat wurde 15 min bei 4°C und 10.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf ein 1 ml Kissen von 6 % (w/v) Saccharose in 10 mM Hepes, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA und 0,5 % (v/v) vorkondensiertes Triton X-114, pH 7,4 gegeben. Es folgte eine Inkubation von 10 min bei 37°C und eine Zentrifugation von 5 min bei 510 x g. Der Überstand inklusive Saccharose-Lösung wurde abgenommen und verworfen. Das Sediment (angereichertes Triton X-114) wurde mit 4 Volumen eiskaltem TBS versetzt und auf Eis gestellt bis die Lösung klar wurde. Danach wurde die Lösung wie oben beschrieben auf einem Saccharosekissen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Triton X-114 angereicherte Sediment für die 2D-PAGE eingesetzt. Dazu wurde die Präparation 1:10 mit Rehydrierungslösung (siehe 2.2.9.1) versetzt, für 10 min bei 18°C im Ultraschallbad beschallt und für 20 min bei 18°C und 20.800 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur 2D-PAGE

einem 18 cm langen *IPGDryStrip* mit einem linearen pH-Gradient pH 4-7 durch *in-gel*-Rehydrierung appliziert (siehe 2.2.9).

## 2.2.5 Elektronenmikroskopie

Alle verwendeten Lösungen wurden durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße filtriert.

Allgemeine Lösungen:

PBS

Na-Cacodylatpuffer: 50 mM Na-Cacodylat ( $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{-AsO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ), pH 7,4

0,5 % (w/v) Uranylacetat

Fixanz: 2 % Paraformaldehyd + 0,025 % Glutaraldehyd / Na-Cacodylatpuffer)

LR-White (fertige Lösung)

### 2.2.5.1 Herstellung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie

Parasiten wurden angereichert, ein Mal in Na-Cacodylatpuffer gewaschen und anschließend in frischem Fixanz resuspendiert. Sofort nach dem Resuspendieren wurden die Zellen für 1 min bei 4000 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden für 1 Stunde bei RT fixiert. Anschließend ein Mal mit Na-Cacodylatpuffer, ein Mal mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , zum Blockieren freier Aldehydgruppen, und zwei Mal mit  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Dabei wurde das Sediment bei jedem Schritt resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen mit 2 % Agarose in  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  (low melting Agarose, im Wasserbad aufgekocht und anschließend auf etwas 45°C abgekühlt) versetzt und für 10 Minuten bei ca. 9000 x g sedimentiert. Hierfür wurden vorgewärmte Eppendorfgefäße sowie *low-melting point* Agarose verwendet.

Die Agarblöckchen wurden zum Verfestigen in den Kühlschrank gestellt, dann herausgeschnitten und vorsichtig überschüssiger Agar von den Zellpellet entfernt. Anschließend folgte die sukzessive Entwässerung über eine 30, 50, 70 bis 90 %-ige Ethanolreihe für jeweils 1 Stunde bei 4°C. Die Entwässerung mit 90 % EtOH wurde mindestens zwei Mal für 1 Stunde bei -20°C, ggf. sogar über Nacht durchgeführt. Die folgende Inkubation mit den angegebenen LR White-Lösungen wurde tageweise durchgeführt:

90 % Ethanol + LR White:

3+1, 2+1, 1+1, 1+2, 1+3, 2x konz. LR-white

Nach dem letzten Schritt wurde frisches LR-White zugegeben und die Lösung für 3 Tage bei 50 °C polymerisiert. Das Anfertigen der Ultradünnschnitte sowie deren Überführung auf

Pioloform-beschichtete Kupfernetze wurden von der Zentralen Abteilung für Mikroskopie der Universität Kiel durchgeführt.

Die Schnitte wurden anschließend mit 2 % wässrigen Uranylacetat kontrastiert (Reynolds, 1963).

### 2.2.5.2 Immun-Elektronenmikroskopie (IEM)

Allgemeine Lösungen:

2 % Uranylacetat in  $\text{ddH}_2\text{O}$

PBS

$\text{ddH}_2\text{O}$

Lösung A: 1 % (w/v) BSA/0,1 % Tween20/PBS

Lösung B: 0,1 % (w/v) BSA/0,1 % Tween20/PBS

Zunächst wurden die Ultradünnschnitte auf den Pioloform-beschichteten Kupfernetzen für je 5 Minuten in PBS bzw. Lösung A inkubiert (je ein Tropfen auf einem Parafilmstreifen). Anschließend folgte die Inkubation für ca. 4 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C mit den in Lösung A verdünnten primären Antikörpern/-seren. Nach zwei 10 minütigen Waschrufen mit Lösung A sowie Lösung B erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (in Lösung B verdünnt) für zwei Stunden bei RT.

Je nach Ursprung des primären Antikörpers/Antiserums wurden folgende sekundäre Antikörperlösungen verwendet:

- Anti-Maus IgG aus Ziege an 12 nm kolloidalem Gold konjugiert (Dianova).  
Verdünnung 1:50 in 0,1 % BSA/0,1 % Tween20/PBS
- Anti-Kaninchen IgG aus Esel an 12 nm kolloidalem Gold konjugiert (Dianova).  
Verdünnung 1:50 in 0,1 % BSA/0,1 % Tween20/PBS

Die Schnitte wurden jeweils zwei Mal für 10 min mit Lösung B bzw.  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen, auf Whatman-Papier getrocknet und dann in 2 % Uranylacetat nachkontrastiert (Reynolds 1963). Auf die Verwendung von Bleicitrat wurde verzichtet.

### 2.2.6 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IFA) von *Plasmodium falciparum* wurde mit luftgetrockneten Ausstrichen durchgeführt.

Lösungen:

PBS

Blockierungslösung: 5 % (w/v) BSA/PBS



MeOH

3 % PFA/PBS

Ausstriche von angereicherten Parasiten oder von Zellen aus der Kultur wurden für 30 min in 3 % PFA/PBS bei RT fixiert und dann für 15 min in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl behandelt. Dann wurde mit 5 % BSA/PBS blockiert. Verdünnungen der primären und sekundären Antikörper/-seren wurden in der Blockierungslösung angesetzt. Die Inkubation mit primärem Antikörper/-serum erfolgte 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Nach dem Waschen der Präparate in PBS wurden die Ausstriche für weitere 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit der unten angegebenen Verdünnung des sekundären Antikörpers in der Blockierungslösung inkubiert (Cy2-konjugierter Ziege-anti-Maus IgG (1:250) oder Cy3-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen IgG (1:250)). Während der letzten 10 min der dieser Inkubation wurden final 2 µg/ml Hoechst33258 hinzugegeben, um die Nuklei zu markieren, und dann erneut in PBS gewaschen. Das Material wurde in Mowiol eingebettet und mittels Konfokaler Laser-Mikroskopie bzw. herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es wurden Anregungs-/Emissions-Filtereinstellungen für FITC-, TRITC- und DAPI-Markierung verwandt.

#### **Einbettung von Präparaten für die IFA mit Mowiol**

Zur Vorbereitung des Einbettungsmediums wurden 4,8 g Mowiol 4-88 (Calbiochem) mit 12 g Glycerol vermischt und anschließend 12 ml <sub>dd</sub>H<sub>2</sub>O hinzugegeben. Die Mischung wurde für einige Stunden auf dem Magnetrührer gerührt. Nach Zugabe von 24 ml 0,2 M Tris (pH 8,5) wurde die Mischung abermals über mehrere Stunden gerührt und ab und zu auf 50°C erhitzt, bis alles gelöst war. Die Lösung wurde 15 min bei 1500 x g zentrifugiert, und anschließend in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

Direkt vor der Verwendung wurde eine Spatelspitze des Antibleichmittels DABCO (Sigma) zugegeben, und bis zur vollständigen Lösung gevortext.

#### **Verwendung von anti-Glycophorin A&B Serum:**

Das Serum wurde in der Verdünnung 1:500 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde 1:250 verdünnter Cy2-konjugierter anti-Maus Antikörper (Dianova) eingesetzt.

#### **Verwendung von Exp-2 (mAB 7.7) Serum:**

Das Serum wurde in der Verdünnung 1:200 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde 1:250 verdünnter Cy2-konjugierter anti-Maus Antikörper (Dianova) eingesetzt

Das Serum wurde von Herrn Prof. Dr. K. Lingelbach (Universität Marburg) zur Verfügung gestellt.

**Verwendung von Exp-1c Serum:**

Das Serum wurde in der Verdünnung 1:200 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde 1:250 verdünnter Cy3-konjugierter anti-Kaninchen Antikörper (Dianova) eingesetzt.

**Verwendung von SA5052:**

Das Serum wurde in der Verdünnung 1:100 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde 1:250 verdünnter Cy3-konjugierter anti-Kaninchen Antikörper (Dianova) eingesetzt.

**Verwendung von SA5060:**

Das Serum wurde in der Verdünnung 1:200 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde 1:250 verdünnter Cy3-konjugierter anti-Kaninchen Antikörper (Dianova) eingesetzt.

**Verwendung von SA5062:**

Das Serum wurde in der Verdünnung 1:500 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde 1:250 verdünnter Cy3-konjugierter anti-Kaninchen Antikörper (Dianova) eingesetzt.

**Verwendung von SA5066:**

Das Serum wurde in der Verdünnung 1:200 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde 1:250 verdünnter Cy3-konjugierter anti-Kaninchen Antikörper (Dianova) eingesetzt.

**Verwendung von SA5077:**

Das Serum wurde in der Verdünnung 1:200 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde 1:250 verdünnter Cy3-konjugierter anti-Kaninchen Antikörper (Dianova) eingesetzt.

Das Serum wurde unter anderem direkt mit dem Cy3-Farbstoff gekoppelt (s. 2.2.6.1) und anschließend unverdünnt eingesetzt.

### **2.2.6.1 Konjugation von Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen**

Um affinitätsgereinigte Antikörper (s. 2.2.7.2) direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren, wurde prinzipiell den Anleitungen der Hersteller gefolgt. Es wurden zwei Produkte von unterschiedlichen Herstellern verwendet:

1) *Cy3 monoreactive dye pack* (Amersham Bioscience):

Der für 1 mg IgG-Moleküle ausreichende Farbstoff wurde zunächst in 900 µl DMSO gelöst und anschließend in drei Teile aufgeteilt. Das Lösemittel wurde per Lyophilisation entfernt.

2) *DyLight 488 NHS Ester* (Pierce):

Die Substanz wurde eingewogen, in DMF gelöst und mit der affinitätsgereinigten Antikörpersuspension versetzt.

Für die Markierung wurde die Lösung spezifischer IgG-Moleküle mit dem Farbstoff vermischt und dunkel für mehrere Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundener Farbstoff wurde anschließend, nach Angaben des Herstellers, über eine PD-10 (Amersham Bioscience) Säule entfernt.

Die Säule wurde hierfür mit 5 ml PBS äquilibriert. Dann wurde die IgG-Lösung aufgetragen und anschließend mit 3 ml PBS eluiert. Das Eluat wurde mit Hilfe einer *Vivaspin Column* MWCO 10.000 (Vivascience) eingengt und bei 4°C vor Licht geschützt gelagert.

## 2.2.7 Reinigung von Antikörpern

Für einige Experimente wurden gereinigte IgG's benötigt. Hierzu wurden die Antikörper zunächst über eine Protein A Säule gereinigt. Teilweise wurde noch eine Affinitätsreinigung über eine Peptid-Matrix durchgeführt

### 2.2.7.1 HiTrap Protein A Säule

Lösungen:

20 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,0

1M Tris, pH 9,0

100 mM Zitronensäure, pH 3,5

Material:

Peristaltikpumpe (Pharmacia)

Für die Anreicherung von IgG-Molekülen aus Kaninchenserum wurde eine 1 ml HiTrap-Protein A Säule von Amersham Bioscience verwendet.

Die Säule wurde vor Verwendung mit 10 ml 20 mM Na-Phosphatpuffer bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/min äquilibriert.

Währenddessen wurden 5 ml Serum zentrifugiert (30 min, 4°C, 20.000 x g) und der Überstand anschließend mit 5 ml 20 mM Na-Phosphatpuffer gemischt. Diese Lösung wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule geladen (Kreislauf, etwa 1,5 h). Daraufhin wurde die Säule für 30 min mit 20 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,0 gewaschen.

Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte durch Eluton mit 5 ml 100 mM Zitronensäure. Das Eluat wurde dabei in 1,5 ml Eppendorfgefäßen aufgefangen, in denen 200 µl 1M Tris, pH 9,0 vorgelegt war, um einen finalen pH von etwa 7,4 zu erreichen.

Die Proteinkonzentration und Reinheit der Fraktionen wurde photometrisch bei  $A_{280\text{ nm}}$  bzw. per SDS-PAGE überprüft.

### 2.2.7.1 HiTrap Peptid-NHS Säule

Um peptidspezifische IgG-Moleküle zu erhalten, wurden die gleichen Peptide wie auch für die Immunisierung verwendet. Diese wurden hierfür an eine NHS aktivierte Säulenmatrix gebunden. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Anschließend wurde das Eluat aus der Protein A-Reinigung auf die Säule geladen, gewaschen und die spezifischen Antikörper eluiert.

Lösungen:

1 mM HCl (bei 4°C gelagert)

Puffer A:

0,5 M Ethanolamin

0,5 M NaCl

pH 8,3

Puffer B:

0,1 M Na-Acetat

0,5 M NaCl

pH 4,0

Kopplungspuffer:

0,2 M  $\text{NaHCO}_3$

0,5 M NaCl

pH 8,3

2 M Glycin-HCl, pH 2,0

TBS

Elutionspuffer:

100 mM Glycin

0,5 M NaCl

pH 7,2

Sonstige Materialien:

1 ml NHS aktivierte HiTrap-Säule (Amersham Bioscience)

PD-10

Peristaltikpumpe P1 (Pharmacia)

### **Präparation der NHS-Säule mit Peptiden**

Zunächst wurden die gewünschten Peptide in 1 ml Kopplungspuffer gelöst. Währenddessen wurde die Säule unter Verwendung einer Spritze 2 ml 1 mM HCl beladen, wobei eine maximale Flussrate von 1 ml/min beibehalten wurde. Direkt im Anschluss wurde der Peptidmix geladen. Die Säule wurde verschlossen und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Um die Kopplungseffizienz zu bestimmen wurde die Säule mit 3 ml Kopplungspuffer gewaschen, wobei die Lösung separat gesammelt wurde. Hierauf folgten mehrere Waschschriffe:

2x 3 ml Puffer A

2x 3 ml Puffer B

2x 3 ml Puffer A

Säule verschließen und 30 min bei Raumtemperatur stehen lassen

2x 3 ml Puffer A

2x 3 ml Puffer B

2x 3 ml Puffer A

Nach dem letzten Waschen wurde die Säule mit PBS äquilibriert und anschließend mit PBS + Gentamycin bei 4°C gelagert.

Die Bestimmung der Kopplungseffizienz wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **Affinitätsreinigung peptidspezifischer Antikörper**

Die vorbereitete Säule wurde mit 5 ml PBS äquilibriert und anschließend für 2 h mit der via Protein A Säule gereinigten IgG-Lösung beladen. Es folgte ein Waschschritt mit 20 ml PBS, gefolgt von der Elution der Peptide mit 5 ml Elutionspuffer in 1,5 ml Eppendorfgefäße, in denen 100 µl 1 M Tris pH 9,0 vorgelegt war. Der resultierende pH lag bei 7,4.

Das Proteingehalt der Fraktionen wurde per Bradford Proteinbestimmung beziehungsweise mittels SDS-PAGE überprüft.

Das Eluat der Protein A-Säule wurde bis zu 5 mal über die Peptidsäule gegeben.

Die Säule wurde daraufhin mit 20 ml PBS gespült und in PBS + Gentamycin bei 4°C gelagert.

Das Volumen des Eluats wurde mit Hilfe von *Vivaspin Columns MWCO 10.000* (Vivascience) eingeengt. Die IgG-Lösung wurde mit Gentamycin versetzt und ohne Zugabe von Glycerol bei 4°C gelagert.

## 2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese Methode der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde modifiziert nach Laemmli (1970) durchgeführt.

Alle verwendeten Chemikalien waren vom Hersteller mit dem Vermerk *electrophoresis grade* (für die Elektrophorese geeignet) ausgezeichnet.

Stamm-Lösungen:

Acrylamid-Lösung 1	29 %(w/v) Acrylamid, 1 %(w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
Acrylamid-Lösung 2	49 %(w/v) Acrylamid, 1 %(w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, 0,4 %(w/v) SDS, pH 8,8
Sammelpuffer	0,5 M Tris, 0,4 %(w/v) SDS, pH 6,8
Elektrophorese-Puffer	25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1 %(w/v) SDS, pH 8,3
TEMED	fertige Lösung
APS	40 %(w/v) APS in $\text{ddH}_2\text{O}$
Probenpuffer	10 %(w/v) Glycerin; 3,1 %(w/v) SDS; 62,5 mM Tris, pH 6,8; 0,01 %(w/v) Bromphenolblau; 5 %(v/v) $\beta$ -MSH oder 65 mM DTT (für reduzierende Bedingungen frisch zugegeben)

Präparation des Trenngels (C = 2 %):

Final: % T	10,0 % T	11,0 % T
Trenngelpuffer	0,375 M Tris, 0,1 % SDS, pH 8,8	0,375 M Tris, 0,1 % SDS, pH 8,8
Acrylamid (Lösung 2 verwandt)	10,0 %(v/v)	11,0 %(v/v)
TEMED	0,025 %(v/v)	0,025 %(v/v)
APS	0,12 %(w/v)	0,12 %(w/v)

Das Sammelgel (C = 3 %) wurde wie folgt hergestellt:

Acrylamid (Lösung 1 verwandt)	5,0 % T
Sammelgelpuffer	0,125 M Tris, 0,1 % SDS, pH 6,8
TEMED	0,1 %(w/v)
APS	0,12 %(w/v)

Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel zu gleichen Volumenteilen mit Probenpuffer versetzt. Die Denaturierung erfolgte durch Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur, 3 min bei 95°C oder für 15 min bei 65°C.

Es wurden Doppelgelkammern für Glasplatten der Größe 20 x 20 cm<sup>2</sup> (Modell PerfectBlue Twin L; Peqlab, Erlangen) Midigel bzw. Minigelsysteme mit Glasplatten von 10 x 10 cm<sup>2</sup> verwandt (Modell PerfectBlue Twin S; Peqlab, Erlangen). Bei beiden Systemen wurden Glasplattenabstandhalter von jeweils 0,8 mm oder 1,0 mm Dicke benutzt. Die Elektrophorese wurde bei 40 mA konstanter Stromstärke durchgeführt bis die Bromphenolblau-Bande das Trenngel erreicht hatte. Dann wurde für den Rest des Laufs eine begrenzte Spannung von 35 mA gewählt.

## 2.2.9 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Alle verwendeten Chemikalien waren vom Hersteller mit dem Vermerk *electrophoresis grade* (für die Elektrophorese geeignet) ausgezeichnet.

### Lösungen:

#### Äquilibrierungspuffer 1

50 mM Tris-HCl pH 8,8

6 M Harnstoff

30 %(v/v) Glycerin

2 %(w/v) SDS

65 mM DTT

eine Spur BPB

### **Äquilibrationpuffer 2**

50 mM Tris-HCl pH 8,8  
6 M Harnstoff  
30 %(v/v) Glycerin  
2 %(w/v) SDS  
135 mM IAA  
eine Spur BPB

### **SDS-Elektrophoresepuffer**

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,1 %(w/v) SDS  
pH 8,3

### **Agarose-Lösung**

0,5 %(w/v) Agarose, *low EEO* (Sigma) in SDS-Elektrophoresepuffer.  
Eine Spur BPB

### **Acrylamid-Lösung**

11 % T, 2 % C  
0,375 M Tris pH 8,8  
5 %(v/v) Glycerin

## **2.2.9.1 Die erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung)**

Für die erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung, IEF) der Zwei-Dimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) wurde die IPGphor-Apparatur (*IPGphor Isoelectric Focusing System*) von Amersham Bioscience (Freiburg) verwendet. Es wurden die kommerziell erhältlichen sog. *IPG-DryStrips* (IPG-Gelstreifen; Amersham Bioscience, Freiburg) benutzt. Sie zeichnen sich durch einen in der Gelmatrix immobilisierten pH-Gradienten (iPh) aus. Diese Polyacrylamid- Streifen sind für verschiedene pH-Gradienten und Gellängen (7-24 cm) verfügbar. Das Gel selbst ist auf eine Plastikfolie (GelBond) aufpolymerisiert. In dieser Arbeit wurden stets 18 cm lange Gelstreifen verwendet. Der entsprechende pH-Gradient im Gel wird im Folgenden angegeben.

Die bezogenen IPG-Gelstreifen wurden in dehydrierter Form geliefert. Die Rehydrierung und die IEF erfolgten in ein und derselben Halterung (*Strip-Holder*) aus Aluminiumoxid. Vor der Verwendung wurden die Halterungen mit Spülmittel (*StripHolder Cleaning Solution*,



Amersham Bioscience) gründlich gereinigt und intensiv mit  $d_4H_2O$  abgespült. Danach wurden die Halterungen unter einem Staubschutz luftgetrocknet.

### **Solubilisierung der Probe:**

Für die erste Dimension der 2D-PAGE wurde die Probe durch die sog. *in-gel* Rehydrations-technik in den IPG Gelstreifen appliziert.

Die aufzutrennende Proteinprobe wurde mindestens 1:10 in Rehydrierungslösung (s. unten) aufgenommen. Diese Suspension wurde für 15 min bei 18°C im Ultraschallbad bei max. Leistung ultrabeschallt und schließlich für weitere 15 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 20.000 x g und 18°C abzentrifugiert. Nur der Überstand wurde weiter verwandt.

Wenn nicht anders erwähnt, wurden stets 18 cm lange *IPG-DryStrips* mit einem immobilisierten linearen pH-Gradient von pH 4-7 (Amersham Bioscience) verwandt. Für die einzelnen *IPG-DryStrips* wurden geeignete Mengen an Rehydrationspuffer in die Mitte der *StripHolder* pipettiert (350  $\mu$ l für 18 cm Gelstreifen).

Die IEF-Gelstreifen wurden von ihrer Schutzfolie befreit und mit einer Pinzette vorsichtig auf die Rehydrationslösung gelegt.

Es wurde darauf geachtet, dass

- a) die Gelseite nach unten zur Rehydrierungslösung wies,
- b) die anodische Seite des Gels an der Anode der Halterung zu liegen kam und
- c) sich keine Luftblasen unter dem Gel befanden,
- d) die Probenlösung nicht auf die GelBond-Folie des IPG-Streifens läuft.

Nach erfolgreichem Auflegen der Gelstreifen wurden 1 ml *IPG-Cover Fluid* (Amersham Bioscience) auf die oben liegende GelBond-Folie pipettiert, um Verdunstung und Harnstoff-Kristallisierung vorzubeugen. Dann erfolgt abschließend das Auflegen der Abdeckungen der Halterungen, was einen guten Kontakt zwischen Gel und Elektroden gewährleistet, während das Gel quillt.

Rehydrierungslösung: Wenn im Folgenden keine weiteren Angaben gemacht sind, wurde folgender Rehydrierungslösung verwandt:

	Endkonzentration
Harnstoff	8 M
Thioharnstoff	2 M
CHAPS	4 %(w/v)
ASB-14	2 %(w/v)

DTT	40 mM
IPG Puffer (gleicher pH Bereich wie im verwendeten IPG-Streifen)	0,5 %(v/v)

Die Verdünnung der Probe mit Rehydrierungslösung war empirisch zu ermitteln. Für analytische Gele und *Western-Blotting* von 2D-Gele wurden Proteine aus ca.  $2 \times 10^7$  Parasiten, für präparative Gele wurden Proteine aus ca.  $1,5 \times 10^8$  Parasiten extrahiert.

Es wurde folgendes Protokoll für die IEF, pH 4-7, linearer Gradient, Gellänge 18 cm, angewandt:

Rehydrierung	6:00 h
30 V	6:00 h
500 V	0:30 h
1000 V	1:00 h
3000V	1:00 h
8000 V	bis 100.000 Vh erreicht waren

Maximal wurden 50  $\mu$ A/Gelstreifen zugelassen. Die Temperatur wurde bei 18°C gehalten.

### 2.2.9.2 Äquilibrieren des IEF-Gelstreifens für die zweite Dimension

Nach dem Lauf in der ersten Dimension erfolgte die weitere Auftrennung der Proteine aus dem *IPG-DryStrip* über die SDS-PAGE. Hierzu wurde der jeweilige Gelstreifen aus der IPGphor-Apparatur entnommen und in einer Einweg-Plastik-Pipette oder ein anderes passendes Gefäß mit 5 ml Äquilibrierungspuffer 1 für 15 min bei RT inkubiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Gelseite Kontakt zur Flüssigkeit hat. Danach wurde derselbe Gelstreifen in 5 ml frischem Äquilibrierungspuffer 2 für weitere 15 min bei RT inkubiert. Inkubationen erfolgten auf einem Taumeltisch.

### 2.2.9.3 Die zweite Dimension (SDS-PAGE)

Die zweite Dimension erfolgte nach dem Elektrophoresesystem nach Laemmli (1970) mit der Modifikation, dass in der vertikalen SDS-PAGE auf ein Sammelgel verzichtet wurde (siehe 2.2.6). Das Trenngel wurde bis zu einer Höhe von 0,5 cm vom oberen Glasplattenrand gegossen.

Um den *IPGDryStrip* nach der IEF auf der Oberfläche des SDS-PAGE-Gels zu fixieren, wurde circa 0,5 %-ige Lösung aus verflüssigter Agarose in Elektrophoresepuffer auf die Geloberfläche pipettiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Agaroselösung nicht zu heiß wurde (ca. 50 bis 55°C).

Der Gelstreifen wurde aus der Äquilibrungslösung entnommen, kurz in  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  geschwenkt und auf dem Laemmli-Trenngel (11 %T; 18 x 18 cm<sup>2</sup>) in der Agaroselösung platziert. Der äquilibrierte Gelstreifen lag gleichmäßig auf der Oberfläche des SDS-PAGE-Gels auf.

Zum Auftrag von Markerproteinen wurden diese in geeigneter Konzentration auf ein 0,5 cm x 0,5 cm großes Whatman-Papierstück pipettiert, welches dann auf der Trenngeloberfläche neben dem IEF-Streifen platziert wurde. Zur Erleichterung späterer Orientierung wurden die Markerproteine stets direkt neben der anodischen Seite des IEF-Gelstreifens aufgetragen. Der Lauf wurde mit 25 mA/Gel bei 25°C (Wasserbad-Kühlung) durchgeführt bis die Bromphenol Blau-Front ca. 5 mm vom unteren Gelrand entfernt war (ca. 6 h).

Nach dem Lauf wurden die Proteine im Gel mit Silber nach Heukeshoven und Dernick (1988) oder mit kolloidaler Coomassie-Färbung (Neuhoff *et al.*, 1988) sichtbar gemacht (s. unten).

Im Folgenden werden 2D-Gele so abgebildet, dass diejenige Seite des Gels links abgebildet ist, an der sich die Anode während der ersten Dimension befunden hat.

#### **2.2.9.4 Besonderheiten bei der Durchführung der 2D-PAGE im präparativen Maßstab**

Im Prinzip wurde so vorgegangen wie oben beschrieben. Allerdings wurde die Probe über *Vivaspin Columns 5000 MWCO* (Vivascience, Sartorius Group, Göttingen) entsalzt und möglichst stark eingeeengt und nach der *in-gel*-Rehydrierungsphase der rehydrierte *IPGDryStrip* mit Elektrodenplättchen verwandt.

Dazu wurde unter Verwendung von 0,5 x 0,5 cm großen, angefeuchteten Elektrodenplättchen den Anweisungen des Herstellers gefolgt.

#### **2.2.10 Proteinfärbung mit Silbernitrat**

Die Silberfärbung von Proteinen nach der SDS-PAGE bzw. 2D-PAGE wurde in der Regel modifiziert nach der Methode I von Heukeshoven und Dernick (1988) durchgeführt. Als zur Massenspektrometrie kompatible Alternative wurde die Methode II nach Blum *et al.* (1987) angewendet.

### 2.2.10.1 Methode I nach Heukeshoven und Dernick (1988)

Stamm-Lösungen:

Fixierlösung	30 %(v/v) EtOH, 10 %(v/v) Eisessig
Natriumthiosulfat-Lösung	0,02 %(w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,5 M Na-Acetat 0,5 %(v/v) GA 30 %(v/v) EtOH
Silbernitrat-Lösung	0,2 %(w/v) AgNO <sub>3</sub> , 0,03 %(v/v) Paraformaldehyd
Entwickler-Lösung	3 %(w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,02 %(v/v) Paraformaldehyd
Stop-Lösung	0,05 M Na <sub>2</sub> -EDTA

Die Gele wurden für 10 min in Fixierlösung geschüttelt. Dann erfolgte die Vorbehandlung der Gele in Natriumthiosulfat-Lösung für 20 min und das Waschen der Gele für 5 x 15 min in  $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$ . Dann wurden die Gele in Silbernitrat-Lösung für 30 min inkubiert und nochmals in  $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Die Inkubation des Gels in Entwickler-Lösung dauerte so lange bis die gewünschte Farbintensität vorhanden war. Gestoppt wurde die Färbung durch die Stop-Lösung. Die Dokumentation der Gele erfolgte durch Digitalisierung mit einer Auflösung von 300 dpi.

### 2.2.10.2 Methode II verändert nach Blum *et al.*, 1987

Lösungen:

Fixierlösung:	40 % EtOH/10 % Eisessig
Waschlösung I:	30 % EtOH
Natriumthiosulfat-Lösung:	0,02 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Silbernitrat-Lösung:	0,1 % AgNO <sub>3</sub> (abgedunkelt und bei 4°C lagern)
Entwickler-Lösung:	3 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 0,05 % Formalin
Stop-Lösung:	5 % Eisessig

Die Gele wurden für 1 Stunde oder über Nacht in Fixierlösung geschüttelt und anschließend zwei Mal 20 s in Waschlösung I gewaschen. Dann erfolgte die 1 min Behandlung mit Natriumthiosulfat-Lösung, gefolgt von 3 x 20 sek waschen in  $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$ . Vor Zugabe der Silbernitratlösung wurde die Entwicklerschale gewechselt. Die Entwicklung in AgNO<sub>3</sub>-Lösung erfolgte so lange, bis die gewünschte Intensität erreicht war. Die Färbung wurde durch 5 % Eisessig in Wasser gestoppt und das Gel in 1 % Eisessig aufbewahrt. Die Dokumentation der Gele erfolgte durch Digitalisierung mit einer Auflösung von 300 dpi.

### 2.2.10.3 Entfärbung von Silbergelen nach Gharahdaghi *et al.*, 1999

Lösungen:

30 mM  $K_4Fe(CN)_6$  /<sub>dd</sub>H<sub>2</sub>O

100 mM  $Na_2S_2O_3$  /<sub>dd</sub>H<sub>2</sub>O

Vor der Verwendung werden die Lösungen frisch im Verhältnis 1:1 gemischt. Anschließend werden pro zu entfärbendem Gelspot 30-50  $\mu$ l der Lösung zugegeben. Es erfolgt eine 30 min Inkubation bei Raumtemperatur, woraufhin die Gelstücke mehrfach mit <sub>dd</sub>H<sub>2</sub>O gespült werden.

### 2.2.11 Proteinfärbung mit kolloidalem Commassie-Brilliant-Blue G-250

Die Proteinfärbung mit kolloidalem CBB G-250 wurde mit der Methode von Neuhoff *et al.* (1988) durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

Färbelösung:                    1,4 %(w/v)  $H_3PO_4$  in <sub>dd</sub>H<sub>2</sub>O  
                                      8 %(w/v) AMS  
                                      0,1 %(w/v) CBB G-250  
                                      20 %(v/v) MeOH

Die Färbung erfolgte für 12 bis 30 h bei RT auf einem Taumeltisch. Das Fortschreiten der Färbung der Proteine im Gel wurde nach Waschen in <sub>dd</sub>H<sub>2</sub>O festgestellt.

Nach der Färbung der Proteine wurden die Gele kurz in 25 %(v/v) MeOH gewaschen und für eine stabile Aufbewahrung in 25 %(w/v) AMS gebracht.

### 2.2.12 Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran

Zum Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran wurde die *Semi-Dry-Blot*-Technik, verändert nach Towbin *et al.* (1979), angewandt. Als Transferpuffer diente SDS-Elektrophoresepuffer (siehe Kapitel 2.2.6), der mit 20 %(v/v) MeOH versetzt wurde. Proteine wurden ausschließlich auf PVDF-Membranen (Roth) transferiert. Zum Blotten wurde eine *Semi-Dry-Blot*-Aparatur mit 22 x 22 cm Elektrodenflächen (Amersham Bioscience) verwandt. Der Transfer wurde bei 1,5 mA/cm<sup>2</sup> für 1 h durchgeführt.

### 2.2.13 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer PVDF-Membran

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte über die Alkalische Phosphatase-Reaktion.

Verwendete Lösungen:

Blockpuffer:	20 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,05 %(v/v) Tween 20 150 mM NaCl 3 %(w/v) Magermilchpulver
TTBS:	20 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,05 %(v/v) Tween 20
AP-Puffer:	100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub>
Färbelösung:	150 mM BCIP 150 mM NBT in AP-Puffer

Die Membran wurde nach Elektrotransfer der Proteine für 1 h in Blockpuffer geschüttelt. Anschließend erfolgte unter leichtem Schütteln die Inkubation mit einem primären Antiserum (anti-Glycophorin, anti-Bande 3 etc.) in entsprechender Verdünnung in TTBS über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen in TTBS für 15 min wurden die Membranen mit der sekundären Antikörperlösung für 2 bis 3 h bei RT inkubiert. Sekundäre Antikörper waren mit alkalischer Phosphatase konjugiert (Sigma) und wurden dem Hersteller entsprechend verdünnt eingesetzt.

Nach wiederholtem Waschen der Membran in TTBS und AP-Puffer erfolgte die Färbereaktion durch Zugabe der Färbelösung. Die Reaktion wurde bei Erreichen der gewünschten Färbeintensität mit  $d_dH_2O$  gestoppt.

## 2.2.14 Massenspektrometrie

### 2.2.14.1 *In-gel*-Fragmentierung von Proteinen, Elution von Peptiden und deren massenspektrometrische Analyse

Verwendete Lösungen:

50 % (v/v) MeCN, 12,5 mM ABC

5 mM ABC

0,03 µg/µl Trypsin (bovin, *sequencing grade*; Roche) in 5 mM ABC für MALDI-TOF MS

0,03 µg/µl Trypsin (porcine, Promega) in 5 mM ABC für LC-ESI MS/MS

0,1 % (v/v) TFA

0,3 % (v/v) TFA in MeCN

MeCN

Matrixlösung: 8 mg/ml ACHC in 65 % (v/v) MeCN/0,1 % (v/v) TFA

Die mit kolloidaler Coomassie-Färbung sichtbar gemachten Proteine wurden so eng wie möglich aus dem 2D-Gel ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden in  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und in 1 mm<sup>3</sup> große Stücke zerschnitten. Die Gelfragmente wurden in 50 % MeCN/12,5 mM ABC gewaschen und in MeCN dehydriert. MeCN wurde dann im Vakuum entfernt. Die Gelstückchen wurden mit 0,03 µg/µl Trypsin in 5 mM ABC rehydriert und das gleiche Volumen 5 mM ABC zupipettiert. Die tryptische Spaltung der Proteine im Gel erfolgte über Nacht bei 37°C. Die tryptische Aktivität wurde durch eine finale Konzentration von 0,2 % (v/v) TFA/80 % ACN gestoppt. Peptide wurden zunächst mit 0,3 % TFA/MeCN im Ultraschallbad, dann mit 0,1 % TFA/5 % MeCN und erneuter Ultraschallbehandlung extrahiert. Die Eluate wurden vereinigt und im Vakuum eingeeengt.

#### MALDI-TOF MS

Die eingeeengten Peptide wurden mit Hilfe von ZipTip<sub>C18</sub> (10 µl Pipettenspitze mit 0,6 µl C18-Material, Millipore) konzentriert, mit 0,1 % TFA gewaschen und mit 2,5 µl Matrixlösung direkt auf eine Probenplatte (Applied Biosystems) eluiert. Die durch die Selbstspaltung von Trypsin entstandenen Peptide wurden in der nachfolgenden MALDI-TOF MS-Analyse zur internen Kalibrierung der Spektren verwendet.

#### Liquid Chromatography (LC)-Electrospray Ionization (ESI)-Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)

Die eingeeengten Peptide wurden in 6  $\mu\text{L}$  0,1% (v/v) TFA/ 5% (v/v) MeCN in Wasser aufgenommen und in LC-Gefäße überführt (Ziemer, Langerwehe) und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für die Messung aufbewahrt.

#### 2.2.14.2 LC-ESI MS/MS und Datenbanksuche

Die LC-MS Messung wurde in einem Quadrupol *Time-of-flight* Massenspektrometer durchgeführt (Q-ToF Ultima, Micromass, Manchester, UK), das mit einer Z-spray nanoelectrospray Ionenquelle und einem CapLC Flüssigchromatographiesystem (Waters GmbH, Eschborn, Germany) ausgestattet war. Für den Lauf wurden 2-5  $\mu\text{l}$  der Probe injiziert und vorkonzentriert (PepMap C18, 5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 5 mm x 300  $\mu\text{m}$  i.D.; Dionex, Idstein, Germany). Die LC-Trennung wurde auf einer Kapillarsäule (Atlantis dC18, 3  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 150 mm x 75  $\mu\text{m}$  i.D.; Waters GmbH) bei einer Elutionsrate von 200 nL/min und einem linearen Gradienten von 4-70 % Lösung B in 100 min durchgeführt. Als mobile Phase A wurde 0,1 % Ameisensäure (v/v) in MeCN/H<sub>2</sub>O (3:97, v/v), als Lösung B 0,1 % Ameisensäure in MeCN/H<sub>2</sub>O (8:2 (v/v)) eingesetzt.

Das Massenspektrometer lief im positiven Ionenmodus und es wurden PicoTip spray Kapillaren der Firma New Objective (Woburn, MA, USA) verwendet. Die MS/MS Daten wurden aufgenommen, indem jeweils das Peptid, dessen Signal im MS-Spektrum das größte war, sequenziert wurde. Die Datenanalyse wurde mit der MassLynx version 4.0 Software der Firma Micromass-Waters (Manchester, UK) durchgeführt.

Mit Hilfe der MS/MS Spektren und der Suchmaschine MASCOT (version 2.0, Matrix science Ltd, London, UK) wurde eine automatisierte *in-house* Datenbanksuche auf einem MASCOT-Server in der aktuellen NCBI Proteindatenbank durchgeführt. Bei der Analyse wurden zwei tryptische Fehlsplaltungen pro Peptid sowie eine Massentoleranz von 150 ppm für Vorläuferionen bzw. 0,1 Da für Sekundärionen zugelassen. Die Carbamidomethylierung von Cysteinen sowie die mögliche Oxidation von Methioninresten wurden bei der Suche berücksichtigt. Ein Protein wurde als signifikant gewertet, wenn mindestens zwei zugehörige Peptide als einwandfrei zu dem Protein gehörend identifiziert wurden (Carr *et al.*, 2004).

#### 2.2.14.3 MALDI-TOF MS und Datenbanksuche

Peptide-Mass-Fingerprints (PMF) von Proteinen, die mittels 2D-PAGE aufgetrennt worden waren, wurden mit einem MALDI-TOF Voyager DE STR Massenspektrometer (Perseptive Biosystems) am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin (FMP Berlin, Abtlg. für Peptidchemie/Massenspektrometrie, Dr. E. Krause) generiert. Messungen wurden im



positiven Reflectron-Modus mit einer angelegten Spannung von 20 kV durchgeführt. Die Spektren wurden mit dem Programm Voyager Data Explorer Version 3.5.0.0 kalibriert.

Die Peptidmassen der generierten PMF wurden zur Suche in Proteinsequenz-Datenbanken verwandt. Dazu wurde das Programm MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml/msfit.htm>) benutzt. Die Datenbanksuchen beschränkten sich auf die nicht-redundante NCBI Datenbank. Es wurde stets eine Massentoleranz von  $\pm 0,07$  Da zugelassen. Oxidierte Methionine, eine tryptische Fehlsplaltung pro Peptid und die Carbamidomethylierung von reduzierten Cysteinresten wurden bei den Suchen berücksichtigt.

Im späteren Verlauf des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit wurden die MALDI-TOF Analysen im eigenen Labor an einer *4700 Proteomics Analyzer Workstation* (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) durchgeführt. Die Messung erfolgte im positiven Reflectron Modus bei einer angelegten Spannung von 20 kV. Es wurden 1000 Laserschüsse für jedes Spektrum akkumuliert. Für die Datenbankanalyse der Spektren wurde die GPS Explorer Software V 3.6 verwendet. Die Identifikation der Proteine erfolgte durch Suche in der nicht redundanten NCBI-Datenbank durch die MASCOT V2.0 Suchmaschine. Die Suche wurde auf humane und plasmodiale Proteine begrenzt. Bei der Suche wurde die Carbamidomethylierung von Cysteinresten obligatorisch, sowie die Oxidation von Methionin als variable Modifikation berücksichtigt. Es wurde maximal eine tryptische Fehlsplaltung pro Peptid erlaubt. Die Massentoleranz wurde auf 50 ppm gesetzt.

### 3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteomanalysen von Merozoiten sowie subzellulärer Membranstrukturen von *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrocyten durchgeführt. Hierfür wurden unterschiedliche Elektrophoresetechniken für die Separation der Proteine angewendet (1D-PAGE und 2D-PAGE). Die anschließende Proteinidentifikation erfolgte unter Verwendung zweier unterschiedlicher massenspektrometrischer Verfahren (MALDI-TOF-MS und LC-ESI-MS/MS).

Aus den bei der Analyse der subzellulären Membransysteme identifizierten, als hypothetisch annotierten, Proteine wurden fünf für die genauere Charakterisierung ausgewählt.

So wurden drei neue Merozoitenoberflächenproteine, ein Rhoprienprotein sowie ein Protein der parasitophoren Vakuolenmembran beschrieben.

#### 3.1 Synchronisation der intraerythrocytären Entwicklung von *P. falciparum* und Anreicherung von murenen Schizonten

Sowohl für die Analyse der Merozoiten- als auch der PVM/TVN-Fraktion war es notwendig, mature Schizonten von früheren Stadien sowie nicht infizierten Erythrocyten zu trennen. Hierfür wurde die Parasitenentwicklung zunächst mit Hilfe des in 2.2.1.5 beschriebenen Verfahrens synchronisiert.

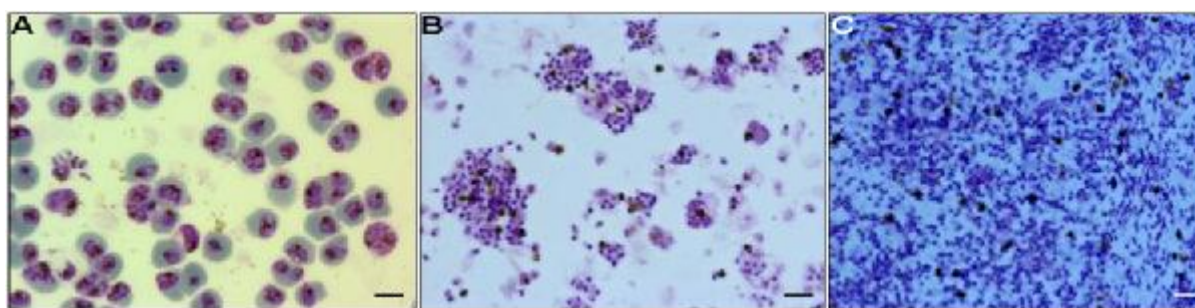
Nach der Synchronisation wurden die Zellen unter normalen Bedingungen so lange weiterkultiviert, bis überwiegend späte Trophozoiten bis Schizonten im Giemsa-gefärbten Ausstrich erkennbar waren. Nun erfolgte die Anreicherung der Zellen, wofür drei Methoden zur Verfügung standen: 1) Anreicherung über ein 65 %-Percoll-Kissen (siehe 2.2.1.6), 2) Anreicherung durch Flotation in Gelafundin/RPMI (siehe 2.2.1.7), 3) Anreicherung mit Hilfe des in 2.2.1.8 beschriebenen, magnetischen Separationsverfahrens (QuadroMACS, Miltenyi Biotec).

Bei der ersten Methode wurden infizierte Erythrocyten (iRBC) sedimentiert und vorsichtig auf ein 65 %-iges Percoll/PBS-Kissen gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt befanden sich die maturen Zellen in der Interphase zwischen Percoll-Kissen und dem Überstand. Mit Hilfe einer Pipette wurden die Zellen vorsichtig abgenommen und die Parasitämie im Giemsa-Ausstrich überprüft. Bei der zweiten Methode wurden sedimentierte iRBC mit einer Gelafundin/RPMI Mischung versetzt. Durch das Vorhandensein von KNOBS an der Oberfläche der Wirtszelle flotierten mature iRBC im Überstand während junge Stadien und

nichtinfizierte Erythrocyten absanken und ein lockeres Sediment bildeten. Auch hier wurde die Reinheit der Kultur jeweils im Giemsa-gefärbten Ausstrich überprüft. Mit Hilfe der dritten Methode waren iRBC sehr effizient und schonend anreicherbar. Sie eignete sich jedoch nur für kleine Zellzahlen.

Der Vorteil der ersten Methode ist das Erzielen einer hohen Parasitämie von mindestens 95 %. Die Zellen werden jedoch stärker in Mitleidenschaft gezogen, so dass sie eine Regenerationsphase benötigten, um weiter kultiviert werden zu können. Mit der zweiten Methode wurde eine Parasitämie von etwa 75-85 % erzielt. Die Zellen wirkten nicht gestresst und eigneten sich somit gut für die weitere Kultur sowie Fixierungen für die Mikroskopie. Die magnetische Separationsmethode erzielte eine Reinheit von 90 %, erwies sich jedoch als wenig praktikabel.

### 3.2 Isolation von PEMS (nach Salmon *et al.*, 2001)



**Abb. 9: Giemsa-gefärbte Ausstriche von angereicherten infizierten Erythrocyten (A), PEMS (B) und Merozoiten (C)**

Der Größenbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Nach den Untersuchungen von Salmon *et al.* (2001) eignen sich durch E64 Behandlung erzeugte PEMS hervorragend als Startmaterial für die weitere Untersuchung von Merozoiten sowie subzellulärer Membranstrukturen wie PVM/TVN. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es gewesen, auf diesem Weg die beiden Fraktionen anzureichern und bisher unbekannte Proteine zu charakterisieren. Ein Schwerpunkt sollte hierbei auf der Untersuchung der subzellulären Membranstrukturen liegen.

Für die Präparation von PEMS wurden iRBC angereichert und anschließend in Mikrotiterplatten weiter kultiviert, bis überwiegend Schizonten vorlagen (Abb. 9 A). Nun folgte eine 8 bis 10-stündige Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  E64 unter Standardbedingungen.

Nach der Inkubation wurden verbliebene Erythrocyten und iRBC durch Zentrifugation entfernt. Die von der PVM umschlossenen Merozoitencluster befanden sich im Überstand (SNT) und wurden vorsichtig durch eine weitere Zentrifugation sedimentiert. Das Sediment wurde vorsichtig in 1,5 ml *Disruption-Buffer* gewaschen und die Reinheit im Ausstrich

überprüft (Abb. 9 B). Die so gewonnenen PEMS wurden in der Regel direkt weiter verarbeitet oder alternativ mit einem Cocktail aus Protease-Inhibitoren versetzt und bei -80°C gelagert.

### 3.2.1 Präparation von Merozoiten

Um Merozoiten zu isolieren, wurden PEMS als Ausgangsmaterial verwendet. Das Startmaterial wurde in *Disruption-Buffer* aufgenommen und durch eine Kanüle gepresst. Durch die Scherkräfte sollte man eine Suspension aus Merozoiten und Membran-Fragmenten erhalten, die beide durch Zentrifugation separiert werden sollten. Im gefärbten Ausstrich wurde die strukturelle Integrität der Merozoiten überprüft (Abb. 9 C). Zusätzlich wurden nicht infizierte Erythrocyten mit einem Aliquot isolierter Zellen inokuliert, um Viabilität und Invasivität der Merozoiten zu überprüfen. Bei Überprüfung von Giemsa-gefärbten Ausstrichen dieser Kulturen nach 24 bzw. 48 Stunden waren jedoch keine infizierten Erythrocyten nachweisbar.

Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abgenommen und für die Präparation von PVM/TVN verwendet. Die übrigen Merozoiten sowie der PVM/TVN enthaltende Überstand wurden mit Protease-Inhibitorcocktail (Complete; Roche) versetzt und bei -80°C gelagert oder direkt weiter verarbeitet.

### 3.3 Untersuchung der Merozoiten-Fraktion

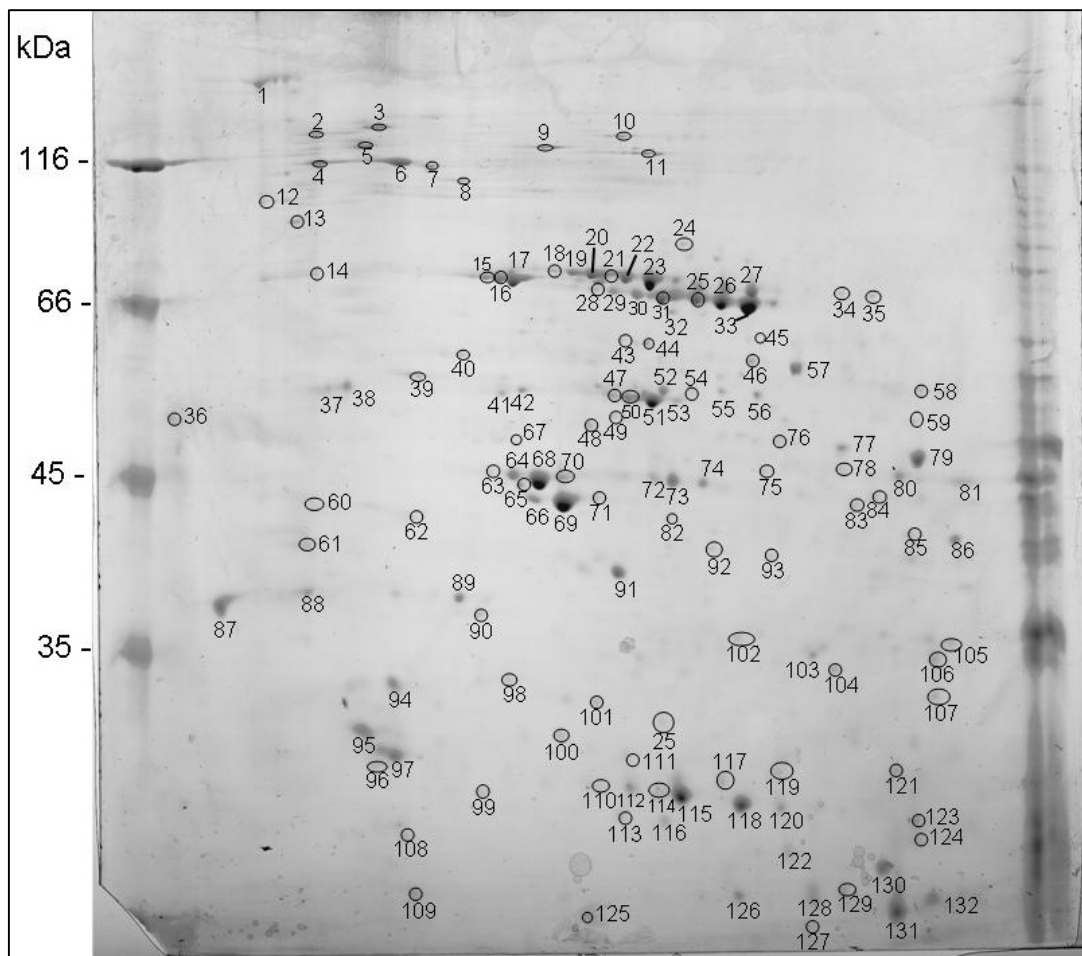
Mit Hilfe der in 3.2.1 beschriebenen Methode wurden die invasiven Stadien von *Plasmodium falciparum* angereichert und gereinigt. Diese Merozoiten wurden als Ausgangsmaterial für die Analyse des Proteoms dieser Stadien verwendet. Die Proteine wurden durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert und mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert (Abb. 10).

Für die massenspektrometrische Analyse wurden die per 2D-PAGE separierten Proteine aus dem Gel ausgestochen und, wie in 2.2.14.1 beschrieben, tryptisch prozessiert. Die resultierenden Peptide wurden in Kooperation mit Dr. E. Krause (Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) auf einer Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation (PerSeptive Biosystems, Framingham, USA) untersucht und die Proteine per *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) identifiziert.

Von den 132 untersuchten Protein-Spots waren 72 % als plasmodial und 14 % als human bzw. bovin identifiziert worden. Die übrigen 14 % waren nicht zu identifizieren (Abb. 11 A). Sechs der Kontaminationen waren auf bovines Albumin, den Hauptbestandteil von AlbuMAX II (Gibco) zurückzuführen, mit dem das Kulturmedium supplementiert wurde. Bei den übrigen

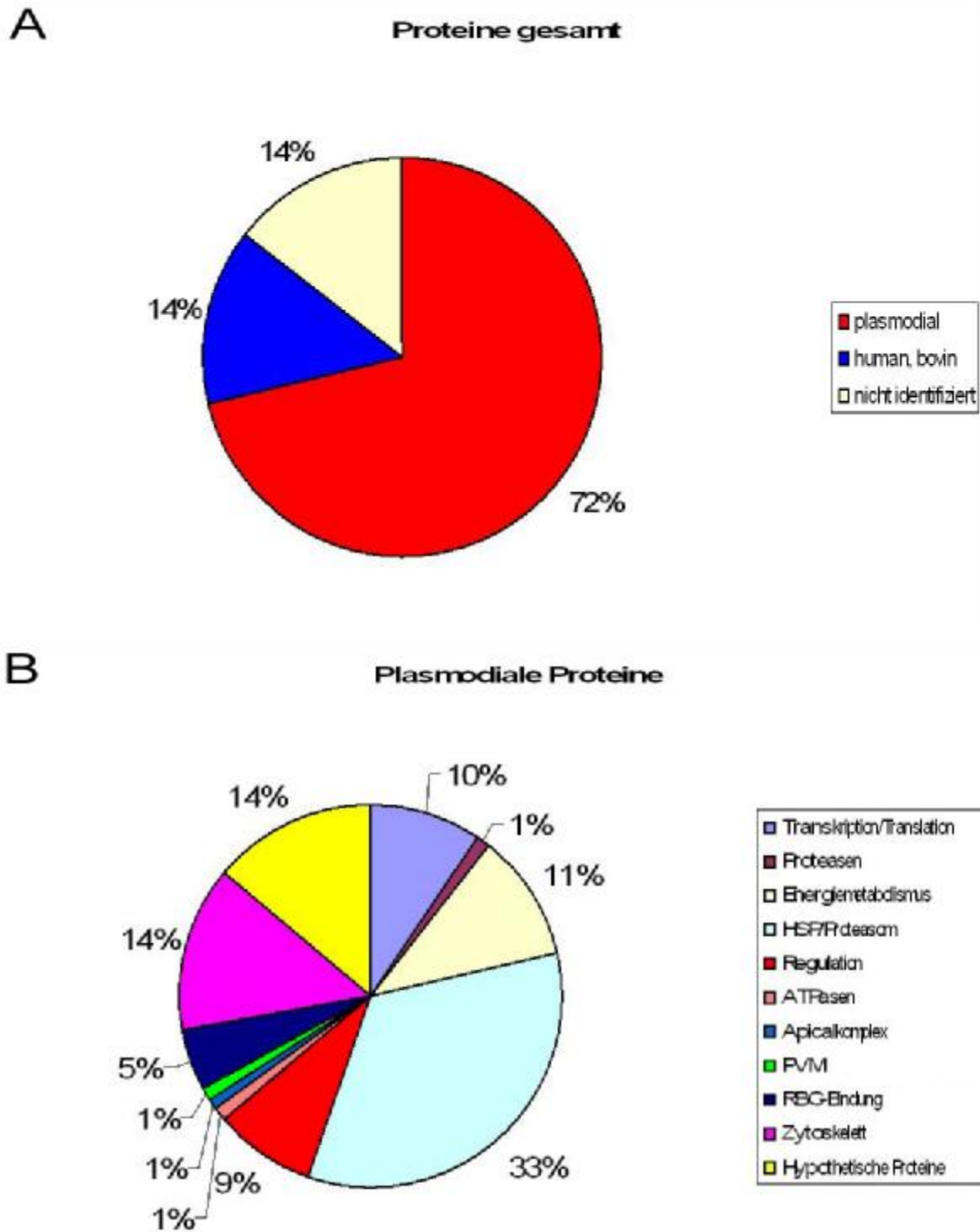
handelt es sich hauptsächlich um humane Proteine, die mit der Plasmamembran des Erythrocyten assoziiert sind (z.B. Spektrin, Bande 4.1, Cytoskelettproteine) (Kakhniashvili *et al.*, 2004). Die Tatsache, dass nur wenige erythrocytäre Proteine identifiziert wurden, spricht für den hohen Reinheitsgrad der Präparation.

80 % der plasmodialen Proteine war eine stadienunspecifische zelluläre Funktionen und/oder Lokalisationen zugeordnet worden. 6 % waren bekannt, spezifisch für Merozoiten zu sein. Zu dieser Gruppe gehörten Proteine der apikalen Sekretionsorganellen sowie bekannte Merozoiten-Oberflächen-Proteine die an der Bindung nicht infizierter Erythrocyten beteiligt sind. 14 % waren in der Datenbank als hypothetische Proteine annotiert (Abb. 11 B). Für 15 % der identifizierten Proteine wurde ein Signalpeptid vorhergesagt (Nielsen und Krogh, 1998), bzw. wurde in der Literatur bereits als solches beschrieben. Fünf Prozent wiesen eine hydrophobe Sequenz auf, die als Transmembrandomäne gedeutet wurde (Krogh *et al.*, 2001).



**Abb. 10: 2D-Gel mit aufgetrennten Proteinen aus einem Gesamtextrakt angereicherter Merozoiten**

In der ersten Dimension wurde ein pH-Gradient von 4-7 verwendet. Die Markierungen sowie die Numerierung zeigen die für die MALDI-TOF MS-Analyse ausgewählten Proteine. Links sind die molekularen Massen des verwendeten Größenstandards in kDa angegeben.



**Abb. 11: Prozentuale Verteilung der identifizierten Proteine aus dem Merozoitengel**

A) Herkunft der identifizierten Proteine sowie durch den *Peptide Mass Fingerprint* nicht identifizierbare Proteine

B) Lokalisation bzw. Funktion sowie bisher als hypothetisch annotierte, plasmodiale Proteine

### 3.4 Untersuchung subzellulärer Membranstrukturen

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Proteine subzellulärer Membranstrukturen von *P. falciparum* infizierten Erythrocyten.

