

**Proteomische Analyse der Zellmembran  
humaner Erythrozyten als Wirtszellen des  
Malariaerregers *Plasmodium falciparum*  
(WELCH 1897)**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

Stephan Philipp

Kiel, Mai 2012

Referent: Prof. Dr. Matthias Leippe

Korreferent: Prof. Dr. Ottmar Janßen

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2012

Zum Druck genehmigt: 25.06.2012

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung .....	8
1.1 Malaria .....	8
1.2 <i>Plasmodium falciparum</i> (Welch 1897).....	9
1.3 Der erythrozytäre Zyklus und seine Folgen.....	10
1.4 Der Proteinexport von <i>P. falciparum</i> .....	15
1.5 Die Membran und das Zytoskelett von nicht-infizierten Erythrozyten .....	17
1.6 Die Membran und das Zytoskelett von <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrozyten .....	19
1.7 Proteomics .....	21
1.8 Zielsetzung .....	22
2 Material.....	23
2.1 Chemikalien und Reagenzien .....	23
2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	26
2.3 Software .....	27
2.4 Antikörper .....	27
3 Methoden.....	28
3.1 <i>Plasmodium falciparum</i> -Stämme und Erythrozyten.....	28
3.2 <i>In-Vitro</i> -Kultivierung von <i>P. falciparum</i> .....	28
3.2.1 Mikroskopische Analyse von <i>P. falciparum</i> nach Giemsa-Färbung .....	29
3.2.2 Einfrieren von <i>P. falciparum</i> .....	29
3.2.3 Auftauen von <i>P. falciparum</i> .....	29
3.2.4 Synchronisation einer <i>P. falciparum</i> -Kultur mit D-Sorbitol .....	30
3.2.5 Synchronisation einer <i>P. falciparum</i> -Kultur über Gelafundin.....	30
3.2.6 Anreicherung von späten Parasitenstadien über Percoll.....	31
3.3 Markierung von Proteinen der Wirtszelloberfläche mittels Fluoreszenzfarbstoffen .....	31
3.4 Anreicherung der erythrozytären Plasmamembran .....	31
3.5 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	32
3.6 Western Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran .....	32
3.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer PVDF-Membran .....	33
3.8 Quantitative Proteinbestimmung .....	33
3.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	33

3.9.1 Eindimensionale SDS-PAGE .....	33
3.9.2 Zweidimensionale PAGE (Isoelektrische Fokussierung / SDS-PAGE) .....	34
3.9.3 Zweidimensionale PAGE (Kationische PAGE / SDS-PAGE) .....	35
3.10 Färbungen von Proteinen im Gel .....	37
3.10.1 Proteinfärbung mit kolloidaler Coomassie-Lösung.....	37
3.10.2 Proteinfärbung mit Silbernitrat.....	37
3.10.3 Proteinfärbung mit Flamingo Pink .....	37
3.11 Geldokumentation, Probenisolierung und Probenvorbereitung für die massen-	
spektrometrische Analyse.....	38
3.12 Proteolytische Spaltung und massenspektrometrische Analyse .....	38
3.13 LC-MALDI TOF/TOF .....	39
3.14 Durchflusszytometrie .....	40
4 Ergebnisse .....	42
4.1 Oberflächenmarkierung von <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrozyten .....	42
4.2 Anreicherung und Analyse der Membranfraktion aus spät-infizierten Erythrozyten .....	44
4.3 Optimierung der kationischen 2D Gelelektrophorese .....	47
4.4 Experimentelle Strategie für die proteomische Analyse der erythrozytären	
Plasmamembran .....	49
4.5 Analyse der Membranfraktionen aus spät-infizierten Erythrozyten .....	51
4.6 Analyse der Membranfraktionen aus spät-infizierten Erythrozyten mittels LC-MALDI	
TOF/TOF .....	58
4.7 Isolierung früher Ringstadien mittels <i>fluorescence-activated cell sorting</i> (FACS) .....	61
4.8 Analyse der Membranfraktionen aus früh-infizierten Erythrozyten .....	66
5 Diskussion.....	69
5.1 Oberflächenmarkierung von <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrozyten .....	69
5.2 Isolierung und Gel-basierte Analyse der Wirtszellmembran von spät-infizierten	
Erythrozyten.....	70
5.2.1 Anreicherung spät-infizierter Erythrozyten und Isolierung der Wirtszellmembran .....	70
5.2.2 Optimierung der kationischen 2D PAGE und Gel-basierte Analyse der Membranfraktion	
spät-infizierter Erythrozyten .....	72
5.2.3 Identifizierte plasmodiale Proteine aus den Gelen spät-infizierter Erythrozyten .....	74
5.3 LC-MALDI TOF/TOF Analyse der Membranfraktion von spät-infizierten Erythrozyten....	81
5.4 Isolierung und Gel-basierte Analyse der Wirtszellmembran von früh-infizierten	
Erythrozyten.....	82
5.4.1 Identifizierte plasmodiale Proteine aus dem Gel früh-infizierter Erythrozyten .....	83
5.5 Ausblick .....	86



## Inhaltsverzeichnis

---

6 Literaturverzeichnis.....	87
7 Zusammenfassung .....	107
8 Summary .....	109
9 Danksagung .....	110
10 Erklärung .....	111
11 Lebenslauf .....	112
12 Publikationsliste .....	113
13 Anhang .....	114

## Abkürzungsverzeichnis

16-BAC	Benzyl dimethyl-n-hexadecylammoniumchlorid
1D, 2D	eindimensional, zweidimensional
×g	Relative Zentrifugalkraft
°C	Grad Celsius
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bichinoninsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CBB G-250	<i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>
CHCA	α-Cyano-4-hydroxymethylsäure
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
DBL	<i>Duffy Binding Like</i>
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBL	<i>Erythrocyte Binding Like</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
g	Gramm
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	Stunde
HTS	<i>host targeting signal</i> , Exportsignal
IAA	Iodacetamid
kDa	Kilodalton
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
M	molar
mA	Milliampere
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
mg	Milligramm
MSP	<i>Merozoite Surface Protein</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Phosphatpuffer mit Salz)
PIC	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>
pmol	Pikomol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
RBL	<i>Reticulocyte Binding Like</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SP	Signalpeptid
TBS	Trispuffer mit Salz
TBST	Trispuffer mit Salz und Tween20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TM	Transmembrandomäne
TOF	<i>Time of Flight</i>
TVN	Tubovesikuläres Netzwerk
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>Volume per Volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>Weight per Volume</i> (Gewicht pro Volumen)

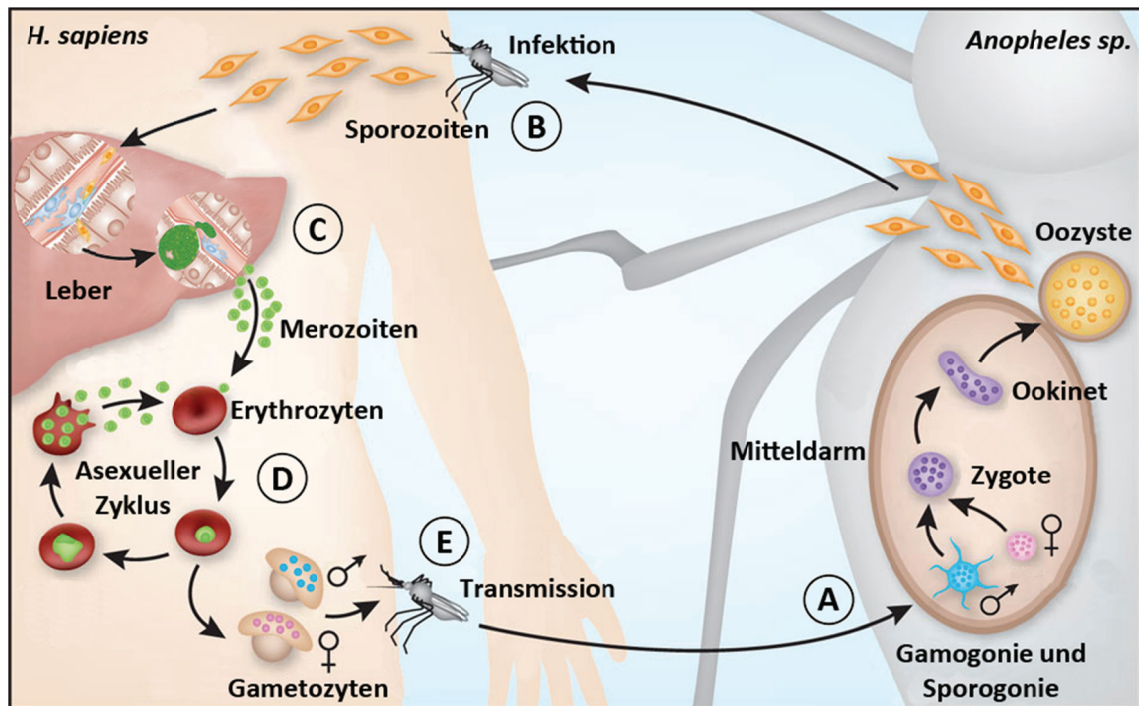
## 1 Einleitung

### 1.1 Malaria

Malaria zählt, neben AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) und Tuberkulose, zu einer der wichtigsten Infektionskrankheiten und Schätzungen zufolge leben etwa 3,3 Milliarden Menschen in Malaria-Endemiegebieten (1). Gegenwärtig tritt Malaria hauptsächlich in den Tropen und Subtropen auf und war bis zu den sechziger Jahren auch in Teilen Europas verbreitet (2,3). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) beziffert die Zahl der 2010 aufgetretenen Malariafälle auf 216 Millionen, wobei davon 665000 tödlich endeten. Hiervon traten 81 % der Fälle im afrikanischen Raum auf und 86 % der Todesopfer waren Kinder unter 5 Jahren (1). Jüngsten Schätzungen zufolge liegt die Zahl der Todesfälle mit 1,2 Millionen noch weitaus höher (4). Damit im Zusammenhang treten auch enorme wirtschaftliche und soziale Probleme durch Malaria auf, bei denen besonders die ärmsten Länder am stärksten betroffen sind. Neben den hohen Ausgaben für medizinische Versorgung und Prävention, sinkt in diesen Ländern auch die Produktivität durch Ausfall von Arbeitskräften. Schätzungen zufolge verlieren die betroffenen Länder dadurch ca. 1,3 % des Wachstums im Bruttoinlandsprodukt (5). Malaria wird auch als Sumpf- oder Wechselfieber bezeichnet und der Name entstammt dem italienischen „Mala aria“ (=schlechte Luft). Im Jahr 1880 gelang es dem französischen Forscher Charles Laveran den Erreger der Malaria im Blut von Malariapatienten nachzuweisen. Dabei handelte es sich um parasitische Einzeller der Gattung *Plasmodium* (Stamm *Alveolata*, Unterstamm *Apicomplexa*, Klasse *Haematozoa*, Ordnung *Haemosporida*, Familie *Plasmodiidae*). Von den bisher weit über 200 beschriebenen *Plasmodium*-Spezies gelten vier Arten als humanpathogen; *Plasmodium falciparum* (Malaria tropica), *Plasmodium ovale* (Malaria tertiana), *Plasmodium vivax* (Malaria tertiana) und *Plasmodium malariae* (Malaria quartana). Kürzlich wurde mehrfach mit *Plasmodium knowlesi* eine weitere Art als humanpathogen eingestuft, die normalerweise Affen infiziert (6-9). In Abhängig der *Plasmodium*-Spezies variiert das Krankheitsbild der Malaria, wobei die schwerste Form durch *P. falciparum* ausgelöst wird (10).

## 1.2 *Plasmodium falciparum* (Welch 1897)

Bei *Plasmodium falciparum* handelt es sich um einen obligaten Endoparasiten, der im Zuge seiner Entwicklung einen Generations- und Wirtswechsel durchläuft. Übertragen wird *P. falciparum* von Mücken der Gattung *Anopheles* (Stamm *Arthropoda*, Klasse *Insecta*, Ordnung *Diptera*, Unterordnung *Nematocera*, Familie *Culicidae*) und der Mensch dient als Zwischenwirt. In der Mücke entsteht durch Verschmelzung von männlichen und weiblichen Gametozyten eine Zygote, die sich zu einem Ookinet differenziert (Abb. 1A). Dieser bewegliche Ookinet setzt sich zwischen das Mitteldarmepithel und der Basallamina und transformiert zu einer Oozyste. Durch Sporogonie entstehen tausende Sporozoiten, die durch Platzen der Oozyste freigesetzt werden und durch Zirkulation der Hämolymphe zu den Speicheldrüsen der Mücke gelangen (11,12). Während einer Blutmahlzeit der weiblichen *Anopheles* Mücke gelangen die Sporozoiten über den Speichel in das avaskuläre Gewebe der Haut (Abb. 1B) (13,14). Durch eine spiralförmige, gleitende Vorwärtsbewegung („*gliding motility*“), die durch eine Aktin-Myosin-basierte Motormaschinerie ausgelöst wird, erreicht ein Teil der Sporozoiten die Blutkapillaren (15,16). Von dort aus dringen diese in die menschliche Blutbahn ein und gelangen schließlich zur Leber (17). Hier adhären die Sporozoiten an das sinusoidale Endothel und gleiten an diesem entlang bis eine Kupffer-Zelle erreicht wird (18). Über diese Zellen gelangen die Sporozoiten, umhüllt von einer Plasmamembran, durch die Epithelschicht und sind damit in der Lage Hepatozyten zu befallen (Abb. 1C) (19,20). Durch Interaktion mit der Zelloberfläche, unter anderen durch die Proteine AMA-1 (*apical membrane antigen 1*), TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*) und CSP (*circumsporozoite protein*), heften sich die Sporozoiten an Hepatozyten und invadieren diese unter Ausbildung einer parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) (21-24). Innerhalb der Wirtszelle entwickelt sich der Parasit zu einem Schizonten und generiert durch Zellkernteilung innerhalb von wenigen Tagen mehrere zehntausend Tochtermerozoiten (25). Studien im Mausmodell mit *P. berghei* zeigten, dass nach Ende der Merozoitenbildung die PVM degradiert wird und die Merozoiten frei in der Wirtszelle vorliegen (26). Durch Abschnürung von Vesikeln die Merozoiten beinhalten (Merosomen), gelangen diese in die Blutbahn, werden freigesetzt und befallen Erythrozyten (siehe Abschnitt 1.3 und Abb. 1D) (18). Während der folgenden asexuellen Vermehrung des Parasiten innerhalb der Erythrozyten können sich die entstehenden Merozoiten auch zu Geschlechtsformen, den männlichen Mikrogametozyten und den weiblichen Makrogametozyten, entwickeln (27). Werden diese Gametozyten durch eine *Anopheles* Mücke aufgenommen beginnt die sexuelle Fortpflanzung von *P. falciparum* im Mitteldarm der Mücke und ein neuer Zyklus entsteht (Abb. 1E) (28,29).



**Abb. 1: Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*.** Nach Gamogonie und Sporogonie im Mitteldarm der *Anopheles* Mücke (A) kommt es während einer Blutmahlzeit zur Übertragung der Sporozoiten auf den Menschen (B). Daraufhin befallen die Sporozoiten in der Leber die Hepatozyten und generieren durch Zellkernteilung mehrere zehntausend Merozoiten (C). Die Merozoiten gelangen über Vesikel (=Merosomen) in die Blutbahn und befallen dort Erythrozyten (D). Im darauf folgenden asexuellen Zyklus kann es zur Ausbildung von geschlechtlichen Gametozyten kommen. Diese können während einer erneuten Blutmahlzeit durch eine *Anopheles* Mücke aufgenommen werden und so den Entwicklungskreislauf von *P. falciparum* schließen (E). Abbildung wurde verändert nach (28,30).

### 1.3 Der erythrozytäre Zyklus und seine Folgen

Nachdem die Merozoiten aus der Leber in die Blutbahn entlassen werden, befallen sie Erythrozyten, um sich innerhalb der Wirtszelle durch asexuelle Schizogenie zu vermehren (siehe Abb. 2). Im Gegensatz zu anderen Plasmodienarten, wie zum Beispiel *P. ovale* oder *P. vivax* die nur Retikulozyten (junge Erythrozyten) infizieren, kann *P. falciparum* sowohl Retikulozyten als auch Normozyten (fertig ausgebildete Erythrozyten) invadieren (10). Dabei ist der Prozess der Invasion in mehrere Phasen unterteilt und innerhalb von circa 30 Sekunden abgeschlossen (31,32). Während der ersten Phase (Abb. 2a) lagern sich die Merozoiten zufällig und reversibel an die Erythrozyten an (33). Danach erfolgt die Phase der Reorientierung (Abb. 2b), bei der der apikale Pol der Merozoiten in Richtung der Wirtszelloberfläche gebracht wird. Hierbei entstehen Rezeptor-Liganden vermittelte Verbindung (*tight junctions*), bei der AMA-1 und RON-4 (*rophtry neck protein 4*) eine wichtige Rolle spielen (34-36). Zusätzlich sind mindestens drei weitere Proteinfamilien, MSP (*merozoite surface protein*), EBL (*erythrocyte binding-like*) und RBL (*reticulocyte-binding-like homologue*), in den Phasen der Erkennung und

Bindung von Zielstrukturen, sowie der Ausbildung der *tight junctions* involviert (37-41). Auf Seiten der Wirtszelle konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Rezeptor Basigin essentiell für den Invasionsprozess ist (42). Es folgt die Sezernierung des Inhalts der Mikronemen, Rhoptrien und Mononemen sowie die Invagination der Wirtszellmembran (43,44). Dabei wird angenommen, dass die Invagination an einer Protein-freien Stelle der Erythrozytenmembran induziert wird (45). Die anschließende Phase der Invasion (Abb. 2c) wird unter Ausbildung einer parasitophoren Vakuole (PV) und der *moving junctions* von einem Aktin-Myosin-Motor angetrieben, wobei sich die *moving junctions* entlang der Merozoitenoberfläche zum posterioren Ende bewegen (39,46). Ob dabei die *moving junctions* aus den anfänglich gebildeten *tight junctions* entstehen und somit die gleichen molekularen Komponenten aufweisen ist bisher unbekannt (47). Zusätzlich werden weitere Inhalte der Rhoptrien bestehend aus Lipiden und Proteinen sezerniert. Wahrscheinlich dienen die Lipide und einige der Proteine zur Modifizierung und Aufbau der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) (48). Studien haben gezeigt, dass sowohl Lipide vom Parasiten als auch vom Erythrozyten in der PVM enthalten sind, jedoch ist die genaue Lipidzusammensetzung unbekannt (49,50). Zusätzlich konnten mehrere erythrozytäre Proteine wie Flotiline und Aquaporine gefunden werden, die mit der PVM assoziiert sind (51,52). Schließlich werden nach Ausbildung der PVM die *moving junctions* proteolytisch gespalten und mit dem Verschließen der Membranen ist die Invasion abgeschlossen (39).

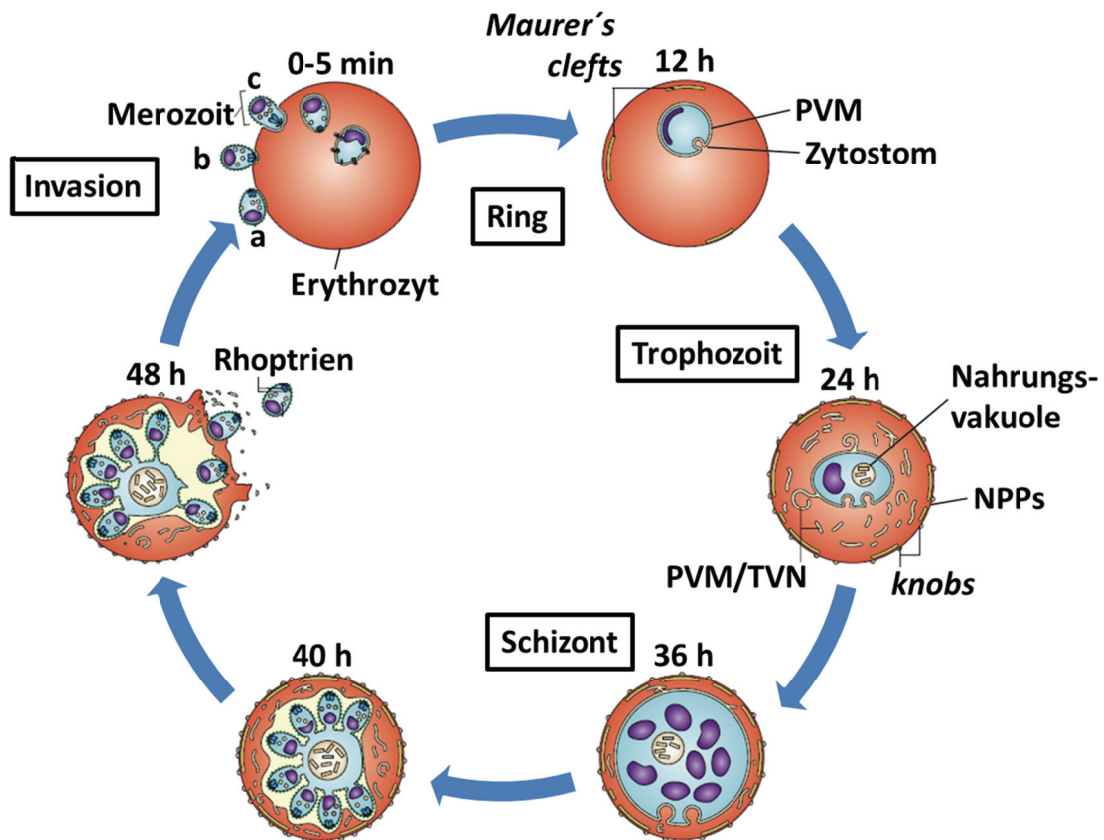
In der anschließenden intraerythrozytären Entwicklung des Parasiten erfolgen weitreichende Modifizierungen der Wirtszelle. Kurz nach der Invasion, werden die Inhalte der *dense granules* sezerniert, was wiederum den Export von Proteinen und den Aufbau neuer Membranstrukturen im Wirtszellzytoplasma initiiert (53,54). Das frühe Trophozoitenstadium wird, aufgrund der Siegelringform des Parasiten, als Ringstadium bezeichnet. Der Zellkern und der Hauptteil der Organellen befinden sich am Rand und erscheinen somit dicker als das Zentrum des Parasiten (55). Die Endozytose des Wirtszellzytoplasmas beginnt im Ringstadium ca. 10-15 h nach der Invasion einerseits durch Pinozytose und andererseits durch Ausbildung eines Zytostoms (56). Letzteres wird oft als „Zellmund“ bezeichnet und ist auch in anderen freilebenden und parasitischen Protozoen zu finden (57). Die so aufgenommenen Vesikel verschmelzen später im Trophozoitenstadium zu einer Nahrungsvakuole (58). Innerhalb dieser Nahrungsvakuole wird das Wirtszellhämoglobin zum Gewinn von Aminosäuren abgebaut und das entstehende toxische Ferriprotoporphyryn wird als Hämozoin kristallisiert (59). Diese Detoxifikation bildet die Grundlage für den Wirkmechanismus verschiedener Malariamedikamente wie z.B. Chloroquin oder Artemisinininderivate. In dieser Zeit kommt es zusätzlich zur Ausbildung der *new permeation pathways* (NPPs) (60) und damit zu einer

erheblichen Steigerung der Permeabilität der Wirtszellmembran (61). Dies dient der Aufnahme einer großen Bandbreite essentieller Substanzen und Ionen sowie dem Ausschleusen toxischer Stoffwechselprodukte. Neben Peptiden (62), Glukose (63) und Pantothersäure (64) werden auch Aminosäuren aufgenommen, die nicht bzw. nur im geringen Maße durch den Abbau von Hämoglobin gewonnen werden können. Hierzu zählen Methionin, Cystein, Glutamat, Prolin, Glutamin und Isoleucin (65,66). Wie die NPPs konstruiert sind ist derzeit unbekannt und es wird angenommen, dass sowohl wirtseigene als auch parasitäre Proteine am Aufbau sowie der Modulation von Transportern, Kanälen und Poren beteiligt sind (65,67). Der Parasit könnte zum Beispiel verschiedene Wirtszelltransporter wie den Glukosetransporter Glut1 oder diverse Aminosäuretransporter benutzen (65).

Neben diesen Permeabilitätsveränderungen der Wirtszelle, werden innerhalb der ersten 24 h die *Maurer's clefts* und das tubovesikuläre Netzwerk (TVN) durch den Parasit gebildet (68-70). Dabei wird das TVN teils als schlauchförmige Erweiterungen der PVM sichtbar und Hinweise deuten darauf hin, dass Lipide, Proteine und Nährstoffe hierüber transportiert und ausgetauscht werden (71,72). Die genaue Herkunft der *Maurer's clefts* ist unbekannt. Es wird angenommen, dass sie ihren Ursprung in der PVM oder dem TVN haben und durch tubuläre Strukturen in engen Kontakt mit der Wirtszellmembran gehalten werden (73,74). Die *Maurer's clefts* dienen dort als Plattform und Verteilungszentrum für den Export zahlreicher Proteine (75). So wurde gezeigt, dass z. B. KAHRP (*knob-associated histidine rich protein*) nach dem Export ins Zytoplasma die *Maurer's clefts* passiert bevor das Protein die Plasmamembran der Wirtszelle erreicht (76,77).

Im finalen intraerythrozytären Stadium, dem Schizontenstadium, erfolgt eine mehrfache Replikation der DNA und die Formation von 16-20 Tochtermerozoiten (54). Zu diesem Zeitpunkt füllt der Parasit nahezu die gesamte Wirtszelle aus und hat ca. 80 % des Hämoglobins abgebaut. Am Ende der mehrstufigen Ausbildung der Tochtermerozoiten platzt die Wirtszelle, in einem unvollständig aufgeklärten Prozess, explosionsartig und die freigelassenen Merozoiten befallen neue Erythrozyten (78,79).

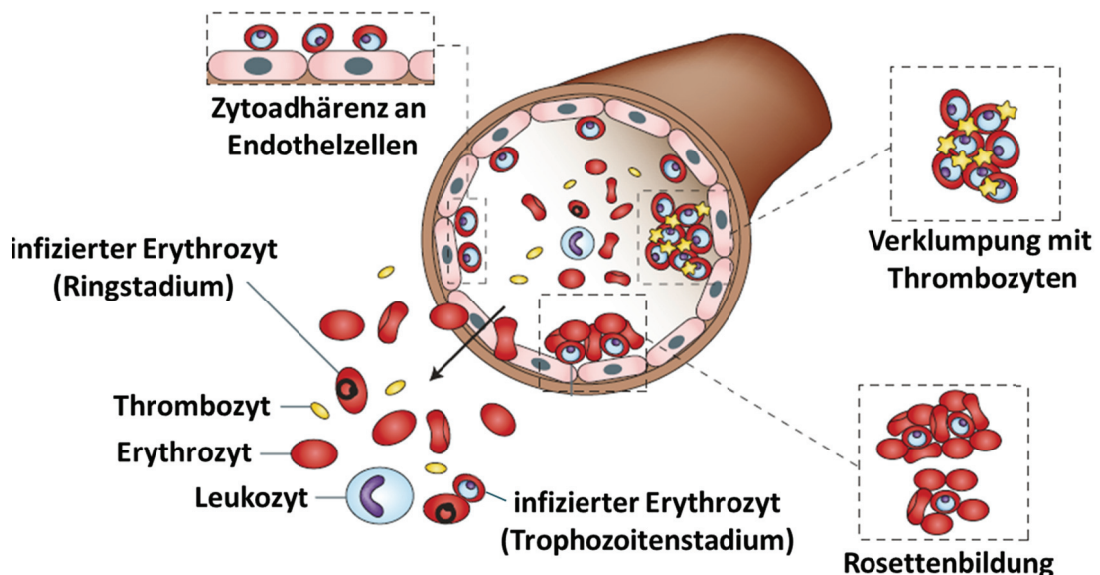




**Abb. 2: Intraerythrozytärer Zyklus von *Plasmodium falciparum*.** Während der Invasion lagern sich die Merozoiten an den Erythrozyt an (a). Nach der Reorientierung (b) erfolgt die Invasion des Merozoiten unter Ausbildung einer parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) (c). Im Weiteren Verlauf entwickelt sich der Parasit vom Ringstadium zum Trophozoitenstadium. In dieser Phase kommt es zur Bildung der Maurer's clefts, den new permeation pathways (NPPs) und dem tubovesikulären Netzwerk mit Auswüchsen der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM/TVN). Über das Zytostom wird Wirtszellzytoplasma aufgenommen und es bildet sich eine Nahrungsvakuole. Im späten Trophozoitenstadium werden kleine Erhebungen der Wirtszellmembran sichtbar, die als knobs bezeichnet werden. Schließlich kommt es im darauffolgenden Schizontenstadium zur Formation von Tochtermerozoiten, die nach der Lyse der Wirtszelle neue Erythrozyten invadieren. Abbildung wurde verändert nach (44).

Dieser erythrozytäre Zyklus bestimmt das klinische Krankheitsbild der Malaria tropica. Zunächst treten nach einer Inkubationszeit von mindestens 7 Tagen erste grippeähnliche Symptome wie Kopf- und Gliederschmerzen, Schüttelfrost, Schweißausbrüche, allgemeine Abgeschlagenheit, Übelkeit, Durchfall und Fieber auf (10). Im Gegensatz zu anderen Malariaformen (z.B. bei Malaria tertiana alle 48 h) erscheinen die Fieberschübe bei Malaria tropica in unterschiedlichen Abständen von 36-48 h. Diese Fieberschübe entstehen durch Freisetzen von Malariatoxinen nach Ruptur von infizierten Erythrozyten. Weiterhin stimulieren diese Toxine die Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ ) durch Makrophagen (80). Diese erhöhte Ausschüttung von  $\text{TNF}\alpha$  löst eine gesteigerte ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) Expression auf Endothelzellen im Gehirn aus und fördert so die Zytoadhärenz (81). Aber auch weitere pro-inflammatorische Signale wie Interferon- $\gamma$  und Stickoxide spielen eine

wichtige Rolle für die Erklärung des Krankheitsbildes der Malaria (82-84). Im späteren Verlauf kann es zu einer lebensbedrohlichen Malaria mit Symptomen wie Hyperparasitämie, starke Anämie, Blutgerinnungsstörungen, Hypoglykämie, Laktazidose, Durchblutungsstörung und multiples Organversagen kommen (85,86). Dabei wird angenommen, dass die Laktazidose durch das Zusammenspielen verschiedener Faktoren, wie die erhöhte Laktatproduktion durch den Parasiten, die geminderte Leberfunktion sowie die Sauerstoffunterversorgung von Organen entsteht (87). Zusätzlich kann eine zerebrale Malaria auftreten, bei der die Patienten unter Krampfanfällen, Sehstörungen und Bewusstseinstörungen bis hin zum Koma leiden (10). Sowohl die komplizierte als auch die zerebrale Malaria können tödlich verlaufen und werden durch den Parasiten modifizierten Erythrozyten ausgelöst. Folgen der Modifikationen dieser Zellen sind erhöhte Zytoadhärenz an Endothelzellen (88), Verklumpung mit Thrombozyten (89) sowie die sogenannte Rosettenbildung mit anderen Erythrozyten (90) (Abb. 3). Wahrscheinlich versucht so der Parasit das Aussortieren durch die Milz zu verhindern, um sein Überleben zu sichern. Zusätzlich könnte insbesondere das Umgeben mit nicht-infizierten Erythrozyten bei der Rosettenbildung als eine Art Schutzschild dienen, um dem Immunsystem zu entgehen. Des Weiteren könnte durch die Sequestration der Kapillaren ein für den Parasiten günstiges Mikromilieu geschaffen und so die eigene asexuelle Vermehrung gefördert werden.



**Abb. 3: Zytoadhärenz von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten an humane Zellen.** Infizierte Erythrozyten mit Parasiten im Trophozitenstadium binden an Endothelzellen, Thrombozyten (Verklumpung) und nicht-infizierte Erythrozyten (Rosettenbildung).