Da es sich in diesem Fall um zu analysierende Membranproteine handelt, wurde die Probe über eine normale SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per LC-ESI-MS/MS analysiert (Abb. 13). Durch diese Vorgehensweise sollte vermieden werden, dass es durch die schlechte Solubilisierbarkeit von Membranproteinen in der 2D-Gelelektrophorese zu einer Unterschätzung des Membranproteoms kommt.

Um die Ergebnisse dieser Analyse zu verifizieren, wurde nach dem ersten Ansatz ein Zweiter mit folgenden Veränderungen gestartet:

- Aufgrund der zahlreichen identifizierten, löslichen Proteine wurde die Membranfraktion mit Hochsalzpuffer gewaschen. Die Membranen wurden anschließend sedimentiert, und die Proteine des Überstands mit Trichloressigsäure ausgefällt.
- Beide Fraktionen wurden in Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Verbesserung der Auflösung wurde diesmal ein 5 bis 16 %-Gradientengel verwendet (Abb. 17).

Die beiden Ansätze sind im Folgenden jeweils mit Präp-1 bzw. Präp-2 bezeichnet.

#### 3.4.1 Präparation subzellulärer Membranstrukturen

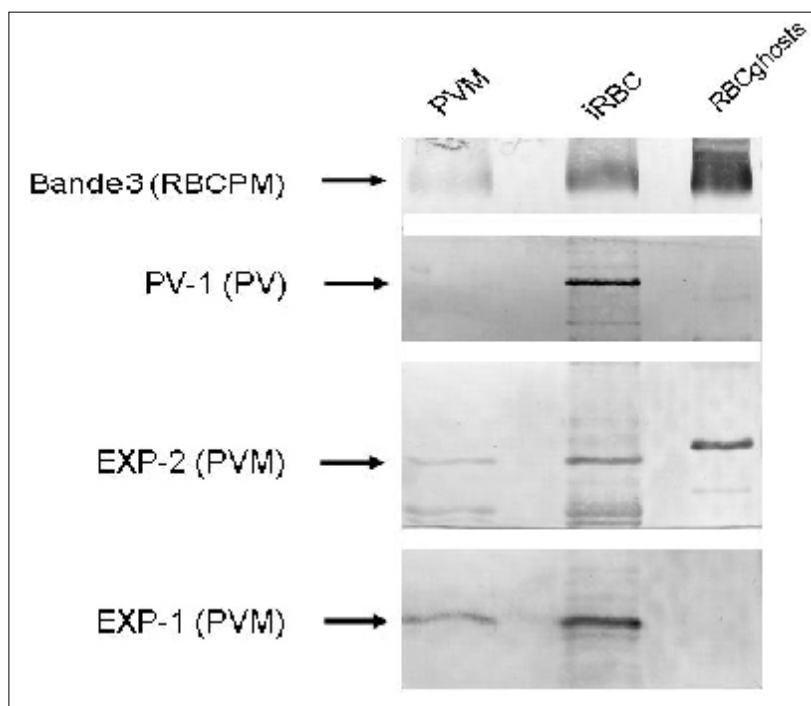
Für die Präparation der von *P. falciparum* innerhalb der Wirtszelle ausgebildeten Membransysteme wurde der von den Merozoiten abgenommene Überstand aus unterschiedlichen Präparationen vereinigt und in der Ultrazentrifuge pelletiert.

Die Reinheit der Präparation wurde per Western-Blot überprüft (Abb. 12). Hierfür wurden die Proteine auf der PVDF-Membran mit anti-Bande 3 Antikörpern, anti-PV-1 Serum sowie anti-EXP-1 und anti-EXP-2-Serum inkubiert (Fischer *et al.*, 1998; Nyalwidhe *et al.*, 2006). Die nachgewiesenen Proteine sollten jeweils als Marker für folgende Strukturen dienen:

Bande 3	à RBC-Plasmamembran
PV-1	à parasitophore Vakuole
EXP-1 / EXP-2	à subzelluläre Membransysteme (PVM/TVN)

In Abb. 12 ist zu sehen, dass die angereicherte Membran-Fraktion, verglichen mit iRBC und RBCghosts, nur ein schwaches Bande 3-Signal aufweist, was darauf hindeutet, dass nur wenig RBC-Plasmamembrankontaminationen in der Präparation vorhanden waren. Auch Verunreinigungen von Proteinen der parasitophoren Vakuole scheinen vernachlässigbar, da kein Signal des löslichen Proteins PV-1 zu erkennen ist (Nyalwidhe *et al.*, 2006). Die beiden

PVM/TVN-Marker EXP-1 und EXP-2 ergeben jedoch deutliche Signale (Günther *et al.*, 1991; Fischer *et al.*, 1998). Die bei RBCghosts bei Inkubation mit anti-EXP-2 auftretende Bande wurde bereits als Kreuzreaktion des Serums mit einem Erythrocytenprotein beschrieben (Fischer *et al.*, 1998).



**Abb. 12: Überprüfung der Reinheit der angereicherten Membransysteme**

PVM: parasitophore Vakuolenmembran; iRBC: infizierter Erythrocyt; RBCghost: Plasmamembran von Erythrocyten ohne Cytoplasma; Bande 3: Membranprotein der Plasmamembran von Erythrocyten; PV-1: lösliches Protein der parasitophoren Vakuole (Nyalwidhe *et al.*, 2006); EXP-1: Protein der PVM (Günther *et al.*, 1991); EXP-2: Protein der PVM (Fischer *et al.*, 1998)

### 3.4.2 Analyse der Proteine mit Hilfe von LC-ESI MS/MS

#### 3.4.2.1 Analyse der Proteine aus Präp-1

Nach der eindimensionalen Gelelektrophorese wurden in Präp-1 31 Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und die Proteine tryptisch gespalten (Abb. 13). Die Analyse der resultierenden Peptide wurde, wie in 2.2.14.2 beschrieben, in Kooperation mit Dr. E. Krause und Dr. M. Schümann am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin durchgeführt.

Insgesamt wurden 394 Proteine signifikant identifiziert. 92 % der identifizierten Proteine stammten von *Plasmodium falciparum* (siehe Anhang 7.1, Tabelle 2). Bei 8 % der Proteine handelte es sich um Kontaminationen erythrocytären (31 Mal), bovinen (1x Albumin) oder porcinen (1x Trypsin) Ursprungs (Abb. 14 A).



Bovines Albumin ist Hauptbestandteil des Kulturmediumsupplements AlbuMax II (Invitrogen). Porcines Trypsin (Promega) wurde für die *in-Gel*-Spaltung der Proteine eingesetzt. Bei den erythrocytären Komponenten handelt es sich in der Hauptsache um Proteine der RBC-Plasmamembran (u.a. Bande 3, 4.1, 4.9, 7; Spektrin; Stomatin; Blutgruppenantigene), des Cytoskeletts (u.a. Actin; Tropomodulin), Hämoglobin, mehrere cytosolische Proteine sowie verschiedene Keratinvarianten (Kakhniashvili *et al.*, 2004). Bei einem der identifizierten Proteine handelt es sich um ein *detergent resistant-membrane* Protein der Plasmamembran von Erythrocyten: Flotillin. Es wurde im Laufe der intraerythrocytären Differenzierung auch PVM-assoziiert nachgewiesen (Murphy *et al.*, 2004).

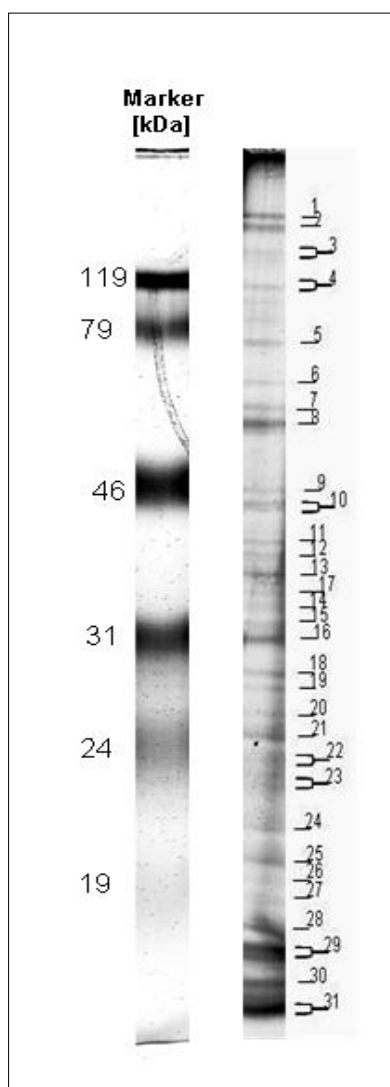
Von den 361 plasmodialen Proteinen waren 49 % bereits als membranassoziiert beschrieben bzw. es wurde eine oder mehrere Transmembrandomänen vorhergesagt (Abb. 14 B) (Krogh *et al.*, 2001).

Abb. 15 zeigt die prozentuale Verteilung der identifizierten plasmodialen Proteine. Die Kategorien sind hauptsächlich funktionell gewählt. Die Proteine des Apikalkomplexes bzw. der PVM sind ihrer Lokalisation entsprechend eingeordnet, da ihre Funktion noch nicht bekannt ist.

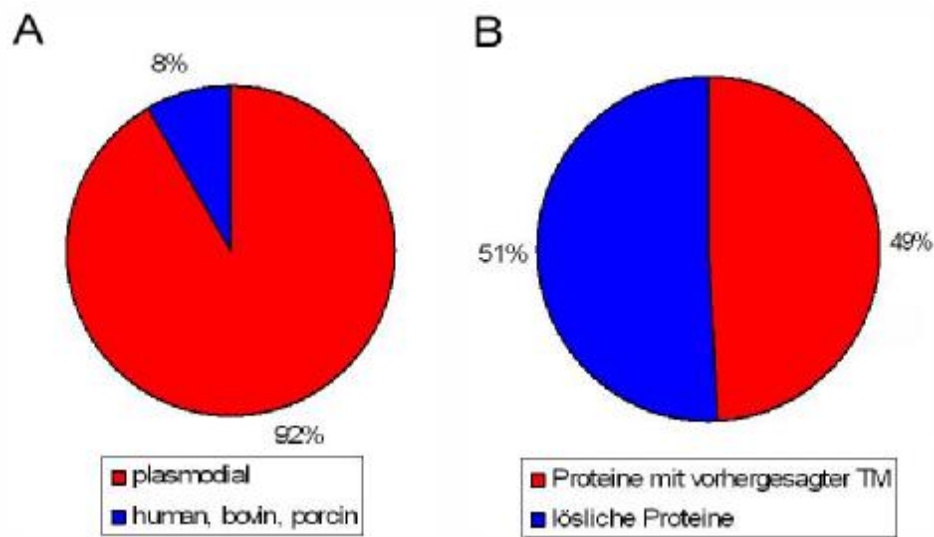
Eine große Fraktion besteht aus an der Transkription bzw. Translation beteiligten Proteinen. Hier fallen insbesondere die 49 identifizierten, unterschiedlichen ribosomalen Untereinheiten ins Gewicht. Eine weitere Gruppe sind verschiedene tRNA-Ligasen sowie DNA- bzw. RNA-bindende und/oder modifizierende Proteine (u.a. Helicasen, Histone, DNA- und RNA-Polymerasen, Topoisomerasen, Translations- und Replikationsfaktoren).

14 % der identifizierten Proteine sind am Energiemetabolismus des Parasiten beteiligt, 9 % sind *heat-shock* Proteine sowie Proteasomen-Untereinheiten bzw. Komponenten des Ubiquitinsystems. Acht Prozent haben regulatorische Funktion (u.a. Kinasen, GTPasen). Drei Prozent sind Proteasen, die unterschiedliche Lokalisationen aufweisen. Unter anderen wurde die *histo-aspartic protease* (HAP; Banerjee *et al.*, 2002) sowie Falcilysin und Plasmepsin 1 und 2 der Nahrungsvakuole identifiziert (Banerjee *et al.*, 2002; Murata und Goldberg 2003; Siripurkpong *et al.*, 2002). SERP I/SERA ist ein Marker der parasitophoren Vakuole (Delplace *et al.*, 1987).

Vier Prozent der Proteine sind an vesikulären Transportprozessen beteiligt (u.a. ein putatives SNARE-Protein, Syntaxin, *vacuolar sorting protein*), 2 % sind Ionenpumpen von denen verschiedene ATPase-Untereinheiten identifiziert wurden. Komponenten des Cytoskeletts sind ebenfalls zu 2 % vertreten (u.a. Actin 1&2,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, sowie Cytoskelett-assoziierte Proteine wie Myosin oder *actin depolymerizing factor*) (Morrissette und Sibley 2002).



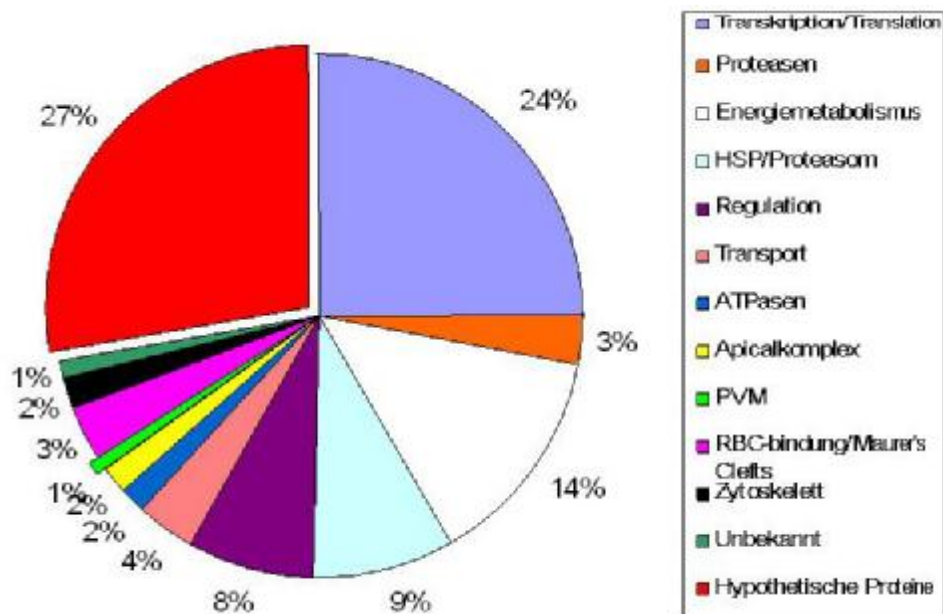
**Abb. 13: Eindimensionale SDS-PAGE mit aufgetrennten Proteinen aus Präp-1**  
Für die Separation wurde ein 11 %iges Gel verwendet. Die Numerierung kennzeichnet die für die LC ESI-MS/MS-Analyse ausgewählten, Coomassie Brilliant Blue-gefärbten Proteinbanden.  
Links sind die molekularen Massen des verwendeten Größenstandards in kDa angegeben.



**Abb. 14: Prozentuale Verteilung identifizierter Proteine aus Präp-1**

A) Herkunft der identifizierten Proteine

B) Anteil löslicher Proteine bzw. Proteine mit per TMHMM2-Algorithmus vorhergesagter Transmembrandomäne



**Abb. 15: Prozentuale Aufteilung aller in Präp-1 identifizierten plasmodialen Proteine**

Die Proteine wurden soweit möglich nach Funktion und Lokalisation eingeteilt. Außerdem sind Proteine mit unbekannter Funktion/Lokalisation sowie bisher als hypothetisch annotierte Proteine aufgeführt.

Proteine der apikalen Sekretionsorganellen waren zu 2 % vertreten. So wurden etwa die Rhoprienproteine AMA-1 (Narum und Thomas, 1994), RhopH1, RhopH3, RAP-1, RAP-2 und RAP-3 identifiziert (Holder *et al.*, 1985; Cooper *et al.*, 1988; Ridley *et al.*, 1990; Howard und Reese, 1990). Das *Ring infected Erythrocyte Surface Antigen* (RESA) lokalisiert in den *Dense Granules* (Aikawa *et al.*, 1990; Culvenor *et al.*, 1991).

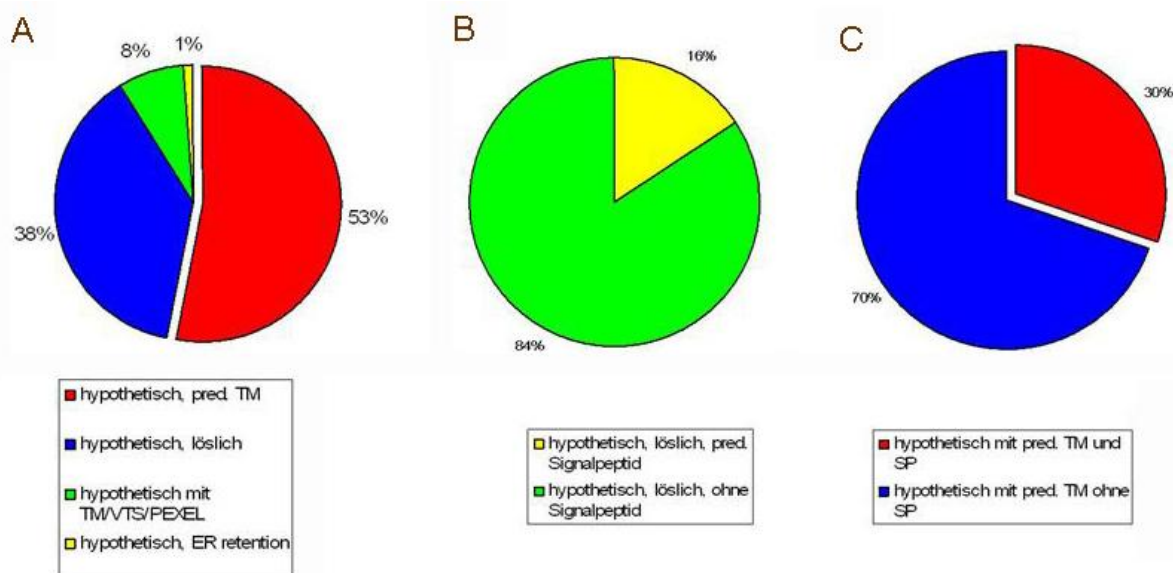
Die für diese Studie mit am interessantesten Proteine der parasitophoren Vakuolenmembran sowie des tubovesikulären Netzwerks ergaben zusammen 4 % der Gesamtproteine. Drei der fünf bisher beschriebenen PVM-lokalisierten Proteine wurden ebenfalls identifiziert. Hierzu gehört das Transmembranprotein EXP-1 (Günther *et al.*, 1991), sowie das PVM-assoziierte Protein EXP-2 (Johnson *et al.*, 1994). Außerdem wurde das *early transcribed membrane protein 10.2* (ETRAMP10.2) nachgewiesen, das ebenfalls ein Transmembranprotein der PVM ist (Spielmann *et al.*, 2003; Spielmann *et al.*, 2006). Sowohl EXP-1 als auch Vertreter der ETRAMP-Familie bilden vermutlich Komplexe mit anderen, bisher nicht beschriebenen, Proteinen (Spielmann *et al.*, 2006). Es ist davon auszugehen, dass sich derartige Interaktionspartner unter den identifizierten hypothetischen Proteinen befinden.

Die beiden als transient PVM-lokalisiert beschriebenen Proteine PfCG2 (Cooper *et al.*, 2005) sowie das plasmodiale Stomatin-Ortholog (Hiller *et al.*, 2003) sind in diesem Ansatz nicht nachgewiesen worden.

Drei Prozent sind Merzoiten-Oberflächenproteine, die für die Bindung von Erythrocyten benötigt werden sowie Proteine, die in den *Maurer's Clefts* lokalisiert sind: RIFIN (Khattab und Klinkert, 2006), KAHRP (Culvenor *et al.*, 1987), BAEBL (Mayer *et al.*, 2001), PfEMP2 (Lustigmann *et al.*, 1990), MSP-1 (Blackman *et al.*, 1998), MSP-7 (Mello *et al.*, 2004), MSP-9 (Vargas-Serrato *et al.*, 2002). Einem Prozent der identifizierten Proteine war keine Funktion oder Lokalisation zuzuordnen.

Die verbleibenden 27 % der identifizierten Proteine waren in der NCBI-Datenbank als hypothetisch annotiert (Abb. 15). Für ein Prozent dieser Proteine wurde die *KDEL*-Aminosäuresequenz vorhergesagt, die als Retentionssignal für das Endoplasmatische Retikulum beschrieben ist (Abb. 16 A) (Munro und Pelham, 1987; Pelham, 1990). 8 % der Proteine weisen eine potentielle Transmembrandomäne sowie ein *vacuolar translocation signal* (VTS) bzw. das so genannte PEXEL-Motiv auf. Diese deuten darauf hin, dass die Proteine vom Parasiten gebildet und in die Plasmamembran der Wirtszelle integriert werden (Abb. 16 A) (Horrocks und Muhia, 2005; Lingelbach und Przyborski, 2006). Bei 38 % der hypothetischen Proteine handelt es sich vermutlich um lösliche Proteine (Abb. 16 A), von denen für 16 % ein Signalpeptid vorhergesagt wurde (Abb. 16 B) (Nielsen und Krogh, 1998). Für den größten Teil der hypothetischen Proteine wurde mindestens eine Transmembrandomäne mit dem TMHMM2-Algorithmus vorhergesagt (Abb. 16 A) (Krogh *et al.*, 2001).

Von den 53 hypothetischen Proteinen mit vorhergesagter Transmembrandomäne wurde für 30 % zusätzlich noch ein Signalpeptid vorhergesagt (Abb. 16 C).



**Abb. 16: Charakteristika der identifizierten und als hypothetisch annotierten Proteine aus Abb. 15**

A) Verteilung der als hypothetisch annotierten Proteine nach den Eigenschaften: löslich, vorhergesagte Transmembrandomäne, PEXEL/VTS sowie ER-Retentionssignal

B) Vergleich von löslichen, als hypothetisch annotierten Proteinen mit und ohne Signalpeptid

C) Vergleich von den als hypothetisch annotierten Proteinen mit vorhergesagter Transmembrandomäne sowie mit oder ohne Signalpeptid

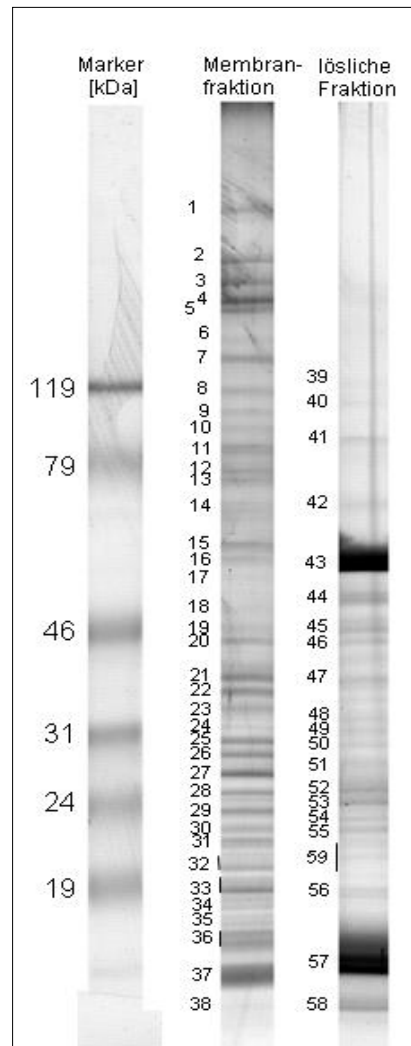
TM: Transmembrandomäne; VTS: *vacuolar translocation signal*; PEXEL: *Plasmodium export element*; ER: Endoplasmatisches Retikulum

### 3.4.2.2 Analyse der Proteine aus Präp-2

In Präp-2 wurden 344 Proteine aus 58 Banden signifikant identifiziert (Abb. 17; Daten: siehe Anhang 7.2, Tabelle 3). 44 % der identifizierten Proteine waren identisch mit denen aus Präp-1 (Abb. 18).

Wie in der ersten Analyse wurden drei der bisher beschriebenen PVM-Proteine EXP-1, EXP-2 und ETRAMP10.2 identifiziert (Günther *et al.*, 1991; Fischer *et al.*, 1998; Spielmann *et al.*, 2003), während PfStomatin und PfCG2 nicht nachgewiesen wurden (Hiller *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2005).

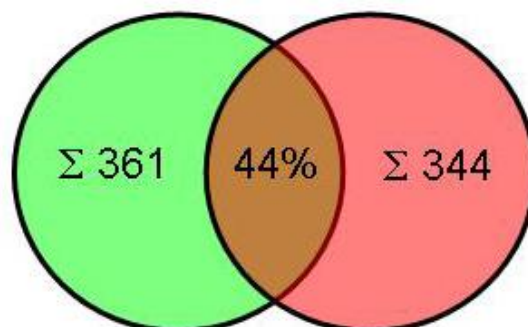
Von den fünf in Abschnitt 3.5 genannten Proteinen, die als Antigen für die Produktion von Antikörpern ausgewählt wurden, waren vier erneut identifiziert worden (PFL1415w, PF14\_0201, PFE0395c, PF10\_0372).



**Abb. 17: Eindimensionale SDS-PAGE mit aufgetrennten Proteinen aus Präp-2**

Für die Separation wurde ein 5-16 %iges Gradientengel verwendet. Die Numerierung kennzeichnet die für die LC ESI-MS/MS-Analyse verwendeten Proteinbanden.

Links sind die molekularen Massen des verwendeten Größenstandards in kDa angegeben.

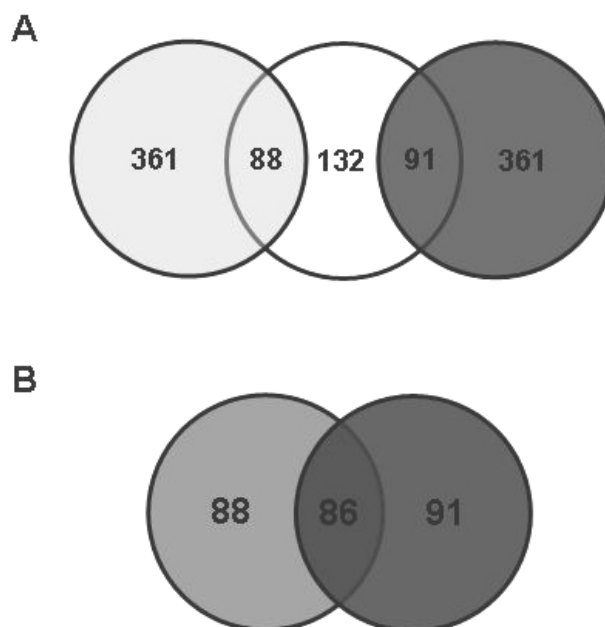


**Abb. 18: Vergleich der identifizierten Proteine aus Präp-1 und Präp-2**

In der ersten Analyse wurden 361 Proteine identifiziert (grün), in der zweiten 344 (rot). 44 % der Proteine auf Präp-2 wurden auch in Präp-1 identifiziert (braun).

### 3.4.3 Vergleich der identifizierten Proteine der Merozoitenpräparation mit den Resultaten von Präp-1 und Präp-2 subzellulärer Membransysteme

Von den 132 (Abb. 19 A: weiß), mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese separierten und hinterher mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie identifizierten Proteinen aus der Merozoitenpräparation (siehe 3.3) wurden 67 % (Abb. 19 A: hellgrau) auch in Präp-1 (insgesamt 361) und 69 % (Abb. 19 A: dunkelgrau) der Proteine in Präp-2 (insgesamt 361) identifiziert. Die mittels LC-ESI-MS/MS analysierten Proteine aus Präp-1 und -2 (siehe 3.4.2), die auch in der Merozoitenproteinanalyse nachgewiesen wurden, waren zu 98 % identisch (Abb. 19 B).



**Abb. 19: Vergleich der Merozoitenpräparation mit Präp-1 und Präp-2**

A) weiß: Identifizierte Proteine der Merozoiten 2D-PAGE; hellgrau: Identifizierte Proteine in Präp-1; dunkelgrau: Proteine aus Präp-2  
B) sowohl in der Merozoiten-, als auch in Präp-1 (hellgrau) sowie in Präp-2 (dunkelgrau) identifizierte Proteine

### 3.5 Auswahl von fünf Kandidatenproteinen für die Generierung von Antikörpern

Aus den Datenbankanalysen der Proteomdaten zwecks Identifikation hypothetischer Proteinen sollten fünf Kandidaten als Antigene zur Generierung von Antisera ausgewählt werden, um potentielle neue PVM/TVN-Proteine beschreiben zu können. Für die Auswahl wurden folgende Kriterien angewandt:

#### 1) Durch den TMHMM2-Algorithmus sollte mindestens eine Transmembrandomäne vorhergesagt sein

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit sollte auf der Identifizierung und Charakterisierung bisher noch nicht beschriebener Proteine der parasitophoren Vakuolenmembran und des tubovesikulären Netzwerks liegen. Um die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem ausgewählten Protein in der Tat um ein Transmembranprotein handelt, zu erhöhen, wurde der TMHMM2-Algorithmus von Krogh *et al.* (2001) für die Vorhersage von Transmembranhelices verwendet.

#### 2) Es sollte ein Signalpeptid vorhergesagt sein

Die Vorhersage eines Signalpeptides durch den SignalP-Algorithmus von Nielsen und Krogh (1998) sollte ein weiteres Auswahlkriterium darstellen. Da es sich bei der parasitophoren Vakuolenmembran oder dem TVN augenscheinlich um ein sehr spezielles Ziel handelt, ist davon ausgegangen worden, dass die Proteine über ein Signalpeptid dorthin dirigiert werden. Würde es sich bei den ausgewählten Kandidaten schließlich tatsächlich um Proteine dieser subzellulären Membranstrukturen handeln, so wäre es ggf. möglich, durch Vergleich der betreffenden Sequenzabschnitte generelle Aussagen über potentielle „*targeting signals*“ treffen zu können.

#### 3) Das Protein sollte keine homologen Sequenzabschnitte zu anderen Protein- oder Enzymklassen aufweisen

Eine der dieser Arbeit zugrunde liegenden Ideen war die Identifikation der von Desai *et al.* (1993) postulierten Pore bzw. deren eventuelle Untereinheiten. Da nicht davon auszugehen war, dass solche strukturellen Proteine Homologien zu anderen, bekannten Proteinen aufweisen, sollten derartige Sequenzabschnitte als Selektionsgrundlage dienen.

#### 4) Per PSI-BLAST-Suche sollten orthologe, hypothetische Proteine in anderen Plasmodienspecies oder Apicomplexa gefunden werden



Die Überlegung bei der Auswahl dieses Kriteriums war, evolutiv konservierte Proteine auszuwählen und zu charakterisieren.

Bei PSI (*position-specific-iterated*)-Blast handelt es sich um eine Erweiterung der herkömmlichen BLAST-Suche. Aus den Treffern, die bei der ersten Suche gefunden werden, werden multiple Sequenzvergleiche gebildet. Aus der resultierenden Konsensussequenz eine positionspezifische *scoring Matrix* (PSSM) erstellt, und für die weitere Suche verwendet. Bei jedem Durchlauf werden neue Treffer hinzugefügt, die in den Sequenzvergleich und somit in die PSSM mit eingehen. Als Richtwert wurden ausschließlich Proteine als homolog angesehen, die einen Wahrscheinlichkeitswert (P-Wert) von mindestens  $10^{-50}$  bis  $10^{-100}$  aufwiesen (Altschul *et al.*, 1997; Schaffer *et al.*, 1999).

Nach Anwendung dieser Kriterien wurden folgende Proteine, deren Eigenschaften in 3.6 näher erläutert sind, ausgewählt. In der ersten Spalte ist die Nummer angegeben, unter der das Protein in Tab. 2 (Anhang 7.1) läuft. Die zweite Spalte gibt die Bezeichnung des identifizierten Proteins an, in Spalte drei ist der zugehörige Genort aus dem annotierten *Plasmodium* Genomprojekt genannt. In der vierten Spalte ist die Zugangsnummer (GI) für die nicht redundante NCBI-Datenbank aufgeführt. Die folgenden drei Spalten geben die Anzahl vorhergesagter Signalpeptide (SP), Transmembranhelices (TM) bzw. *vacuolar translocation signal/plasmodium export element*-Sequenzen (VTS/PEXEL) an. Spalte acht zeigt die Summe der in der massenspektrometrischen Analyse sequenzierten Peptide des Proteins an. Die neunte Spalte gibt den Signifikanzwert an, mit dem das jeweilige Protein identifiziert wurde (Werte  $\geq 49$  wurden als signifikant gewertet). In der letzten Spalte ist die theoretische, nach dem Eintrag in der Datenbank berechnete, molekulare Masse der Proteine angegeben.

Protein Nr.	Identifiziertes Protein	Genort	Zugangsnr. (GI)	SP	TM	PEXEL / VTS	ident. Fragm.	Signifikanz	Masse [Da]
266	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF11_0179	gij23508370	1	2		1	53	15253
273	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFL1415w	gij23508977	1	1		16	671	117409
278	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0201	gij23509422	1	1		2	128	112505
316	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFE0395c	gij23613103	1	1		5	251	40561
361	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF10_0372	gij23495239	1	1		2	90	13831

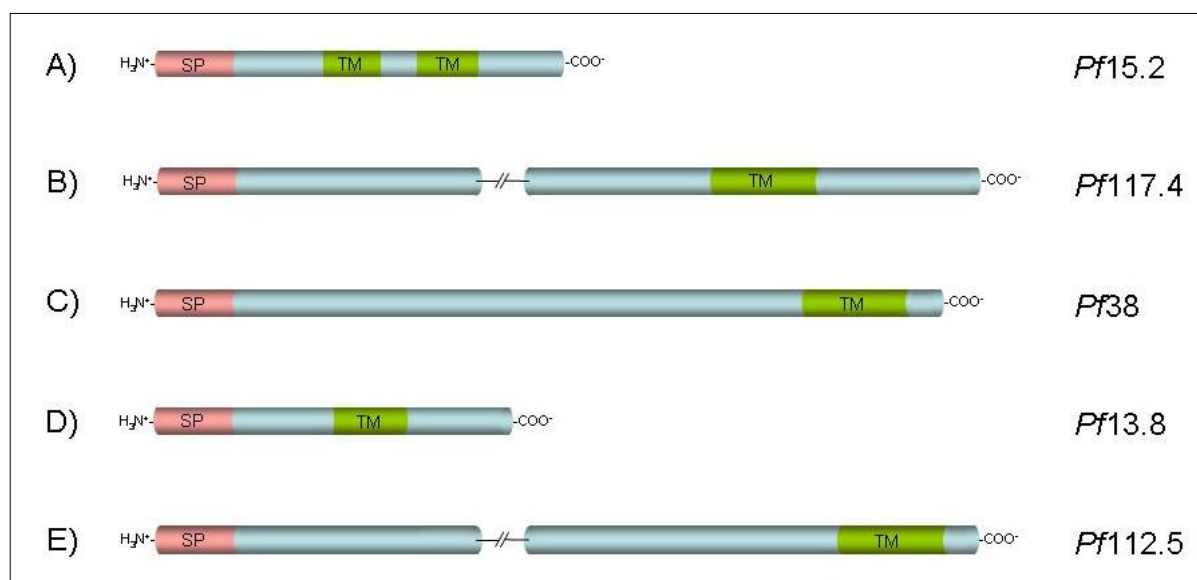
Bis auf PF11\_0179 wurden alle Proteine in einer zweiten LC-ESI-MS/MS basierten Proteomanalyse einer PVM/TVN-angereicherten Fraktion erneut identifiziert.

Die ausgewählten Proteine werden im Folgenden mit der Abkürzung „Pf“ für *Plasmodium falciparum* sowie den ersten Ziffern ihrer molekularen Masse benannt.

### 3.6 Charakterisierung der fünf Proteine

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf bisher nicht beschriebene Proteine näher untersucht, deren schematischer Aufbau in Abb. 20 dargestellt ist. Die Proteine liegen in einem Massenbereich von 13 bis 117 kDa. Für jedes Protein wurden ein N-terminales Signalpeptid sowie mindestens eine Transmembrandomäne vorhergesagt (Krogh *et al.*, 2001; Nielsen und Krogh, 1998). Für alle Proteine wurde aber erst später verifiziert, dass es sich um Membranproteine handelt. Pf38 sowie Pf12.5 waren zudem in einer DRM-Rafts Präparation anreicherbar. Für beide Proteine wurde ein potentieller GPI-Anker vorhergesagt, was ebenfalls für ein DRM-Protein spricht (Fankhauser und Mäser, 2005).

Durch erstmalige fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurde die subzelluläre Lokalisation der Proteine festgestellt. Bei Pf15.2, Pf117.4 sowie Pf13.8 handelt es sich um Proteine der Plasmamembran von Merozoiten. Für Pf38 wurde, mit Hilfe von Kolokalisationsstudien mit RAP-1 (Ridley *et al.*, 1990) gezeigt, dass es ein Rhoprienprotein ist. Bei Pf12.5 handelt es sich um ein Protein der parasitophoren Vakuolenmembran. Dies wurde durch Kolokalisation mit dem PVM-Protein EXP-2 verifiziert (Johnson *et al.*, 1994).



**Abb. 20: Schematischer Aufbau der fünf charakterisierten Proteine**

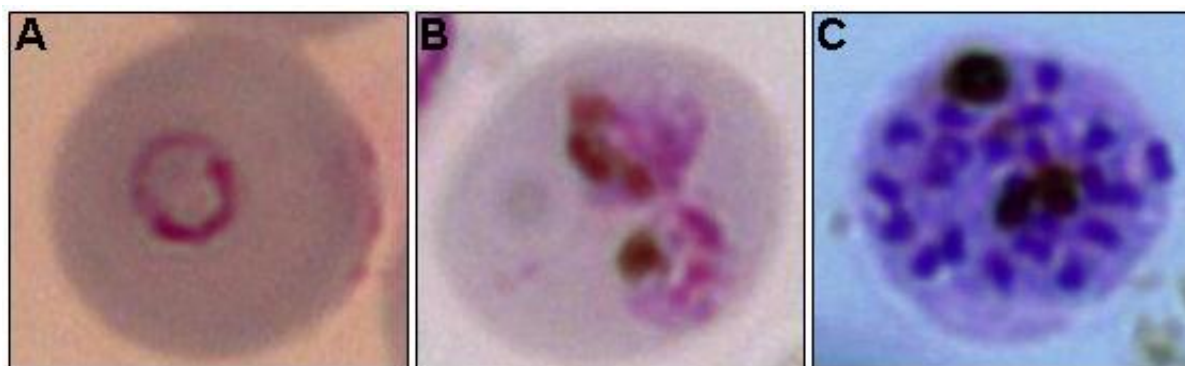
vorhergesagtes Signalpeptid (rot); vorhergesagte Transmembrandomäne (grün); Pf117.4 und Pf112.5 sind unterbrochen dargestellt, um die Größenrelation beizubehalten.

Im Folgenden sind die Eigenschaften der fünf Proteine jedes Mal in vier Abschnitten im Einzelnen beschrieben. Der jeweils erste Abschnitt umfasst deren Charakterisierung anhand der Daten aus dem annotierten Genomprojekt von *Plasmodium falciparum* bzw. anderer Apicomplexa. Für die Vorhersage von Signalpeptid und Transmembrandomäne wurden die

auf der Webseite [www.plasmoDB.org](http://www.plasmoDB.org) implementierten Algorithmen SignalP sowie TMHMM2 verwendet (Nielsen und Krogh, 1998; Krogh *et al.*, 2001; Bahl *et al.*, 2003). Für die GPI-Anker-Prognose wurde der GPI-SOM Algorithmus eingesetzt (<http://gpi.unibe.ch>; Fankhauser und Mäser, 2005).

Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit den massenspektrometrischen Untersuchungen und Ergebnissen. Zusätzlich wird die Auswahl der für die Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen dargelegt.

Im dritten jeweiligen Abschnitt werden die Untersuchungen der nativen Proteine in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (Abb. 21) anhand von Western-Blot- Untersuchungen erläutert. Für die stadienspezifischen Expressionsuntersuchungen wurde aus einer synchronisierten Kultur jeweils die gleiche Anzahl resuspendierter Zellen entnommen und untersucht. In diesem Abschnitt werden auch die Untersuchungen zur Membranständigkeit (siehe 2.2.4.1) sowie im Falle von *Pf38* und *Pf112.5* zur Anreicherung in DRM-Raft-Präparationen gezeigt (siehe 2.2.4.2).



**Abb. 21: Intraerythrocytäre Entwicklungsstadien von *Plasmodium falciparum*, Giemsa-gefärbter Ausstrich**

A) Ringstadium

B) Trophozoit (doppelt infizierte Zelle)

C) maturaer Schizont (doppelt infizierte Zelle)

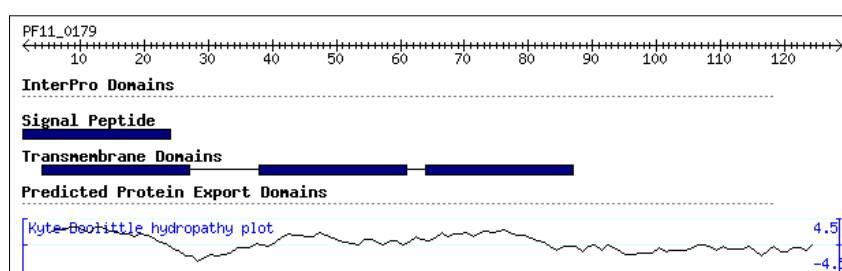
Das Cytoplasma des Parasiten erscheint violett, der ihn umgebende Erythrocyt leicht grünlich. Die Hämозinkristalle sind in B) und C) braun bis schwarz zu erkennen. Vergrößerung 1:1000

Der vierte Abschnitt zeigt die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der einzelnen Proteine. Für die Lokalisation der Proteine unter Verwendung der generierten Seren wurden diese jeweils mit Cy3-konjugierten anti-Kaninchen Antikörpern (Dianova) rot markiert. Die Kolokalisation wurde jeweils mit Antikörpern aus Mäusen durchgeführt und entsprechend mit Cy2-konjugierten anti-Maus Antikörpern (Dianova) grün markiert. Die DNA der Zellkerne der Parasiten wurde mit Hoechst33258-Farbstoff gefärbt (blau).

### 3.6.1 Das Protein Pf15.2

Für den Genlocus PF11\_0179 war bisher ein hypothetisches Protein in der Datenbank annotiert. Dieses hat im Anschluss an unsere Untersuchungen die Bezeichnung Pf15.2 erhalten.

Das Protein hat eine theoretische Masse von 15253 Da. Der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei  $pI$  10,16. Es wurden ein Signalpeptid (SP: 1-18) sowie zwei Transmembrandomänen (TM<sub>1</sub>: 38-60; TM<sub>2</sub>: 64-86) vorhergesagt (Abb. 22) (Krogh *et al.*, 2001; Nielsen und Krogh, 1998).



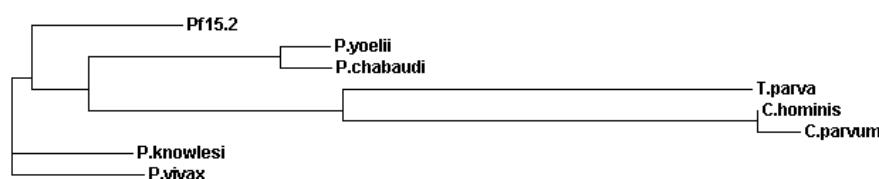
**Abb. 22: Vorhergesagte strukturelle Eigenschaften des Proteins Pf15.2**

Das Schema zeigt die aus dem Genlocus (PF11\_0179) abgeleitete Primärstruktur sowie die vorhergesagte Lage des Signalpeptids sowie der Transmembrandomänen anhand des Kyte-Doolittle Hydrophathie Diagramms. (verändert aus [www.PlasmoDB.org](http://www.PlasmoDB.org))

In der PSI-BLAST-Suche wurden orthologe hypothetische Proteine in *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. yoelii yoelii*, *P. chabaudi* sowie anderen Apicomplexa wie *Cryptosporidium hominis* und *C. parvum* sowie *Theileria annulata* und *T. parva* gefunden (Anhang 7.2, Abb. 64). In allen Plasmodienspecies außer *P. falciparum* ist das jeweilige Ortholog als konserviertes hypothetisches Protein annotiert. Das zu der PSI-BLAST-Suche gehörige Protein-Alignment ist in Anhang 7.2, Abb. 66 dargestellt. Hieraus ergab sich folgende prozentuale Identität mit Pf15.2:

Organismus	Genlocus	Sequenzidentität mit Pf15.2
<i>P. knowlesi</i>	(PKN.002786)	80 %
<i>P. vivax</i>	(Pv091495)	69 %
<i>P. yoelii yoelii</i>	(MALPY02113)	71 %
<i>P. chabaudi</i>	(PC_RP2103)	73 %
<i>T. parva</i>	(TP03_0726)	55 %
<i>C. hominis</i>	(Chro.10031)	54 %
<i>C. parvum</i>	(cgd1_210)	55 %

In dem in Abb. 23 gezeigten Phylogramm spiegelt sich diese wieder. Die Sequenzen der Proteine aus *P. falciparum*, *P. vivax* sowie des primatenspezifischen Pathogens *P. knowlesi* sind am nächsten miteinander verwandt. Dies ist anhand der Länge der Äste, von ihrer Basis aus betrachtet, zu erkennen. Je länger ein Ast dargestellt ist, desto mehr Aminosäuren wurden im Laufe der Evolution ausgetauscht. Einen schwächeren Verwandtschaftsgrad weisen die Proteine aus den murinen Malariaerregern *P. yoelii yoelii* sowie *P. chabaudi* auf. *T. parva* sowie *C. hominis* und *C. parvum* gehören zu anderen Klassen des Phylum Apicomplexa, daher sind deren Orthologe offensichtlich evolutiv am weitesten entfernt.



**Abb. 23: Phylogramm der Orthologen Proteine von Pf15.2**

Die Länge der Äste symbolisiert die Ähnlichkeit der miteinander verglichenen Sequenzen (erstellt mit ClustalW: [www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/))

### 3.6.1.1 Massenspektrometrische Daten und Auswahl der Peptide für die Immunisierung

Für das Protein Pf15.2 wurden in Präp-1 vier tryptische Peptide in zwei der untersuchten Gelbanden identifiziert (Anhang 7.3, Abb. 69). In Bande 2 des Gels wurde ein Peptid sowie in Bande 29 drei weitere, zu dem Protein gehörende Peptide identifiziert. Bande 2 läuft im Gel höher als 119 kDa, was nicht mit der theoretischen Größe von Pf15.2 von 15 kDa übereinstimmt. Die Identifikation der Pf15.2-Peptids ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Analyse nicht in der nummerierten Reihenfolge der Proteinbanden analysiert wurden, sondern nach deren Färbungsintensität im Gel, wodurch es bei sehr abundanten Proteinen zu einem sogenannten *Memory effect* kommen kann. Die Proteinbande 29 läuft im Gel hingegen etwa in Höhe von 15 kDa, was gut mit der Größe des hier charakterisierten Proteins korreliert (Abb. 13).

In der folgenden Aminosäuresequenz von Pf15.2 sind die massenspektrometrisch identifizierten Bereiche unterstrichen dargestellt (Abb. 24). Das Signalpeptid ist **pink** und die beiden Transmembrandomänen **oliv** hinterlegt. In **rot** sind die beiden Sequenzabschnitte hervorgehoben, die zur Synthese der für die Immunisierung verwendeten Peptide ausgewählt wurden. Der zweite der beiden Sequenzabschnitte wurde beinahe komplett massenspektrometrisch bestätigt.

MLGLIFKVVIFIVGYVLP IGLSLHGWKNKKYEMIEYYLKYVYFFVIFENLVTPSLGRVIYRIS  
 SFLWCILHLTIYIILITPKLNYLNSIYDKISKINNQNNIGLYWNKYLVNPLNDKFNKIVKKLK  
 TL

**Abb. 24: Primärstruktur von Pf15.2 (gi|23508370)**

pink: Signalpeptid; oliv: vorhergesagte Transmembrandomäne, rot: für die Immunisierung verwendete Peptide; unterstrichen: in der Massenspektrometrie sequenzierte Peptide

Für die Auswahl der für die Immunisierung verwendeten Peptide wurden zunächst der Algorithmus von Hopp und Woods (1981) eingesetzt ([www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl](http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl)). Mit Hilfe dieses Analysewerkzeugs wurde die Antigenität der Primärstruktur des Proteins vorhergesagt und vielversprechende Bereiche für die Synthese von Peptiden ausgesucht. In Absprache mit der Firma Eurogentec (Leiden, Belgien) wurde die Auswahl verifiziert und folgende Peptide für die Immunisierung synthetisiert (Immunisierungsprogramm: DoubleX). Um die Peptide an KLH koppeln zu können, wurde jeweils ein Cysteinrest angefügt:

ISKINNQNNIGLYC                      theor. pI/Mw: 8,20 / 1593,82 (Peptid-Kennung: EP053623)

CHGWKNKKYEMIE                      theor. pI/Mw: 8,16 / 1665,95 (Peptid-Kennung: EP053624)

Die aus der Immunisierung resultierenden Seren liefen unter der Kennung: SA5052 bzw. SA5053. Für die weiteren Untersuchungen wurde das Serum SA5052 verwendet.

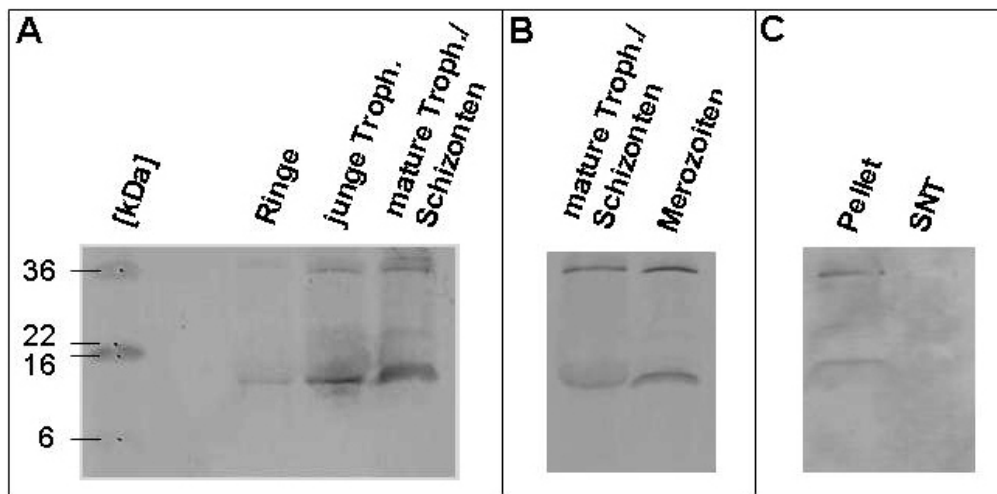
### 3.6.1.2 Nachweis des nativen Proteins auf einer PVDF-Membran

Die im Auftrag durch die Firma Eurogentec generierten Antiseren erkannten auf der Western-Blot-Membran eine Bande 15 kDa (Abb. 25 A-C), was gut mit der theoretischen Masse des Proteins übereinstimmt. Außerdem kam es zu einer Kreuzreaktion mit einem unbekanntem Protein in Höhe von etwa 36 kDa (Abb. 25 A-C).

Um zu überprüfen, in welchen Stadien Pf15.2 exprimiert wird, wurden aus einer synchronisierten Kultur jeweils gleiche Volumina resuspendierter Zellen entnommen und direkt in Probenpuffer aufgenommen. So wurden Proben von Ringstadien, Trophozoiten und matura Schizonten (Abb. 25 A) auf das Vorhandensein des Proteins hin untersucht. In Abb. 25 A) ist zu erkennen, dass das Protein in Ringstadien kaum nachweisbar ist, das heißt, dass es auch nur schwach exprimiert wird. In Trophozoiten sowie matura Schizonten ist jedoch eine deutliche Bande zu erkennen (Abb. 25 A). Zusätzlich wurden matura Schizonten mit Merozoiten verglichen, um zu sehen, ob das Protein eventuell während der Evasion

proteolytisch prozessiert wird. Dies ist wohl jedoch, wie in Abb. 25 B) zu sehen ist, nicht der Fall.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob es sich bei *Pf15.2* tatsächlich um ein Membran-, oder doch um ein lösliches Protein handelt. Hierfür wurden Membranen einer nicht synchron wachsenden Kultur infizierter Erythrocyten extrahiert (siehe 2.2.4) und mit Hochsalz- bzw. Karbonatpuffer gewaschen (siehe 2.2.4.1). Durch diese Prozedur sollten periphere Membranproteine von der Membran gelöst werden, während integrale Membranproteine nicht betroffen sind (Fujiki *et al.*, 1982; Johnson *et al.*, 1994). Die gewaschenen Membranen wurden sedimentiert, die Proteine des Überstandes ausgefällt und die Proteine beider Fraktionen per SDS-PAGE getrennt. Wie in Abb. 25 C) zu erkennen ist, wurde verifiziert, dass es sich bei *Pf15.2* um ein integrales Membranprotein handelt.



**Abb. 25: Nachweis des nativen *Pf15.2* auf einer PVDF-Membran**

A) Untersuchung der Stadienspezifischen Expression von *Pf15.2*

B) Untersuchung von *Pf15.2* vor und nach der Evasion

C) Nachweis, dass es sich bei *Pf15.2* um ein integrales Membranprotein handelt

Am linken Rand sind die molekularen Massen des verwendeten Größenstandards in kDa angegeben (A-C: SeeBlue Plus2, Invitrogen).

Abb. 25 C) zeigt außerdem, dass es sich bei dem die Kreuzreaktion bei 36 kDa verursachenden Protein ebenfalls um ein integrales Membranprotein zu handeln scheint, da dessen Nachweis nur in der mit Karbonatpuffer behandelten Membranfraktion auftritt.

### 3.6.1.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie von *Pf15.2*

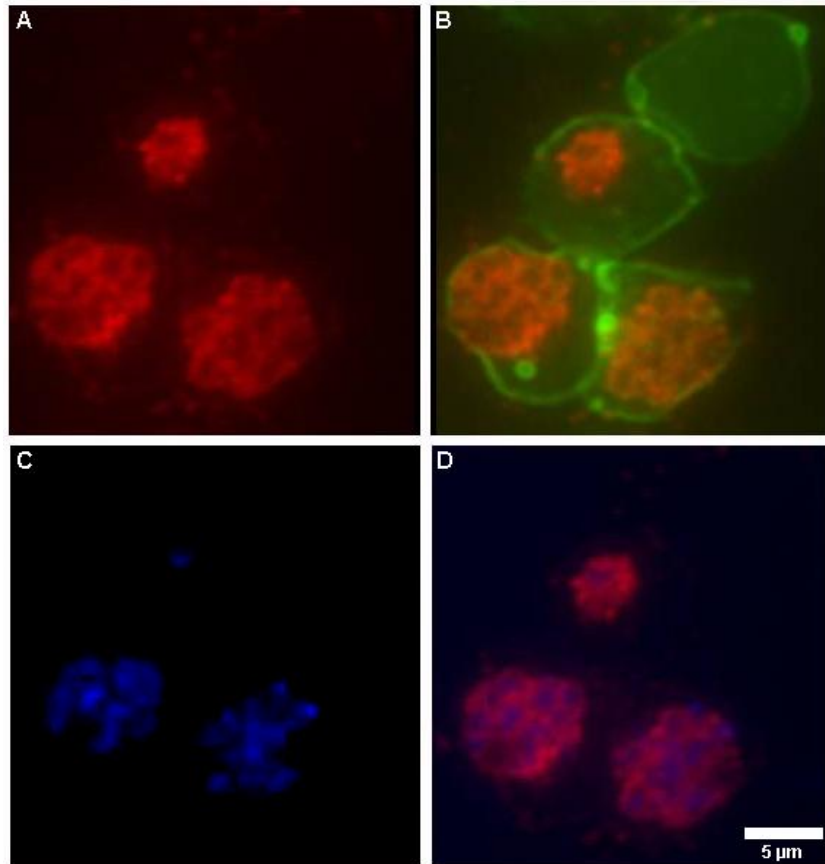
In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von *Pf15.2* (rot) wurde das Protein bereits in jungen Trophozoiten nachgewiesen (Abb. 26). Die Markierung erscheint in Ringstadien und frühen Trophozoiten zunächst kompakt. Im Laufe der Entwicklung zum murenen Schizonten wird die Markierung differenzierter und die Fluoreszenz ist wabenartig um die einzelnen Kerne herum (Abb. 26 C+D, blau) sichtbar (Abb. 26 A+D). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei *Pf15.2* um ein Protein der Plasmamembran des Parasiten handelt. Diese stülpt sich während der Reifung zum Segmenter nach innen, und beginnt, die gebildeten Kerne der zukünftigen Merozoiten zu umschließen. Dies führt zu dem wabenartige Muster, das in späten Entwicklungsstadien erkennbar ist.

Die erythrocytäre Plasmamembran wurde mit Cy2-konjugierten anti-Glycophorin Antikörpern markiert (grün). In Abb. 26 B) sind deutlich drei Parasiten (rot) innerhalb der Erythrocyten (grün) zu erkennen. Außerdem sieht man einen nicht infizierten Erythrocyten (grün).

Wie in Abb. 27 C) deutlich zu erkennen ist, lokalisiert *Pf15.2* (Abb. 27 A: rot) an der Oberfläche der Merozoiten (Abb. 27 B: Nuclei à blau).

In Abb. 28 ist die Kolokalisation von *Pf15.2* (rot) mit dem Rhoprienprotein RAP-1 (grün) gezeigt (Abb. 28 C+F). Auch hier ist gut zu erkennen, dass die *Pf15.2* den gesamten Merozoiten umgibt (Abb. 28 A+D), während RAP-1 nur an dessen apikalen Pol lokalisiert (Abb. 28 B+E).





**Abb. 26: Lokalisation von Pf15.2 in frühen und murenen Trophozoiten**

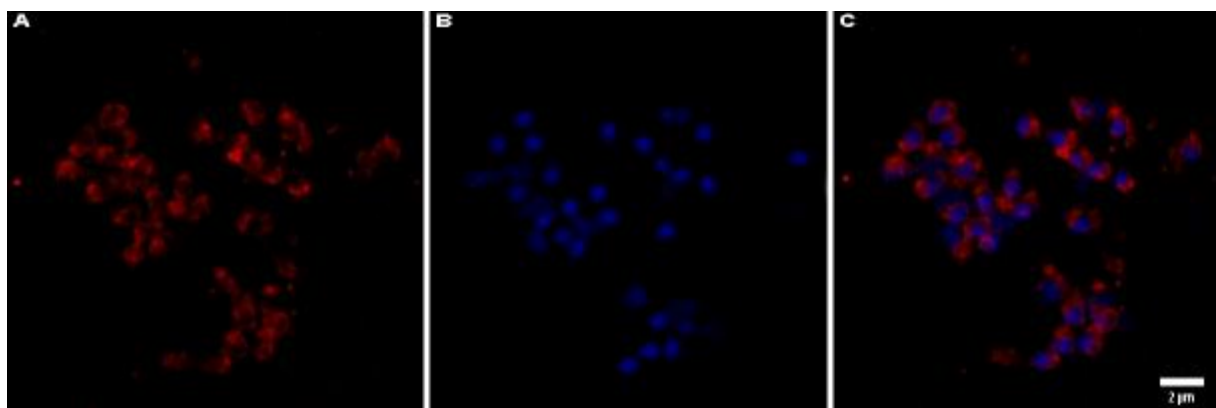
A) Lokalisation von Pf15.2 (Cy3: rot)

B) Kolokalisation von Pf15.2 (Cy3: rot) mit Glycophorin (Cy2: grün)

C) Färbung der Nuklei von *P. falciparum* mit Hoechst33258 (blau)

D) Kolokalisation von Pf15.2 (Cy3: rot) mit den Kernen von *P. falciparum* (Hoechst33258: blau)  
Die Aufnahmen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Modell 200M) erstellt.