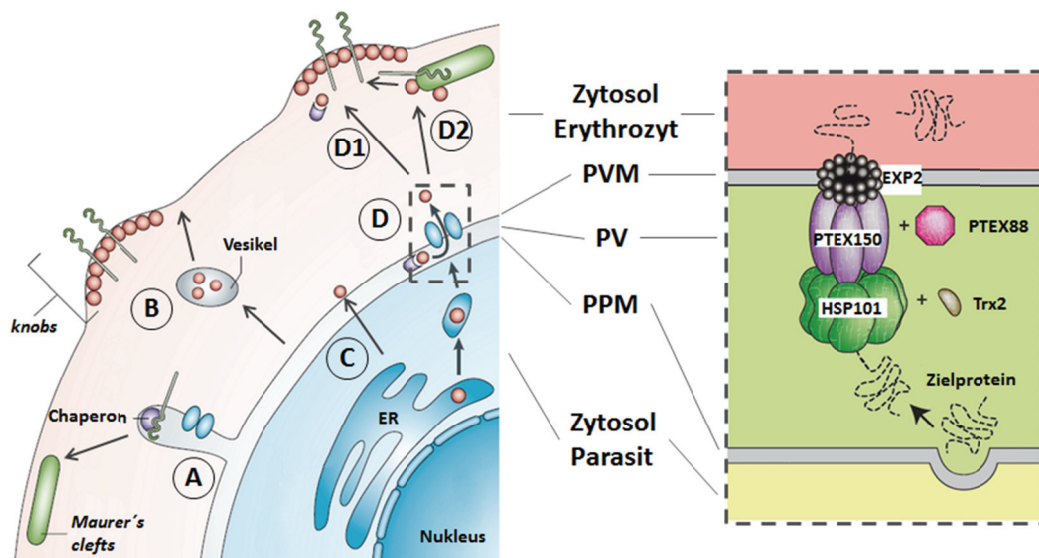
Schon im späten 19. Jahrhundert konnten nur früh-infizierte Erythrozyten im peripheren Blut von Patienten beobachtet werden (91) und die Sequestration wurde als Folge der Anheftung spät-infizierter Erythrozyten an das Endothel im Tiefengewebe beschrieben. Später wurden durch Transmissionselektronenmikroskopie kleine Erhebungen, sogenannte *knobs*, auf der Oberfläche spät-infizierter Erythrozyten gefunden (92). Diese bestehen aus mehreren Proteinen (Abb. 5) und werden maßgeblich für die erhöhte Zytoadhärenz verantwortlich gemacht. Zunächst rollen die infizierten Erythrozyten an den Endothelzellen entlang bis es schließlich zur Bindung mit der Zielzelle kommt (93). Dabei scheint PfEMP1 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*) viele Interaktionen seitens des Parasiten zu vermitteln und so die zentrale Rolle für die Pathogenität auszuüben (94-96). Aber auch weitere Oberflächenproteine wie die RIF (*repetitive interspersed family*) (97) und STEVOR (*subtelomeric variable open reading frame*) (98) Antigene könnten bei der Adhäsion involviert sein. Auf Seiten der Zielzellen konnten bisher folgende Interaktionspartner identifiziert werden: CD36 (99,100), ICAM-1 (CD54) (101,102), TSP (Thrombospondin) (103), P/E-selectin (CD62P/E) (104-106), PECAM1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, CD31) (107), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*, CD106) (106), Heparansulfat (108), CR1 (*complement receptor 1*, CD35) (109,110), Chondroitinsulfat A (111,112) und verschiedene Antigene der Blutgruppen A und B (113,114). Jedoch sind die meisten dieser molekularen Interaktionen noch unzureichend aufgeklärt und nur CD36 und CD54 wurden bisher im Detail untersucht. Es fehlen zum Beispiel Daten über die Bindungsspezifität, die Gewebespezifität sowie das Vorhandensein von synergistischen Effekten. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere bisher nicht identifizierte Moleküle sowohl auf der Oberfläche von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten als auch auf deren Zielzellen existieren die an Interaktionen beteiligt sind. In der Diskussion stehen zum Beispiel Fractalkin (115), Integrine (116) und Fibronektin (117), jedoch sind die jeweiligen zugehörigen Liganden seitens *P. falciparum* unbekannt.

#### **1.4 Der Proteinexport von *P. falciparum***

Maßgeblich für das Überleben und die Virulenz von *P. falciparum* während seines erythrozytären Zyklus sind die zahlreichen und tiefgreifenden Modifikationen der Wirtszelle, die durch den Export von parasitären Proteinen ausgelöst werden. Es wird angenommen, dass das Exportom von *P. falciparum* 5-10 Mal größer ist als das von anderen *Plasmodium* Spezies (44,118). Anhand einer speziellen Sequenz konnten systematisch 455 potentiell exportierte Proteine, die bis zu 8 % des Proteoms von *P. falciparum* ausmachen, identifiziert werden (118-120). Diese Sequenz mit dem Motiv R/KxLxE/Q befindet sich ca. 15-20 Aminosäuren hinter

dem N-terminalen Signalpeptid und wurde in zwei unabhängigen Studien als PEXEL (*plasmodium export element*, (119)) bzw. als HTS (*host targeting signal*, (120)) bezeichnet. Dabei handelt es sich um eine Erkennungssequenz für eine Plasmeysin V Proteaseschnittstelle innerhalb des endoplasmatischen Retikulums (121-123). Weiterführende bioinformatische Analysen lassen vermuten, dass die PEXEL/HTS-umgebenden Aminosäuren zusätzliche Informationen für den Export beisteuern (124). Interessanterweise ist das Motiv bei Proteinen, die in die Erythrozytenmembran eingelagert werden, hochkonserviert, was einen ähnlichen Exportmechanismus annehmen lässt. Hierzu gehören verschiedene RIF und STEVOR Antigene sowie der Virulenzfaktor PfEMP1 (125).

Neben diesen Proteinen gibt es aber auch solche, die exportiert werden obwohl sie kein klassisches PEXEL/HTS Motiv besitzen (126-129). Die bioinformatische Identifizierung dieser Proteine gestaltet sich als sehr schwierig, da hier keinerlei systematische Ansätze existieren. So ist es wahrscheinlich, dass weit mehr Proteine vom Parasiten exportiert werden als bisher angenommen. Zusätzlich ist unklar ob diese Proteine im Gegensatz zu PEXEL/HTS-positiven Proteinen über gleiche oder andere Wege exportiert werden (130). In Diskussion stehen mehrere verschiedene Exportmechanismen von *P. falciparum*, um sowohl die eigene Plasmamembran als auch die umschließende PVM zu überwinden (Abb. 4).



**Abb. 4: Mögliche Proteinexportmechanismen von *Plasmodium falciparum*.** Proteine könnten über (A) entstehende *Maurer's clefts*, (B) über Vesikel, (C) durch Fusion mit der PVM oder (D) durch ein Translokon in die Wirtszelle transportiert werden. Weiterhin könnte der Transport (D1) direkt oder (D2) zusätzlich über die *Maurer's clefts* erfolgen. Das mögliche Translokon in der PVM wurde als PTEX (*Plasmodium translocon of exported proteins*) bezeichnet und ist vergrößert rechts dargestellt. Es besteht aus den Komponenten EXP2 (*exported protein 2*), PTEX150, PTEX88, HSP101 (*heat shock protein 101*) sowie Trx2 (*thioredoxin like protein 2*). PVM – parasitophore Vakuolenmembran; PV – parasitophore Vakuole; PPM – Parasitenplasmamembran. Abbildung verändert nach (44,131).

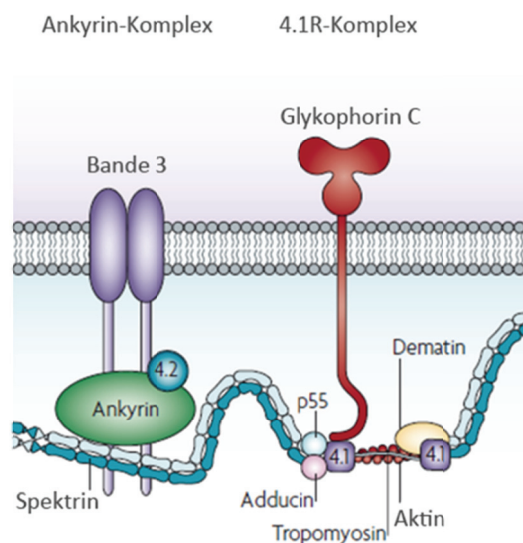
Eine Hypothese ist, dass die *Maurer's clefts* während ihrer Entstehung mit zu exportierenden Proteinen beladen werden, um diese dann in die Nähe der Wirtszellmembran zu transportieren (75,126). Durch die Deletion von MAHRP-1 (*membrane-associated histidine-rich protein 1*) akkumulierte PfEMP1 in der PV, woraufhin angenommen wird, dass MAHRP-1 eine Rolle beim Beladen entstehender *Maurer's clefts* besitzt (132). Ein weiterer Exportmechanismus könnte der Transport innerhalb von Vesikeln sein (133-135) und damit im Zusammenhang wurde auch eine mögliche direkte Fusion von Vesikeln mit der PVM diskutiert (136). Schon vor fast 20 Jahren wurde durch erste *Patch-Clamp*-Versuche und durch Versuche mit planaren Lipid-Doppelschichten eine Pore in der PVM vermutet, die von einem abundanten Protein der PVM gebildet wird (137). Kürzlich wurde ein möglicher Transporter in der PVM beschrieben, der als PTEX (*Plasmodium translocon of exported proteins*) bezeichnet wurde und dabei eine solche Pore ausbildet (138). Als Komponenten dieses Translokons wurden EXP2 (*exported protein 2*), PTEX150, PTEX88, HSP101 (*heat shock protein 101*) sowie Trx2 (*thioredoxin like protein 2*) identifiziert. Zwar gibt es verschiedene Hinweise über die Funktion der einzelnen Komponenten, aber es existiert noch kein definitiver Beweis, dass PTEX als Translokon fungiert (131). Es wird angenommen, dass EXP2 durch Oligomerisierung und Einlagerung in die PVM eine Pore ausbildet, durch die die Proteine die Membran passieren(131). Des Weiteren könnte HSP101 als ein Chaperon mit Funktion einer AAA<sup>+</sup> ATPase unter Hydrolyse von ATP Zielproteine entfalten und so deren Export durch die Pore in der PVM vorbereiten. Eine ähnliche Funktion besitzt das ClpC Chaperon in Chloroplasten von Pflanzen und Algen (139).

### **1.5 Die Membran und das Zytoskelett von nicht-infizierten Erythrozyten**

Erythrozyten sind hochspezialisierte Zellen mit einem Durchmesser von 8 µm, einer Dicke von 2 µm und einem Volumen von 90 fL (140,141) und wurden erstmals 1658 von Jan Swammerdam beschrieben. Im Jahr 1675 wurden ihre einzigartigen Eigenschaften durch den Holländer Antonie van Leeuwenhoek publiziert (142) und 1925 gaben Gorter und Grendel erste Einblicke in die Struktur der Membran als eine Lipidschicht (143).

Im Laufe ihrer Entstehung, welche als Erythropoese bezeichnet wird, verlieren die humanen Erythrozyten ihren Zellkern sowie weitere wichtige Organellen wie zum Beispiel die Mitochondrien. In Folge dessen sind sie nicht in der Lage, ATP durch oxidative Phosphorylierung zu generieren und sind so auf ihre Glykolyse angewiesen. Während ihrer Lebenszeit von ungefähr 120 Tagen besteht die Hauptaufgabe der Erythrozyten im Transport

von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid. Es gibt aber auch Hinweise auf weitere Funktionen, wie dem Transport von Proteinen mit GPI-Ankern (144,145) oder dem Erweitern und Verengen von Blutgefäßen (146,147). Dabei werden die Zellen mit einer Vielzahl von verschiedenen Stresssituationen konfrontiert. Im Durchschnitt passieren sie einmal pro Minute die Lunge (=oxidativer Stress), mehrmals pro Stunde die Nieren (=osmotischer Stress) und müssen sich durch Kapillaren quetschen die kleiner sind als sie selbst (=mechanischer Stress) (148,149). Ermöglicht wird dies durch die bikonkave Form, die hohe Elastizität (100x weicher als eine Latexmembran gleicher Dicke) und hohe Deformierbarkeit, sowie die rapide Anpassungsfähigkeit an äußere Einflüsse (innerhalb 100 Millisekunden) der murenen Erythrozyten, basierend auf den besonderen Eigenschaften ihrer Membran und ihres Zytoskeletts (150,151). Die Grundlage des Zytoskeletts bilden dabei alpha und beta Spektrine, die mit anderen Proteinen wie Aktin, Ankyrin, Bande 4.1, Aducin, Dematin und Tropomyosin interagieren und so über integrale Membranproteine mit der Membran verknüpft sind (44,152,153) (Abb. 5).



**Abb. 5: Schematischer Aufbau des erythrozytären Zytoskeletts.** Durch die zwei makromolekularen Komplexe (Ankyrin- und 4.1R-Komplex) ist das Zytoskelett über Transmembranproteine wie Bande 3 und Glykophorin C mit der Membran verknüpft. Abbildung verändert nach (44).

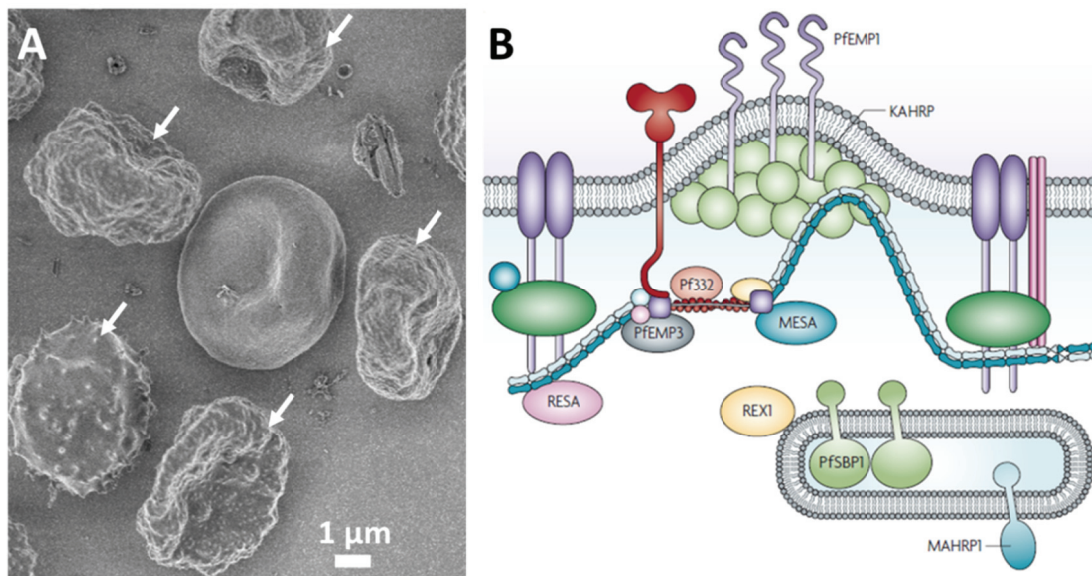
In Erythrozyten gibt es mehr als 50 verschiedene Transmembranproteine, deren Anzahl von wenigen 100 bis zu einer Million Kopien pro Zelle reicht (150). In einer aktuellen Proteomstudie wurden mit den neuesten Proteinidentifizierungstechniken insgesamt 105 integrale Membranproteine identifiziert. Darunter befinden sich unter anderem



Adhäsionsproteine (z.B. ICAM-4), Transporter (z. B. Bande 3, Glut1) und die Blutgruppen-Antigene. Die Verknüpfung des Zytoskeletts mit der Membran wird hauptsächlich über zwei makromolekulare Komplexe, dem Ankyrin- und dem 4.1R-Komplex, vermittelt. So wird zum Beispiel das Transmembranprotein Bande 3 über Ankyrin und das Glykophorin C über 4.1R mit dem Zytoskelett verbunden (154-156). Insbesondere der 4.1R-Komplex mit Spektrin scheint eine Schlüsselrolle für die Stabilität der Membranstruktur zu übernehmen (150). Neben diesen makromolekularen Komplexen bestehen weitere Verbindungen zwischen dem Zytoskelett und der Membran und es wird angenommen, dass Dematin und Adducin über den Glukosetransporter Glut1 mit der Membran verbunden sind (157).

### 1.6 Die Membran und das Zytoskelett von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten

Wie eingangs erwähnt, werden infizierte Erythrozyten im Laufe der Entwicklung des Parasiten weitreichend modifiziert und verlieren ihre bikonkave Form (Abb. 6A). Dies wird durch den Aufbau neuer Strukturen innerhalb der Wirtszelle und den Export einer Vielzahl von Proteinen erreicht, die sowohl mit dem Zytoskelett als auch mit der Membran der Wirtszelle interagieren (Abb. 6B).



**Abb. 6: Struktur von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten.** **A:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines nicht-infizierten Erythrozyten, umringt von mehreren infizierten Erythrozyten mit *knobs* (weiße Pfeile). **B:** Schematische Darstellung der *knobs* sowie der möglichen Zielstrukturen von exportierten parasitären Proteinen. RESA - ring-infected surface antigen, PFEMP1 und 3 - *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 und 3, MESA - mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen, KAHRP - knob-associated histidine rich protein, REX1 - ring-exported protein 1, PFSBP1 - *P. falciparum* skeleton-binding protein 1, MAHRP-1 - membrane-associated histidine-rich protein-1, Pf332 - *P. falciparum* antigen 332. Abbildung verändert nach (158) und (44).

Die Oberfläche der infizierten Erythrozyten ist mit noppenartigen Erhebungen (Durchmesser ca. 100 nm) übersät (159). Diese werden als *knobs* bezeichnet, bestehen hauptsächlich aus dem Protein KAHRP und dienen als Ankerplattform für den Virulenzfaktor PfEMP1 (160,161). Zusätzlich bindet KAHRP sowohl an erythrozytäres alpha Spektrin (162) als auch an Ankyrin (163) und eine Deletion des Proteins veränderte die Adhärenz- und Stabilitätseigenschaften der Wirtszelle (164,165). Bei PfEMP1 handelt es sich um ein 200-250 kDa großes Protein, welches durch die Familie der *var* Gene kodiert wird. Es gibt insgesamt 59 *var* Gene und der Parasit besitzt gleichzeitig immer nur eine einzige Variante von PfEMP1 (166). Jedoch kann nach Änderung der Genexpression auf eine andere Variante von PfEMP1 umgeschaltet werden, um so dem Immunsystem des Wirts zu entgehen (167). Weitere Proteine, die mit Spektrinen interagieren sind RESA (*ring-infected surface antigen*) und PfEMP3 (168-171). Versuche mit rekombinanten RESA haben gezeigt, dass Spektrinmoleküle thermisch stabiler waren und dass Erythrozyten infiziert mit RESA-negativen Parasiten anfällig gegenüber Hitze sind (170,172,173). Beides spricht für eine Rolle von RESA zum Schutz infizierter Erythrozyten gegen Fieberschübe. Im Gegensatz dazu bindet PfEMP3 in der Nähe des 4.1R-Komplexes an Spektrin, zerstört so die Spektrin-Aktin-4.1R Interaktion und mindert so die Deformierbarkeit von spät-infizierten Erythrozyten (165,174). Zusätzlich interagiert auch MESA (*mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen*) mit dem 4.1R-Komplex, indem es an den N-Terminus von 4.1R bindet und so die Interaktion mit p55 und Glykophorin C moduliert (175,176). Pf332 (*P. falciparum antigen 332*) ist mit 1 MDa das bisher größte bekannte Protein von *P. falciparum*, welches zur Erythrozytenmembran exportiert wird (44). Dieses hoch-negativ geladene Protein ist ebenfalls bei der Modifikation des Wirtszellzytoskeletts beteiligt und scheint zusätzlich bei der Organisation der *Maurer's clefts* eine Rolle zu spielen (177,178). Mit REX1 (*ring-exported protein 1*) ist ein weiteres Protein in dieser Organisation involviert und interagiert mit der zytoplasmatischen Seite der *Maurer's clefts* (179,180). Die Proteine MAHRP-1 (*membrane-associated histidine-rich protein-1*) und PfSBP1 (*P. falciparum skeleton-binding protein 1*) sind ebenso auf dieser Seite der *Maurer's clefts* zu finden, besitzen jedoch andere Funktionen (129,181). Für beide Proteine ist eine Rolle im Transport von PfEMP1 beschrieben (132,182,183). Zusätzlich scheint PfSBP1 an der Verbindung der *Maurer's clefts* mit dem Zytoskelett der Erythrozyten beteiligt zu sein (129). Damit im Einklang stehen Ergebnisse aus der Immunelektronenmikroskopie, die eine Assoziation von PfSBP1 mit tubulären Strukturen zeigen (184). Neben den eben beschriebenen und in Abb. 6B aufgeführten Proteinen, werden auch verschiedene Enzyme wie FEST (*falciparum-exported Ser/Thr protein kinase*) (185), PfCDPK1 (*P. falciparum calcium-dependent protein kinase 1*) (186), PP1 (*protein phosphatase 1*) (187), PfACS1 und 3 (*P. falciparum fatty acyl-CoA*



*synthetase 1* und *3*) (188,189) exportiert. Diese Enzyme könnten sowohl parasitäre als auch erythrozytäre Proteine als Zielmoleküle haben. Des Weiteren werden auch Proteine der Rhoptrien, wie der RhopH-Komplex (*high-molecular mass rhoptry protein complex*) in das Wirtszellzytoplasma transportiert. Auch hier sind die genauen Mechanismen nicht bekannt und es wird eine Beteiligung am Aufbau des Zytoadhärenzkomplexes postuliert (190). Zusätzlich zu dieser Vielzahl von exportierten parasitären Proteinen und den Modifikationen von erythrozytären Proteinen könnte auch der Import von erythrozytären Membran- und Zytoskelettproteinen, wie kürzlich am Beispiel von Dematin gezeigt (191), an der Veränderung der Wirtszelleigenschaften beteiligt sein.

### 1.7 Proteomics

Der Begriff „Proteom“ wurde von Marc Wilkins eingeführt und umfasst alle Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder Organismus, die zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhanden sind (192). Anders als das relativ statische Genom, ist das Proteom, nicht zuletzt wegen der vielfältigen posttranslationalen Modifikationen, hochgradig dynamisch und kann sich in seiner Zusammensetzung qualitativ wie quantitativ verändern. Hierfür können jegliche äußere Einflüsse, wie Temperatur oder Strahlung usw. als Auslöser dienen. Im Jahr 2002 wurde das Genom von *P. falciparum*, bestehend aus 23 Megabasen und für ca. 5300 Gene codierend, komplett sequenziert (193). Davon wurden ca. 60 % der vorhergesagten Genprodukte als „hypothetische Proteine“ eingestuft, da bei diesen keinerlei signifikante Ähnlichkeiten zu Proteinen anderer Organismen gefunden werden konnten. Mit 31 % wurde für knapp ein Drittel der Genprodukte mindestens eine Transmembrandomäne und für ca. 17 % ein Signalpeptid vorhergesagt (193). Noch im selben Jahr erschienen zwei Studien über das Gesamtproteom des Parasiten (194,195). Die Gruppe um Florens identifizierte über 2400 Proteine der asexuellen Stadien und der Gametozyten. Ein Großteil dieser Proteine wurde als unbekannt oder hypothetisch klassifiziert. Im Gegensatz dazu identifizierte Lasonder *et. al.* etwas mehr als 1200 Proteine, von denen 714 den asexuellen Stadien zugeordnet wurden. Zusätzlich schienen 575 Proteine einzig im sexuellen Stadium aufzutreten. Bei diesen Ansätzen handelte es sich um die sogenannte „*Expression Proteomics*“, da hier das Gesamtproteom des Parasiten betrachtet wurde (196,197). Das Problem bei solchen Studien ist, dass aufgrund der extrem komplexen Probe insbesondere die Proteine, welche in wenigen Kopien vorliegen oft nicht identifiziert werden können. Deshalb wurden später Proteomstudien, die sogenannte „*Cell Map Proteomics*“ oder „*Interaction Proteomics*“ (196,197), durchgeführt, welche sich mit bestimmten Stadien, Organellen oder Teilstrukturen von *P. falciparum* befassten. Hierzu

zählen zum Beispiel Studien über die Merozoiten (198-200), die *Maurer's clefts* (201,202), die Rhoptrien (203) und die parasitophore Vakuole (204,205). Demgegenüber beschäftigten sich nur relativ wenige Arbeiten mit einer systematischen Proteomanalyse von Oberflächen-, Membran-assoziierten- und Membranproteinen von infizierten Erythrozyten (206-208). Während Florens *et. al.* eine 2D Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit MS/MS verwendete, kam in den Arbeitsgruppen um Rabilloud und Wu die klassische 2D IEF/SDS PAGE mit anschließender MALDI-TOF MS zum Einsatz. Zwar hat sich die 2D IEF/SDS PAGE in den letzten Jahrzehnten bei der Gel-basierten Auftrennung von komplexen Proteingemischen etabliert, jedoch weist diese Technik signifikante Limitierungen bei der Darstellung von hydrophoben Proteinen, wie Membranproteinen, auf (209-211). Aus diesem Grund müssen alternative Wege zur Darstellung des Membranproteoms infizierter Erythrozyten gefunden werden, um letztendlich auch diese Proteine der Massenspektrometrie besser zugänglich zu machen.

### **1.8 Zielsetzung**

Das klinische Krankheitsbild der Malaria ist eng mit dem intraerythrozytären Lebenszyklus von *P. falciparum* verknüpft. In Folge der Veränderungen der Wirtszelle kommt es unter anderem zu einer erhöhten Permeabilität der Wirtszellmembran, einer gesteigerten Zytoadhärenz und einer veränderten Zellmorphologie der Wirtszelle. Insbesondere die erhöhte Zytoadhärenz wird für eine Vielzahl der teils lebensbedrohlichen klinischen Symptome verantwortlich gemacht. Auslöser hierfür ist eine Vielzahl von Proteinen, die der Parasit exportiert. Bislang ist nicht verstanden, wie viele Proteine exportiert werden und nur wenige der bekannten sind bisher charakterisiert. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit, durch einen „*Cell map Proteomics*“-Ansatz das Proteom der Wirtszellmembran von Erythrozyten, infiziert mit verschiedenen Stadien von *P. falciparum*, zu untersuchen. Neben der Markierung von Oberflächenproteinen der Wirtszellmembran mit Fluoreszenzfarbstoffen, sollten verschiedene Gel-basierte Techniken für die Auftrennung und Darstellung des Membranproteoms infizierter Erythrozyten etabliert werden. Hierfür musste zunächst eine Methodik für die Separierung der Wirtszellmembran vom intrazellulären Parasiten erarbeitet werden. Nach erfolgreicher Isolierung und Anreicherung des Kompartiments sollten die Proteine extrahiert, mittels verschiedener 1D- und 2D-Gelelektrophoresen aufgetrennt und schließlich massenspektrometrisch analysiert werden. Die daraus resultierenden Daten sollten miteinander verglichen und ausgewertet werden, um so eine umfassende Studie über den Proteinbesatz der Wirtszellmembran zu erhalten.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

5-Brom-4-Chlor-Indoxylphosphat	Roth, Karlsruhe
Acetonitril	Roth
Acrylamidlösung 2K, Gel 30, 32:1	Applichem, Darmstadt
Acrylamidlösung Gel 30, 37,5:1	Roth
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
AlbuMAX II	GIBCO, Karlsruhe
Aluminiumsulfat ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ )	Merck, Darmstadt
Ammoniumbicarbonat	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	Roth
Ammoniumpersulfat	Roth
Aminosulfobetain-14	Calbiochem, Schwalbach
Aminosulfobetain -80	Calbiochem
Ascorbinsäure	Roth
Benzyldimethyl-n-hexadecylammoniumchlorid	Sigma
BD FACS Accudrop Beads	BD Biosciences, Heidelberg
Bisacrylamidlösung 2 % (w/v), Gel B	Roth
Borsäure	Merck
Bovines Serumalbumin	Sigma
Bromphenolblau	Applichem
Cetyltrimethylammoniumbromid	Calbiochem
CHAPS	Roth
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure	LaserBio Labs
Coomassie-Brillantblau G250	Applichem
CyDye3-Farbstoff	GE Healthcare, München
CyDye3-Farbstoff	Lumiprobe, Moskau, Russland
Dikaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	Roth
Dimethylformamid	Fluka, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Roth

## Material

---

Dithiothreitol	Roth
Eisen(II)sulfat (FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O)	Merck
Essigsäure	Roth
Ethanol (≥99,8 % (v/v) p.a.)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure, di-Natriumsalz	Serva
Formaldehyd 37 % (v/v)	Sigma
Furosemid	Sigma
GDye100, GDye200	DyeAGNOSTIC, Halle
Gelafundin	B. Braun, Melsungen
Giemsa-Lösung	Merck
Glukose	Roth
Glutardialdehyd	Sigma
Glyzerin (≥86 % (v/v))	Roth
Glyzin	Merck
Harnstoff	Sigma
HEPES	Roth
Hoechst 33258	Sigma
Immobiline™ Dry Strip pH 3-10 NL	GE Healthcare
IPG Puffer pH 3-10 NL	GE Healthcare
Iodacetamid	Calbiochem
Isopropanol	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Applichem
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Applichem
Methanol	Roth
MicroBCA™ Protein Assay Kit	Pierce
MobiGLOW Mounting Medium	Mo Bi Tec, Göttingen

## Material

---

Natriumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	Roth
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth
Natriumdodecylsulfat, ultra	Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumthiosulfat (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Roth
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	Roth
Paraformaldehyd	Applichem
Percoll	GE Healthcare
Phosphorsäure 85 % (w/v)	Roth
Protease Inhibitor Cocktail Complete (PIC), EDTA-frei	Roche
Pyronin Y	Applichem
RPMI 1640, 25 mM HEPES	Sigma
Salzsäure 37 % (v/v), (HCl)	Roth
Saponin (aus <i>Q. saponaria</i> )	Sigma
SeeBlue Plus2	Invitrogen
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Sigma
Sorbitol	Sigma
Tetramethylethylendiamin	Roth
Thioharnstoff	Fluka
Trifluoressigsäure	Applichem
Tris	Roth
Trypsin MS approved	Serva
Trypsin	Promega
Tween 20	Applichem
Wasserstoffperoxid 30 % (v/v), (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Roth
Vybrant® DyeCycle™ Violett	Invitrogen

## 2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

8-Kanalpipette E8-200	Mettler Toledo
AB SCIEX TOF/TOF™ 5800	AB Sciex, USA
BD FACSAria	BD Biosciences
Ettan™ Digester	GE Healthcare
Ettan™ IPGphor™ 2 IEF System	GE Healthcare
Ettan™ Spot Picker	GE Healthcare
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1, Apotom	Zeiss, Jena
Inkubator BB6060	Heraeus
Inkubator CB 150	Binder, Tuttlingen
LEDETECT 96	Deelux, Gödenstorf
Lichtmikroskop Axioskop 40	Zeiss
Multiskan® MCC/340	Titertek, USA
PerfectBlue™ Semi Dry Electroblotter	Peqlab, Erlangen
PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter Web M	Peqlab
PerfectBlue™ Twin Doppelgelsystem in S, M und L	Peqlab
Peristaltikpumpe LKB Pump P-1	Pharmacia
pH340/ION pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer Ultraspec 1100 pro	Amersham Biosciences
Probot Mikrofraktionssammler	Dionex, Niederlande
Reinstwasseranlage GenPure	TKA, Niederelbert
Spannungsgeber E835 und E861	Consort
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Typhoon Trio	GE Healthcare
U3000 nanoHPLC-System	Dionex
Ultraschallbad Sonorex Super RK 106	Bandelin Sonorex
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Zentrifugen	
Centrifuge 5417 R/ F45-30-11	Eppendorf, Hamburg
Minispin	Eppendorf
Rotanta 460 R	Hettich, Tuttlingen
SpeedVac UVS400A/ RH40.12, RH2MP	Thermo Fisher Scientific
Ultrazentrifuge L7-65/ 70 Ti	Beckmann

Alle Plastikmaterialien wurden, soweit nicht anders beschrieben von der Firma Sarstedt bezogen.

96-Loch-Spitzbodenplatte Nerbe plus	Winsen
96-Loch-Spitzbodenplatte aus PP	Greiner-Bio, Frickenhausen
96-Loch-U-Bodenplatte aus PP	Greiner-Bio

### 2.3 Software

Axiovision Rel 4.5	Zeiss
BD FACSDiva	BD Biosciences
GPS Explorer 3.6	Applied Biosystems
ImageMaster™ 2D	GE Healthcare
MASCOT-Server Version 2.0	Matrix Science, London, UK

Für die Vorhersage von strukturellen Besonderheiten von Proteinen wurden die Algorithmen SignalP 3.0, TMHMM 2.0 und ExportPred verwendet.

### 2.4 Antikörper

Kaninchen-anti-EXP2-Antikörper	Prof. K. Lingelbach, Marburg
Kaninchen-anti-PfAldolase-Antikörper	Prof. K. Lingelbach, Marburg
Kaninchen-anti-PV-1-Antikörper	Prof. K. Lingelbach, Marburg
Maus-anti-Bande-3-Antikörper	Sigma
Maus-anti-MAHRP-1-Antikörper	Prof. H. P. Beck, Basel, Schweiz
Maus-anti-RAP-1-Antikörper	Prof. K. Lingelbach, Marburg
Meerschweinchen-anti-PfEMP1-Antikörper	Prof. H. P. Beck, Basel, Schweiz
Ziege-anti-Kaninchen IgG-AP	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen IgG-DyLight549	Jackson I. Research, England
Ziege-anti-Maus IgG-AP	Jackson I. Research
Ziege-anti-Maus IgG-DyLight488	Jackson I. Research
Ziege-anti-Meerschweinchen IgG-AP	Jackson I. Research

### 3 Methoden

#### 3.1 *Plasmodium falciparum*-Stämme und Erythrozyten

Die *P. falciparum* Stämme FCBR (von Prof. Dr. K. Lingelbach, Marburg) und 3D7 (von Prof. Dr. R.D. Walter, Hamburg) wurden in Dauerkulturen gehalten. Humane Erythrozyten Konzentrate (Blutgruppe A, Rhesus Faktor positiv) wurden vom Institut für Transfusionsmedizin UKSH Kiel bezogen. Die Konzentrate waren bei ihrer Verwendung nicht älter als vier Wochen.