Der Größenbalken entspricht 5 µm.



**Abb. 27: Lokalisation von Pf15.2 in Merozoiten**

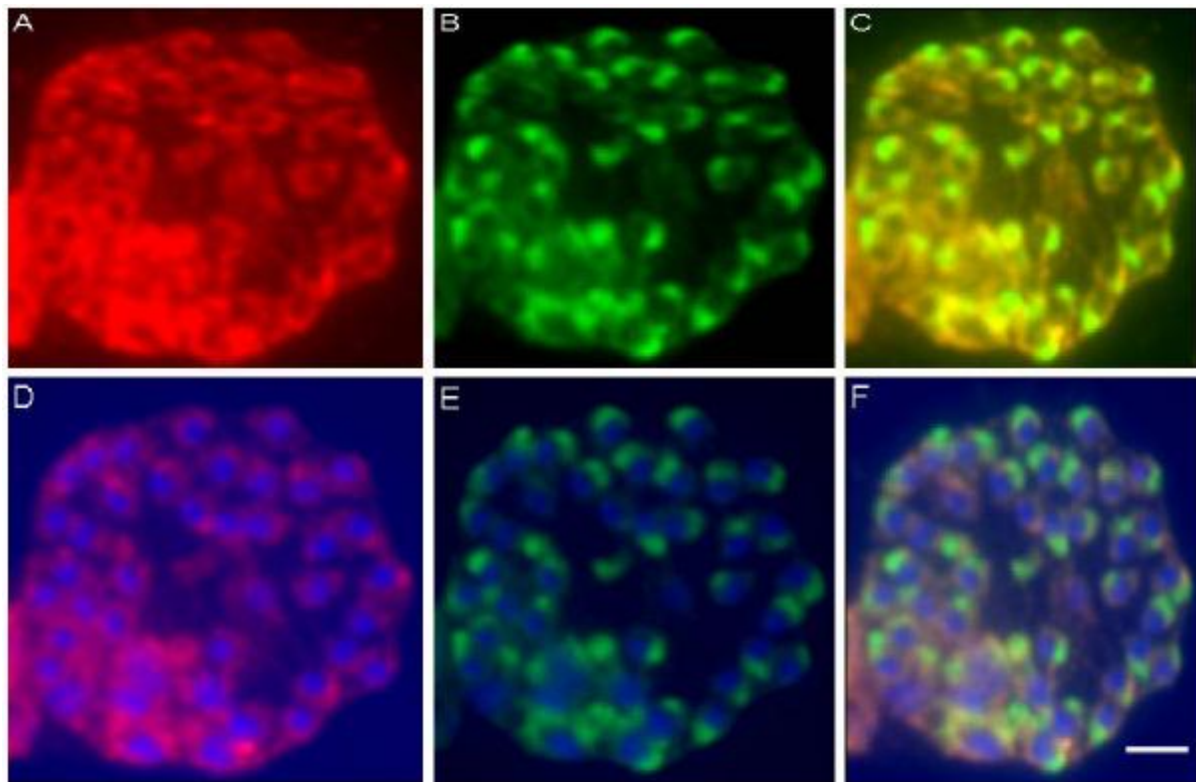
A) Nachweis von Pf15.2 (rot) auf der Oberfläche von Merozoiten

B) Färbung von *P. falciparum* Kernen mit Hoechst33258 (blau)

C) Kolokalisation von Pf15.2 (rot) mit angefärbten Merozoitenkernen (blau)

Die Aufnahmen wurden an einem LSM der Firma Leica (Modell TCS SP 2) erstellt.

Der Größenbalken entspricht 2 µm.



**Abb. 28: Lokalisation von Pf15.2 und RAP-1 in einem Segmenter**

A) Lokalisation von Pf15.2 (rot) an der Oberfläche von Merozoiten

B) Lokalisation von RAP-1 (grün) in den Rhoptrien von Merozoiten

C) Lokalisation von Pf15.2 (rot) und RAP-1 (grün)

D) Lokalisation von Pf15.2 (rot) und Färbung der Merozoitenkerne mit Hoechst33258 (blau)

E) Lokalisation von RAP-1 (grün) und Färbung der Merozoitenkerne mit Hoechst33258 (blau)

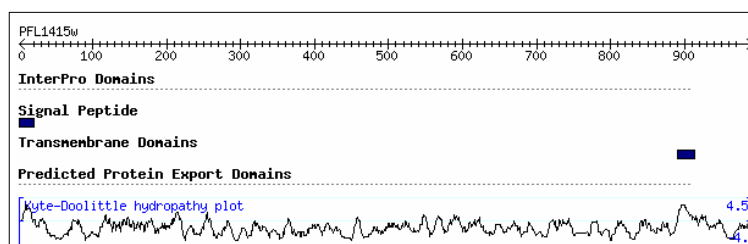
F) Lokalisation von Pf15.2 (rot), RAP-1 (grün) sowie Merozoitenkernen (blau)

Die Aufnahmen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Modell 200M) erstellt.  
Der Größenbalken entspricht 2  $\mu\text{m}$ .

### 3.6.2 Das Protein Pf117.4

Das hier als Pf117.4 beschriebene Protein existierte bis vor kurzem nur als hypothetisches, annotiertes Protein mit dem Genlocus PFL1415w.

Laut Datenbank hat es eine theoretische Masse von 117483 Da und seinen isoelektrischen Punkt bei  $pI$  5,73. Unter Verwendung der Algorithmen TMHMM2 für Transmembrandomänen (Krogh *et al.*, 2001) und SignalP für Signalpeptide (Nielsen und Krogh, 1998) waren beide Sequenzmotive vorhergesagt worden (SP: 1-19; TM: 891-913) (Abb. 29).

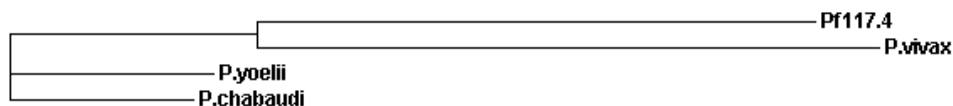


**Abb. 29: Vorhergesagte strukturelle Eigenschaften des Proteins Pf117.4**

Das Schema zeigt die aus dem Genlocus (PFL1415w) abgeleitete Primärstruktur sowie die vorhergesagte Lage des Signalpeptids sowie der Transmembrandomäne anhand des Kyte-Doolittle Hydrophathie Diagramms. (verändert aus [www.PlasmoDB.org](http://www.PlasmoDB.org))

In der PSI-BLAST-Suche wurden orthologe hypothetische Proteine in *P. vivax*, *P. yoelii yoelii*, *P. chabaudi* gefunden, die jeweils als konserviert gekennzeichnet wurden. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der entsprechenden Proteine ist in Anhang 7.2, Abb. 65 aufgeführt.

Das in Abb. 30 gezeigte Phylogramm stellt den Verwandtschaftsgrad der vier orthologen Proteine dar. Man sieht deutlich den Unterschied zwischen den Proteinen humanpathogener Plasmodienspecies (*P. falciparum* und *P. vivax*) und den Krankheitserregern bei Nagetieren (*P. yoelii yoelii* und *P. chabaudi*). An der Länge der Äste ist zu erkennen, dass Pf117.4 und das *P. vivax* Ortholog eine Zweiergruppe mit großer hoher Ähnlichkeit der Primärstruktur bilden. An der prozentualen Sequenzähnlichkeit ist allerdings zu erkennen, dass sich die Aminosäurezusammensetzung der Primärstrukturen nur zu 38 % ähnelt.



**Abb. 30: Phylogramm der Orthologen Proteine von Pf117.4**

Die Länge der Äste symbolisiert die Ähnlichkeit der miteinander verglichenen Sequenzen (erstellt mit ClustalW: [www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/))

Die drei durch PSI-BLAST-Suche gefundenen Proteine haben folgende prozentuale Sequenzidentität ihrer Primärstruktur mit *Pf117.4*:

Organismus	Genlocus	Sequenzidentität mit <i>Pf117.4</i>
<i>P. vivax</i>	(Pv124090)	38 %
<i>P. yoelii yoelii</i>	(PY00677)	56 %
<i>P. chabaudi</i>	(PC000789)	40 %

### 3.6.2.1 Massenspektrometrische Daten und Auswahl der Peptide für die Immunisierung

Das Protein *Pf117.4* wurde in beiden massenspektrometrischen Analysen jedes Mal in einer Bande identifiziert. Insgesamt wurden 27 tryptische Peptide des Proteins sequenziert (Anhang 7.3, Abb. 70). In Präp-1 wurde das Protein in Bande 4 identifiziert. Diese läuft im Gel etwa in Höhe der 119 kDa Bande des Größenstandards (Abb. 13). In Präp-2 wurde *Pf117.4* in einer Bande identifiziert, die etwas unterhalb der 119 kDa großen Markerbande lief (Abb. 17). In beiden Fällen stimmt die experimentelle Größe sehr gut mit dem theoretischen Molekulargewicht des gesamten, vorhergesagten Proteins von 117 kDa überein.

In der im Folgenden gezeigten Aminosäuresequenz des Proteins sind diese Peptide unterstrichen dargestellt und decken 25 % der Gesamtsequenz ab (Abb. 31). Das vorhergesagte Signalpeptid ist in **pink**, die Transmembrandomäne in **oliv** hinterlegt. Die für die Immunisierung ausgewählten Sequenzabschnitte sind **rot** hervorgehoben. Beide dieser Abschnitte sind partiell mit identifizierten Peptiden übereinstimmend. Die beiden für die Immunisierung ausgewählten Peptide hatten folgende Sequenz und theoretische pI/Mw-Daten:

CKDIPKEGSADEYSQD      theor. pI/Mw: 4,27 / 1784,87 (Peptid-Kennung: EP053617)

CHLAKGDSKKDEMCKE      theor. pI/Mw: 8,15 / 1847,13 (Peptid-Kennung: EP053618)

Die für die Kopplung an KLH benötigten Cysteinreste sind **fett** hervorgehoben. Die Auswahl der Aminosäuresequenzen der Peptide erfolgte wie für *Pf15.2* beschrieben. Für die aus der Immunisierung resultierenden Seren wurde die Bezeichnung SA5060 bzw. SA5061 der Firma Eurogentec übernommen. Für alle nachfolgenden Abbildungen wurde das Serum SA5060 verwendet.

MKLKYHLFFLIIFIQDILC LKYEDYIKSLPEAFHLAKGDSKKDEMKENPKEENDNNNDNKSNS  
 SNSNNNYKVGMQDIVNNISNKISDDNKNKDNSSDKYDCNDDNNNTSNLFFHKMMCAFKKKL  
 FKNEQVIEKDIRNVKKGVINLKENIVKDSNSISKHTNLIKDDITKNTNYLFLNLFKKSFKKEEGD  
 NVNKFSSDYFNKLKLNLPDShLFFSKLLLTLSQNDKDKNKITHINNYNNKMNDNTENNTNLL  
 QNFLSFIKFNKQKDEYNNNDNNIKKENDFHFSFYLNENDKHKNNKDKKYSWWFTNKNDKKNV  
 DNNLNLLYNNSNNSFNSTFNQNQTDHENLPEQVREKKN SQEEKNKWLDIFWKYFHKNEEEIEK  
 KEMNEKNDLNDNNKNGVNVDDHNLNGLHNLDDKKNKFSFLNYWNDKDIPKEGSADEYSQDNNN  
 NKTTDDQNNDDNKKFNIFMYFGKNKKNDEDMNKNKKEMNMDMDMNKDMNKDMNKDMNMMDMNMNM  
 NMNMNMNMNMGMDDTNVDVSDTLNNNLNKNEMNKVDDDPKGFVLNLVKNYEENKNVDNINYS  
 LLLTSGKETNENINYHPLIKFKSCLMNCFK EINNTEKSVEKESYLSFDDYKILEKCSKCKNN  
 NLNDTHNEDPPMKKDDTILYMEKKNKINDTTKNLNLNDNINNLINENNESTEKETSCKWSDFF  
 FKKNNKKNIKDSYEEDKNSNPNQDNISVLTSNETNLENLNLINDNLSSTHLMYDINNNNKKNKI  
 SNNNNKKNISNNNNNYKMKNFLIDSKFKYSNKEKTKNFIQDEQQDKKNVYNKPLHFFNYFNN  
 SNINTDDNNNNNNNNNNNNIYKDNLIMNNSVNDNLLNDDKYNSLK NINNNNNIMLNKNDIDN  
 DENNNYISIGFFLFLLLITFFVYLSAFTNIINQFYLSFKEKICLFIKGYKGTDFDNVYEEESCE  
 SFLPKVQYKNSHNNNNNNNNNDNNNFCQSYENIYHSFQENSLDMA

**Abb. 31: Primärstruktur von Pf17.4 (gi|23508977)**

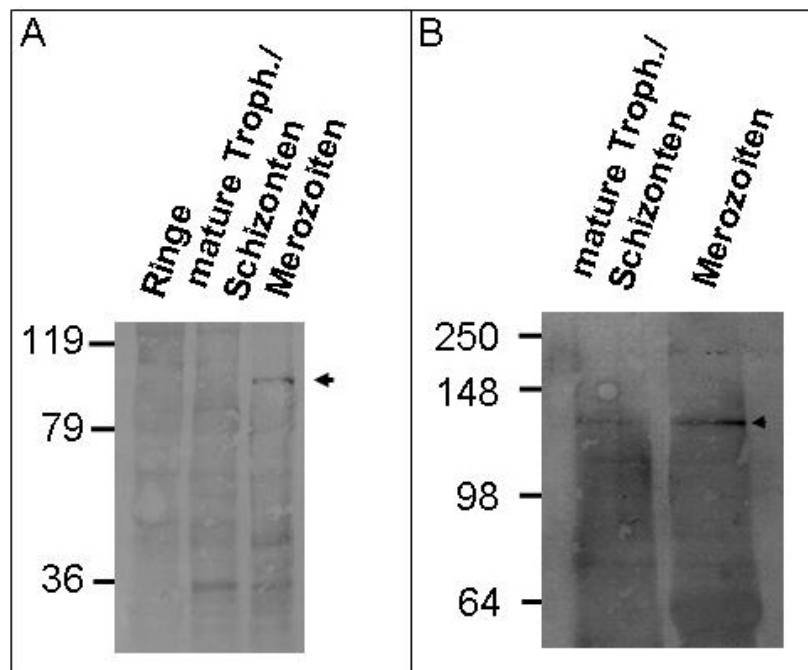
pink: Signalpeptid; oliv: vorhergesagte Transmembrandomäne, rot: für die Immunisierung verwendete Peptide; unterstrichen: in der Massenspektrometrie sequenzierte Peptide

### 3.6.2.2 Nachweis des nativen Proteins auf einer PVDF-Membran

Unter Verwendung des Serums SA5060 wurde nach Elektrotransfer der Proteine auf eine PVDF-Membran eine Proteinbande in Höhe von etwa 117 kDa nachgewiesen. Dies stimmt gut mit der theoretischen Masse des Proteins Pf12.5 von 117483 Da überein (Abb. 32).

In Abb. 32 A) ist die Untersuchung der Expression von Pf12.5 gezeigt. In Ringstadien sowie frühen Trophozoiten wurde noch kein Protein nachgewiesen. Die Bande tauchte erst bei Trophozoiten/Schizonten auf. In Abb. 23 B) ist neben murenen Trophozoiten/Schizonten zusätzlich die Expression des Proteins in Merozoiten dargestellt.

Durch Extraktion von Membranen infizierter Erythrocyten sowie nachfolgender Behandlung mit alkalischem pH bzw. mit Hochsalzpuffer wurden peripher mit der Membran assoziierte Proteine von dieser entfernt, während integrale Membranproteine hiervon nicht betroffen waren (siehe 2.2.4 und 2.2.4.1). In Abb. 33 wird eine PVDF-Membran gezeigt, auf der zu sehen ist, dass Pf17.4 nur in der, durch Ultrazentrifugation pelletierten Membranfraktion nachzuweisen ist. In dem die löslichen Proteine enthaltenden Überstand ist keine Markierung zu erkennen.

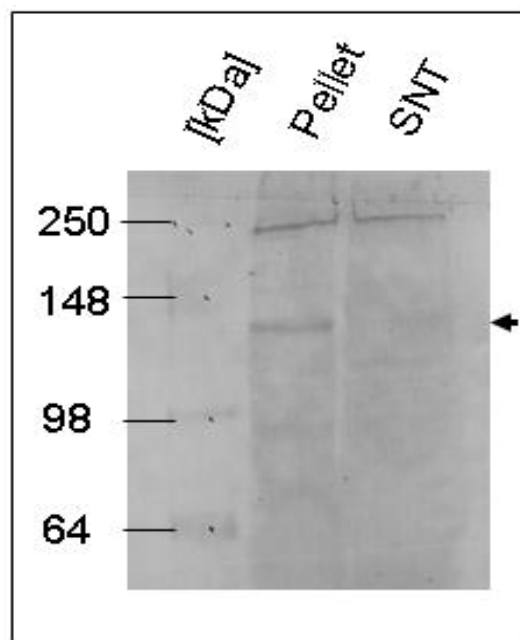


**Abb. 32: Nachweis der Stadienspezifischen Expression von Pf117.4**

A) In allen Spuren die gleiche Anzahl von Ring-, Trophozoiten- sowie Schizonten-infizierter Zellen eingesetzt.

B) Pf117.4 wird in Merozoiten erkannt

Links sind die molekularen Massen des Größenstandards in kDa angegeben.



**Abb. 33: Nachweis von Pf117.4 in der Membranfraktion infizierter Erythrocyten**

Pellet: Sedimentierte Membranfraktion nach Behandlung mit Hochsalz- und Carbonatpuffer

SNT: Der die löslichen Proteine bzw. peripheren Membranproteine enthaltende Überstand nach dem Waschen

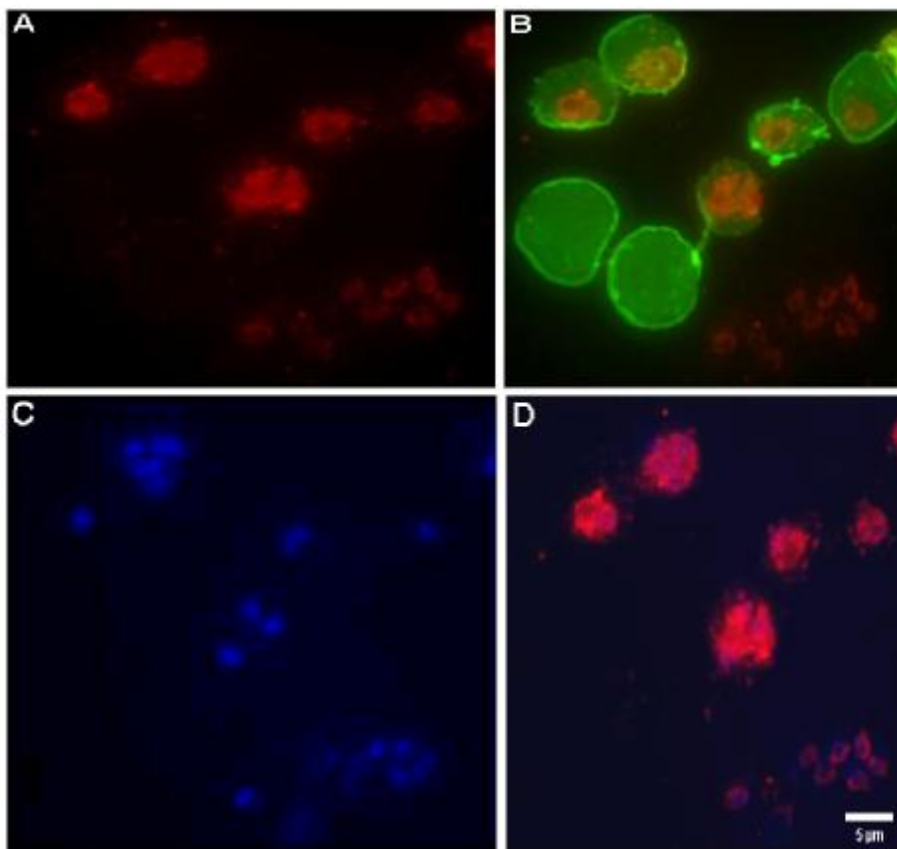
Die Pfeilspitze markiert die spezifische Pf117.4-Bande.

Links sind die molekularen Massen des Größenmarkers in kDa angegeben.

### 3.6.2.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie von *Pf17.4*

In Abb. 34 ist zu erkennen, dass *Pf17.4* (rot) bereits in jungen und murenen Trophozoiten nachzuweisen ist (Abb. 34 A+B). In Abb. 34 A+B sind neben infizierten und nichtinfizierten Erythrocyten auch freie Merozoiten zu erkennen, die eine rote Fluoreszenzmarkierung aufweisen. Final kann das Protein in der Plasmamembran von Merozoiten (Kerne → blau) lokalisiert werden (Abb. 34 D).

In Abb. 35 ist die sowohl die Färbung von *Pf17.4* (A: rot) sowie der nukleären DNA von Merozoiten (B: blau) in Segmentern bzw. freien Merozoiten zu sehen. Durch Fluoreszenzüberlagerung (Abb. 35 C) ist deutlich zu erkennen, dass *Pf17.3* die Merozoiten wie eine Hülle umgibt.



**Abb. 34: Nachweis von *Pf17.4* in infizierten Erythrocyten mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

A) Lokalisation von *Pf17.4* (rot) in Trophozoiten und freien Merozoiten (Pfeilspitze)

B) Markierung von *Pf17.4* (rot) und der erythrocytären Plasmamembran (grün; Glycophorin)

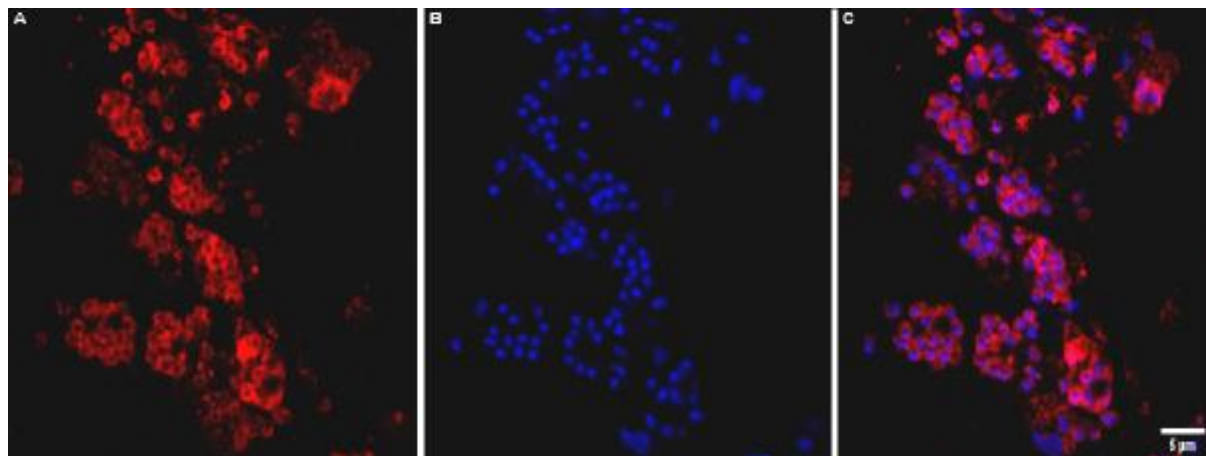
C) Färbung der DNA der plasmodialen Nuklei mit Hoechst33258 (blau)

D) Färbung von *Pf17.4* (rot) und der plasmodialen DNA (blau)

Die Aufnahmen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Modell 200M) erstellt.

Der Größenmarker entspricht 5 μm.





**Abb. 35: Lokalisation von Pf117.4 in Segmentern/Merozoiten**

A) Nachweis von Pf117.4 (rot) in der Plasmamembran von Merozoiten

B) Färbung der plasmodialen Merozoitenkerne mit Hoechst33258 (blau)

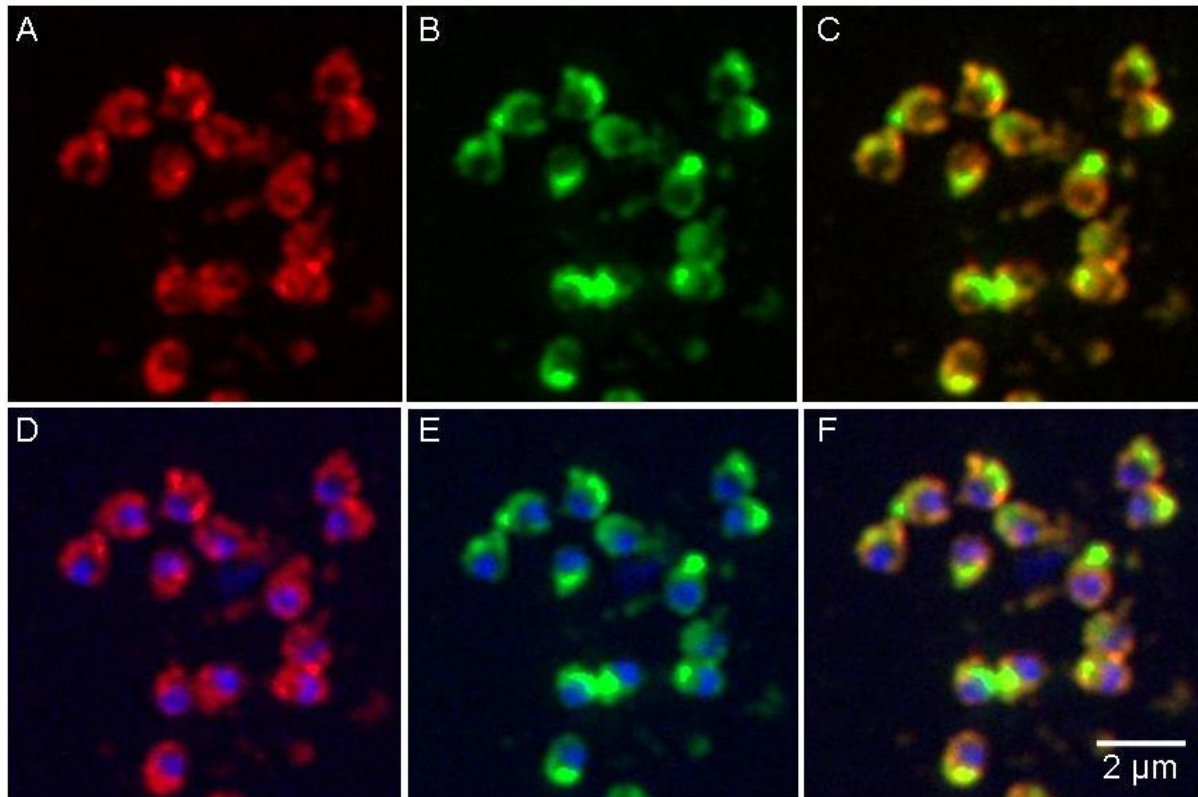
C) Überlagerung der Fluoreszenz von Pf117.4 (rot) und Kernen (blau)

Die Aufnahmen wurden an einem LSM der Firma Leica (Modell TCS SP 2) erstellt.

Der Größenbalken entspricht 5 µm.

Um die Lokalisation von Pf117.4 in der Plasmamembran der Merozoiten zu verifizieren, wurde eine Kolo-kalisation mit dem Protein RAP-1 durchgeführt (Abb. 36). Dieses Proteien lokalisiert in den Rhoptrien des Apikalkomplexes von *Plasmodium falciparum* (Ridley *et al.*, 1990), was in Abb. 36 B) + E) gut zu erkennen ist. Das Fluoreszenzsignal von Pf117.4 (rot) hingegen schließt die Merozoitenkerne (blau) sowie das RAP-1 Signal in Form von Ringen ein (Abb. 36 F).





**Abb. 36: Lokalisation von Pf117.4 und RAP-1 in Merozoiten**

A) Lokalisation von Pf117.4 (rot) an der Oberfläche von Merozoiten

B) Lokalisation von RAP-1 (grün) in den Rhoptrien von Merozoiten

C) Lokalisation von Pf117.4 (rot) und RAP-1 (grün)

D) Lokalisation von Pf117.4 (rot) und Färbung der Merozoitenkerne mit Hoechst33258 (blau)

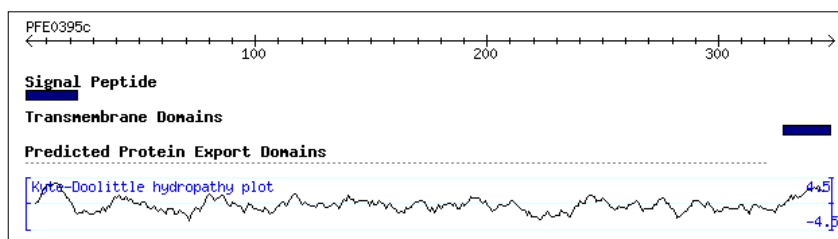
E) Lokalisation von RAP-1 (grün) und Färbung der Merozoitenkerne mit Hoechst33258 (blau)

F) Lokalisation von Pf117.4 (rot), RAP-1 (grün) sowie Merozoitenkernen (blau) in einem Bild

Die Aufnahmen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Modell 200M) erstellt.  
Der Größenbalken entspricht 2 μm.

### 3.6.3 Das Protein Pf38

Bei Pf38 handelt es sich um ein Protein mit dem Genlocus PFE0395c. Es wurde während der experimentellen Phase für die vorliegende Arbeit von Sanders und Kollegen als ein Bestandteil einer DRM-Rafts Präparation beschrieben und mit Pf38 benannt. Als Pf38-GFP Fusionsprotein wurde es am apikalen Pol von Merozoiten lokalisiert (Sanders *et al.*, 2005). Hier wurden deren Ergebnisse erstmals mit Hilfe spezifischer Antiseren gegen das natürliche Protein bestätigt.



**Abb. 37: Vorhergesagte strukturelle Eigenschaften des Proteins Pf38**

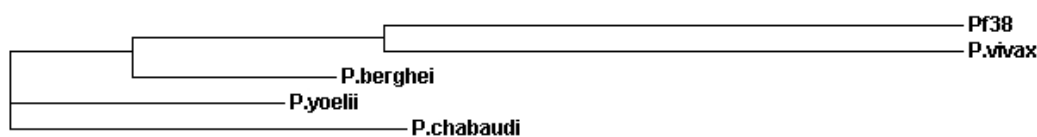
Das Schema zeigt die aus dem Genlocus (PFE0395c) abgeleitete Primärstruktur sowie die vorhergesagte Lage des Signalpeptids sowie der Transmembrandomänen anhand des Kyte-Doolittle Hydrophathie Diagramms. (verändert aus [www.PlasmoDB.org](http://www.PlasmoDB.org))

Die aus der gesamten Primärstruktur des Proteins errechnete Masse beträgt 40588 Dalton. Der theoretische pI liegt bei 7,57. Mit Hilfe der entsprechenden Algorithmen wurde ein Signalpeptid (SP: 1-21) sowie eine Transmembranhelix (TM: 328-347) vorhergesagt (Krogh *et al.*, 2001; Nielsen und Krogh, 1998) (Abb. 37). In der NCBI sowie PlasmoDB Datenbank wurde ein GPI-Anker durch den DGPI v2.04-Algorithmus vorhergesagt (<http://129.194.185.165/dgpi/>; Kronegg und Buloz, 1999; Bahl *et al.*, 2003). Da die Webseite dieses Algorithmus vorübergehend nicht mehr erreichbar war, wurde zur erfolgreichen Verifizierung der aktuellere Algorithmus GPI-SOM eingesetzt (<http://gpi.unibe.ch>; Fankhauser und Mäser, 2005).

Mit Hilfe der PSI-BLAST-Suche wurden vier orthologe Proteine in *Plasmodium vivax*, *P. yoelii yoelii*, *P. berghei* sowie *P. chabaudi* identifiziert (Anhang 7.2, Abb. 66). Die Orthologe aus *P. yoelii yoelii* und *P. vivax* sind jeweils als hypothetisches Protein aber auch als Pfs38 (*P. yoelii yoelii*) sowie putatives Pfs38 (*P. vivax*) annotiert. Die Proteine der anderen beiden Species sind jeweils als konserviert hypothetisch annotiert. In dem in Abb. 38 gezeigten Phylogramm ist der Verwandtschaftsgrad der fünf Proteine anhand der Länge der einzelnen Äste zu erkennen. Vermutlich ist Pf38 näher mit dem Ortholog aus *P. vivax* verwandt, als mit den anderen Orthologen.

Im Folgenden ist die prozentuale Sequenzidentität der orthologen Proteine mit *Pf38* angegeben:

Organismus	Genlocus	Sequenzidentität mit <i>Pf38</i>
<i>P. vivax</i>	(Pv097960)	70 %
<i>P. yoelii yoelii</i>	(PY02738)	64 %
<i>P. berghei</i>	(PB000400.01.0)	62 %
<i>P. chabaudi</i>	(PC000227.02.0)	61 %



**Abb. 38: Phylogramm der Orthologen Proteine von *Pf38***

Die Länge der Äste symbolisiert die Ähnlichkeit der miteinander verglichenen Sequenzen (erstellt mit ClustalW: [www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/))

### 3.6.3.1 Massenspektrometrische Daten und Auswahl der Peptide für die Immunisierung

Für das Protein *Pf38* wurden in beiden Analysen insgesamt 11 Peptide identifiziert (Anhang 7.3, Abb. 71). Insgesamt ergibt sich eine Sequenzabdeckung von 30 % bezogen auf die gesamte Primärstruktur. In Präp-1 wurden 5 verschiedene Peptide in Bande 16 sequenziert. Zusätzlich wurde in den Banden 15 und 18 jeweils ein Peptid identifiziert, das auch in der erstgenannten Bande auftauchte (Abb. 13). Diese Banden laufen jeweils in Höhe der 31 kDa Bande des Proteinmarkers, also etwas unter der theoretischen Masse des Proteins von etwa 40 kDa. In Präp-2 wurden 6 Peptide in Bande 25 identifiziert, die ebenfalls etwas unter der 31 kDa Bande des Proteinstandards läuft (Abb. 17).

In der folgenden Sequenz sind die per Massenspektrometrie identifizierten Peptide unterstrichen (Abb. 39). Das vorhergesagte Signalpeptid ist pink, die Transmembrandomäne **oliv** hervorgehoben. Die für die Immunisierung ausgewählten Sequenzabschnitte sind **rot** markiert:

MKRWSIITGIVIIFCILTCKGQ**VENKKVDFRTEKGKF**VPLNLVPGDVVEYSCPYSLNNDIRNMNG  
 VEREHFDNKKFCFDYIFVGSKLTFLKEYVR GSYNVVHKEEGNLYTSQFSVPPVVLTHRNFDCFCY  
 MEENNVVVKVLR IHISNGVLRKIPGCDFNADYK ESTAITTFSNMSPRRVKVCDVYPKSGDFISL  
 MCPSDYSIKPDGCFSNVYVKR YPNEEVKE **EDRFNLRKWDASKY** NVVSIETVLKMNMITQGDKYS  
IFSKLPDVKDQVDFTCICQSNDEQDNLMMNVY INNTSY LTNNTRS IGVNH SFSNSEIFERIERE  
 EISFAFSSYLSITLILLYLFFLNF

**Abb. 39: Primärstruktur von Pf38 (gi|23509422)**

pink: Signalpeptid; oliv: vorhergesagte Transmembrandomäne, rot: für die Immunisierung verwendete Peptide; unterstrichen: in der Massenspektrometrie sequenzierte Peptide

Die Sequenzbereiche der für die Immunisierung ausgewählten Peptide werden im Folgenden gezeigt. Der zusätzliche Cysteinrest ist jeweils hervorgehoben. Die Peptide haben den angegebenen theoretischen isoelektrischen Punkt sowie Molekulargewicht. In Klammern ist die Bezeichnung des Peptids der Firma Eurogentec (Leiden, Belgien) angegeben. Die für die Synthese der Peptide ausgewählte Aminosäuresequenz wurde zunächst durch den Algorithmus zur Vorhersage der Immunogenität von Hopp und Woods (1981; [www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl](http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl)) bestimmt, und anschließend in Absprache mit der Firma Eurogentec optimiert.

CEDRFNLRKWDASKY            theor. pI/Mw: 8,18 / 2045,26 (EP053621)

CVENKKVDFRTEKGKF        theor. pI/Mw: 9,11 / 1928,24 (EP053622)

Die daraus resultierenden Seren liefen unter der Kennung SA5062 bzw. SA5063. Beide Seren zeigten die gleichen Resultate bei den Untersuchungen. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse gezeigt, die mit Hilfe des Serums SA5062 erhalten wurden.

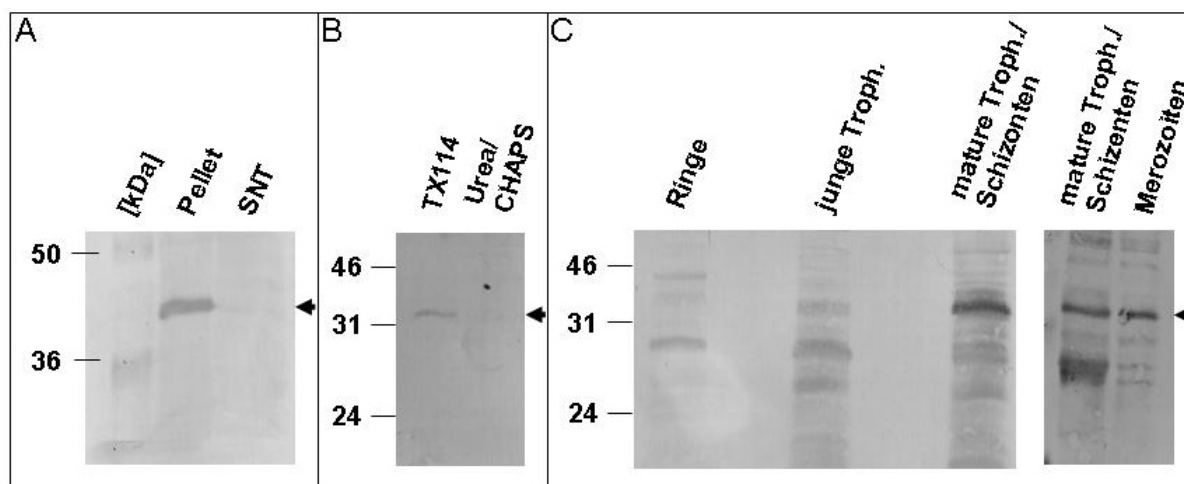
### 3.6.3.2 Nachweis des nativen Proteins auf einer PVDF-Membran

Mit Hilfe des zur Verfügung stehenden Serums SA5062 wurde auf einer Western-Blot-Membran eine Proteinbande bei etwa 40 kDa nachgewiesen (Abb. 40). Dies korreliert gut mit der theoretischen Masse des Proteins von 40588 Da. Es wurde gezeigt, dass es sich bei Pf38 um ein Membranprotein handelt (Abb. 40 A), indem Membranen wie in 2.2.4 beschrieben behandelt wurden. In Abb. 40 A) ist zu sehen, dass das Protein nur in der Membranfraktion, aber nicht im Überstand nachgewiesen werden kann.

Für das Protein Pf38 wurde mittels des verwendeten GPI-SOM Algorithmus ein GPI-Anker vorhergesagt (Fankhauser und Mäser, 2005). Diese Modifikation ist ein Indiz für die Lokalisation des betreffenden Proteins in DRM-Rafts (Butikofer *et al.*, 2001). Um dies zu

überprüfen wurde eine temperaturabhängige Triton-X114 Phasenseparation durchgeführt, wodurch DRM-Rafts einer Zelle extrahiert werden können (siehe 2.2.4.2; Smythe *et al.*, 1988). In Abb. 40 B) ist zu erkennen, dass das Protein in der DRM-Rafts angereicherten Fraktion zu finden ist, während die übrigen, mit CHAPS und Harnstoff extrahierten Proteine lediglich nur noch ein sehr schwaches Signal zeigen.

In Abb. 40 C) ist das Ergebnis der Expressionsanalyse von *Pf38* dargestellt. Um zu überprüfen, in welchen Stadien das Protein synthetisiert wird, wurden aus einer synchronen Kultur jeweils gleiche Volumina an Zellen entnommen und der Gesamtextrakt mittels SDS-PAGE separiert. Wie im linken Teil von Abb. 40 C) zu sehen ist, kann das Protein bereits in Ringstadien nachgewiesen werden. Da zu dem Zeitpunkt bereits die Lokalisation des *Pf38*-GFP-Fusionsproteins publiziert war, wurde noch das Vorhandensein des Antigens in freien Merozoiten und in einem Gemisch aus Trophozoiten und Schizonten verglichen, um zu überprüfen, ob das Protein bei der Merozoitenreife eventuell prozessiert wird (Sanders *et al.*, 2005). Wie im rechten Teil von Abb. 40 C) zu sehen ist, geschieht dies anscheinend nicht. Sowohl die Hauptbande als auch die auftretenden vermutlichen Kreuzreaktionen sind für alle Stadien identisch.



**Abb. 40: Nachweis von nativem *Pf38* auf einer PVDF-Membran**

A) Nachweis von *Pf38* in Hochsalz- bzw. Karbonatpuffer behandelten Membranextrakten infizierter Erythrocyten.

B) Nachweis von *Pf38* in angereicherten DRM-Rafts im Vergleich mit Harnstoff/CHAPS Extrakten.

C) Nachweis von *Pf38* in verschiedenen Entwicklungsstadien

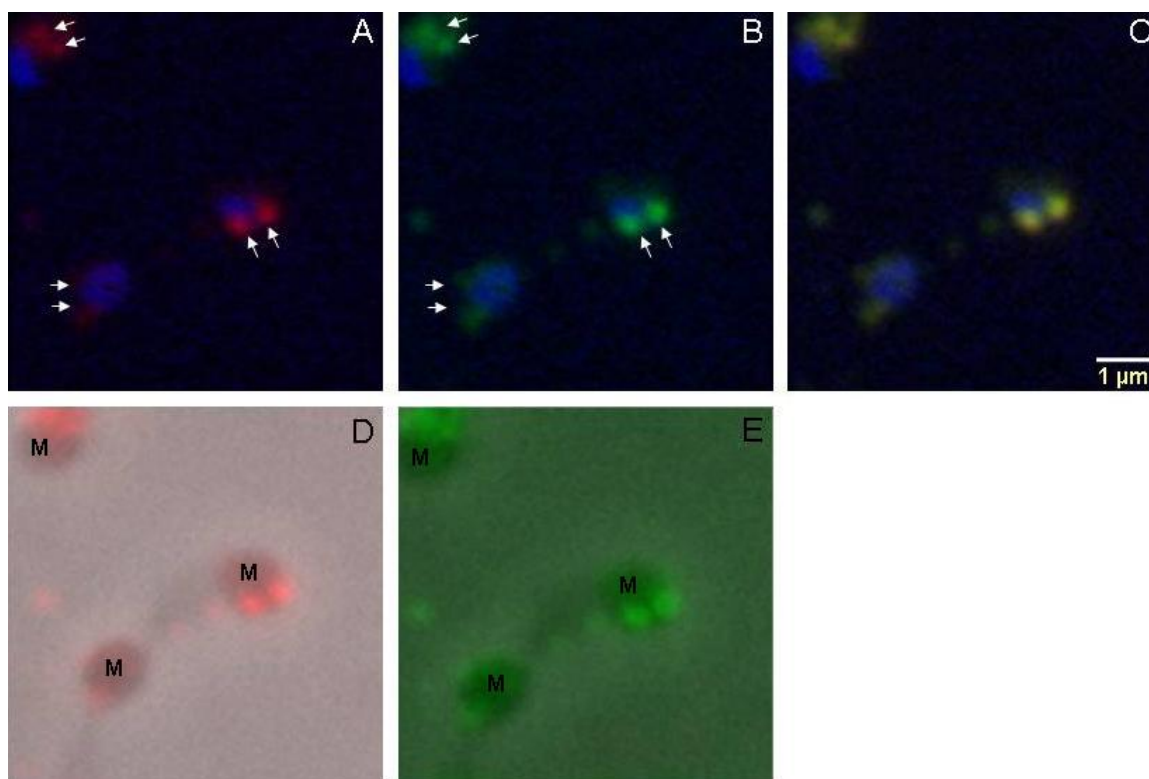
Die schwarze Pfeilspitze kennzeichnet jeweils die spezifische *Pf38* Bande.

Links sind die molekularen Massen des Größenmarkers in kDa angegeben.

### 3.6.3.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie von *Pf38*

Das Protein *Pf38* (rot) ist in den Merozoiten am apikalen Pol lokalisiert (Abb. 41+42 A). Durch Kolo-kalisation mit dem *Rhoptry associated protein 1* (RAP-1; Ridley *et al.*, 1990) (grün) wurde die Lokalisation in den Rhoptrien verifiziert (Abb. 41+42 B+C). Diese Ergebnisse stimmen mit den zwischenzeitlich publizierten Daten von Sanders und Kollegen überein, die eine *Pf38*-GFP-Chimäre am apikalen Pol der Merozoiten lokalisierten (Sanders *et al.*, 2005). Hier sei darauf hingewiesen, dass *Pf38* in der vorliegenden Arbeit erstmalig als natürliches Protein in Merozoiten lokalisiert und nachgewiesen wurde.

Aufgrund der Lokalisation von *Pf38* in den Rhoptrien war es naheliegend zu überprüfen, ob das Protein sezerniert und anschließend in die PVM integriert wird. Wie in Abb. 43 und 44 zu sehen ist, ist dies in der Tat der Fall. Abb. 43+44 A) zeigt die Lokalisation von *Pf38* (rot) in Ringstadien etwa 5 Stunden nach der Invasion. In Abb. 43+44 B) ist die EXP-2 Lokalisation (grün) gezeigt. Die gelbe Färbung der überlagerten Fluoreszenzaufnahmen zeigt, dass *Pf38* und EXP-2 in Ringstadien in der parasitophoren Vakuolenmembran kolo-kalisieren (Abb. 43+44 C).



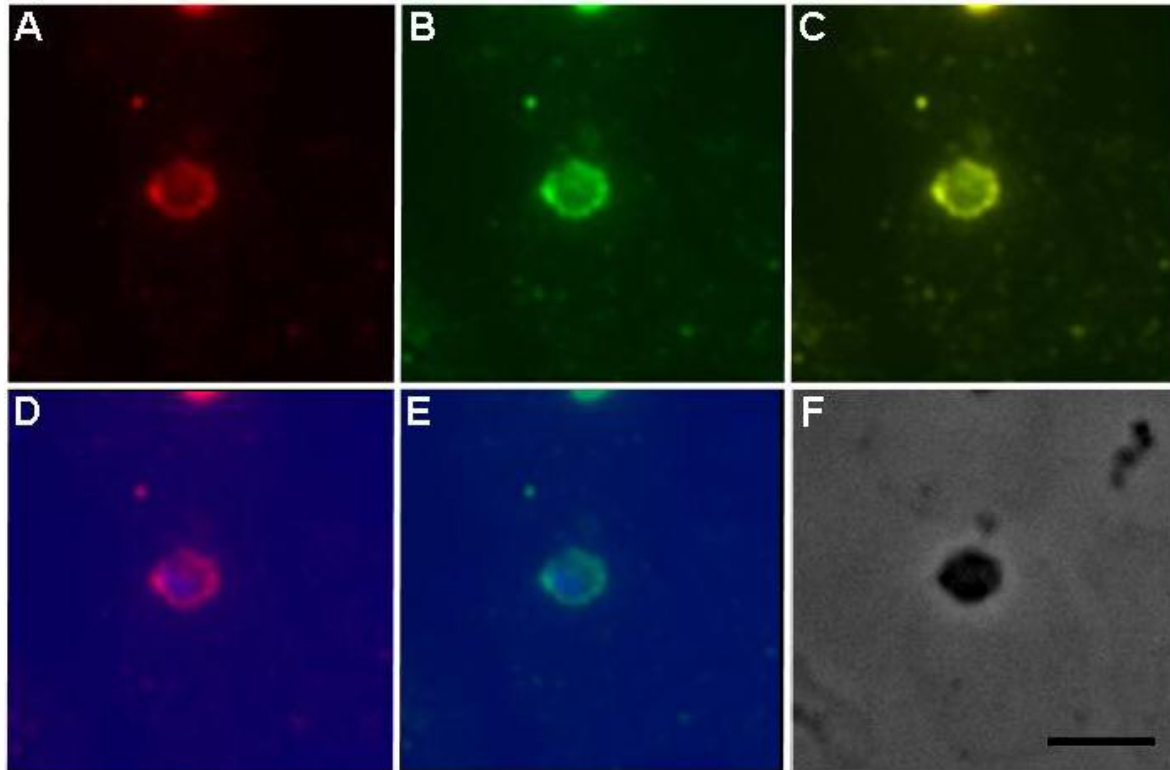
**Abb. 41: Lokalisation von *Pf38* in den Rhoptrien von Merozoiten**

- A) Nachweis von *Pf38* (rot) und Nuklei von Merozoiten (blau)
- B) Nachweis von RAP-1 (grün) und Nuklei von Merozoiten (blau)
- C) Kolo-kalisation (gelb) von *Pf38* und RAP-1 in den Rhoptrien von Merozoiten
- D) Lokalisation von *Pf38* (rot) mit Hellfeldaufnahme von Merozoiten überlagert
- E) Lokalisation von RAP-1 (grün) mit Hellfeldaufnahme von Merozoiten überlagert

In D)+E) sind die Merozoiten mit einem „M“ gekennzeichnet.

Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Modell 200M) erstellt. Der Größenbalken entspricht 1 µm.





**Abb. 43(▲ ) und 44 (▼ ): Kolokalisation von Pf38 und EXP-2 in Ringstadien**

A) Lokalisation von Pf38 (rot)

B) Lokalisation von EXP-2 (grün)

C) Kolokalisation (gelb) von Pf38 und EXP-2

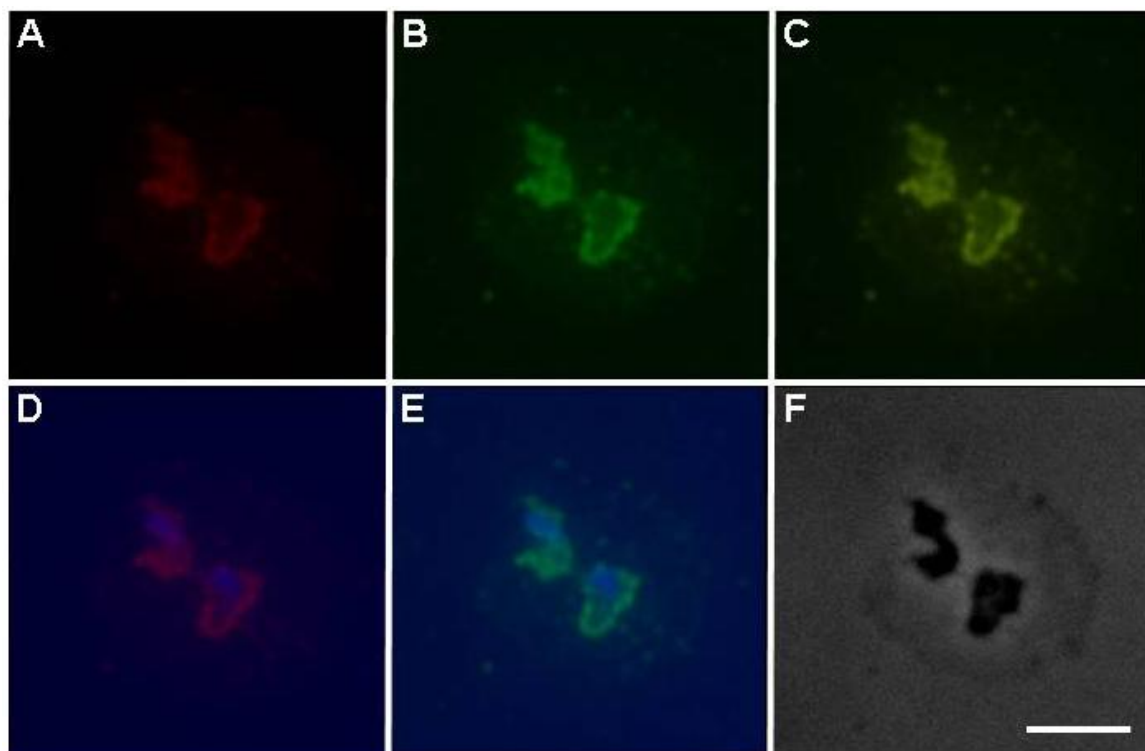
D) Lokalisation von Pf38 (rot) mit Kernfärbung (blau)

E) Lokalisation von Pf38 (grün) mit Kernfärbung (blau)

F) Durchlicht Aufnahme eines Ring-infizierten Erythrocyten

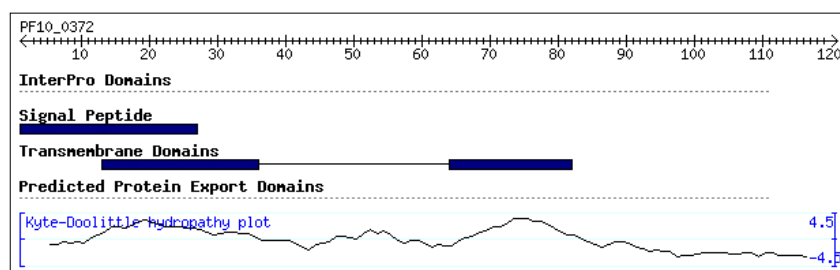
Die Aufnahmen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Modell 200M) erstellt.

Der Größenbalken entspricht 5 µm.



### 3.6.4 Das Protein Pf13.8

Das Protein Pf13.8 war bislang in der Datenbank unter dem Genlocus PF10\_0372 als hypothetisches Protein annotiert. Sein theoretischer isoelektrischer Punkt ist  $pI$  10,16. Das theoretische Molekulargewicht beträgt 13840 Dalton, berechnet aus der gesamten in der Datenbank enthaltenen Primärstruktur. Durch die Sequenzanalyse-Algorithmen SignalP sowie TMHMM2 wurde jeweils ein Signalpeptid (SP: 1-25) und eine Transmembrandomäne (TM: 64-81) vorhergesagt (Abb. 45) (Krogh *et al.*, 2001; Nielsen und Krogh, 1998). Eine zweite durch den Algorithmus vorhergesagte Transmembranhelix (TM: 13-35) überschneidet sich zum großen Teil mit dem vermuteten Signalpeptid (Abb. 45).



**Abb. 45: Vorhergesagte strukturelle Eigenschaften des Proteins Pf13.8**

Das Schema zeigt die aus dem Genlocus (PF10\_0372) abgeleitete Primärstruktur sowie die vorhergesagte Lage des Signalpeptids sowie der Transmembrandomänen anhand des Kyte-Doolittle Hydrophathie Diagramms. (verändert aus [www.PlasmoDB.org](http://www.PlasmoDB.org))

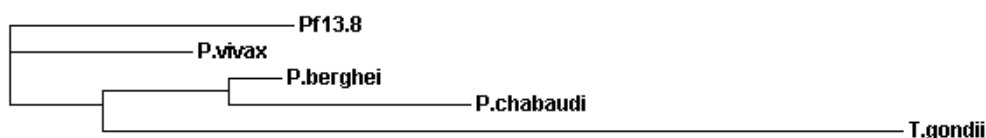
Die PSI-BLAST-Suche hat vier weitere stark konservierte orthologe Proteine aus *P. vivax*, *P. berghei*, *P. chabaudi* sowie *Toxoplasma gondii* erbracht, die alle als hypothetische Proteine annotiert sind. Das *Alignment* aller fünf Aminosäuresequenzen ist im Anhang 7.3, Abb. 67 dargestellt.

In dem in Abb. 46 dargestellten Phylogramm wird die evolutionäre Ähnlichkeit der 5 Proteine, veranschaulicht durch die Länge der Äste, verglichen. Die Orthologe der beiden humanpathogenen Plasmodienspecies ähneln sich am meisten, gefolgt von den Proteinen der murinen Pathogene *P. berghei* und *P. chabaudi*. *Toxoplasma gondii*, welches zu einer anderen Klasse der Apicomplexa gehört, verfügt über das evolutionär am weitesten entfernte Proteinortholog.

Im Folgenden ist deren prozentuale Identität der Aminosäuresequenzen verglichen mit Pf13.8 aufgeführt:



Organismus	Genlocus	Sequenzidentität mit Pf38
<i>P. vivax</i>	(Pv110850)	70 %
<i>P. berghei</i>	(PB000898.01.0)	74 %
<i>P. chabaudi</i>	(PC000827.00.0)	69 %
<i>T. gondii</i>	(55.m00101)	76 %



**Abb. 46: Phylogramm der Orthologen Proteine von Pf13.8**  
Die Länge der Äste symbolisiert die Ähnlichkeit der miteinander verglichenen Sequenzen (erstellt mit ClustalW: [www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/))

### 3.6.4.1 Massenspektrometrische Daten und Auswahl der Peptide für die Immunisierung

In den beiden Analysen wurden jeweils 3 verschiedene Peptide identifiziert. In Präp-1 wurden das Protein in den Banden 30 und 31 identifiziert. Beide Proteinbanden laufen in der SDS-PAGE tiefer als die 19 kDa Bande des Größenstandards (Abb. 13), so dass die Größe gut mit dem theoretischen Molekulargewicht von Pf13.8 korreliert. In Präp-2 wurde das Protein in Bande 37 der Membranfraktion identifiziert (Abb. 17). Auch die Laufhöhe dieser Proteinbande stimmt mit der berechneten Größe von Pf13.8 überein. Die identifizierten Peptide sind in Anhang 7.3 Abb. 71 aufgeführt. Aus den identifizierten Peptiden resultiert eine Sequenzabdeckung von 18 %.

In der im Folgenden gezeigten Sequenz sind diese identifizierten Abschnitte unterstrichen dargestellt. Die vorhergesagte Transmembrandomäne ist **oliv** und das Signalpeptid **pink** hervorgehoben. Die für die Immunisierung ausgewählten Peptidsequenzen sind **rot** dargestellt.

```
MGSQIQPSRFLDSAILALFAMIISASFLYMFSEFFMMSHESKLFNKLLSMILSRLFPFKKTFEYN
LTHILLTICIIILSLKPDSVSSKYGLKDSRKPQKDDAHKGDEDPNRLNRDKKK
```

**Abb. 47: Primärstruktur von Pf13.8 (gi|23613103)**

pink: Signalpeptid; oliv: vorhergesagte Transmembrandomäne, rot: für die Immunisierung verwendete Peptide; unterstrichen: in der Massenspektrometrie sequenzierte Peptide

Eines der identifizierten Peptide liegt genau am Anfang des vorhergesagten Signalpeptids. Ein weiteres markiert die letzten 7 Aminosäuren einer der für die Immunisierung ausgewählten Peptide.

Die für die Immunisierung synthetisierten Peptide hatten die in Klammern angegebenen Kennziffern und wiesen die unten angegebenen Daten für pI und Mw auf, sie wurden anhand eines Algorithmus für die Vorhersage antigener Aminosäuresequenzen ausgewählt (Hopp und Woods, 1981; [www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl](http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl)).

CKPQGKDDAHKGDDEDP      theor. pI/Mw: 4,75 / 1739,83 (EP053668)

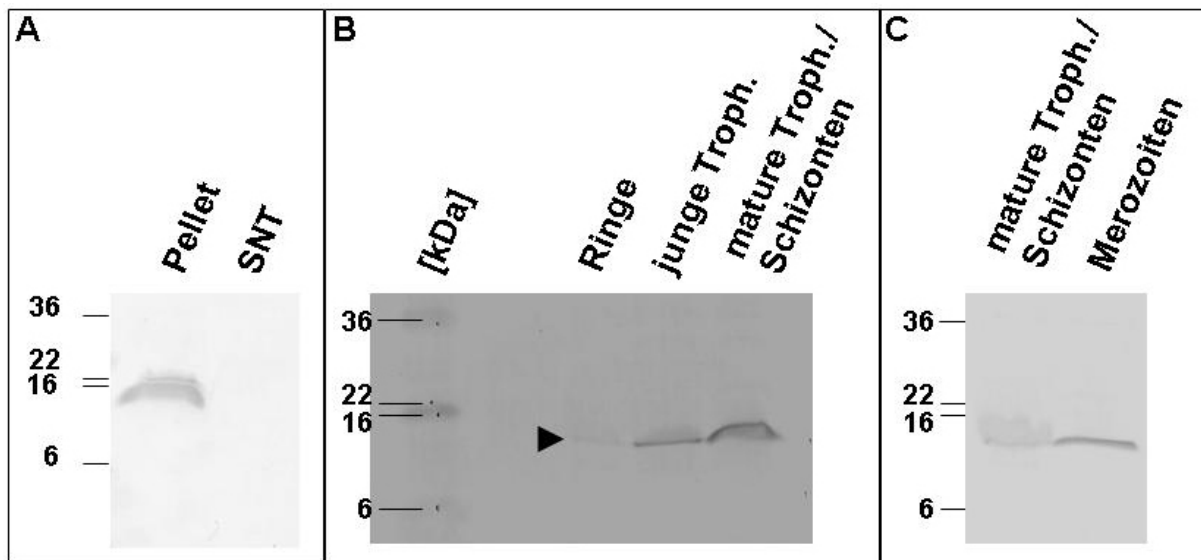
CKPDSVSSKYGLKDSR      theor. pI/Mw: 9,11 / 1769,99 (EP053669)

Die von der Firma Eurogentec (Leiden, Belgien) im Auftrag generierten Seren hatten die Bezeichnung SA5066 und SA5067. Diese zeigten in allen Experimenten die gleichen Ergebnisse. Für alle folgenden Abbildungen wurde das Serum SA5066 verwendet.

#### 3.6.4.2 Nachweis des nativen Proteins auf einer PVDF-Membran

Für das Protein *Pf13.8* wurde auf Blotmembranen eine Bande bei etwa 14 kDa nachgewiesen, was nahe an dessen theoretischer Masse von 13840 Dalton liegt (Abb. 48). Es wurde gezeigt, dass das Protein stets membrangebunden vorliegt (Abb. 48 A). Hierfür wurden Membranen infizierter Erythrocyten extrahiert und gewaschen (siehe 2.2.4). Nach Sedimentation befinden sich integrale Transmembranproteine im Membranpellet. Aus Abb. 48 A) ist ersichtlich, dass sich *Pf13.8* nach dieser Behandlung in der Membranfraktion nachweisen lässt.

Desweiteren wurde auch hier die stadienabhängige Expression von *Pf13.8* untersucht, indem jeweils Ring-, Trophozoiten sowie Schizonten miteinander verglichen wurden. In Abb. 48 B) ist zu sehen, dass *Pf38* bereits in Ringstadien nachgewiesen werden kann, die Expression aber im Laufe der Entwicklung zunimmt. In Abb. 48 C) sind Merozoiten mit maturaen Trophozoiten/Schizonten verglichen. Es ist zu erkennen, dass das Protein in beiden Stadien nachgewiesen werden kann, und es bei der Merozoitenreifung oder der Evasion offensichtlich nicht zu einer Prozessierung von *Pf13.8* kommt.



**Abb. 48: Nachweis von nativem Pf13.8 im Western-Blot**

A) Pf38 kann in der mit Hochsalz- und Karbonatpuffer gewaschenen Membranfraktion nachgewiesen werden, aber nicht im Überstand

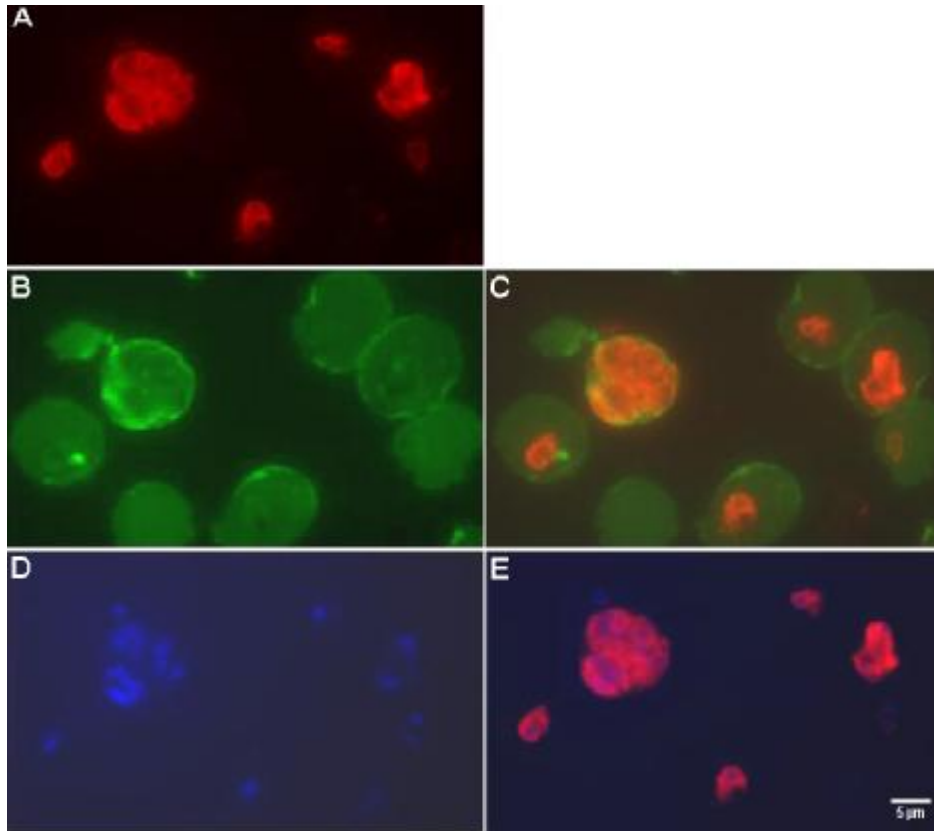
B) Pf38 kann in Ring-, Trophoziten und Schizonten-infizierten erythrocyten nachgewiesen werden. Die schwarze Pfeilspitze: markiert die Bande in Ringstadien

C) Pf38 kann in Merozoiten nachgewiesen werden und wird bei der Evasion nicht prozessiert  
Links sind jeweils die molekularen Massen des Größenstandards in kDa angegeben.

### 3.6.4.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Pf13.8

Mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden wurde Pf13.8 (rot) bereits in sehr frühen Stadien nachgewiesen, was mit den Untersuchungen der Expression in 3.6.4.2 übereinstimmt (Abb. 49). In der Abbildung ist Pf13.8 rot dargestellt (Abb. 49 A). Die Plasmamembran der Erythrocyten ist mit anti-Glycophorin-Antikörpern markiert und grün dargestellt (Abb. 49 B). Die DNA der Merozoitenkerne wurden mit Hoechst33258 gefärbt und in blau gezeigt (Abb. 49 D). In Abb. 49 C) ist die Überlagerung der Pf13.8 (rot) sowie der Glycophorin (grün) Färbung gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass Pf13.8 in dem intraerythrocytäre Parasiten lokalisiert, was auch in der Überlagerung der Kernfärbung (blau) mit der Pf13.8 zu sehen ist (Abb. 49 E).

Anscheinend lokalisiert das Protein Pf13.8 in oder an der Plasmamembran (grün) von Merozoiten (Nuclei à blau) (Abb. 49).



**Abb. 49: Fluoreszenzmikroskopische Lokalisation von Pf13.8**

A) Lokalisation von Pf13.8 (rot) in unterschiedlichen Entwicklungsstadien

B) Lokalisation von Glycophorin (grün) in der erythrocytären Plasmamembran

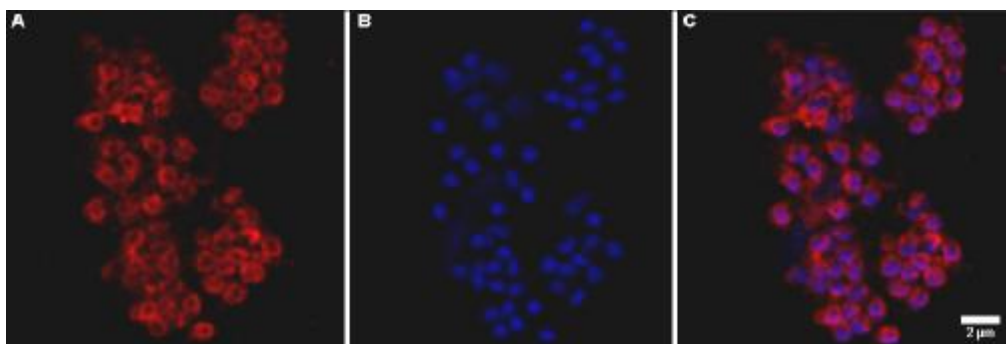
C) Überlagerung der Lokalisation von Pf13.8 (rot) und Glycophorin (grün)

D) Färbung der DNA plasmodialer Kerne (blau) mit Hoechst33258

E) Überlagerung der Kernfärbung (blau) mit der Lokalisation von Pf13.8 (rot)

Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Modell 200M) erstellt.

Der Größenbalken entspricht 5 µm.



**Abb. 50: Lokalisation von Pf13.8 in Merozoiten**

A) Lokalisation von Pf13.8 (rot) in der Plasmamembran von Merozoiten

B) Färbung der Merozoitenkerne mit Hoechst33258 (blau)

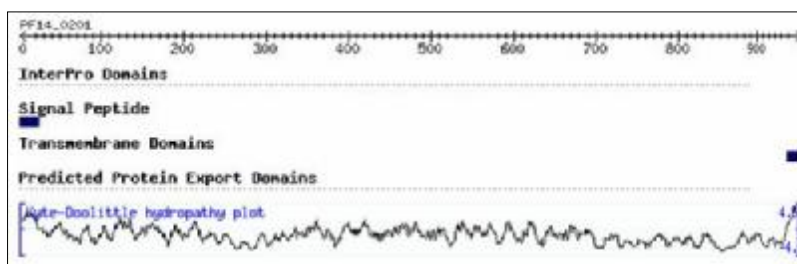
C) Überlagerung der Kernfärbung (blau) mit der Lokalisation von Pf13.8 (rot)

Die Aufnahmen wurden mit einem LSM der Firma Leica (Modell TCS SP 2) erstellt.

Der Größenbalken entspricht 2 µm.

### 3.6.5 Das Protein Pf112.5

Bei Pf112.5 handelt es sich um ein Protein mit einer theoretischen Masse von 112575 Dalton, bezogen auf die in der Datenbank enthaltene, komplette Sequenz. Der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei pI 4,21. Bisher war für den Genlocus Pf14\_0201 ein hypothetisches Protein annotiert.

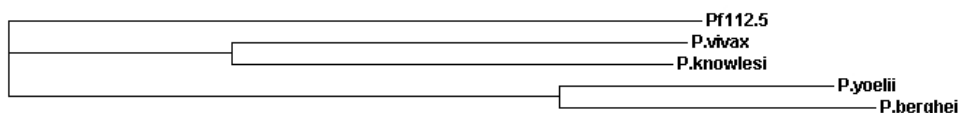


**Abb. 51: Vorhergesagte strukturelle Eigenschaften des Proteins Pf112.5**

Das Schema zeigt die aus dem Genlocus (Pf14\_0201) abgeleitete Primärstruktur sowie die vorhergesagte Lage des Signalpeptids sowie der Transmembrandomäne anhand des Kyte-Doolittle Hydrophathie Diagramms. (verändert aus [www.PlasmoDB.org](http://www.PlasmoDB.org))

Mit Hilfe von algorithmusbasierten Suchprogrammen wurden zwei hydrophobe Abschnitte der Aminosäuresequenz als wahrscheinliches Signalpeptid (SP: 1-22) sowie Transmembranhelix (TM: 949-966) benannt (Abb. 51) (Krogh *et al.*, 2001; Nielsen und Krogh, 1998). Zusätzlich wurde für das Protein ein GPI-Anker vorhergesagt (<http://gpi.unibe.ch>; Fankhauser und Mäser, 2005).

In der PSI-BLAST-Suche wurden weitere hypothetische Proteine aus vier anderen Plasmodienspecies (*P. vivax*, *P. yoelii yoelii*, *P. berghei* sowie *P. knowlesi*) gefunden (Anhang 7.2, Abb. 68). Das in Abb. 52 gezeigte Phylogramm verdeutlicht anhand der Längen der Äste den Verwandtschaftsgrad der orthologen Proteine. Demnach steht Pf112.5 zwei Paaren gegenüber, die von dem Humanpathogen *Plasmodium vivax* und dem Primatenpathogen *Plasmodium knowlesi* sowie den beiden Nager-spezifischen Pathogenen *Plasmodium yoelii yoelii* und *Plasmodium berghei* gebildet werden.



**Abb. 52: Phylogramm der Orthologen Proteine von Pf112.5**

Die Länge der Äste symbolisiert die Ähnlichkeit der miteinander verglichenen Sequenzen (erstellt mit ClustalW: [www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/))

Für die Proteine wurde die folgende prozentuale Sequenzidentität mit *Pf112.5* ermittelt werden:

Organismus	Genlocus	Sequenzidentität mit <i>Pf112.5</i>
<i>P. vivax</i>	(Pv085445)	56 %
<i>P. knowlesi</i>	(PKH_132830)	46 %
<i>P. yoelii yoelii</i>	(PY05715)	49 %
<i>P. berghei</i>	(PB000807.00.0)	57 %

### 3.6.5.1 Massenspektrometrische Daten und Auswahl der Peptide für die Immunisierung

Das Protein *Pf112.5* wurde in beiden Analysedurchläufen mehrfach signifikant identifiziert. Insgesamt wurden in Präp-1 zwei tryptische Peptide in einer Bande sowie in Präp-2 36 teilweise identische Peptide in acht unterschiedlichen Banden identifiziert (Anhang 7.3, Abb. 72). Daraus ergab sich eine Abdeckung der Aminosäuresequenz von 17 %.

In Präp-1 wurden die Peptide in Bande 5, die etwas unter der 79 kDa Markerbande liegt, sequenziert (Abb. 13). In Präp-2 wurde das Protein in den Banden 3 (> 119 kDa), 4 (> 119 kDa), 5 (> 119 kDa), 6 (> 119 kDa), 12 (~ 79 kDa), 13 (~ 79 kDa), 17 (~ 50 kDa) der Sedimentfraktion sowie in Bande 45 (~ 46 kDa) des Überstands identifiziert (Abb. 17).

In der nachfolgenden Sequenz sind die in der Massenspektrometrie identifizierten Peptide unterstrichen dargestellt. Das vorhergesagte Signalpeptid ist **pink** und die Transmembrandomäne **oliv** hervorgehoben. Die für die Immunisierung ausgewählten Sequenzen sind **rot** markiert (Abb. 53).

MKIPFFILHILLQFLLCIRCYVHNDVIKFGEEENSLKCSQGNLYVLHCEVQCLNGNNEIIHKR  
 CNDDIEKKCNGNKKCIYFFEYELRKKTSFRNKNSIEISECVSESEQNEVKTSTTCLLSNSFILD  
 EAFIQYFFFIKNKNEEPVICKDGNINIKSALLHSPFCEIKLKDISEYIRKKCDNNKECLIDPLD  
 VQKNLLNEEDPCYINNSYVSVNVVVCNKEEIG **DESTDSSMEIQDSTS**NEQDENVKGMSSSQEM  
 NSNNDENKNQDNESSDDVNNNNNNNDDQDEQNDGDVTSMMKNEDNKDLEHGSSNDVNNNTD  
 TLVNNKENKEFVLKEKSSLSKINKELAHRTALFNK LADNISLLLNKKYDSFEIKDVLEDRYNE  
 MKRDANPDVYIYLMDTLDIKIEDINLEEVK MSLLASLKETMKNIDTIEKKIEEFKNKYISLY  
 NKVKTTPPELFDLNEDLVLLYNDPFDFNGMISSDIFFKYNPSENIMDHQEMVKK GSITEDELRI  
VNDLEPLDNYRRRKRI TELRKILVEKLRILYLEKNNLFNTQASCIKSYCYKNPLNLK TLEVLLK  
KNYRRLKENKDYDVVSSI IQHLDNVDANKKKKWL THERILKKLQVLI AEGYKRINEKEKDIDRR  
MAVYNALYEKAQSYNLQKLFNDSNDFLKKYAIMGNSFDDGDEVFGSQSSNFNIFDSNNTDQNNE  
QE QPKQDDQLLNNNDDVLSSESNNEKETSDDA **THKETQEKSDQEPSQ**NIQEDNSDEKHAENE  
ENVEQIETDSNVSEEANDENKDNMQTTTDEGTEELQONDEDAESLTKENSK SEEQENEDSTDAE  
AIDKEEVETEKGKDEQKDEQKDEEEDGEKKNKHK SSETTNETVTDIEENKNEVKGEEHLQ  
GSEQIEASESSQKDETKETEDKEEYVNAVNDDESSEEDTTPNETNKT DNGSS **FFFAMSNALLVI**  
LLLLFIEFL

**Abb. 53: Primärstruktur von Pfl 12.5 (gi|23495239)**

pink: Signalpeptid; oliv: vorhergesagte Transmembrandomäne, rot: für die Immunisierung verwendete Peptide; unterstrichen: in der Massenspektrometrie sequenzierte Peptide

Anhand der Sequenz ist zu erkennen, dass die Peptide alle in den C-terminalen 2/3 der Gesamtsequenz zu finden sind.

Die für die Immunisierung verwendeten Peptide haben die in Klammern genannten Kennungen sowie die folgenden theoretischen physikalischen Eigenschaften und wurden, wie bereits für die anderen Proteine beschrieben, ausgewählt:

**CDESTDSSMEIQDSTS** theor. pI/Mw: 3,33 / 1718,67 (EP053620)

**CTHKETQEKSDQEPSQ** theor. pI/Mw: 4,83 / 1874,95 (EP053619)

Die von der Firma Eurogentec generierten Seren hatten die Bezeichnung SA5076 und SA5077. Das Serum SA5077 wurde für alle hier gezeigten Experimente verwendet.

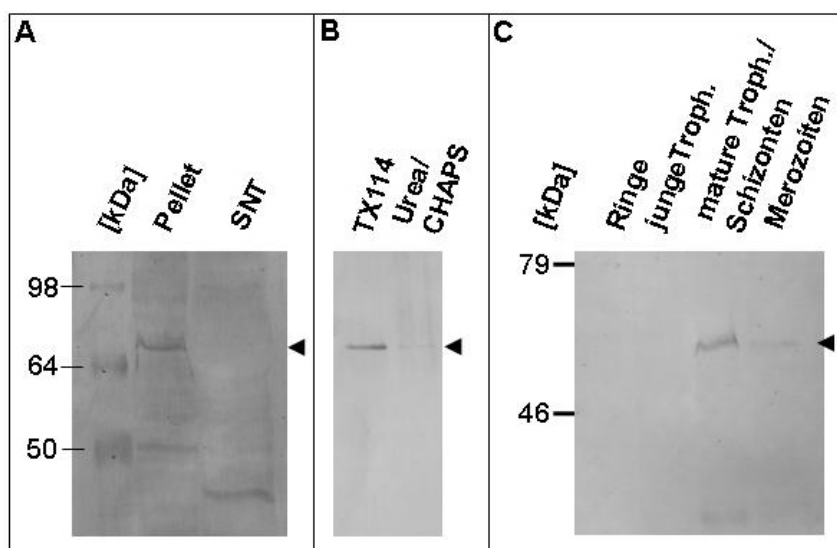
### 3.6.5.2 Nachweis des nativen Proteins auf einer PVDF-Membran

Auf der PVDF-Membran wurde nach dem Transfer der Proteine aus dem Gel eine Proteinbande bei ca. 70 kDa erkannt (Abb. 54 A-C). Dies bedeutet eine Diskrepanz von rund 40 kDa zum theoretischen Molekulargewicht des Proteins von 112 kDa. Auch in der massenspektrometrischen Analyse erfolgte die Identifikation des Proteins in niedriger laufenden Proteinbanden, als es aufgrund der aus der Primärsequenz berechneten Größe sein sollte. Zusammen mit der hohen Sequenzabdeckung der massenspektrometrisch

identifizierten Peptide im C-terminalen Bereich der in der Datenbank hinterlegten Aminosäuresequenz, ist davon auszugehen, dass das Protein nach der Biosynthese prozessiert wird. Der N-Terminus war nicht zu verifizieren.

Es wurde gezeigt, dass es sich bei dem Protein *Pf112.5* um ein Membranprotein handelt (Abb. 54 A). Hierfür wurden Membranen infizierter Erythrocyten extrahiert (siehe 2.2.4) und anschließend, wie schon für die anderen Proteine beschrieben, behandelt. In Abb. 54 A) ist zu sehen dass nur in der sedimentierten Membranfraktion eine Bande erscheint.

Durch die Anreicherung von DRM-Rafts mittels temperaturabhängiger Triton X-114 Phasentrennung wurde gezeigt, dass *Pf112.5* offensichtlich in DRM-Rafts enthalten ist. In der Triton X-114 Fraktion ist eine einzige starke Bande zu erkennen, während in der CHAPS/Harnstoff Extraktion nur eine schwache Bande zu sehen ist (Abb. 54 B). Dies stimmt gut mit dem vorhergesagten GPI-Anker überein, der ein Indiz dafür ist, dass ein Protein mit DRM-Rafts assoziiert ist (Butikofer *et al.*, 2001).



**Abb. 54: Nachweis von nativem *Pf112.5* auf einer PVDF-Membran**

A) *Pf112.5* kann in der mit Hochsalz- mit Karbonatpuffer behandelten Membranfraktion nachgewiesen werden, aber nicht im Überstand

B) *Pf112.5* kann in einer DRM-Rafts Fraktion angereichert werden

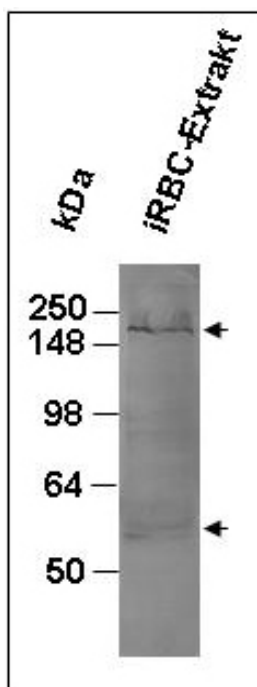
C) *Pf112.5* kann in murenen Trophozoiten/Schizonten sowie in geringem Maße in Merozoiten nachgewiesen werden.

Links sind die molekularen Massen der verwendeten Größenmarker in kDa angegeben.

Bei der Untersuchung der stadienabhängigen Expression von *Pf112.5* wurde gezeigt, dass das Protein in Trophozoiten/Schizonten nachweisbar ist (Abb. 54 C). Außerdem tritt eine sehr schwache Bande in gereinigten Merozoiten in derselben Höhe auf (Abb. 54 C). Hieraus ist zu schließen, dass das Protein bei der Merozoitenentwicklung nicht weiter prozessiert wird.



Auf Blot-Membranen, auf die extrahierte Membranproteine transferiert wurden, wurde die nachgewiesene Größe des Proteins *Pf12.5* sehr von der theoretischen Masse von 112 kDa ab. Bei entsprechenden Experimenten in denen Gesamtextrakt infizierter Erythrocyten verwendet wurde, trat zudem eine weitere Bande auf, die über der 148 kDa Bande des verwendeten Proteinstandards lief (Abb. 55). Aufgrund ihrer scheinbar zu großen Molekulargewichts wurde diese zunächst für eine Kreuzreaktion gehalten.



**Abb. 55: Nachweis von *Pf12.5* in Gesamtextrakt infizierter Erythrocyten**

Über eine Protein A-Säule gereinigtes SA5077-Serum wurde verwendet, um *Pf12.5* in Gesamtextrakt infizierter Zellen nachzuweisen.

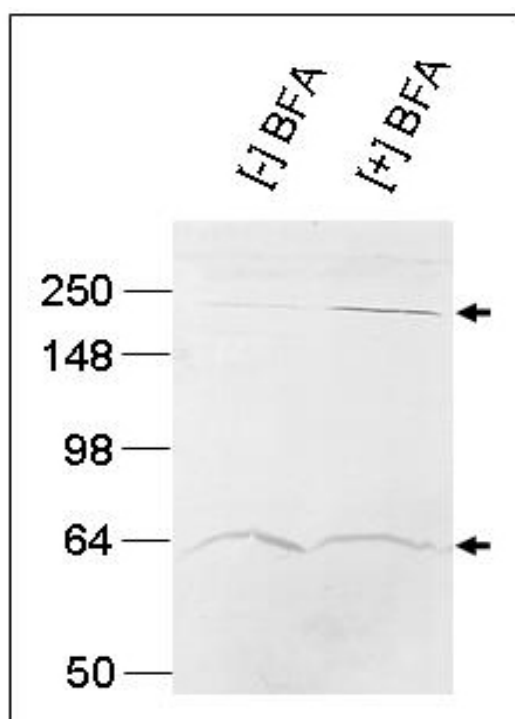
Links sind die molekularen Massen des Größenstandards in kDa angegeben (SeeBlue Plus2, Invitrogen)

### 3.6.5.3 Nachweis von *Pf12.5* nach Behandlung infizierter Erythrocyten mit Brefeldin A

Durch Behandlung von Zellen mit Brefeldin A (BFA), einem toxischen Metaboliten aus Pilzen, kann der klassische sekretorische Proteintransportweg reversibel gehemmt werden (Doms *et al.*, 1989; Benting *et al.*, 1994). Die Verwendung der Substanz führt dazu, dass Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) akkumulieren, da der Golgiapparat degradiert wird (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989).

Für das Experiment wurden angereicherte Trophozoiten für 16 Stunden mit BFA behandelt und die Proteine des Gesamtextraktes mittels SDS-PAGE getrennt. Anschließend wurde die Blot-Membran mit peptidspezifischen, affinitätsgereinigten anti-*Pf12.5* Antikörpern inkubiert.

In Abb. 56 ist zu erkennen, dass neben der ~70 kDa Bande auch die in Abb. 55 gezeigte Bande bei etwa 250 kDa erkannt wird. Diese ist jedoch in BFA-behandelten und unbehandelten Zellen unterschiedlich stark ausgeprägt. In unbehandelten Zellen war die Bande kaum vorhanden, während sie in infizierten Erythrocyten, die mit BFA behandelt wurden, stärker hervortrat. Gleichzeitig nahm die Intensität der 70 kDa Bande ab (Abb. 56). Dieser Effekt ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass es sich bei der höher laufenden Bande um einen Vorläufer des Proteins *Pf12.5* handelt, der erst im ER der Zelle zur 70 kDa Form prozessiert wird.



**Abb. 56: Nachweis von *Pf12.5* in Brefeldin A behandelten infizierten Erythrocyten**

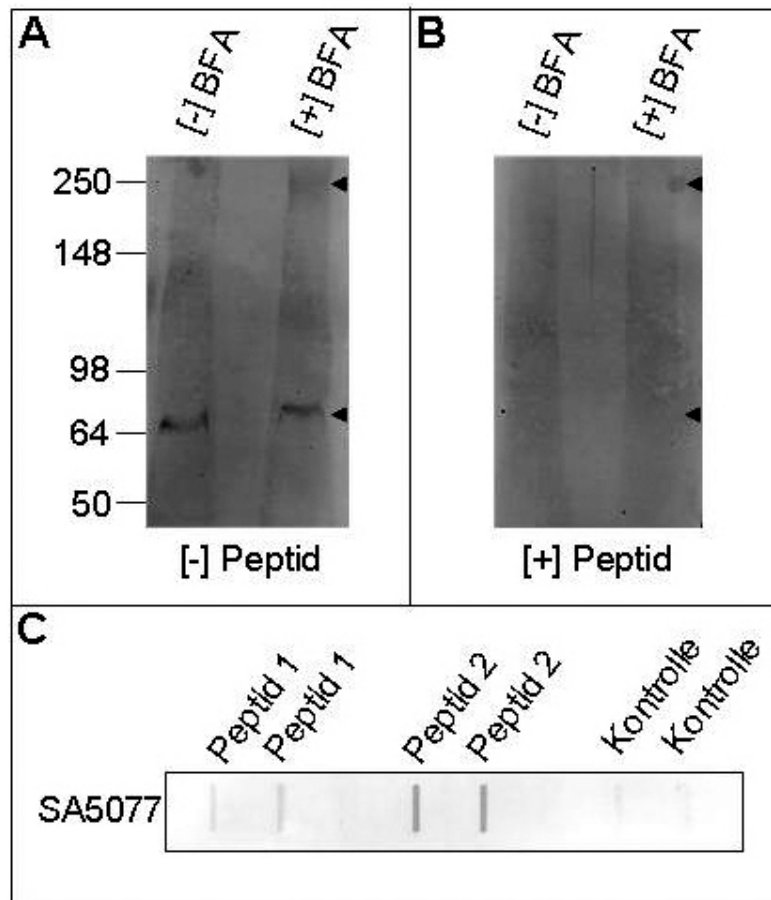
linke Bahn: unbehandelte Zellen; die obere Bande des möglichen Vorläufers ist nur schwach zu erkennen

rechte Bahn: BFA behandelte Zellen; die obere Bande tritt stärker hervor, während die untere etwas schwächer wird.

Links sind die molekularen Massen des Größenmarkers in kDa angegeben (SeeBlue Plus2, Invitrogen).

Zur Überprüfung, ob es sich bei der kleineren Bande um eine spezifische Reaktion handelt, wurde das eingesetzte Serum mit dem N-terminal liegenden und zur Immunisierung verwendeten Peptiden (EP053619) vorinkubiert. In Abb. 57 B ist zu sehen, dass die Bande daraufhin komplett verschwand. Die höhere Bande war auf der Blot-Membran in den BFA-behandelten Zellen nur schwach zu erkennen (Abb. 57 B). Nach Vorinkubation mit dem Peptid war diese jedoch ebenfalls nicht mehr nachweisbar (Abb. 57 B). Dies war darauf

zurückzuführen, dass die Erkennung des Proteins hauptsächlich über das zweite, C-terminal liegende Peptid erfolgt. Das N-terminale Peptid wurde kaum erkannt (Abb. 57 C).



**Abb. 57: Nur ein Peptid fungiert in Pfl12.5 als Antigen**

A) Beide Proteinfragmente sind nachweisbar (Pfeilspitzen)

B) nach Vorinkubation mit dem C-terminal liegenden Peptid verschwinden beide Signale

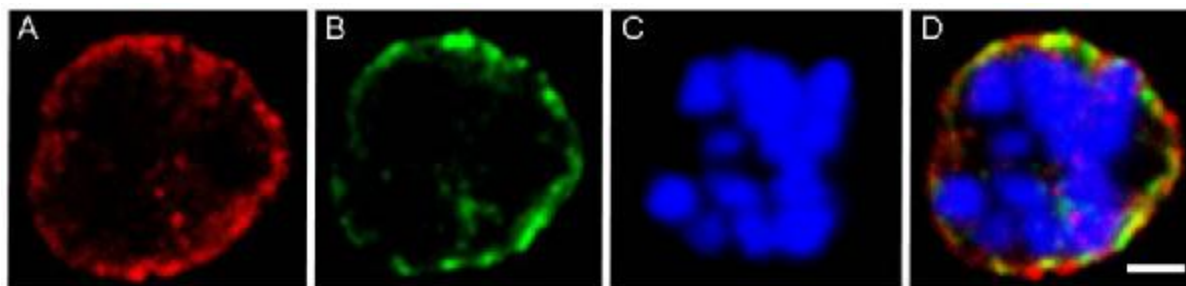
C) Das erste Peptid (N-terminal) wird im Gegensatz zu dem zweiten Peptid (C-terminal) vom Serum SA5077 kaum erkannt.

Es wurden jeweils zwei unterschiedliche Konzentration der Peptide sowie der Kontrolle (Melittin) eingesetzt.

Links sind die molekularen Massen des Größenstandards in kDa angegeben.

### 3.6.5.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie von *Pf112.5*

Mittels konfokaler *laser-scanning* Mikroskopie wurde nachgewiesen, dass das Protein *Pf112.5* (rot) in der parasitophoren Vakuolenmembran lokalisiert (Abb. 58 A). In Abb. 58 B) ist die Lokalisation von EXP-2 (grün) gezeigt, das wie von Günther *et al.* (1991) beschrieben, in der den Parasiten umgebenden PVM lokalisiert.



**Abb. 58: Lokalisation von *Pf112.5* in infizierten Erythrocyten**

A) Lokalisation von *Pf112.5* (rot)

B) Lokalisation von EXP-2 (grün)

C) Färbung der Merozoitennuklei mit Hoechst33258 (blau)

D) Überlagerung der Bilder A-C: die gelbe Färbung erfolgt durch partielle Kolokalisation von *Pf112.5* und EXP-2

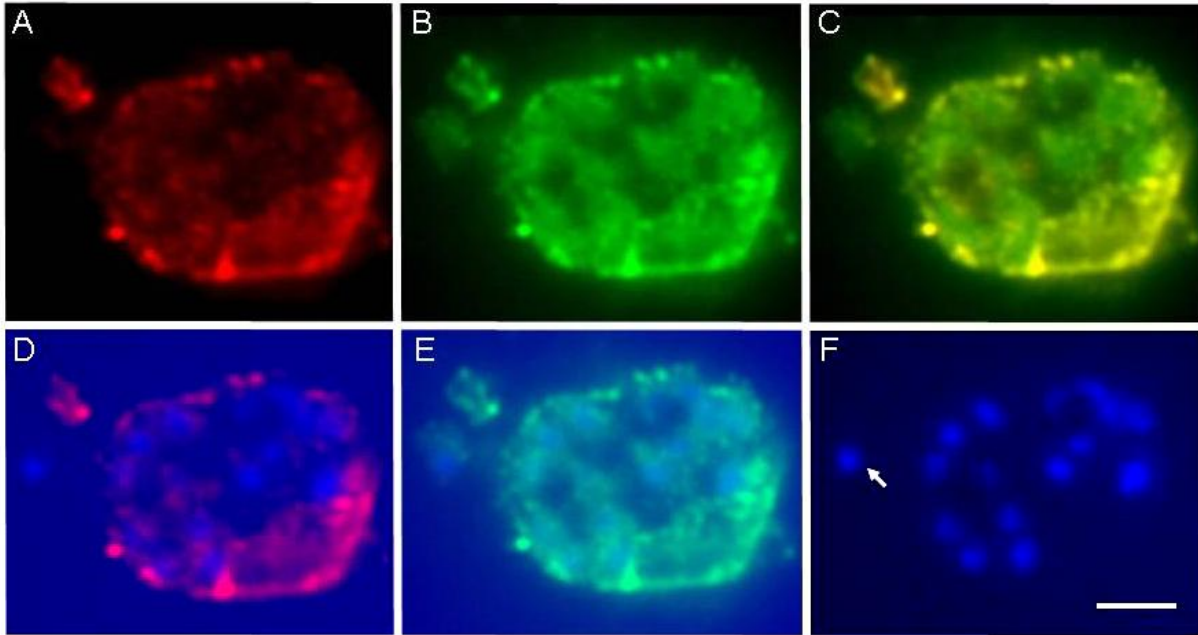
Die Aufnahmen wurden mit einem LSM der Firma Leica (Modell TCS SP 2) erstellt.

Der Größenbalken entspricht 3  $\mu\text{m}$ .

In Abb. 59 ist eine weitere im Fluoreszenzmikroskop aufgenommene Kolokalisation von *Pf112.5* (rot) mit EXP-2 (grün) gezeigt. Auch hier ist in Abb. 59 C) deutlich die gelbe, durch Kolokalisation der beiden fluoreszenzmarkierten Proteine *Pf112.5* und EXP-2 entstehende Markierung zu erkennen. In Abb. 59 D-E) ist *Pf112.5* (rot) sowie EXP-2 (grün) jeweils mit der Färbung von Merozoitennuklei (blau) überlagert.

In Abb. 59. D+F) ist deutlich zu erkennen, dass *Pf112.5* nicht mit freien Merozoiten (weißer Pfeil) kolokalisiert. Es ist lediglich eine schwache rote Färbung zu erkennen, die ggf. darauf zurückzuführen ist, dass nach der Evasion PVM-Fragmente an den Merozoiten haften bleiben.

Mit zunehmendem Reifegrad der Schizonten war es immer schwieriger die PVM deutlich abzubilden. Das immer diffuser werdende Signal war wahrscheinlich auf das Anschwellen der PV und der damit einhergehenden Oberflächenzunahme erklärbar. Hierdurch würden die in der PVM lokalisierten Antigene weiter auseinanderdriften, woraus eine Abschwächung des Signals resultieren würde. Bei DRM-Rafts assoziierten Proteinen würde dieser Effekt noch stärker zum tragen kommen.



**Abb. 59: Lokalisation von *Pf112.5* und EXP-2 in murenen Trophozoiten**

A) Lokalisation von *Pf112.5* (rot)

B) Lokalisation von EXP-2 (grün)

C) Kolokalisation von *Pf112.5* (rot) mit EXP-2 (grün)

D) Kolokalisation von *Pf112.5* (rot) mit gefärbten Merozoitenkernen (blau)

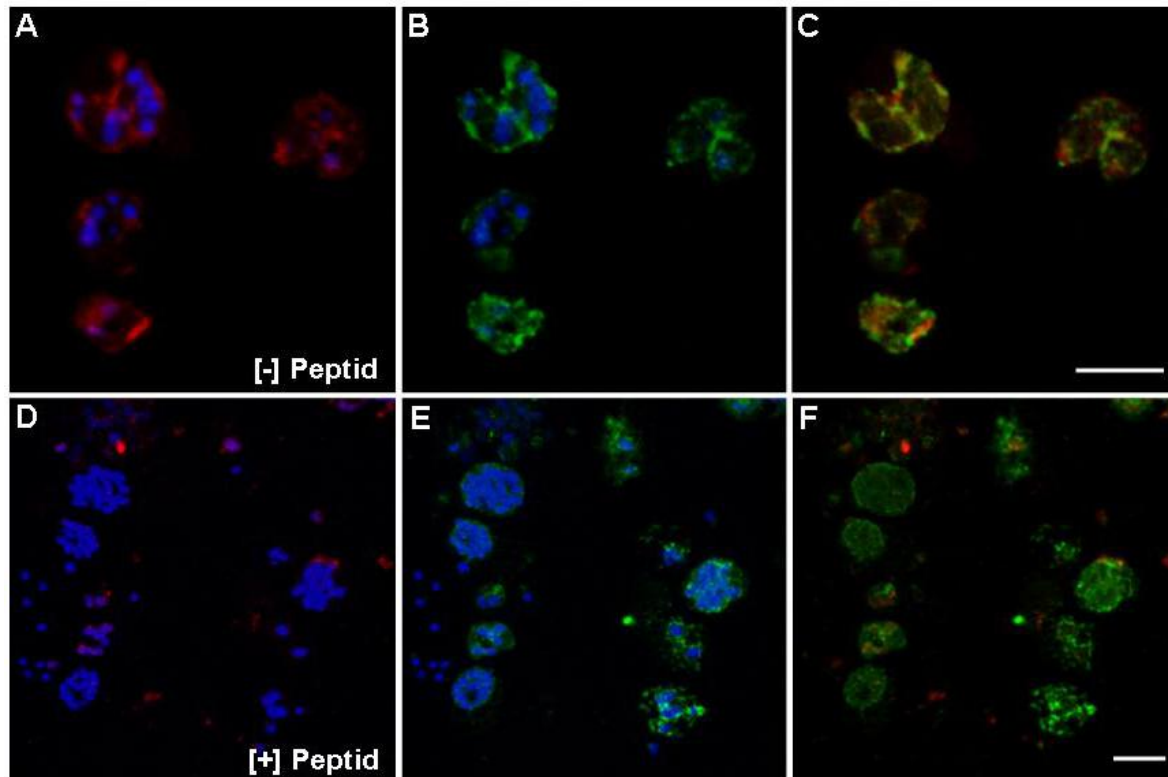
E) Lokalisation von EXP-2 (grün) mit gefärbten Merozoitenkernen (blau)

F) Mit Hoechst33258 gefärbte Merozoitenkerne; der weiße Pfeil markiert einen frei vorliegenden Merozoiten

Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Modell 200M) erstellt.

Der Größenbalken entspricht 3  $\mu\text{m}$ .

Durch Vorinkubation der Antikörper mit den für die Immunisierung verwendeten Peptiden wurde gezeigt, dass es sich bei den Fluoreszenzsignalen von *Pf112.5* nicht um Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen sondern um spezifische Signale handelte (Abb. 60). In Abb. 60 A) sind markierte Zellen gezeigt, bei denen anti-*Pf112.5* Antikörper (rot) verwendet wurden, die nicht mit den Peptiden vorinkubiert wurden. In Abb. 60 B) ist in den gleichen Zellen die Lokalisation von EXP-2 gezeigt, sowie in Abb. 60 C) die Fluoreszenzüberlagerung der beiden Bilder, wobei die blaue Kernfärbung nicht gezeigt wurde. Bei Abb. 60 D) wurde das anti-*Pf112.5* Serum mit den Peptiden vorinkubiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Fluoreszenzsignal beinahe komplett verschwunden ist. In Abb. 60 E) ist das entsprechende EXP-2 Signal sowie in Abb. 60 F) die Überlagerung der Fluoreszenzen von beiden Aufnahmen gezeigt.



**Abb. 60: Das Fluoreszenzsignal von *Pf112.5* verschwindet nach Inkubation mit den beiden für die Immunisierung verwendeten Peptiden**

A-C) ohne Peptid-Vorinkubation [- Peptid]

D-F) mit Peptid-Vorinkubation [+ Peptid]

A) Lokalisation von *Pf112.5* (rot) mit Kernfärbung durch Hoechst33258 (blau)

B) Lokalisation von EXP-2 (grün) mit Kernfärbung Hoechst33258 (blau)

C) Überlagerung der Lokalisation von *Pf112* (rot) und EXP-2 (grün)

D) Lokalisation von *Pf112.5* (rot) mit Kernfärbung durch Hoechst33258 (blau)

E) Lokalisation von EXP-2 (grün) mit Kernfärbung Hoechst33258 (blau)

F) Überlagerung der Lokalisation von *Pf112* (rot) und EXP-2 (grün)

Die Aufnahmen wurden mit einem LSM der Firma Leica (Modell TCS SP 2) erstellt.

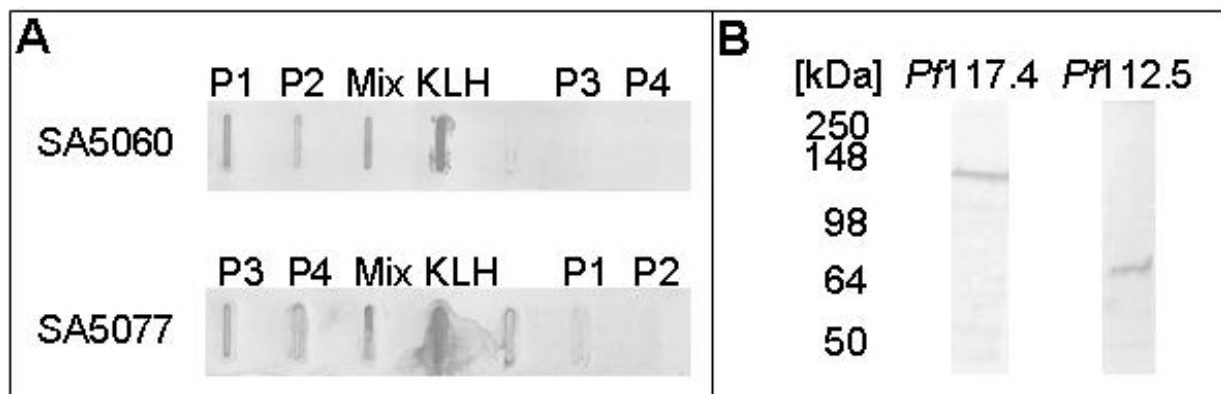
Der Größenbalken entspricht 8  $\mu\text{m}$ .

### 3.6.6 Verwendung affinitätsgereinigter Antikörper für den Nachweis von *Pf117.4* und *Pf112.5*

Um ausschließen zu können, dass es sich bei dem beobachteten Fluoreszenzsignal um Artefakte durch Kreuzreaktionen unspezifischer Antikörper im Serum SA5060 und SA5077 handelt wurden zunächst die IgG-Moleküle über eine Protein A-Säule gereinigt (siehe 2.7.2.1). Die reinen IgGs wurden anschließend einer Affinitätschromatographie unterzogen. Dafür wurden die gleichen, wie auch für die Immunisierung verwendeten Peptide (SA5060: EP053617 und EP053618; SA5077: EP053619 und EP053620) an eine NHS-HiTrap-Säule (Amersham Bioscience) gekoppelt und hierüber anschließend die spezifischen Antikörper gereinigt (siehe 2.2.7.1).

In Abb. 61 A) ist zu erkennen, dass die affinitätsgereinigten Antikörper jeweils die gewünschten Peptide erkennen. Als Kontrolle wurde KLH eingesetzt, das ebenfalls von allen Seren erkannt wird, sowie die jeweiligen Peptide des anderen Serums bei denen es zu keiner Reaktion kommt.

Auf einer PVDF-Membran wurde nach Elektrotransfer der Proteine, die spezifische Reaktion der gereinigten Peptide mit dem jeweiligen Antigen nachgewiesen (Abb. 61 B).



**Abb. 61: Nachweis der Antigene *Pf117.4* und *Pf112.5* mit affinitätsgereinigten IgG-Molekülen**

A) SA5060: für den Nachweis von *Pf117.4* verwendetes Serum; SA5077: für den Nachweis von *Pf112.5* verwendetes Serum; P1: erstes für die Generierung von SA5060 eingesetztes Peptid; P2: zweites für die Generierung von SA5060 eingesetztes Peptid; P3: erstes für die Generierung von SA5077 eingesetztes Peptid; P4: zweites für die Generierung von SA5077 eingesetztes Peptid; KLH: *keyhole limpet hemocyanin*; Mix: Mischung von P1+P2 bzw. P3+P4

B) Nachweis der Antigene *Pf117.4* und *Pf112.5* mit peptidspezifischen Antikörpern

Links sind die molekularen Massen des verwendeten Größenmarkers in kDa angegeben (SeeBlue Plus2, Invitrogen).

Im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurden die Antikörper in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie überprüft und daraufhin direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (siehe 2.2.6.1). Für die gereinigten anti-*Pf117.4* Antikörper wurde das grün fluoreszierende *DyLight 488* (Pierce), für anti-*Pf112.5* das rot fluoreszierende *Cy3* (Amersham Bioscience) verwendet.

Die Ergebnisse waren identisch mit den in 3.6.2.3 bzw. 3.6.5.4 gezeigten Bildern, die Fluoreszenzintensität war jedoch beträchtlich geringer. Gerade in Segmenten war nur ein sehr schwaches Signal für *Pf112.5* zu erkennen. Eine Kolo-kalisation der beiden Proteine war dadurch nicht möglich. Auf die Darstellung von Bildern wurde aus diesen Gründen verzichtet.

## 4. Diskussion

Nach der Veröffentlichung der Genomsequenzdaten von *Plasmodium falciparum* im Jahr 2002 wurden insgesamt 5276 proteincodierende Gene annotiert (Gardner *et al.*, 2002). In einer Proteomanalyse unterschiedlicher Entwicklungsstadien des Malaria-Pathogens wurden 2415 als tatsächlich exprimierte Proteine identifiziert (Florens *et al.*, 2002), von denen etwa die Hälfte als hypothetisch annotiert war. Dies stimmt gut mit den momentanen Resultaten aus Datenbankrecherchen überein. Derzeit sind in der PlasmoDB-Datenbank ([www.PlasmoDB.org](http://www.PlasmoDB.org); Bahl *et al.*, 2003) insgesamt 1171 Proteine als hypothetisch annotiert, für die auch eine Transmembrandomäne (TM) vorhergesagt wurde. 334 hypothetische Proteine weisen sowohl eine vorhergesagte TM als auch ein vermutetes Signalpeptid auf. Diese hypothetischen Proteine stellen eine enorme Herausforderung für *Cell-Map-Proteomics*-Ansätze dar, mit deren Hilfe die Proteine aus vorfraktionierten, infizierten Erythrocyten identifiziert und anschließend lokalisiert werden sollen (Barrett *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden entsprechende *Cell-Map*-Proteomanalysen von angereicherten Merozoiten sowie der den Parasiten umgebenden Membransysteme durchgeführt. Merozoiten sind interessante Zielobjekte, da sie die infektiöse Form des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* darstellen. Zudem sind sie das einzige Entwicklungsstadium, das transient in größerer Anzahl direkt dem menschlichen Immunsystem ausgesetzt ist (Matuschewski, 2006). Bei den Merozoiten handelt es sich zudem um höchst spezialisierte Zellen, die einerseits die für die Erkennung und Bindung von Erythrocyten benötigte Proteinausstattung auf ihrer Oberfläche aufweisen (Cowman und Crab, 2002; Kushwaha *et al.*, 2002; Goel *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Kariuki *et al.*, 2005), andererseits sind die Merozoiten die treibende Kraft bei der Invasion, da rote Blutzellen über keinerlei der für die Endocytose benötigte Proteinausstattung verfügen (Opitz und Soldati, 2002; Morrissette und Sibley, 2002; Kakhniashvili *et al.*, 2004).

Die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) und das tubovesikuläre Netzwerk (TVN) fungieren während des gesamten intraerythrocytären Zyklus von *P. falciparum* als Schnittstelle zwischen der Wirts- und der Parasitenzelle. Zu Beginn der Invasion geht die PVM aus der Einstülpung der erythrocytären Plasmamembran hervor, wobei sie zunächst von Wirtszellproteinen entledigt wird. Das TVN wird erst mit der Zeit erkennbar und stellt vermutlich Ausstülpungen der PVM dar (Elmendorf und Haldar, 1994; Cowman und Crabb, 2006). Im Laufe der Entwicklung wurde eine Hand voll plasmodialer Proteine sowie einige erythrocytäre DRM-Rafts assoziierte Proteine in der PVM lokalisiert, über deren dortige Funktion jedoch nur wenig bekannt ist (Bannister *et al.*, 1986a; Sam-Yellowe *et al.*, 1988; Bannister und Mitchell, 1989; Fischer *et al.*, 1998; Günther *et al.*, 1991; Hiller *et al.*, 2003;



Ling *et al.*, 2003; Spielmann *et al.*, 2003; Lauer *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2004; Cooper *et al.*, 2005). Während der weiteren Entwicklung stellt die PVM eine Barriere dar, über die hinweg Proteine sowie Nährstoffe transportiert werden müssen (Desai *et al.*, 1993; Nyalwidhe *et al.*, 2003; Lingelbach und Przyborski, 2006). Die Lokalisation erythrocytärer, an Signaltransduktionsprozessen beteiligter Komponenten lässt zudem vermuten, dass das PVM/TVN-Netzwerk eine Schaltstelle zwischen Parasit und Wirtszelle sowie dem umgebenden Milieu darstellt (Lauer *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2004; Halder und Mohandas, 2007). Zu den dort nachgewiesenen Proteinen gehört etwa ein erythrocytäres G-Protein, welches als vielversprechendes Ziel für die Chemotherapie der Malaria gilt (Murphy *et al.*, 2006b). Mittels Inhibition des G-Proteins durch  $\beta$ -Blocker wurde demonstriert, dass das Protein am intrazellulären Wachstum des Parasiten beteiligt ist (Murphy *et al.*, 2006b).

Da die subzellulären Strukturen des PVM/TVN-Netzwerks offensichtlich von essentieller Bedeutung für die intraerythrocytären Entwicklung der Parasiten sind, sollten in der vorliegenden Arbeit spezifische Antiseren gegen bisher als hypothetisch annotierte Proteine generiert werden, die resultierenden Seren wurden für die biochemische und zellbiologische Charakterisierung der Proteine eingesetzt. Die Vorgehensweise ist in Abb. 62 schematisch dargestellt. Zuerst sollten die intakten Merozoiten von extraplasmatischen Membranstrukturen durch differenzielle Zentrifugationsschritte voneinander getrennt werden. Für die Separation und Analyse von Proteinen der Merozoitenfraktion wurde daraufhin eine auf 2D-PAGE und MALDI-TOF-MS basierende Methode eingesetzt (Abb. 62). Der Vorteil dieser Methode gegenüber einem 1D-PAGE/LC-ESI-MS/MS-Ansatz sollte sein, dass man im Gel Informationen über die separierten Proteine, wie etwa den experimentellen isoelektrischen Punkt, die experimentelle molekulare Masse, ggf. auftretende Modifikationen sowie prozessierte Varianten identifizieren kann. Der Nachteil der Methode ist die schlechte Solubilisierbarkeit sehr großer sowie membranständiger Proteine. Auch sehr basische oder saure Proteine neigen dazu, in der ersten Dimension auszufallen (Barrett *et al.*, 2000). Das Resultat der Analyse der Merozoitenproteine waren 5 % identifizierte Membranproteine von 132 untersuchten Proteinen. In Hinblick darauf, dass bisher nicht beschriebene integrale Membranproteine des PVM/TVN-Netzwerks charakterisiert werden sollten, wurde die Separation bei einer weiteren Analyse mittels herkömmlicher eindimensionaler Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 62). Die einzelnen Proteine der einzelnen Banden wurden anschließend mit Hilfe der LC-ESI-Tandem-Massenspektrometrie identifiziert. Dabei wurde ausgenutzt, dass im Prinzip schon wenige Peptide aus einem Protein ausreichend sind, um dieses signifikant identifizieren zu können. Der aus der Sensitivität der Methode resultierende Nachteil war, dass auch Proteine, die nur eine Verunreinigung der Fraktion darstellen, identifiziert werden würden. Diese sollten anschließend größtenteils durch

Subtraktion der Resultate aus der Analyse der Merozoitenproteine eliminiert werden. Die Reproduzierbarkeit der Analyse wurde durch eine Wiederholung bestätigt. Die beiden Experimente werden im Folgenden als Präp-1 und Präp-2 bezeichnet.

Im Anschluss an die massenspektrometrische Untersuchung der Präparation subzellulärer Membransysteme (Präp-1) wurden 5 Proteine ausgewählt, um gegen Peptide aus deren Primärstruktur Antiseren zu generieren. Unter Verwendung dieser Seren sollten die entsprechenden, bisher nicht charakterisierten Proteine des durch den Parasiten gebildeten, intraerythrocytären Membrannetzwerks biochemisch und zellbiologisch beschrieben werden.

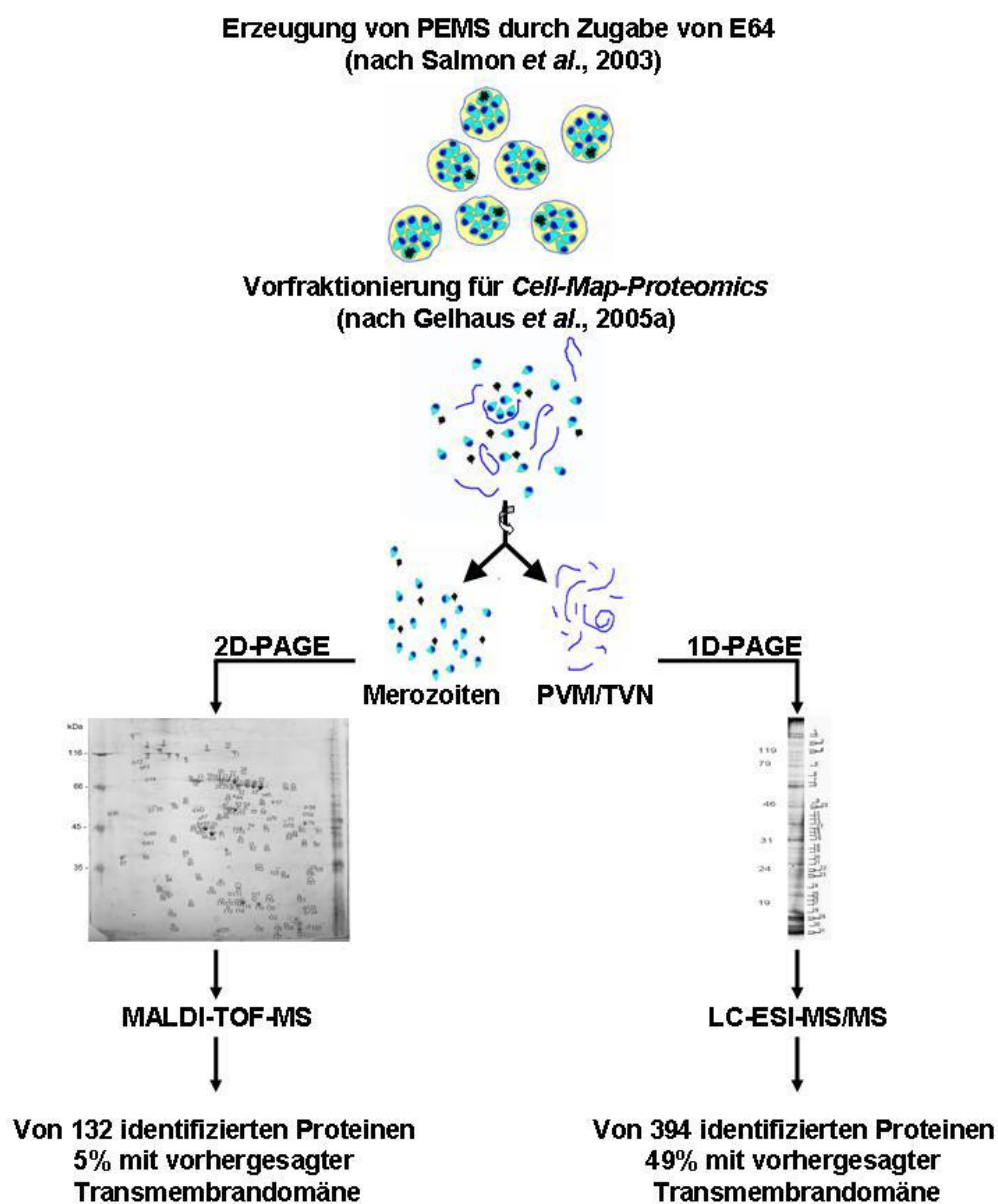


Abb. 62: Schematische Darstellung der Fraktionierung von Merozoiten sowie intraerythrocytärer, durch den Parasiten gebildeter Membranstrukturen und die jeweils eingesetzten Proteinseparations- und analysenmethoden.