#### 3.2 *In-Vitro*-Kultivierung von *P. falciparum*

Die *in-vitro* Kultur der erythrozytären Stadien von *P. falciparum* wurde unter sterilen Bedingungen verändert nach den Methoden von Trager und Jensen (212) durchgeführt und es wurden folgende Lösungen verwendet:

NaHCO <sub>3</sub> -Lösung:	8 % (w/v) NaHCO <sub>3</sub> in ddH <sub>2</sub> O
RPMI 1640-Medium:	15,43 g RPMI 1640 ad 900 ml in ddH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
RPMI 1640-Medium (gepuffert):	900 ml RPMI 1640-Medium, 40 ml NaHCO <sub>3</sub> -Lösung
Albumax II-Lösung:	5 % (w/v) Albumax II in RPMI 1640-Medium (gepuffert)
Komplettmedium:	20 mM Glukose, 0,05 mg/ml Gentamycinsulfat, 0,25 % (v/v) Albumax II-Lösung in RPMI 1640-Medium (gepuffert)
Erythrozyten:	50 % (v/v) Hämatokrit in Komplettmedium

Die Dauerkulturen von *P. falciparum* wurden in 100 ml Komplettmedium mit 2,5 % Hämatokrit in 250 ml Kulturflaschen gehalten und unter sauerstoffarmer Atmosphäre (1 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 94 % N<sub>2</sub>, Air Liquide) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dabei wurde das Medium mindestens aller zwei bis drei Tage gewechselt. Da *in vitro* eine zu hohe Parasitämie zum Absterben der Parasiten führt, wurde darauf geachtet, dass diese einen bestimmten Wert nicht überschreitet (asynchron 7 %, synchrone Ringstadien 10 %, Trophozoiten und Schizonten 5 % Parasitämie).



### **3.2.1 Mikroskopische Analyse von *P. falciparum* nach Giemsa-Färbung**

Für die mikroskopische Untersuchung von Parasitenkulturen zur Bestimmung der Parasitämie und der Parasitenstadien wurden Blutausstriche auf Glasobjektträgern angefertigt. Diese wurden im Luftstrom der Sterilbank getrocknet und für 30 s in 100 % (v/v) Methanol fixiert. Anschließend wurden die Ausstriche in Giemsa-Färbelösung (10 % (v/v) Giemsa-Lösung, 3,6 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) für mindestens 10 min gefärbt. Die überschüssige Färbelösung wurde mittels Leitungswasser gründlich abgespült und der Objektträger wurde auf einer Heizplatte getrocknet. Die mikroskopische Untersuchung und die Bestimmung der Parasitämie erfolgten bei 1000-facher Vergrößerung mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv. Hierbei wurden Erythrozyten mit Mehrfachinfektionen immer als einfach infiziert gezählt.

### **3.2.2 Einfrieren von *P. falciparum***

Für das Einfrieren von Parasiten wurde eine Parasitenkultur mit ca. 3 % Ringstadien verwendet. Nach Zentrifugation (800xg, 10 min, RT) wurde das resultierende Zellsediment in zwei Volumen 30 % (w/v) Glycerin in PBS vorsichtig resuspendiert und zu je 500  $\mu\text{l}$  in sterile Kryo-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde zum Abkühlen für 10 min auf Eis gestellt und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **3.2.3 Auftauen von *P. falciparum***

Die im Stickstoff eingefrorenen Zellen wurden unter leichtem Schütteln bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Anschließend wurden zwei Volumenteile kalter Lösung A (27 % (w/v) D-Sorbitol in PBS, pH 7,4) unter leichtem Schütteln tropfenweise hinzugefügt und die Suspension für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden zwei Volumenteile der kalten Lösung B (5 % (w/v) D-Sorbitol in PBS, pH 7,4) ebenfalls tropfenweise hinzugefügt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (800xg, 5 min, 4 °C) wurde das Zellsediment in zwei Volumenteile kalter Lösung B vorsichtig resuspendiert, 8 min auf Eis gestellt und erneut zentrifugiert (800xg, 5 min, 4 °C). Nach zweimaligem Waschen in Kompletmedium, wurden die Zellen schließlich unter Standardbedingungen kultiviert.

### **3.2.4 Synchronisation einer *P. falciparum*-Kultur mit D-Sorbitol**

Durch die Behandlung mit D-Sorbitol kann eine Plasmodienkultur auf Ringstadien synchronisiert werden. Hierbei dringt das D-Sorbitol in die Zellen ein und es wird durch Zugabe von Komplettmedium ein osmotischer Schock ausgelöst. Späte Stadien können dieser Prozedur nicht standhalten und platzen, wodurch eine synchrone Kultur aus Ringstadien und nicht-infizierten Erythrozyten entsteht (29). Zellen der zu synchronisierenden Kultur wurden zentrifugiert (500xg, 5 min, RT), in neun Volumenteile steriler 5 % (w/v) D-Sorbitollösung resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde der osmotische Schock durch Zugabe der gleichen Menge Komplettmedium ausgelöst, die Zellsuspension sedimentiert (500xg, 5 min, RT) und das erhaltene Zellsediment einmal in Komplettmedium gewaschen. Die Ringstadien wurden schließlich unter Standardbedingungen weiterkultiviert.

### **3.2.5 Synchronisation einer *P. falciparum*-Kultur über Gelafundin**

Während seiner Entwicklung bildet der *P. falciparum*-Stamm FCBR in den mittleren bis späten Phasen sogenannte *knobs* aus. Dabei handelt es sich um membranassoziierte Strukturen auf der Oberfläche der Wirtszelle, welche deren Sedimentationseigenschaften verändern (213). Bei Zugabe von Gelafundin sinken Zellen ohne *knobs* (nicht infizierte Erythrozyten sowie Ringstadien) schneller zu Boden als Zellen welche diese Strukturen auf der Oberfläche präsentieren. Um sicherzustellen dass die Ausbildung der *knobs* nicht verloren geht, wurden die Parasitenkulturen mindestens einmal pro Woche mit Gelafundin behandelt. Hierzu wurden die Zellen zentrifugiert (500xg, 5 min, RT) und das Zellsediment wurde in 1,4-fachen Sedimentvolumen Komplettmedium resuspendiert. Nach Zugabe von 2,4-fachen Sedimentvolumen 4 % (w/v) Gelafundin wurde die Zellsuspension bei 37 °C im Wasserbad für 15 min inkubiert. Anschließend wurde der Überstand, in dem sich die Zellen mit ausgebildeten *knobs* befanden, vorsichtig abgenommen und zentrifugiert (500xg, 5 min, RT). Schließlich wurden die Zellen einmal in Komplettmedium gewaschen und unter Standardbedingungen weiter kultiviert.

### **3.2.6 Anreicherung von späten Parasitenstadien über Percoll**

Aufgrund unterschiedlicher Dichteigenschaften von nicht-infizierten und spät-infizierten Erythrozyten können Schizonten mittels Percoll angereichert werden (Protokoll verändert nach 214). Hierfür wurden die Zellen einer Kultur mit Schizonten zentrifugiert (500xg, 5 min, RT) und das Zellsediment in 5 ml PBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde vorsichtig auf ein 25 ml Percoll-Kissen (65 % (v/v) Percoll in PBS) und zentrifugiert (1500xg, 20 min, RT, ohne Bremse). Die Schizonten sammelten sich dabei an der Phasengrenze und wurden vorsichtig abgenommen. Um das restliche Percoll zu entfernen wurden die Zellen mit PBS gewaschen.

### **3.3 Markierung von Proteinen der Wirtszelloberfläche mittels Fluoreszenzfarbstoffen**

Um Proteine auf der Wirtszelloberfläche zu markieren wurden die Farbstoffe Cy3 (GE Healthcare), Cy3 (Lumiprobe), GDye100 (DyeAGNOSTICS) und GDye200 (DyeAGNOSTICS) eingesetzt. Hierfür wurden die Zellen mit PBS (pH 8,0) und anschließend mit PBS (pH 8,5 mit 1 M Harnstoff) gewaschen. Für die Markierungsreaktion wurden  $5 \times 10^8$  Zellen in PBS (pH 8,5 mit 1 M Harnstoff) mit 200 pmol Fluoreszenzfarbstoff für 30 min auf Eis inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 10  $\mu$ l G-Dye Stopp Lösung und anschließender zehnminütiger Inkubation auf Eis. Schließlich wurden die Zellen mehrfach mit PBS (pH 7,5) gewaschen und zur mikroskopischen Analyse auf einen Objektträger gegeben. Alternativ wurden die Zellen vor der Markierungsreaktion entweder mit 100  $\mu$ M Furosemid (215), mit 50  $\mu$ M Chloroquin oder mit 100  $\mu$ M Furosemid in Kombination mit 50  $\mu$ M Chloroquin vorinkubiert. Die Behandlung mit Furosemid erfolgte dabei für 5 min direkt vor der Markierungsreaktion und Chloroquin wurde am Vortag im Ringstadium eingesetzt.

### **3.4 Anreicherung der erythrozytären Plasmamembran**

Sowohl bei nicht-infizierten Erythrozyten, als auch bei Erythrozyten infiziert mit verschiedenen Stadien von *P. falciparum* erfolgte die Anreicherung der erythrozytären Plasmamembran durch Lyse mit Saponin und anschließender differentieller Zentrifugation. Bei infizierten Erythrozyten wurden die Stadien zunächst synchronisiert und angereichert (späte Stadien über Percoll, frühe Stadien mittels Durchflusszytometrie), bevor die Zellen für 3 min mit 0,05 % (w/v) Saponin in PBS lysiert wurden. Hierbei wurde nach jeder Minute kurz gevortext und schließlich zentrifugiert (1500 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, erneut zentrifugiert (130000 x g, 45 min, 4 °C) und das resultierende Sediment wurde mehrmals

gewaschen bis keine rötliche Verfärbung erkennbar war. Das finale Sediment wurde entweder in Protein-Extraktionslösung aufgenommen oder bei -20 °C gelagert.

### **3.5 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Zum indirekten Nachweis, sowie der Lokalisierung verschiedener Proteine wurde in dieser Arbeit die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet. Hierfür wurden Zellen für 15 min bei Raumtemperatur fixiert (4 % (w/v) Paraformaldehyd, 0,0075 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS, pH 7,4), mit PBS gewaschen und durch anschließende Inkubation mit 1 % (v/v) Triton X-100 in PBS für 15 min permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS für 15 min inkubiert und mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 5 % (w/v) BSA in PBS für 1 h bei RT blockiert und die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht in einer dunklen Feuchtkammer bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit sekundärem Antikörper für 1 h bei 37 °C inkubiert. Um zusätzlich die DNA und damit die Zellkerne anzufärben, wurde der Farbstoff Hoechst 33258 (2 µg/ml) hinzugegeben und für weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden die Präparate nach mehrmaligem Waschen mit PBS in MobiGlow Mounting Medium (MoBiTec, Göttingen) eingebettet und mikroskopisch analysiert.

### **3.6 Western Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran**

Der Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (verändert nach 216) wurde mit dem *Tank-Blot* Verfahren (PerfectBlue Tank-Elektroblotter Web M, Peqlab) durchgeführt. Zunächst wurden die Filterpapiere und die PVDF-Membran auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten und die Membran in 100 % (v/v) Methanol aktiviert. Der Aufbau der *Blot*-Kassette erfolgte nach Herstellerangaben und der Transfer der Proteine wurde in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) durch anlegen von 100 V für 1 h unter Wasserkühlung erreicht.

### **3.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer PVDF-Membran**

Nach dem Transfer der Proteine, wurden freie Bindungsstellen auf der PVDF-Membran durch eine einstündige Inkubation mit 2 % (w/v) BSA in TTBS (0,05 % (w/v) Tween-20, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) blockiert. Danach wurde die Membran mit dem ersten Antikörper (1:600 verdünnt in TTBS) über Nacht bei 4 °C inkubiert und dreimal für je 20 min mit TTBS gewaschen. Der zweite Antikörper mit gekoppelter Alkalischer Phosphatase (1:10000 verdünnt in TTBS) wurde für mindestens 1h bei RT mit der Membran inkubiert und anschließend wurde mehrmals mit TTBS gewaschen. Die Membran wurde kurz in AP-Puffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) äquilibriert und die Farbreaktion durch Zugabe einer BCIP/NBT Reaktionslösung in AP-Puffer gestartet. Zum Stoppen der Farbreaktion wurde die Membran ausgiebig mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mittels Druckluft getrocknet.

### **3.8 Quantitative Proteinbestimmung**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Mikro-BCA-Test (Pierce) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Messung der Absorption in Flachboden-Mikrotiterplatten erfolgte bei 570 nm im Multiskan<sup>®</sup> MCC/340 von Titertek. Mittels einer Kalibrationsreihe aus verschiedenen BSA-Lösungen (bovines Serumalbumin, Sigma-Aldrich) definierter Konzentrationen (0 bis 0,4 mg/ml) in BCA-kompatiblen Probenpuffer (3 M Harnstoff, 2 % (w/v) SDS, 1 % (w/v) CHAPS, 10 % (v/v) Glycerin) wurden die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt. Die zu messenden Proben lagen immer

### **3.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

#### **3.9.1 Eindimensionale SDS-PAGE**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in abgewandelter Form nach Laemmli (217) durchgeführt. Durch den Einsatz des anionischen Detergenz SDS wurden die Proteine denaturiert, sowie deren Eigenladung maskiert. Hierzu wurden die Proben in 6x SDS-Probenpuffer (0,35 M Tris, 10,28 % (w/v) SDS, 36 % (w/v) Glycerin, 0,012 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen und nach Zugabe von 50 mM DTT für 20 min bei 56 °C reduziert. Danach wurden die Proben durch Zugabe von 150 mM IAA alkyliert (20 min, RT) und abschließend zentrifugiert (20000xg, 5 min, RT). Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in einem diskontinuierlichen Gelsystem bestehend aus einem

niederprozentigen Sammelgel und einem höherprozentigen Trenngel (Zusammensetzung siehe Tabelle 1). Für die eindimensionale SDS-PAGE wurde eine vertikale 10×10 cm Gelapparatur von Peqlab verwendet. Nach dem Befüllen der Gelapparatur mit SDS-Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS), erfolgte die Elektrophorese für 30 min bei 20 mA/Gel und wurde bei 30 mA fortgesetzt bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

**Tabelle 1: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels der eindimensionalen SDS-PAGE**

	Sammelgel	Trenngel		
	4 %	10 %	12,5 %	15 %
Acrylamid 2K-Lösung	1,33 ml	/	/	/
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	/	3,32 ml	4,17 ml	4,98
4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8)	2,5 ml	/	/	/
4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8)	/	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
40 % (w/v) APS	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
TEMED	5 µl	3,5 µl	3,5 µl	3,5 µl
ad ddH <sub>2</sub> O	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

### 3.9.2 Zweidimensionale PAGE (Isoelektrische Fokussierung / SDS-PAGE)

Die (klassische) zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) kombiniert die isoelektrische Fokussierung (IEF) in der ersten Dimension mit der SDS-PAGE in der zweiten Dimension und wurde 1975 unabhängig voneinander durch O'Farrell (218) und Klose (219) entwickelt. Bei der IEF werden die Proteine anhand der Ladung nach ihrem charakteristischen isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt. Durch unterschiedliche, pH-Wert abhängige (De)protonierungszustände der sauren und basischen Aminoreste wandern die Proteine im elektrischen Feld bis sie ihren pI erreicht haben. An diesem Punkt heben sich positive und negative Ladungen des Proteins auf und die Nettoladung beträgt 0. In der zweiten Dimension werden dann die Proteine nach ihrem Molekulargewicht weiter orthogonal aufgetrennt.

Für die isoelektrische Fokussierung wurden 18 cm lange Gelstreifen mit einem immobilisierten nicht-linearen pH-Gradienten (Immobiline™ Dry Strip pH 3-10 NL, GE Healthcare) verwendet. Das Rehydrieren der Gelstreifen mit gleichzeitiger Probenaufnahme wurde durch die „in gel reswelling“-Methode (220) erreicht. Hierzu wurde die Probe mit Rehydratisierungslösung (8 M

Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % (w/v) CHAPS, 2 % (w/v) ASB-14, 40 mM DTT, 0,5 % (v/v) IPG Puffer pH 3-10 NL) auf ein Volumen von 340 µl aufgefüllt und gleichmäßig über den Gelstreifen verteilt. Die isoelektrische Fokussierung wurde bei 20 °C und maximal 50 µA je Gelstreifen nach folgendem Protokoll durchgeführt:

0 V Rehydrierung	6 h
50 V konstant	6 h
200 V konstant	1 h
500 V konstant	1 h
1000 V Gradient	4 h
8000 V Gradient	4 h
8000V konstant	bis 55000 Vh

Anschließend wurden die Gelstreifen zweimal in 10 ml Äquibrierungslösung (50 mM Tris, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 0,0001 % (w/v) Bromphenolblau) für je 15 min bei RT inkubiert. Beim ersten Äquibrierungsschritt wurden 65 mM DTT und beim zweiten Äquibrierungsschritt 135 mM IAA hinzugegeben. Schließlich wurden die Gelstreifen kurz in SDS-Elektrophoresepuffer geschwenkt. Als zweite Dimension wurde die SDS-PAGE (siehe Tabelle 1) in einer vertikalen 20×20 cm Gelapparatur von Peqlab und eine Geldicke von 1,5 mm verwendet. Die Gelstreifen der ersten Dimension wurden luftblasenfrei auf ein 10%iges SDS-Trenngel aufgelegt und mit 0,8 % (w/v) Agarose in SDS-Elektrophoresepuffer fixiert. Es wurde kein zusätzliches Sammelgel verwendet und die Elektrophorese erfolgte mit 10 mA je Gel über Nacht bei 20 °C.

### **3.9.3 Zweidimensionale PAGE (Kationische PAGE / SDS-PAGE)**

Im Gegensatz zur klassischen 2D IEF/SDS-PAGE wird bei der kationischen 2D-PAGE ein kationisches Detergenz in der ersten Dimension verwendet. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die kationischen Detergenzien Benzyldimethyl-n-hexadecylammoniumchlorid (16-BAC) und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) verwendet (modifiziert nach (221)). Die folgenden Mengenangaben von CTAB gelten äquivalent für den Einsatz von 16-BAC. Für die Gele der ersten Dimension wurde eine vertikale 20×20 cm Gelapparatur von Peqlab und eine Geldicke von 0,75 mm verwendet. Beim Gießen der Gele (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) musste schnell gearbeitet werden, da diese binnen weniger Minuten nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auspolymerisieren. Zusätzlich wurde das Trenngel vorsichtig mit Trenngelpuffer überschichtet,

um eine gerade Trennlinie zu erhalten. Nachdem das Trenngel vollständig auspolymerisiert war, wurde die überschüssige Lösung abgegossen und das Sammelgel hinzugegeben.

**Tabelle 2: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels der kationischen PAGE**

	Trenngel (7,5 %)	Sammelgel (5 %)
Harnstoff	9,1 g	1 g
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	12,5 ml	1,67 ml
Rotiphorese Gel B (2 % (w/v) Bisacrylamidlösung)	/	1,173 ml
Trenngelpuffer (300 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2,1 mit HCl)	12,5 ml	/
Sammelgelpuffer (500 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 4,1 mit HCl)	/	2,5 ml
Ascorbinsäure (80 mM) *	2,5 ml	0,5 ml
FeSO <sub>4</sub> (5 mM) *	80 µl	8,5 µl
16-BAC oder CTAB (250 mM) *	0,5 ml	70 µl
ad ddH <sub>2</sub> O	50 ml	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 % (v/v))	3,3 µl	0,8 µl

\* Lösungen müssen immer frisch angesetzt werden

Für die Solubilisierung der Proteine wurden die Proben in 2x Probenpuffer (7,5 M Harnstoff, 10 % (w/v) CTAB, 10 % (w/v) Glyzin, 75 mM DTT, 0,05 % (w/v) Pyronin Y) aufgenommen. Nach dem Befüllen der Gelkammer mit Laufpuffer (2,5 mM CTAB, 150 mM Glycin, 50 mM Phosphorsäure) wurde die Elektrophorese durch Anlegen einer Stromstärke von 10 mA gestartet. Nach 3 h wurde auf 12 mA erhöht bis die PyroninY Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Die Elektrophorese wurde gestoppt und der Gelstreifen mit der aufgetrennten Probe wurde herausgeschnitten. Daraufhin wurde der Gelstreifen dreimal in 10 ml Äquilibriumslösung (50 mM Tris pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 0,0001 % (w/v) Bromphenolblau) für je 15 min bei RT inkubiert. Beim zweiten Äquilibriumsschritt wurden DTT (65 mM Endkonzentration) und beim dritten Äquilibriumsschritt IAA (135 mM Endkonzentration) hinzugegeben. Als zweite Dimension wurde die SDS-PAGE (siehe Tabelle 1) in einer vertikalen 20x20 cm Gelapparatur von Peqlab und eine Geldicke von 1 mm eingesetzt. Anders als bei der 2D IEF/SDS PAGE wurde hier in der zweiten Dimension ein zusätzliches Sammelgel mit 1 cm Breite verwendet. Der Gelstreifen der ersten Dimension wurde luftblasenfrei auf das SDS-Sammelgel aufgelegt, mit 0,8 % (w/v) Agarose in SDS-Elektrophoresepuffer fixiert und die Elektrophorese erfolgte mit 10 mA je Gel über Nacht bei 20 °C.



### **3.10 Färbungen von Proteinen im Gel**

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im Gel wurden je nach Art der späteren Verwendung mittels kolloidaler Coomassie-Lösung (222), mittels Silbernitratfärbung (223) oder mittels Flamingo Pink (Biorad) sichtbar gemacht.

#### **3.10.1 Proteinfärbung mit kolloidaler Coomassie-Lösung**

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 2 min in ddH<sub>2</sub>O geschwenkt und anschließend wurden die Proteine im Gel für mindestens 1 h in Fixierlösung (30 % (v/v) Ethanol, 2 % (w/v) Phosphorsäure) fixiert. Die Inkubation mit Färbelösung (5 % (w/v) Aluminiumsulfat, 10 % (v/v) Ethanol, 0,02 % (w/v) CBB-G250, 2 % (w/v) Phosphorsäure) erfolgte über Nacht bei RT und leichtem Schütteln. Schließlich wurde das Gel solange entfärbt (10 % (v/v) Ethanol, 2 % (w/v) Phosphorsäure) bis die Proteinbanden sichtbar waren.

#### **3.10.2 Proteinfärbung mit Silbernitrat**

Die Silbernitratfärbung besitzt im Gegensatz zur Färbung mit Coomassie eine geringere Nachweisgrenze für Proteine und kann schneller durchgeführt werden. Der Nachteil dieser Färbemethode ist jedoch die Inkompatibilität zur massenspektrometrischen Analyse. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für je 10 min in Lösung 1 (5 % (v/v) Glutardialdehyd, 0,16 M Borsäure, pH 8,2), in Lösung 2 (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) und in Lösung 3 (30 % (v/v) Ethanol, 6,8 % (w/v) Natriumacetat, 0,125 % (v/v) Glutardialdehyd, 0,2 % (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) bei RT geschwenkt. Anschließend wurde das Gel viermal für 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit Lösung 4 (0,25 % (w/v) AgNO<sub>3</sub>, 0,015 % (v/v) Formaldehyd) für 20 min inkubiert. Nach kurzem Spülen mit ddH<sub>2</sub>O wurde das Gel mit Lösung 5 (2,5 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,0074 % (v/v) Formaldehyd, pH 11,5) entwickelt. Nach dem Erreichen der gewünschten Farbintensität, wurde die Entwicklerlösung abgenommen und die Farbreaktion gestoppt (1,5 % (w/v) EDTA).

#### **3.10.3 Proteinfärbung mit Flamingo Pink**

Bei dieser Färbung wurden die Gele zunächst über Nacht fixiert (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) und anschließend mit Flamingo Pink (Biorad) über Nacht gefärbt. Vor der Geldokumentation wurden die Gele zweimal mit ddH<sub>2</sub>O für 10 min gewaschen.

### **3.11 Geldokumentation, Probenisolierung und Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse**

Die folgenden Arbeitsschritte wurden im Labor von Prof. Ottmar Janßen (Institut für Immunologie, UKSH Kiel) durchgeführt. Die Dokumentation der Flamingo Pink gefärbten Gele erfolgte auf einem Flachbett Fluoreszenzscanner (Typhoon Trio Imager, 530 nm Bandpass, GE Healthcare) mit einer Pixelgröße von 100 µm und die dabei erhaltenen Gelbilder wurden mittels der ImageMaster Software ausgewertet. Hierbei wurde die Liste der zu isolierenden Gelstücke erstellt, welche durch den Ettan Spotpicker (2 mm Pickkopf, GE Healthcare) ausgestanzt und in eine Spitzboden-Mikrotiterplatte überführt wurden. Zur Qualitätskontrolle wurde das fertig ausgestanzte Gel erneut eingescannt. Die isolierten Gelstücke wurden im Ettan Digester (GE Healthcare) für je 20 min zunächst dreimal mit 100 µl ddH<sub>2</sub>O und dann zweimal mit 70 µl 25 mM ABC in 50 % (v/v) Methanol gewaschen. Die anschließende Dehydrierung erfolgte durch Zugabe von 100 µl 70 % (v/v) ACN. Bei der manuellen Prozessierung wurden die Gelstücke für je 20 min zunächst dreimal mit 100 µl ddH<sub>2</sub>O und dann mit 100 µl 25 mM ABC in 50 % (v/v) ACN gewaschen. Die Dehydrierung erfolgte mit 100 % (v/v) ACN.

### **3.12 Proteolytische Spaltung und massenspektrometrische Analyse**

Für die proteolytische In-Gel-Spaltung wurde zu den vollständig dehydrierten Gelstücken 100 ng Trypsin (MS approved, Serva) in 10 µl 20 mM ABC zugegeben und für 15 min bei 4 °C rehydriert. Anschließend wurden 10 µl 20 mM ABC auf die gequollenen Gelstücke gegeben und die Proben bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die proteolytische Spaltung durch Trypsin wurde durch die Zugabe von 0,3 % TFA in ACN gestoppt und anhand einer 15-minütigen Ultraschall-Behandlung wurde die Elution der Peptide aus der Gelmatrix gefördert. Danach wurde der Überstand in eine PP-Rundboden-Mikrotiterplatte (Greiner) überführt und die Gelstücke wurden mit 100 µl 100 % (v/v) ACN dehydriert. Der Überstand wurde mit dem bereits abgenommenen Überstand vereinigt und in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac) eingengt. Die Proben wurden schließlich mit 0,7 µl Matrixlösung (3.3 mg/ml rekristallisiertes CHCA (LaserBio Labs) in 50 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) TFA) aufgenommen und auf MALDI-Target (Opti-TOF™ LC MALDI Insert, Applied Biosystems) überführt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mit dem 5800 MALDI TOF/TOF Massenspektrometer (ABSciex) durch Herrn Thomas Jakoby (Institut für Experimentelle Medizin, Systematische Proteomforschung, Prof. Tholey, CAU Kiel). Zur internen Kalibrierung wurden die monoisotopischen Massen der Trypsin

Autolyse-Fragmente verwendet. Zur Generierung der MS/MS Spektren wurden je Spektrum 2000 Laserimpulse akkumuliert. Für die Auswahl der Vorläufer wurde ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 20 gesetzt und es wurden maximal 12 Vorläufer pro Spot verwendet. Im MS/MS Modus diente die Umgebungsluft als Kollisionsgas und die Kollisionsenergie wurde auf 1 keV eingestellt. Die resultierenden Spektren wurden mit Hilfe der GPS Explorer 3.6 Software an den MASCOT 2.2 Server übertragen. Die Datenbanksuche erfolgte gegen eine „in-house“ Datenbank (NCBI nr, Datum 03.11.2009; 2,775,237 Einträge; Taxonomie begrenzt auf Eukaryota) und beinhaltete die folgenden Parameter: obligate Carboxyamidomethylierung der Cysteine, mögliche Oxidation von Methionin und die maximale Anzahl an fehlenden tryptischen Spaltungen von 1. Die Proteine wurden als sicher identifiziert eingestuft, wenn Identifikationswahrscheinlichkeit höher als 95 % lag (MASCOT-Score  $\geq 78$ ). In dem Fall, dass die analysierten Peptide zu mehreren Mitglieder einer Proteinfamilie oder zu verschiedenen Isoformen von Proteinen zugeordnet werden konnten, wurde der Eintrag mit dem höchsten Score verwendet.

### **3.13 LC-MALDI TOF/TOF**

Die Proteine wurden vor der LC-MALDI TOF/TOF Massenspektrometrie mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit kolloidaler Coomassie-Lösung angefärbt. Die zu analysierenden Banden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und die isolierten Gelstücke wurden komplett entfärbt. Nach tryptischer Spaltung der Proteine mit Trypsin (Promega) und Elution der Peptide erfolgte die HPLC und die LC-MALDI TOF/TOF-Analyse durch Herrn Thomas Jakoby (Institut für Experimentelle Medizin, Systematische Proteomforschung, Prof. Tholey, CAU Kiel). Um die Probenmenge abschätzen zu können und gegebenenfalls Proben zusammenfassen zu können, wurden die Peptide zunächst ohne vorangehende Chromatographie mittels MALDI TOF/TOF analysiert (224). Dabei wurden die gleichen Messbedingungen verwendet, wie unter Punkt 3.11 beschrieben.

Für die Auftrennung mittels nano-HPLC wurden 10  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Probe mit 10  $\mu\text{l}$  0,1 % (v/v) TFA verdünnt und dann mit einem U3000 nanoHPLC-System (Dionex) über eine 50  $\mu\text{l}$  Probenschleife injiziert. Mittels einer Acclaim PepMap100 C18 Vorsäule (300  $\mu\text{m}$  I.D. x 10 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Dionex, Idstein, Deutschland) wurden die Proben konzentriert. Die Trapsäule wurde 6 min mit 0,1 % (v/v) TFA bei einer Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  mit Peptiden beladen. Die Analyten wurden dann auf eine Acclaim PepMap100 C18 Trennsäule (75  $\mu\text{m}$  I.D. x 150 mm, Dionex, Idstein, Deutschland) gespült. Die Trennung fand unter Verwendung eines Gradienten aus

Eluent A (0.05 % (v/v) TFA) und Eluent B (0,04 % (v/v) TFA in 80 % (v/v) ACN) statt (siehe Tabelle 3) und die Flussrate betrug 0,3 µl/min bei einer Säulentemperatur von 30 °C. Die Detektion bei 214 nm erfolgte mittels eines UV-Detektors mit Z-förmiger Detektorzelle mit einem Detektorvolumen von 3 nl.

Nach Elution von der Säule wurden die Peptide ab der fünfzehnten Minute im Verhältnis 1:4 (v/v) mit Matrixlösung durch einen Probot Mikrofraktionssammler (LC Packings, Dionex) über ein T-Stück mittels Spritzenpumpe gemischt und alle 15 s auf ein MALDI-Target (Opti-TOF™ LC MALDI Insert, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) gespottet. Das Spotten erfolgte für 60 min und die Matrix-Stockkonzentration betrug 3 mg/ml in 70 % (v/v) ACN, 0.1 % (v/v) TFA und enthielt ca. 5 nM Glu<sup>1</sup>-Fibrinopeptid zur internen Kalibrierung. Schließlich erfolgte die massenspektrometrische Analyse mit dem 5800 MALDI TOF/TOF Massenspektrometer (ABSciex) unter den gleichen Messbedingungen, wie unter Punkt 3.11 beschrieben.

**Tabelle 3: Zeitlicher Verlauf des Gradienten bei der Trennung der tryptischen Peptide mittels IP-RP-HPLC in der zweiten Dimension**

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
6	95	5
56	50	50
60	5	95
64	5	95
65	95	5
80	95	5

### 3.14 Durchflusszytometrie

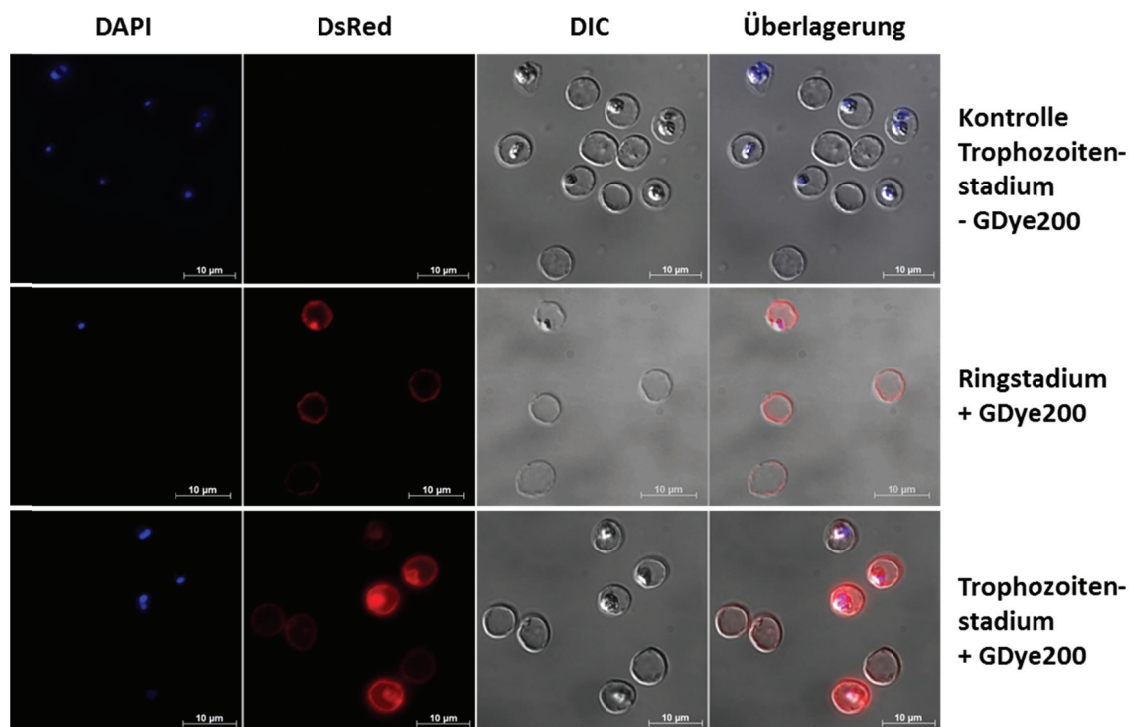
In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie für die stadienspezifische Isolierung von *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten verwendet. Hierfür wurden Zellen aus einer Dauerkultur zentrifugiert (570xg, 5 min, RT) und in Waschlösung (0,5 % (w/v) BSA, 2 mM EDTA in PBS) gewaschen. Anschließend wurden bis zu  $1 \times 10^8$  Zellen ( $1 \times 10^7$  Zellen/ml) in Waschlösung mit 5 µM Vybrant® DyeCycle™ Violett Fluoreszenzfarbstoff (VDCV, Invitrogen) bei 37 °C im Dunkeln für 30 min gefärbt. Direkt im Anschluss wurden die Zellen im Durchflusszytometer FACSAria (BD Biosciences) unter Verwendung der FACSDiva Software (BD Biosciences) durch Dr. Heiner Oberg und Sandra Ussat (Institut für Immunologie, UKSH Kiel) analysiert. Dabei wurden die

VDCV/DNA Komplexe mit einem 407 nm Laser (violett) angeregt und die Emission über FL8 mit einem Bandpassfilter (450/40 nm) gemessen. Der *drop delay* wurde mit Hilfe von BD FACS Accudrop Beads bestimmt und es wurden folgende Detektorspannungen verwendet: FSC (325 V), SSC (445 V) und FL-8 (440 V). Die Zellen wurden bei geringem Druck mittels einer 100 µm Düse sortiert und zur Qualitätssicherung erneut analysiert. Schließlich wurden die sortierten Zellen zweimal mit Komplettmedium gewaschen und in Kultur gebracht.