## 4.1 Massenspektrometrische Untersuchung von angereicherten Merozoiten sowie subzellulärer Membranstrukturen

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Proteomanalysen durchgeführt, in denen insgesamt 837 Proteine signifikant identifiziert wurden. Etwa 70% dieser Proteine waren sowohl in der Analyse der angereicherten Merozoiten sowie in Präp-1 und Präp-2 identifiziert worden. Durch die hohe Sensitivität des LC-ESI-MS/MS-Verfahrens wurden in Präp-1 und Präp-2 zahlreiche Proteine identifiziert, die in einem auf 2D-PAGE basierenden Ansatz nicht gefunden worden sind. Umgekehrt wären bei der ausschließlichen Verwendung der 2D-PAGE/MALDI-TOF Methodik viele Membranproteine nicht identifiziert worden.

Für die Anreicherung von Merozoiten wurde ein Protokoll verwendet, das auf den Arbeiten von Salmon und Kollegen (2001) aufbaut. Grundlage der Methode war der Einsatz des Cysteinproteaseinhibitors E64, um *PVM Enclosed Merozoite Structures* (PEMS) zu isolieren. Für die Durchführung des Protokolls wurden durch Gelflotation angereicherte späte Trophozoiten mit einer Parasitämie von > 90% eingesetzt und für 8 bis 10 h mit E64 inkubiert. Diese Präparation beruht darauf, dass die den Parasiten umgebenden PVM sowie die Plasmamembran der Wirtszelle bei der Freisetzung der Merozoiten vermutlich sequenziell degradiert werden. Mehrere Studien zeigten, dass es sich hierbei offenbar um Prozesse handelt, an denen unterschiedliche Proteasen beteiligt sind (Salmon *et al.*, 2001; Wickham *et al.*, 2003; Gelhaus *et al.*, 2005b). So konnte einerseits die Ruptur der Plasmamembran des Erythrocyten (RBCPM) inhibiert werden (Wickham *et al.*, 2003; Gelhaus *et al.*, 2005b). Andererseits führte die Behandlung infizierter Schizonten mit E64 zur Bildung sogenannter PEMS (*PVM enclosed merozoite structures*), wobei die RBCPM abgebaut wird, während die PVM intakt bleibt und die reifen Merozoiten weiterhin umschließt (Salmon *et al.*, 2001). Diese PEMS stellen demnach ein ideales Ausgangsmaterial für die Anreicherung und Reinigung von Merozoiten sowie der sie umgebenden Membranstrukturen dar (Abb. 62).

Die Reinheit der PEMS wurde für jede Präparation im Giemsa-gefärbten Ausstrich überprüft, wodurch ausgeschlossen werden sollte, dass zu viele erythrocytäre Proteine die Präparation kontaminieren. Insbesondere das hoch abundante cytoplasmatische Erythrocytenprotein Hämoglobin erweist sich während der isoelektrischen Fokussierung aufgrund seiner Menge als störend. Nach der Begutachtung im Ausstrich wurden entsprechend nur Präparationen weiterverwendet, die keine oder sehr wenige intakte Erythrocyten aufwiesen. Die so erhaltenen PEMS wurden geschert, indem sie mehrfach durch eine Kanüle gepresst wurden. Hierbei wurde der Innendurchmesser von 0,9 mm gewählt, um zu vermeiden, dass die Merozoiten zerstört werden. Die so erhaltenen Merozoiten wurden ebenfalls im Giemsa-

gefärbten Ausstrich überprüft und mehrere Präparationen vereinigt. Die Separation der Proteine erfolgte mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese.

Aus dem Gel wurden die 132 gefärbten Proteinpunkte ausgestochen, von denen 86 % mittels *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) identifiziert wurden. Für die übrigen 14 % war kein auswertbarer PMF erhalten worden. Eine solche Fehlerquote ist normal für MALDI-TOF Analysen und unter anderem damit zu erklären, dass je nach Messmodus nur positiv oder negativ geladene Peptide nachgewiesen werden. In der Regel wird im positiven Modus gemessen. Die übrigen Peptide fehlen für einen kompletten PMF. Manche tryptische Peptide sind auch überhaupt nicht nachweisbar. Ein weiteres Problem sind auftretende Kontaminationen, etwa durch Cytokeratine. Sind deren Peptide zu abundant führt dies mitunter zur Unterdrückung der gewollten Peptidsignale im Massenspektrum.

14 % der identifizierten Proteine waren bovinen bzw. erythrocytären Ursprungs. Die bovinen Kontaminationen waren alle auf den Kulturmediumzusatz AlbuMax II (Gibco) zurückgeführt worden. Bei den humanen Proteinen wurden überwiegend Proteine des Cytoskeletts identifiziert, die an der Plasmamembran roter Blutzellen lokalisieren. Diese Kontaminationen waren durch Reste der erythrocytären Plasmamembran zu erklären, die in jeder PEMS-Präparation vorhanden sind (Gelhaus *et al.*, 2005b).

Insgesamt wurden 95 plasmodiale Proteine identifiziert. Sehr ernüchternd war die Tatsache, nur für 5 % der identifizierten Proteine eine oder mehrere Transmembrandomänen vorhergesagt wurde. Bei dem Rest handelte es sich um vermeindlich lösliche Proteine ohne Membranassoziation. Der geringe Anteil an Membranproteinen ist mit deren schlechter Solubilisierbarkeit mittels der für die 2D-PAGE einsetzbaren Detergenzien zurückzuführen. Zwar konnte, wie in Gelhaus *et al.* (2005) publiziert die Extraktionseffizienz für Membranproteine gesteigert werden, dies traf jedoch nur auf sehr abundante Proteine zu. Ein weiterer Grund für die schlechte Nachweisbarkeit lag unter Umständen auch in der angewendeten Färbemethode begründet. Hier wurde, entsprechend dem Vorschlag von Herrn Dr. Krause (Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin), die am besten MALDI-TOF-kompatible kolloidale Coomassiefärbung eingesetzt (Neuhoff *et al.*, 1988). Diese hat jedoch eine geringe Sensitivität, wodurch etwa wenig abundante Proteine kaum sichtbar werden (Patton, 2002). Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen für den Nachweis der Proteine im Gel hätte die Sensitivität erhöht werden können, der Nachteil hierbei ist jedoch, dass die Protein-*Spots* nur indirekt über einen Fluoreszenzscanner nachweisbar sind, und somit das Ausstanzen der *Spots* nicht per Hand durchführbar ist (Patton, 2002). Eine im Vergleich mit der kolloidalen Coomassiefärbung ebenfalls sensitivere MALDI-TOF-kompatible Proteinfärbung mit Silbernitrat wurde nicht verwendet, da man die ausgestanzten *Spots* vor der Analyse umständlich hätte entfärben müssen (Blum *et al.*, 1987; Gharahtaghi *et al.*, 1999; Patton, 2002). In der 2D-PAGE der Merozoitenpräparation wurde außerdem ein

IPG-Streifen mit einem pH von 4-7 für die isoelektrische Fokussierung verwendet. Dies bedeutete, dass alle Proteine mit einem  $pI \leq 4$  bzw.  $\geq 7$  in der Analyse fehlten.

Sechs der identifizierten Proteine waren anhand der Datenbankeinträge eindeutig Merozoiten zuzuordnen. Bei den übrigen handelt es sich um strukturelle Proteine und Enzyme, die in allen intraerythrocytären Entwicklungsstadien exprimiert werden. So wurde gezeigt, dass die Anreicherung von Merozoiten mit Hilfe der eingesetzten Methode grundsätzlich funktioniert.

In Anbetracht der Resultate aus der Merozoitenanalyse wurde für die Untersuchung von Membranproteinen die eindimensionale SDS-PAGE gewählt. Hierbei muss die Identifikation über Proteinsequenzierung mittels Tandem-Massenspektrometrie erfolgen (Abb. 62). Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass auch große sowie membranständige Proteine sehr gut in Lösung zu bringen und separierbar sind. Zudem repräsentiert eine Bande im Gel in der Regel ein Gemisch verschiedener Proteine, wodurch sich die Intensität der Färbung erhöht. Hierdurch werden auch wenig abundante Proteine indirekt sichtbar. Die Identifikation der Proteine findet nach *in-Gel*-Spaltung der Proteine mit Hilfe der Tandemmassenspektrometrie statt. Hierfür werden die durch die Trypsinisierung entstandenen Peptidgemische per Flüssigphasenchromatographie separiert. Parallel werden kontinuierlich möglichst viele Peptide im Massenspektrometer sequenziert. Die so erhaltenen Daten der Aminosäuresequenzen der einzelnen Peptide sind anschließend in der Regel einwandfrei einem Protein zuzuordnen. So genügen bereits wenige sequenzierte Peptide, um ein Proteine signifikant zu identifizieren (Carr *et al.*, 2004). Hierdurch ergibt sich eine hohe Sensitivität der Methode, die es erlaubt, auch wenig abundante Proteine nachzuweisen. In gleichem Maße werden allerdings auch Kontaminationen identifiziert - egal, wie selten oder häufig sie in der Präparation vorkommen.

Für die hier durchgeführte Analyse wurde zunächst die Reinheit der angereicherten Membranstrukturen, der als Pröp-1 bezeichneten Fraktion, evaluiert. Hierfür wurde ein Aliquot der Proteine der Probe per SDS-PAGE separiert und die Proteine durch Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran überführt. Auf dieser Membran fand der Nachweis von Markerproteinen für unterschiedliche Strukturen infizierter Erythrocyten statt. Das RBC-Plasmamembranprotein Bande 3 wurde lediglich mit einem schwachen Signal nachgewiesen. Die Färbung in dieser Fraktion auf der PVDF-Blot-Membran war wesentlich schwächer als im Gesamtextrakt infizierter Erythrocyten und rekonstituierten Plasmamembran-*ghosts* von Erythrocyten. Diese wurden als Kontrolle verwendet, da davon auszugehen war, dass in der Membranfraktion fast ausschließlich erythrocytäre Plasmamembranen als Verunreinigung vorhanden waren (Gelhaus *et al.*, 2005b). Die cytosolischen Proteine sollten sich im Überstand befinden. Als weitere Kontrolle diente PV-1, ein Protein der parasitophoren Vakuole (Nyalwidhe *et al.*, 2006). Dieses Protein war, wie zu

erwartet gewesen ist, weder in der PVM-Fraktion noch in RBC-ghosts nachweisbar, weil hier lösliche Proteine ohne Membranassoziation nicht vorhanden sein sollten. Als Bestätigung für die Präsenz von PVM/TVN waren zwei der in diesen Strukturen lokalisierenden, bekannten Proteine, EXP-1 und EXP-2, nachgewiesen worden (Günther *et al.*, 1991; Fischer *et al.*, 1998). Bei EXP-1 handelt es sich um ein integrales Membranprotein, während EXP-2 peripher mit der PVM assoziiert sei (Johnson *et al.*, 1994). Die beiden Proteine wurden in der PVM sowie in iRBCs nachgewiesen. In RBC-ghosts war die typische, bereits beschriebene Kreuzreaktion von EXP-2 mit einem unbekanntem Protein zu beobachten (Fischer *et al.*, 1998). Der Nachweis beider PVM-Proteine sprach dafür, dass auch bisher unbekannte integrale und periphere Proteine der PVM bzw. der Maurer's sowie Circular Clefts (MC bzw. CC) in der Präparation vorhanden waren. Aufgrund dieser Resultate wurde davon ausgegangen, dass auf jeden Fall die erwarteten PVM/TVN-Strukturen in der Präparation vorhanden waren. Das schwache Bande 3-Signal sowie die Abwesenheit des PV-1-Signals wurden als Indizien dafür gewertet, dass nur wenige erythrocytäre als auch lösliche plasmodialer Kontaminationen zu erwarten waren.

Eine zweite, nach demselben Schema durchgeführte Präparation (Präp-2) wurde entsprechend analysiert. Die Unterschiede zu Präp-1 waren, dass die extrahierten Membranen vor dem Lauf nochmals mit Hochsalz- und Karbonatpuffer gewaschen wurden, um lösliche Proteine möglichst effizient zu entfernen, und anschließend über ein Gradientengel elektrophoretisch getrennt wurden, um die Proteine des zu erwartenden komplexen Proteingemisches weiter zu fraktionieren. Nach beiden Analysen wurden 361 bzw. 344 Proteine signifikant identifiziert. Insgesamt wurden 44 % der Proteine aus Präp-2 auch in Präp-1 einwandfrei nachgewiesen. Bei den übrigen Proteinen handelte es sich zum überwiegenden Teil um Untereinheiten großer Proteinkomplexe wie etwa der Ribosomen oder Proteasomen. Da da hier oftmals ein und dasselbe Protein als putative oder hypothetische Untereinheit annotiert ist, fiel der eindeutige Vergleich schwer. Diese Proteine standen zudem nicht im Fokus der vorliegenden Untersuchung, weshalb auf einen detaillierten Vergleich verzichtet wurde.

Von größerem Interesse war die Tatsache, dass drei von fünf bisher beschriebenen PVM-assoziierten Proteinen sowohl in Präp-1 als auch in Präp-2 identifiziert wurden. Hierzu zählen EXP-1 sowie EXP-2, die wie bereits beschrieben, für die Evaluation der Reinheit der Fraktion herangezogen wurden (Günther *et al.*, 1991; Fischer *et al.*, 1998). Neben diesen beiden Proteinen wurde auch noch das PVM-lokalisierte ETRAMP10.2 identifiziert (Spielmann *et al.*, 2006). Bei EXP-1 sowie bei ETRAMP10.2 handelt es sich um integrale Transmembranproteine (Johnson *et al.*, 1994; Spielmann *et al.*, 2006). Es gibt Hinweise dafür, dass sowohl EXP-1 als auch ETRAMP10.2 Komplexe mit anderen Proteinen bilden, so war davon auszugehen, dass sich derartige Interaktionspartner unter den in der

Präparation identifizierten hypothetischen Proteinen befinden sollten. Der Nachweis des peripher mit der PVM assoziierten Proteins EXP-2 ließ darauf schließen, dass sich noch weitere periphere Membranproteine unter den als hypothetisch annotierten befinden müssten. Die beiden als transient mit der PVM assoziierten Proteine PfCG2 sowie PfStomatin wurden in keiner der Analysen identifiziert (Hiller *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2005). Bei beiden handelt es sich um Proteine die mit der Aufnahme von Nährstoffen aus dem Cytosol der Wirtszelle in Verbindung gebracht wurden. Da die cytoplasmatischen Proteine der infizierten Erythrocyten, in dem Stadium aus dem die als Ausgangsmaterial verwendeten PEMS hervorgegangen sind, zu dem Zeitpunkt bereits überwiegend für den Proteinmetabolismus des Parasiten verbraucht sein dürften, finden unter Umständen keine der Prozesse mehr statt, an denen die PfCG2 und PfStomatin beteiligt sind (Krugliak *et al.*, 2002; Hiller *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2005). Diese sind somit in diesem Stadium eventuell gar nicht mehr PVM-assoziiert vorzufinden. Hierüber liessen sich jedoch keine Informationen finden.

Zu den extrazellulären Membransystemen, die es zu analysieren galt, gehören außer der PVM auch die sogenannten *Maurer's Clefts* (MC). Bei diesen Strukturen herrscht noch Unklarheit darüber, ob sie mit der PVM verbunden sind, oder lediglich aus ihr hervorgehen (Lanzer *et al.*, 2006). Es konnten mehrere MC-assoziierte Proteine identifiziert werden. Hierzu gehören RIFIN, KAHRP sowie PfSAR1p, (Albano *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 2001; Haeggstrom *et al.*, 2004).

Der eindeutige Nachweis von insgesamt sechs PVM/TVN-assoziierten Proteinen sprach dafür, dass die Anreicherung der Membranstrukturen prinzipiell funktionierte. Zudem war die große Anzahl der sowohl in Präp-1 als auch in Präp-2 identifizierten Proteine ein Indiz für die Reproduzierbarkeit der Präparationsmethode.

Insgesamt wurden in Präp-1 100 als hypothetisch annotierte Proteine identifiziert. Unter diesen sollten sich theoretisch neue PVM/TVN-Proteine finden. Entsprechend sollten aus daraus einige ausgewählt werden, um mit Hilfe von Antisera charakterisiert zu werden.

Um aus diesen Proteinen geeignete Kandidaten auszuwählen, wurden bestimmte Selektionskriterien angewendet, die im Folgenden erläutert sowie in Abb. 63 schematisch dargestellt sind:

- Es sollte mindestens eine Transmembrandomäne (TM) vorhergesagt sein, da in der vorliegenden Arbeit neue integrale PVM/TVN-Proteine charakterisiert werden sollten (Krogh *et al.*, 2001). Wenngleich es sich bei EXP-2, PfCG2 sowie PfStomatin um Proteine handelt, für die keine TM vorhergesagt wurde, die aber dennoch peripher mit dem PVM/TVN-Netzwerk assoziiert sind.
- Es sollte ein Signalpeptid (SP) vorhergesagt werden können (Nielsen und Krogh, 1998). Diesem Kriterium lag die Annahme zugrunde, dass es für einen extrazellulären Locus wie die

PVM, oder die MC's ein spezifisches Signalpeptid für den klassischen Transportweg über das ER-Golgi-System geben sollte. Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen könnten anschließend ggf. Aussagen über die Sequenz des SP getroffen werden.

- Proteine für die ein VTS/PEXEL-Motiv vorhergesagt wurde sollten verworfen werden, da diese als Signal für den Transport von Proteinen in das Cytosol bzw die Plasmamembran der Wirtszelle gelten (Hiller *et al.*, 2004a; Marti *et al.*, 2004). Gleichermaßen wurden Proteine aussortiert, für die das ER-Retentionssignal „KDEL“ vorhergesagt wurde (Lopez-Estrano *et al.*, 2003)

- Für die Proteine sollten, mittels PSI-BLAST-Suche, orthologe hypothetische Proteine in anderen Plasmodienspecies oder sogar anderen Apicomplexa gefunden werden. Da es sich bei den subzellulären Membranstrukturen der Apicomplexa um sehr spezielle Kompartimente handelt, war die Hypothese, dass sich die an ihrem Aufbau beteiligten Proteine in unterschiedlichen Klassen dieses Tierstammes ähneln sollten. Die Vorhersage orthologer Proteine galt damit als Indiz dafür, dass diese Proteine für den plasmodialen Lebenszyklus essentiell sein könnten.

- Auf der Suche nach bisher nicht beschriebenen PVM/TVN-Proteinen wurden Ähnlichkeiten zu anderen Protein- oder Enzymklassen anderer Organismen als Ausschlusskriterium gewählt. Zahlreiche als hypothetisch annotierte Proteine wiesen etwa RNA-Erkennungssequenzen oder Homologien zu Enzymen auf. Diese wurden deshalb für eine weitere Analyse ausgeklammert. Um entsprechende Homologien in den auszuwählenden Proteinen auszuschließen, wurden die frei zugänglichen Datenbanken NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), PlasmoDB ([www.PlasmoDB.org](http://www.PlasmoDB.org); Bahl *et al.*, 2003) sowie Pfam ([www.sanger.ac.uk/Software/Pfam](http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam)) ausgiebig daraufhin durchsucht.

Es kristallisierten sich 5 bis dato als hypothetisch annotierte Proteine heraus, auf die alle Kriterien zutrafen (Abb. 63). Um diese Proteine charakterisieren zu können, sollten Antiseren gegen jeweils zwei Peptide dieser Proteine generiert werden. Zur Auswahl möglichst antigener Bereiche der Primärstruktur wurde zunächst der Algorithmus von Hopp und Woods (1981) eingesetzt. Zur Bestätigung wurde dies mit der Firma Eurogentec (Leiden, Belgien), welche auch die Seren generieren sollte, abgestimmt.

Die erhaltenen Seren wurden eingesetzt, um die ausgewählten Proteine zu charakterisieren. So wurden in der vorliegenden Arbeit drei Merozoitenoberflächenproteine, ein in den Rhoptrien lokalisiertes Protein sowie ein Protein der parasitophoren Vakuolenmembran beschrieben.

Es stellte sich demnach also heraus, dass es sich bei der angereicherten Fraktion um ein Gemisch aus PVM/TVN und Merozoitenmembranen handelte. Vermutlich wurden beim Scheren der PEMS zahlreiche Merozoiten ebenfalls zerrissen. Durch die anschließende Zentrifugation wurden offenbar nur die intakten Merozoiten entfernt, während die



verbliebenen Plasmamembranfragmente bei der Ultrazentrifugation gemeinsam mit den übrigen Membranen sedimentiert wurden. Dies bestätigt auch die recht große Anzahl von Proteinen, die als cytosolische Komponenten eingeordnet wurden (siehe Anhang 7.1, Tab. 2).

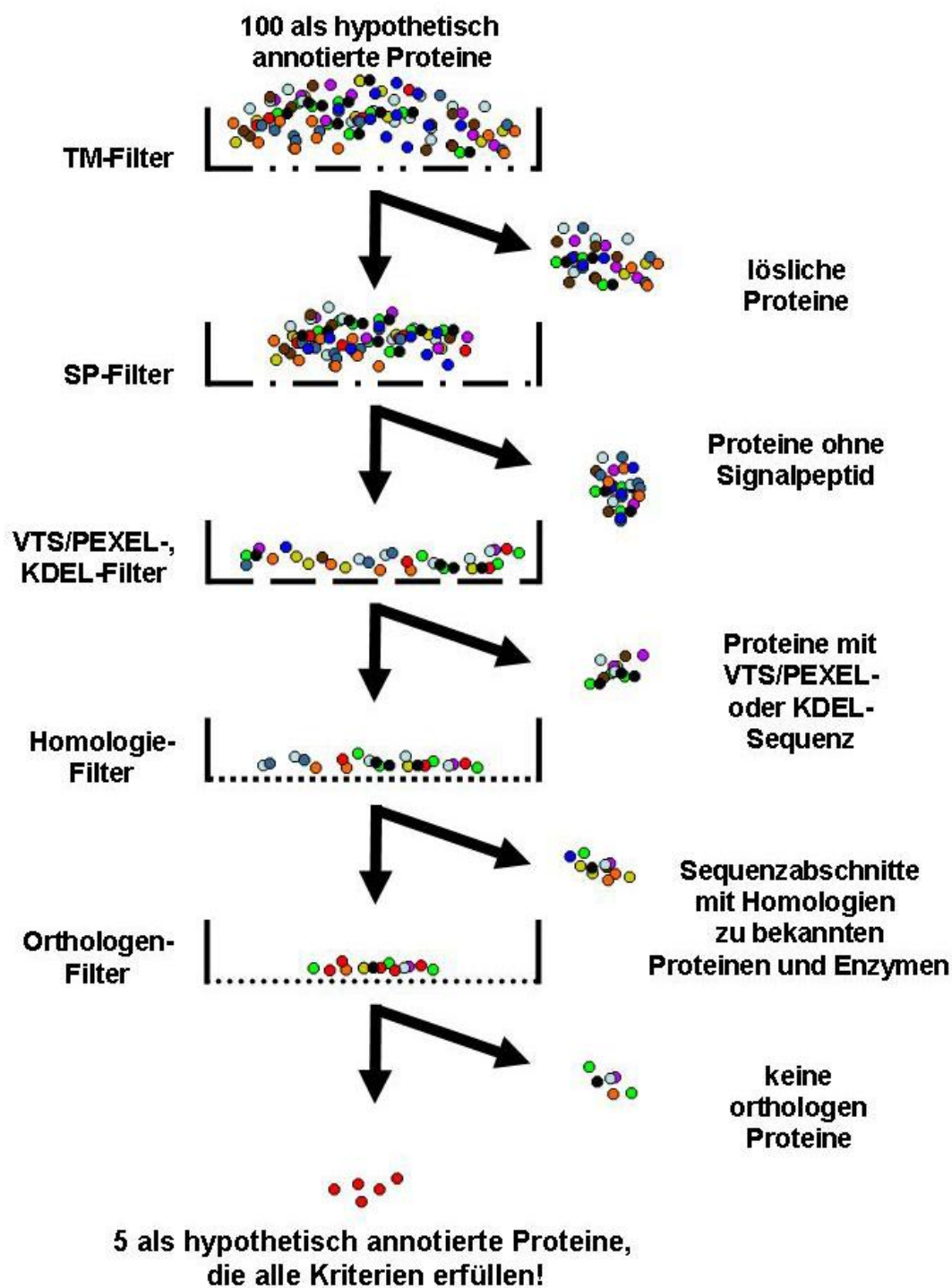


Abb. 63: Schematische Darstellung der für die Auswahl von Proteinen verwendeten Kriterien

## 4.2 ***Pf15.2, Pf17.4* und *Pf13.8* – Proteine der Merozoiten Plasmamembran**

Bei der Verwendung der Antiseren für die Charakterisierung der bis dato als hypothetisch annotierten Proteine wurde sowohl die herkömmliche Fluoreszenz- als auch die die konfokale *laser-scanning*-Mikroskopie für die Bestimmung der Lokalisation der Proteine eingesetzt. Es wurden parallel Versuche unternommen, die zu charakterisierenden Proteine Immuno-elektronenmikroskopisch zu lokalisieren. Hierfür wurden unterschiedliche Fixierungsmethoden eingesetzt (chemische Paraformaldehyd-Fixierung mit und ohne Glutaraldehyd sowie Cryofixierung). Bei Einsatz von Kontrollantikörpern die gegen Bande 3 sowie EXP-1 gerichtet waren, wurde die jeweils erwartete Lokalisation verifiziert. Mit den neuen, von uns eingesetzten Antikörpern war keine eindeutige Lokalisation der Proteine möglich. Auf eine Darstellung dieser Ergebnisse wurde daher in der vorliegenden Arbeit verzichtet.

So wurde auf lichtmikroskopischer Basis gezeigt, dass drei von fünf untersuchten Proteinen in der Plasmamembran von Merozoiten lokalisieren. Durch die Beschreibung der Proteine stieg die Anzahl der bekannten Merozoitenoberflächenproteine von 24 auf 27 an (Cowman und Crabb, 2006). Es zeigte sich somit, dass das bisher bestehende Bild des Aufbaus und der molekularen Zusammensetzung der Merozoitenplasmamembran bei weitem noch nicht komplett war. Weder die an der Erkennung und Bindung von Erythrocyten beteiligten Oberflächenproteine, noch die auf der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran von Merozoiten lokalisierten Proteine sind ausreichend beschrieben. Aufgrund ihrer Lokalisation und potentiellen Exposition gegenüber dem humanen Immunsystem stellen die drei Proteine ggf. interessante Kandidaten für die Vakzinentwicklung dar (Matuschewski, 2006). Dies muss jedoch in weiterführenden Studien untersucht werden.

Da die Proteine an der Oberfläche der invasiven Form von *Plasmodium falciparum* lokalisieren, wurde vermutet, dass sie an der Invasion von Merozoiten beteiligt sein könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde getestet, ob die Invasion durch Inkubation mit den peptidspezifischen Antikörpern inhibiert wird. Hierfür wurden hochgradig synchrone Schizonten angereichert und mit frischen, nicht infizierten Erythrocyten versetzt. Durch Inkubation mit dem Antiserum während des Evasions- bzw. Invasionszeitraumes sollte überprüft werden, ob die Antikörper die extrazellulären Epitope des Proteins binden und dadurch die Invasion blockieren können. Dies wurde in entsprechenden Experimenten für andere Merozoitenoberflächenproteine sowie von den Organellen des Apikalkomplexes sezernierten Proteine gezeigt (Baldi *et al.*, 2000; Cowman *et al.*, 2000; Cowman und Crabb, 2002; Dutta *et al.*, 2003; Healer *et al.*, 2004). Für die drei in dieser Studie beschriebenen Proteine war die Inhibition der Invasion von Merozoiten durch das Vorhandensein der

Serum-Antikörper nicht nachzuweisen. Im Vergleich mit der Kontrolle zeigten die behandelten Zellen die gleiche Parasitämie. Mögliche Erklärungen hierfür waren, dass die benötigten Epitope durch sterische Inhibition nicht für die Antikörper zugänglich waren, oder ins Cytosol der Zelle wiesen. Möglicherweise sind die Proteine auch nicht an der Invasion beteiligt, sondern haben andere Funktionen, wie etwa als Anker für membranassoziierte Proteine ohne Transmembranhelix oder GPI-Anker oder als Komponenten der der Gliding-Maschinerie.

Zur Überprüfung, ob die von den Antiseren erkannten Epitope cytoplasmatisch ausgerichtet sind, wurden Merozoiten angereichert und für eine Stunde mit 1 mg/ml Trypsin bei 37°C inkubiert. Hierdurch sollten die extrazellulären Epitope der Proteine proteolytisch abgespalten werden. Anschließend wurden die Merozoiten für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie vorbereitet. Bei der Betrachtung der Präparate war zu sehen, dass die Fluoreszenzmarkierung wie bei den unbehandelten Zellen nachweisbar war (auf die Darstellung der aufgenommenen Bilder wurde hier verzichtet). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die erkannten Epitope in das Zellinnere ragen. Die drei Proteine stellen somit interessante Kandidaten für die Interaktion mit den corticalen Cytoskelettelementen, etwa als Bestandteil des *Glideosoms*, dar (Opitz und Soldati, 2002). Dieses ist vermutlich sowohl an den aktiven Bewegungen während des Invasionsvorganges als auch der Umformung der Trophozoiten- zur Merozoiten-Plasmamembran beteiligt (Bannister und Mitchell, 1995; Opitz und Soldati, 2002). Von einer Kollokalisationsanalyse mit markierenden Cytoskelettelementen wurde abgesehen, da dies in so kleinen Strukturen wie Merozoiten aussichtslos erschien. Der Nachweis der Interaktion mit dem Cytoskelett müsste auf elektronenmikroskopischer Ebene oder durch Kopräzipitationsexperimente erfolgen.

Zudem blieb noch zu klären, ob die Proteine überhaupt der Spaltung durch Trypsin zugänglich waren, oder ob diese durch sterische Inhibition durch andere Merozoitenoberflächenproteine möglicherweise beeinträchtigt wurde.

Es wurde gezeigt, dass es sich bei allen drei Proteinen um integrale Membranproteine handelte. Für die Untersuchungen wurde eine Gesamtmembranextraktion infizierter Erythrocyten durchgeführt. Die so erhaltenen Membranen wurden anschließend wie in 2.2.4.1 beschrieben behandelt, um peripher mit den Membranen assoziierte Proteine von dieser zu entfernen (Fujiki *et al.*, 1982; Johnson *et al.*, 1994). Die drei Proteine Pf15.2, Pf117.4 und Pf13.8 wurden anschließend auf einer Blot-Membran jeweils in der Membranfraktion, aber nicht im Überstand nachgewiesen. Durch diese Experimente wurden die durch den TMHMM2-Algorithmus vorhergesagten Transmembrandomänen bestätigt (Krogh *et al.*, 2001).

Bisher waren ausschließlich GPI-verankerte mögliche und bestätigte Merozoitenoberflächenproteine (MSP) beschrieben, Darunter befanden sich unter anderen

auch die von uns charakterisierten Proteine *Pf38* (siehe 4.2.2) und *Pf112.5* (siehe 4.2.3) (Cowman und Crabb, 2006). Neben diesen Proteinen waren noch einige peripher mit der Plasmamembran assoziierte Proteine bekannt (Cowman und Crabb, 2006). Die drei in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Proteine waren die ersten verifizierten integralen Plasmamembranproteine von Merozoiten, für die eine Transmembrandomäne vorhergesagt und bestätigt wurde. Durch diese Tatsache gelten sie als potentielle Bindeglieder des subcorticalen Cytoskeletts mit extrazellulären Proteinkomponenten. Bislang wurde noch kein Protein identifiziert, dem diese Aufgabe zugeschrieben werden konnte (Cowman und Crabb, 2006). Aus anderen Organismen sind sowohl Aldolase sowie das *thrombospondin related anonymous protein* (TRAP) als Brücke zwischen dem Actincytoskelett und extrazellulären Komponenten des Glideosoms diskutiert worden, in den Merozoiten von *P. falciparum* wurde eine solche Interaktion jedoch nicht bestätigt (Buscaglia *et al.*, 2003; Jewett und Sibley, 2003).

Bei der Überprüfung der in der Merozoitenpräparation identifizierten Proteine wurden diese drei Kandidaten nicht gefunden. Dies war entweder auf die schlechte Solubilisierbarkeit von Membranproteinen, die geringe Abundanz oder auf die den isoeletrischen Punkt (pI) des jeweiligen Proteins zurückzuführen. Diese lagen theoretisch bei pI 10,16 (*Pf15.2*), pI 5,73 (*Pf117.4*) sowie pI 10,16 (*Pf13.8*) und damit in zwei Fällen außerhalb des für die isoelektrische Fokussierung verwendeten pH von 4,0 bis 7,0. Der pI von *Pf117.4* hätte zwar innerhalb dieses pH-Bereiches gelegen, hier kam jedoch noch die Schwierigkeit hinzu, dass es sich um ein sehr großes Proteine handelte. Diese sind in der Regel schlecht fokussierbar (Gorg *et al.*, 2004). Demnach kann hier die Verwendung von der Kombination von SDS-PAGE und LC-ESI-MS/MS als Verbesserung für die hier bearbeitete Fragestellung gewertet werden.

### **Pf15.2**

*Pf15.2* wurde außer in der vorliegenden Studie noch von Lasonder *et al.* (2002) identifiziert. In der genannten Analyse wurden 2 Peptide dieses Proteins aus einem Gemisch aus Trophozoiten- und Schizontenproteinen sequenziert. Merozoiten wurden in der genannten Studie nicht analysiert (Lasonder *et al.*, 2002).

Das Protein *Pf15.2* war in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie bereits in frühen Entwicklungsstadien des Parasiten lokalisierbar. Dies deckt sich mit dem immunologischen Nachweis der Expression nach Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran. Auch hier wurde in Ringstadien eine wenn auch schwache Markierung nachgewiesen, die in späteren Stadien kräftiger wurde. Nach der von Bozdech *et al.*, durchgeführten Transkriptomanalyse, wurde das zugehörige Gen PF11\_0179 ab circa 21 h nach der

Invasion von Merozoiten transkribiert (Bozdech *et al.*, 2003), was in guter Korrelation mit den hier präsentierten Expressionsdaten steht.

In späten Trophozoiten bzw. murenen Schizonten erschien die Fluoreszenzmarkierung mehr und mehr wabenartig. Diese Beobachtung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Protein zunächst in die Plasmamembran (PM) des Parasiten inseriert wird. Mit fortschreitender Differenzierung zog sich diese nach innen, um die im Entstehen begriffenen Merozoiten zu umschließen. Auf diese Weise wurde die Trophozoiten-Plasmamembran zur Plasmamembran der Merozoiten, und dort lokalisierte Pf15.2. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis auf die Interaktion mit Cytoskelettelementen, die vermutlich an der Einstülpung der PM beteiligt sind sein (Bannister und Mitchell, 1995; Opitz und Soldati, 2002).

Die Resultate des auf PVDF-Membran nachgewiesenen Proteins zeigten, dass das Pf15.2 die gleiche molekulare Masse aufweist, wie die auf Basis der Primärstruktur kalkulierte. Es wurde zu keiner Zeit eine größere Bande, wie sie etwa durch Glycosylierung entstehen könnte (Gowda *et al.*, 1999), oder eine kleinere aus proteolytischer Prozessierung resultierende Bande nachgewiesen.

Mit Hilfe der PSI-BLAST-Suche wurden sieben orthologe Proteine in verschiedenen Plasmodienspecies (*P. yoelii yoelii*; *P. chabaudi*, *P. knowlesi* und *P. vivax*) sowie in anderen, zum Phylum Apicomplexa gehörenden Organismen (*Theileria parva*, *Cryptosporidium hominis* und *C. parvum*) gefunden, die zum Teil als konservierte hypothetische Proteine annotiert sind. Das Auftreten dieses Proteins in so vielen Species ließ auf ein wichtiges Protein schließen, dass eine bisher nicht bekannte, konservierte Funktion in verschiedenen Apicomplexa mit ihrem obligat intrazellulären Lebenszyklus hat.

Die Topologie mit zwei vorhergesagten Transmembrandomänen ließ vermuten, dass es sich bei Pf15.2 um ein Typ-3 Membranprotein handelte, bei dem sowohl der C- als auch der N-terminale Teil ins Cytoplasma ragen (Davis *et al.*, 2006b). Da das Proteien nur über eine Sequenz von drei Aminosäuren zwischen den Transmembrandomänen verfügt, hätte es somit auch nur ein kurzes extrazelluläres Epitop. Dies legt nahe, dass das Protein eine Funktion im Inneren der Zelle hat. Hier könnte es beispielsweise an der Einstülpung der Plasmamembran beteiligt sein sowie an der als *gliding* bezeichneten, aktiven Bewegung bei der Invasion, die typisch für Merozoiten der Apicomplexa ist (Miller *et al.*, 1979; Field *et al.*, 1993; Pinder *et al.*, 1998; Opitz und Soldati, 2002; Baum *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2006). So wurde etwa beschrieben, dass in *P. falciparum* besonders kurze Actinfilamente auftreten, über die an der Regulation der Filament-Dynamik beteiligten Proteine ist jedoch nichts bekannt (Schmitz *et al.*, 2005). Sowohl das hier, als auch die beiden im Folgenden, beschriebenen Protein könnten somit potentielle Funktionen in diesem Regelkreis einnehmen.

### **Pf117.4**

Das Protein *Pf117.4* wurde schon zuvor in einer Proteomanalyse unterschiedlicher Entwicklungsstadien von *P. falciparum* mit jeweils einem sequenzierten Peptid in Merozoiten und Trophozoiten nachgewiesen (Carucci *et al.*, 2002). Die prozentuale Abdeckung der Aminosäuresequenz war entsprechend gering.

Für *Pf117.4* wurde anhand der Ergebnisse aus den Western-Blot Analysen bestätigt, dass das experimentelle und das theoretische Molekulargewicht von 117 kDa miteinander gut in Einklang stehen. Die Identifikation und Sequenzierung zahlreicher über die gesamte Proteinsequenz verteilter Peptide unterstützt die Annahme, dass das Protein in seiner murenen Form exprimiert wird.

Bei diesem Protein zeigte sich bezüglich der stadienspezifischen Expression eine Diskrepanz zwischen dem immunologischen Nachweis auf einer PVDF-Membran und der Fluoreszenzmikroskopie. Auf einer PVDF-Membran war erst in einer Mischung später Trophozoiten und murener Schizonten sowie in Merozoiten ein Signal erkennbar. In der Immunfluoreszenz-Mikroskopie hingegen wurde das Protein bereits in jungen und mittleren Trophozoiten erkannt. Auch in freien Merozoiten wurde *Pf117.4* eindeutig lokalisiert. Es war kein Vergleich mit Microarraydaten möglich, da das Protein bisher in keiner Transkriptom-Analyse erwähnt wurde.

Für *Pf117.4* existieren drei Orthologe, was auf eine konservierte Funktion des Proteins hindeutet. Auch für zahlreiche der anderen bisher charakterisierten MSPs wurden orthologe Proteine in anderen Plasmodienspecies beschrieben. Hierzu zählen unter anderem MSP-1, MSP-3, MSP-9, ABRA (Holder und Freeman, 1984; Miller *et al.*, 1993; Barnwell *et al.*, 1999; Galinski *et al.*, 1999; Galinski *et al.*, 2001; Vargas-Serrato *et al.*, 2002).

Es wurde gezeigt, dass es sich bei *Pf117.4* aufgrund seiner Primärsequenz um ein integrales Typ-1 Membranprotein handelt. Das bedeutet, dass der C-Terminus cytoplasmatisch und der N-terminale Teil des Proteins extrazellulär liegt (Davis *et al.*, 2006b). Möglicherweise fungiert *Pf117.4* als Anker für Proteine, die von den apikalen Organellen sezerniert werden, an der Oberfläche der Merozoiten lokalisieren, aber keine eigene Transmembrandomäne oder GPI-Anker aufweisen. Ein solches Beispiel wäre SUB-1. Das Zymogen der vermutlich am *Shedding* von Merozoitenoberflächenproteinen während der Invasion beteiligten Protease lokalisiert in den *Dense Granules* (Blackman *et al.*, 1998; Sajid *et al.*, 2000). Nach autokatalytischer Spaltung wurde die murene Form an der Merozoitenoberfläche nachgewiesen, obwohl das Enzym keine Transmembrandomäne oder GPI-Verankerung aufweist (Blackman *et al.*, 1998; Sajid *et al.*, 2000; Jean *et al.*, 2003). Das Protein *Pf117.4* könnte auch, wie schon für *Pf15.2* beschrieben, mit der im Zellcortex lokalisierten Cytoskelettmaschinerie interagieren und somit eine Rolle bei der Invasion oder der Einstülpung der Plasmamembran bei der Merozoitenreifung spielen. Durch seine

Eigenschaft als potentiell Typ-1 Membranprotein würde sich *Pf15.2* hervorragend als Bindeglied zwischen dem intrazellulären Actincytoskelett und extrazellulären Komponenten dieser Maschinerie eignen. Zwar gab es einige Kandidaten für eine derartige Funktion, diese waren jedoch nicht in Merozoiten zu lokalisieren bzw. nur über einen GPI-Anker mit der extrazellulären Membranseite assoziiert (Klotz *et al.*, 1989; Thompson *et al.*, 2001; Buscaglia *et al.*, 2003; Cowman und Crabb, 2006; Jones *et al.*, 2006; Bosch *et al.*, 2007).

### **Pf13.8**

Bei *Pf13.8* handelt es sich um ein weiteres Protein, dessen theoretische mit der experimentellen molekularen Masse im Western-Blot-Experiment übereinstimmt. Wie gezeigt wurde, wird das Protein während der Merozoitenreifung nicht proteolytisch prozessiert.

Die Expression über den gesamten Entwicklungszyklus hinweg wurde durch die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen bestätigt. Auch durch Analyse von Proteinextrakten unterschiedlicher Parasitenstadien durch Elektrotransfer der separierten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde dies bestätigt. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit den Transkriptomdaten von Bozdech *et al.*, (2003) nach denen die zugehörige mRNA ab etwa 18 Stunden nach der Invasion der Merozoiten synthetisiert wird.

Es wurde wie in 2.2.4.1 beschrieben bestätigt, dass *Pf13.8* ein integrales Transmembranprotein ist. Nach dem Entfernen peripher assoziierter Membranproteine war *Pf13.8* in der reinen Membranfraktion detektierbar, während im Überstand kein Signal zu erkennen war.

Anders als durch den SignalP-Algorithmus vorhergesagt, scheint das Protein kein Signalpeptid (SP) zu haben. Dies wird durch die Tatsache nahegelegt, dass in der massenspektrometrischen Analyse ein Peptid aus dem N-terminalen Teil des Proteins sequenziert wurde, das am Anfang des vorhergesagten Signalpeptids liegt. In der Regel werden SP jedoch spätestens im Endoplasmatischen Retikulum proteolytisch abgespalten (Lemberg und Martoglio, 2004). Dies ist hier offensichtlich nicht der Fall. Vermutlich wird das Protein über einen noch nicht genau beschriebenen Mechanismus zu seinem Ziel transportiert, welcher alternativ zu dem klassischen, ER-Golgi-Transportweg existiert. Sogenannte Brefeldin A-insensitive Mechanismen sind für *P. falciparum* bereits mehrfach in der Literatur erwähnt (Nacer *et al.*, 2001; Templeton und Deitsch, 2005; Lingelbach und Przyborski, 2006; Tonkin *et al.*, 2006).

Ein weiteres Indiz gegen ein vorhandenes Signalpeptid ist, dass ein Großteil der vorhergesagten SP-Sequenz auch von dem TMHMM2-Algorithmus als Transmembranelix vorhergesagt wurde. Solche überlappenden Vorhersagen treten mitunter auf und sind auf die Hydrophobizität der beiden Strukturen zurückzuführen (Nielsen und Krogh, 1998; Krogh *et al.*, 2001). Eine ebenfalls mögliche Erklärung war, dass es sich bei dem vorhergesagten SP

um einen sogenannten Signal-Anker handelte. Diese Variante des klassischen Signalpeptids wird nicht proteolytisch abgespalten, sondern bleibt für die Insertion des Proteins in die Membran erhalten. Hierdurch ergibt sich eine Topologie bei Membranproteinen, deren N-Terminus, sowie auch die zweite TM in der Membran verankert sind und der C-Terminus in das Cytoplasma der Zelle ragt, der Sequenzbereich zwischen den beiden hydrophoben Helices läge extrazellulär (Kihara und Ito, 1998; Davis *et al.*, 2006a). Hier aus ergeben sich die bereits für die Proteine Pf15.2 und Pf117.4 möglichen Funktionen.

Ein bisher noch nicht genannter, ebenfalls Actin-abhängiger Mechanismus ist die Relokalisation von SUB-2 von den Micronemen an den posterioren Pol der Merozoiten während der Invasion (Harris *et al.*, 2005). Dieses Protein ist vermutlich an der als *Shedding* bezeichneten proteolytischen Spaltung der Proteine AMA-1, MSP-1 sowie möglicherweise noch weiterer Proteine auf der Merozoitenoberfläche beteiligt (Blackman *et al.*, 1990; Howell *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2005; Howell *et al.*, 2005).

### 4.3 Pf38 – ein Protein der Rhoptrien

Bei Pf38 handelt es sich um ein Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 40 kDa, was durch immunologischen Nachweis des nativen Proteins auf einer PVDF-Membran bestätigt wurde. Die Nomenklatur für dieses Protein unterscheidet sich etwas von den übrigen Proteinen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Identifizierung dieses Proteins während der praktischen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation publiziert, und in Form eines Pf38-GFP Fusionskonstruktes lokalisiert wurde (Sanders *et al.*, 2005). In der Untersuchung von Sanders und Kollegen wurde das Protein in einer DRM-Rafts Fraktion angereichert und massenspektrometrisch identifiziert. Das daraufhin generierte Pf38-GFP Konstrukt wurde im apikalen Bereich der Merozoiten lokalisiert (Sanders *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit ist es nun erstmalig gelungen, die native Form des Proteins mit Hilfe von Antikörpern in infizierten Zellen nachzuweisen. Dabei war es möglich, die Lokalisation im apikalen Bereich von Merozoiten zu bestätigen und zu verfeinern. Durch Kolo-kalisation mit RAP-1 wurde gezeigt, dass Pf38 in den Rhoptrien lokalisiert. Der Nachweis in den Rhoptrien der Merozoiten ließ vermuten, dass das Protein während der Invasion sezerniert und in die naszierende PVM integriert wird. Dies wurde verifiziert, indem frisch infizierte Erythrocyten mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht wurden. Durch Kolo-kalisation mit dem PVM-Markerprotein EXP-2 wurde Pf38 in der PVM nachgewiesen (Günther *et al.*, 1991). Andere Rhoptrienproteine wie der RhopH- und der RAP(1-3)-Komplex wurden ebenfalls nach der Invasion an der PVM lokalisiert (Banister *et al.*, 1986; Sam-Yellowe *et al.*, 1988; Bannister und Mitchell, 1989; Ling *et al.*, 2003). Bei dem



2003 von Hiller und Kollegen beschriebenen PfStomatin handelt es sich gleichfalls um ein Rhoprienprotein, das nach der Invasion an der PVM lokalisiert werden konnte. Es galt als erster Beweis dafür, dass DRM-Rafts der PVM nicht ausschließlich aus der Plasmamembran des Erythrocyten rekrutiert werden, sondern Bestandteil des von den Rhoprien sezernierten Lipid- und Proteinmaterials sind (Hiller *et al.*, 2003). In derselben Studie wurde gezeigt, dass auch RhopH2 DRM-Raft-assoziiert lokalisiert (Hiller *et al.*, 2003).

In den durchgeführten Analysen zur stadienspezifischen Expression von Pf38 waren in frühen Trophozoiten, Schizonten und Merozoiten deutliche Signale auf einer Blot-Membran zu erkennen. In Ringstadien hingegen war nur ein schwaches Signal sichtbar. Dies war darauf zurückzuführen, dass das Protein in diesem Stadium noch nicht exprimiert wird, und nur durch das Vorhandensein in der PVM nachweisbar ist. Diese Beobachtungen stehen in guter Korrelation mit Transkriptanalysen von Sanders *et al.* (2005) sowie Bozdech *et al.* (2003), in denen die mRNA-Synthese in Trophozoiten nachgewiesen wurde. Zusammengefasst sprechen die Resultate der Expressionsanalysen dafür, dass Pf38, wie in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie gezeigt, von den Rhoprien sezerniert und in die PVM integriert wird.

Für Pf38 sowie auch für einige andere Oberflächenproteine in Apicomplexa war in der Datenbank zusätzlich zur vorhergesagten Transmembrandomäne ein möglicher GPI-Anker annotiert (McConville und Ferguson, 1993; Moran und Caras, 1994). Gilson und Kollegen publizierten 2006 eine Studie, in welcher die Signalpeptide protozoischer GPI-Ankerstellen untersucht wurden. Diese bestanden demnach aus drei Aminosäuren mit kleinen Seitengruppen gefolgt einigen Aminosäuren als Abstandshalter sowie einer hydrophoben Sequenz am C-Terminus des Proteins (Udenfried und Kodukula, 1995a; Udenfried und Kodukula, 1995b; Gilson *et al.*, 2006). Dieser C-terminal liegende hydrophobe Sequenzbereich wurde im Fall von Pf38 sowie Pf12.5 (siehe 4.2.4) vermutlich durch den TMHMM2-Algorithmus als Transmembranhelix (TM) vorhergesagt. Proteine die sowohl eine TM als auch einen GPI-Anker aufweisen gelten als extrem selten (Chatterjee und Mayor, 2001; Gilson *et al.*, 2006).

Durch eine kombinierte Suche nach einem vorhergesagten Signalpeptid, einer Transmembrandomäne und einem GPI-Anker in der Datenbank PlasmoDB wurden insgesamt 29 Proteine mit diesen Eigenschaften gefunden ([www.PlasmoDB.org](http://www.PlasmoDB.org); Bahl *et al.*, 2003). 18 dieser Proteine waren als hypothetisch annotiert, worunter sich auch Pf38 und das in folgendem Abschnitt diskutierte Pf12.5 befand. Weitere Proteine waren die bekannten Merozoitenoberflächenproteine MSP-1, MSP-8, MSP-10, Pf12, das mit Maurer's Clefts assoziierte RIFIN, *transmission blocking target antigen precursor 1* sowie dessen Paralog Pf47 und das *circumsporozoite protein 1*, welche auf der Oberfläche von Sporozoiten lokalisieren, ein als GPI8p Transamidase annotiertes Protein, ein putatives, vermutlich an der

Bildung von Cop-Proteinen-umhüllten Vesikeln beteiligtes Protein (p24) sowie ein putatives Protein der Ookinetenoberfläche (Aley *et al.*, 1987; Kocken *et al.*, 1993; Haeggstrom *et al.*, 2004; Sanders *et al.*, 2005; Cowman und Crabb, 2006; van Schaijk *et al.*, 2006).

Die GPI-Proteinmodifikation weist auf die Lokalisation von Pf38 in DRM-Rafts hin, was sowohl durch die Untersuchungen von Sanders *et al.* (2005) als auch in der vorliegenden Arbeit verifiziert wurde. Pf38 ist somit neben PfStomatin und RhopH2 das dritte von den Rhoptrien sezernierte Protein, das mit DRM-Rafts assoziiert ist (Hiller *et al.*, 2003). Der Nachweis des Proteins in DRM-Rafts lässt vermuten, dass das Protein an intrazellulären Signaltransduktionsprozessen beteiligt sein könnte (Noble *et al.*, 2006; Riethmüller *et al.*, 2006; Shaw, 2006). Im Laufe der Differenzierung von *Plasmodium falciparum* wurden Proteine, die normalerweise in der Plasmamembran des Erythrocyten lokalisieren, in der PVM nachgewiesen. Unter den identifizierten Proteinen waren auch G-Proteine, die an Signalling-Prozessen beteiligt sind (Murphy *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2006a). Auch die Bildung von Caveolae, und daraus hervorgehend die Clathrin-unabhängige Bildung von Vesikeln wurde mit DRM-Rafts in Verbindung gebracht (McConville und Ferguson, 1993; Zajichowski und Robbins, 2002). Durch derartige Vesikelbildung werden unter anderen GPI-verankerte Proteine für die kompartimentierte Signalverarbeitung internalisiert. An diesen Prozessen sind Proteine wie Stomatin, Flotillin 1 und 2, Prohibitin und die beiden Proteine HfIK und HfIC aus dem Bakterium *Escherichia coli* beteiligt, die gemeinsam die sogenannte SFPH-Proteinsuperfamilie bilden (Kihara und Ito, 1998; Tavernarakis *et al.*, 1999). Von Murphy *et al.* (2004) wurden Flotillin 1 und 2 sowie Stomatin als erythrocytäre DRM-Rafts Proteine in der PVM lokalisiert. Peptide einer plasmodialen Prohibitin-Variante wurden in Präp-1 ebenfalls sequenziert (siehe Anhang 7.1, Tab. 2).

#### 4.4 Pf112.5 – ein Protein der parasitophoren Vakuolenmembran

Das Protein Pf114.5 wurde zuvor auch in anderen Proteomanalysen identifiziert. In der Studie von Lasonder *et al.* (2002) wurde es in einer Trophozoiten/Schizonten-Fraktion identifiziert und eine prozentuale Abdeckung der Aminosäuresequenz von 30 % erzielt. In der Studie von Florens *et al.* (2002) wurden verschiedene Blutstadien analysiert, und Peptide des Proteins sowohl aus Trophozoiten als auch aus Gametocyten sequenziert. In Merozoiten wurde das Protein nicht identifiziert.

Sanders *et al.* (2005) identifizierten Pf112.5 während der experimentellen Phase zu dieser Arbeit in einer DRM-Rafts angereicherten Fraktion. Aufgrund dieser Tatsache und des vorhergesagten GPI-Ankers wurde postuliert, dass das Protein auf der Oberfläche von Merozoiten lokalisiert (Sanders *et al.*, 2005). Der Hinweis von Pf112.5 als Rafts-Protein

begründete sich in den Resultaten der oben genannten Publikation und der Tatsache, dass das Protein in der vorliegenden Studie ebenfalls mittels temperaturabhängiger Triton-X114-Phasenseparation (Smythe *et al.*, 1988) in einer DRM-Rafts-Fraktion angereichert wurde. Die Assoziation des Proteins mit DRM-Rafts lässt, wie schon für Pf38 beschrieben, vermuten, dass Pf112.5 eine Funktion bei möglichen intrazellulären Signaltransduktionsprozessen hat, die für das Überleben des Parasiten in der Wirtszelle essentiell sein könnten. Derartige Proteine liegen häufig mit DRM-Rafts assoziiert vor (Murphy *et al.*, 2006a; Noble *et al.*, 2006; Riethmüller *et al.*, 2006; Shaw, 2006). Murphy und Kollegen haben in einer Studie ein erythrocytäres G-Protein in DRM-Rafts in der parasitophoren Vakuolenmembran lokalisiert. Durch Inhibition dieses Proteins wurde gleichzeitig die Entwicklung des Parasiten gestört (Murphy *et al.*, 2006a&b).

Das Vorhandensein eines GPI-Ankers gibt Grund zu der Annahme, dass es sich, wie im vorherigen Abschnitt (4.3) beschrieben, bei der vorhergesagten Transmembrandomäne (TM) um ein falsch positivs TM-Signal handelte (Gilson *et al.*, 2006).

Auf einer PVDF-Blot-Membran wurde ein Protein aus Membranextrakten infizierter Erythrocyten bei etwa 70 kDa erkannt, was nicht mit der theoretischen, nach der Primärstruktur berechneten, molekularen Masse des Proteins übereinstimmt. Diese lag bei ~ 112 kDa. In Proteinextrakten infizierter Erythrocyten wurde zusätzlich eine Bande bei etwa 148 kDa von den peptidspezifischen Antikörpern erkannt. Diese lief damit zwar höher als erwartet, dies wurde aber mit der Präsenz zahlreicher Cysteinreste im N-terminalen Teil des Proteins erklärt, welche die Laufeigenschaften von Proteinen in der SDS-Gelelektrophorese beeinflussen können. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde davon ausgegangen, dass das Protein nach der Biosynthese proteolytisch prozessiert wurde. Durch Anwendung des fungalen Toxins Brefeldin A (BFA) und damit der Hemmung des Transports von Vesikeln vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat wurde diese Annahme in der vorliegenden Arbeit bestätigt (Doms *et al.*, 1989; Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989; Benting *et al.*, 1994). Beim Vergleich von BFA-unbehandelten und behandelten Zellen war deutlich zu erkennen, dass die 148 kDa Bande an Intensität zunahm, während die 70 kDa Bande schwächer wurde. Vermutlich findet die Prozessierung des Pf112.5-Vorläufers also nach der ER-Passage statt. Die Behandlung mit BFA führte zur Akkumulation des Vorläufers im ER (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989; Nacer *et al.*, 2001). Der BFA-abhängige Transport von Pf112.5 steht zudem in Einklang mit dem Vorhandensein des GPI-Ankers, da diese Proteinmodifikation im Endoplasmatischen Retikulum mittels einer dort lokalisierten GPI-Transamidase erfolgt (Amthauer *et al.*, 1993).

Es wurde bestätigt, dass es sich bei den beiden auf der Blot-Membran zu erkennenden Banden nicht um Kreuzreaktionen handelte, indem Antikörper für den Nachweis von Pf112.5 eingesetzt wurden, die peptidspezifisch durch Affinitätschromatographie gereinigt wurden.

Durch Vorinkubation der Antikörperverdünnung mit den auch für die Immunisierung verwendeten Peptiden verschwanden beide Signale auf der PVDF-Membran. Diese Tatsache wurde auch in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestätigt.

Die Annahme, dass *Pf112.5* proteolytisch prozessiert wird, wird außer durch die vorliegende noch durch drei weitere Studien gestützt, in denen jeweils nur der C-terminale Teil des Proteins identifiziert wurde (Lasonder *et al.*, 2002; Carucci *et al.*, 2002; Sanders *et al.*, 2005). Die Expression von *Pf112.5* erfolgt nach den vorliegenden Resultaten durch Nachweis des nativen Proteins auf einer PVDF-Membran in Trophozoiten und Schizonten. Dies wurde durch die von Sanders *et al.* (2005) durchgeführte Transkriptionsanalyse von 12 potentiell GPI-verankerten Proteinen bestätigt. Auch in der von Bozdech und Kollegen durchgeführten Transkriptom-Analyse wurde die Biosynthese der zugehörigen mRNA in Trophozoiten nachgewiesen (Bozdech *et al.*, 2003).

Mit Hilfe immunfluoreszenzmikroskopischer Methoden wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass *Pf112.5* in der parasitophoren Vakuolenmembran von *P. falciparum* infizierten Erythrocyten lokalisiert und nicht, wie von Sanders *et al.* (2005) vermutet, an der Merozoitenoberfläche. Dies wurde durch Kolokalisation mit dem PVM-Markerprotein EXP-2 verifiziert (Günther *et al.*, 1991). Die Kolokalisation war in jungen und mittleren Trophozoiten am deutlichsten zu erkennen (siehe 3.6.5.4). In den aufgenommenen Bildern war zu sehen, dass sowohl das EXP-2- als auch das *Pf112.5*-Signal den Parasiten wie ein Ring einschlossen. In späten Trophozoiten sowie murenen Schizonten war die Lokalisation nicht mehr als Ring zu visualisieren. Dies war dadurch zu erklären, dass die PVM entweder bereits partiell degradiert ist, was für die sequenzielle Permeabilisierung der PVM während der Merozoitenreifung spräche (Rayner, 2006), oder dass sich dieselbe Anzahl von *Pf112.5*-Molekülen auf eine vergrößerte Membranoberfläche verteilte. Letztere Hypothese wird dadurch gestützt, dass es sich bei *Pf112.5* um ein DRM-Rafts assoziiertes Protein handelt und diese punktuell verteilt in einer Membran vorliegen (Zajichowski und Robbins, 2002; Shaw, 2006). Dies erklärt auch die nur partielle Kolokalisation mit EXP-2.

Bei *Pf112.5* handelt es sich demnach um ein erstmals beschriebenes, in der PVM lokalisiertes Protein, dessen Funktion in weiterführenden Studien eingehend untersucht werden muss. Das Vorhandensein eines GPI-Ankers impliziert eine Beteiligung an DRM-Rafts assoziierten, zellulären Prozessen, die aufgrund der vorhergesagten orthologen Proteine in anderen Plasmodienspecies von essentieller Bedeutung für die intraerythrocytäre Entwicklung des Parasiten sein könnten.

In Anbetracht der hier gezeigten Ergebnisse wird deutlich, dass der intrazelluläre Lebenszyklus des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* noch zahlreiche Rätsel birgt. Trotz der Etablierung von dessen *in-vitro* Kultur durch Trager und Jensen (1976), und der

anschließenden intensiven Untersuchungen, sind viele Mechanismen, die für das Überleben des Parasiten seiner Wirtszelle essentiell sind, unbekannt. Zahlreiche Proteine, wie auch die in dieser Arbeit charakterisierten, konnten zwar identifiziert und lokalisiert werden, der funktionelle Kontext, in dem sie stehen, ist jedoch völlig unbekannt. Gerade die Proteine solch einzigartiger Strukturen wie des durch den Parasiten gebildeten PVM/TVN-Netzwerks stellen eine große Herausforderung für die Forschung dar. So ist es unerlässlich, zunächst möglichst umfassend die in solchen Strukturen lokalisierten Proteine zu identifizieren, um daraufhin funktionelle Beziehungen untersuchen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Mittels eines Proteomics-Ansatzes wurde ein ganz besonderes Entwicklungsstadium des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* untersucht: die sogenannten Segmenter, d.h. invasive Merozoiten, die sich am Ende des intraerythrocytären Entwicklungszyklus noch innerhalb komplexer Membranstrukturen befinden, bevor sie freigesetzt werden. Solche Membranstrukturen werden vom Parasiten während seiner Reifung innerhalb der Wirtszelle gebildet und scheinen eine besondere Bedeutung für sein intrazelluläres Überleben zu besitzen. Um das Proteinrepertoire dieses Entwicklungsstadiums zu analysieren, wurden aus den Segmentern die sogenannten *Parasitophorous Vacuolar Membrane-Enclosed Merozoite Structures* (PEMS) generiert. Diese Strukturen wurden in Merozoiten und Membrankompartimente fraktioniert.

Die Proteine der Merozoitenfraktion wurde mit einem klassischen Verfahren analysiert: Die massenspektrometrische Identifikation von Proteinen mittels 2D-PAGE und MALDI-TOF MS. Dies führte zu dem ersten veröffentlichten Referenzgel (Mastergel) für dieses Stadium des Parasiten überhaupt. Membranproteine waren aber bei diesem Verfahren unterrepräsentiert.

Für die Analyse der angereicherten Membranstrukturen wurden die Proteine mittels eindimensionaler Gelelektrophorese getrennt und anschließend durch LC-ESI MS/MS identifiziert. Wegen der verbesserten Solubilisierbarkeit von Membranproteinen und der enorm hohen Sensitivität der Methode wurden deutlich mehr Proteine identifiziert, die als membranständig annotiert worden waren.

Nach der *in-silico*-Analyse des generierten, umfangreichen Datensatzes, wurden gegen 5 ausgewählte und bis dahin als hypothetisch annotierte Proteine peptidspezifische Antiseren hergestellt. Bei diesen Proteinen handelt es sich um mutmaßliche Membranproteine mit kanonischem Signalpeptid, die ausschließlich in anderen Apikomplexa Orthologe besitzen, wodurch sie vermutlich für den obligat intrazellulären Lebensstil der Mitglieder dieses Stammes eine besondere Bedeutung haben.

Drei der hier erstmals beschriebenen Proteine (*Pf15.2*, *Pf117.4* und *Pf13.8*) sind vermutlich unter der Oberfläche der Merozoiten in der Plasmamembran verankert und könnten eine wichtige Rolle bei der aktiven Invasion der Merozoiten in ihre Wirtszelle spielen, z. B. die Beteiligung an der sogenannten *gliding-motility* oder an den *moving junctions*.

Das Protein *Pf38* lokalisiert in den Rhoptrien und wird während der Invasion auch in die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) integriert. Dieses Protein könnte am Aufbau oder an der Aufrechterhaltung der PVM oder am Stofftransport über die PVM beteiligt sein. Dieses Protein ist vermutlich über einen GPI-Anker mit der Membran verbunden, was durch eine Analyse von DRM-Rafts herausgefunden wurde.

*Pf112.5* ist in der gleichen Art an die PVM gebunden, wird aber erst im Laufe der intrazellulären Parasitenentwicklung in prozessierter Form über den klassischen sekretorischen Weg über das Endoplasmatische Retikulum zur PVM transportiert. Dadurch könnte *Pf112.5* eine Funktion bei der Ruptur der PVM und der Freisetzung der Merozoiten haben.

Die Identifikation von *Pf38* und *Pf112.5* aus subfraktionierten PEMS deutet darauf hin, dass der hier dargelegte Proteomics-Ansatz in Kombination mit einer umfassenden Datenbankanalyse eine interessante Möglichkeit ist, bisher nur schwer zugängliche Membranstrukturen im Cytosol einer infizierten Wirtszelle zu untersuchen.

Alle der hier beschriebenen und erstmals in nativer Form lokalisierten Proteine erweitern das Bild einer zellulären Landkarte dieses gefährlichen Parasiten und könnten dazu beitragen, die komplexen Mechanismen besser zu verstehen, die dessen Überleben innerhalb der Wirtszelle sichern.

## 5.1 Summary

To identify and analyse yet unknown proteins of a specific developmental stage of the malaria pathogen *Plasmodium falciparum* a proteomics-approach has been applied. The so called Segmenterstage comprises the invasive merozoites residing within a complex membrane network prior to their release. These membrane structures are established by the parasite during its maturation within the host cell and appear to be of particular importance for the pathogens intracellular survival. To investigate the proteome of this stage, segmenters were used to generate so called *parasitophorous vacuole membrane-enclosed merozoite structures* (PEMS). These were fractionated to merozoites and membrane compartments.

The proteins of the merozoite fraction have been subjected to classical analytical methods: the identification of proteins via 2D-PAGE followed by MALDI-TOF MS. This led to the first ever published reference gel (mastergel) of this parasite stage. Membrane proteins were under-represented by use of this method.

For the analysis of enriched membrane structures the proteins were separated by one-dimensional SDS-PAGE and subsequently identified by means of LC-ESI MS/MS. Due to the enhanced solubility of membrane proteins combined with the extremely high sensitivity of the method the amount of proteins assumed to be membrane associated was significantly higher.

After *in-silico*-analysis of the generated datafiles, five proteins have been selected for the generation of peptide-specific antisera. Each of them contained a putative transmembrane helix and a canonical signal peptide. Orthologues existing only in other apicomplexan parasites lead to the assumption that these proteins are of special importance to the intracellular lifestyle of members of this phylum.

Three of the proteins (*Pf15.2*, *Pf117.4* and *Pf13.8*) are supposed to localize beneath the surface of the merozoites plasmamembrane and might act in the process of invasion, e.g. being part of the *glideosome* or the *moving junctions*.

The Protein *Pf38* localizes in the rhoptries and is integrated into the nascent *parasitophorous vacuole membrane* (PVM) during invasion. *Pf38* might be involved in the maintenance of the PVM or transport processes across this membrane. The protein is supposed to possess a GPI-anchor, which is supported by a DRM-rafts analysis.

*Pf112.5* is linked to the PVM in the same way, but is transported to this localisation during the process of maturation by use of the classical ER-dependent secretion pathway. During this transport the protein is proteolytically processed. The protein might operate at the rupture of the PVM and the following release of the merozoites.

The identification of *Pf38* and *Pf112.5* from subfractionated PEMS indicates that the presented proteomics-approach, combined with intensive use of the available datasources is



an interesting tool to analyze hitherto unaccessible membrane structures in the cytosol of the infected host cell.

All the proteins described are first-time localized in native form and broaden the picture of the cellular map of this dangerous parasite and might lead to a better understanding of its survival within the red blood cell.

## 6. Literatur

- ADAMS, J. H. et al. 2001. An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. *Trends in parasitology*, **17** (6), S. 297–299.
- ADISA, A. et al. 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. *Journal of cell science*, **114** (Pt 18), S. 3377–3386.
- AIKAWA, M. & MILLER, L. H. 1983. Structural alteration of the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion and intraerythrocytic development. *Ciba Foundation symposium*, **94**, S. 45–63.
- AIKAWA, M. et al. 1978. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *The Journal of cell biology*, **77** (1), S. 72–82.
- AIKAWA, M. et al. 1981. Freeze-fracture study on the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion. *The Journal of cell biology*, **91** (1), S. 55–62.
- AIKAWA, M. et al. 1990. Pf155/RESA antigen is localized in dense granules of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Experimental parasitology*, **71** (3), S. 326–329.
- ALBANO, F. R. et al. 1999. A homologue of Sar1p localises to a novel trafficking pathway in malaria-infected erythrocytes. *European journal of cell biology*, **78** (7), S. 453–462.
- ALEY, S. B. et al. 1987. Ultrastructural localization of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in newly invaded hepatoma cells. *The Journal of parasitology*, **73** (6), S. 1241–1245.
- ALONSO, P. L. et al. 2004. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*, **364** (9443), S. 1411–1420.
- ALONSO, P. L. et al. 2005. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet*, **366** (9502), S. 2012–2018.
- ALTSCHUL, S. F. et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, **25** (17), S. 3389–3402.
- AMTHAUER, R. et al. 1993. Evidence that the putative COOH-terminal signal transamidase involved in glycosylphosphatidylinositol protein synthesis is present in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90** (9), S. 3973–3977.
- ANDERS, R. F. et al. 1987. Structure and function of candidate vaccine antigens in *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Society symposium*, **53**, S. 103–114.
- ANDERSON, R. G. & JACOBSON, K. 2002. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science*, **296** (5574), S. 1821–1825.
- ANSORGE, I. et al. 1996. Protein sorting in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells permeabilized with the pore-forming protein streptolysin O. *The Biochemical journal*, **315** ( Pt 1), S. 307–314.
- ANSORGE, I. et al. 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. *Molecular and biochemical parasitology*, **84** (2), S. 259–261.
- ATKINSON, C. T. & AIKAWA, M. 1990. Ultrastructure of malaria-infected erythrocytes. *Blood cells*, **16** (2-3), S. 351–368.
- ATKINSON, C. T. et al. 1988. Ultrastructural localization of erythrocyte cytoskeletal and integral membrane proteins in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *European journal of cell biology*, **45** (2), S. 192–199.
- BAHL, A. et al. 2003. PlasmoDB: the *Plasmodium* genome resource. A database integrating experimental and computational data. *Nucleic acids research*, **31** (1), S. 212–215.
- BALDI, D. L. et al. 2000. RAP1 controls rhoptry targeting of RAP2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The EMBO journal*, **19** (11), S. 2435–2443.
- BALDI, D. L. et al. 2002. Identification and disruption of the gene encoding the third member of the low-molecular-mass rhoptry complex in *Plasmodium falciparum*.

- Infection and immunity*, **70** (9), S. 5236–5245.
- BANERJEE, R. et al. 2002. Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99** (2), S. 990–995.
- BANNISTER, L. H. et al. 1975. Structure and invasive behaviour of *Plasmodium knowlesi* merozoites in vitro. *Parasitology*, **71** (3), S. 483–491.
- BANNISTER, L. H. et al. 2000. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitology today*, **16** (10), S. 427–433.
- BANNISTER, L. H. et al. 2003. *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *Journal of cell science*, **116** (Pt 18), S. 3825–3834.
- BANNISTER, L. H. & MITCHELL, G. H. 1989. The fine structure of secretion by *Plasmodium knowlesi* merozoites during red cell invasion. *The Journal of protozoology*, **36** (4), S. 362–367.
- BANNISTER, L. & MITCHELL, G. 2003. The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends in parasitology*, **19** (5), S. 209–213.
- BANNISTER, L. H. et al. 1986a. Lamellar membranes associated with rhoptries in erythrocytic merozoites of *Plasmodium knowlesi*: a clue to the mechanism of invasion. *Parasitology*, **92** ( Pt 2), S. 291–303.
- BANNISTER, L. H. et al. 1986b. Structure and development of the surface coat of erythrocytic merozoites of *Plasmodium knowlesi*. *Cell and tissue research*, **245** (2), S. 281–290.
- BARNWELL, J. W. et al. 1999. *Plasmodium vivax*, *P. cynomolgi*, and *P. knowlesi*: identification of homologue proteins associated with the surface of merozoites. *Experimental parasitology*, **91** (3), S. 238–249.
- BARRETT, J., JEFFERIES, J. R. & BROPHY, P. M. 2000. Parasite proteomics. *Parasitology today*, **16** (9), S. 400–403.
- BAUER, M. & PELKMANS, L. 2006. A new paradigm for membrane-organizing and -shaping scaffolds. *FEBS letters*, **580** (23), S. 5559–5564.
- BAUM, J. et al. 2006. A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. *The Journal of biological chemistry*, **281** (8), S. 5197–5208.
- BENTING, J., MATTEI, D. & LINGELBACH, K. 1994. Brefeldin A inhibits transport of the glycophorin-binding protein from *Plasmodium falciparum* into the host erythrocyte. *The Biochemical journal*, **300** ( Pt 3), S. 821–826.
- BLACKMAN, M. J. et al. 1998. A subtilisin-like protein in secretory organelles of *Plasmodium falciparum* merozoites. *The Journal of biological chemistry*, **273** (36), S. 23398–23409.
- BLACKMAN, M. J. et al. 1990. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *The Journal of experimental medicine*, **172** (1), S. 379–382.
- BLISNICK, T. et al. 2000. Pfsbp1, a Maurer's cleft *Plasmodium falciparum* protein, is associated with the erythrocyte skeleton. *Molecular and biochemical parasitology*, **111** (1), S. 107–121.
- BLISNICK, T. et al. 2005. LANCL1, an erythrocyte protein recruited to the Maurer's clefts during *Plasmodium falciparum* development. *Molecular and biochemical parasitology*, **141** (1), S. 39–47.
- BLUM, H., BEIER, H. & GROSS, H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* (8), S. 93–99.
- BOSCH, J. et al. 2007. Aldolase provides an unusual binding site for thrombospondin-related anonymous protein in the invasion machinery of the malaria parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104** (17), S. 7015–7020.
- BOZDECH, Z. et al. 2003. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS biology*, **1** (1), S. E5.
- BRAUN-BRETON, C. & PEREIRA, d. Silva L. 1988. Activation of a *Plasmodium falciparum* protease correlated with merozoite maturation and erythrocyte

- invasion. *Biology of the cell*, **64** (2), S. 223–231.
- BROWN, D. A. 2006. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology*, **21**, S. 430–439.
- BROWN, D. A. & LONDON, E. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology*, **14**, S. 111–136.
- BRUCE, M. C. et al. 1990. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology*, **100 Pt 2**, S. 191–200.
- BUSCAGLIA, C. A. et al. 2003. Sites of interaction between aldolase and thrombospondin-related anonymous protein in plasmodium. *Molecular biology of the cell*, **14** (12), S. 4947–4957.
- BUTIKOFER, P. et al. 2001. GPI-anchored proteins: now you see 'em, now you don't. *The FASEB journal*, **15** (2), S. 545–548.
- CABRERA-VERA, T. M. et al. 2003. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine reviews*, **24** (6), S. 765–781.
- CALLERA, G. E. et al. 2007. Vascular signaling through cholesterol-rich domains: implications in hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*, **16** (2), S. 90–104.
- CARR, S. et al. 2004. The need for guidelines in publication of peptide and protein identification data: Working Group on Publication Guidelines for Peptide and Protein Identification Data. *Molecular & cellular proteomics*, **3** (6), S. 531–533.
- CHATTERJEE, S. & MAYOR, S. 2001. The GPI-anchor and protein sorting. *Cellular and molecular life sciences*, **58** (14), S. 1969–1987.
- CLAVIJO, C. A., MORA, C. A. & WINOGRAD, E. 1998. Identification of novel membrane structures in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **93** (1), S. 115–120.
- COGSWELL, F. B. 1992. The hypnozoite and relapse in primate malaria. *Clinical microbiology reviews*, **5** (1), S. 26–35.
- COOPER, J. A. et al. 1988. The 140/130/105 kilodalton protein complex in the rhoptries of *Plasmodium falciparum* consists of discrete polypeptides. *Molecular and biochemical parasitology*, **29** (2-3), S. 251–260.
- COOPER, R. A. et al. 2005. PfCG2, a *Plasmodium falciparum* protein peripherally associated with the parasitophorous vacuolar membrane, is expressed in the period of maximum hemoglobin uptake and digestion by trophozoites. *Molecular and biochemical parasitology*, **144** (2), S. 167–176.
- COWMAN, A. F. et al. 2000. Functional analysis of proteins involved in *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of red blood cells. *FEBS letters*, **476** (1-2), S. 84–88.
- COWMAN, A. F. & CRABB, B. S. 2002. The *Plasmodium falciparum* genome—a blueprint for erythrocyte invasion. *Science*, **298** (5591), S. 126–128.
- COWMAN, A. F. & CRABB, B. S. 2006. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, **124** (4), S. 755–766.
- CULVENOR, J. G., DAY, K. P. & ANDERS, R. F. 1991. *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. *Infection and immunity*, **59** (3), S. 1183–1187.
- CULVENOR, J. G. et al. 1987. *Plasmodium falciparum*: identification and localization of a knob protein antigen expressed by a cDNA clone. *Experimental parasitology*, **63** (1), S. 58–67.
- DAVIES, D. H. et al. 2005. Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: high-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102** (3), S. 547–552.
- DAVIS, M. J. et al. 2006b. Differential use of signal peptides and membrane domains is a common occurrence in the protein output of transcriptional units. *PLoS genetics*, **2** (4), S. e46.
- DAVIS, M. J. et al. 2006a. MemO: a consensus approach to the annotation of a protein's membrane organization. *In silico biology*, **6** (5), S. 387–399.
- DELPLACE, P. et al. 1987. Localization, biosynthesis, processing and isolation of a major 126 kDa antigen of the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*, **23** (3), S. 193–201.
- DESAI, S. A., KROGSTAD, D. J. & MCCLESKEY, E. W. 1993. A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic

- malaria parasite. *Nature*, **362** (6421), S. 643–646.
- DESOUZA, L. et al. 2005. Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cIAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of proteome research*, **4** (2), S. 377–386.
- DLUZEWSKI, A. R. et al. 1989. Red cell membrane protein distribution during malarial invasion. *Journal of cell science*, **92** (Pt 4), S. 691–699.
- DLUZEWSKI, A. R. et al. 1995. Origins of the parasitophorous vacuole membrane of the malaria parasite: surface area of the parasitized red cell. *European journal of cell biology*, **68** (4), S. 446–449.
- DOMS, R. W., RUSS, G. & YEWDELL, J. W. 1989. Brefeldin A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*, **109** (1), S. 61–72.
- DRUILHE, P. et al. 2005. A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. *PLoS medicine*, **2** (11), S. e344.
- DURASINGH, M. T. et al. 2003. Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (8), S. 4796–4801.
- DUTTA, S. et al. 2003. Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (21), S. 12295–12300.
- EISENHUT, M. 2007. Immunity to blood stages of *Plasmodium falciparum* is dependent on a specific pattern of immunoglobulin subclass responses to multiple blood stage antigens. *Medical hypotheses*.
- ELMENDORF, H. G. & HALDAR, K. 1994. *Plasmodium falciparum* exports the Golgi marker sphingomyelin synthase into a tubovesicular network in the cytoplasm of mature erythrocytes. *The Journal of cell biology*, **124** (4), S. 449–462.
- ETIENNE-MANNEVILLE, S. & HALL, A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420** (6916), S. 629–635.
- FANKHAUSER, N. & MASER, P. 2005. Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics*, **21** (9), S. 1846–1852.
- FAST, N. M. et al. 2001. Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Molecular biology and evolution*, **18** (3), S. 418–426.
- FIELD, S. J. et al. 1993. Actin in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Cell motility and the cytoskeleton*, **25** (1), S. 43–48.
- FISCHER, K. et al. 1998. Characterization and cloning of the gene encoding the vacuolar membrane protein EXP-2 from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*, **92** (1), S. 47–57.
- FLORENS, L. et al. 2004. Proteomics approach reveals novel proteins on the surface of malaria-infected erythrocytes. *Molecular and biochemical parasitology*, **135** (1), S. 1–11.
- FLORENS, L. et al. 2002. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, **419** (6906), S. 520–526.
- FREITAS-JUNIOR, L. H. et al. 2005. Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites. *Cell*, **121** (1), S. 25–36.
- FRIEDRICHSON, T. & KURZCHALIA, T. V. 1998. Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature*, **394** (6695), S. 802–805.
- FUJIKI, Y. et al. 1982. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*, **93** (1), S. 97–102.
- GALINSKI, M. R. & BARNWELL, J. W. 1996. *Plasmodium vivax*: Merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. *Parasitology today*, **12** (1), S. 20–29.
- GALINSKI, M. R. et al. 1999. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 contains coiled-coil motifs in an alanine-rich central domain. *Molecular and biochemical parasitology*, **101** (1-2), S. 131–147.
- GALINSKI, M. R. et al. 2001. *Plasmodium vivax* merozoite surface proteins-3beta and-3gamma share structural similarities with *P. vivax* merozoite surface protein-3alpha and define a new gene family. *Molecular and*

- biochemical parasitology*, **115** (1), S. 41–53.
- GARDINER, D. L. et al. 2004. CLAG 9 is located in the rhoptries of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology research*, **93** (1), S. 64–67.
- GARDNER, M. J. et al. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **419** (6906), S. 498–511.
- GASKINS, E. et al. 2004. Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of cell biology*, **165** (3), S. 383–393.
- GELHAUS, C. et al. 2005a. Fractionation and identification of proteins by 2-DE and MS: towards a proteomic analysis of *Plasmodium falciparum*. *Proteomics*, **5** (16), S. 4213–4222.
- GELHAUS, C. et al. 2005b. Blocking effect of a biotinylated protease inhibitor on the egress of *Plasmodium falciparum* merozoites from infected red blood cells. *Biological chemistry*, **386** (5), S. 499–502.
- GHARAHDAĞHI, F. et al. 1999. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*, **20** (3), S. 601–605.
- GILBERGER, T. W. et al. 2003. A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from *Plasmodium falciparum* defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. *The Journal of biological chemistry*, **278** (16), S. 14480–14486.
- GILSON, P. R. et al. 2006. Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular & cellular proteomics*, **5** (7), S. 1286–1299.
- GLUSHAKOVA, S. et al. 2005. Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. *Current biology*, **15** (18), S. 1645–1650.
- GOEL, V. K. et al. 2003. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (9), S. 5164–5169.
- GORG, A., WEISS, W. & DUNN, M. J. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, **4** (12), S. 3665–3685.
- GOWDA, D. C. & DAVIDSON, E. A. 1999. Protein glycosylation in the malaria parasite. *Parasitology today*, **15** (4), S. 147–152.
- GREENWOOD, B. & MUTABINGWA, T. 2002. Malaria in 2002. *Nature*, **415** (6872), S. 670–672.
- GÜNTHER, K. et al. 1991. An exported protein of *Plasmodium falciparum* is synthesized as an integral membrane protein. *Molecular and biochemical parasitology*, **46** (1), S. 149–157.
- GYGI, S. P. et al. 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature biotechnology*, **17** (10), S. 994–999.
- GYGI, S. P. et al. 2002. Proteome analysis of low-abundance proteins using multidimensional chromatography and isotope-coded affinity tags. *Journal of proteome research*, **1** (1), S. 47–54.
- HAEGGSTROM, M. et al. 2004. Common trafficking pathway for variant antigens destined for the surface of the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte. *Molecular and biochemical parasitology*, **133** (1), S. 1–14.
- HALDAR, K. & MOHANDAS, N. 2007. Erythrocyte remodeling by malaria parasites. *Current opinion in hematology*, **14** (3), S. 203–209.
- HALDAR, K. et al. 2002. Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. *Cellular microbiology*, **4** (7), S. 383–395.
- HALDAR, K. & UYETAKE, L. 1992. The movement of fluorescent endocytic tracers in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Molecular and biochemical parasitology*, **50** (1), S. 161–177.
- HARRIS, P. K. et al. 2005. Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. *PLoS pathogens*, **1** (3), S. 241–251.
- HARRISON, T. et al. 2003. Erythrocyte G protein-coupled receptor signaling in malarial infection. *Science*, **301** (5640), S. 1734–1736.
- HAYASHI, M. et al. 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. *The Journal of biological chemistry*, **276** (18), S. 15249–15255.
- HEALER, J. et al. 2002. Independent translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infection and immunity*, **70** (10), S. 5751–5758.
- HEALER, J. et al. 2004. Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology*, **52** (1), S. 159–168.
- HELMS, J. B. & ZURZOLO, C. 2004. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic*, **5** (4), S. 247–254.
- HEUKESHOVEN, J. & DERNICK, R. 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, **9** (1), S. 28–32.
- HIBBS, A. R., STENZEL, D. J. & SAUL, A. 1997. Macromolecular transport in malaria—does the duct exist? *European journal of cell biology*, **72** (2), S. 182–188.
- HILLER, N. L. et al. 2003. Identification of a stomatin orthologue in vacuoles induced in human erythrocytes by malaria parasites. A role for microbial raft proteins in apicomplexan vacuole biogenesis. *The Journal of biological chemistry*, **278** (48), S. 48413–48421.
- HILLER, N. L. et al. 2004. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science*, **306** (5703), S. 1934–1937.
- HINTERBERG, K. et al. 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. *Experimental parasitology*, **79** (3), S. 279–291.
- HOLDER, A. A. & FREEMAN, R. R. 1984. The three major antigens on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites are derived from a single high molecular weight precursor. *The Journal of experimental medicine*, **160** (2), S. 624–629.
- HOLDER, A. A. et al. 1985. Isolation of a *Plasmodium falciparum* rhoptry protein. *Molecular and biochemical parasitology*, **14** (3), S. 293–303.
- HOLT, D. C. et al. 1999. The cytoadherence linked asexual gene family of *Plasmodium falciparum*: are there roles other than cytoadherence? *International journal for parasitology*, **29** (6), S. 939–944.
- HOPP, T. P. & WOODS, K. R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **78** (6), S. 3824–3828.
- HORGAN, G., CREASEY, A. & FENTON, B. 1992. Superimposing two-dimensional gels to study genetic variation in malaria parasites. *Electrophoresis*, **13** (11), S. 871–875.
- HORROCKS, P. & MUHIA, D. 2005. Pexel/VTS: a protein-export motif in erythrocytes infected with malaria parasites. *Trends in parasitology*, **21** (9), S. 396–399.
- HOWARD, R. F. & REESE, R. T. 1990. *Plasmodium falciparum*: hetero-oligomeric complexes of rhoptry polypeptides. *Experimental parasitology*, **71** (3), S. 330–342.
- HOWELL, S. A. et al. 2005. Distinct mechanisms govern proteolytic shedding of a key invasion protein in apicomplexan pathogens. *Molecular microbiology*, **57** (5), S. 1342–1356.
- HOWELL, S. A. et al. 2001. Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. *The Journal of biological chemistry*, **276** (33), S. 31311–31320.
- HUDSON-TAYLOR, D. E. et al. 1995. *Plasmodium falciparum* protein associated with the invasion junction contains a conserved oxidoreductase domain. *Molecular microbiology*, **15** (3), S. 463–471.
- JEAN, L. et al. 2003. Functional characterization of the propeptide of *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease-1. *The Journal of biological chemistry*, **278** (31), S. 28572–28579.
- JEWETT, T. J. & SIBLEY, L. D. 2003. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Molecular cell*, **11** (4), S. 885–894.
- JOHNSON, D. et al. 1994. Characterization of membrane proteins exported from *Plasmodium falciparum* into the host erythrocyte. *Parasitology*, **109** (Pt 1), S. 1–9.
- JONES, G. L. & EDMUNDSON, H. M. 1990. Protein phosphorylation during the asexual life cycle of the human malarial parasite

- Plasmodium falciparum. *Biochimica et biophysica acta*, **1053** (2-3), S. 118–124.
- JONES, M. L., KITSON, E. L. & RAYNER, J. C. 2006. Plasmodium falciparum erythrocyte invasion: a conserved myosin associated complex. *Molecular and biochemical parasitology*, **147** (1), S. 74–84.
- KAKHNIASHVILI, D. G., BULLA, L. rA.J. & GOODMAN, S. R. 2004. The human erythrocyte proteome: analysis by ion trap mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics*, **3** (5), S. 501–509.
- KARIUKI, M. M. et al. 2005. Two Plasmodium falciparum merozoite proteins binding to erythrocyte band 3 form a direct complex. *Biochemical and biophysical research communications*, **338** (4), S. 1690–1695.
- KHAN, S. M. et al. 2005. Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific Plasmodium biology. *Cell*, **121** (5), S. 675–687.
- KHATTAB, A. & KLINKERT, M. Q. 2006. Maurer's clefts-restricted localization, orientation and export of a Plasmodium falciparum RIFIN. *Traffic*, **7** (12), S. 1654–1665.
- KIHARA, A. & ITO, K. 1998. Translocation, folding, and stability of the HflKC complex with signal anchor topogenic sequences. *The Journal of biological chemistry*, **273** (45), S. 29770–29775.
- KIRK, K. 2001. Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiological reviews*, **81** (2), S. 495–537.
- KLOTZ, F. W. et al. 1989. A 60-kDa Plasmodium falciparum protein at the moving junction formed between merozoite and erythrocyte during invasion. *Molecular and biochemical parasitology*, **36** (2), S. 177–185.
- KOBAYASHI, T. et al. 2006. Mitochondria and apicoplast of Plasmodium falciparum: Behaviour on subcellular fractionation and the implication. *Mitochondrion*.
- KOCKEN, C. H. et al. 1993. Cloning and expression of the gene coding for the transmission blocking target antigen Pfs48/45 of Plasmodium falciparum. *Molecular and biochemical parasitology*, **61** (1), S. 59–68.
- KONCAREVIC, S., BOGUMIL, R. & BECKER, K. 2007. SELDI-TOF-MS analysis of chloroquine resistant and sensitive Plasmodium falciparum strains. *Proteomics*, **7** (5), S. 711–721.
- KROGH, A. et al. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, **305** (3), S. 567–580.
- KRONEGG, J. & BULOZ, D. Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI). <http://129.194.185.165/dgpi/>, **1999**.
- KROTOSKI, W. A. 1989. The hypnozoite and malarial relapse. *Progress in clinical parasitology*, **1**, S. 1–19.
- KRUGLIAK, M., ZHANG, J. & GINSBURG, H. 2002. Intraerythrocytic Plasmodium falciparum utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Molecular and biochemical parasitology*, **119** (2), S. 249–256.
- KUSHWAHA, A. et al. 2002. Amino terminus of Plasmodium falciparum acidic basic repeat antigen interacts with the erythrocyte membrane through band 3 protein. *Molecular and biochemical parasitology*, **122** (1), S. 45–54.
- KUTNER, S. et al. 1985. Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of Plasmodium falciparum: association with parasite development. *Journal of cellular physiology*, **125** (3), S. 521–527.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** (5259), S. 680–685.
- LAMBROS, C. & VANDERBERG, J. P. 1979. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. *The Journal of parasitology*, **65** (3), S. 418–420.
- LANGRETH, S. G. et al. 1978. Fine structure of human malaria in vitro. *The Journal of protozoology*, **25** (4), S. 443–452.
- LANZER, M. et al. 2006. Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *International journal for parasitology*, **36** (1), S. 23–36.
- LASONDER, E. et al. 2002. Analysis of the Plasmodium falciparum proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature*, **419** (6906), S. 537–542.
- LAUER, S. et al. 2000. Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *The EMBO journal*, **19** (14), S. 3556–3564.



- LEMBERG, M. K. & MARTOGLIO, B. 2004. On the mechanism of SPP-catalysed intramembrane proteolysis; conformational control of peptide bond hydrolysis in the plane of the membrane. *FEBS letters*, **564** (3), S. 213–218.
- LI, X. et al. 2004. A co-ligand complex anchors Plasmodium falciparum merozoites to the erythrocyte invasion receptor band 3. *The Journal of biological chemistry*, **279** (7), S. 5765–5771.
- LI, W., KELLER, G. A. & HALDAR, K. 1995. Recognition of a 170 kD protein in mammalian Golgi complexes by an antibody against malarial intraerythrocytic lamellae. *Tissue & cell*, **27** (4), S. 355–367.
- LING, I. T. et al. 2004. The Plasmodium falciparum clag9 gene encodes a rhoptry protein that is transferred to the host erythrocyte upon invasion. *Molecular microbiology*, **52** (1), S. 107–118.
- LING, I. T. et al. 2003. Characterisation of the rhop2 gene of Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii. *Molecular and biochemical parasitology*, **127** (1), S. 47–57.
- LINGELBACH, K. & JOINER, K. A. 1998. The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *Journal of cell science*, **111** ( Pt 11), S. 1467–1475.
- LINGELBACH, K. & PRZYBORSKI, J. M. 2006. The long and winding road: protein trafficking mechanisms in the Plasmodium falciparum infected erythrocyte. *Molecular and biochemical parasitology*, **147** (1), S. 1–8.
- LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. et al. 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** (5), S. 801–813.
- LOBO, C. A. et al. 2003. Characterization of PfRhop148, a novel rhoptry protein of Plasmodium falciparum. *Molecular and biochemical parasitology*, **128** (1), S. 59–65.
- LOPEZ-ESTRANO, C. et al. 2003. Cooperative domains define a unique host cell-targeting signal in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (21), S. 12402–12407.
- LUSTIGMAN, S. et al. 1990. The mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) of Plasmodium falciparum associates with the erythrocyte membrane skeletal protein, band 4.1. *Molecular and biochemical parasitology*, **38** (2), S. 261–270.
- MACKINTOSH, C. L., BEESON, J. G. & MARSH, K. 2004. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends in parasitology*, **20** (12), S. 597–603.
- MAIER, A. G. et al. 2003. Plasmodium falciparum erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. *Nature medicine*, **9** (1), S. 87–92.
- MAIER, A. G. et al. 2007. Skeleton-binding protein 1 functions at the parasitophorous vacuole membrane to traffic PfEMP1 to the Plasmodium falciparum-infected erythrocyte surface. *Blood*, **109** (3), S. 1289–1297.
- MARTI, M. et al. 2004. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science*, **306** (5703), S. 1930–1933.
- MATUSCHEWSKI, K. 2006. Vaccine development against malaria. *Current opinion in immunology*, **18** (4), S. 449–457.
- MAYER, D. C. et al. 2001. Characterization of a Plasmodium falciparum erythrocyte-binding protein paralogous to EBA-175. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98** (9), S. 5222–5227.
- MCCONVILLE, M. J. & FERGUSON, M. A. 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *The Biochemical journal*, **294** ( Pt 2), S. 305–324.
- MEHLHORN, H. & PIEKARSKI, G. 1998. *Grundriß der Parasitenkunde. Parasiten des Menschen und der Nutztiere*: Spektrum Akademischer Verlag.
- MELLO, K. et al. 2004. Members of the merozoite surface protein 7 family with similar expression patterns differ in ability to protect against Plasmodium yoelii malaria. *Infection and immunity*, **72** (2), S. 1010–1018.
- MILLER, L. H. et al. 1979. Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. *The Journal of experimental medicine*, **149** (1), S. 172–184.

- MILLER, L. H. et al. 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, **415** (6872), S. 673–679.
- MILLER, L. H. et al. 1993. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Molecular and biochemical parasitology*, **59** (1), S. 1–14.
- MITCHELL, G. H. et al. 2004. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infection and immunity*, **72** (1), S. 154–158.
- MOORTHY, V. S., GOOD, M. F. & HILL, A. V. 2004. Malaria vaccine developments. *Lancet*, **363** (9403), S. 150–156.
- MORAN, P. & CARAS, I. W. 1994. Requirements for glycosylphosphatidylinositol attachment are similar but not identical in mammalian cells and parasitic protozoa. *The Journal of cell biology*, **125** (2), S. 333–343.
- MORRISSETTE, N. S. & SIBLEY, L. D. 2002. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and molecular biology reviews*, **66** (1), S. 21–38; table of contents.
- MUNRO, S. & PELHAM, H. R. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, **48** (5), S. 899–907.
- MURATA, C. E. & GOLDBERG, D. E. 2003. *Plasmodium falciparum* falcilysin: an unprocessed food vacuole enzyme. *Molecular and biochemical parasitology*, **129** (1), S. 123–126.
- MURPHY, S. C. et al. 2006b. Erythrocyte G protein as a novel target for malarial chemotherapy. *PLoS medicine*, **3** (12), S. e528.
- MURPHY, S. C. et al. 2006a. Lipid rafts and malaria parasite infection of erythrocytes. *Molecular membrane biology*, **23** (1), S. 81–88.
- MURPHY, S. C. et al. 2004. Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. *Blood*, **103** (5), S. 1920–1928.
- NACER, A. et al. 2001. *Plasmodium falciparum* signal sequences: simply sequences or special signals? *International journal for parasitology*, **31** (12), S. 1371–1379.
- NAGAO, E., SEYDEL, K. B. & DVORAK, J. A. 2002. Detergent-resistant erythrocyte membrane rafts are modified by a *Plasmodium falciparum* infection. *Experimental parasitology*, **102** (1), S. 57–59.
- NARUM, D. L. & THOMAS, A. W. 1994. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Molecular and biochemical parasitology*, **67** (1), S. 59–68.
- NEUHOFF, V. et al. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, **9** (6), S. 255–262.
- NIELSEN, H. & KROGH, A. 1998. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. *Proceedings*, **6**, S. 122–130.
- NIRMALAN, N., SIMS, P. F. & HYDE, J. E. 2004. Quantitative proteomics of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and its application to studies of development and inhibition. *Molecular microbiology*, **52** (4), S. 1187–1199.
- NOBLE, K., ZHANG, J. & WRAY, S. 2006. Lipid rafts, the sarcoplasmic reticulum and uterine calcium signalling: an integrated approach. *The Journal of physiology*, **570** (Pt 1), S. 29–35.
- NOSTEN, F. et al. 2000. Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study. *Lancet*, **356** (9226), S. 297–302.
- NYALWIDHE, J. et al. 2002. A nonpermeant biotin derivative gains access to the parasitophorous vacuole in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes permeabilized with streptolysin O. *The Journal of biological chemistry*, **277** (42), S. 40005–40011.
- NYALWIDHE, J. & LINGELBACH, K. 2006. Proteases and chaperones are the most abundant proteins in the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Proteomics*, **6** (5), S. 1563–1573.
- O'DONNELL, R. A. et al. 2006. Intramembrane proteolysis mediates shedding of a key adhesin during erythrocyte invasion by the malaria parasite. *The Journal of cell biology*, **174** (7), S. 1023–1033.
- ONG, S. E. & MANN, M. 2006. A practical recipe for stable isotope labeling by amino

- acids in cell culture (SILAC). *Nature protocols*, **1** (6), S. 2650–2660.
- OPITZ, C. & SOLDATI, D. 2002. 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Molecular microbiology*, **45** (3), S. 597–604.
- PAGOLA, S. et al. 2000. The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature*, **404** (6775), S. 307–310.
- PALACPAC, N. M. et al. 2004. Developmental-stage-specific triacylglycerol biosynthesis, degradation and trafficking as lipid bodies in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Journal of cell science*, **117** (Pt 8), S. 1469–1480.
- PASVOL, G. 2003. How many pathways for invasion of the red blood cell by the malaria parasite? *Trends in parasitology*, **19** (10), S. 430–432.
- PASVOL, G. et al. 1978. Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Annals of tropical medicine and parasitology*, **72** (1), S. 87–88.
- PATTON, W. F. 2002. Detection technologies in proteome analysis. *Journal of chromatography*, **771** (1-2), S. 3–31.
- PELHAM, H. R. 1990. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends in biochemical sciences*, **15** (12), S. 483–486.
- PEYROCHE, A. et al. 1999. Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Molecular cell*, **3** (3), S. 275–285.
- PINDER, J. C. et al. 1998. Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for red cell invasion. *Journal of cell science*, **111** (Pt 13), S. 1831–1839.
- PINSWASDI, C. et al. 1987. Polymorphism of proteins in malaria parasites following mefloquine treatment. *Molecular and biochemical parasitology*, **23** (2), S. 159–164.
- POUELLE, B. et al. 1991. Direct access to serum macromolecules by intraerythrocytic malaria parasites. *Nature*, **353** (6339), S. 73–75.
- PREISER, P. R. et al. 2002. Stage-specific transcription of distinct repertoires of a multigene family during *Plasmodium* life cycle. *Science*, **295** (5553), S. 342–345.
- PRESLEY, J. F. et al. 2002. Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport. *Nature*, **417** (6885), S. 187–193.
- PRZYBORSKI, J. M. & LANZER, M. 2005. Protein transport and trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Parasitology*, **130** (Pt 4), S. 373–388.
- PRZYBORSKI, J. M. et al. 2003. Maurer's clefts--a novel secretory organelle? *Molecular and biochemical parasitology*, **132** (1), S. 17–26.
- RAETHER, W. et al. 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. *Parasitology research*, **75** (8), S. 619–626.
- RALPH, S. A. et al. 2004. Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nature reviews*, **2** (3), S. 203–216.
- RAYNER, J. C. 2006. Erythrocyte exit: Out, damned merozoite! Out I say! *Trends in parasitology*, **22** (5), S. 189–192.
- RAYNER, J. C. et al. 2005. Dramatic difference in diversity between *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* reticulocyte binding-like genes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **72** (6), S. 666–674.
- RAYNER, J. C. et al. 2001. A *Plasmodium falciparum* homologue of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein (PvRBP1) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway. *The Journal of experimental medicine*, **194** (11), S. 1571–1581.
- REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology*, **17**, S. 208–212.
- RIDLEY, R. G. et al. 1990. Characterisation and sequence of a protective rhoptry antigen from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*, **41** (1), S. 125–134.
- RIGAUT, G. et al. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology*, **17** (10), S. 1030–1032.
- ROGER, N. et al. 1988. Characterization of a 225 kilodalton rhoptry protein of

- Plasmodium falciparum. *Molecular and biochemical parasitology*, **27** (2-3), S. 135–141.
- ROSARIO, V. 1981. Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. *Science*, **212** (4498), S. 1037–1038.
- RUSSELL, P. F. 1955. *Man's mastery of malaria*. London [u.a.]: Oxford Univ. Press.
- SACHS, J. D. 2005. Achieving the Millennium Development Goals--the case of malaria. *The New England journal of medicine*, **352** (2), S. 115–117.
- SAJID, M., WITHERS-MARTINEZ, C. & BLACKMAN, M. J. 2000. Maturation and specificity of Plasmodium falciparum subtilisin-like protease-1, a malaria merozoite subtilisin-like serine protease. *The Journal of biological chemistry*, **275** (1), S. 631–641.
- SALIBA, K. J. & KIRK, K. 2001. Nutrient acquisition by intracellular apicomplexan parasites: staying in for dinner. *International journal for parasitology*, **31** (12), S. 1321–1330.
- SALMON, B. L., OKSMAN, A. & GOLDBERG, D. E. 2001. Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98** (1), S. 271–276.
- SAMUEL, B. U. et al. 2001. The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *The Journal of biological chemistry*, **276** (31), S. 29319–29329.
- SAM-YELLOWE, T. Y. et al. 2004a. A Plasmodium gene family encoding Maurer's cleft membrane proteins: structural properties and expression profiling. *Genome research*, **14** (6), S. 1052–1059.
- SAM-YELLOWE, T. Y. et al. 2004b. Proteome analysis of rhoptry-enriched fractions isolated from Plasmodium merozoites. *Journal of proteome research*, **3** (5), S. 995–1001.
- SAM-YELLOWE, T. Y. & PERKINS, M. E. 1991. Interaction of the 140/130/110 kDa rhoptry protein complex of Plasmodium falciparum with the erythrocyte membrane and liposomes. *Experimental parasitology*, **73** (2), S. 161–171.
- SAM-YELLOWE, T. Y., SHIO, H. & PERKINS, M. E. 1988. Secretion of Plasmodium falciparum rhoptry protein into the plasma membrane of host erythrocytes. *The Journal of cell biology*, **106** (5), S. 1507–1513.
- SANDERS, P. R. et al. 2005. Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in Raft-like membranes of Plasmodium falciparum. *The Journal of biological chemistry*, **280** (48), S. 40169–40176.
- SCHAFFER, A. A. et al. 1999. IMPALA: matching a protein sequence against a collection of PSI-BLAST-constructed position-specific score matrices. *Bioinformatics*, **15** (12), S. 1000–1011.
- SCHMITZ, S. et al. 2005. Malaria parasite actin filaments are very short. *Journal of molecular biology*, **349** (1), S. 113–125.
- SHAW, A. S. 2006. Lipid rafts: now you see them, now you don't. *Nature immunology*, **7** (11), S. 1139–1142.
- SIDDIQUI, W. A. et al. 1986. Induction of protective immunity to monoclonal-antibody-defined Plasmodium falciparum antigens requires strong adjuvant in Aotus monkeys. *Infection and immunity*, **52** (1), S. 314–318.
- SIDDIQUI, W. A. et al. 1987. Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against Plasmodium falciparum malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84** (9), S. 3014–3018.
- SILVIE, O. et al. 2004. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by Plasmodium falciparum sporozoites. *The Journal of biological chemistry*, **279** (10), S. 9490–9496.
- SIMONS, K. & IKONEN, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387** (6633), S. 569–572.
- SIMS, P. F. & HYDE, J. E. 2006. Proteomics of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Expert review of proteomics*, **3** (1), S. 87–95.
- SINGH, N. et al. 2004. Conservation and developmental control of alternative splicing in maeb1 among malaria parasites. *Journal of molecular biology*, **343** (3), S. 589–599.
- SIRIPURKPONG, P. et al. 2002. Active site contribution to specificity of the aspartic proteases plasmepsins I and II. *The Journal*

- of biological chemistry, **277** (43), S. 41009–41013.
- SMITH, P. G. & MILLIGAN, P. J. 2005. Malaria vaccine: 3 or 6 months' protection? *Lancet*, **365** (9458), S. 472–473.
- SMYTHE, J. A. et al. 1988. Identification of two integral membrane proteins of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85** (14), S. 5195–5199.
- SNOUNOU, G. et al. 2005. The *Plasmodium* sporozoite survives RTS,S vaccination. *Trends in parasitology*, **21** (10), S. 456–461.
- SPIELMANN, T., FERGUSEN, D. J. & 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. *Molecular biology of the cell*, **14** (4), S. 1529–1544.
- SPIELMANN, T. et al. 2006. Organization of ETRAMPs and EXP-1 at the parasite-host cell interface of malaria parasites. *Molecular microbiology*, **59** (3), S. 779–794.
- STAALSOE, T. et al. 1999. Detection of antibodies to variant antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by flow cytometry. *Cytometry*, **35** (4), S. 329–336.
- STAINES, H. M. et al. 2007. Electrophysiological studies of malaria parasite-infected erythrocytes: current status. *International journal for parasitology*, **37** (5), S. 475–482.
- STOREY, E. 1992. A polyclonal but not a monoclonal antibody to an M(r) 52-kD protein responsible for a punctate fluorescence pattern in *Plasmodium falciparum* merozoites inhibits invasion in vitro. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **47** (5), S. 663–674.
- STOUTE, J. A. et al. 2007. Phase 1 randomized double-blind safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* malaria merozoite surface protein FMP1 vaccine, adjuvanted with AS02A, in adults in western Kenya. *Vaccine*, **25** (1), S. 176–184.
- STOUTE, J. A. et al. 1997. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. *The New England journal of medicine*, **336** (2), S. 86–91.
- SUETTERLIN, B. W., KAPPES, B. & FRANKLIN, R. M. 1991. Localization and stage specific phosphorylation of *Plasmodium falciparum* phosphoproteins during the intraerythrocytic cycle. *Molecular and biochemical parasitology*, **46** (1), S. 113–122.
- SUNDARESH, S. et al. 2006. Identification of humoral immune responses in protein microarrays using DNA microarray data analysis techniques. *Bioinformatics*, **22** (14), S. 1760–1766.
- SZARFMAN, A. et al. 1988a. Mature liver stages of cloned *Plasmodium falciparum* share epitopes with proteins from sporozoites and asexual blood stages. *Parasite immunology*, **10** (3), S. 339–351.
- SZARFMAN, A. et al. 1988b. Allelic forms of gp195, a major blood-stage antigen of *Plasmodium falciparum*, are expressed in liver stages. *The Journal of experimental medicine*, **167** (1), S. 231–236.
- TAKEBE, S. et al. 2007. Purification of Components of the Translation Elongation Factor Complex of *Plasmodium falciparum* by Tandem Affinity Purification. *Eukaryotic cell*, **6** (4), S. 584–591.
- TARASCHI, T. F. et al. 2001. Vesicle-mediated trafficking of parasite proteins to the host cell cytosol and erythrocyte surface membrane in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *International journal for parasitology*, **31** (12), S. 1381–1391.
- TAVERNARAKIS, N., DRISCOLL, M. & KYRPIDES, N. C. 1999. The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends in biochemical sciences*, **24** (11), S. 425–427.
- TEMPLETON, T. J. & DEITSCH, K. W. 2005. Targeting malaria parasite proteins to the erythrocyte. *Trends in parasitology*, **21** (9), S. 399–402.
- THOMPSON, J. K. et al. 2001. A novel ligand from *Plasmodium falciparum* that binds to a sialic acid-containing receptor on the surface of human erythrocytes. *Molecular microbiology*, **41** (1), S. 47–58.
- TONKIN, C. J. et al. 2006. Evidence for Golgi-independent transport from the early secretory pathway to the plastid in malaria parasites. *Molecular microbiology*, **61** (3), S. 614–630.
- TOPOLSKA, A. E. et al. 2004. Characterization of a membrane-associated rhoGTPase protein of *Plasmodium falciparum*. *The Journal of*

- biological chemistry*, **279** (6), S. 4648–4656.
- TORII, M. et al. 1989. Release of merozoite dense granules during erythrocyte invasion by *Plasmodium knowlesi*. *Infection and immunity*, **57** (10), S. 3230–3233.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76** (9), S. 4350–4354.
- TRAGER, W. & JENSEN, J. B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, **193** (4254), S. 673–675.
- TRAGER, W. et al. 1992. Transfer of a dense granule protein of *Plasmodium falciparum* to the membrane of ring stages and isolation of dense granules. *Infection and immunity*, **60** (11), S. 4656–4661.
- TRAPE, J. F. 2001. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **64** (1-2 Suppl), S. 12–17.
- TRELKA, D. P. et al. 2000. Evidence for vesicle-mediated trafficking of parasite proteins to the host cell cytosol and erythrocyte surface membrane in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Molecular and biochemical parasitology*, **106** (1), S. 131–145.
- TRIGLIA, T. et al. 2005. Reticulocyte-binding protein homologue 1 is required for sialic acid-dependent invasion into human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology*, **55** (1), S. 162–174.
- UDENFRIEND, S. & KODUKULA, K. 1995a. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annual review of biochemistry*, **64**, S. 563–591.
- UDENFRIEND, S. & KODUKULA, K. 1995b. Prediction of omega site in nascent precursor of glycosylphosphatidylinositol protein. *Methods in enzymology*, **250**, S. 571–582.
- VAIDYA, A. B. & MATHER, M. W. 2005. A post-genomic view of the mitochondrion in malaria parasites. *Current topics in microbiology and immunology*, **295**, S. 233–250.
- VAN DOOREN, G. G. et al. 2005. Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Molecular microbiology*, **57** (2), S. 405–419.
- VAN SCHAIJK B C. ET AL. 2006. Pfs47, paralog of the male fertility factor Pfs48/45, is a female specific surface protein in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*, **149** (2), S. 216–222.
- VARGAS-SERRATO, E. et al. 2002. Merozoite surface protein-9 of *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites is orthologous to p101/ABRA of *P. falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*, **120** (1), S. 41–52.
- VARMA, R. & MAYOR, S. 1998. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*, **394** (6695), S. 798–801.
- VINCENSINI, L. et al. 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. *Molecular & cellular proteomics*, **4** (4), S. 582–593.
- WALLER, R. F. & MCFADDEN, G. I. 2005. The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Current issues in molecular biology*, **7** (1), S. 57–79.
- WANG, R. et al. 2005. Immune responses to *Plasmodium vivax* pre-erythrocytic stage antigens in naturally exposed Duffy-negative humans: a potential model for identification of liver-stage antigens. *European journal of immunology*, **35** (6), S. 1859–1868.
- WANG, Q. et al. 2004. Transcriptome of axenic liver stages of *Plasmodium yoelii*. *Molecular and biochemical parasitology*, **137** (1), S. 161–168.
- WARD, G. E., MILLER, L. H. & DVORAK, J. A. 1993. The origin of parasitophorous vacuole membrane lipids in malaria-infected erythrocytes. *Journal of cell science*, **106** ( Pt 1), S. 237–248.
- WASHBURN, M. P. 2004. Utilisation of proteomics datasets generated via multidimensional protein identification technology (MudPIT). *Briefings in functional genomics & proteomics*, **3** (3), S. 280–286.
- WATERKEYN, J. G. et al. 2000. Targeted mutagenesis of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) disrupts cytoadherence of malaria-infected red blood cells. *The EMBO journal*, **19** (12), S. 2813–2823.

- WICKERT, H. et al. 2004. Maurer's cleft organization in the cytoplasm of plasmodium falciparum-infected erythrocytes: new insights from three-dimensional reconstruction of serial ultrathin sections. *European journal of cell biology*, **83** (10), S. 567–582.
- WICKERT, H. et al. 2003. Evidence for trafficking of PfEMP1 to the surface of P. falciparum-infected erythrocytes via a complex membrane network. *European journal of cell biology*, **82** (6), S. 271–284.
- WICKHAM, M. E., CULVENOR, J. G. & COWMAN, A. F. 2003. Selective inhibition of a two-step egress of malaria parasites from the host erythrocyte. *The Journal of biological chemistry*, **278** (39), S. 37658–37663.
- WICKHAM, M. E. et al. 2001. Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes. *The EMBO journal*, **20** (20), S. 5636–5649.
- WILLIAMSON, D. H. et al. 2002. The plastid DNA of the malaria parasite Plasmodium falciparum is replicated by two mechanisms. *Molecular microbiology*, **45** (2), S. 533–542.
- WINOGRAD, E. et al. 1999. Release of merozoites from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes could be mediated by a non-explosive event. *Parasitology research*, **85** (8-9), S. 621–624.
- WITHERS-MARTINEZ, C., JEAN, L. & BLACKMAN, M. J. 2004. Subtilisin-like proteases of the malaria parasite. *Molecular microbiology*, **53** (1), S. 55–63.
- WOEHLBIER, U. et al. 2006. Analysis of antibodies directed against merozoite surface protein 1 of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Infection and immunity*, **74** (2), S. 1313–1322.
- WU, Y. & CRAIG, A. 2006. Comparative proteomic analysis of metabolically labelled proteins from Plasmodium falciparum isolates with different adhesion properties. *Malaria journal*, **5**, S. 67.
- ZAJCHOWSKI, L. D. & ROBBINS, S. M. 2002. Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *European journal of biochemistry*, **269** (3), S. 737–752.
- ZUCKERMAN, J. N. 2006. Protective efficacy, immunotherapeutic potential, and safety of hepatitis B vaccines. *Journal of medical virology*, **78** (2), S. 169–177.