## 4 Ergebnisse

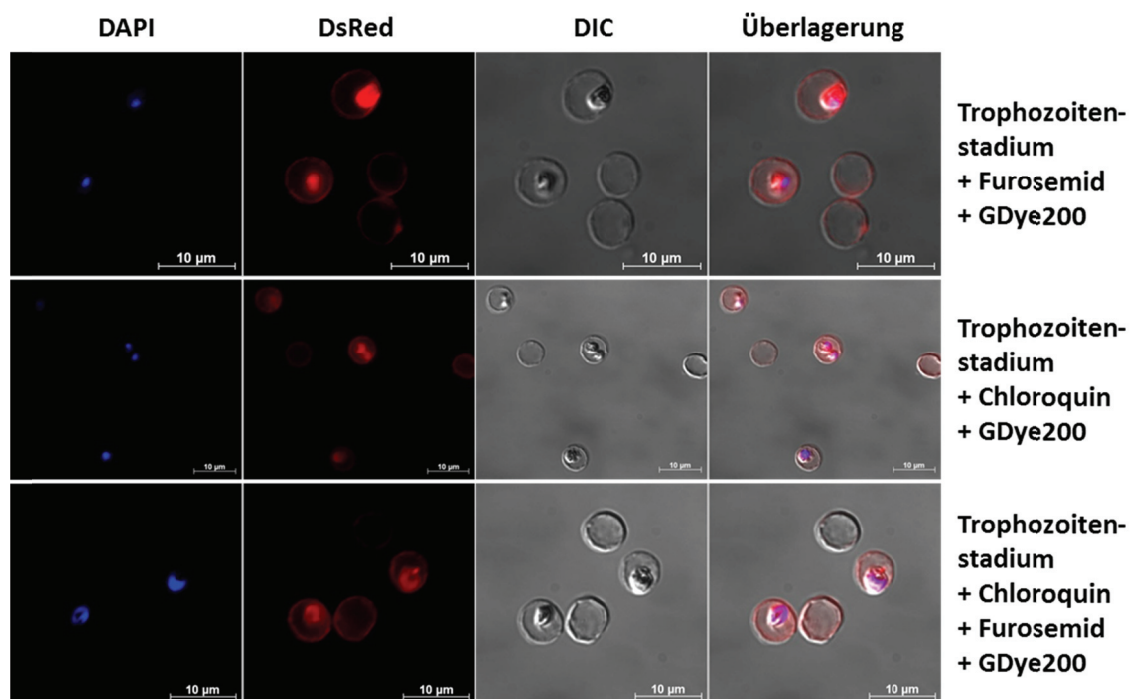
### 4.1 Oberflächenmarkierung von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten

Zunächst wurde versucht, die Proteine auf der Zelloberfläche von *P. falciparum* infizierten Erythrozyten zu markieren, um diese von intrazellulären Proteinen unterscheiden zu können. Hierfür wurden die Zellen jeweils mit den Farbstoffen Cy3 (GE Healthcare), Cy3 (Lumiprobe), GDye100 (DyeAGNOSTICS) und GDye200 (DyeAGNOSTICS) inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Farbstoffe besitzen einen reaktiven N-Hydroxysuccinimid (NHS) Ester und binden so kovalent an primäre Amine der Proteine. Für alle aufgeführten Farbstoffe wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt und im Folgenden werden exemplarisch die Resultate mit dem Farbstoff GDye200 dargestellt (Abb. 7 und Abb. 8).



**Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von verschiedenen Stadien *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten nach Inkubation mit GDye200.** Die obere Reihe zeigt infizierte Erythrozyten (Trophozoitenstadium) die zur Kontrolle nur mit Hoechst 33258 (2 µg/ml) behandelt wurden. In der mittleren Reihe (Ringstadium) sowie der unteren Reihe (Trophozoitenstadium) wurden die Zellen zusätzlich mit 200 pmol GDye200 markiert. Der DAPI-Kanal zeigt die Kernfärbung von Hoechst 33258 (blau). Der DsRed-Kanal zeigt die Fluoreszenz des Farbstoffes GDye200 (rot). DIC - Differentialinterferenzkontrast.

Die Kontrollexperimente zeigten keinerlei Autofluoreszenz im DsRed-Kanal. Bei den GDye200 behandelten Zellen wurden im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderungen der Zellmorphologie beobachtet. Es ist aber zu erkennen, dass offensichtlich sowohl die Plasmamembran der infizierten, als auch der nicht-infizierten Erythrozyten durch GDye200 markiert wurden. Zusätzlich wurde der intraerythrozytäre Parasit massiv angefärbt ohne dabei das Zytosol der Erythrozyten zu markieren. Diese Aufnahme aller getesteten Farbstoffe durch den Parasiten erfolgte unabhängig vom Entwicklungsstadium. In weiteren Experimenten wurden Chloroquin und Furosemid eingesetzt, um die Aufnahme der Farbstoffe näher zu analysieren (Abb. 8). Für Chloroquin ist bekannt, dass es die Polymerisation des toxischen Ferriprotoporphyrins verhindert und somit zum Absterben des Parasiten im Trophozoitenstadium führt. Bei Furosemid handelt es sich um einen Anionenkanal-Inhibitor, der eingesetzt wird, um Teile der NPPs mit funktionellen Charakteristika von klassischen Anionenkanälen zu blockieren (225,226).



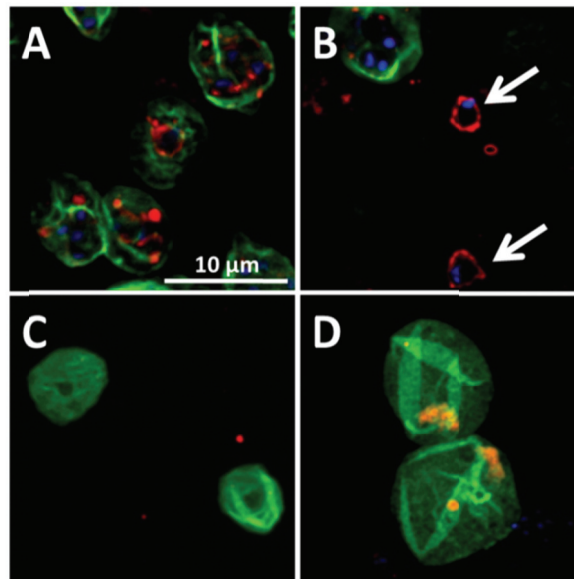
**Abb. 8: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten nach Vorinkubation mit Furosemid oder/und Chloroquin und anschließender Färbung durch GDye200.** Die Zellen wurden entweder mit 100 µM Furosemid (obere Reihe), mit 50 µM Chloroquin (mittlere Reihe) oder mit 100 µM Furosemid in Kombination mit 50 µM Chloroquin (untere Reihe) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 200 pmol GDye200 und Hoechst 33258 (2 µg/ml) markiert. Der DAPI-Kanal zeigt die Kernfärbung von Hoechst 33258 (blau). Der DsRed-Kanal zeigt die Fluoreszenz des Farbstoffes GDye200 (rot). DIC - Differentialinterferenzkontrast.

Weder der Einsatz von Furosemid (=Blockierung der Anionenkanäle) oder Chloroquin (=Absterben des Parasiten) noch die Kombination aus beiden Stoffen konnte die Aufnahme von GDye200 durch den Parasiten verhindern. Somit konnten die getesteten Farbstoffe nicht zur selektiven Oberflächenmarkierung von *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten verwendet werden.

#### **4.2 Anreicherung und Analyse der Membranfraktion aus spät-infizierten Erythrozyten**

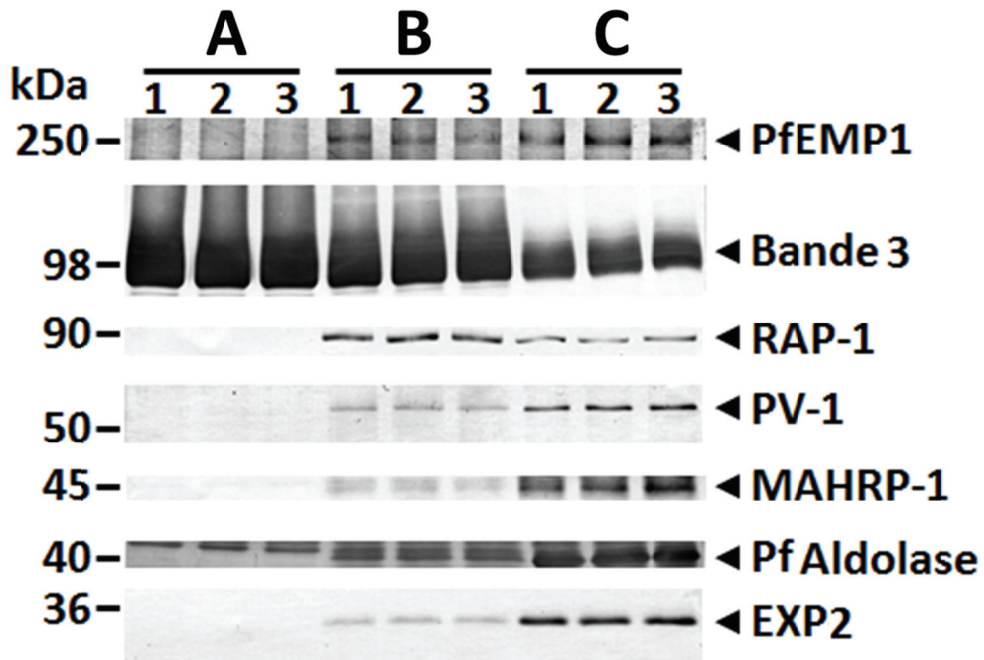
Da die Oberflächenproteine der infizierten Erythrozyten nicht durch die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe selektiv markiert werden konnten, wurde eine neue Strategie gewählt um Proteine der Plasmamembran von infizierten Erythrozyten zu identifizieren. Hierfür wurde zunächst die Plasmamembran isoliert und angereichert, um später das Membranproteom mittels verschiedener Gelelektrophoresen aufzutrennen und massenspektrometrisch zu analysieren. Im Falle der infizierten Erythrozyten gestaltete sich die Isolierung der Plasmamembran der Erythrozyten als schwierig, da hier einerseits der Parasit nicht beschädigt werden durfte und andererseits mit der PVM, TVN und den *Maurer's clefts* zusätzliche Membranstrukturen während der späten Stadien vorhanden sind. Des Weiteren wurde eine sehr hohe Parasitämie von mehr als 90 % benötigt, um Kontaminationen mit Membranen von nicht-infizierten Erythrozyten möglichst gering zu halten. Eine geeignete Methode zur Anreicherung später Stadien war die Synchronisation über Percoll. Im Gegensatz dazu musste für die Isolierung von frühen Stadien erst eine Methode zur Anreicherung erarbeitet werden (siehe 4.7). Nach der spezifischen Anreicherung der Stadien infizierter Erythrozyten wurden verschiedene Ansätze wie *freeze and thaw*, Saponinlyse, mechanischer Stress, differentielle Zentrifugation und osmotischer Schock zur Isolierung der erythrozytären Plasmamembran getestet (Daten nicht gezeigt). Die effektivste Anreicherung wurde durch eine Kombination aus Saponinlyse und mechanischem Stress durch vortexen mit anschließender differentieller Zentrifugation erreicht. Zur Kontrolle wurden die einzelnen Fraktionen nach der Saponinlyse mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 9).





**Abb. 9: Immunfluoreszenz von *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten nach Saponinlyse.** Nach der Anreicherung später Stadien durch Percoll, wurden die Zellen mittels Saponin lysiert und anschließend durch Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Als primäre Antikörper wurden Maus-anti-Bande-3 zusammen mit Kaninchen-anti-EXP2 (Markerprotein für die parasitophore Vakuolenmembran (PVM)) verwendet. Als sekundäre Antikörper kamen DyLight-488-Ziege-anti-Maus (grün) und DyLight-549-Ziege-anti-Kaninchen (rot) zum Einsatz. Die DNA wurde mit Hoechst 33258 (2 µg/ml, blau) gefärbt. (A) unbelichtete Zellen; (B) Sediment nach Saponinlyse beinhaltet sowohl nicht komplett lysierte Zellen als auch freie Strukturen die von der PVM umschlossen sind (freie Parasiten, weiße Pfeile); (C)+(D) Der Überstand nach Saponinlyse beinhaltet Membranhüllen (=ghosts) der Erythrozyten. Zusätzlich sind teilweise Verunreinigungen durch Fragmente der PVM (rot) zu erkennen.

Die Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigte die Anreicherung der Plasmamembran der Erythrozyten in der Membranfraktion (Abb. 9C+D). Es wurden keine intakten Parasiten gefunden und die vereinzelt Signale von EXP2 (rote Fluoreszenz) deuteten auf das Vorhandensein weniger Fragmente des TVN/PVM Netzwerkes unterhalb der Erythrozyten Plasmamembran hin. Im Vergleich dazu wurden in der Sediment-Fraktion (Abb. 9B, weiße Pfeile) PVM umschlossene Strukturen (freie Parasiten) gefunden und nicht komplett lysierte Zellen gefunden. Um diese Ergebnisse weiter zu bestätigen wurde mit jeweils drei biologischen Replikaten jeder Fraktion der immunologische Nachweis mit den Markerproteinen PfEMP1 (integrales Membranprotein der infizierten Erythrozytenmembran), Bande 3 (integrales Membranprotein der Erythrozytenmembran), RAP-1 (lösliches Protein in den Rhoptrien), MAHRP-1 (integrales Membranprotein der *Maurer's clefts*), EXP2 (integrales Membranprotein der PVM), PV-1 (lösliches Protein der PV) und Pf Aldolase (lösliches Protein des Parasiten) durchgeführt (Abb. 10). Als Kontrolle wurden nicht-infizierte Erythrozyten in gleicher Weise behandelt.

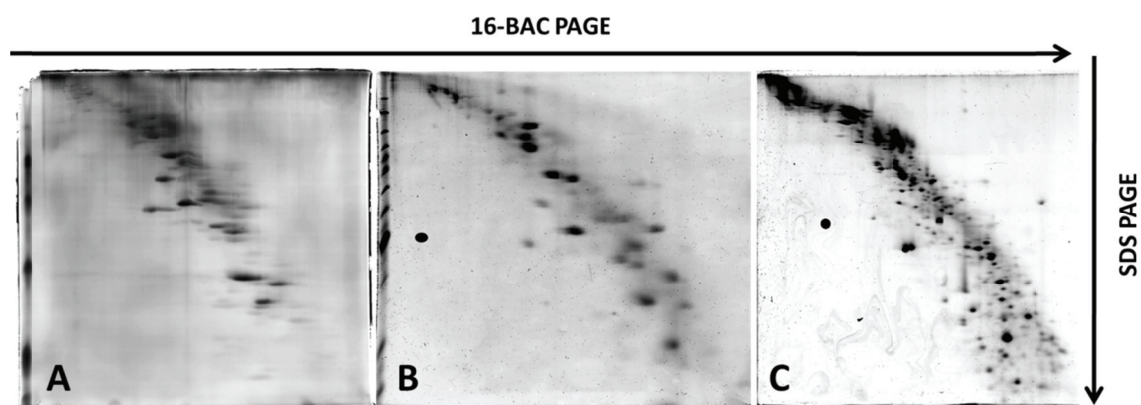


**Abb. 10 Immunologischer Nachweis von Proteinen nach Behandlung der Zellen mit Saponin.** Nicht-infizierte Erythrozyten und über Percoll angereicherte spät-infizierte Erythrozyten wurden durch Saponin lysiert und die Membranfraktion wurde durch differentielle Zentrifugation separiert. Nach der 1D SDS/PAGE wurden die Proteine mittels *Tank-Blot* Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Nummern 1-3 stellen die jeweiligen biologischen Replikate dar und es wurde für alle Spuren die gleiche Proteinmenge von 10 µg verwendet. Die primären Antikörper wurden 1:600 und die entsprechenden sekundären Antikörper wurden 1:10000 eingesetzt. **A:** Membranfraktion nicht-infizierter Erythrozyten; **B:** Membranfraktion spät-infizierter Erythrozyten; **C:** Fraktion mit freien Parasiten nach Saponinlyse spät-infizierter Erythrozyten; PfEMP1 - *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*; RAP-1 - *rhoptry associated protein-1*, PV-1 - *parasitophorous vacuole protein-1*; MAHRP-1 - *membrane-associated histidine-rich protein-1*; EXP2 - *exported protein-2*. Bei der obere Bande der Pf Aldolase (auch in A zu finden) handelt es sich um eine Kreuzreaktion.

Das Signal von Bande 3 wurde in allen Spuren detektiert und war in der Fraktion der freien Parasiten (C) am schwächsten ausgeprägt. Das Protein PfEMP-1 ist auf der Oberfläche von infizierten Erythrozyten lokalisiert und wurde folglich nicht in der Membranfraktion von nicht-infizierten Erythrozyten gefunden. Das Auftreten von PfEMP-1, MAHRP-1, EXP2 und von Bande 3 in der Fraktion freier Parasiten bestätigte die Immunfluoreszenzanalyse (Abb. 9), dass noch nicht vollständig lysierte Wirtszellen, und somit auch die jeweiligen Kompartimente der Markerproteine, in dieser Fraktion vorhanden waren. Im Vergleich zur Membranfraktion spät-infizierter Erythrozyten wurden bis auf RAP-1 alle weiteren plasmodialen Proteine (MAHRP-1, EXP2, PV-1 und Pf Aldolase) in den Fraktionen der freien Parasiten angereichert. Dies deutet einerseits auf geringe Kontaminationen mit Strukturen der *Maurer's clefts* und der PVM in der Membranfraktion hin. Andererseits wurden die intrazellulären Proteine der Parasiten weitestgehend eliminiert. Somit wurden die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigt.

### 4.3 Optimierung der kationischen 2D Gelelektrophorese

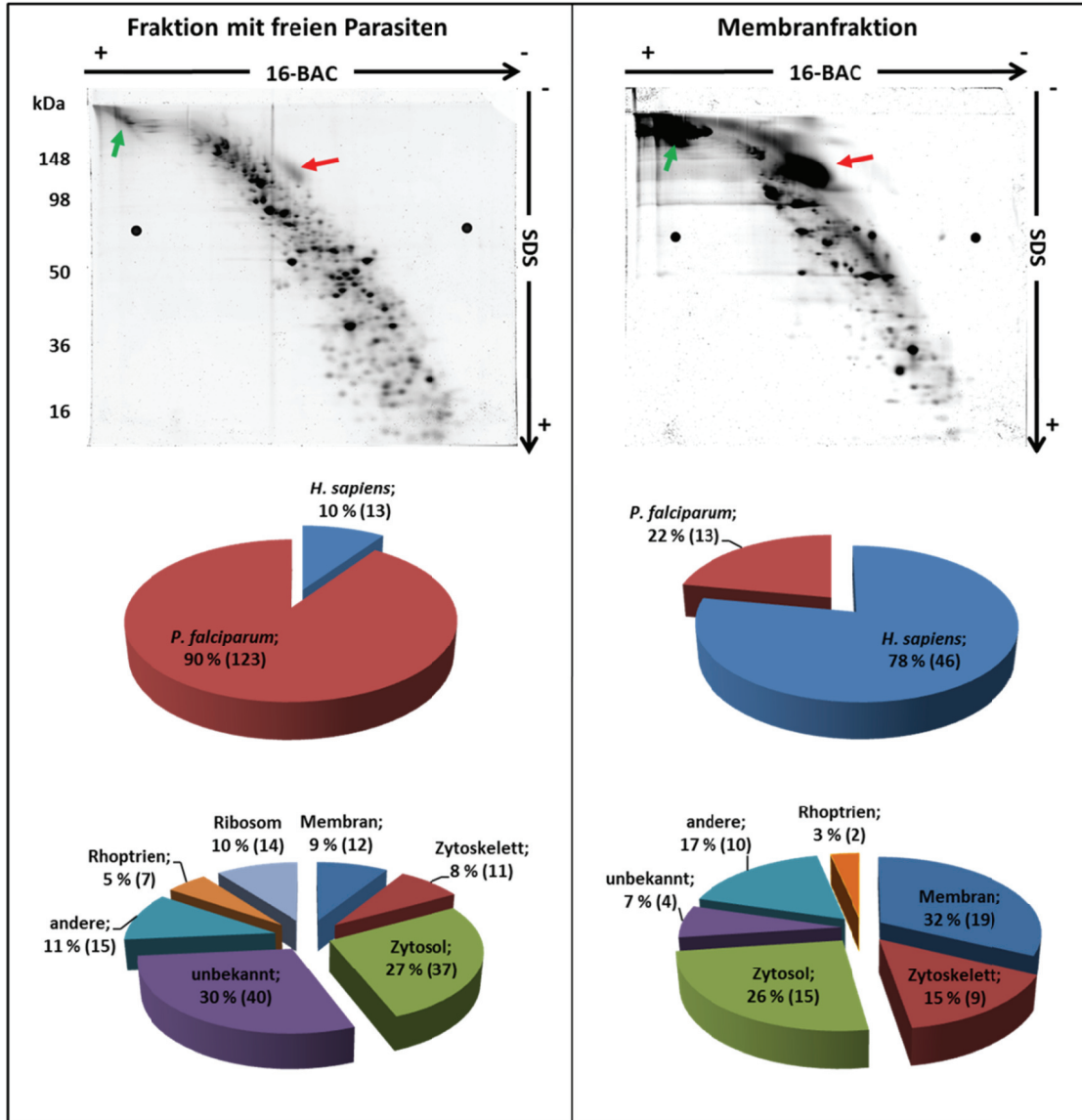
Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine aus den Membranfraktionen von nicht-infizierten und infizierten Erythrozyten wurden neben der klassischen IEF/SDS PAGE auch zwei verschiedene kationische 2D PAGEs verwendet. Der einzige Unterschied beider kationischer PAGEs ist die Verwendung zweier unterschiedlicher kationischer Detergenzien, 16-BAC und CTAB. Die ersten Gele mit kationischen Detergenzien wurden nach den Protokollen von Macfarlane (227) und Hartinger (228) angefertigt und wiesen eine unregelmäßige Polymerisation der Gellösung auf. Insbesondere daraus resultierte eine sehr schlechte Trennauflösung (Abb. 11A). Es wurde versucht durch Veränderungen der Verhältnisse einzelner Substanzen sowie durch einen Austausch des Laufpuffersystems (nach (229)) diese Schwachstellen zu kompensieren. Diese Optimierungsversuche brachten nur ein geringfügig besseres Polymerisations- und Trennverhalten (Abb. 11B). Schließlich konnte ein Protokoll von Nothwang und Schindler (221) an die Fragestellung dieser Arbeit angepasst und optimiert werden (Abb. 11C).



**Abb. 11: Gelbilder nach Optimierung der 2D 16-BAC/SDS PAGE.** Die Gele wurden nach modifizierten Protokollen (A: (227,228); B: (229); C: (221)) hergestellt. Die Färbung erfolgte entweder mittels Silber (A+B) oder durch Flamingo Pink (C).

Durch Modifikationen des Protokolls von Nothwang und Schindler (221), wie dem Reduzieren der Geldicke auf 0,75 mm in der ersten und 1 mm in der zweiten Dimension, dem Weglassen der zusätzlichen Färbung nach der ersten Dimension und einer alternativen Äquilibration (siehe Material und Methoden) wurde die Qualität der Gele sowie deren Auflösung entscheidend verbessert (Abb. 11C). Mit diesem Protokoll wurde sowohl die Membranfraktion, als auch die Fraktion mit freien Parasiten in einem ersten Versuch hinsichtlich des

Proteinbesatzes mittels 2D 16-BAC/SDS PAGE untersucht und miteinander verglichen (Abb. 12). Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend aus dem Gel isoliert und massenspektrometrisch analysiert.



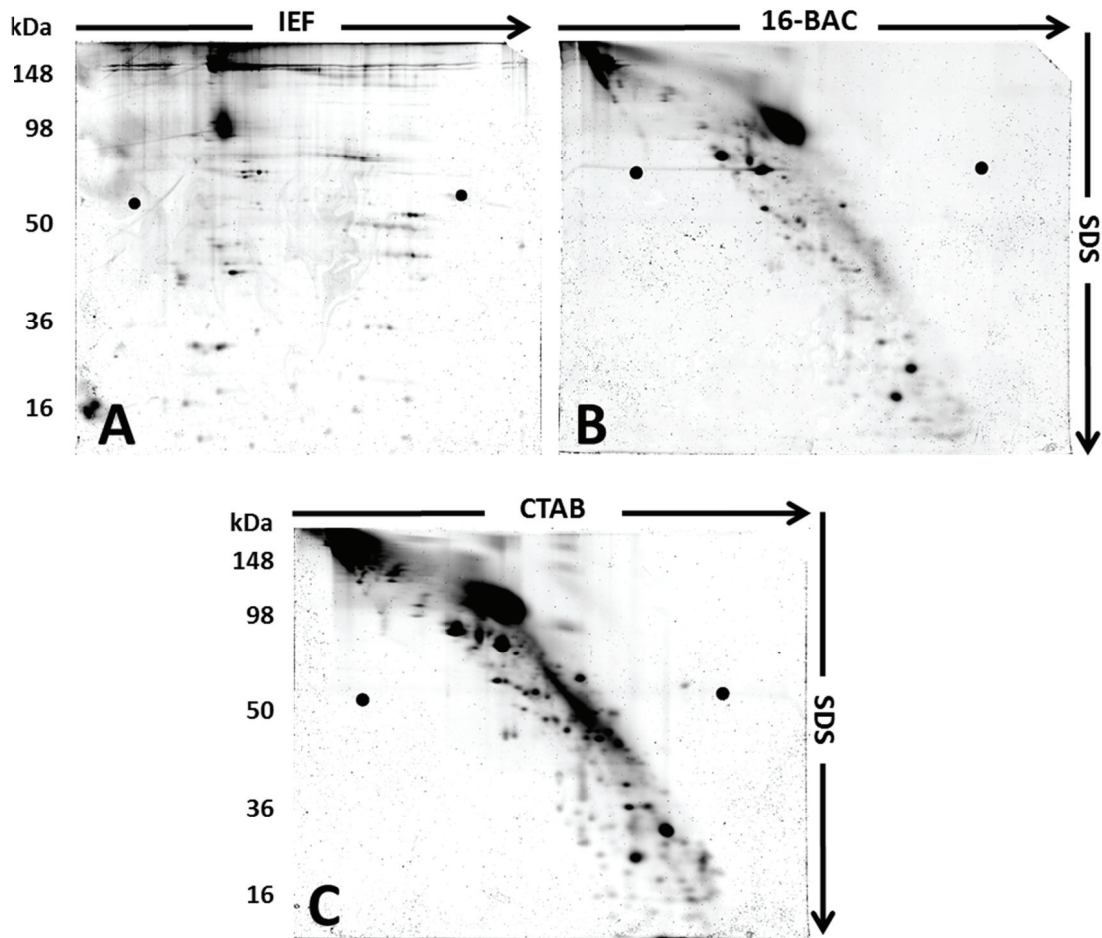
**Abb. 12: Vergleich zweier 2D Gele von Fraktionen nach Saponinlyse.** *P. falciparum*-infizierte Erythrozyten wurden durch Saponin lysiert und zentrifugiert. Die Proteine der daraus resultierenden Fraktion mit freien Parasiten (links) sowie die Membranfraktion (rechts) wurden mittels 2D 16-BAC/SDS Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Flamingo Pink angefärbt. Die Proteinspots wurden isoliert und massenspektrometrisch analysiert. Die oberen Diagramme zeigen die Verteilung der identifizierten Proteine nach ihrer Herkunft und die unteren Diagramme geben Auskunft über deren Lokalisation und Funktion. Dabei wurden sowohl humane als auch parasitäre Proteine berücksichtigt. Zur Verdeutlichung der Unterschiede beider Fraktionen hinsichtlich des Proteinbesatzes sind auf den Gelen das Markerprotein für die erythrozytäre Plasmamembran (Bande 3, roter Pfeil) sowie Proteine des erythrozytären Zytoskeletts (Spektrine und Aktine, grüner Pfeil) markiert. Die Zahlen der Teilstücke zeigen die Menge an zugeordneten Proteinen sowie deren prozentualen Anteil. 16-BAC - Benzylidimethyl-n-hexadecylammoniumchlorid.

Nach dem Anreichern sank die Protein-Komplexität der Membranfraktion im Vergleich zur Fraktion freier Parasiten deutlich. Trotz Einsatz gleicher Proteinmengen und gleicher Bedingungen beim Scannen der Gele unterschieden sich beiden Fraktionen stark, sowohl im Spotmuster als auch in der Spotintensität. Offensichtlich wurde die geringere Komplexität der Membranfraktion durch das massive Auftreten von Bande 3 und den Proteinen des Zytoskeletts der Erythrozyten kompensiert. Dies spiegelte sich in den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse wieder. Während in der Fraktion mit freien Parasiten 90 % aller identifizierten Proteine vom Parasiten stammten, war dies in der Membranfraktion nur für 22 % der Proteine der Fall. Damit in Zusammenhang stieg der Anteil an Proteinen mit unbekannter Funktion in der Fraktion freier Parasiten auf 40 % an, da, im Gegensatz zu den humanen Proteinen, die Funktion/Lokalisation für einen großen Teil der Proteine von *P. falciparum* noch nicht aufgeklärt wurde. Beim Betrachten der identifizierten humanen Proteine wurde der Großteil der Membran oder des Zytoskeletts der Erythrozyten zugeordnet. In der Membranfraktion wurden die stärksten Spots als verschiedene Spektrine und Aktine (Abb. 12, rechts, grüner Pfeil) und als das integrale Membranprotein Bande 3 identifiziert (Abb. 12, rechts, roter Pfeil). Im Vergleich dazu waren diese Proteine verhältnismäßig schwach auf dem Gel der Fraktion freier Parasiten präsent (Abb. 12, links, roter und grüner Pfeil). Zusätzlich wurden ca. ein Drittel der Proteine der Membranfraktion eine Membranlokalisierung zugeordnet, was eine Steigerung des Anteils dieser Proteine um ca. 300 % im Vergleich zur anderen Fraktion entsprach. Membranproteine oder membran-assoziierte Proteine die einem bestimmten Kompartiment angehörten, wurden diesem zugeordnet und tauchen nicht zusätzlich in der Rubrik „Membran“ auf. Kategorien mit einem Anteil von weniger als 3 % (unter anderen PVM, Nukleus, Endoplasmatisches Retikulum) wurden als „andere“ zusammengefasst.

#### **4.4 Experimentelle Strategie für die proteomische Analyse der erythrozytären Plasmamembran**

Nachdem die Protokolle sowohl für die Isolierung der erythrozytären Plasmamembran von spät-infizierten Erythrozyten als auch für die kationische 2D PAGE optimiert werden konnten, wurden verschiedene 2D Gelelektrophorese-Techniken hinsichtlich ihrer Trennleistung miteinander verglichen. Hierfür wurden die Membranen spät-infizierter Erythrozyten angereichert und aliquotiert. Nach Extraktion der Proteine, wurden diese in gleicher Menge mit den verschiedenen 2D Gelelektrophorese-Techniken (2D 16-BAC/SDS PAGE, 2D CTAB/SDS PAGE und 2D IEF/SDS PAGE) aufgetrennt (Abb. 13).