## 7. Anhang

### 7.1 Massenspektrometrische Ergebnistabellen

**Tabelle 1: Identifizierte Proteine aus Merozoiten 2D-PAGE**

Protein Nr.	Fragmente	Passende Massen	Identifiziertes Protein	Zugangsnummer (GI)	Genlocus	pI theor./ exp.	MW theor./exp. (kDa)	% Seq	SP	TM
1	42	18	spectrin alpha chain	1197893	-	5.0 / 4.6	280	10	nd	nd
2	26	-	-	-	-	5.1	120	-	-	-
3	49	-	-	-	-	5.3	120	-	-	-
4	17	6	GBP130 precursor	23507963	PF10_0159	5.0 / 4.7	96 / 116	55	1	0
5	25	-	-	-	-	5.2	120	-	-	-
6	22	7	GBP130 precursor	23507963	PF10_0159	5.0 / 4.8	96 / 116	54	1	0
7	31	-	-	-	-	5.4	116	-	-	-
8	36	11	cell division cycle protein48 homologue, putative	23612274	MAL6P1.232	5.0 / 4.9	91 / 100	17	0	0
9	29	-	-	-	-	5.5	120	-	-	-
10	31	-	-	-	-	6.0	125	-	-	-
11	80	-	-	-	-	6.0	116	-	-	-
12	43	6	HSP86	23612467	PF07_0029	4.9 / 4.6	86 / 90	9	0	0
13	41	7	glycophorin BP (Fragment)	72401	-	4.4 / 4.7	25 / 90	67	1	0
14	51	12	HSP	23505079	PFI0875w	5.1 / 4.7	72 / 70	22	1	0
15	98	22	heat shock protein	23613697 M	PFI0875w	5.2 / 5.0	72 / 70	42	1	0
16	60	23	heat shock protein	23613697 M	PFI0875w	5.2 / 5.0	72 / 70	43	1	0
17	48	16	HSP70	22255708	PFI0875w	5.2 / 5.1	72 / 70	27	1	0
18	31	8	heat shock 70 kDa protein	23612827	PF08_0054	5.5 / 5.2	74 / 72	15	0	0
19	46	7	HSP70	23612827	PF08_0054	5.5 / 5.3	73 / 70	12	0	0
20	34	4	HSP70	23612827	PF08_0054	5.5 / 5.3	74 / 72	7	0	0
21	84	7	HSP70 kDa Prot	23612827	PF08_0054	5.5 / 5.3	74 / 68	15	0	0
22	35	20	HSP70	23612827	PF08_0054	5.5 / 5.3	73 / 70	32	0	0
23	30	21	HSP70	23612827	PF08_0054	5.5 / 5.5	73 / 70	31	0	0
24	29	-	-	-	-	6.0	70	-	-	-
25	83	11	albumin, bovine	1386160	-	5.4 / 5.8	66 / 66	17	nd	nd
26	23	9	albumin, bovine	30794280	-	5.8 / 5.6	69 / 66	17	nd	nd
27	44	17	albumin, bovine	30794280	-	5.8 / 5.7	69 / 67	26	nd	nd
28	32	6	heat shock protein hsp70 homologue	23508542	PF11_0351	6.5 / 5.3	73 / 68	16	0	0
29	58	14	heat shock protein hsp70 homologue	23508542	PF11_0351	6.5 / 5.4	73 / 68	27	0	0
30	35	9	HSP70	23496277	PF11_0351	6.5 / 4.5	73 / 68	21	0	0
31	35	13	heat shock protein hsp70 homologue	11127605	pthsp70-3	5.9 / 5.5	72 / 66	28		
32	70	13	vacuolar ATP synthase catalytic subunit a	23649057	PF13_0065	5.0 / 5.7	69 / 65	21	0	0
33	26	14	albumin, bovine	30794280	-	5.8 / 5.7	69 / 66	24	nd	nd
34	53	8	hypothetical protein	23495963	PF11_0037	5.7 / 6.3	74 / 67	20	1	0
35	55	6	HSP60	23495018	PF10_0153	6.7 / 6.4	62 / 66	11	0	0
36	33	-	-	-	-	4	50	-	-	-
37	43	-	-	-	-	4.6	50	-	-	-
38	33	4	tubulin beta chain, P.f.	160732	-	4.7 / 4.7	50 / 60	15	-	-
39	57	14	tubulin beta chain	23494948	PF10_0084	4.7 / 4.8	50 / 62	33	0	0
40	43	6	T-complex protein 1 alpha subunit, putative	23496256	PF11_0331	6.6 / 4.9	60 / 64	20	0	0
41	67	13	T-complex beta subunit	23477030	MAL3P2.26	5.4 / 5.5	60 / 60	28		
42	68	12	26S proteasome subunit, putative	23496239	PF11_0314	5.1 / 5.1	50 / 60	32	0	0



Fortsetzung Tabelle 1										
43	57	8	hypothetical protein	23618996	PF13_0031	9.4 / 5.6	58 / 65	20	0	0
44	41	-	-	-	-	5.5 / 5.4	64 / 65	-	-	-
45	75	9	TCP-1-alpha; human	135538	-	5.8 / 5.7	60 / 65	19	nd	nd
46	29	10	HSP60	23495018	PF10_0153	6.7 / 5.7	63 / 63	22	0	0
47	68	11	protein disulfide isomerase	23612738	MAL8P1.17	5.6 / 5.7	55 / 55	19	1	0
48	36	9	hypothetical protein	23496539	PFL0040c	8.5 / 5.3	65 / 50	17	0	0
49	44	7	tubulin alpha chain	23504938	PFI0180w	4.9 / 5.4	51 / 51	26	0	0
50	62	7	protein disulfide isomerase	23612738	MAL8P1.17	5.6 / 5.7	55 / 55	13	1	0
51	74	13	protein disulfide isomerase	23612738	MAL8P1.17	5.6 / 5.7	55 / 55	28	1	0
52	67	13	T-complex beta subunit, putative	23957736	MAL3P2.26	5.5 / 5.5	59 / 60	31	-	-
53	33	5	lysophospholipase like protein, put.	23498725	PF07_0005	5.2 / 5.0	49 / 49	16	-	-
54	36	9	hypothetical protein	23496539	PFL0040c	8.5 / 5.3	65 / 50	17	0	0
55	55	12	eIF4A like DEAD family RNA helicase	3845186	PFB0445c	5.7 / 5.5	52 / 60	26	0	0
56	48	15	eIF4A-like DEAD family RNA helicase	3845186	PFB0445c	5.7 / 5.7	52 / 62	38	0	0
57	59	25	HSP60	23495018	PF10_0153	6.7 / 6.0	63 / 63	49	0	0
58	39	-	-	-	-	6.2	52	-	-	-
59	38	9	erythrocyte membrane protein band 4.1	4758274	-	6.8 / 6.5	66 / 49	20	nd	nd
60	58	9	hypothetical protein	7768286	MAL3P6.5	6.7 / 4.6	54 / 44	21	-	-
61	32	4	hypothetical protein	23496065	PF11_0142	4.6 / 4.7	54 / 40	19	0	0
62	84	7	hypothetical protein	23904650	PFE0820c	5.4 / 4.8	40 / 42	27	0	0
63	40	9	actin	23509135	PFL2215w	5.2 / 5.0	42 / 46	26	0	0
64	46	12	actin	23509135	PFL2215w	5.2 / 5.0	42 / 45	40	0	0
65	60	11	tropomodulin I, human	4507553	-	5.0 / 5.0	40 / 45	48	nd	nd
66	35	9	ACTB protein, human	15277503	-	5.6 / 5.2	40 / 44	34	nd	nd
67	33	5	lysophospholipase like protein	23498725	PF07_0005	5.2 / 5.0	49 / 49	16	0	1
68	41	18	actin	23509135	PFL2215w	5.2 / 5.2	42 / 45	55	0	0
69	26	12	ACTB protein, human	15277503	-	5.6 / 5.2	40 / 44	36	nd	nd
70	55	8	actin II	23509345	PF14_0124	5.2 / 5.2	43 / 45	31	0	0
71	31	6	actin beta, human	14250401	-	5.6 / 5.3	41 / 44	20		
72	23	5	HSP C306 fragment human	6841262	-	4.9 / 5.5	30 / 45	33	nd	nd
73	39	11	MSP-1 fragment	2789670	-	5.8 / 5.5	44 / 45	31		
74	56	7	merozoite surface protein 1	2789668	-	5.8 / 5.6	43 / 45	28		
75	42	12	26S protease regulatory subunit 7 (MSS1 protein)	-	-	5.7 / 5.7	49 / 45	25		
76	40	9	Enolase	23507959	PF10_0155	6.2 / 6.0	48 / 50	29	0	0
77	40	12	Enolase	23507959	PF10_0155	6.2 / 6.2	48 / 48	39	0	0
78	66	10	erythrocyte membrane protein 1	19071554	-	8.0 / 6.2	51 / 45	21		
79	53	20	enolase	23507959	PF10_0155	6.2 / 6.5	48 / 47	50	0	0
80	56	9	ornithine aminotransferase	46361043	PFF0435w	6.5 / 6.3	47 / 45	24	0	0
81	39	13	ornithine aminotransferase	23612170	MAL6P1.91	6.5 / 6.6	46 / 45	32	0	0
82	46	6	actin I	23509135	PFL2215w	5.3 / 5.5	42 / 42	21	0	0
83	43	-	-	-	-	6.3	44	-	-	-
84	51	5	S-adenosylmethionine synthetase, putative	23505122	PFI1090w	6.3 / 6.3	45 / 45	17	0	0
85	60	7	Phosphoglycerate kinase	23613743	PFI1105w	7.6 / 6.5	45 / 40	21	0	0
86	58	6	TCP1/cpn60 chaperonin family	23619499	MAL13P1.283	6.1 / 6.6	58 / 40	13	0	0
87	37	7	ER resident calcium binding protein	23508293	PF11_0098	4.5 / 4.5	40 / 36	18	1	0
88	30	11	TPM1 prot, hum.	31565806	-	4.7 / 4.7	29 / 36	41		

Fortsetzung Tabelle 1										
89	29	10	HAP Protein	23497142	PF14_0078	8	51 / 36	21	1	0
90	20	-	-	-	-	4.9	36	-	-	-
91	41	10	actin	23509135	PFL2215w	5.2 / 5.5	42 / 39	34	0	0
92	46	6	actin I	23509135	PFL2215w	5.3 / 5.5	42 / 42	21	0	0
93	51	4	actin	23496976	PFL2215w	5.8 / 5.2	42 / 45	17	0	0
94	51	8	eukaryotic translation initiation factor, putative	23612859	MAL8P1.83	6.0 / 6.5	31 / 33	28	0	0
95	56	-	-	-	-	4.9	30	-	-	-
96	32	4	BiP (HSP70)	160114	-	4.7 / 4.7	30 / 30	18	-	-
97	47	21	TPMsk3, human	19072649	-	4.7 / 4.7	29 / 31	58	nd	nd
98	25	-	-	-	-	4.7	33	-	-	-
99	23	16	apolipoprotein precursor, bovine	113988	-	5.7 / 4.7	30 / 30	57	nd	nd
100	67	8	hypothetical protein	23508265	PF11_0069	4.9 / 4.9	32 / 29	32	1	0
101	65	6	exported protein 2	23509900	PF14_0678	5.1 / 5.0	33 / 33	26	1	0
102	38	6	LDH, human	-	-	5.7 / 5.7	37 / 37	15	nd	nd
103	84	12	collagen 22a1 fragment, human	27469566	-	6.5 / 6.1	80 / 35	20	nd	nd
104	75	10	eukaryotic translation initiation factor, putative	23612859	MAL8P1.83	6.0 / 6.2	31 / 34	40	0	0
105	31	6	proteasome regulatory subunit, putative	23619601	MAL13P1.343	6.3 / 6.5	35 / 35	19	0	0
106	36	5	guanine nucleotide binding protein, putative	23499027	PF08_0019	6.2 / 6.5	36 / 35	21	0	0
107	51	8	eukaryotic translation initiation factor, putative	23612859	MAL8P1.83	6.0 / 6.5	31 / 33	28	0	0
108	51	9	proteasome subunit alpha type 5	23612640	PF07_0112	5.0 / 4.8	29 / 34	52	0	0
109	67	6	hypothetical protein	23505159	PFI1270w	5.5 / 4.8	25 / 26	31	1	0
110	47	7	phosphoethanolamine N-methyltransferase	23615568	MAL13P1.214	5.4 / 5.3	31 / 29	28	0	0
111	45	6	phosphoethanolamine N-methyltransferase	23615568	MAL13P1.214	5.4 / 5.4	31 / 30	28	0	0
112	30	6	phosphoethanolamine N-methyltransferase, putative	23619361	MAL13P1.214	5.4 / 5.4	31 / 29	24	0	0
113	54	6	hypothetical protein	23497203	PF14_0138	5.5 / 5.4	23 / 28	27	0	0
114	37	6	proteasome subunit alpha	23499217	MAL8P1.128	5.9 / 5.5	33 / 29	25	0	1
115	23	9	phosphoethanolamine N-methyltransferase, putative	23619361	MAL13P1.214	5.4 / 5.5	31 / 29	36	0	0
116	48	6	proteasome subunit, alpha type 1, putative	23509938	PF14_0716	5.5 / 5.5	28 / 28	35	0	0
117	31	9	actin	23509135	PFL2215w	5.2 / 5.6	42 / 29	29	0	0
118	27	9	phosphoethanolamine N-methyltransferase, putative	23619361	MAL13P1.214	5.4 / 5.7	31 / 29	44	0	0
119	26	8	hypothetical protein, conserved	23508128	PF10_0325	5.6 / 6.0	33 / 30	34	0	0
120	44	11	RESA-like protein, truncated (C terminal)	23510225	PFD1170c	8.7 / 6.0	36 / 29	33	0	1
121	33	8	hypothetical protein	23509367	PF14_0046	7.7 / 6.4	35 / 30	22	1	0
122	28	6	small heat shock protein, putative	23618982	PF13_0021	6.0 / 6.0	25 / 26	30	0	0
123	21	-	-	-	-	6.0	27	-	-	-
124	30	8	hypothetical protein, conserved	23613663	PFI0705w	6.0 / 6.0	28 / 26	34	0	0
125	43	11	APA1, bovine	AAA30381	-	5.7 / 5.3	30 / 25	32	-	-
126	20	5	proteasome subunit, putative	23619460	PF13_0282	5.9 / 5.4	28 / 25	33	0	0
127	33	5	GTPase, putative	23613148	PFE0625w	6.2 / 6.0	23 / 23	35	0	0

Fortsetzung Tabelle 1										
128	42	14	uridine phosphorylase, putative	23613155	PFE0660c	6.1 / 6.0	27 / 25	77	0	0
129	42	12	triose-phosphate isomerase	23509600	PF14_0378	6.0 / 6.0	28 / 25	41	0	0
130	29	8	small heat shock protein, putative	23618982	PF13_0021	6.0 / 6.0	25 / 25	36	0	0
131	43	-	-	-	-	6.2	25	-	-	-
132	34	11	triose-phosphate isomerase	23509600	PF14_0378	6.0 / 6.0	28 / 25	43	0	0

Tabelle 2: Identifizierte plasodiale Proteine aus LC-MS/MS Präp-1

Protein Nr.	Identifiziertes Protein	Genort	Zugangsnr. (GI)	SP	TM	PEXEL / VTS	ident. Fragm.	Signifikanz	Masse [Da]
1	merozoite surface protein 1, precursor [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI1475w	gij23613817	1	1		78	3407	195605
2	merozoite surface protein 7 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0197	gij15808773	1			5	158	41338
3	RIFIN [Plasmodium falciparum 3D7]	PFA0710c	gij23613505	1	1		1	65	42278
4	apical membrane antigen 1 - malaria parasite [Plasmodium falciparum]	PF11_0344	gij102331	1	1		4	193	71996
5	HAP protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0078	gij23509299		1		8	373	51661
6	cysteine protease, putative; SERP I/SERA [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0340c	gij160687	1			4	114	111698
7	erythrocyte binding antigen 140; BAEBL [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.60	gij23619069	1	1		3	84	140508
8	Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) or PfEMP2 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0040c	gij23613032	1	1	1	8	376	168186
9	early transcribed membrane protein 10.2 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0019	gij8247330	1	1		2	170	17145
10	exported protein 2 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0678	gij3021540		1		15	538	32932
11	circumsporozoite-related antigen; Exp-1 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0224	gij6650201	1	1		6	104	17285
12	endoplasmic homolog precursor, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1070c	gij23508908	1	1		42	1830	94959
13	enolase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0155	gij23495020		1		29	1210	48647
14	cell division cycle protein 48 homologue, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0940c	gij23612274				2	78	89835
15	14-3-3 protein homologue, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL8P1.69	gij23612834				4	155	29457
16	actin [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL2215w	gij23496976				28	983	41794
17	actin II [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0124	gij23509345				9	319	42578
18	myosin a [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0233	gij23619357		1		8	392	92219
19	actin depolymerizing factor, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0165w	gij23613057		1		1	90	13732

Fortsetzung Tabelle 2									
20	Aquaglyceroporin [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0338	gij23496264	1	1		1	56	28279
21	ring-infected erythrocyte surface antigen precursor, RESA [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD1170c	gij23613381	1	1	1	14	550	126443
22	T-complex protein beta subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFC0285c	gij23957736				14	730	59030
23	101 kDa malaria antigen (P101) (Acidic basic repeat antigen); ABRA; MSP-9 [Plasmodium falciparum]	PFL1385c	gij113005	1			1	62	86569
24	Cytoadherence linked asexual protein, CLAG/RhopH1 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFC0120w	gij71361250	1	1		1	54	168670
25	rhostry complex polypeptide RhopH3 - malaria parasite [Plasmodium falciparum]	PFI0265c	gij323133	1	1		4	182	104818
26	rhostry-associated protein 1; RAP1 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0102	gij23509323		1		37	1409	89996
27	rhostry-associated protein 2 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0080c	gij23613040		1		20	744	46709
28	rhostry-associated protein 3 [Plasmodium falciparum]	PFE0075c	gij21591743		1		2	74	46947
29	high molecular weight rhostry protein-2 [Plasmodium falciparum]	PFI1445w	gij27414163				54	2229	162561
30	alpha tubulin [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0180w	gij23613558				9	415	50264
31	Tubulin beta chain (Beta tubulin) [Plasmodium falciparum]	PF10_0084	gij135491				3	205	49719
32	ornithine aminotransferase [Plasmodium falciparum]	PFF0435w	gij12005661				13	658	46025
33	prohibitin, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0144	gij23495009		1		7	233	34772
34	zinc-metallopeptidase-like protein - malaria parasite [Plasmodium falciparum]	MAL13P1.56	gij7494454	1			1	52	122593
35	zinc transporter, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF07_0065	gij23612531		1		1	97	62904
36	plasmodium falciparum gamete antigen 27/25 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0011	gij23618959				3	147	25988
37	replication factor c subunit 4 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL2005w	gij23496934		1		2	67	37614
38	replication factor C subunit 5, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0117	gij23508310				2	51	40321
39	replication factor C, subunit 2 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0840w	gij3845290				3	164	37899
40	plasmepsin 2 precursor [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0077	gij23509298		1		7	394	51448
41	plasmepsin 1 precursor [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0076	gij23509297		1		4	194	51428
42	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL0625c	gij23508822				1	66	165959
43	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL0310c	gij23508759				7	315	115941

Fortsetzung Tabelle 2									
44	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0077	gij23507881				3	121	63071
45	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF07_0117	gij23612646				3	124	37796
46	eukaryotic translation initiation factor 2, beta, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0103	gij23507907				2	66	25306
47	translation initiation factor E4, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P5.13	gij16805234				7	265	26931
48	eukaryotic initiation factor 5a, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL0210c	gij23508739				2	79	17620
49	L-lactate dehydrogenase [Plasmodium falciparum]	PF13_0141	gij76563843	1			1	76	34086
50	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Plasmodium falciparum]	PF14_0598	gij13560655		1		2	91	36612
51	Phosphoglycerate kinase [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI1105w	gij23613743				20	916	45398
52	phosphoglycerate mutase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0208	gij23508399				17	678	28752
53	PfSNF2L [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0053	gij23508249				1	57	166844
54	nucleoside transporter 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0252	gij7688919		1		3	130	47600
55	nucleoside diphosphate kinase b; putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0349	gij23619586				2	67	17001
56	6-phosphofruktokinase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0755c	gij23613673		1		12	506	159351
57	transcriptional regulator, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0870w	gij23613196		1		1	85	132600
58	DNA topoisomerase II, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0316	gij23509538				7	320	169122
59	elongation factor 2 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0486	gij23509708		1		18	754	93462
60	elongation factor 1 alpha [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0305	gij23619492				39	1330	48928
61	elongation factor 1-gamma, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0214	gij23619320		1		4	134	50428
62	glutathione peroxidase [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL0595c	gij23508816	1			3	137	23937
63	hydroxyacyl glutathione hydrolase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD0311w	gij23510053				3	83	31609
64	thioredoxin-related protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0272	gij23619447	1	1		3	124	23972
65	multidrug resistance protein Pgh1 [Plasmodium falciparum]	PFE1150w	gij8050813	1	1		1	54	162150
66	isoleucine--tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0179	gij23619270		1		5	167	151214
67	glycine -- tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0198	gij23509419		1		11	428	103097

Fortsetzung Tabelle 2									
68	methionine -- tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0340	gij23495207		1		9	363	104102
69	glutamate--tRNA ligase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0257	gij23619415		1		4	190	101354
70	phenylalanine -- tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0051	gij23508247				6	333	72455
71	asparagine -- tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0525w	gij3845207				5	162	70453
72	aspartate--tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFA0145c	gij23613388		1		6	298	73403
73	cysteine -- tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0149	gij23495014		1		2	69	69380
74	methionine -- tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0401	gij23509623		1		6	252	46412
75	seryl-tRNA synthetase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF07_0073	gij23612549		1		7	278	62414
76	leucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF1095w	gij23612305		1		7	258	170133
77	E1-E2_ATPase/hydrolase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0240c	gij23613570		1		2	125	298622
78	vacuolar ATP synthase catalytic subunit a [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0065	gij23619057				11	631	68532
79	vacuolar ATP synthase subunit b [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD0305c	gij23510050				9	444	55753
80	ATP synthase (C/AC39) subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0615	gij23497689				9	385	44503
81	vacuolar ATP synthase subunit D, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0227	gij23619350				2	116	45231
82	V-type H(+)-translocating pyrophosphatase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0541	gij23497614	1	1		7	514	76367
83	ADP/ATP transporter on adenylate translocase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0366	gij23495233	1	1		9	509	33705
84	NADP-specific glutamate dehydrogenase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0164	gij23509385		1		2	109	52513
85	RNA helicase-1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0655	gij23497730				10	477	45281
86	RNA-binding protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0820c	gij23613686				3	97	45115
87	helicase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0445c	gij3845186				1	83	52191
88	DNA-directed RNA polymerase II, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI1130c	gij23613748				3	139	38322
89	conserved GTP-binding protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL7P1.122	gij23612594				5	210	45135
90	small GTPase Rab11 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0119	gij23619155		1		13	635	24737
91	Rab1 protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0690c	gij23613161				2	103	23844
92	GTPase; RAB6 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0461	gij1628428		1		7	300	23583

Fortsetzung Tabelle 2									
93	2-Cys peroxiredoxin [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0368	gij23509590		1		9	429	21793
94	putative deoxyuridine 5'- triphosphate nucleotidohydrolase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0282	gij23496207				4	204	19561
95	erythrocyte binding antigen [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL7P1.176	gij23612676	1	1		5	210	169804
96	knob associated histidine-rich protein; KAHRP [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0100c	gij3845095	1		1	4	208	71259
97	tryptophan/threonine-rich antigen [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0003	gij23612717		1	1	2	55	80393
98	IRP-like protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0229	gij23619352		1		2	92	103313
99	coronin [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL2460w	gij23497026		1		5	151	68971
100	rhoGAP protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0071	gij23507875		1		2	103	75061
101	disulfide isomerase precursor, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL8P1.17	gij23612738	1			22	986	55466
102	Plasmodium falciparum membrane protein pf12 precursor [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0615c	gij23612207	1	1		4	181	39409
103	vesicle-associated membrane protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0377	gij23509599		1		1	72	27669
104	karyopherin beta [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE1195w	gij23613261		1		1	66	127272
105	ubiquitin/ribosomal fusion protein uba52 homologue, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL0585w	gij23619579				2	83	14608
106	PfpUB Plasmodium falciparum polyubiquitin [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1245w	gij23508814		1		1	56	42803
107	CG4 protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF07_0033	gij23612471		1		2	103	99902
108	transportin [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF1345w	gij23612355		1		7	305	131419
109	QF122 antigen [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0115	gij23507919				7	329	131545
110	bi-funct. enz.: long-chain fatty- acid Co-A ligase and oxalyl Co-A decarboxyl., put. [Plasmodium falciparum]	PFF0945c	gij23612275	1	1		3	128	163802
111	falcilysin [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0322	gij23619529		1		11	428	138776
112	Protein phosphatase 2C [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0396	gij23496322		1		7	354	107185
113	protein phosphatase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0129	gij23612977		1		2	87	70032
114	myo-inositol 1-phosphate synthase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0585c	gij23613140		1		17	730	69069
115	ribose-phosphate pyrophosphokinase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0157	gij23619229				4	202	63979

Fortsetzung Tabelle 2									
116	acid phosphatase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0880c	gij23613698	1	1		6	329	44576
117	phosphoribosylpyrophosphate synthetase [Plasmodium falciparum]	PF13_0143	gij6525226		1		14	751	49352
118	phosphatidylserine decarboxylase [Plasmodium falciparum]	PFI1370c	gij23534527	1	1		3	126	41521
119	deoxyribose-phosphate aldolase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0210	gij23495075				1	65	28961
120	triose-phosphate isomerase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0378	gij23509600				4	178	27917
121	4-methyl-5(B-hydroxyethyl)- thiazol monophosphate biosynthesis enzyme [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF1335c	gij23612353				3	170	20280
122	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0520	gij23509742	1	1		9	409	52960
123	lysophospholipase-like protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF07_0040	gij23612480		1		5	176	42331
124	phosphoethanolamine N- methyltransferase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.214	gij23619361				16	591	31024
125	hypoxanthine phosphoribosyltransferase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0121	gij23507925				9	290	26346
126	uridine phosphorylase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0660c	gij23613155		1		4	146	26841
127	syntaxin 5, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.169	gij23619261		1		1	77	32791
128	bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD0830w	gij23510155				1	63	71691
129	adenylosuccinate synthetase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0287	gij23619467				10	324	50033
130	s-adenosylmethionine synthetase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI1090w	gij23613740		1		13	565	44816
131	pyridoxine biosynthetic enzyme pdx1 homologue, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF1025c	gij23612291		1		8	402	32992
132	spermidine synthase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0301	gij6851056	1	1		3	161	36573
133	GTP-binding nuclear protein ran/tc4 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0183	gij436408				4	160	28190
134	tat-binding protein homolog - malaria parasite (Plasmodium falciparum)	PFL2345c	gij1078797				2	57	49513
135	nucleosome assembly protein 1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL0185c	gij23508734		1		5	140	41971
136	guanine nucleotide-binding protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0019	gij23612749				6	364	35664
137	UMP-CMP kinase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFA0555c	gij23613470	1			3	127	44216
138	nuclear transport factor 2, putative [P. falciparum 3D7]	PF14_0122	gij23509343				2	79	14162



Fortsetzung Tabelle 2									
139	S1/P1nuclease, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0385c	gij23613599	1	1		3	135	43467
140	proliferating cell nuclear antigen [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0328	gij23619540				8	380	30568
141	single-strand binding protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0435c	gij23613111	1			2	139	33839
142	pyruvate kinase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF1300w	gij23612346		1		28	969	55625
143	hexokinase [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF1155w	gij23612317		1		16	665	55226
144	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1110c	gij23508916				15	562	50801
145	protein kinase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0815w	gij3845284		1		2	87	60761
146	ethanolamine kinase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0257	gij23508448		1		13	621	49882
147	adenylate kinase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0086	gij23507890				9	425	27594
148	thymidylate kinase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL2465c	gij23497027				2	93	24675
149	casein kinase 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0377	gij23496302		1		5	261	37607
150	casein kinase II, alpha subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0096	gij23508291		1		6	209	39865
151	pyrroline carboxylate reductase [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.284	gij23619500		1		2	145	28360
152	vacuolar sorting protein 35, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0112	gij23508305		1		1	57	123389
153	snare protein homologue, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.135	gij23619197				2	103	24350
154	transketolase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0530w	gij23612190		1		8	345	75767
155	peptidase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0517	gij23509739		1		15	815	88447
156	m1-family aminopeptidase [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI1570c	gij23619056				2	76	125983
157	leucine aminopeptidase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0439	gij23509661		1		21	780	67778
158	organelle processing peptidase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI1625c	gij23613847				1	66	55699
159	signal peptidase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.167	gij23619255		1		2	59	21111
160	Ag15 [Plasmodium falciparum]	PFL1855w	gij5262956		1		4	125	14739
161	centrin, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0443	gij23509665				2	144	19299
162	sexual stage-specific protein precursor [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD0310w	gij23510051		1		1	58	16616
163	Serine hydroxymethyltransferase [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1720w	gij23496877		1		12	506	49749

Fortsetzung Tabelle 2									
164	malate:quinone oxidoreductase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0815w	gij23612248		1		5	230	59469
165	dihydrolipoamide acyltransferase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFC0170c	gij16805139		1		1	61	50958
166	proliferation-associated protein 2g4, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0261	gij23509483				5	249	42614
167	aspartate carbamoyltransferase [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.221	gij23619372	1			23	958	43224
168	ran binding protein 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD0950w	gij23510180		1		5	251	33176
169	translocation protein sec62, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0361	gij23509583		1		3	116	39062
170	oxoglutarate/malate translocator protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0031	gij23612776		1		9	318	35364
171	UbiE-like methyltransferase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0220w	gij3845127		1		2	87	41143
172	monosaccharide transporter, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0210c	gij3845125		1		1	56	56380
173	endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0098	gij23508293				23	863	39350
174	adenosine deaminase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0289	gij23495155				17	671	42438
175	PfSec61 [Plasmodium falciparum]	MAL13P1.231	gij3057044		1		6	224	52190
176	PfmpC [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL0110c	gij23508719		1		3	95	36777
177	PF70 protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0025	gij23507829		1	1	2	86	69808
178	branched-chain alpha keto-acid dehydrogenase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0070	gij23619063				1	56	49840
179	mitochondrial import receptor subunit tom40 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0825c	gij23612250		1		3	177	25827
180	cyclophilin (PFCYP19) [Plasmodium falciparum 3D7]	PFC0975c	gij11514610				5	194	18940
181	prenylated protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0515w	gij23613625				1	54	23327
182	DNAJ-like Sec63 homologue [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0099	gij23619134	1	1		8	260	75824
183	Heat shock protein 86 [Plasmodium falciparum]	PF07_0029	gij23508294		1		37	1606	86112
184	heat shock protein 101, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0175	gij23508366	1	1		45	2090	102810
185	heat shock protein hsp104 [Plasmodium falciparum]	PF08_0063	gij3661535		1		1	53	85203
186	homologue of human HSPC025 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0590c	gij23612202		1		5	259	78080
187	heat shock 70 kDa protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0351	gij23612827		1		28	1069	73868

Fortsetzung Tabelle 2									
188	chaperonin cpn60, mitochondrial precursor [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1545c	gij23496842	1			6	364	79555
189	co-chaperone GrpE, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0258	gij23508449				4	177	34464
190	small heat shock protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0021	gij23618982				4	194	25179
191	chaperonin, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0180	gij23619271	1			4	199	29045
192	proteasome subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0025	gij23509246				3	154	78332
193	proteasome precursor, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI1545c	gij23613831		1		5	214	32581
194	Proteasome subunit alpha type 1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0716	gij23497792				1	78	28819
195	20S proteasome beta subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0111	gij23507915				5	214	30577
196	26s proteasome subunit p55, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0174	gij23495039				6	237	55174
197	proteasome regulatory component, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.190	gij23619318		1		19	940	59029
198	26S proteasome regulatory subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0630w	gij23613648				7	397	44649
199	subunit of proteasome activator complex, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0370c	gij23613596				6	265	33105
200	proteasome beta-subunit [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL8P1.142	gij23612967				8	332	30852
201	proteasome subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.270	gij23619461				4	244	27211
202	proteasome subunit alpha, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL8P1.128	gij23612939		1		10	527	32406
203	proteasome component C8, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFC0745c	gij16805254		1		3	121	29270
204	proteasome subunit alpha type 5, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF07_0112	gij23612640		1		7	287	28370
205	proteasome subunit beta type 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0915c	gij23613205		1		10	523	29710
206	proteasome subunit alpha type 2, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0420c	gij23612167		1		13	647	26512
207	20S proteasome beta 4 subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0676	gij23497751				2	141	25248
208	beta3 proteasome subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFA0400c	gij23613439				2	105	23066
209	histone H4, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0061	gij23508257				8	297	11448
210	histone H2A variant, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFC0920w	gij16805290				8	297	16443
211	histone h3 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0865w	gij23612258				5	197	15404
212	histone H2B [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0062	gij23508258				1	80	13117

Fortsetzung Tabelle 2									
213	ribosomal phosphoprotein P0 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0313	gij23496238				3	186	34945
214	60S ribosomal subunit protein L4/L1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0350c	gij23613094				15	676	46183
215	60S ribosomal subunit protein L8, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0845c	gij23613191				3	175	27982
216	60S ribosomal protein L7, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P2.29	gij23957737				11	354	30504
217	60S ribosomal protein L13, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0075	gij23612876				11	358	25425
218	60S ribosomal subunit protein L6e, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0213	gij23619319				12	451	25516
219	60S ribosomal protein L19, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL6P1.281	gij23612225				3	137	23394
220	60S ribosomal subunit protein L18, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0224	gij23619344				11	447	21733
221	60S ribosomal protein L24, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0049	gij23619029				3	132	19233
222	60S ribosomal protein L12, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0850c	gij23613192				2	117	17143
223	60S ribosomal protein L11a, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF07_0079	gij23612566				2	58	20215
224	60S ribosomal protein L27a, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL6P1.244	gij23612262				7	258	16712
225	60S acidic ribosomal protein p1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0043	gij23508239				3	59	13006
226	60S Acidic ribosomal protein P2 [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P3.19	gij16805185				1	89	11941
227	60S Ribosomal protein L36, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0106	gij23508299				3	98	15433
228	60S ribosomal subunit protein L31, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0185c	gij23613061				1	60	14056
229	60S ribosomal protein L23, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0171	gij23619260				3	100	14983
230	40S ribosomal subunit protein S6, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0228	gij23619351				7	328	35363
231	40S ribosomal protein S3A, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P7.35	gij16805310				4	131	30028
232	40S ribosomal protein S7 homologue, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0014	gij23618965				6	183	22467
233	40S ribosomal protein S11, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P6.14	gij16805260				2	95	18748
234	40S ribosomal protein S12, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P2.28	gij16805164				1	89	15387
235	40S ribosomal protein S15, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.92	gij23619124				1	75	17029
236	40S ribosomal subunit protein S14, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0810c	gij23613184				3	151	16067

Fortsetzung Tabelle 2									
237	40S ribosomal protein S23, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P2.27	gij16805163				3	127	16120
238	40S ribosomal protein S16, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0076	gij23612877				2	96	16275
239	40S ribosomal protein S13 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0316	gij23619516				2	69	17240
240	40S ribosomal protein S10, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF07_0080	gij23612567				4	162	16468
241	40S ribosomal subunit protein S24, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0975c	gij23613217				2	99	15382
242	ribosomal protein S2, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0448	gij23509670				2	76	29939
243	ribosomal protein S3, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0627	gij23497701				10	470	24652
244	ribosomal protein S4, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0065	gij23508261				15	652	32334
245	ribosomal protein S8e, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0083	gij23509304				2	104	25035
246	ribosomal protein S18, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0272	gij23496197				2	82	17880
247	ribosomal protein S19s, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD1055w	gij23510203				3	132	19710
248	ribosomal protein S25, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0205	gij23509427				1	51	15731
249	ribosomal protein L1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0391	gij23509613				13	495	24790
250	ribosomal protein L3, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0272	gij23495138				7	335	44193
251	Ribosomal protein family L5, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0230	gij23509452				3	174	33977
252	ribosomal protein L6 homologue, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0129	gij23619181				6	246	21588
253	ribosomal protein L7a, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0231	gij23509453				2	80	32560
254	ribosomal protein L10, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0141	gij23509362				3	111	25200
255	ribosomal protein L13, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0043	gij23507847				2	86	23739
256	ribosomal protein L14, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0296	gij23509518				4	170	19285
257	ribosomal protein L15, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD0745c	gij23510143				6	279	25906
258	ribosomal protein L17, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0268	gij23619437				2	74	23400
259	ribosomal protein L27, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0579	gij23497652				3	158	13786
260	ribosomal protein L32, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0190w	gij23613560				3	105	15517
261	ribosomal protein L38e [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0312	gij23496237				2	80	10307

Fortsetzung Tabelle 2									
262	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL13P1.308	gij23619539				3	211	290837
263	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF11_0168	gij23508359				2	62	344706
264	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFL1835w	gij23496901	1	1		3	161	140854
265	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0543	gij23497616	1	7+1		3	115	46873
266	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF11_0179	gij23508370	1	2+1		1	53	15253
267	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0344	gij23509566	1			4	247	112340
268	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF08_0137	gij23612996	1	1		4	158	146979
269	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0593	gij23497667	1	3		5	148	161117
270	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF11_0246	gij23508437	1	2		3	141	153603
271	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFB0640c	gij23503401				2	88	165384
272	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF11_0506	gij23496419		1		1	58	66258
273	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFL1415w	gij23508977	1	1		16	671	117409
274	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL8P1.73	gij23499117				5	197	147979
275	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFI0490c	gij23613620	1			3	141	138937
276	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL13P1.83	gij23619106				4	108	142906
277	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0094	gij23509315	1	1		1	50	92691
278	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0201	gij23509422	1	1		2	128	112505
279	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFD0080c	gij23510008	1			6	248	60233
280	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF13_0116	gij23619149	1			5	213	149085
281	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF11_0191	gij23508382				3	152	69347
282	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFI1445w	gij23613811	1			3	133	160993
283	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL1P1.31	gij23613400				1	73	92677
284	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0186	gij23509407	1			4	177	69935
285	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0191	gij23509412				3	133	59656
286	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL1P1.29	gij23613398				2	108	67760
287	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0350	gij23509572	1	1		1	75	64615
288	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF10_0130	gij23494995	1	1		6	300	75420

Fortsetzung Tabelle 2									
289	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL7P1.119	gij23612592	1	1		14	509	87825
290	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL1P1.33	gij23613401				2	90	53593
291	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL6P1.254	gij23612252				1	75	52948
292	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFD1015w	gij23510200	1	1		1	58	44902
293	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL6P1.86	gij23612165		2		8	478	232952
294	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF11_0055	gij23508251	1			15	740	49235
295	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFE0060w	gij23613036	1	2	1	6	295	48690
296	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF13_0032	gij23618999	1			4	191	56775
297	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF10_0323	gij23495190	1	1		3	139	38902
298	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF11_0197	gij23508388	1			3	136	42965
299	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFI0605c	gij23613643	1	1		3	134	52671
300	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL13P1.237	gij23619399				2	120	42133
301	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFD0880w	gij23510166	1			3	107	50998
302	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFE1285w	gij23613279				2	95	34319
303	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL8P1.95	gij23612884				3	184	37477
304	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFL0280c	gij23508753				3	130	38994
305	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFD0240c	gij23510037	1			3	106	43061
306	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0257	gij23509479				3	85	32986
307	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0509	gij23509731				2	51	208094
308	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0105	gij23509326	1			9	478	39806
309	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFL2505c	gij23497033	1	3		11	376	262988
310	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL8P1.62	gij23612820				7	350	32145
311	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0586	gij23497659				7	333	36916
312	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFB0194w	gij23503357	1			5	249	33393
313	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFL1705w	gij23496874				1	49	194556
314	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF08_0008	gij23612729	1	1		3	180	85197
315	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0714	gij23497790	1	5		1	56	46159

Fortsetzung Tabelle 2									
316	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFE0395c	gij23613103	1	1		5	251	40561
317	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFI0895c	gij23613701				5	243	36797
318	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL3P8.15	gij16805122			1	3	147	37366
319	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFD0670c	gij23510121		1		2	116	38996
320	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0567	gij23497640		1		8	350	40043
321	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFL1270w	gij23508948				8	273	33247
322	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF10_0039	gij23507843				3	137	32634
323	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF11_0287	gij23496212				2	120	33097
324	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0069	gij23509290				3	108	22688
325	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF10_0028	gij23507832				3	76	30033
326	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF11_0281	gij23496206				6	307	29334
327	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFD0720w	gij23510132		1		3	216	39647
328	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL8P1.66	gij23612830				2	112	28392
329	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFD0825c	gij23510159				3	66	31156
330	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF10_0325	gij23495192				6	319	32821
331	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL6P1.71	gij23612150	1			7	278	34481
332	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF10_0068	gij23507872				6	172	29512
333	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL13P1.233	gij23619387				4	164	24969
334	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0044	gij23509265	1			2	138	33330
335	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL8P1.121	gij23612930				2	132	31172
336	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF10_0220	gij23495085				3	116	32997
337	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF08_0064	gij23612853				2	91	24812
338	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFL2245w	gij23496982	1	1		2	87	30604
339	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0098	gij23509319				2	67	34930
340	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFE1505w	gij23613320		1		1	58	26674
341	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF11_0069	gij23508265	1	1		11	426	32055
342	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF13_0275	gij23619453		2	1	6	189	32763



Fortsetzung Tabelle 2									
343	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL13P1.299	gij23619523	1	2		4	168	29624
344	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF07_0087	gij23612582	1	1		1	65	29231
345	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFE0050w	gij23613034		1	1	6	271	30696
346	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFI1270w	gij23613776	1			8	255	24683
347	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF10_0023	gij23507827		3	1	2	82	32117
348	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFI1770w	gij23613876			1	2	74	34887
349	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFL1825w	gij23496899	1	3		1	70	23644
350	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF10_0104	gij23507908	1			1	65	25662
351	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL13P1.61	gij23619070	1	2	1	6	241	28237
352	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0329	gij23509551				5	80	28854
353	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFA0670c	gij23613491	1	2	1	4	164	28216
354	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFB0395w	gij3845173	1	1		2	124	28146
355	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL3P6.7	gij16805251				2	121	26024
356	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF13_0276	gij23619454				5	167	15839
357	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF07_0007	gij23612428		1		3	139	14186
358	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	MAL6P1.22	gij23612101		1		2	119	14716
359	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF10_0063	gij23507867				2	61	11969
360	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PFI1740c	gij23613870	1	1		1	53	13284
361	hypothetical protein [Plasmodium falciparum]	PF10_0372	gij23495239	1	1		2	90	13831

Tabelle 3: Identifizierte plasmodiale Proteine aus LC-MS/MS Präp-2

## Teil A: Überstand

Protein Nr.	Identifiziertes Protein	Genort	Zugangsnr. (GI)	SP	TM	PEXEL / VTS	ident. Fragm.	Signifikanz	Masse [Da]
1	cysteine protease, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0340c	gij16804967				34	1664	111698
2	L-lactate dehydrogenase [Plasmodium falciparum]	PF13_0141	gij76563843	1			3	189	34100
3	adenosine deaminase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0289	gij23495155				3	174	42438

Fortsetzung Tabelle 3; Teil A									
4	pyruvate kinase [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF1300w	gi 86171639				1	95	55625
5	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0598	gi 23497672				9	375	36612
6	enolase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0155	gi 23495020				4	335	48647
7	S-antigen [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0343	gi 23495210	1			4	135	62910
8	glycophorin-binding protein 130 precursor [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0159	gi 23495024		1		3	161	8503
9	101 kd malaria antigen; MSP 9 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1385c	gi 23508971	1			44	2083	86568
10	hypoxanthine phosphoribosyltransferase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0121	gi 23494985				3	137	26346
11	Phosphoglycerate kinase [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI1105w	gi 23613743				2	111	45398
12	DNA repair protein RAD23, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0114	gi 23494978				4	187	44367
13	disulfide isomerase precursor, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL8P1.17	gi 23612738	1			9	541	55466
14	Serine hydroxymethyltransferase [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1720w	gi 23509038				15	705	49749
15	ornithine aminotransferase [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0435w	gi 86170756				7	374	46025
16	14-3-3 protein homologue, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL8P1.69	gi 23612834				3	104	29457
17	NADP-specific glutamate dehydrogenase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0164	gi 23497229				2	90	52513
18	pyridoxine biosynthetic enzyme [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF1025c	gi 86171362				13	616	32992
19	ran binding protein 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD0950w	gi 23510180				9	451	33176
20	fructose-bisphosphate aldolase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0425	gi 23497496				8	404	39246
21	merozoite surface protein 3 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0345	gi 23495212	1			1	61	40096

Fortsetzung Tabelle 3; Teil A									
22	phosphoglycerate mutase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0208	gi 23508399				7	242	28752
23	endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0098	gi 23508293	1			28	1201	39350
24	40S ribosomal protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0264	gi 23495130				7	364	29837
25	1-cys peroxidoxin [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0131	gi 23612983				5	159	25148
26	HAP protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0078	gi 23497142		1		14	689	51661
27	early transcribed membrane protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE1590w	gi 23613334	1	1		4	245	19018
28	casein kinase II, alpha subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0096	gi 23508291				2	120	39865
29	plasmepsin 2 precursor [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0077	gi 23497141		1		1	83	51448
30	rhopty associated membrane antigen [Plasmodium falciparum]	MAL7P1.208	gi 37220738				1	77	103635
31	m1-family aminopeptidase [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.56	gi 23619056		1		5	265	125983
32	Nucleosome assembly protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0930c	gi 23613708				12	503	31807
33	cyclophilin (PFCYP19) [Plasmodium falciparum 3D7]	PFC0975c	gi 16805301				7	375	18940
34	nascent polypeptide associated complex subunit alpha [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF1050w	gi 86171390				8	322	20610
35	Ribosomal protein family L5, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0230	gi 23497297				3	154	33977
36	co-chaperone GrpE, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0258	gi 23508449				2	152	34464
37	merozoite surface protein 7 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0197	gi 23619291	1			12	591	41251
38	ribosomal protein S2, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0448	gi 23497519				3	129	29939
39	falcipain-2 precursor, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0161	gi 23508352		1		3	110	55768
40	proteasome subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.270	gi 23619461				3	166	27211

Fortsetzung Tabelle 3; Teil A									
41	actin depolymerizing factor, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0165w	gi 23613057				1	102	13732
42	gametocytogenesis onset-specific protein [Plasmodium falciparum]	PF13_0011	gi 160295				2	88	25988
43	hydroxyacyl glutathione hydrolase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD0311w	gi 23510053				2	83	31609
44	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0576	gi 23497649				2	27	24118
45	ribosomal protein S4, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0065	gi 23508261	1			1	61	32334
46	vacuolar ATP synthase subunit E, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11670c	gi 23613856				2	108	25604
47	GTP-binding nuclear protein ran/tc4 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0183	gi 23508374				2	95	24860
48	proteasome component C8, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P6.31	gi 16805254				4	91	29270
49	exported protein 2 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0678	gi 23497753	1			16	551	33391
50	histamine-releasing factor, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0545c	gi 23613132				2	113	19967
51	proteasome regulatory protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P6.16	gi 16805262				1	59	26450
52	proteasome subunit alpha type 2 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0420c	gi 86170740				7	373	26512
53	60S ribosomal subunit protein L6e, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0213	gi 23619319				3	226	25516
54	glutaredoxin, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFC0271c	gi 23957733				1	73	12410
55	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0164	gi 23508355	1			8	466	21717
56	tubulin-specific chaperone a, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL1P2.21	gi 23613451				10	386	19578
57	eukaryotic initiation factor 5a, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL0210c	gi 23508739				8	265	17620
58	60S ribosomal protein L12, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0850c	gi 23613192				5	244	17143

Fortsetzung Tabelle 3; Teil A									
59	Skp1 family protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.337	gi 23619591				4	201	20023
60	centrin, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL1P1.61	gi 23613428				3	148	19587
61	40S ribosomal protein S12, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P2.28	gi 16805164				2	125	15387
62	macrophage migration inhibitory factor homolog, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1420w	gi 23508978				2	81	12836
63	ubiquitin conjugating enzyme, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0740c	gi 23613670				2	67	18178
64	ubiquitin/ribosomal fusion protein uba52 homologue, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0346	gi 23619579				2	122	14608
65	ribosomal protein S28e, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0585	gi 23497658				2	144	7489
66	u6 snRNA-associated sm-like protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0142	gi 23619200				3	104	8838
67	tim10 homolog, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL0430w	gi 23508783				2	96	8531
68	2-Cys peroxiredoxin [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0368	gi 23497438				6	344	21793
69	4-methyl-5(B-hydroxyethyl)-thiazol monophosphate biosynthesis enzyme [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF1335c	gi 86171677				5	325	20280
70	Fe-superoxide dismutase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0071	gi 23612866				8	238	22719
71	glutathione s-transferase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0187	gi 23497253				2	140	24774
72	beta3 proteasome subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL1P2.08	gi 23613439				2	127	23066
73	Elongation factor 1 (EF-1); putative [P. falciparum 3D7]	MAL3P7.3	gi 23957766				2	87	17695
74	20S proteasome beta 4 subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0676	gi 23497751				1	68	25248

## Teil B: Sediment

Protein Nr.	Identifiziertes Protein	Genort	Zugangsnr. (GI)	SP	TM	PEXEL / VTS	ident. Fragm.	Signifikanz	Masse [Da]
1	Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA); PfEMP2 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0040c	gi 23613032		1	1	87	3906	168186
2	erythrocyte membrane protein 3 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0095c	gi 16804919	1			2	117	193062
3	merozoite surface protein 1, precursor [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI1475w	gi 23613817	1	1		33	1652	195605
4	asparagine-rich antigen [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0111	gi 23508304				7	348	173819
5	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0598	gi 23497672				6	291	36612
6	antigen 332, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0507	gi 23508683				3	132	620798
7	knob associated histidine-rich protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0100c	gi 16804920	1		1	8	387	71259
8	liver stage antigen-3 [Plasmodium falciparum]	PFB0915w	gi 6688933		1		1	54	62512
9	Protein phosphatase 2C [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0396	gi 23508586				4	203	104990
10	pyruvate kinase [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF1300w	gi 86171639				1	112	55625
11	ornithine aminotransferase [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0435w	gi 86170756				4	184	46074
12	falcilysin [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0322	gi 23619529				2	148	138776
13	cysteine protease, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0340c	gi 16804967				4	153	111698
14	vacuolar sorting protein 35, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0112	gi 23508305				1	58	123389
15	ubiquitin-activating enzyme e1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1245w	gi 23508943				2	53	131695
16	minichromosome maintenance protein 3, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE1345c	gi 23613291				2	77	109729
17	papain family cysteine protease, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0135c	gi 23613549	1			7	462	105477

Fortsetzung Tabelle 3; Teil B

18	polyadenylate-binding protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1170w	gi 23508928				2	104	97169
19	m1-family aminopeptidase [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.56	gi 23619056		1		7	347	125983
20	glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0511	gi 23497583				3	82	106919
21	Cg4 protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF07_0033	gi 23612471				1	78	97872
22	2-oxoglutarate dehydrogenase e1 component, mitochondrial precursor, putative [Plasmodium falciparum]	PF08_0045	gi 23612809				1	61	121073
23	101 kd malaria antigen, ABRA [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1385c	gi 23508971	1			62	2482	86569
24	tryptophan/threonine-rich antigen [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0003	gi 23612717		1	1	4	258	80466
25	endoplasmic homolog precursor, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1070c	gi 23508908	1			22	1387	94959
26	PF70 protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0025	gi 23494888		1	1	1	63	69808
27	merozoite surface protein 10 [Plasmodium falciparum]	PFF0995c	gi 28822127	1	1		1	61	61211
28	phosphoethanolamine N-methyltransferase [Plasmodium falciparum]	MAL13P1.214	gi 38018254				2	113	31024
29	glycophorin-binding protein 130 precursor [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0159	gi 23495024		1	1	4	156	5786
30	heat shock protein 101, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0175	gi 23508366	1			85	3646	102810
31	merozoite surface protein 2 precursor [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0300c	gi 16804959				1	100	27940
32	rhoptry-associated protein 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0102	gi 23497166	1			15	738	89996
33	glucose-6-phosphate isomerase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0341	gi 23497410				2	85	67325
34	26S protease subunit regulatory subunit 6a, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0314	gi 23508505				1	67	49510

Fortsetzung Tabelle 3; Teil B									
35	skeleton binding protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0065w	gi 23613037	1			2	113	36607
36	T-complex protein beta subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFC0285c	gi 23957736				1	66	59030
37	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1110c	gi 23508916				5	217	50801
38	leucine aminopeptidase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0439	gi 23497510				3	172	67778
39	rhoptry associated membrane antigen [Plasmodium falciparum]	MAL7P1.208	gi 37220738				2	105	103635
40	RNA helicase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0096	gi 23612911				5	292	108568
41	merozoite surface protein 6 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0346	gi 23495213				1	68	42250
42	eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0104	gi 23497168				1	63	51212
43	merozoite capping protein 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0268	gi 23495134				3	155	43903
44	adenylosuccinate synthetase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0287	gi 23619467				2	120	50033
45	disulfide isomerase precursor, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL8P1.17	gi 23612738	1			1	101	55466
46	early transcribed membrane protein 10.2 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0323	gi 8247330	1	1		2	142	17145
47	u1 small nuclear ribonucleoprotein a, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.35	gi 23619006				1	60	52476
48	clustered-asparagine-rich protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1745c	gi 23509043	1			1	53	53205
49	proliferation-associated protein 2g4, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0261	gi 23497329				4	204	42614
50	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0520	gi 23497592				4	186	52960
51	Phosphoglycerate kinase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11105w	gi 23613743				3	137	45398



Fortsetzung Tabelle 3; Teil B									
52	HAP protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0078	gi 23497142		1		7	326	51661
53	nucleosome assembly protein 1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL0185c	gi 23508734				2	74	41971
54	conserved GTP-binding protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL7P1.122	gi 23612594				1	53	45164
55	splicing factor, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0865c	gi 23613195				1	64	31370
56	merozoite surface protein 3 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0345	gi 23495212	1			6	295	41139
57	membrane-associated histidine-rich protein [Plasmodium falciparum]	MAL13P1.413	gi 34305469		1		3	165	28930
58	Ser/Arg-rich splicing factor, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0160c	gi 23613056				2	95	37677
59	vacuolar ATP synthase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFA0300c	gi 23613419				2	77	45231
60	ATP synthase (C/AC39) subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0615	gi 23497689				1	61	44503
61	enolase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0155	gi 23495020				20	1108	48647
62	TatD-like deoxyribonuclease, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFA0580c	gi 23613475				3	150	51337
63	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11685w	gi 23613859				2	84	40171
64	ribosomal phosphoprotein P0 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0313	gi 23508504				14	800	34945
65	exported protein 2 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0678	gi 23497753	1			5	292	33391
66	early transcribed membrane protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE1590w	gi 23613334	1	1		5	261	19018
67	rhoptry-associated protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0075c	gi 23613039	1	1		3	124	46974
68	guanine nucleotide-binding protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0019	gi 23612749				1	60	35664

Fortsetzung Tabelle 3; Teil B									
69	dihydroorotase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0697	gi 23497772				1	56	41691
70	lysophospholipase-like protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF07_0040	gi 23612480				1	51	42331
71	casein kinase II, alpha subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0096	gi 23508291				11	429	39865
72	eukaryotic translation initiation factor 3 37.28 kDa subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL7P1.81	gi 23612540				3	178	37261
73	Nucleosome assembly protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0930c	gi 23613708				5	181	31807
74	eukaryotic translation initiation factor, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL8P1.83	gi 23612859				7	351	31005
75	adenosine deaminase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0289	gi 23495155				1	73	42438
76	fibrillarin, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0068	gi 23497132				2	64	34107
77	L-lactate dehydrogenase [Plasmodium falciparum]	PF13_0141	gi 76563843	1			8	444	34086
78	nascent polypeptide associated complex subunit alpha [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF1050w	gi 86171390				6	274	20610
79	MSP7-like protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.174	gi 23619289	1			5	268	32791
80	orotate phosphoribosyltransferase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0630c	gi 23613149				1	54	32985
81	UMP-CMP kinase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL1P2.40	gi 23613470		1		2	88	44216
82	prohibitin, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0006	gi 23612725	1			1	63	30539
83	eukaryotic translation initiation factor 2, beta, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0103	gi 23494967				4	191	25306
84	vesicle-associated membrane protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0377	gi 23497447				1	72	27669
85	14-3-3 protein homologue, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL8P1.69	gi 23612834				16	570	29457
86	hypoxanthine phosphoribosyltransferase [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0121	gi 23494985				3	133	26346

Fortsetzung Tabelle 3; Teil B										
87	adenylate kinase 2 [Plasmodium falciparum]	PF10_0086	gi 32394417					2	131	27594
88	plastidic co-chaperonin [Plasmodium falciparum]	PF13_0180	gi 63086964	1				1	66	29045
89	histamine-releasing factor, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0545c	gi 23613132					1	79	19967
90	uridine phosphorylase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0660c	gi 23613155					2	67	26841
91	2-Cys peroxiredoxin [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0368	gi 23497438					5	235	21793
92	putative Rab7 GTPase [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0155c	gi 13509187					2	142	23773
93	circumsporozoite-related antigen; EXP 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0224	gi 37777722	1	1			5	254	17285
94	ADP-ribosylation factor [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0203	gi 23495068					5	299	20899
95	basic transcription factor 3b, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0241	gi 23497309					6	269	19381
96	thioredoxin-related protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0272	gi 23619447	1	1			3	139	23972
97	small GTP-binding protein sar1 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD0810w	gi 23510151					2	120	22006
98	high mobility group protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL0145c	gi 23508726					8	325	11324
99	Ag15 [Plasmodium falciparum]	PFL1855w	gi 5262956					8	272	14739
100	integral membrane protein, conserved in P. falciparum [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD1120c	gi 23510216	1	1			4	173	14882
101	myosin a [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0233	gi 23619357					13	746	92219
102	tubulin beta chain, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0084	gi 23494948					9	528	49719
103	40S ribosomal protein S17, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL2055w	gi 23509103					5	184	16057
104	ribosomal protein S3, putative	MAL3P7.35	gi 23497701					18	762	24652
105	ribosomal protein S8e, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0083	gi 23497147					4	175	25035
106	60S ribosomal protein L7, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P2.29	gi 23957737					2	79	30504
107	ribosomal protein L1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0391	gi 23497461					1	52	24790

Fortsetzung Tabelle 3; Teil B										
108	60S ribosomal subunit protein L8, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0845c	gi 23613191					1	85	27982
109	ribosomal protein L10, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0141	gi 23497206					2	130	25200
110	ribosomal protein L17, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0268	gi 23619437					2	73	23400
111	ribosomal protein I15, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD0770d	gi 23510143					3	120	25906
112	ribosomal protein L13, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0043	gi 23494906					2	73	23400
113	60S ribosomal protein L19 [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0700c	gi 86171018	1				12	447	23394
114	40S ribosomal subunit protein S9, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE1005w	gi 23613223					4	162	22109
115	ribosomal protein S19s, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD1055w	gi 23510203					14	587	19710
116	40S ribosomal protein S11, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P6.14	gi 16805260					9	355	18748
117	ribosomal protein L9 homologue, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0129	gi 23619181					6	305	21588
118	60S ribosomal subunit porotein L18, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.20 9	gi 23619345					3	77	22226
119	60S ribosomal protein L24, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0049	gi 23619029					6	286	19232
120	40S ribosomal protein S7 homologue, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0014	gi 23618965					6	206	22467
121	40S ribosomal protein S5, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF07_0088	gi 23612587					4	174	21849
122	60S ribosomal protein L12, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0850c	gi 23613192					2	109	17143
123	ribosomal protein L14, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0296	gi 23497364					8	351	19285
124	ribosomal protein L38e [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0312	gi 23508503					3	81	10307
125	40S ribosomal protein S15A, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P6.30	gi 16805252					1	60	14864

Fortsetzung Tabelle 3; Teil B

126	ribosomal protein S20e, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0038	gi 23494901				11	510	29939
127	40S ribosomal subunit protein S24, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0975c	gi 23613217				2	79	15382
128	60S ribosomal subunit protein L31, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0185c	gi 23613061				2	78	13934
129	ribosomal protein L32, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI0190w	gi 23613560				2	69	15517
130	60S ribosomal protein L26, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P4.28	gi 16805215				2	52	14803
131	60S ribosomal protein L11a, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF07_0079	gi 23612566				5	174	20215
132	ribosomal protein L27, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0579	gi 23497652				2	90	13786
133	60S acidic ribosomal protein p1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0043	gi 23508239				2	69	15517
134	40S ribosomal protein S13 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0316	gi 23619516				2	86	17240
135	40S ribosomal protein S15, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.92	gi 23619124				3	202	17029
136	40S ribosomal subunit protein S14, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0810c	gi 23613184				6	274	16067
137	Ribosomal protein family L5, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0230	gi 23497297				22	765	33977
138	40S ribosomal subunit protein S6, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0228	gi 23619351				7	264	35363
139	ribosomal protein L7a, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0231	gi 23497298				1	81	32560
140	ribosomal protein L21e, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0240	gi 23497308				1	62	18783
141	60S ribosomal subunit protein L4/L1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0350c	gi 23613094				4	248	46183
142	heat shock protein 86 [Plasmodium falciparum]	PF07_0029	gi 2642495				1	68	86371
143	heat shock 40 kDa protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0595w	gi 16805018				6	304	37333
144	heat shock 70 kDa protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0054	gi 23612827				2	94	73868