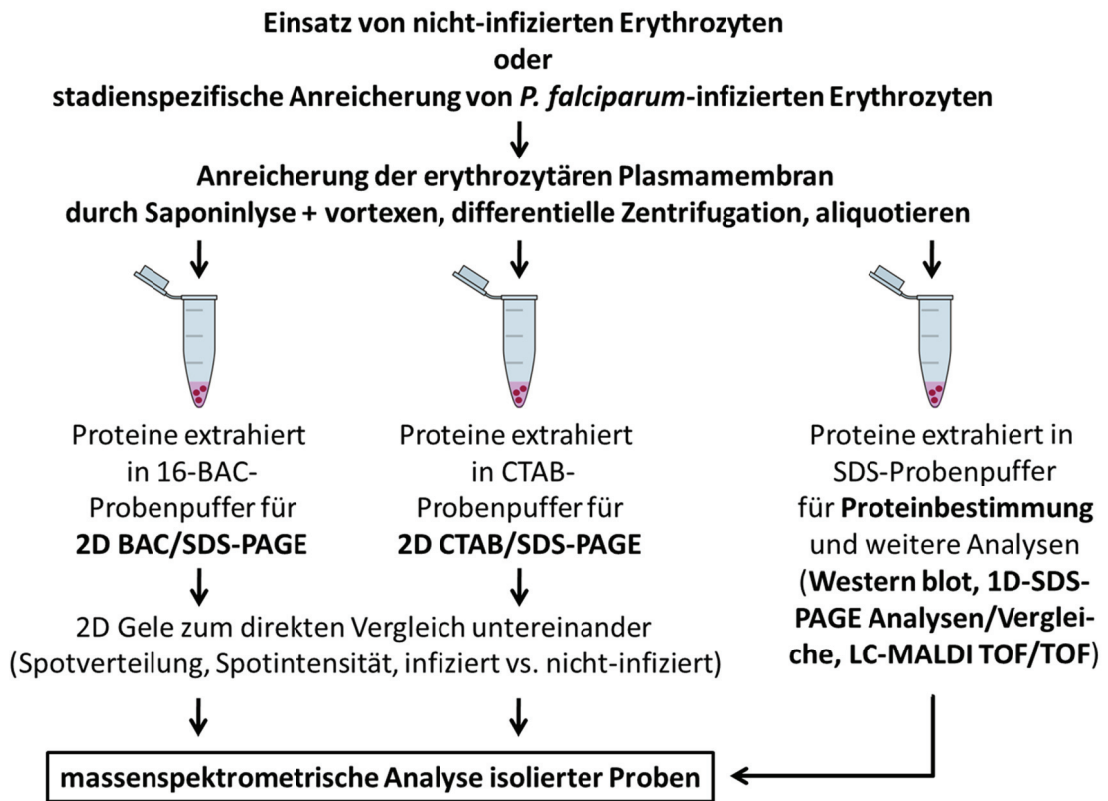




**Abb. 13: Gelbilder verschiedener 2D Gelelektrophoresen zur Auftrennung von Proteinen aus Membranfraktionen von Erythrozyten infiziert mit *P. falciparum*.** Die erythrozytäre Plasmamembran von infizierten Erythrozyten wurde durch Saponinlyse und differentielle Zentrifugation angereichert und aliquotiert. Es wurden gleiche Proteinmengen zur Auftrennung mittels verschiedener 2D Gelelektrophoresen verwendet und die aufgetrennten Proteine wurden mit Flamingo Pink angefärbt. A: 2D Isoelektrische Fokussierung (IEF)/SDS Gel, Bei der IEF kam ein nicht linearer pH 3-10 Gradient zum Einsatz; B: Benzyltrimethylammoniumchlorid (16-BAC)/SDS Gel; C: Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)/SDS Gel. Bei allen SDS Gelelektrophoresen wurden 10%ige Gele verwendet.

Im direkten Vergleich gegenüber der klassischen IEF/SDS PAGE wurde ungefähr die doppelte Anzahl an Proteinspots in den Gelen der kationischen PAGEs nachgewiesen. Die auftretenden Spots der IEF/SDS PAGE wiesen oft eine perlschnurartige Verteilung auf und der gesamte obere Rand des Gels wurde mit angefärbt. Dies deutete auf einen unvollständigen Übergang der Proteine aus der ersten Dimension in die zweite Dimension. Beim Vergleich der beiden kationischen PAGEs untereinander wurde gezeigt, dass ein Großteil des Spotmusters identisch war, jedoch besaß das Detergenz CTAB eine höhere Solubilisierungskraft als 16-BAC. Verschiedene Versuche die IEF/SDS PAGE zu optimieren (z.B. durch Einsatz diverser Detergenzien) brachten keine Verbesserungen (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde

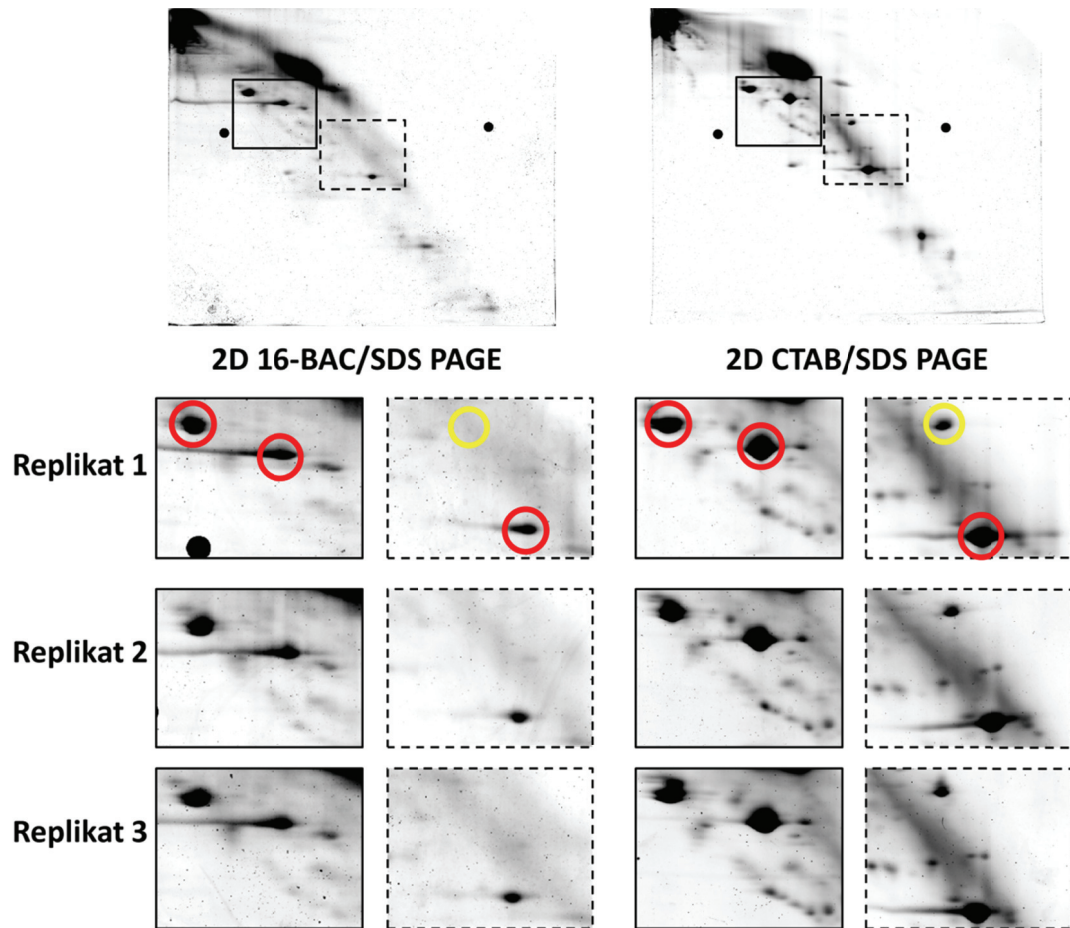
in den nachfolgenden Analysen auf die 2D IEF/SDS PAGE zu verzichten. Schließlich wurde nach Abschluss dieser Vergleiche die Strategie für den Einsatz und die Kombination der verschiedenen Techniken für die proteomische Analyse der Wirtszellmembran aufgestellt (Abb. 14).



**Abb. 14:** Strategie für die proteomische Analyse der erythrozytären Plasmamembran von nicht-infizierten Erythrozyten und mit *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten. Zur Verifizierung der Daten werden je Probe drei biologische Replikate unabhängig voneinander nach diesem Schema analysiert.

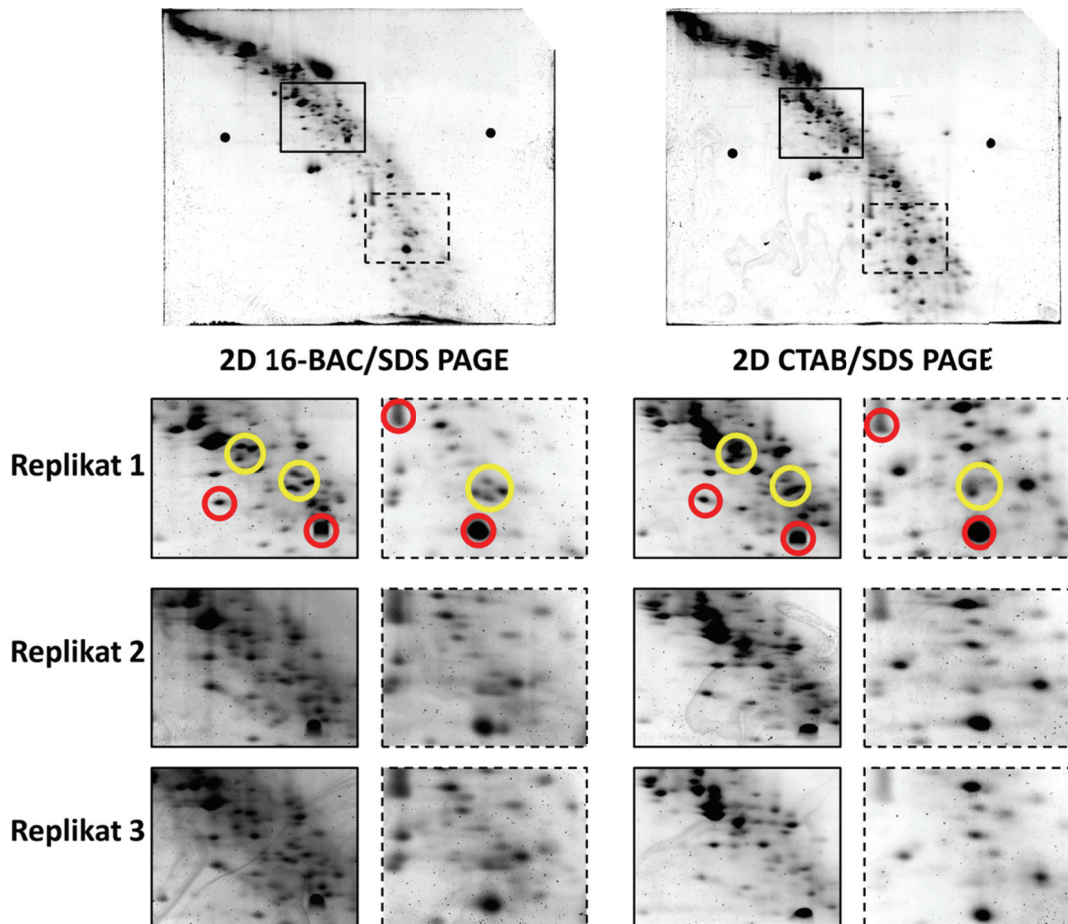
#### 4.5 Analyse der Membranfraktionen aus spät-infizierten Erythrozyten

Aus den Proben der Membranfraktion, die für den immunologischen Nachweis eingesetzt wurden (Abb. 10), wurde von jedem biologischen Replikat je eine 2D 16-BAC/SDS PAGE und eine 2D CTAB/SDS PAGE durchgeführt. Dabei wurde bei jeder PAGE mit 60 µg die gleiche Menge an Protein eingesetzt. Um einerseits die zwei kationischen 2D Techniken besser miteinander vergleichen zu können und andererseits den Grad der Reproduzierbarkeit einzuschätzen, wurden einzelne Bereiche der Gele vergrößert nebeneinander dargestellt (Abb. 15 und Abb. 16). Die dazugehörigen kompletten Gelbilder sind im Anhang (Abb. 33 - Abb. 36) zu finden.



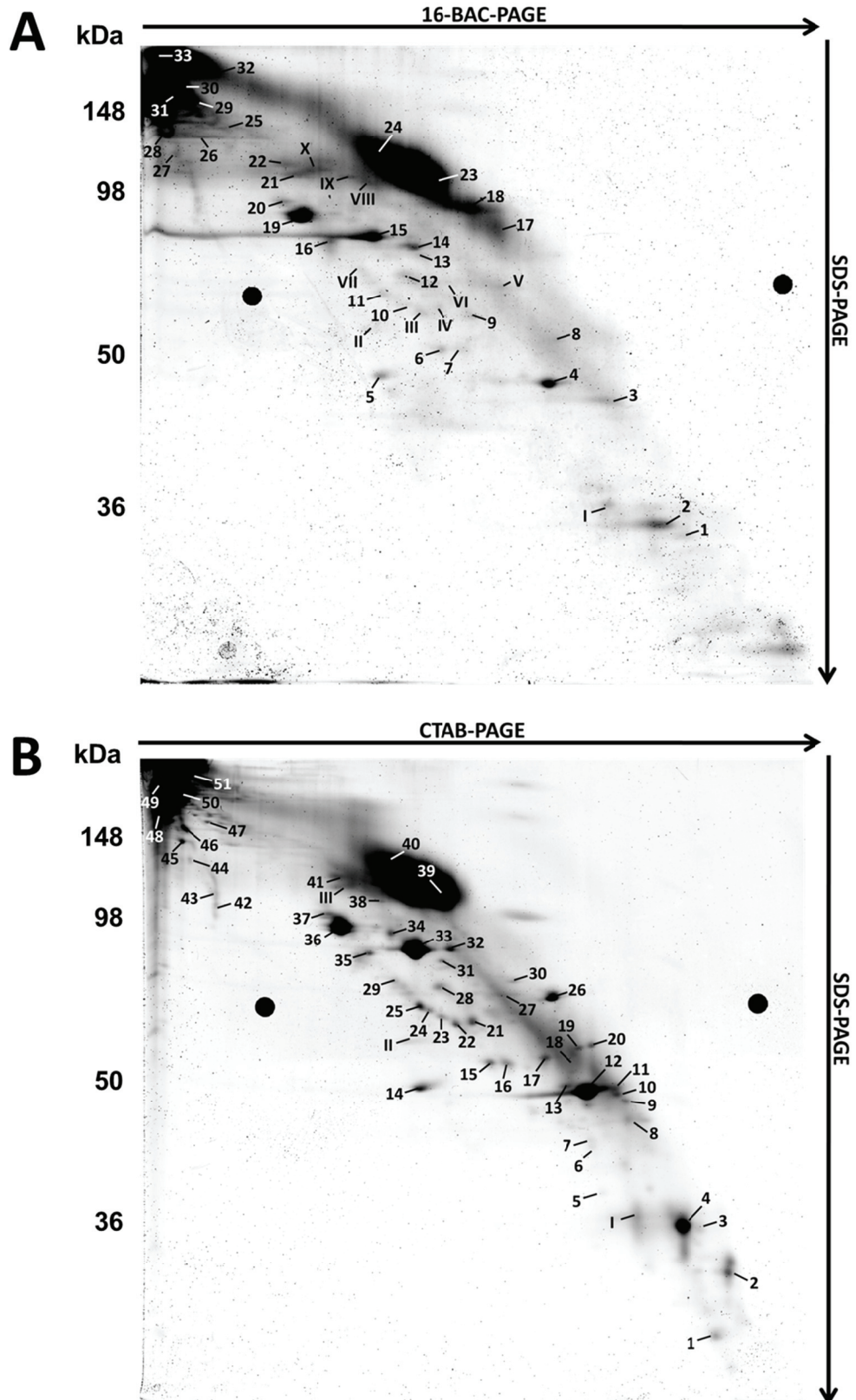
**Abb. 15: Vergleich verschiedener Gelbereiche nach kationischer 2D Gelelektrophoresen von Proben aus nicht-infizierten Erythrozyten.** Exemplarisch wird jeweils ein Gel komplett gezeigt und es ist die Position der vergrößerten Gelbereiche aus den drei biologischen Replikaten markiert. Die roten Kreise zeigen Bereiche die bei den beiden Elektrophoresearten (links: 2D 16-BAC/SDS PAGE; rechts: 2D CTAB/SDS PAGE) ähnlich sind, während die gelben Kreise auf Unterschiede hindeuten. Die Gele wurden mit Flamingo Pink gefärbt.





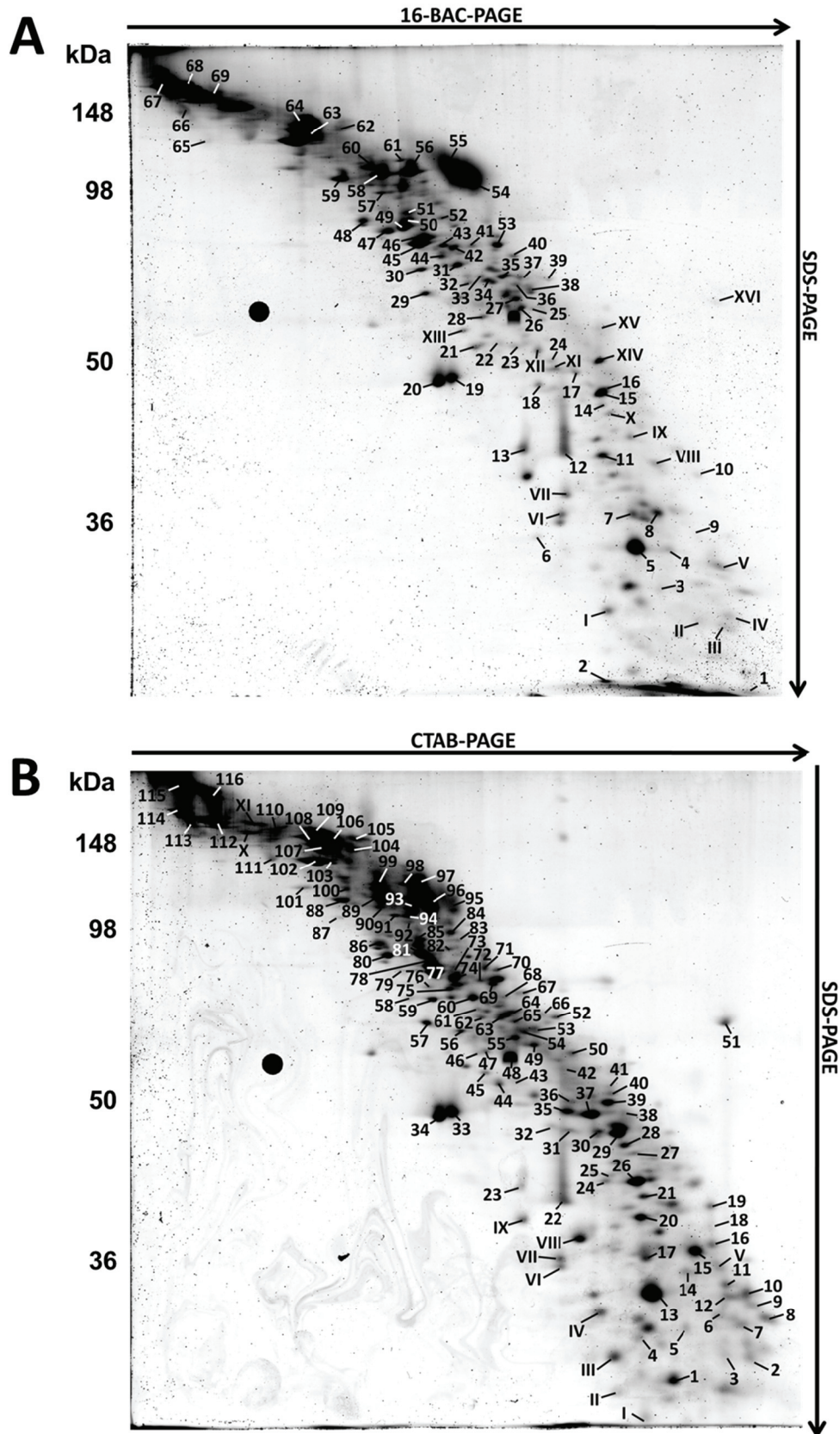
**Abb. 16: Vergleich verschiedener Gelbereiche nach kationischer 2D Gelelektrophoresen von Proben aus infizierten Erythrozyten.** Exemplarisch wurde jeweils ein Gel komplett gezeigt und es wurde die Position der vergrößerten Gelbereiche aus den drei biologischen Replikaten markiert. Die roten Kreise zeigen Bereiche die bei den beiden Elektrophoresearten (links: 2D 16-BAC/SDS PAGE; rechts: 2D CTAB/SDS PAGE) ähnlich sind, während die gelben Kreise auf Unterschiede hindeuten. Die Gele wurden mit Flamingo Pink gefärbt.

Bei der Gegenüberstellung einzelner Teilbereiche der zwei kationischen Elektrophoresen fiel auf, dass der Großteil des Spotmusters übereinstimmte (beispielhaft markiert mit roten Kreisen). Es gab jedoch auch diverse Unterschiede bei einzelnen Spots in Hinblick auf Intensität und Lokalisation auf dem 2D Gel (beispielhaft markiert mit gelben Kreisen). Dabei spielte es keine Rolle ob die Proben von nicht-infizierten oder infizierten Erythrozyten stammten. Zusätzlich wurden beim Vergleich der Gele aus den drei Replikaten untereinander keine signifikanten Unterschiede im Spotmuster festgestellt. Aufgrund dieser offensichtlichen Reproduzierbarkeit wurde aus den Gelen der zusammengehörigen biologischen Replikate je ein Mastergel erstellt (Abb. 17 und Abb. 18). Dabei handelt es sich um ein repräsentatives Gel auf dem alle identifizierten Proteine den jeweiligen Spots zugeordnet wurden. Zusätzlich dazu wurden Gele mit einer erhöhten Proteinmenge erstellt, um auch wenig abundante Proteine identifizieren zu können, die in den ursprünglichen Gelen zu schwach waren (Gelbilder nicht gezeigt). Diese Spots wurden in den Mastergelen mit römischen Zahlen versehen.



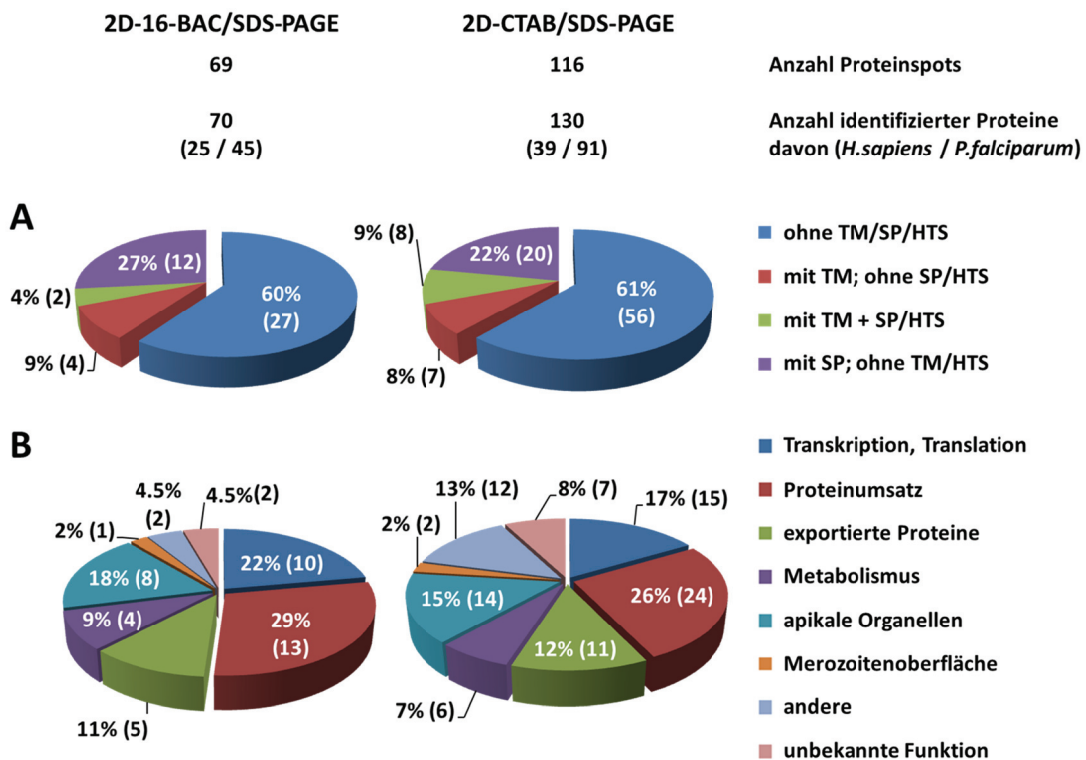
**Abb. 17: Mastergele der Membranfraktionen aus nicht-infizierten Erythrozyten.** Die Mastergele wurden aus drei biologischen Replikaten erstellt. Die Daten der massenspektrometrischen Analyse der jeweiligen Spotnummern sind für A: 2D 16-BAC/SDS Gel in der Tabelle 5 und für B: 2D CTAB/SDS Gel in der Tabelle 6 zu finden. Die Gele wurden mit Flamingo Pink gefärbt.





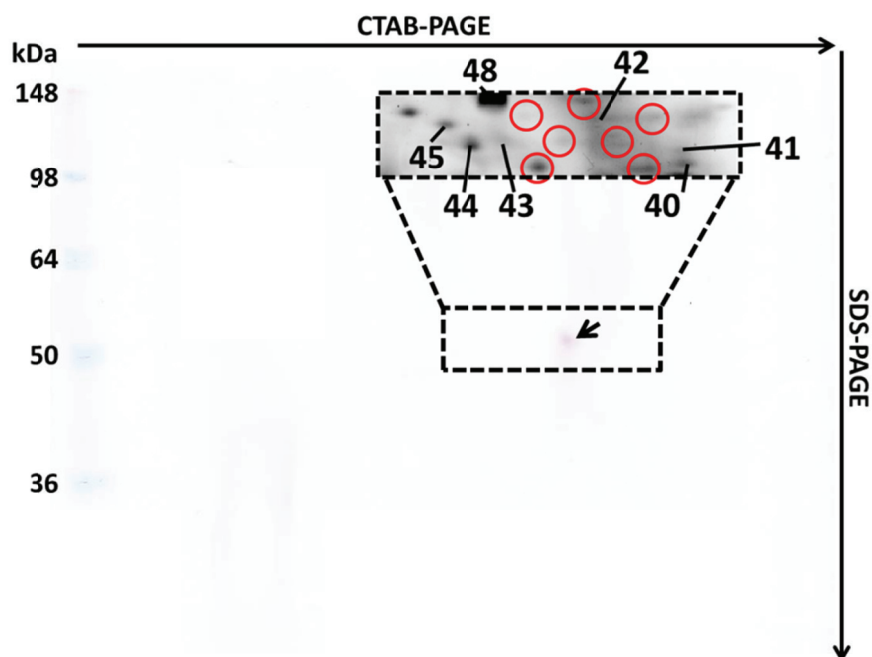
**Abb. 18: Mastergele der Membranfraktionen aus spät-infizierten Erythrozyten.** Die Mastergele wurden aus drei biologischen Replikaten erstellt. Die Daten der massenspektrometrischen Analyse der jeweiligen Spotnummern sind für A: 2D 16-BAC/SDS Gel in der Tabelle 7 und für B: 2D CTAB/SDS Gel in der Tabelle 8 zu finden. Die Gele wurden mit Flamingo Pink gefärbt.

Im Vergleich zu den Gelen der Membranfraktion von nicht-infizierten Erythrozyten, war das Spotmuster der Gele von den infizierten Erythrozyten deutlich komplexer und es wurden folglich mehr Proteine identifiziert. Insgesamt wurden in den Gelen der nicht-infizierten Erythrozyten 34 (16-BAC) und 54 (CTAB) und in den Gelen der infizierten Erythrozyten 69 (16-BAC) und 116 (CTAB) verschiedene Proteine identifiziert (Tabelle 5 - Tabelle 8). Dabei gehörten fast alle der identifizierten humanen Proteine der Membran oder des Zytoskeletts der Erythrozyten an. Die stärksten Spotintensitäten lieferten dabei verschiedene Spektrine und Aktine, sowie das integrale Membranprotein Bande 3. Im Gegensatz dazu wurde in keinem der Gele das zytosolische Protein Hämoglobin gefunden. Die identifizierten plasmodialen Proteine wurden hinsichtlich ihrer strukturellen Eigenschaften bioinformatisch durch die Algorithmen TMHMM v. 2.0 (Vorhersage von Transmembrandomänen (TM)), SignalP v. 3.0 (Vorhersage von Signalpeptiden (SP)) und ExportPred (Vorhersage des Exportsignals (HTS)) analysiert und die funktionellen Eigenschaften wurden aus den Datenbanken PlasmoDB und NCBI entnommen (Abb. 19).



**Abb. 19: Prozentuale Verteilung der massenspektrometrisch identifizierten plasmodialen Proteine aus den Mastergelen von infizierten Erythrozyten (Abb. 18) bezüglich ihrer Struktur sowie Funktion/Lokalisation. A:** Bioinformatische Analyse der strukturellen Besonderheiten durch die Algorithmen TMHMM v. 2.0 (Vorhersage von Transmembrandomänen (TM)), SignalP v. 3.0 (Vorhersage von Signalpeptiden (SP)) und ExportPred (Vorhersage des Exportsignals (HTS)) (118). **B:** Einteilung der identifizierten Proteine anhand ihrer Funktion/Lokalisation. Die Zahlen der Teilstücke zeigen die jeweils die Menge an zugeordneten Proteinen sowie deren prozentualen Anteil.

Es wurde etwas mehr als die doppelte Anzahl plasmodialer Proteine auf den Gelen der 2D CTAB/SDS PAGE identifiziert. Trotzdem war die prozentuale Verteilung der Proteine sowohl bei den strukturellen als auch bei den funktionellen Eigenschaften bei beiden Techniken sehr ähnlich. So wiesen zum Beispiel ca. 40 % der Proteine strukturelle Besonderheiten auf (Abb. 19A). Ein großer Teil der Proteine (51 % bei 16-BAC, 43 % bei CTAB) wurde funktionell zur Transkription/Translation und dem Proteinumsatz (z.B. Proteine des Proteasoms) zugeordnet. Außerdem gehörten ca. ein Drittel der Proteine zu den apikalen Organellen, der Merozoitenoberfläche oder werden in die Wirtszelle exportiert. Zu diesen identifizierten Proteinen die als exportiert annotiert sind gehörten PF13\_0275, PFD0115c, PFI1735c, MAL7P1.172, PF07\_0008, PF14\_0678, PFC0120w, PFI0265c, PFI1445w (Tabelle 7 und Tabelle 8). Im Gegensatz dazu wurde MAHRP-1 zwar in den Membranfraktionen infizierter Erythrozyten immunologisch nachgewiesen (Abb. 10), jedoch nicht massenspektrometrisch identifiziert. Um zu klären, ob das Protein während der zweidimensionalen Auftrennung verloren ging oder ob es aufgrund der geringen Konzentration nicht massenspektrometrisch nachweisbar war, wurde ein zusätzliches 2D CTAB/SDS Gel angefertigt. Dieses 2D Gel wurde anschließend durch Antikörper auf das Vorhandensein von MAHRP-1 getestet (Abb. 20).

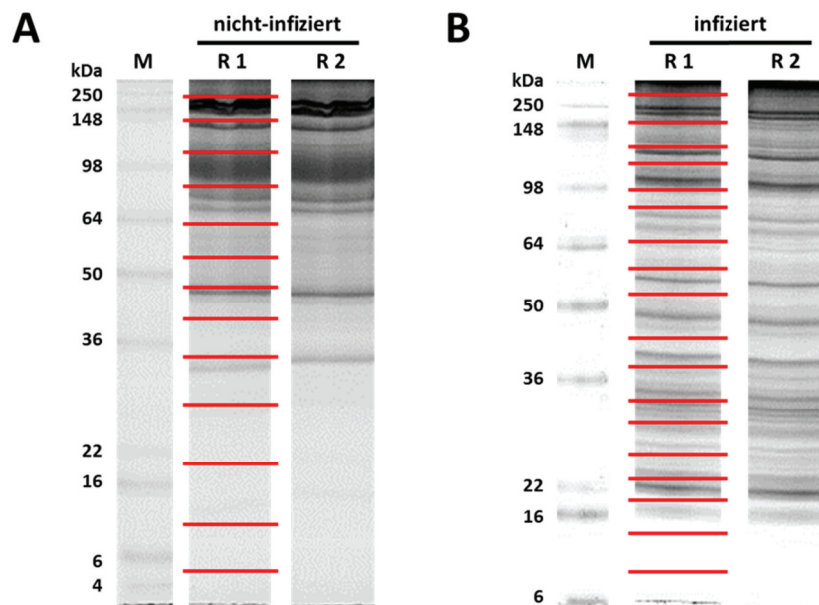


**Abb. 20: Immunologischer Nachweis von MAHRP-1 auf einem 2D CTAB/SDS Gel infizierter Erythrozyten.** Wie bei den Gelen für die massenspektrometrische Analyse, wurde eine Proteinmenge von 60 µg verwendet. Nach der Elektrophorese, wurden die im Gel aufgetrennten Proteine im *Tank-Blot* Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Der primäre Maus-anti-MAHRP-1 Antikörper wurde 1:600 und der sekundäre Kaninchen-anti-Maus Antikörper wurde 1:10000 eingesetzt. Der gestrichelte Bereich um das MAHRP-1 Signal (schwarzer Pfeil) zeigt den zugehörigen Ausschnitt des Mastergels aus Abb. 18B. Die roten Kreise weisen auf Spots, welche nicht massenspektrometrisch identifiziert werden konnten. MAHRP-1 - *membrane-associated histidine-rich protein 1*.

Durch den immunologischen Nachweis wurde ausgeschlossen, dass MAHRP-1 während der 2D PAGE verloren ging. Demgegenüber fiel beim Vergleich mit dem Mastergel auf, dass in dem Bereich des MAHRP-1 Signales mehrere Proteinspots nicht identifiziert werden konnten (Abb. 20, rote Kreise). Die Signale dieser Spots waren zumeist sehr schwach und deuten somit auf eine niedrige Proteinkonzentration hin. Diese Konzentration lag offensichtlich unter der Identifikationsgrenze der hier angewandten Methode.

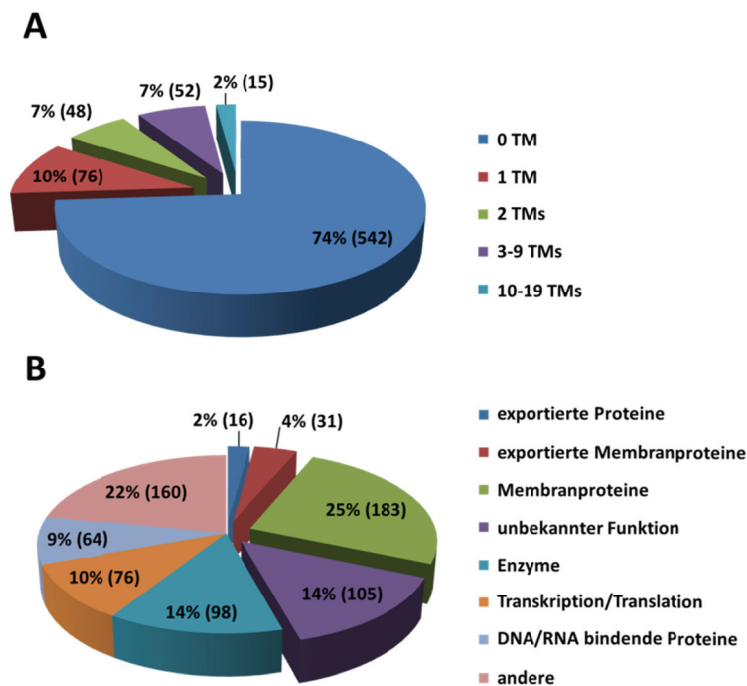
#### 4.6 Analyse der Membranfraktionen aus spät-infizierten Erythrozyten mittels LC-MALDI TOF/TOF

Neben dem Ansatz der 2D Gelelektrophorese wurde die 1D SDS PAGE gekoppelt mit einer HPLC mit anschließender LC-MALDI TOF/TOF-Analyse verwendet, um Proteine der Membranfraktion infizierter Erythrozyten zu identifizieren. Hierfür wurden die Proteine aus den Proben der drei biologischen Replikate zu gleichen Teilen vermischt und daraus zwei technische Replikate hergestellt. Nach Auftrennung der Proteine durch die 1D SDS PAGE (10-15 %iges Gradientengel) und anschließender Färbung durch kolloidale Coomassie-Lösung, wurden die Gelspuren mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und aufgeteilt (Abb. 21).



**Abb. 21: Gele der 1D SDS PAGE von Membranfraktionen aus nicht-infizierten (A) und infizierten (B) Erythrozyten.** Zur Auftrennung wurde jeweils ein 10-15 %iges Gradientengel verwendet. Die Proben aus drei biologischen Replikaten wurden zu gleichen Teilen vermischt und es wurden zwei technische Replikate (R1 und R2) erstellt. Die roten Striche in R1 zeigen exemplarisch die Größe der isolierten Gelfragmente an, die aus beiden technischen Replikaten isoliert wurden. Die Gele wurden mit kolloidaler Coomassie-Lösung angefärbt.

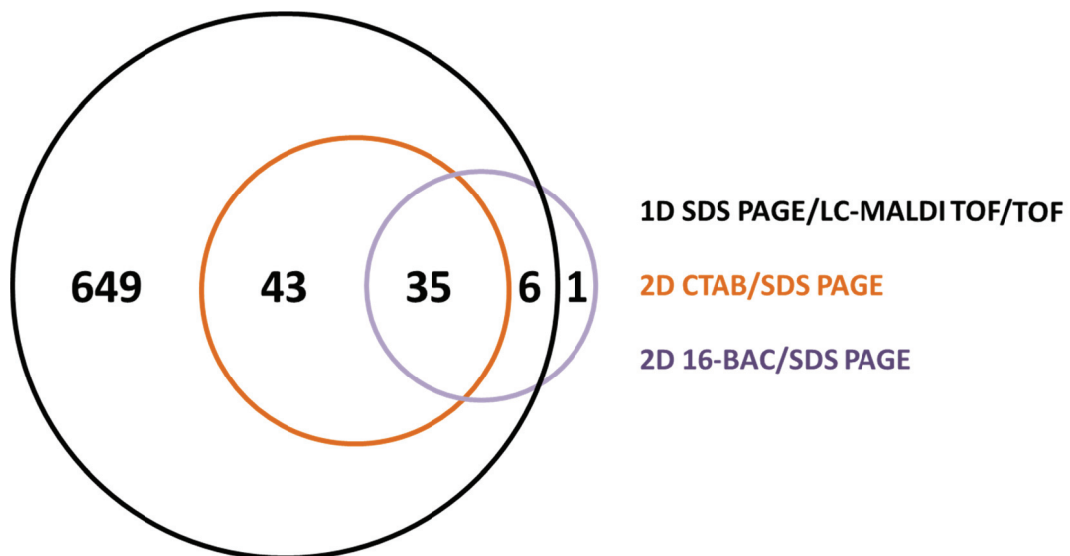
Wie schon bei den 2D Gelen (Abb. 17 und Abb. 18), war auch nach der 1D SDS PAGE eine deutlich höhere Proteinkomplexität bei den Proben aus infizierten Erythrozyten erkennbar. Dementsprechend wurden kleinere Gelfragmente zurechtgeschnitten um eine möglichst ähnliche Proteinkonzentration zu gewährleisten. Nach dem Entfärben der Gelfragmente erfolgte die In-Gel-Spaltung der Proteine. Die anschließende HPLC und massenspektrometrische Analyse wurde von Herrn Thomas Jakoby (Institut für Experimentelle Medizin, Systematische Proteomforschung, Prof. Tholey, CAU Kiel) durchgeführt. Dabei wurden in den Proben der nicht-infizierten Erythrozyten 358 humane Proteine und in den Proben der infizierten Erythrozyten 200 humane sowie 733 plasmodiale Proteine identifiziert. Wie bei den angefertigten 2D Gelen, konnte der Großteil aller humanen Proteine zum Zytoskelett (z.B. Spektrine, Aktine) und zur Membran (z. B. Bande 3, Flotilin) der Erythrozyten zugeordnet werden. Die Daten der Proteine des Parasiten wurden anschließend analog zu Abb. 19 durch Datenbanksuche und verschiedene Algorithmen bioinformatisch ausgewertet (Abb. 22). Von diesen besaßen 67 (9,1 %) ein vorhergesagtes Signalpeptid und 40 (5,5 %) ein vorhergesagtes Exportsignal (ermittelt durch SignalP 3.0 und ExportPred).



**Abb. 22: Prozentuale Verteilung der massenspektrometrisch identifizierten plasmodialen Proteine der zwei technischen Replikate (Abb. 21B) bezüglich des Vorhandenseins von Transmembranndomänen und ihrer Funktion/Lokalisation.** A: Bioinformatische Vorhersage der Anzahl an Transmembranndomänen (TM) durch den Algorithmus TMHMM v. 2.0. B: Einteilung der identifizierten Proteine anhand ihrer Funktion/Lokalisation. Die Zahlen der Teilstücke zeigen die jeweils die Anzahl an zugeordneten Proteinen sowie deren prozentualen Anteil. Membranproteine oder membran-assoziierte Proteine die einem bestimmten Kompartiment angehörten, wurden diesem zugeordnet und tauchen nicht zusätzlich in den Rubriken exportierte Membranproteine und Membranproteine auf



Die Daten der LC-MALDI TOF/TOF Analyse sind auf der beiliegenden CD-ROM gespeichert. Insgesamt wurden durch den Algorithmus TMHMM v. 2.0 für 26 % (191) aller Proteine eine oder mehrere Transmembrandomänen vorhergesagt. Bei 15 Proteinen, hauptsächlich diverse Transporter (z. B. *Chloroquine resistance transporter*, Folat/Biopterin Transporter (putativ), *Multidrug resistance protein 2*, *V-type H(+)-translocating pyrophosphatase* (putative)) waren es mehr als zehn solcher hydrophoben Domänen. Bei diesen 191 Proteinen mit Transmembrandomäne wurde zusätzlich bei 30 Proteinen ein Exportsignal und bei 33 Proteinen ein Signalpeptid gefunden. Insgesamt wurden 45 % der identifizierten Proteine bezüglich der Funktion/Lokalisation zu den Rubriken exportierte Proteine, Membranproteine oder Proteinen unbekannter Funktion bzw. Lokalisation zugeordnet. Als anteilig häufigste Verunreinigungen traten lösliche Enzyme (14 %) und Untereinheiten der Ribosomen (10 %) auf. Diese und andere teils typischen Verunreinigungen wurden auch in den 2D Gel-basierten Ansätzen gefunden. Unter der Rubrik „andere“ sind Gruppen von Proteinen zusammengefasst deren Anteil weniger als 4 % betrug. Hierzu gehörten unter anderem Proteine des Zytoskeletts (1 %), der Rhoptrien (1,2 %), des Proteasoms (4 %), des Nukleus (1,7 %), der Transkription/Translation (3,4 %), sowie Hitzeschockproteine/Chaperone (3 %). Schließlich wurden die identifizierten Proteine der beiden kationischen Elektrophoresen und die der 1D SDS/LC MSMS Analyse miteinander verglichen und ein Venn Diagramm erstellt (Abb. 23).



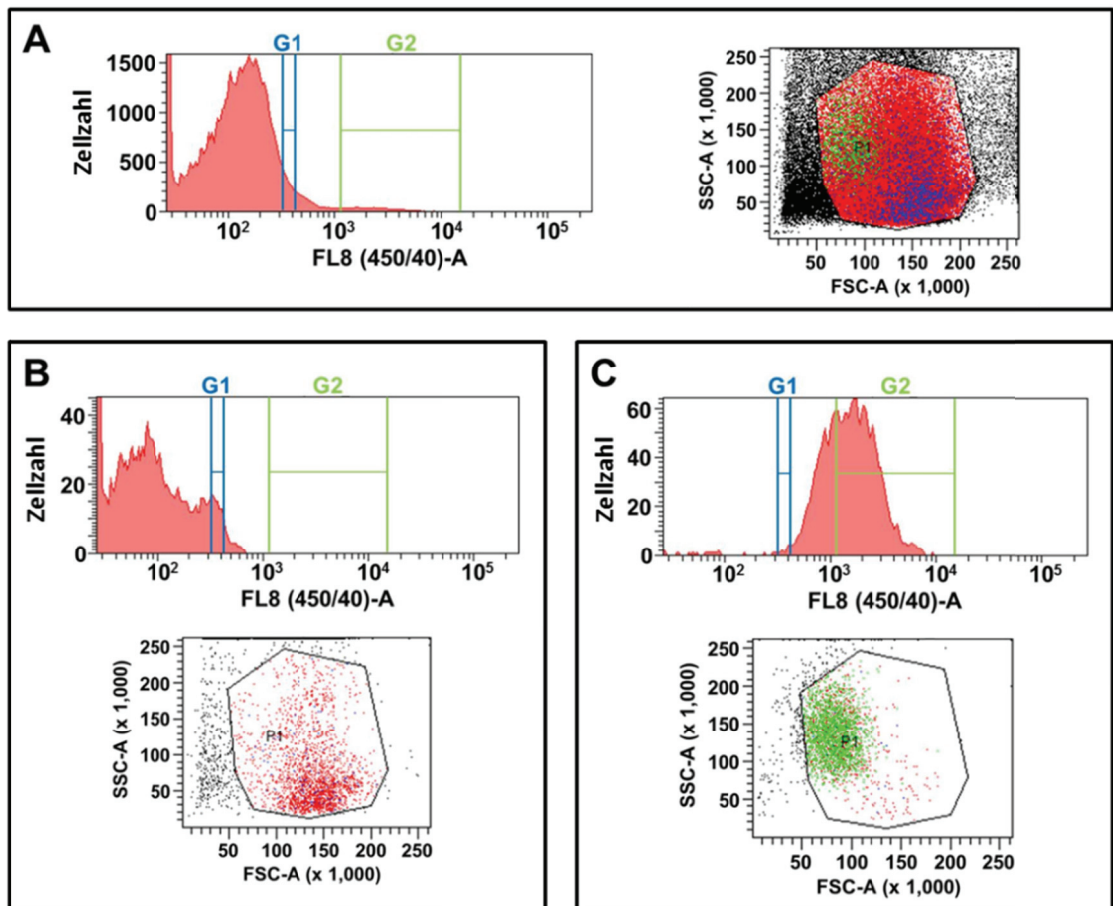
**Abb. 23** Schnittmengenvergleich der identifizierten plasmodialen Proteine zwischen 2D-16-BAC/SDS-PAGE, 2D-CTAB/SDS-PAGE und 1D SDS-PAGE/LC-MSMS. Die Zahlen im Venn Diagramm zeigen die Anzahl der zugeordneten Proteine der jeweiligen Schnittmenge.



Bis auf ein Protein (PF13\_0304, *elongation factor 1-alpha*) wurden alle Proteine, die in beiden kationischen Elektrophoresen gefunden wurden, auch mittels LC-MALDI TOF/TOF identifiziert. Zusätzlich wurden 649 weitere Proteine mittels LC-MALDI TOF/TOF bestimmt. Beim Vergleich der zwei kationischen Gelelektrophoresen wurden 35 Proteine sowohl mit der 2D 16-BAC/SDS PAGE als auch mit der 2D CTAB/SDS PAGE gefunden. Im Gegensatz dazu wurden 43 Proteine nur mit der 2D CTAB/SDS PAGE und 7 Proteine nur in der 2D 16-BAC/SDS PAGE identifiziert.

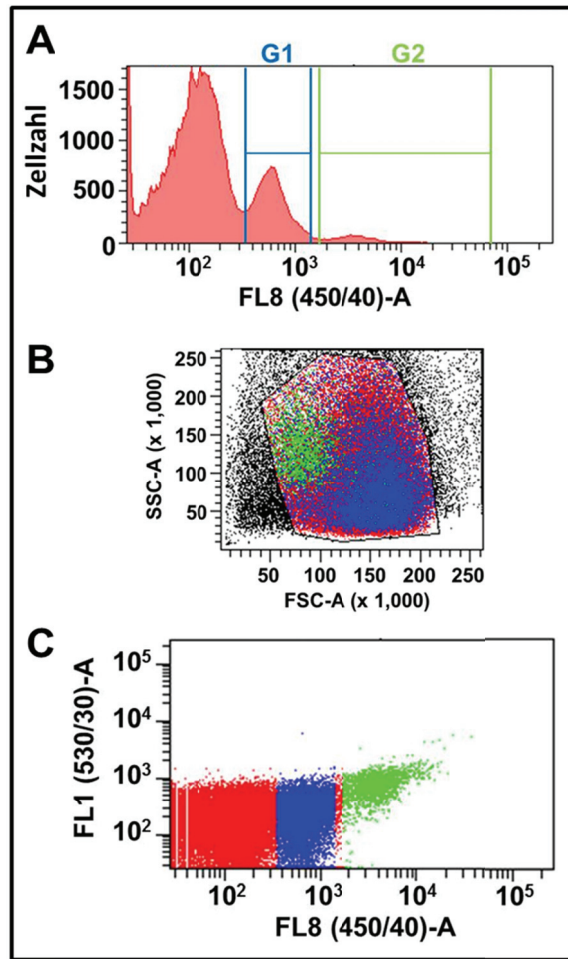
#### **4.7 Isolierung früher Ringstadien mittels *fluorescence-activated cell sorting* (FACS)**

Die Membran von früh-infizierten Erythrozyten sollte in gleicher Weise wie die Membran spät-infizierter Erythrozyten proteomisch analysiert werden. Dafür mussten zunächst die früh-infizierten Erythrozyten angereichert werden, um Kontaminationen mit Membranen von nicht-infizierten Erythrozyten möglichst gering zu halten. Während der Zellkultur erfolgt die Synchronisation auf Ringstadien über Sorbitol. Diese Methode kann jedoch nur bedingt zur Anreicherung von Ringstadien verwendet werden, da hier, im Gegensatz zur Anreicherung später Stadien über Percoll, kein Ausschluss der nicht-infizierten Erythrozyten erfolgt. So wurde durch die Behandlung mit Sorbitol durchschnittlich eine maximale Parasitämie von lediglich 20 % erreicht. Diese hohe Kontamination an nicht-infizierter Erythrozyten (80 %) stellt für die weiteren Analysen ein großes Problem dar. So musste nach einer Möglichkeit gesucht werden Ringstadien-infizierte Erythrozyten von nicht-infizierten Erythrozyten zu unterscheiden und dadurch voneinander trennen zu können. Als Merkmal hierfür wurde das Vorhandensein von DNA ausgewählt. Während humane Erythrozyten in Folge der Erythropoese ihren Zellkern und damit ihre DNA verlieren, ist in infizierten Erythrozyten DNA des Parasiten vorhanden. Diese DNA wurde durch den membranpermeablen Farbstoff VDCV markiert und mittels Durchflusszytometrie, speziell dem FACS, analysiert. In einem ersten Versuch wurde eine nicht-synchronisierte Kultur mit geringer Parasitämie verwendet (Abb. 24).



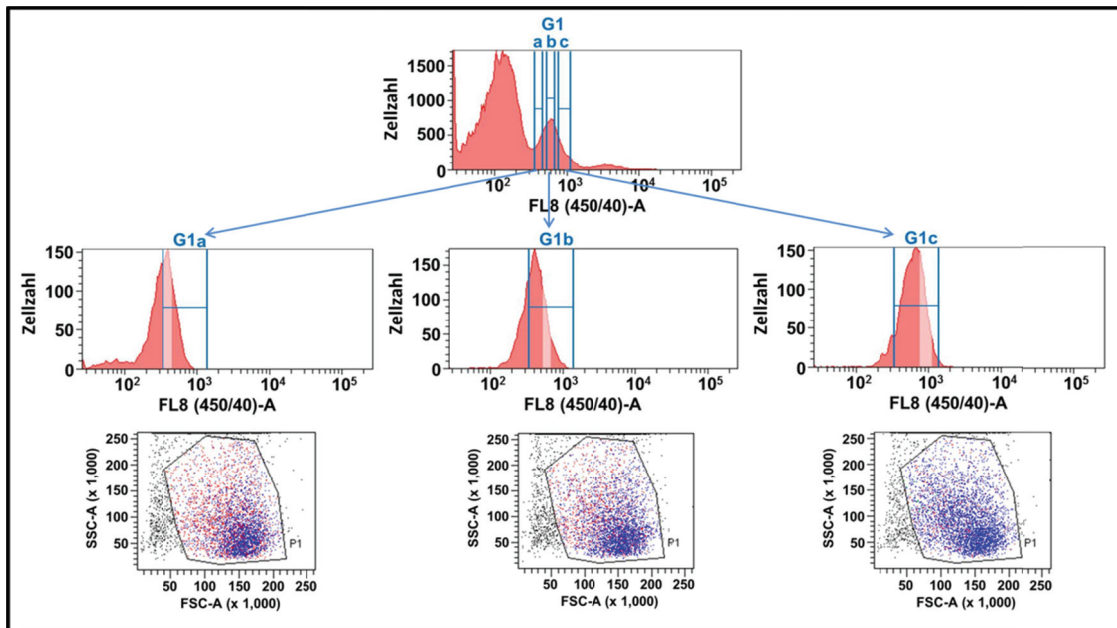
**Abb. 24:** FACS-Analyse einer nicht-synchronisierten *P. falciparum* Kultur mit einer Parasitämie von 3 %. Die Zellen wurden mit dem Farbstoff Vybrant® DyeCycle™ Violett behandelt und durch ein FACSaria Durchflusszytometer analysiert. Das Histogramm sowie das Punktdiagramm (FSC-A (*forward scatter*) zu SSC-A (*side scatter*)) in (A) zeigen die Verteilung von 100000 analysierten Zellen. Die erneute Analyse der Fenster G1 (B) und G2 (C) erfolgte jeweils mit 3000 Zellen. Dabei handelte es sich bei (B) um eine Mischkultur aus nicht-infizierten und früh-infizierten Erythrozyten und bei (C) um ausschließlich spät-infizierte Erythrozyten. Die jeweiligen Punktdiagramme zeigen die Verteilung der Zellen anhand ihrer Lichtbrechungseigenschaften. FACS - *fluorescence-activated cell sorting*.

Dieses Experiment zeigte, dass Anhand der Fluoreszenzanalyse mittels FACS spät-infizierte Erythrozyten (Abb. 24C) sowohl von nicht-infizierten, als auch von früh-infizierten Erythrozyten (Abb. 24B) differenziert werden konnten. Zusätzlich zeigen die Punktdiagramme eine eindeutige Subpopulation der spät-infizierten Zellen. Diese wiesen eine signifikant erhöhte Granulität (=höherer SSC-A Wert) und eine verringerte Zellgröße (=kleinerer FSC-A Wert) auf. Die erneute Analyse der Zellen aus dem Fenster G1 (Abb. 24B) zeigte ein zusätzliches Maxima und damit verbunden einen erhöhten Anteil von früh-infizierten Erythrozyten (ermittelt durch Giemsa-gefärbte Ausstriche, Daten nicht gezeigt). Betrachtet man das zugehörige Punktdiagramm, so können hier keine voneinander abgegrenzten Populationen unterschieden werden. Als nächstes wurde eine auf Ringstadien synchronisierte Kultur mit hoher Parasitämie analysiert (Abb. 25).



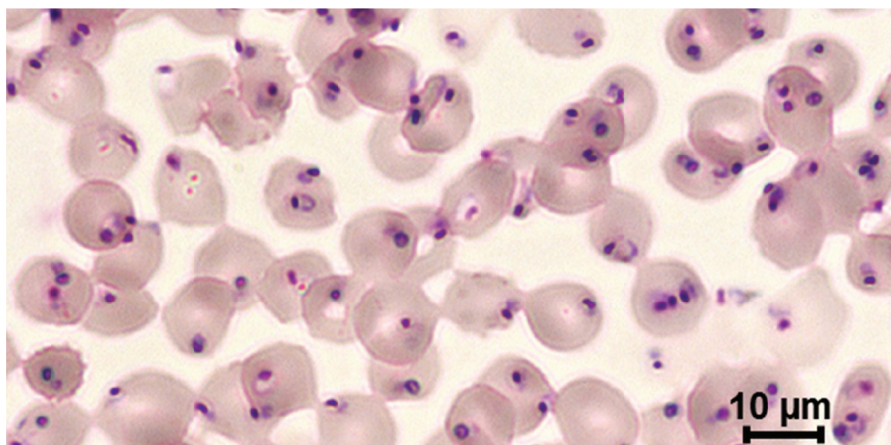
**Abb. 25:** FACS-Analyse einer auf Ringstadien synchronisierten *P. falciparum* Kultur mit einer Parasitämie von 18,5 %. Die Kultur wurde zunächst mittels Sorbitol synchronisiert, anschließend mit dem Farbstoff Vybrant® DyeCycle™ Violett behandelt und durch ein FACSaria Durchflusszytometer analysiert. Es wurden insgesamt 100000 Zellen gemessen. Das Histogramm (A) zeigt die Verteilung der analysierten Zellen anhand ihrer Fluoreszenz. Das Punktediagramm (B) stellt die Lichtbrechungseigenschaften (FSC-A (*forward scatter*) zu SSC-A (*side scatter*) der Zellen dar. Das zusätzliche Punktediagramm (C) der verschiedenen Fluoreszenzeigenschaften (FL1 und FL8 angegeben mit den zugehörigen Bandbreiten) schließt weitere mögliche Subpopulationen aus. Bei Zellen aus G1 handelte es sich bei um eine Mischkultur aus nicht-infizierten und hauptsächlich früh-infizierten Erythrozyten (blau). Ausschließlich spät-infizierte Erythrozyten wurden in G2 gefunden (grün). Alle Zellen die nicht zu G1 oder G2 gehören, sind in Rot dargestellt. FACS - *fluorescence-activated cell sorting*.

Mit diesem Versuch konnten die Ergebnisse der Vorversuche bestätigt werden. Zusätzlich war im Vergleich zur nicht-synchronisierten Kultur mit 3 % Parasitämie (Abb. 24) ein weiteres Fluoreszenzmaximum sichtbar. Dieses passte zum zusätzlich aufgetretenen Maximum während der erneuten Analyse im Vorversuch (Abb. 24B) und beinhaltete vorwiegend früh-infizierte Erythrozyten (ermittelt durch Giemsa-gefärbte Ausstriche, Daten nicht gezeigt). Es wurde erneut deutlich, dass sich die früh-infizierten Erythrozyten in dem Grad ihrer Granulität sowie ihrer Größe zwar von spät-infizierten Erythrozyten, jedoch nicht von nicht-infizierten Erythrozyten unterscheiden. Im Gegensatz dazu konnten jedoch die früh-infizierten Erythrozyten anhand ihrer Fluoreszenz differenziert und isoliert werden (Abb. 26).



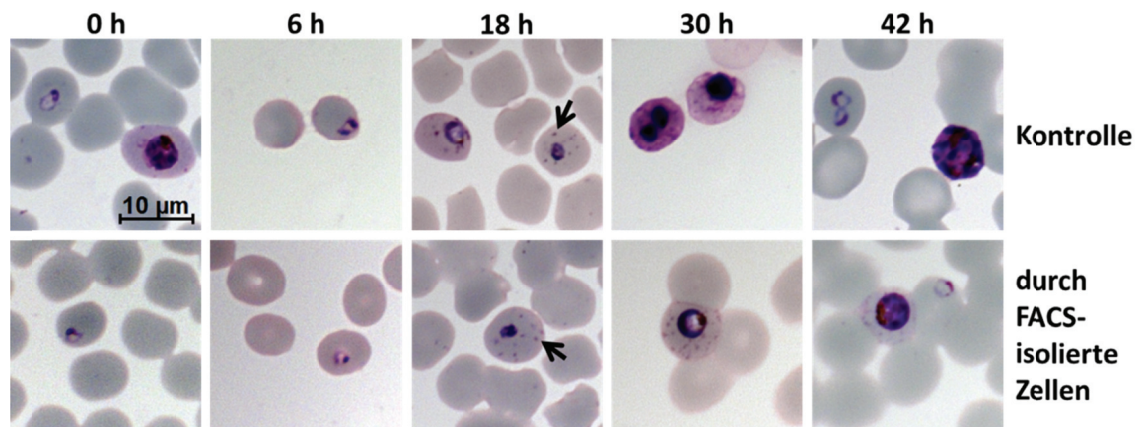
**Abb. 26: Optimierung der FACS-Fenster zur Isolierung von früh-infizierten Erythrozyten.** Es wurde die gleiche, auf Ringstadien synchronisierte, Ausgangskultur mit einer Parasitämie von 18,5 % aus Abb. 25 verwendet. Diese wurde zuerst mittels Sorbitol synchronisiert, anschließend mit dem Farbstoff Vybrant® DyeCycle™ Violett behandelt und durch ein FACSAria Durchflusszytometer analysiert. Für das Sortieren der Zellen wurde das Fenster (G1) in drei kleiner Fenster (G1a-c) unterteilt. Die Histogramme G1a-c zeigen die Verteilung von jeweils 5000 sortierten Zellen und die verwendeten Fenster wurden weiß schraffiert. Die zugehörigen Punktediagramme FSC-A (*forward scatter*) zu SSC-A (*side scatter*) zeigen die Verteilung der Zellen (blau) mit Bezug auf das gesamte Fenster G1. Alle anderen Zellen die nicht zu G1 gehören sind rot dargestellt. FACS - *fluorescence-activated cell sorting*.

Durch das Optimieren der Sortierfenster konnte der prozentuale Anteil an isolierten früh-infizierten Erythrozyten erheblich gesteigert werden. Während die, durch G1a isolierten Zellen aus ca. 65 % früh-infizierten Erythrozyten bestanden, betrug der Anteil an früh-infizierten Erythrozyten in G1b 91 %. Den mit 98 % höchsten Anteil an früh-infizierten Erythrozyten, wurde in G1c gefunden (ermittelt durch Giemsa-gefärbte Ausstriche, Abb. 27).



**Abb. 27: Giemsa-gefärbter Ausstrich von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten nach FACS.** Ein Teil der isolierten Zellen aus dem Fenster G1a von Abb. 26 wurden auf einem Objektträger ausgestrichen und anschließend durch Giemsa-Lösung angefärbt. FACS - *fluorescence-activated cell sorting*.

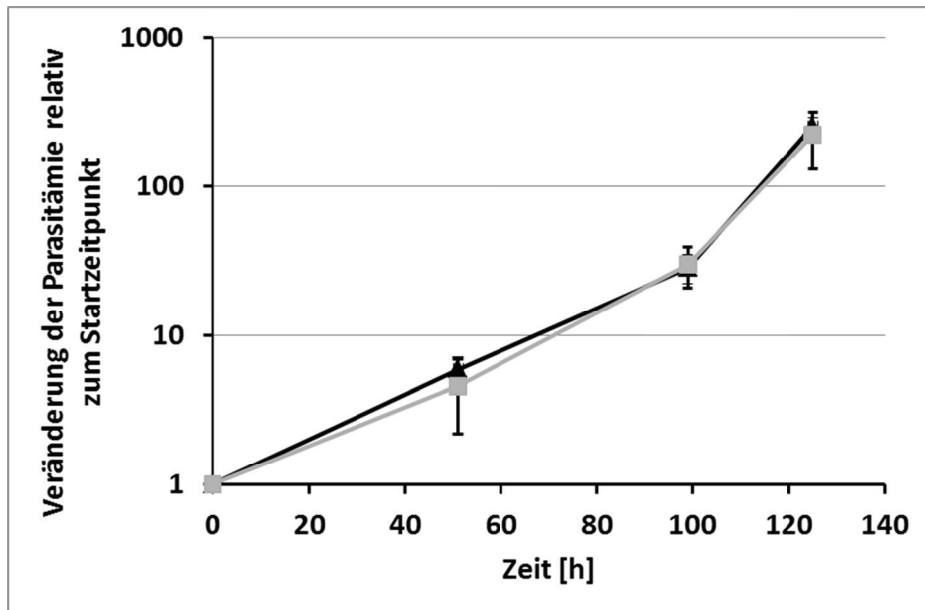
Zusätzlich zu diesen Optimierungen wurden die isolierten Zellen hinsichtlich ihrer Viabilität und der weiteren Entwicklung überprüft. Für die Entwicklung wurde ein kompletter erythrozytärer Zyklus beobachtet und zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Giemsa-gefärbte Ausstriche angefertigt (Abb. 28).



**Abb. 28: Mikroskopische Analyse der Entwicklung von FACS-isolierten Erythrozyten und einer Kontrollkultur.** Zuerst wurde eine Kultur mit 14,5 % Ringstadien und 1 % Trophozoitenstadien von *P. falciparum* aufgeteilt. Davon diente ein Teil als unbehandelte Kontrolle (obere Reihe) und ein Teil wurde mit dem Farbstoff Vybrant® DyeCycle™ Violett behandelt und durch ein FACSaria Durchflusszytometer analysiert (untere Reihe). Anschließend wurden die Zellen beider Teile unter Standardbedingungen separat kultiviert und es wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Giemsa-gefärbte Ausstriche angefertigt. Die schwarzen Pfeile beim 18h Zeitpunkt zeigen das Auftreten der *Maurer's clefts*. FACS - fluorescence-activated cell sorting.

Die Giemsa-gefärbten Ausstriche aus Abb. 28 zeigen, dass keine signifikanten Unterschiede in der Entwicklung zwischen unbehandelten Parasiten und durch FACS-isolierte Parasiten zu erkennen waren. Zum Zeitpunkt 18h war mit 2,5 % die Parasitämie der Kontrollkultur höher, als die der isolierten Zellen mit 0,33 %. Dies konnte auf das Vorhandensein von Schizonten in der Kontrollkultur zurückgeführt werden, welche binnen der ersten Stunden nach Kulturstart wodurch zusätzliche Parasiten entlassen wurden. Im Gegensatz dazu wurden diese Schizonten während der FACS-Analyse aussortiert. Obwohl die Parasiten eine etwas langsamere Entwicklung zeigten, waren in beiden Kulturen nach 6h nur noch Ringstadien vorhanden. Diese entwickelten sich weiter zu Trophozoiten und etablierten mit den *Maurer's clefts* charakteristische Membranstrukturen innerhalb der Erythrozyten (18h Zeitpunkt, lila Punkte angedeutet mit schwarzen Pfeilen) (230). Nach 42h wurden in beiden Kulturen sowohl Schizonten, als auch Ringstadien beobachtet, was auf Reinvansion der Parasiten und damit auf einen neuen intraerythrozytären Lebenszyklus hinweist. Zusätzlich wurde die Reinfektionsrate der Parasiten über drei Lebenszyklen kontrolliert (Abb. 29).