Fortsetzung Tabelle 3; Teil B

145	DNAJ protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE1605w	gi 23613337		1		3	125	61048
146	chaperone protein J [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF1415c	gi 86171763		1		3	152	44641
147	p23-like protein [Plasmodium falciparum]	PF14_0510	gi 886764				1	62	21210
148	elongation factor 1 alpha [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0305	gi 23619492				7	353	48928
149	elongation factor 2 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0486	gi 23497558				3	199	93462
150	elongation factor 1-gamma, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0214	gi 23619320				1	76	50428
151	histone H3 [Plasmodium falciparum]	PFF0510w	gi 28192618				3	130	15437
152	histone H4, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0061	gi 23508257				5	240	11448
153	26s proteasome aaa-ATPase subunit Rpt3, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD0665c	gi 23510120				2	109	44639
154	26S proteasome regulatory subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10630w	gi 23613648				1	66	44649
155	proteasome regulatory subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.343	gi 23619601				3	134	39112
156	proteasome subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.270	gi 23619461				9	490	27930
157	20S proteasome beta subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0111	gi 23494975				2	130	30577
158	subunit of proteasome activator complex, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10370c	gi 23613596				4	326	33105
159	valine - tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0589	gi 23497663				1	65	127989
160	threonine -- tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0270	gi 23508461		1		4	168	119471
161	N2,N2-dimethylguanosine tRNA methyltransferase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0109	gi 23619139				2	76	94757
162	glycine -- tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0198	gi 23497264				3	196	103097
163	Methionine -- tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0340	gi 23495207				11	550	104102
164	Phenylalanine -- tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0051	gi 23508247				2	87	72455

Fortsetzung Tabelle 3; Teil B

165	aspartate--tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL1P1.20	gi 23613388				3	139	73403
166	tryptophan--tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0205	gi 23619307				3	112	73053
167	phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL1P2.25	gi 23613455				1	70	67678
168	cysteine -- tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0149	gi 23495014				1	88	69380
169	tyrosyl-tRNA synthetase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL8P1.125	gi 23612935				3	159	43425
170	methionine -- tRNA ligase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0401	gi 23497471				11	550	104102
171	RNA binding function, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11435w	gi 23613809				4	200	21991
172	RNA-binding protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11175c	gi 23613757				9	356	45115
173	DNA replication licensing factor mcm7 homologue, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	PF07_0023	gi 23612456				2	113	94178

### Teil C: Hypothetische Proteine

Protein Nr.	Identifiziertes Protein	Genort	Zugangsnr. (GI)	SP	TM	PEXEL / VTS	ident. Fragm.	Signifikanz	Masse [Da]
1	hypothetical protein PF11_0168 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0168	gi 23508359				3	136	344706
2	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0201	gi 23497267	1	1		9	392	112505
3	hypothetical protein PF10_0361 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0361	gi 23495228				1	56	192514
4	hypothetical protein PF11_0207 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0207	gi 23508398				5	250	116278
5	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0137	gi 23612996		1		3	155	146979
6	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL7P1.171	gi 23612672		1		1	60	24404
7	hypothetical protein PF11_0189 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0189	gi 23508380				2	74	173516
8	hypothetical protein PFB0640c [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0640c	gi 23593308				1	72	165384
9	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0020	gi 23612751				3	195	154522
10	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11735c	gi 23613869		1		2	79	82991
11	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0344	gi 23497413	1			4	275	112340

Fortsetzung Tabelle 3; Teil C

12	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0060w	gi 23613036	1	1		1	72	48690
13	hypothetical protein PFF0220w [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0220w	gi 86170539				1	51	334204
14	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0018	gi 23494881	1	1		1	67	107589
15	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0091	gi 23612901	1			2	108	143917
16	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.33 6	gi 23619590				11	486	78525
17	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0020	gi 23494883				6	225	88508
18	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P8.14	gi 16805121		1		3	146	93142
19	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD0080c	gi 23510008		1		1	89	60233
20	hypothetical protein PF14_0732 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0732	gi 23497808		1		3	151	68100
21	hypothetical protein, conserved [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0546	gi 23497619				1	84	75938
22	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0355	gi 23619599	1			1	55	135752
23	hypothetical protein PF11_0508 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0508	gi 23508684				2	75	51125
24	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL8P1.4	gi 23612716		1		1	67	54513
25	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0186	gi 23497252				5	184	69935
26	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0109	gi 23612936				2	125	55033
27	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0192	gi 23619286				1	79	75511
28	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0191	gi 23619284	1			1	57	54319
29	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0081	gi 23612882	1			2	52	65567
30	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE1600w	gi 23613336				4	193	60150
31	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL1P1.33	gi 23613401	1			5	250	53593
32	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0060	gi 23497123	1			2	105	56281
33	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0013	gi 23497076				2	89	59195
34	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0067	gi 23494931				1	76	41755
35	hypothetical protein PF14_0746 [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0746	gi 23497822				1	72	58898



Fortsetzung Tabelle 3; Teil C									
36	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF07_0008	gi 23612429		1		8	509	27656
37	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11780w	gi 23613878		1		3	106	45472
38	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11755c	gi 23613873		1		1	64	37566
39	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0142	gi 23508333				2	137	42680
40	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD0090c	gi 23510010		1		12	473	49713
41	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11525w	gi 23613827				1	74	34551
42	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0390	gi 23497460				1	58	26291
43	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0105	gi 23497169	1			6	295	39806
44	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0336	gi 23497405				4	149	30461
45	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL8P1.62	gi 23612820				2	91	32145
46	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0586	gi 23497659				2	87	36916
47	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0166	gi 23508357				1	75	33861
48	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD0670c	gi 23510121		1		2	103	38996
49	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0008	gi 23612729	1	1		1	87	85197
50	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10895c	gi 23613701				2	86	36797
51	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0510	gi 23497582				2	58	30631
52	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0050w	gi 23613034		1		13	425	30696
53	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF14_0301	gi 23497370				7	397	33246
54	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0076	gi 23619074		1		3	161	36510
55	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF08_0074	gi 23612874				4	173	27242
56	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0028	gi 23494891				11	401	30033
57	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0490c	gi 16804997				4	195	32522
58	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL7P1.174	gi 23612675		1		3	135	37699
59	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P8.15	gi 16805122		1		2	100	37366

Fortsetzung Tabelle 3; Teil C

60	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0281	gi 23508472				5	290	29334
61	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0335c	gi 86170657	1			7	272	34481
62	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.23 3	gi 23619387				6	264	24969
63	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0325	gi 23495192				2	140	32821
64	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0099	gi 23619120				1	71	23178
65	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0220	gi 23495085				1	54	32997
66	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0275	gi 23619453		1		5	154	32763
67	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0068	gi 23494932				9	392	29512
68	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFD0115c	gi 23510014		1		3	120	31000
69	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0071	gi 23619064				3	117	66905
70	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF07_0007	gi 23612428		1		11	25	14186
71	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0075c	gi 16804915		1		1	75	29604
72	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11770w	gi 23613876				2	104	34887
73	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.61	gi 23619070	1	1		9	293	28237
74	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11270w	gi 23613776	1			2	59	24683
75	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.34 1	gi 23619597				1	55	25811
76	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL13P1.61	gi 23619070	1	1		2	102	28237
77	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0990w	gi 23613220				2	144	14931
78	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0106c	gi 23593263		1		3	139	33720
79	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10230c	gi 23613568	1			3	92	22515
80	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0323	gi 23495190	1	1		6	300	38902
81	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1825w	gi 23509059		1		9	448	23644
82	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFA0670c	gi 23613491		1		7	365	28216
83	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0511	gi 23508687				7	406	22898

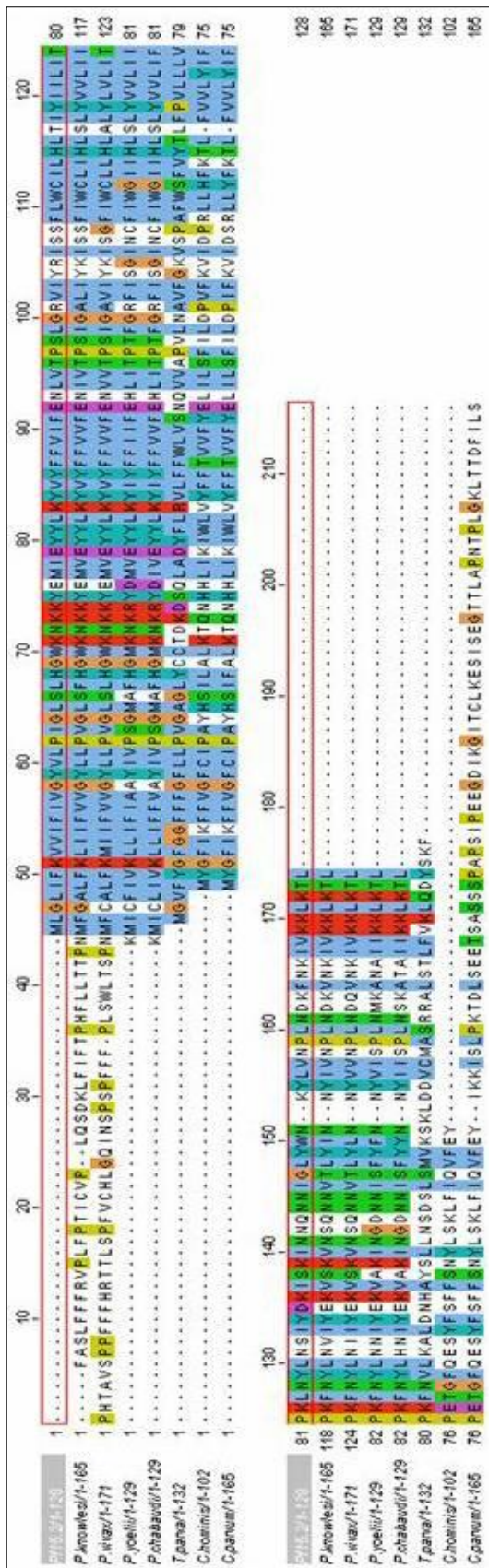
Fortsetzung Tabelle 3; Teil C									
84	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFA0680c	gi 23613493		1		6	323	21784
85	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFB0985c	gi 23593351		1		5	252	27045
86	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0060w	gi 86170378	1	1		5	235	27284
87	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL3P7.47	gi 16805321	1	1		3	207	26987
88	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL7P1.5	gi 23612420		1		3	152	27539
89	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL7P1.67	gi 23612512		1		3	125	23829
90	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF13_0276	gi 23619454		1		5	207	15839
91	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	MAL8P1.52	gi 23612802				3	117	14051
92	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFF0090w	gi 86170403		1		2	104	14716
93	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF11_0437	gi 23508626				1	61	14398
94	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFI1740c	gi 23613870		1		1	58	13284
95	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFL1415w	gi 23508977	1	1		11	494	117409
96	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PF10_0372	gi 23495239	1	1		1	54	13831
97	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	PFE0395c	gi 14289020	1	1		6	237	40913

**Tab. 1-3: Zusammenfassende Ergebnisse der massenspektrometrischen Identifizierung von Proteinen aus einem 2D-Gel (Tabelle 1) bzw. einem 1D-Gel (Tabellen 2 und 3).**

In **Tab. 1** ist die Numerierung der Proteinspots, wie sie Abb. 10 zu entnehmen ist. Zusätzlich ist die im entsprechenden Massenspektrum ermittelte Anzahl der Peptidfragmente verzeichnet, die durch die tryptische *In-gel*-Spaltung entstanden sind, sowie die Anzahl der in der Datenbank gefundenen Peptide, die der jeweiligen Aminosäuresequenz des identifizierten Proteins entsprechen (Treffer). Bei erfolgreicher Identifizierung sind die Bezeichnung des Proteins sowie die GI-Zugangsnummer und der zugehörige Genlocus. Außerdem ist die im Gel experimentell ermittelte Molekularmasse des untersuchten Proteins (Exp. MW) und die theoretische Molekularmasse des entsprechenden identifizierten Proteins (Theor. MW) in kDa, der experimentell ermittelte pI (Exp. pI) und der theoretisch berechnete pI (Theor. pI) (MS-Fit, Protein-Prospektor) sowie die sich aus den Treffern ergebene Sequenzabdeckung in Prozent (% Seq). Bei identifizierten Proteinen aus *P. falciparum* wurde Anzahl der vorhergesagten Signalpeptide (SP) und Transmembran-Domänen (TM) angegeben. In **Tab 2 und 3** sind die fortlaufenden Nummern der identifizierten Proteine aus Präp-1 bzw. Präp-2 angegeben, dies entspricht nicht der Reihenfolge der Identifikation. Es ist die Bezeichnung des Proteins, der Genlocus und seine GI-Zugangsnummer angegeben. Bei identifizierten Proteinen aus *P. falciparum* wurde Anzahl der vorhergesagten Signalpeptide (SP) und Transmembran-Domänen (TM) sowie *vacuolar translocation signal/plasmodium export element* (VTS/PEXEL) angegeben. Zusätzlich ist die Anzahl der sequenzierten Peptide, der Signifikanzwert für die eindeutige Identifikation sowie die theoretische molekulare Masse in Dalton angegeben.

Es auf die ermittelten Daten von Florens *et al.* (Florens *et al.*, 2002) sowie die Datenbank PlasmoDB ([www.PlasmoDB.org](http://www.PlasmoDB.org); Bahl *et al.*, 2003) zurückgegriffen bzw. SignalP 2.0 (Nielsen *et al.*, 1997) und TMHMM (Krogh *et al.*, 2001) verwandt (n. b.: nicht bestimmt).

## 7.2 Vergleich der Proteinsequenzen aus der PSI-BLAST-Suche



### ◀ Abb. 64: Sequenzvergleich der Ergebnisse aus der PSI-BLAST-Suche nach Orthologen Proteinen zu Pf15.2

Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) erstellt.

Pf15.2 ist das von uns charakterisierte Protein. Bei den übrigen handelt es sich um Orthologe Proteine aus anderen Plasmodienspecies bzw. Apicomplexa.

### ▼ Abb. 65: Sequenzvergleich der Ergebnisse aus der PSI-BLAST-Suche nach Orthologen Proteinen zu Pf17.4.

Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) erstellt.

Pf15.3 ist das von uns charakterisierte Protein. Bei den übrigen handelt es sich um Orthologe Proteine aus anderen Plasmodienspecies.



51117_M1-590	1	MKLYRLLFFLLIFII	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
P.wax/1-980	1	MKLDYHLLLFTLLS	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
P.yoelli/1-736	1	MKRLIXVLEVFLEI	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
P.chabaudi/1-440														
51117_M1-590	124	KKLFKREQVIEKDIR	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
P.wax/1-980	86	RLLEPKEMESHVQ	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
P.yoelli/1-736	46	SILNN	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
P.chabaudi/1-440														
51117_M1-590	248	NTLLQMFESFKNF	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
P.wax/1-980	210	ATPKRSPDDREVEE	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
P.yoelli/1-736	155	IQINKGDNKLEK	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
P.chabaudi/1-440														
51117_M1-590	315	VNNLLLYNNSNST	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490
P.wax/1-980	334	SATQKHPNGEKKN	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490
P.yoelli/1-736	236	NNNNMITEKDEEN	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490
P.chabaudi/1-440	1		380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490
51117_M1-590	438	NNKDDONDDKKN	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610
P.wax/1-980	456	VGSNSDVIKGSSE	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610
P.yoelli/1-736	348	KKNIISNDIES	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610
P.chabaudi/1-440	66	KVCEKNSSIPN	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610
51117_M1-590	593	NI...NYSLLT	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740
P.wax/1-980	538	GEAEKVLSTHTE	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740
P.yoelli/1-736	398	DK...NLLSLL	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740
P.chabaudi/1-440	113	DE...NLSLLTE	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740
51117_M1-590	660	NINLLINESTEKE	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840	850	860
P.wax/1-980	657	SRYNLGGSFSAF	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840	850	860
P.yoelli/1-736	502	...DINLNDI	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840	850	860
P.chabaudi/1-440	211	...DNTLNTD	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840	850	860
51117_M1-590	786	SKKE...KTKF	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980
P.wax/1-980	781	PKSKSITGGEKQ	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980
P.yoelli/1-736	580	VNSN...IQNNAIN	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980
P.chabaudi/1-440	288	TN...IQNNAIN	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980
51117_M1-590	904	VYLSAFTNLI	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070				
P.wax/1-980	905	VYLSAFTNLI	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070				
P.yoelli/1-736	665	IYLSAFTNLI	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070				
P.chabaudi/1-440	366	IYLSAFTNLI	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070				



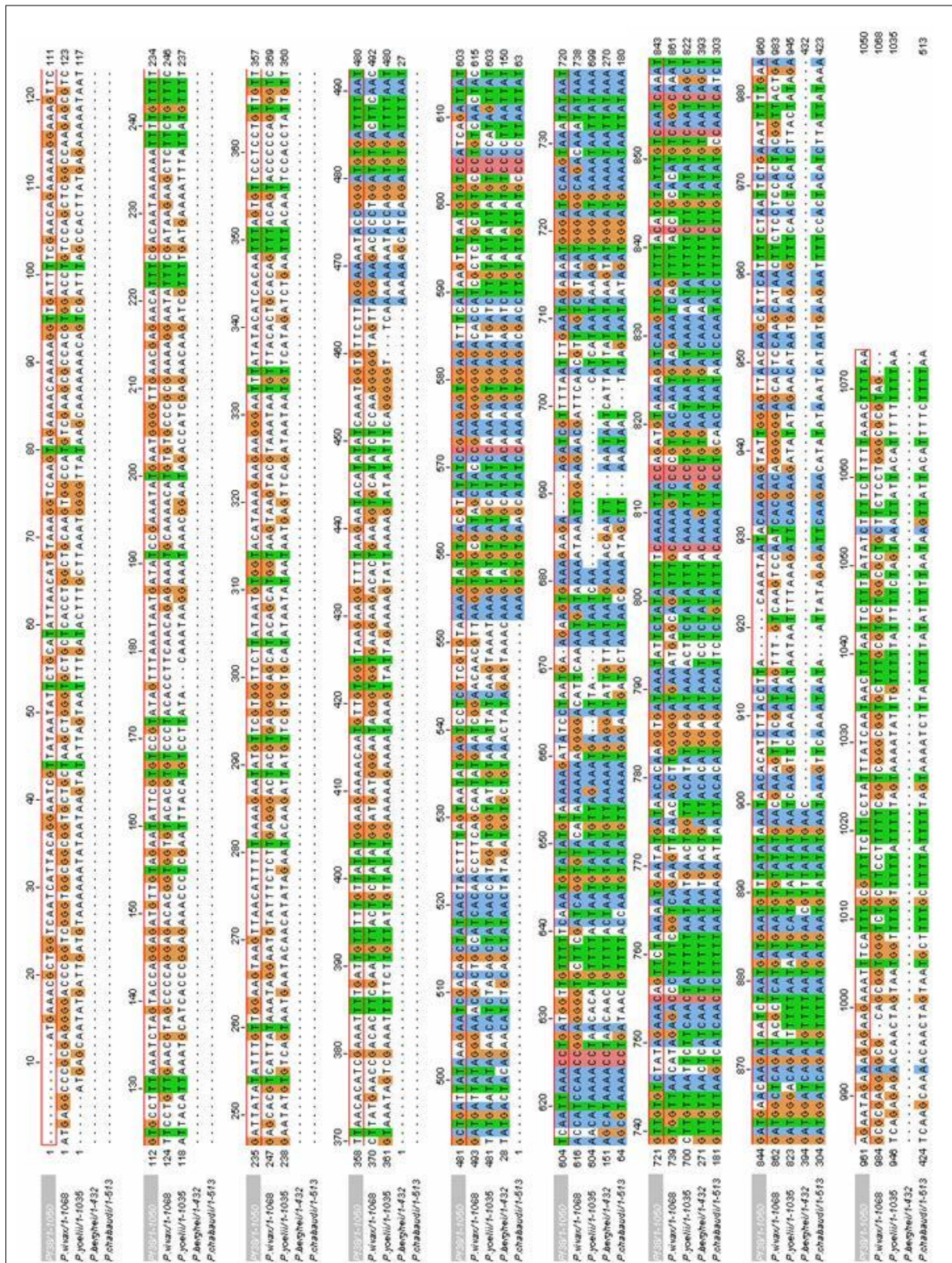


Abb. 66: Sequenzvergleich der Ergebnisse aus der PSI-BLAST-Suche nach Orthologen Proteinen zu *P.38*.

Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) erstellt.

*P.38* ist das von uns charakterisierte Protein. Bei den übrigen handelt es sich um Orthologe Proteine aus anderen Plasmodienspecies.





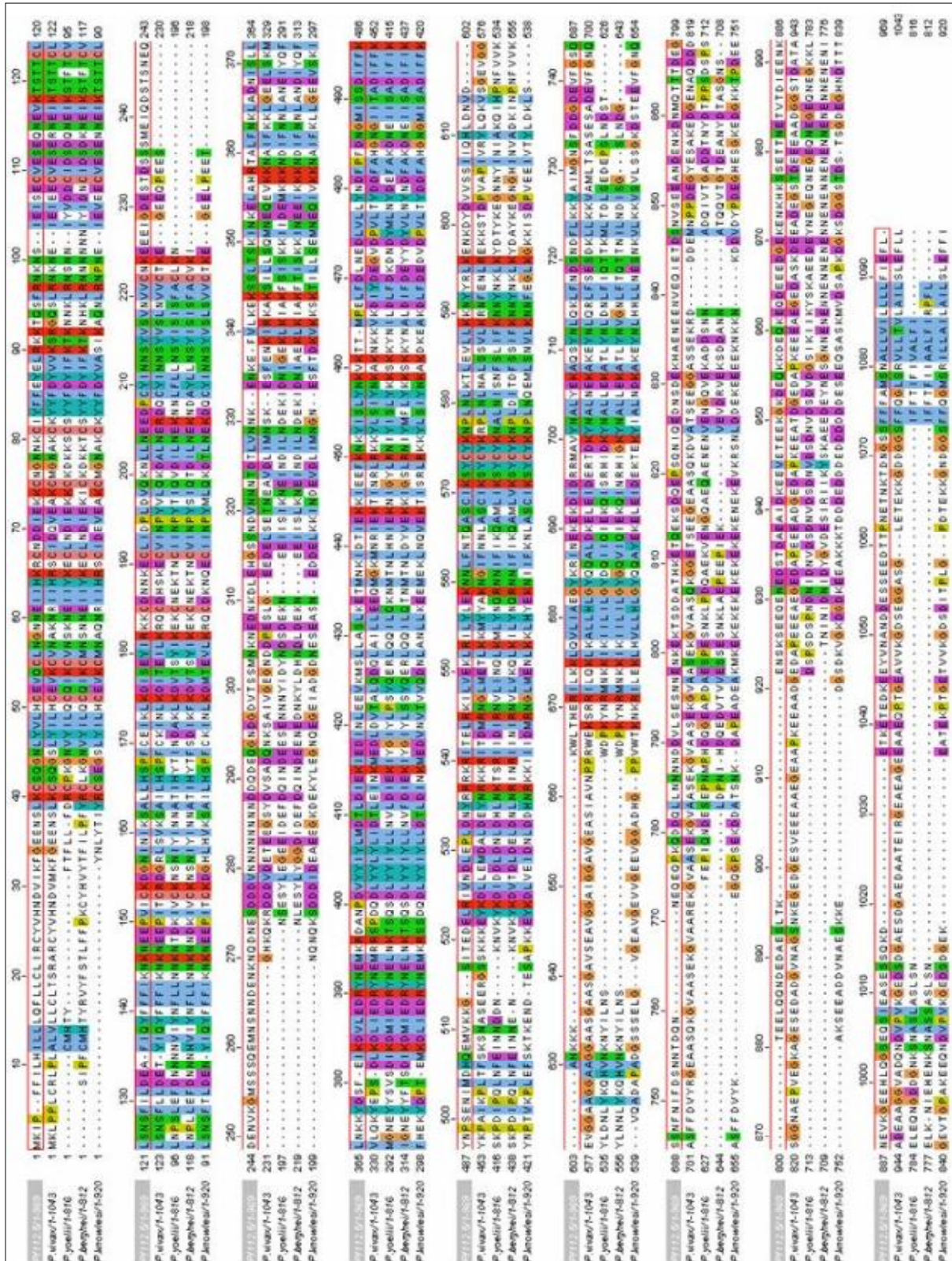


Abb. 68: Sequenzvergleich der Ergebnisse aus der PSI-BLAST-Suche nach Orthologen Proteinen zu *Pfl12.5*

Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) erstellt. *Pfl12.5* ist das von uns charakterisierte Protein. Bei den übrigen handelt es sich um Orthologe Proteine aus anderen Plasmodienspecies.



### 7.3 Ergebnisse der MASCOT-Suche für die fünf neu charakterisierten Proteine

9. <a href="#">gi 23508370</a> Mass: 15253 Total score: 162 Peptides matched: 3 hypothetical protein PF11_0179 [Plasmodium falciparum 3D7]								
<input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report								
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">116</a>	538.29	1074.56	1074.57	-0.01	0	47	1	YLVNPLNDK
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">201</a>	488.93	1463.75	1463.78	-0.02	1	26	1	YLVNPLNDKFNK
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">209</a>	795.91	1589.80	1589.79	0.00	0	88	1	INNQNIGLYWNK
78. <a href="#">gi 23508370</a> Mass: 15253 Total score: 53 Peptides matched: 1 hypothetical protein PF11_0179 [Plasmodium falciparum 3D7]								
<input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report								
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">281</a>	621.82	1241.62	1241.63	-0.01	0	53	1	LNYLNSIYDK

**Abb. 69: MASCOT-Suchergebnisse für Pf15.2**

gi|: Zugangsnummer NCBI-Datenbank; Mass: theoretische molekulare Masse; Total score: Signifikanzwert der Identifikation, Summe der Score-Werte für einzelne Peptide; Peptides matched: Anzahl der identifizierten Peptide; Query: Nummer des per MS/MS sequenzierten und analysierten Peptids; Observed: experimenteller m/z Wert ;Mr(expt): experimenteller m/z Wert bezogen auf die molekulare Masse des Peptides; Mr(calc): berechnete relative Masse des identifizierten Peptids; Delta: mit einbezogene Massenungenauigkeit; Miss: Anzahl mit einbezogener fehlerhafter Trypsinisierungen; Score: Signifikanzwert für das einzelne Peptid (muss > 49 sein); Rank: Rang mit dem das jeweilige Peptid für das identifizierte Protein zutrifft; Peptide: identifiziertes Peptid

Die in einer Bande identifizierten Proteine werden fortlaufend durchnummeriert, dies ist durch die Ziffer vor der Zugangsnummer angegeben.

Peptide mit Rank = 1 sind rot markiert, bei Rank = 2 oder höher wird die Beschriftung schwarz

8. [gi|23508977](#) Mass: 117409 Total score: 671 Peptides matched: 16  
hypothetical protein PFL1415w [Plasmodium falciparum 3D7]  
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 26	418.73	835.44	835.44	-0.00	0	48	1	NFLIDSK
<input type="checkbox"/> 36	430.23	858.44	858.44	-0.00	0	15	4	NEQVIEK
<input checked="" type="checkbox"/> 57	445.27	888.53	888.54	-0.01	0	22	1	GFVLNLVK
<input checked="" type="checkbox"/> 139	504.23	1006.44	1006.44	0.00	0	50	1	FSSDYFNK
<input checked="" type="checkbox"/> 140	504.27	1006.53	1006.53	0.00	0	33	1	WLDIFWK
<input checked="" type="checkbox"/> 192	556.81	1111.61	1111.60	0.01	0	24	1	SLPEAFHLAK
<input checked="" type="checkbox"/> 286	632.79	1263.57	1263.57	-0.00	0	28	1	NFIQDEQQDK
<input checked="" type="checkbox"/> 287	633.78	1265.55	1265.55	0.01	0	50	1	ESYLSFDDYK
<input checked="" type="checkbox"/> 288	422.87	1265.59	1265.59	0.00	1	36	1	SFREGDNVVK
<input checked="" type="checkbox"/> 291	636.79	1271.56	1271.56	0.00	0	27	1	DDTILYMEEK + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 293	637.34	1272.66	1272.65	0.01	0	46	1	NTNYLFLNFK
<input checked="" type="checkbox"/> 358	716.35	1430.69	1430.69	0.00	0	85	1	NINNNINIMLNK + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 381	498.90	1493.66	1493.67	-0.01	1	22	1	QKDEYVNDNNIK
<input checked="" type="checkbox"/> 382	501.60	1501.79	1501.80	-0.01	1	39	1	LLLTLSQNDDKDK
<input checked="" type="checkbox"/> 421	825.93	1649.85	1649.86	-0.01	0	105	1	NVDNINYSLLLTSGK
<input checked="" type="checkbox"/> 456	810.39	2428.15	2428.15	0.01	0	45	1	NNLLNDNINNLINENNESTEK

12. [gi|23508977](#) Mass: 117409 Score: 494 Peptides matched: 11  
hypothetical protein PFL1415w [Plasmodium falciparum 3D7]  
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 30	445.27	888.52	888.54	-0.02	0	21	74	1	GFVLNLVK
<input checked="" type="checkbox"/> 105	556.80	1111.58	1111.60	-0.02	0	40	0.77	1	SLPEAFHLAK
<input checked="" type="checkbox"/> 132	591.77	1181.53	1181.56	-0.02	0	40	0.65	1	FNIFMYFGK + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 163	637.32	1272.63	1272.65	-0.02	0	46	0.2	1	NTNYLFLNFK
<input checked="" type="checkbox"/> 172	433.23	1296.67	1296.70	-0.04	1	34	3.2	1	HTNLIKDDITK
<input checked="" type="checkbox"/> 232	724.35	1446.69	1446.71	-0.02	0	77	0.00016	1	VGMQDIVNNISNK + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 281	528.92	1583.75	1583.79	-0.04	0	32	5.1	1	ETNENINVHPLIK
<input checked="" type="checkbox"/> 286	825.93	1649.84	1649.86	-0.02	0	100	7.6e-007	1	NVDNINYSLLLTSGK
<input checked="" type="checkbox"/> 309	582.32	1743.94	1743.94	-0.00	2	47	0.16	1	LLLTLSQNDDKDKK
<input type="checkbox"/> 326	596.28	1785.83	1785.87	-0.04	1	6	2.3e+003	8	FSFLNYWNDKDIK
<input checked="" type="checkbox"/> 406	796.03	2385.08	2385.13	-0.05	0	55	0.021	1	MNDNTERNTNLLQNFLSPIK + Oxidation (M)

### Abb. 70: MASCOT-Suchergebnisse für Pf17.4

gi|: Zugangsnummer NCBI-Datenbank; Mass: theoretische molekulare Masse; Total score: Signifikanzwert der Identifikation, Summe der Score-Werte für einzelne Peptide; Peptides matched: Anzahl der identifizierten Peptide; Query: Nummer des per MS/MS sequenzierten und analysierten Peptids; Observed: experimenteller m/z Wert; Mr(expt): experimenteller m/z Wert bezogen auf die molekulare Masse des Peptides; Mr(calc): berechnete relative Masse des identifizierten Peptids; Delta: mit einbezogene Massenungenauigkeit; Miss: Anzahl mit einbezogener fehlerhafter Trypsinisierungen; Score: Signifikanzwert für das einzelne Peptid (muss > 49 sein); Rank: Rang mit dem das jeweilige Peptid für das identifizierte Protein zutrifft; Peptide: identifiziertes Peptid

Die in einer Bande identifizierten Proteine werden fortlaufend durchnummeriert, dies ist durch die Ziffer vor der Zugangsnummer angegeben.

Peptide mit Rank = 1 sind rot markiert, bei Rank = 2 oder höher wird die Beschriftung schwarz

20.	<a href="#">gi 23613103</a>	Mass: 40561	Total score: 251	Peptides matched: 5					
hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]									
<input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report									
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">66</a>	452.23	902.46	902.46	-0.01	0	43	1	GSYNVVHK	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">228</a>	632.86	1263.70	1263.71	-0.01	0	40	1	YNVVSIVTLK	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">255</a>	676.81	1351.61	1351.62	-0.01	0	79	1	HSFSNSEIFER	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">372</a>	598.95	1793.82	1793.83	-0.02	1	43	1	MNMITQGDKYSIFSK + 2 Oxidation (M)	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">406</a>	758.39	2272.14	2272.15	-0.00	0	46	1	EEGNLYTSQFSVPPVVLTHR	
27.	<a href="#">gi 23613103</a>	Mass: 40561	Score: 237	Peptides matched: 6					
hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]									
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<a href="#">75</a>	504.79	1007.57	1007.59	-0.02	0	33	3.7	2	IHISNGVLR
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">166</a>	632.85	1263.69	1263.71	-0.02	0	47	0.15	1	YNVVSIVTLK
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">192</a>	451.53	1351.58	1351.62	-0.04	0	(43)	0.34	1	HSFSNSEIFER
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">193</a>	676.80	1351.59	1351.62	-0.02	0	79	9.1e-005	1	HSFSNSEIFER
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">248</a>	779.36	1556.70	1556.71	-0.02	0	50	0.068	1	ESTAITTFSNMSPR + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">329</a>	684.65	2050.93	2050.97	-0.04	2	27		15	YPNEEVKEEDRFNLNR

### ▲ ▼ Abb. 71: MASCOT-Suchergebnisse für Pf38 (▲) und Pf13.8 (▼)

gi: Zugangsnummer NCBI-Datenbank; Mass: theoretische molekulare Masse; Total score: Signifikanzwert der Identifikation, Summe der Score-Werte für einzelne Peptide; Peptides matched: Anzahl der identifizierten Peptide; Query: Nummer des per MS/MS sequenzierten und analysierten Peptids; Observed: experimenteller m/z Wert ;Mr(expt): experimenteller m/z Wert bezogen auf die molekulare Masse des Peptides; Mr(calc): berechnete relative Masse des identifizierten Peptids; Delta: mit einbezogene Massenungenauigkeit; Miss: Anzahl mit einbezogener fehlerhafter Trypsinisierungen; Score: Signifikanzwert für das einzelne Peptid (muss > 49 sein); Rank: Rang mit dem das jeweilige Peptid für das identifizierte Protein zutrifft; Peptide: identifiziertes Peptid

Die in einer Bande identifizierten Proteine werden fortlaufend durchnummeriert, dies ist durch die Ziffer vor der Zugangsnummer angegeben.

Peptide mit Rank = 1 sind rot markiert, bei Rank = 2 oder höher wird die Beschriftung schwarz

23.	<a href="#">gi 23495239</a>	Mass: 13831	Total score: 137	Peptides matched: 3					
hypothetical protein PF10_0372 [Plasmodium falciparum 3D7]									
<input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report									
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">15</a>	410.24	818.46	818.47	-0.01	0	53	1	LSMILSR	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">21</a>	419.72	837.42	837.43	-0.01	1	44	1	YGLKDSR	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">31</a>	436.72	871.42	871.45	-0.03	0	41	1	GSQIQPSR	
60.	<a href="#">gi 23495239</a>	Mass: 13831	Total score: 90	Peptides matched: 2					
hypothetical protein PF10_0372 [Plasmodium falciparum 3D7]									
<input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report									
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">27</a>	410.24	818.46	818.47	-0.01	0	47	1	LSMILSR	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">50</a>	436.73	871.44	871.45	-0.01	0	43	1	GSQIQPSR	
67.	<a href="#">gi 23495239</a>	Mass: 13831	Score: 54	Peptides matched: 1					
hypothetical protein PF10_0372 [Plasmodium falciparum 3D7]									
<input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report									
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">10</a>	419.72	837.43	837.43	-0.01	1	54	0.023	1	YGLKDSR



25.	<p>QL123497267 Mass: 112505 Score: 392 Peptides matched: 9                      hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]</p> <p><input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Query</th> <th>Observed</th> <th>Mr(expt)</th> <th>Mr(calc)</th> <th>Delta Miss Score</th> <th>Expect Rank</th> <th>Peptide</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>397.22</td> <td>792.42</td> <td>792.44</td> <td>-0.02</td> <td>1</td> <td>25 23 1 KIRKPK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>408.26</td> <td>814.90</td> <td>814.52</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>38 4.5 1 TLEVLK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>439.75</td> <td>877.48</td> <td>877.49</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>52 0.045 2 MSLLASLK + Oxidation (M)</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>439.76</td> <td>877.50</td> <td>877.49</td> <td>0.01</td> <td>0 (26)</td> <td>20 5 MSLLASLK + Oxidation (M)</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>450.74</td> <td>899.46</td> <td>899.48</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>35 2.9 1 YVSLDK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>510.24</td> <td>1019.47</td> <td>1018.49</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>67 0.0018 1 GSITDQELR</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>606.79</td> <td>1211.56</td> <td>1211.58</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>93 0.031 1 LPRSDHFLK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>607.35</td> <td>1211.69</td> <td>1212.71</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>99 1e-005 1 LADNISILLNK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>651</td> <td>1292.02</td> <td>1272.06</td> <td>2272.13</td> <td>-0.07</td> <td>1</td> <td>34 3 1 DTVVSSIIQLDLYDANRZ</td> </tr> </tbody> </table>	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide	<input checked="" type="checkbox"/>	397.22	792.42	792.44	-0.02	1	25 23 1 KIRKPK	<input checked="" type="checkbox"/>	408.26	814.90	814.52	-0.02	0	38 4.5 1 TLEVLK	<input checked="" type="checkbox"/>	439.75	877.48	877.49	-0.02	0	52 0.045 2 MSLLASLK + Oxidation (M)	<input checked="" type="checkbox"/>	439.76	877.50	877.49	0.01	0 (26)	20 5 MSLLASLK + Oxidation (M)	<input checked="" type="checkbox"/>	450.74	899.46	899.48	-0.02	0	35 2.9 1 YVSLDK	<input checked="" type="checkbox"/>	510.24	1019.47	1018.49	-0.02	0	67 0.0018 1 GSITDQELR	<input checked="" type="checkbox"/>	606.79	1211.56	1211.58	-0.02	0	93 0.031 1 LPRSDHFLK	<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1211.69	1212.71	-0.02	0	99 1e-005 1 LADNISILLNK	<input checked="" type="checkbox"/>	651	1292.02	1272.06	2272.13	-0.07	1	34 3 1 DTVVSSIIQLDLYDANRZ	<p>Mass: 112505 Score: 351 Peptides matched: 3                      hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]</p> <p><input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Query</th> <th>Observed</th> <th>Mr(expt)</th> <th>Mr(calc)</th> <th>Delta Miss Score</th> <th>Expect Rank</th> <th>Peptide</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>406.79</td> <td>1211.57</td> <td>1211.58</td> <td>-0.01</td> <td>0</td> <td>26 1 LPRSDHFLK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>607.35</td> <td>1212.69</td> <td>1212.71</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>92 4.2e-005 1 LADNISILLNK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>730.86</td> <td>1459.71</td> <td>1459.73</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>43 0.42 1 IYVDLDFLQYR</td> </tr> </tbody> </table> <p>Mass: 112505 Total score: 128 Peptides matched: 2                      hypothetical protein Pf4_0201 [Plasmodium falciparum 3D7]</p> <p><input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Query</th> <th>Observed</th> <th>Mr(expt)</th> <th>Mr(calc)</th> <th>Delta Miss Score</th> <th>Rank</th> <th>Peptide</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>406.81</td> <td>1211.60</td> <td>1211.58</td> <td>0.01</td> <td>0</td> <td>24 1 LPRSDHFLK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>607.36</td> <td>1212.71</td> <td>1212.71</td> <td>0.00</td> <td>0</td> <td>104 1 LADNISILLNK</td> </tr> </tbody> </table>	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide	<input checked="" type="checkbox"/>	406.79	1211.57	1211.58	-0.01	0	26 1 LPRSDHFLK	<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.02	0	92 4.2e-005 1 LADNISILLNK	<input checked="" type="checkbox"/>	730.86	1459.71	1459.73	-0.02	0	43 0.42 1 IYVDLDFLQYR	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Rank	Peptide	<input checked="" type="checkbox"/>	406.81	1211.60	1211.58	0.01	0	24 1 LPRSDHFLK	<input checked="" type="checkbox"/>	607.36	1212.71	1212.71	0.00	0	104 1 LADNISILLNK
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	397.22	792.42	792.44	-0.02	1	25 23 1 KIRKPK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	408.26	814.90	814.52	-0.02	0	38 4.5 1 TLEVLK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	439.75	877.48	877.49	-0.02	0	52 0.045 2 MSLLASLK + Oxidation (M)																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	439.76	877.50	877.49	0.01	0 (26)	20 5 MSLLASLK + Oxidation (M)																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	450.74	899.46	899.48	-0.02	0	35 2.9 1 YVSLDK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	510.24	1019.47	1018.49	-0.02	0	67 0.0018 1 GSITDQELR																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	606.79	1211.56	1211.58	-0.02	0	93 0.031 1 LPRSDHFLK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1211.69	1212.71	-0.02	0	99 1e-005 1 LADNISILLNK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	651	1292.02	1272.06	2272.13	-0.07	1	34 3 1 DTVVSSIIQLDLYDANRZ																																																																																																																			
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	406.79	1211.57	1211.58	-0.01	0	26 1 LPRSDHFLK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.02	0	92 4.2e-005 1 LADNISILLNK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	730.86	1459.71	1459.73	-0.02	0	43 0.42 1 IYVDLDFLQYR																																																																																																																				
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Rank	Peptide																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	406.81	1211.60	1211.58	0.01	0	24 1 LPRSDHFLK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	607.36	1212.71	1212.71	0.00	0	104 1 LADNISILLNK																																																																																																																				
14.	<p>QL123497267 Mass: 112505 Score: 419 Peptides matched: 8                      hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]</p> <p><input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Query</th> <th>Observed</th> <th>Mr(expt)</th> <th>Mr(calc)</th> <th>Delta Miss Score</th> <th>Expect Rank</th> <th>Peptide</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>408.26</td> <td>814.50</td> <td>814.52</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>38 1.3 1 TLEVLK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>439.75</td> <td>877.48</td> <td>877.49</td> <td>-0.01</td> <td>0</td> <td>53 0.042 2 MSLLASLK + Oxidation (M)</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>510.25</td> <td>1019.48</td> <td>1019.49</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>71 0.0006 1 GSITDQELR</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>567.32</td> <td>1132.63</td> <td>1132.65</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>44 0.35 1 LQVLIAMQYK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>606.79</td> <td>1211.57</td> <td>1211.58</td> <td>-0.01</td> <td>0</td> <td>50 0.065 1 LPRSDHFLK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>607.35</td> <td>1212.69</td> <td>1212.71</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>92 4.4e-005 1 LADNISILLNK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>609.29</td> <td>1216.57</td> <td>1216.58</td> <td>-0.01</td> <td>0</td> <td>39 0.96 1 HAVYVALYER + Oxidation (M)</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>569.03</td> <td>1132.07</td> <td>1132.13</td> <td>-0.06</td> <td>1</td> <td>41 0.49 1 DTVVSSIIQLDLYDANRZ</td> </tr> </tbody> </table>	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide	<input checked="" type="checkbox"/>	408.26	814.50	814.52	-0.02	0	38 1.3 1 TLEVLK	<input checked="" type="checkbox"/>	439.75	877.48	877.49	-0.01	0	53 0.042 2 MSLLASLK + Oxidation (M)	<input checked="" type="checkbox"/>	510.25	1019.48	1019.49	-0.02	0	71 0.0006 1 GSITDQELR	<input checked="" type="checkbox"/>	567.32	1132.63	1132.65	-0.02	0	44 0.35 1 LQVLIAMQYK	<input checked="" type="checkbox"/>	606.79	1211.57	1211.58	-0.01	0	50 0.065 1 LPRSDHFLK	<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.02	0	92 4.4e-005 1 LADNISILLNK	<input checked="" type="checkbox"/>	609.29	1216.57	1216.58	-0.01	0	39 0.96 1 HAVYVALYER + Oxidation (M)	<input checked="" type="checkbox"/>	569.03	1132.07	1132.13	-0.06	1	41 0.49 1 DTVVSSIIQLDLYDANRZ	<p>Mass: 112505 Score: 143 Peptides matched: 3                      hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]</p> <p><input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Query</th> <th>Observed</th> <th>Mr(expt)</th> <th>Mr(calc)</th> <th>Delta Miss Score</th> <th>Expect Rank</th> <th>Peptide</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>439.76</td> <td>877.51</td> <td>877.49</td> <td>0.01</td> <td>0</td> <td>22 34 7 MSLLASLK + Oxidation (M)</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>607.35</td> <td>1212.69</td> <td>1212.71</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>77 0.0013 1 LADNISILLNK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>609.29</td> <td>1216.57</td> <td>1216.58</td> <td>-0.01</td> <td>0</td> <td>44 0.32 1 HAVYVALYER + Oxidation (M)</td> </tr> </tbody> </table>	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide	<input checked="" type="checkbox"/>	439.76	877.51	877.49	0.01	0	22 34 7 MSLLASLK + Oxidation (M)	<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.02	0	77 0.0013 1 LADNISILLNK	<input checked="" type="checkbox"/>	609.29	1216.57	1216.58	-0.01	0	44 0.32 1 HAVYVALYER + Oxidation (M)																													
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	408.26	814.50	814.52	-0.02	0	38 1.3 1 TLEVLK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	439.75	877.48	877.49	-0.01	0	53 0.042 2 MSLLASLK + Oxidation (M)																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	510.25	1019.48	1019.49	-0.02	0	71 0.0006 1 GSITDQELR																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	567.32	1132.63	1132.65	-0.02	0	44 0.35 1 LQVLIAMQYK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	606.79	1211.57	1211.58	-0.01	0	50 0.065 1 LPRSDHFLK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.02	0	92 4.4e-005 1 LADNISILLNK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	609.29	1216.57	1216.58	-0.01	0	39 0.96 1 HAVYVALYER + Oxidation (M)																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	569.03	1132.07	1132.13	-0.06	1	41 0.49 1 DTVVSSIIQLDLYDANRZ																																																																																																																				
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	439.76	877.51	877.49	0.01	0	22 34 7 MSLLASLK + Oxidation (M)																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.02	0	77 0.0013 1 LADNISILLNK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	609.29	1216.57	1216.58	-0.01	0	44 0.32 1 HAVYVALYER + Oxidation (M)																																																																																																																				
15.	<p>QL123497267 Mass: 112505 Score: 290 Peptides matched: 4                      hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]</p> <p><input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Query</th> <th>Observed</th> <th>Mr(expt)</th> <th>Mr(calc)</th> <th>Delta Miss Score</th> <th>Expect Rank</th> <th>Peptide</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>406.79</td> <td>1211.57</td> <td>1211.58</td> <td>-0.06</td> <td>1</td> <td>99 0.011 1 SSTHTVYDIEKSHQEVZ</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>607.35</td> <td>1212.69</td> <td>1212.71</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>80 6.2e-005 1 QDGLLNRRDQVLSKNNRDK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>930.40</td> <td>1789.19</td> <td>1789.24</td> <td>-0.05</td> <td>1</td> <td>74 0.00226 1 QDGLLNRRDQVLSKNNRDK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>961.72</td> <td>1922.13</td> <td>1922.19</td> <td>-0.06</td> <td>1</td> <td>80 5.5e-005 1 SEKGRDSTDAIDRZVETEK</td> </tr> </tbody> </table>	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide	<input checked="" type="checkbox"/>	406.79	1211.57	1211.58	-0.06	1	99 0.011 1 SSTHTVYDIEKSHQEVZ	<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.02	0	80 6.2e-005 1 QDGLLNRRDQVLSKNNRDK	<input checked="" type="checkbox"/>	930.40	1789.19	1789.24	-0.05	1	74 0.00226 1 QDGLLNRRDQVLSKNNRDK	<input checked="" type="checkbox"/>	961.72	1922.13	1922.19	-0.06	1	80 5.5e-005 1 SEKGRDSTDAIDRZVETEK	<p>Mass: 112505 Score: 133 Peptides matched: 4                      hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]</p> <p><input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Query</th> <th>Observed</th> <th>Mr(expt)</th> <th>Mr(calc)</th> <th>Delta Miss Score</th> <th>Expect Rank</th> <th>Peptide</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>406.79</td> <td>1211.57</td> <td>1211.58</td> <td>-0.06</td> <td>1</td> <td>99 0.011 1 SSTHTVYDIEKSHQEVZ</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>607.35</td> <td>1212.69</td> <td>1212.71</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>80 6.2e-005 1 QDGLLNRRDQVLSKNNRDK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>930.40</td> <td>1789.19</td> <td>1789.24</td> <td>-0.05</td> <td>1</td> <td>74 0.00226 1 QDGLLNRRDQVLSKNNRDK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>961.72</td> <td>1922.13</td> <td>1922.19</td> <td>-0.06</td> <td>1</td> <td>80 5.5e-005 1 SEKGRDSTDAIDRZVETEK</td> </tr> </tbody> </table>	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide	<input checked="" type="checkbox"/>	406.79	1211.57	1211.58	-0.06	1	99 0.011 1 SSTHTVYDIEKSHQEVZ	<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.02	0	80 6.2e-005 1 QDGLLNRRDQVLSKNNRDK	<input checked="" type="checkbox"/>	930.40	1789.19	1789.24	-0.05	1	74 0.00226 1 QDGLLNRRDQVLSKNNRDK	<input checked="" type="checkbox"/>	961.72	1922.13	1922.19	-0.06	1	80 5.5e-005 1 SEKGRDSTDAIDRZVETEK																																																		
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	406.79	1211.57	1211.58	-0.06	1	99 0.011 1 SSTHTVYDIEKSHQEVZ																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.02	0	80 6.2e-005 1 QDGLLNRRDQVLSKNNRDK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	930.40	1789.19	1789.24	-0.05	1	74 0.00226 1 QDGLLNRRDQVLSKNNRDK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	961.72	1922.13	1922.19	-0.06	1	80 5.5e-005 1 SEKGRDSTDAIDRZVETEK																																																																																																																				
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	406.79	1211.57	1211.58	-0.06	1	99 0.011 1 SSTHTVYDIEKSHQEVZ																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.02	0	80 6.2e-005 1 QDGLLNRRDQVLSKNNRDK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	930.40	1789.19	1789.24	-0.05	1	74 0.00226 1 QDGLLNRRDQVLSKNNRDK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	961.72	1922.13	1922.19	-0.06	1	80 5.5e-005 1 SEKGRDSTDAIDRZVETEK																																																																																																																				
32.	<p>QL123497267 Mass: 112505 Score: 311 Peptides matched: 4                      hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]</p> <p><input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Query</th> <th>Observed</th> <th>Mr(expt)</th> <th>Mr(calc)</th> <th>Delta Miss Score</th> <th>Expect Rank</th> <th>Peptide</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>406.79</td> <td>1211.57</td> <td>1211.58</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>44 0.29 1 LPRSDHFLK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>607.35</td> <td>1212.69</td> <td>1212.71</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>89 1e-005 1 LADNISILLNK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>730.86</td> <td>1459.71</td> <td>1459.73</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>49 0.088 1 IYVDLDFLQYR</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>569.02</td> <td>1132.07</td> <td>1132.13</td> <td>-0.06</td> <td>1</td> <td>30 7.5 1 DTVVSSIIQLDLYDANRZ</td> </tr> </tbody> </table>	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide	<input checked="" type="checkbox"/>	406.79	1211.57	1211.58	-0.02	0	44 0.29 1 LPRSDHFLK	<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.02	0	89 1e-005 1 LADNISILLNK	<input checked="" type="checkbox"/>	730.86	1459.71	1459.73	-0.02	0	49 0.088 1 IYVDLDFLQYR	<input checked="" type="checkbox"/>	569.02	1132.07	1132.13	-0.06	1	30 7.5 1 DTVVSSIIQLDLYDANRZ	<p>Mass: 112505 Score: 104 Peptides matched: 1                      hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]</p> <p><input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Query</th> <th>Observed</th> <th>Mr(expt)</th> <th>Mr(calc)</th> <th>Delta Miss Score</th> <th>Expect Rank</th> <th>Peptide</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>607.35</td> <td>1212.69</td> <td>1212.71</td> <td>-0.01</td> <td>0</td> <td>104 3e-007 1 LADNISILLNK</td> </tr> </tbody> </table>	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide	<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.01	0	104 3e-007 1 LADNISILLNK																																																																							
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	406.79	1211.57	1211.58	-0.02	0	44 0.29 1 LPRSDHFLK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.02	0	89 1e-005 1 LADNISILLNK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	730.86	1459.71	1459.73	-0.02	0	49 0.088 1 IYVDLDFLQYR																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	569.02	1132.07	1132.13	-0.06	1	30 7.5 1 DTVVSSIIQLDLYDANRZ																																																																																																																				
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.01	0	104 3e-007 1 LADNISILLNK																																																																																																																				
21.	<p>QL123497267 Mass: 112505 Score: 104 Peptides matched: 1                      hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]</p> <p><input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Query</th> <th>Observed</th> <th>Mr(expt)</th> <th>Mr(calc)</th> <th>Delta Miss Score</th> <th>Expect Rank</th> <th>Peptide</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>607.35</td> <td>1212.69</td> <td>1212.71</td> <td>-0.01</td> <td>0</td> <td>104 3e-007 1 LADNISILLNK</td> </tr> </tbody> </table>	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide	<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.01	0	104 3e-007 1 LADNISILLNK	<p>Mass: 112505 Score: 133 Peptides matched: 4                      hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]</p> <p><input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search or archive report</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Query</th> <th>Observed</th> <th>Mr(expt)</th> <th>Mr(calc)</th> <th>Delta Miss Score</th> <th>Expect Rank</th> <th>Peptide</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>567.32</td> <td>1132.62</td> <td>1132.65</td> <td>-0.03</td> <td>0</td> <td>44 0.39 1 LQVLIAMQYK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>606.79</td> <td>1211.56</td> <td>1211.58</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>24 28 1 LPRSDHFLK</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>609.29</td> <td>1216.56</td> <td>1216.58</td> <td>-0.02</td> <td>0</td> <td>36 2.1 1 HAVYVALYER + Oxidation (M)</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>569.02</td> <td>1132.07</td> <td>1132.13</td> <td>-0.07</td> <td>1</td> <td>30 7.3 1 DTVVSSIIQLDLYDANRZ</td> </tr> </tbody> </table>	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide	<input checked="" type="checkbox"/>	567.32	1132.62	1132.65	-0.03	0	44 0.39 1 LQVLIAMQYK	<input checked="" type="checkbox"/>	606.79	1211.56	1211.58	-0.02	0	24 28 1 LPRSDHFLK	<input checked="" type="checkbox"/>	609.29	1216.56	1216.58	-0.02	0	36 2.1 1 HAVYVALYER + Oxidation (M)	<input checked="" type="checkbox"/>	569.02	1132.07	1132.13	-0.07	1	30 7.3 1 DTVVSSIIQLDLYDANRZ																																																																							
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	607.35	1212.69	1212.71	-0.01	0	104 3e-007 1 LADNISILLNK																																																																																																																				
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss Score	Expect Rank	Peptide																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	567.32	1132.62	1132.65	-0.03	0	44 0.39 1 LQVLIAMQYK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	606.79	1211.56	1211.58	-0.02	0	24 28 1 LPRSDHFLK																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	609.29	1216.56	1216.58	-0.02	0	36 2.1 1 HAVYVALYER + Oxidation (M)																																																																																																																				
<input checked="" type="checkbox"/>	569.02	1132.07	1132.13	-0.07	1	30 7.3 1 DTVVSSIIQLDLYDANRZ																																																																																																																				

**▲ Abb. 72: MASCOT-Suchergebnisse für Pf112.5**

gi|: Zugangsnummer NCBI-Datenbank; Mass: theoretische molekulare Masse; Total score: Signifikanzwert der Identifikation, Summe der Score-Werte für einzelne Peptide; Peptides matched: Anzahl der identifizierten Peptide; Query: Nummer des per MS/MS sequenzierten und analysierten Peptids; Observed: experimenteller m/z Wert ;Mr(expt): experimenteller m/z Wert bezogen auf die molekulare Masse des Peptides; Mr(calc): berechnete relative Masse des identifizierten Peptids Delta: mit einbezogene Massenungenauigkeit; Miss: Anzahl mit einbezogener fehlerhafter Trypsinisierungen; Score: Signifikanzwert für das einzelne Peptid (muss > 49 sein); Rank: Rang mit dem das jeweilige Peptid für das identifizierte Protein zutrifft; Peptide: identifiziertes Peptid

Die in einer Bande identifizierten Proteine werden fortlaufend durchnummeriert, dies ist durch die Ziffer vor der Zugangsnummer angegeben.

Peptide mit Rank = 1 sind rot markiert, bei Rank = 2 oder höher wird die Beschriftung schwarz

---

## **8. Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Kiel, den

Jürgen Fritsch

---

## 9. Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Matthias Leippe für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit, der Bereitstellung des Arbeitsplatzes die Diskussionsbereitschaft und steten Anregungen bedanken.

Herrn Prof. Dr. P. Saftig möchte ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Korefferats danken.

Herrn Dr. Christoph Gelhaus gilt mein ganz besonderer Dank für sein stetes Interesse, sowie die ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie nicht zuletzt den freundschaftlichen Umgang während der letzten Jahre.

Dr. E. Krause und Dr. M. Schümann, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, möchte ich für die Unterstützung und Hilfestellung bei massenspektrometrischen Fragestellungen, insbesondere während der Anfangszeit meiner Arbeit, danken.

Herrn Prof. Dr. K. Lingelbach, Universität Marburg, möchte ich für die zeitweise finanzielle Unterstützung meiner Stelle sowie seine Diskussionsbereitschaft danken.

Den Angehörigen der Arbeitsgruppe Zoophysiology der Universität Kiel möchte ich für den freundschaftlichen Umgang, ihre kollegiale Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft danken. Insbesondere danke ich Heidrun Liesegang für die Unterstützung bei der Führung der *P. falciparum* Kultur.

Meiner Familie gebührt ein ganz besonderer Dank für ihre immerwährende Unterstützung.

---

## 10. Lebenslauf

<b>Name</b>	Jürgen Fritsch
<b>Geburtstag</b>	9. August 1977
<b>Geburtsort</b>	Eschwege
<b>Nationalität</b>	deutsch
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Arbeitstätigkeit</b>	11/2003 – 06/2007 wissenschaftlicher Angestellter (BAT Ila/2), Christian-Albrechts Universität zu Kiel, Abt. Zoophysiologie 08/1998 – 09/1998 Pflegehelfer; Diakoniestation Hofgeismar
<b>Studium</b>	10/1998 – 07/2003 Biologiestudium, Universität Kassel
<b>Zivildienst</b>	07/1997 – 07/1998 Diakoniestation Hofgeismar
<b>Schulbildung</b>	08/1984 – 07/1988 Grundschule (Grebenstein) 08/1988 – 07/1994 Heinrich-Grupe-Schule (Grebenstein) 08/1994 – 06/1997 Albert-Schweitzer-Schule (Oberstufengymnasium, Hofgeismar)