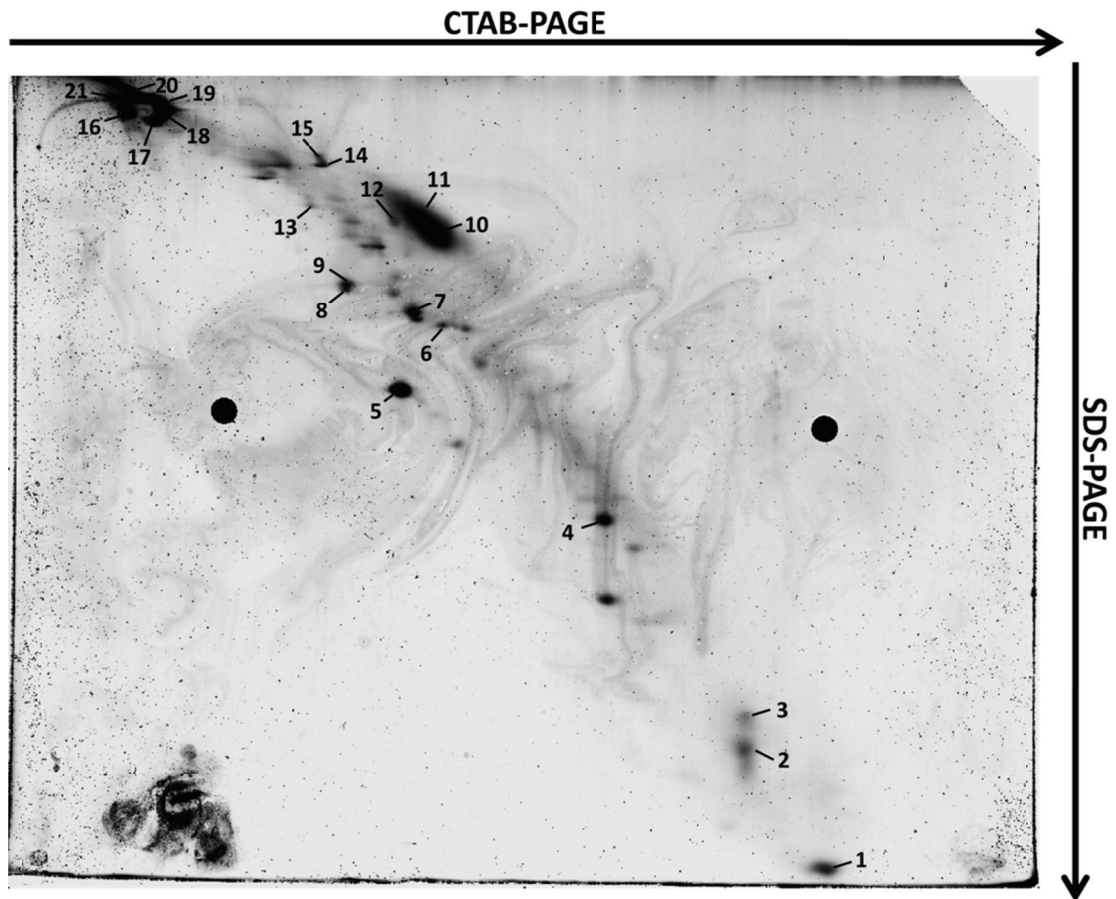


**Abb. 29: Kontrolle der Reinfektionsrate von FACS-isolierten Erythrozyten und einer Kontrollkultur.** Der Zeitverlauf zeigt die Vervielfachung der Parasitämie (jeweils relativ zum Startzeitpunkt) einer unbehandelten *P. falciparum* Kontrollkultur (▲) und einer mit Vybrant® DyeCycle™ Violett behandelten und durch ein FACSaria Durchflusszytometer analysierten *P. falciparum* Kultur (■). Die Parasitämie aller Zeitpunkte wurde anhand Giemsa-gefärbter Ausstriche ermittelt. Für jeden Zeitpunkt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus je drei biologischen Replikaten dargestellt. FACS - fluorescence-activated cell sorting.

Nach dem ersten Lebenszyklus wurde eine etwas höhere Parasitämie bei der Kontrollkultur beobachtet. Dies wurde jedoch in den zwei darauffolgenden Zyklen durch die FACS-isolierten Zellen kompensiert, sodass am Ende der drei Zyklen die Kulturen eine ähnliche Infektionsrate und damit verbunden eine ähnliche relative Parasitämie aufwiesen.

#### 4.8 Analyse der Membranfraktionen aus früh-infizierten Erythrozyten

Nach dem FACS wurde eine Membranfraktion der früh-infizierten Erythrozyten (98 %), analog zu den Membranfraktionen von spät-infizierten Erythrozyten, durch Saponinlyse mit anschließender differentieller Zentrifugation angefertigt. Von dieser Probe wurde eine Hälfte in CTAB-Probenpuffer und die andere Hälfte in SDS-Probenpuffer zur Proteinbestimmung aufgenommen (Vergleich Abb. 14). Für die anschließende 2D CTAB/SDS PAGE wurden 60 µg Protein verwendet (Abb. 30).



**Abb. 30: 2D CTAB/SDS Gel der Membranfraktionen aus früh-infizierten Erythrozyten.** Die Daten der massenspektrometrischen Analyse der jeweiligen Spotnummern in der Tabelle 4 zu finden. Das Gel wurde mit Flamingo Pink gefärbt.

Einerseits war im Vergleich zu den Gelen der spät-infizierten Erythrozyten die Komplexität der Probe deutlich geringer, andererseits jedoch etwas höher als bei den Gelen der nicht-infizierten Erythrozyten. Zusätzlich zeigten die Mehrzahl der Spots (z. B. Bande 3 (Spot 10) und Komponenten des Zytoskeletts (Spot 16-21)) eine vergleichbare Verteilung und Intensität. Insgesamt wurden 71 Spots isoliert, von denen schließlich 21 massenspektrometrisch identifiziert wurden (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Identifizierte Proteine der Spots aus dem 2D CTAB/SDS Gel der früh-infizierten Erythrozyten. MW - Molekulargewicht in Da.**

Spot Nr.	Name des identifizierten Proteins	Uniprot Nr. (PlasmoDB)	Protein MW	Anzahl Peptide	Protein Score
1	Peroxiredoxin 2, isoform CRA_a [Homo sapiens]	A6NIW5	15242	2	118
2	Beta-globin [Homo sapiens]	C8C504	16101	4	224
3	Putative beta-actin-like protein 3 [Homo sapiens]	ACTBM	42330	4	79,7
4	cDNA FLJ57283, highly similar to Actin, cytoplasmic 2 [Homo sapiens]	B4E3A4	40115	12	401
5	Catalase [Homo sapiens]	P04040	59946	20	405
6	Heat shock protein 70 (HSP70) homologue [ <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7]	Q8I2X4 (PFI0875w)	72457	14	108
7	EPB42 protein [Homo sapiens]	Q4KKX0	70096	14	410
8	EPB41 protein [Homo sapiens]	Q4VB86	70246	10	85,2
9	EPB41 protein [Homo sapiens]	Q4VB86	70246	15	199
10	Band 3 anion transport protein [Homo sapiens]	P02730	102012	13	649
11	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 [Homo sapiens]	E2RVJ0	102149	12	410
12	RhopH3 [ <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7]	BOM0W2 (PFI0265c)	105587	5	101
12	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 [Homo sapiens]	E2RVJ0	102149	6	100
13	ATP-citrate synthase [Homo sapiens]	P53396	121674	16	224
14	Ring-infected erythrocyte surface antigen [ <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7]	P13831 (PFA0110w)	88815	13	270
15	Ring-infected erythrocyte surface antigen [ <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7]	P13831 (PFA0110w)	88815	8	170
16	Ankyrin-1 [Homo sapiens]	P16157	207334	19	152
17	Spectrin, beta, erythrocytic [Homo sapiens]	Q59FP5	269042	22	273
18	Spectrin, beta, erythrocytic [Homo sapiens]	B2RMN7	247271	29	456
19	Spectrin beta chain, erythrocyte [Homo sapiens]	P11277	247171	34	537
20	Spectrin, alpha, erythrocytic 1 (Elliptocytosis 2), isoform CRA_c [Homo sapiens]	D3DVD8	178905	24	205
21	Ankyrin-1 [Homo sapiens]	P16157	207334	23	200



## 5 Diskussion

Die Malaria tropica, ausgelöst durch den Parasiten *Plasmodium falciparum*, ist die schwerste Form der Malaria und kann einen tödlichen Verlauf nehmen. Dabei werden die klinischen Symptome maßgeblich durch den erythrozytären Lebenszyklus von *P. falciparum* bestimmt. Insbesondere die Modifikationen der Wirtszellmembran durch exportierte Proteine des Parasiten resultieren in der Anlagerung dieser Zellen an das Endothel der Blutgefäße, sowie in der Verklumpung mit weiteren Erythrozyten und Thrombozyten. Infolgedessen treten lebensbedrohliche Zustände, wie zum Beispiel die Unterversorgung der Organe mit Sauerstoff auf, welche zum Tod des Patienten führen können. Es ist daher von entscheidender Bedeutung diese molekularen Modifikationen der Wirtszelle aufzuklären. Bisher sind nur wenige der exportierten Proteine des Parasiten hinsichtlich ihrer Funktion und Lokalisation charakterisiert worden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Membran von Erythrozyten infiziert mit verschiedenen Stadien von *P. falciparum* angereichert und isoliert. Danach erfolgte die Auftrennung der Proteine dieser Membranfraktion mittels verschiedener Gelelektrophorese-Techniken und schließlich wurden die aufgetrennten Proteine massenspektrometrisch analysiert.

### 5.1 Oberflächenmarkierung von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten

In dieser Arbeit wurde zunächst versucht, die Oberflächenproteine der infizierten Erythrozyten selektiv mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren, um diese von den intrazellulären Proteinen unterscheiden zu können. Der entscheidende Vorteil dieser Methode wäre, dass in späteren Gel-basierten Analysen die markierten von den nicht-markierten Proteinen einfach anhand ihrer Fluoreszenz unterschieden und so der Wirtszelloberfläche zugeordnet werden können. Alle Versuche zur Oberflächenmarkierung führten zu dem Ergebnis, dass die eingesetzten Farbstoffe nicht nur die Proteine der Wirtszellmembran markierten, sondern auch durch den Parasiten, ohne dabei das Zytosol der Wirtszelle mit anzufärben, aufgenommen wurden (Abb. 7 und Abb. 8). Im Gegensatz dazu wurde bei den nicht-infizierten Erythrozyten nur die Oberfläche angefärbt und es kam nicht zu einer Aufnahme der Farbstoffe. Ein möglicher Weg für das Passieren der Farbstoffe durch die Wirtszellmembran in das Zellinnere der infizierten Erythrozyten könnten die NPPs sein. Es wurde mehrfach gezeigt, dass hierdurch die Wirtszelle nach der Invasion eine erhöhte Permeabilität für ein breites Spektrum an Substanzen aufweist

(60-67). In diesem Zusammenhang wurde sogar bei membran-impermeablen NHS-Biotinderivaten wurde eine gesteigerte Permeabilität im Vergleich zu nicht-infizierten Erythrozyten nachgewiesen (226,231) und andere Arbeiten haben gezeigt das durch den Einsatz von Furosemid Teile der NPPs blockiert wurden (64,226,232). Dieser Blockierungseffekt wurde, auch in Kombination mit Chloroquin, für die hier verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe nicht erreicht (Abb. 8). Deshalb musste die Aufnahme der Farbstoffe über andere Teile der NPPs oder über alternative Wege erfolgt sein. Die Tatsache, dass selbst bei frühen Ringstadien die Fluoreszenzfarbstoffe durch den Parasiten aufgenommen wurden (Abb. 7) spricht für einen alternativen Weg, da in diesem frühen Stadien die NPPs noch nicht ausgebildet sind. Eine Möglichkeit hierfür könnte ein direkter Tubus zwischen dem Parasiten und der Wirtszellmembran sein (49,233,234). Unterstützt wird diese Theorie dadurch, dass das Wirtszellzytoplasma nicht mit angefärbt wurde. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe nicht für die selektive Oberflächenmarkierung von infizierten Erythrozyten geeignet sind, da diese auch im Inneren des Parasiten zu finden waren.

## **5.2 Isolierung und Gel-basierte Analyse der Wirtszellmembran von spät-infizierten Erythrozyten**

Als Alternative zur Oberflächenmarkierung wurde die Membran infizierter Erythrozyten angereichert und isoliert, um diese später auf proteomischer Ebene zu analysieren. Im Gegensatz zu bereits markierten Proteinen, wie es bei der Oberflächenmarkierung der Fall gewesen wäre, ist bei diesem Ansatz eine möglichst geringe Kontamination der Probe (z.B. mit zytosolischen Proteinen) die Basis für weiterführende Analysen.

### **5.2.1 Anreicherung spät-infizierter Erythrozyten und Isolierung der Wirtszellmembran**

Sowohl die Synchronisation, als auch die Isolierung der einzelnen erythrozytären Entwicklungsstadien von *P. falciparum* sind ein wichtiger und kritischer Punkt zur Erforschung des Parasiten. Hierfür wurden innerhalb der letzten 30 Jahre verschiedene Standardprotokolle entwickelt und so konnte der Parasit in Dauerkulturen gehalten werden. Basierend auf den vielfältigen morphologischen Modifikationen der Wirtszelle bei den späten Parasitenstadien

sind mit Percoll-Dichtegradienten (214), MACS (*magnetic activated cell sorting*) (235) oder Gelafundin (236) mehrere Möglichkeiten zur Synchronisation gegeben, welche auch zur signifikanten Anreicherung verwendet werden können. Zur Anreicherung später Stadien für die Isolierung der Wirtszellmembran wurde in dieser Arbeit ein Percoll-Dichtegradient verwendet. Einerseits bietet diese Methode mit 98 % eine höhere Anreicherung später Stadien als mit Gelafundin (ca. 75 %) und andererseits lassen sich, im Gegensatz zu MACS, große Mengen an Zellen schnell und kostengünstig separieren. Anschließend wurden durch die Kombination aus Saponinlyse und mechanischem Stress durch vortexen die Zellen lysiert und durch die darauffolgende differentielle Zentrifugation in eine Membranfraktion und eine Fraktion mit freien Parasiten separiert. Die Lyse durch Saponin wurde schon in den frühen achtziger Jahren verwendet, um Schizonten von der Wirtszelle zu isolieren (237). Sowohl die Immunfluoreszenzmikroskopie (Abb. 9) als auch der immunologische Nachweis von verschiedenen Markerproteinen (Abb. 10) bestätigten die Anreicherung der Wirtszellmembran in der Membranfraktion. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Fraktion noch wenige Fragmente der PVM/TVN beinhaltet. Es ist bekannt, dass das PVM/TVN mehrere Ausstülpungen in Form von Kringeln und Wirbeln ausbildet (69,238). Wahrscheinlich sind Fragmente dieser Ausstülpungen während der Präparation der Membranfraktion mit der Membranhülle der Erythrozyten in Kontakt getreten und dadurch zurückgeblieben. Unterstützt wird diese Theorie durch die Immunfluoreszenz, bei der die gelegentlich auftretenden Signale von EXP2 immer punktuell an der Wirtszellmembran zu finden waren. Der immunologische Nachweis von MAHRP-1 deutet auf eine geringe Kontamination der Membranfraktion mit den *Maurer's clefts* hin. Der Grund für das Vorhandensein der *Maurer's clefts* könnte sein, dass diese Strukturen mit der Membran oder dem Zytoskelett der Wirtszelle interagieren. In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass die *Maurer's clefts* über tubuläre Strukturen den Kontakt zur Wirtszellmembran halten (73,74). Insgesamt gesehen wurde erfolgreich eine Methode zur Anreicherung und Isolierung der Membran spät-infizierter Erythrozyten erarbeitet und damit der Grundstein für die proteomische Analyse dieses Kompartiments gelegt.

### **5.2.2 Optimierung der kationischen 2D PAGE und Gel-basierte Analyse der Membranfraktion spät-infizierter Erythrozyten**

Nach der erfolgreichen Anreicherung der Wirtszellmembran stellte sich die Frage, wie die Proteine dieser Fraktion weiter analysiert werden. Als Standardtechniken für die Gel-basierte Auftrennung von Proteingemischen hat sich vor allem die 1D SDS PAGE und die 2D IEF/SDS PAGE in den letzten Jahrzehnten etabliert. Jedoch sind beide Methoden zur Proteintrennung für die vorliegende Fragestellung unzureichend. Während die 1D SDS PAGE stark in der Auflösung begrenzt ist, besitzt insbesondere die klassische 2D PAGE signifikante Limitationen hinsichtlich der Analyse von Membranproteinen. Diese werden oft aufgrund ihrer stark hydrophoben Domänen nur unzureichend dargestellt (209-211). Einerseits dürfen keine anionischen oder kationischen Detergenzien verwendet werden und andererseits präzipitieren solche Proteine oft beim Erreichen ihres isoelektrischen Punktes. Zusätzlich ist damit ein unzureichender Übergang von der ersten in die zweite Dimension vorhanden (239,240). Um dies zu umgehen, wurden Versuche mit einer 2D SDS/SDS PAGE mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen sowie der Zugabe von Harnstoff in einer Dimension durchgeführt (241). Diese 2D PAGE besitzt Limitierungen in der Auflösung und so wurde für die Darstellung des Membranproteoms von nicht-infizierten- und infizierten Erythrozyten nach einer alternativen gelbasierenden 2D Methode gesucht. Besonders geeignet hierfür schien der Wechsel von einem kationischen zu einem anionischen Detergenz zwischen den zwei Dimensionen zu sein (242-245). Zusätzlich zur Carbamidomethylierung der Cysteinreste der Proteine nach der ersten Dimension, besitzen die Gele beider Dimensionen eine unterschiedliche Gesamt-Acrylamidkonzentration und es erfolgt ein Wechsel von der Harnstoff-haltigen ersten Dimension zur Harnstoff-freien zweiten Dimension. Diese Faktoren beeinflussen die Mobilitätseigenschaften der zu trennenden Proteine und tragen so zu einer erhöhten Auflösung bei. So wird das Bindungsverhalten von SDS an Proteine durch das Vorhandensein von Harnstoff beeinflusst und die unterschiedliche Acrylamidkonzentration verändert insbesondere die Laufeigenschaften hydrophober Proteine (241,246). Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die 2D 16-BAC/SDS PAGE als auch die 2D CTAB/SDS PAGE verwendet. Für beide Elektrophoresen wurde durch verschiedene Modifikationen von bereits publizierten Arbeiten ein Protokoll für die kationische 2D PAGE mit guter Auflösung erarbeitet (Abb. 11). Die ersten kationischen 2D Gele der Membranfraktion zeigten eine deutliche Anreicherung des integralen Membranproteins Bande 3 sowie verschiedener Komponenten des Zytoskeletts der Erythrozyten im Vergleich zur Fraktion freier Parasiten (Abb. 12). Dabei war zu erwarten, dass in der Membranfraktion auch Komponenten des Zytoskeletts angereichert wurden, da speziell in Erythrozyten dieses an vielen Stellen eng miteinander mit

der Membran verknüpft ist (152-157). Der direkte Vergleich beider kationischer PAGEs mit der klassischen 2D IEF/SDS PAGE zeigte deutlich, dass diese für die Analyse der Membranfraktion besser geeignet waren, da hier mehr als doppelt so viele Proteine identifiziert werden konnten. Außerdem war bei der 2D IEF/SDS PAGE teils eine Perlschnur-artige Verteilung der Proteine entlang des pH-Gradienten zu erkennen. Es ist bekannt, dass diese häufig bei Membranproteinen oder beim Vorhandensein von mehreren „conformers“ und Isoformen eines Proteins auftreten (247). Unter „conformers“ werden Moleküle bezeichnet die trotz identischer Sequenz und Masse unterschiedlich geladene Gruppen auf der Oberfläche präsentieren (247,248). Insbesondere die Komponenten des Zytoskeletts der Erythrozyten (Bande 4.1, Bande 4.9, Spektrin, Ankyrin) besitzen mehrere Isoformen, wodurch verschiedene Bereiche der 2D Gele maskiert wurden. Zusätzlich war der gesamte obere Rand der Gele angefärbt, was auf einen unvollständigen Übergang der Proteine aus der ersten Dimension in die zweite Dimension deutet und eine mäßige Reproduzierbarkeit mit sich zog. Diese Nachteile traten nicht bei den Gelen der kationischen 2D PAGE auf. Zum einen war der obere Rand der Gele frei von Farbsignalen und zum anderen zeigte das Nachfärben des Gelstreifens der ersten Dimension keinerlei Rückstände an Proteinen (Daten nicht gezeigt). Somit kann davon ausgegangen werden, dass sämtliche Proteine von der ersten in die zweite Dimension transferiert wurden. Darüber hinaus erfolgte die Trennung bei der kationischen PAGE in beiden Dimensionen unabhängig vom pI nach der Masse der Proteine und es traten keine Perlschnur-artigen Verteilungen von Proteinen auf. Beim Vergleich der Gele der jeweiligen biologischen Replikate wurde sowohl bei der 2D 16-BAC/SDS PAGE, als auch bei der 2D CTAB/SDS PAGE eine sehr hohe Reproduzierbarkeit erreicht und es wurden Proteine in einem großem Spektrum (14-281 kDa, pI 4,3-10,5) aufgetrennt. Aufgrund dieser Vorteile der kationischen PAGEs, wurde die 2D IEF/SDS PAGE nicht zur weiteren Analyse der Membranfraktion von infizierten Erythrozyten verwendet. Beim Vergleich der beiden kationischen 2D PAGEs untereinander wurden die Ergebnisse von Yamaguchi *et. al.* bestätigt, dass im Vergleich zu 16-BAC das Detergenz CTAB eine höhere Solubilisierungskraft besitzt (Vergleich Abb. 18 z.B. Spot XVI der 2D-16-BAC/SDS-PAGE zu Spot 51 der 2D-CTAB/SDS-PAGE) (245). Bei der näheren Betrachtung der Mastergele (Abb. 17 und Abb. 18) sowie der zugehörigen vergrößerten Teilbereiche (Abb. 15 und Abb. 16) wird deutlich, dass viele der aufgetrennten Proteine eine ähnliche Mobilität in beiden Dimensionen aufwiesen (z. B. Spots 5, 13, 19, 20 der 2D 16-BAC/SDS PAGE). Insbesondere wird dies am charakteristischen Laufverhalten von PF07\_0008 (exportiertes Protein mit unbekannter Funktion, Spot 12 in der 2D 16-BAC/SDS-PAGE und Spot 22 in der 2D CTAB/SDS-PAGE) deutlich. Im Gegensatz dazu zeigten andere Proteine in beiden kationischen PAGEs geringfügig unterschiedliche

Mobilitäten und Bereiche auf den Gelen wurden divergent aufgelöst (Abb. 16, gelbe Kreise). In Folge dessen ergänzten sich beide Elektrophoresen gegenseitig bei der Darstellung der Proteine der Probe. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Beobachtung von Yamaguchi *et. al.* sein, dass stark basische Proteine besonders in der 16-BAC-PAGE langsamer liefen, als andere Proteine mit gleichem Molekulargewicht (244,245).

### 5.2.3 Identifizierte plasmodiale Proteine aus den Gelen spät-infizierter Erythrozyten

#### Proteine des hochmolekularen Rhoprienkomplex

Im Gegensatz zu allen anderen getesteten löslichen Proteinen, wurde im immunologischen Nachweis RAP-1 in der Membranfraktion angereichert. Damit übereinstimmend wurden mehrere Proteine der Rhoprien (RhopH1/H2/H3, RAP-1, RAP-2 und RAP-3) in Teils sehr hoher Menge in den 2D Gelen der spät-infizierten Erythrozyten gefunden. Bei den Rhoprien handelt es sich um apikale Organellen der Merozoiten, deren Inhalt während der Invasion in die Wirtszelle sezerniert wird (44). Sowohl im Anschluss der Sezernierung, als auch im weiteren Verlauf der Entwicklung des Parasiten werden die Lokalisation und die Funktion dieser Rhoprien-Proteine teils kontrovers diskutiert. Die Proteine RhopH1-3 wurden bisher sowohl in der PVM als auch im Zytosol und der Membran der Wirtszelle gefunden und bilden einen hochmolekularen Komplex dessen genaue Funktion noch unbekannt ist (249-252). Es wird angenommen, dass dieser Komplex an den Veränderungen der Wirtszelle beteiligt ist (253). Das Protein RhopH1 wird durch die CLAG-Familie (*cytoadherence-linked asexual gene*) kodiert, welche aus den Mitgliedern CLAG 2 (PFB0935w), CLAG 3.1 (PFC0120w), CLAG 3.2 (PFC0110w), CLAG 8 (MAL7P1.229) und CLAG 9 (PFI1730w) besteht (254-257). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass jeder RhopH-Komplex immer nur eines dieser Genprodukte enthält (256,258). In den Gelen der kationischen PAGE wurden die Produkte von CLAG 3.1 und CLAG 9 identifiziert. Durch die Trypsinbehandlung infizierter Erythrozyten fanden Goel *et. al.* heraus, dass CLAG 9 in der Wirtszellmembran eingelagert wird und eine Rolle beim PfEMP1 Transport besitzt (252). Für die beiden CLAG 3 Produkte wurde kürzlich durch *gene silencing* gezeigt, dass diese wahrscheinlich am Wachstum und Entwicklung des Parasiten beteiligt sind (250). Versuche, den Genlocus von RhopH3 bei überlebensfähigen intraerythrozytären Parasiten zu zerstören scheiterten, wodurch diese Hypothese, dass der RhopH-Komplex essentiell für das Wachstum des Parasiten ist, unterstützt wird (259). Daneben deuten die Ergebnisse anderer Gruppen

darauf hin, dass der RhopH-Komplex an der zytosolischen Seite der Wirtszellmembran bindet (260,261). Dies erklärt, weshalb die Komponenten des RhopH-Komplexes in den 2D Gelen der Membranfraktion von spät-infizierten Erythrozyten angereichert wurden.

### **Proteine des niedermolekularen Rhoptrienkomplex**

Die in den 2D Gelen identifizierten Proteine RAP-1-3 bilden den niedermolekularen Rhoptrien-Komplex und, ähnlich dem RhopH-Komplex, ist auch hier die genaue Funktion und Lokalisation nicht genau aufgeklärt (262,263). Sowohl für RAP-1 als auch für RAP-2 wurde die Bindung an die Oberfläche von Erythrozyten gezeigt (264-266). Darüber hinaus wird für RAP-2 eine entscheidende Rolle in der Sequestrierung von nicht-infizierten und früh-infizierten Erythrozyten an Endothelzellen vermutet (267). Obgleich nicht weniger bedeutend, wurde RAP-3 als letztes näher untersucht und erst 2002 das codierende Gen identifiziert (268). Kürzlich wurden eindeutige Hinweise auf die mögliche Funktion von RAP-3 bei der Erkennung und Invasion von Erythrozyten gefunden (266). In dieser Studie wurde gezeigt, dass Moleküle auf der Erythrozytenoberfläche durch anti-RAP-3 Antikörper erkannt werden. Dabei verlief der Erkennungsprozess in Abhängigkeit zur Parasitämie und führte zur Phagozytose oder Lyse der markierten Zelle. Schließlich wurden durch den Einsatz von Bindungsassays zwei konservierte Regionen kartiert, über die RAP-3 mit Oberflächenmolekülen von Erythrozyten interagiert (269). Im Hinblick auf die Lokalisation wurde RAP-3 bisher nur in *lipid rafts* von Schizonten gefunden (198,270) und das Vorhandensein in den generierten 2D Gelen dieser Arbeit könnte ein erster Hinweis zu weiteren Funktionen wie der Wirtszellmodifikation sein.

### **Proteine der *Maurer's clefts***

In den 2D Gelen wurden mehrere Proteine identifiziert, die den *Maurer's clefts* zugeordnet wurden. Wie oben erwähnt, könnte das Vorhandensein der *Maurer's clefts* durch die Interaktion über tubuläre Strukturen mit der Membran oder dem Zytoskelett der Wirtszelle begründet sein (73,74). Unterstützt wird diese Hypothese durch das Auftreten von PFE0065w (SBP1, *skeleton-binding protein 1*) in den 2D Gelen. Mehrere Hinweise deuten auf eine Interaktion von SBP1 sowohl mit tubulären Strukturen als auch dem Zytoskelett der Erythrozyten (129,184) und es wird eine Rolle im Transport von PfEMP1 angenommen (182,183). Zusätzlich wurde das Protein PF11\_0281 (*protein phosphatase 1*) identifiziert, welches den Phosphorylierungszustand von SBP1 modifiziert und eines ersten für den

Parasiten essentiellen Enzyme der *Maurer's clefts* darstellt (187). Genauso kritisch für den Parasiten ist das in dem Gel der 2D CTAB/SDS PAGE gefundene PF11735c (REX1). Das Protein interagiert mit der zytoplasmatischen Seite der *Maurer's clefts* (179,180) und Studien mit Deletionsmutanten führten zu einer erheblich gestörten Ausbildung der *knobs* (271). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass REX1 bei der Weiterleitung von Proteinen zu den *knobs* eine wichtige Rolle spielt. Ein weiteres identifiziertes Protein MAL7P1.172 ist im Lumen der *Maurer's clefts* lokalisiert. Die genaue Funktion ist bisher nicht bekannt, aber erste Hinweise deuten auf eine Funktion im PfEMP1 Transport hin. Versuche mit MAL7P1.172-defizienten Parasiten haben gezeigt, dass PfEMP1 zwar zu den *Maurer's clefts* transportiert wurde, jedoch nur in sehr geringem Maße an die Wirtszelloberfläche gelangte (272). MAHRP-1 ist ebenfalls am Transport von PfEMP1 beteiligt und wurde sowohl in der 1D SDS PAGE (Abb. 10) als auch in der 2D CTAB/SDS PAGE (Abb. 20) immunologisch nachgewiesen. Im Gegensatz zu den bisher genannten Proteinen war es nicht möglich, MAHRP-1 massenspektrometrisch zu identifizieren. Durch den immunologischen Nachweis im 2D Gel wurde ausgeschlossen, dass MAHRP-1 während der Vorbereitung und Durchführung der Elektrophoresen verloren ging. Ein Grund für die fehlende Identifizierung könnte eine zu geringe Proteinkonzentration von MAHRP-1 in den 2D Gelen sein. Damit im Zusammenhang waren im Bereich des positiven MAHRP-1 Signals auf den Mastergelen mehrere nicht identifizierte Spots mit schwacher Intensität vorhanden (Abb. 20). Unterstützt wird dies durch die ebenfalls schwache Intensität der in den 2D Gelen identifizierten *Maurer's clefts* Proteine. Diese geringe Proteinkonzentration könnte auch der Grund sein, weshalb keine weiteren *Maurer's clefts* Proteine wie Vertreter der PfMC-2TM (*Plasmodium falciparum* two transmembrane *Maurer's cleft*) Proteinfamilie identifiziert werden konnten.

### **Hitzeschockproteine / Chaperone**

Mit PF14\_0359 wurde ein Vertreter der HSP40 Familie identifiziert, deren Mitglieder generell als Ko-Chaperone für HSP70 fungieren und so deren Aktivität modulieren (273). Diese Chaperone sind in vielfältige Prozesse wie der Faltung, der Translokation und Degradation von Proteinen sowie in der Signaltransduktion involviert (274). Die Proteingruppe HSP40 umfasst 43 Mitglieder und PF14\_0359 ist eins von nur 2 Vertretern der Typ I HSP40 (275). Obwohl das Protein kein bekanntes Exportsignal besitzt, deuten interessanterweise proteomische Untersuchungen von Florens *et. al.* auf eine Lokalisation in der Membran infizierter Erythrozyten hin (194,207). Diese Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, dass PF14\_0359 in den 2D Gelen der Membranfraktion infizierter



Erythrozyten identifiziert wurde. Zusätzlich wurden mit PFI0875w und PF08\_0054 zwei der sechs Vertreter der HSP70 Familie identifiziert die potentiell mit PF14\_0359 interagieren könnten. PF08\_0054 wurde durch proteomische Studien in den *Maurer's clefts* und der PV gefunden und es wurde eine Interaktion mit PF14\_0359 postuliert (202,205,276,277). Im Gegensatz zu dem schwachen Signal von PF14\_0359 auf den 2D Gelen, waren die Signale der beiden Vertreter der HSP70 Familie deutlich stärker ausgeprägt. Dies deutet auf eine Anreicherung in der Membranfraktion und damit auf den Export sowie der Interaktion mit Strukturen der Wirtszelle dieser HSP70 Proteine hin.

### **Proteine des PTEX-Translokons**

Beim PTEX-Translokons handelt es sich um einen möglichen Transporter in der PVM, der aus den fünf Komponenten EXP2, PTEX150, PTEX88, HSP101 und Trx2 besteht (131,138). Dabei bildet EXP2 durch Oligomerisierung einen Kanal in der PVM. In den 2D Gelen der infizierten Erythrozyten wurden mit PF11\_0067 (PTEX88), PF14\_0678 (EXP2) und PF11\_0175 (HSP101) drei dieser Komponenten identifiziert. EXP2 wurde sowohl in der Immunfluoreszenz (Abb. 9), als auch im immunologischen Nachweis als Markerprotein für das PVM/TVN eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass nach der Saponinlyse noch vereinzelt Fragmente dieses Netzwerkes innerhalb der Membranhülle der Wirtszelle zu finden waren. Auch im immunologischen Nachweis war eine deutliche Reduktion des EXP2 Signals sichtbar. In Folge dessen waren auch die identifizierten Proteine nur schwach vertreten und das Vorhandensein der zwei restlichen Komponenten ist wahrscheinlich.

### **Proteine der Ribosomen und des Proteasoms**

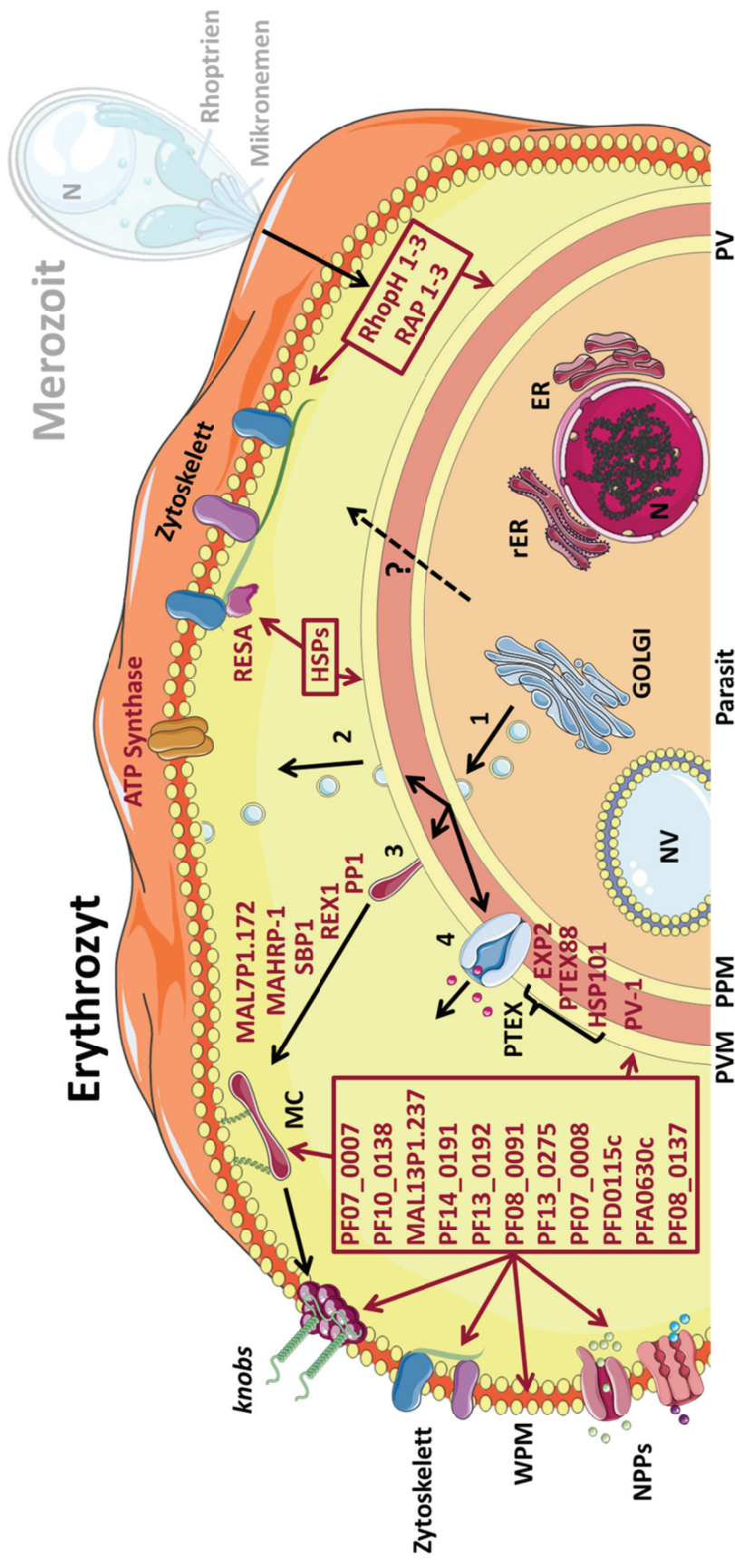
Mit 51 % bei der 2D 16-BAC PAGE und 43 % bei der 2D CTAB SDS/PAGE wurde ein großer Teil der identifizierten Proteine funktional zur Transkription/Translation und dem Proteinumsatz zugeordnet. Dabei handelte es sich hauptsächlich um verschiedenste Untereinheiten der Ribosomen und des Proteasoms. Nicht zuletzt aufgrund der hohen Kopienanzahl innerhalb der Zelle zählen diese Proteine zu den „klassischen Kontaminationen“ in proteomischen Studien (202,278). Da in der Immunfluoreszenz der Membranfraktion keine intakten Parasiten erkennbar waren, lysierten offensichtlich ein Teil der Parasiten während der Präparation. Wahrscheinlich sind dadurch intrazelluläre Bestandteile der Parasiten (z.B. Ribosomen) in der Wirtszelle zurückgeblieben und konnten nicht ausreichend entfernt werden. Gründe hierfür könnte ein rapides Wiederverschließen („resealing“) der Erythrozytenhülle oder die Formation

von winzigen Vesikeln aus Fragmenten der Wirtszellmembran sein (279,280). Das Einbringen von stringenten Waschschritten und das Verändern der Ionenstärke (z.B. durch Karbonat- und Hochsalzlösungen) könnten das rapide Wiederverschließen verhindern und so Kontaminationen verringern. Dabei besteht jedoch auch die Gefahr, gewünschte Proteine, die in wenigen Kopien vorliegen oder nur schwach mit dem Zytoskelett und der Membran der Wirtszelle interagieren, zu verlieren. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auf solche Zusatzschritte verzichtet.

### **Weitere identifizierte Proteine**

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Proteinen wurden mit PF13\_0065 (*vacuolar ATP synthase catalytic subunit a*) und PFD0305c (*vacuolar ATP synthase subunit b*) zwei Untereinheiten eines der ersten beschriebenen Proteine gefunden, welches als funktionierendes Enzym in die Membran der Wirtszelle eingelagert wird (281). Das Protein PFD1170c wurde nur in den Gelen der 2D CTAB PAGE gefunden und wurde in einer früheren allgemeinen Proteomanalyse identifiziert (194). Weiterführende Experimente mit Deletionsmutanten zeigte, dass PFD1170c essentiell für die Ausbildung der *knobs* ist somit die Virulenz direkt beeinflusst (44). Schließlich wurden mit PF07\_0007, PF10\_0138, MAL13P1.237, PF14\_0191, PF13\_0192, PF08\_0091 sechs hoch-konservierte Proteine unbekannter Funktion und mit PF13\_0275, PF07\_0008, PFD0115c, PFA0630c, PF08\_0137 fünf als exportiert annotierte Proteine ebenfalls mit unbekannter Funktion identifiziert. Insgesamt für sieben dieser 11 Proteine wurde mindestens eine Transmembrandomäne vorhergesagt und könnten somit in die Membran der *Maurer's clefts*, dem PVM/TVN oder der Wirtszelle eingelagert sein. Wobei die schwachen Signale von PF07\_0007, PF13\_0192, PFD0115c und PFA0630c eher für eine Lokalisation in den *Maurer's clefts* oder der PVM sprechen, da die bereits identifizierten Proteine dieser subzellulären Strukturen eine ähnliche Intensität in den 2D Gelen aufwiesen. Zusätzlich zu dem Vorhandensein von Transmembrandomänen, wurde bei drei dieser Proteine ein Exportsignal vorhergesagt. Dabei ist PF13\_0275 mit zwei Transmembrandomänen und einem Exportsignal besonders interessant, da dieses 33 kDa große Protein mit einem verhältnismäßig stark ausgeprägtes Signal auf den 2D Gelen vertreten war (2D 16-BAC/SDS PAGE - Spot 5; 2D CTAB/SDS PAGE - Spot 13). Diese Tatsache spricht eher für eine Lokalisation des Proteins in der Wirtszellmembran. Bisher ist die Lokalisation von PF13\_0275 unbekannt und proteomische Daten weisen auf eine Translation des Proteins über den gesamten asexuellen Zyklus hin (272). Im gleichen Maße interessant ist das bisher nicht charakterisierte Protein PF07\_0008, das ein charakteristisches Laufverhalten in den Gelen beider 2D PAGES (2D 16-BAC/SDS PAGE - Spot

12; 2D CTAB/SDS PAGE - Spot 22) zeigte. Dieses Protein besitzt neben einer Transmembrandomäne keine weiteren vorhergesagten Besonderheiten in der Struktur und das Laufverhalten könnte durch posttranslationale Modifikationen (z.B. Glykosylierung) bedingt sein. Insgesamt gesehen wurden durch den Einsatz der 2D kationischen PAGE in Kombination mit MALDI TOF/TOF einige Proteine identifiziert, von denen postuliert wird, dass sie mit dem Zytoskelett oder der Membran der Wirtszelle interagieren. Darunter befanden sich auch Proteine unterschiedlicher Kompartimente wie den Rhoptrien und den *Maurer's clefts*. Die untersuchte Membranfraktion der infizierten Erythrozyten beinhaltete noch wenige Fragmente des PVM/TVN, welche offensichtlich während der Präparation mit der Wirtszellmembran in Kontakt gerieten und deshalb nicht entfernt werden konnten. Darüber hinaus wurden 11 Proteine identifiziert, deren Funktion als auch Lokalisation bisher unbekannt ist. Diese Proteine könnten wichtige Funktionen bei der Modifikation der der Wirtszelle ausüben und sollten in weiterführenden Experimenten analysiert und charakterisiert werden. Schließlich wurde aus den Ergebnissen der Massenspektrometrie der kationischen 2D PAGEs sowie den angegebenen Quellen ein hypothetisches Model erstellt (Abb. 31).



**Abb. 31: Hypothetisches Modell von Erythrozyten, infiziert mit späten Stadien von *Plasmodium falciparum*.** Das Modell basiert auf den Ergebnissen der 2D 16-BAC/SDS PAGE und der 2D CTAB/SDS PAGE von Membranfraktionen von spät-infizierten Erythrozyten. Das Zytoskelett ist stark vereinfacht dargestellt und einzelne Komponenten sind nicht maßstabgetreu abgebildet. Die massenspektrometrisch identifizierten Proteine des Parasiten sind in Dunkelrot dargestellt und einzelne Proteine sind nicht maßstabgetreu abgebildet. Die dazugehörigen dunkelroten Pfeile deuten auf mögliche Lokalisierung dieser Proteine hin. Der Merozoit deutet die Sezernierung der Rhoptrienproteine während der Invasion an. Die Exportwege der Proteine sind mit 1-4 beschriftet, wobei weitere Exportmechanismen nicht ausgeschlossen werden können (gestrichelter Pfeil). Die Rhoptrienproteine (RhopH 1-3 und RAP 1-3) wurden während der Invasion in die Wirtszelle sezerniert. Proteine aus dem GOLGI Apparat werden über Vesikel zur parasitophoren Vakuolen (RhopH 1-3 und RAP 1-3) transportiert (1) und verschmelzen mit der Parasitenplasmamembran (PPM). Der anschließende Transport der Proteine könnte über Vesikel (2) stattfinden. Alternative Wege für den Transport sind bestehende *Maurer's clefts* (MC) (3) und das *Plasmodium translocon of exported proteins* (PTEX) (4), welches sich in der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) befindet. **WPM** - Wirtszellplasmamembran; **NPPs** - new permeation pathways; **(r)ER** - (raues) endoplasmatische Retikulum; **N** - Nukleus; **NV** - Nahrungsvakuole. Abbildung Merozoit verändert nach (282); einzelne Elemente der Abbildung von [www.servier.de](http://www.servier.de).

### 5.3 LC-MALDI TOF/TOF Analyse der Membranfraktion von spät-infizierten Erythrozyten

Bei der LC-MALDI TOF/TOF Analyse erfolgte zunächst eine grobe Auftrennung des Proteingemisches durch eine 1D SDS PAGE (Abb. 21). Die komplette Spur wurde fragmentiert, die Proteine der einzelnen Fragmente proteolytisch gespalten und die resultierenden Peptide mittels LC aufgetrennt. Anschließend wurden die Peptide massenspektrometrisch analysiert. Eine ähnliche Herangehensweise wurde schon durch andere Gruppen für die proteomische Analyse von Membranfraktionen verwendet (283-285) Bei dieser Methode zeigte sich der Vorteil, dass anders als bei der 2D PAGE, das gesamte Gel massenspektrometrisch untersucht wurde und die Anzahl der isolierten Proben nicht auf die Sensitivität der Proteinfärbung basierte (286). Dies spiegelte sich in der Anzahl der identifizierten Proteine wieder. Aus dem Venn-Diagramm wird ersichtlich, dass durch die 1D SDS PAGE/LC-MALDI TOF/TOF Methode ungefähr die zehnfache Menge an plasmodialen Proteinen gegenüber den 2D PAGE Ansätzen identifiziert wurden. Somit bekommt man einen deutlich größeren Einblick in den Proteingehalt der Probe. Damit im Zusammenhang wurden alle bisher beschriebenen Bestandteile des PTEX Translokons und zusätzlich 15 Membranproteine mit mehr als 10 Transmembrandomänen mittels LC-MALDI TOF/TOF identifiziert, welche nicht auf den Gelen der 2D PAGE nachweisbar waren. Dabei handelte es sich neben bereits beschriebenen Transportern, wie dem Hexosetransporter (PFB0210c, (287)) bei der Hälfte dieser Transmembranproteine um verschiedene mutmaßliche Transporter (PF11\_0310, PFA0245w, PF11\_0172, PF14\_0541, PFE0785c, PFI0720w, PFL0420w) deren Lokalisation bisher unbekannt ist. Neben wenig abundanten Zielproteinen, wurden jedoch auch Verunreinigungen identifiziert, die höchstwahrscheinlich aufgrund ihrer geringen Konzentration nicht in den Gelen der 2D PAGEs isoliert und identifiziert wurden. Ein Beispiel für solch eine Verunreinigung ist der in der Membran der Nahrungsvakuole befindliche Chloroquintransporter (MAL7P1.27) (288,289). Ein weiterer großer Nachteil der LC-MALDI TOF/TOF Methode ist die fehlende visuelle Quantifizierung der Proteinmenge. Im Gegensatz zur 2D PAGE (Abb. 12), bei der das Expressionsniveau der Proteine mit deren Spotintensität auf den Gelen korreliert, kann bei der LC-MALDI TOF/TOF Methode beim Vergleich verschiedener Fraktionen keine direkte Aussage über die Anreicherung einzelner Proteine getroffen werden. Aus diesem Grund lag der Fokus dieser Arbeit auf den Gel-basierten Anwendungen.

#### 5.4 Isolierung und Gel-basierte Analyse der Wirtszellmembran von früh-infizierten Erythrozyten

Die Anreicherung später Stadien stellt aufgrund der Modifikation der Wirtszelle kein Problem dar. Zum einen führen Veränderungen der Wirtszelloberfläche, z.B. durch *knobs*, zu veränderten Sedimentationseigenschaften und zum anderen kann durch die Akkumulation von Eisen im Hämozoin eine magnetische Separation durchgeführt werden. In früh-infizierten Erythrozyten ist weder Hämozoin vorhanden, noch ist die Modifikation der Wirtszelloberfläche schon so weit vorangeschritten, um die Sedimentationseigenschaften im Vergleich zu nicht-infizierten Erythrozyten signifikant zu verändern. Als Folge dessen sind die früh-infizierten Erythrozyten kaum von den nicht-infizierten Erythrozyten zu unterscheiden und zu isolieren. Lediglich durch Lyse der spät-infizierten Erythrozyten mittels Sorbitol kann auf frühe Parasitenstadien synchronisiert werden (29). Daraus ergab sich das Teilziel der vorliegenden Arbeit, eine Methode für eine möglichst hohe Anreicherung früh-infizierten Erythrozyten zu etablieren, um deren Wirtszellmembran zu isolieren. Dabei sollte insbesondere darauf geachtet werden, dass die isolierten Parasiten überlebensfähig blieben, um möglichst nah am biologischen Zustand der Zellen zu bleiben. Eine mögliche Methode, um dieses Ziel zu erreichen war die Durchflusszytometrie. Im Gegensatz zu nicht-infizierten Erythrozyten enthalten die *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten xenogenische DNA, welche angefärbt und im Durchflusszytometer nachgewiesen werden kann. Schon Ende der 70er Jahre wurde die Durchflusszytometrie für den Nachweis und das Zählen von Malariaparasiten verwendet (290,291). Obwohl später auch die Diskriminierung einzelner Parasitenstadien möglich war (292) und einige Farbstoffe wie SYTO-16 (293), SYBR Green 1 (294,295), YOYO-1 (296-299), Acridinorange (300), Thiazolorange (301,302), Rhodaminfarbstoffe (303) und Hoechst 33258 (292) in diesem Zusammenhang getestet wurden (Übersicht in (304)), hat sich die Durchflusszytometrie nicht als eine Standardmethode in der Malariaforschung etablieren können. Gründe hierfür könnten in den komplizierten Methoden zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen liegen, die einige der bisher getesteten Farbstoffe benötigen. Als Folge kommt es zum Verlust der Viabilität der Zellen, was den Einsatzbereich der Durchflusszytometrie einschränkt. So ist es zum Beispiel nicht mehr möglich die sortierten Parasiten für die Selektion von Inhibitoren oder ähnlichen Substanzen zu verwenden. Zusätzlich reicht bei einigen Farbstoffen die Intensität der Fluoreszenz nicht aus, um zum Beispiel nicht-infizierte von früh-infizierten Erythrozyten klar trennen zu können. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der DNA-selektive Fluoreszenzfarbstoff Vybrant DyeCycle Violet verwendet, um die Zellen anhand ihres DNA-Gehaltes im Durchflusszytometer zu unterscheiden. Dieser membranpermeable Farbstoff wurde schon erfolgreich in anderen

Studien, wie zum Beispiel bei der stadienspezifischen Isolierung von *Trypanosoma brucei*, verwendet (305,306). Nach Färbung der infizierten Erythrozyten war die eindeutige Differenzierung der Stadien von *P. falciparum* mittels FACS möglich (Abb. 24 und Abb. 25) und es wurde eine Anreicherung früher Ringstadien von 98 % erreicht (Abb. 26). Anschließend wurde dieses Ergebnis durch Giemsa-Ausstriche verifiziert (Abb. 27) und die isolierten Parasiten auf ihre Viabilität überprüft (Abb. 28). Die sortierten Zellen wurden analog zu den Proben der spät-infizierten Erythrozyten behandelt (Abb. 14). Aufgrund der verhältnismäßig geringen Menge an Probe wurden die Zellen nur mittels 2D CTAB/SDS PAGE und nicht mittels 2D 16-BAC/PAGE untersucht. Die Wahl fiel auf die 2D CTAB/SDS PAGE, da in den vorangegangenen Experimenten gezeigt wurde, dass CTAB eine höhere Solubilisierungskraft besitzt und somit auf den Gelen dieser PAGE mehr Proteine zu finden waren. Im Vergleich zu den Gelen der spät-infizierten Erythrozyten wurde diesmal Hämoglobin (Spot 2) gefunden. Dies ist durch den weitaus höheren Anteil an Hämoglobin in früh-infizierten Erythrozyten zu begründen, da hier erst wenig Hämoglobin/Wirtszellzytosol aufgenommen und abgebaut wurde. Damit reichten offensichtlich, im Gegensatz zu der Präparation der Membran aus spät-infizierten Erythrozyten, die durchgeführten Waschschriffe nicht aus um das Hämoglobin in ausreichendem Maße zu entfernen.

#### **5.4.1 Identifizierte plasmodiale Proteine aus dem Gel früh-infizierter Erythrozyten**

Es wurden mit PFI0875w (PfHSP70), PFI0265c (RhopH3) und PFA0110w (RESA) insgesamt drei parasitäre Proteine im Gel der 2D CTAB/SDS PAGE identifiziert (Abb. 32). Neben PfEMP1, MESA und KAHRP gehört RESA zu den Proteinen von *P. falciparum*, die bisher am intensivsten untersucht wurden (170). Im Gegensatz zu RESA treten PfEMP1, MESA und KAHRP erst ab dem Trophozitenstadium auf (44) und wurden folglich nicht im Gel früh-infizierter Erythrozyten identifiziert. In Arbeiten von anderen Gruppen wurde mehrfach gezeigt, dass nach der Invasion der Erythrozyten RESA innerhalb der Wirtszelle zu finden ist und dort mit der Membran und dem Zytoskelett der Wirtszelle assoziiert (170,172,173). Daraus ableitend, kann RESA als Marker für diese Kompartimente früh-infizierter Erythrozyten angesehen werden und das Vorhandensein des Proteins im 2D Gel dieser Arbeit spricht für eine erfolgreiche Präparation der Membran von früh-infizierten Erythrozyten. PfHSP70, RESA und RhopH3 wurden ebenfalls in den 2D Gelen der spät-infizierten Erythrozyten gefunden (siehe 5.2.1), was darauf deutet, dass alle drei Proteine für den Parasiten essentielle Aufgaben über den gesamten asexuellen

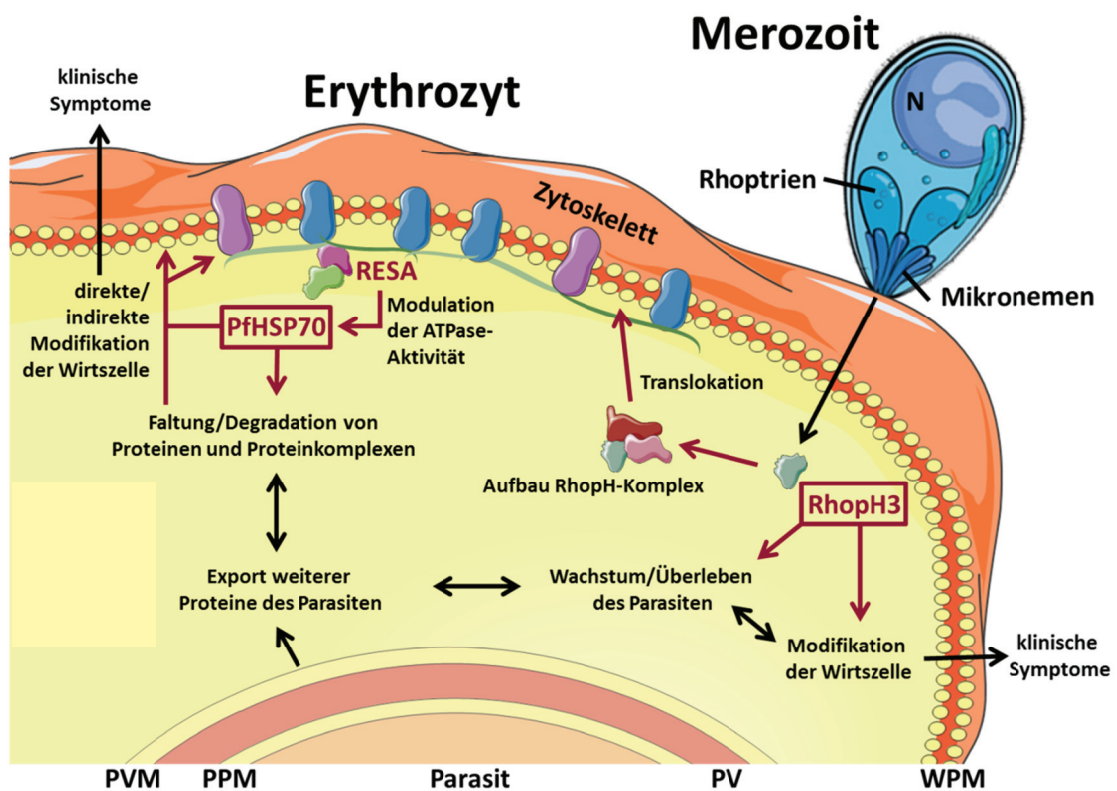


Lebenszyklus innerhalb der Wirtszelle übernehmen. Wie weiter oben schon erwähnt, konnten bisher keine überlebensfähigen Parasiten mit einem zerstörten Genlokus von RhopH3 generiert werden, wodurch diese Hypothese unterstützt wird (259). Beim Betrachten der Spotintensitäten von PfHSP70 und RESA in den 2D Gelen der frühen und späten Stadien ist festzustellen, dass diese in etwa vergleichbar waren, was für eine relativ gleichbleibende Konzentration dieser Proteine spricht. Der Vergleich der Spotintensitäten von RhopH3 gestaltete sich aufgrund des unmittelbar angrenzenden, massiven Auftretens von Bande 3 als nicht verlässlich. Im Gegensatz zu RhopH3, wurden die beiden anderen Komponenten des RhopH-Komplexes RhopH1 und RhopH2 nicht im Gel der früh-infizierten Erythrozyten identifiziert. Beim Vergleich der 2D Gele fällt auf, dass im Bereich wo RhopH1 und RhopH2 in den Gelen der spät-infizierten Erythrozyten identifiziert wurden, im Gel der früh-infizierten Erythrozyten ähnliche Proteinspots zu erkennen sind, die nicht identifiziert werden konnten. Daher ist wohl davon auszugehen, dass RhopH1 und RhopH2 ebenfalls wie RhopH3 in der Membranfraktion von früh-infizierten Erythrozyten zu finden sind und somit der RhopH-Komplex ausgebildet werden kann. Diese Hypothese muss durch weitere Gele verifiziert werden. Daneben deuten die Ergebnisse anderer Gruppen darauf hin, dass der RhopH-Komplex an der zytosolischen Seite der Wirtszellmembran bindet (260,261). Dies würde erklären, weshalb die Komponenten des RhopH-Komplexes in den Gelen der Membranfraktion infizierter Erythrozyten angereichert wurden. Das Vorhandensein von PfHSP70 könnte, durch Faltung und Degradation von Proteinen sowie von höheren Proteinkomplexen, als wichtige Grundlage initialer Prozesse wie den Export/Transport weiterer Proteine dienen. Darüber hinaus ist eine Interaktion von RESA über dessen DnaJ Domäne mit PfHSP70 vorstellbar. Es ist bekannt, dass DnaJ Domänen mit HSP70-Proteinen interagieren und eine Rolle bei deren ATPase-Aktivität spielen (307-309). So könnte PfHSP70 durch RESA in die Nähe des Zytoskeletts rekrutiert werden, um dieses zu modifizieren und/oder am Aufbau höherer Proteinkomplexe mitzuwirken (Abb. 32). Da nur in 30 % der isolierten Spots Proteine eindeutig identifiziert und zugeordnet wurden, ist es höchstwahrscheinlich, dass in den restlichen 70 % der Spots noch weitere plasmodiale Proteine existieren. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass der Großteil der bekannten Komponenten der Membran (z. B. Bande 3) und des Zytoskeletts (z. B. Spektrine und Ankyrine) der Wirtszelle unter den bereits identifizierten Proteinen zu finden war. Außerdem wurde gezeigt, dass bereits einige der früh-infizierten Erythrozyten durch die Milz aussortiert werden (310). Dies deutet auf frühe Modifikationen der Wirtszellmembran und damit im Zusammenhang auf das Vorhandensein weiterer exportierter Proteine des Parasiten hin. Weshalb nur ca. ein Drittel der Proben identifiziert wurden kann nur vermutet werden. Einerseits könnte die Proteinmenge nicht ausreichend für



die Identifikation gewesen sein, andererseits könnten während der Präparation einzelner Proben Fehler (z.B. Verlust des Gelstückes während der Waschvorgänge) aufgetreten sein. Da ein Teil der Proben identifiziert wurden und für alle Proben Trypsin aus der gleichen Charge verwendet wurde, kann eine fehlende proteolytische Spaltung der Proteine durch inaktives Trypsin ausgeschlossen werden. Es ist nicht verwunderlich, dass im Gegensatz zu den Gelen spät-infizierter Erythrozyten keine Proteine des PVM/TVN oder der *Maurer's clefts* gefunden wurden. Sowohl die *Maurer's clefts*, als auch die Ausstülpungen des PVM/TVN werden erst ca. 12-18 h nach Infektion der Erythrozyten durch den Parasiten ausgebildet.

Aus den Ergebnissen der 2D CTAB/SDS PAGE und den genannten Literaturverweisen wurde zusammenfassend ein stark vereinfachtes, hypothetisches Modell der Membran und des Zytoskeletts von Erythrozyten, infiziert mit frühen Stadien von *P. falciparum*, aufgestellt (Abb. 32).



**Abb. 32: Hypothetisches Modell von Erythrozyten, infiziert mit frühen Stadien von *Plasmodium falciparum*.** Das stark vereinfachte Modell basiert auf den Ergebnissen der 2D CTAB/SDS PAGE einer Membranfraktion von früh-infizierten Erythrozyten. Die massenspektrometrisch identifizierten Proteine des Parasiten sind in Dunkelrot dargestellt. Die genaue Lokalisation der zusätzlich dunkelrot umrahmten Proteine ist bisher unbekannt. Die dazugehörigen dunkelroten Pfeile deuten auf mögliche Lokalisierung und Funktion dieser Proteine hin. **PV** - parasitophore Vakuole; **PPM** - Parasitenplasmamembran; **PVM** - parasitophore Vakuolenmembran; **WPM** - Wirtszellplasmamembran. Abbildung Merozoit verändert nach (282); einzelne Elemente der Abbildung von [www.servier.de](http://www.servier.de).

## 5.5 Ausblick

Im Hinblick auf die kationische 2D PAGE konnte verifiziert werden, dass diese für die Auftrennung sowohl von Membran-assoziierten als auch integralen Membranproteinen geeignet ist. Die massenspektrometrischen Daten aus den Gelen der spät-infizierten Erythrozyten haben gezeigt, dass eine Reihe Proteine gefunden wurden, die mit der Membran und dem Zytoskelett der Wirtszelle interagieren. Zusätzlich wurden 11 plasmodiale Proteine mit unbekannter Funktion identifiziert, die mit der Membran oder dem Zytoskelett interagieren könnten. Die Lokalisation dieser potentiell exportierten Proteine sollte durch den Einsatz von Antikörpern in der Immunfluoreszenzmikroskopie genauer untersucht werden. Bei einer Lokalisation auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten könnten weitere Experimente wie Bindungs- oder Blockierungs-Assays Hinweise auf die Funktion einzelner Proteine geben. Zusätzlich könnte mit rekombinant hergestelltem Protein verschiedene Interaktionsstudien (z.B. *pull-down*-Assays) durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die Lokalisation und Funktion der identifizierten Hitzeschockproteine genauer untersucht werden. Die Identifikation von RESA und PfHSP70 im Gel der früh-infizierten Erythrozyten könnte ein erster Hinweis auf eine mögliche Interaktion beider Proteine sein. Um dies zu klären sollte zunächst eine Ko-Immunlokalisation und eine Ko-Immunpräzipitation durchgeführt werden. Bei einer Bestätigung der Interaktion könnten ATP-Assays Aufschluss über die Funktion von RESA bei der Modulation der ATPase Aktivität von PfHSP70 geben. Da nur ca. 30 % der isolierten Spots identifiziert wurden, sollte die 2D CTAB/SDS PAGE der Membranfraktion früh-infizierter Erythrozyten wiederholt und gegebenenfalls die eingesetzte Proteinmenge erhöht werden. Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die beiden kationischen PAGEs sich gegenseitig ergänzen und aus diesem Grund sollte auch mit den Proben der früh-infizierten Erythrozyten eine 2D 16-BAC/SDS PAGE durchgeführt werden. Darüber hinaus könnten mit dem Einsatz der DIGE-Technologie (differentielle Gelelektrophorese) die Proben der früh- und spät-infizierten Erythrozyten verschiedenfarbig markiert und simultan auf dem gleichen Gel aufgetrennt werden. Durch Auswertung dieser Fluoreszenzsignale könnte anschließend der Proteingehalt direkt miteinander verglichen und quantifiziert werden. Schließlich sollten auch die Proben der früh-infizierten Erythrozyten mittels LC-MALDI TOF/TOF untersucht und mit den Ergebnissen der spät-infizierten Erythrozyten verglichen werden, um so einen umfassenden Einblick in den Proteinbesatz zwischen den einzelnen Stadien zu erhalten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. WHO. World Malaria Report. 2011.
2. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, Duffy PE. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest* 2008;118:1266-76.
3. Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IR, Johnston GL, Tatem AJ, Hay SI. A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malar J* 2011;10:378.
4. Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, Fullman N, Naghavi M, Lozano R, Lopez AD. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2012;379:413-31.
5. Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature* 2002;415:680-5.
6. Collins WE. *Plasmodium knowlesi*: a malaria parasite of monkeys and humans. *Annu Rev Entomol* 2012;57:107-21.
7. Singh B, Daneshvar C. *Plasmodium knowlesi* malaria in Malaysia. *Med J Malaysia* 2010;65:166-72.
8. Sabbatani S, Fiorino S, Manfredi R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*): a public health concern? *Braz J Infect Dis* 2010;14:299-309.
9. Sermwittayawong N, Singh B, Nishibuchi M, Sawangjaroen N, Vuddhakul V. Human *Plasmodium knowlesi* infection in Ranong province, southwestern border of Thailand. *Malar J* 2012;11:36.
10. Garcia LS. Malaria. *Clin Lab Med* 2010;30:93-129.
11. Barillas-Mury C, Kumar S. *Plasmodium*-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cell Microbiol* 2005;7:1539-45.
12. Ghosh AK, Jacobs-Lorena M. *Plasmodium* sporozoite invasion of the mosquito salivary gland. *Curr Opin Microbiol* 2009;12:394-400.
13. Amino R, Thiberge S, Blazquez S, Baldacci P, Renaud O, Shorte S, Menard R. Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nat Protoc* 2007;2:1705-12.
14. Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol* 2007;9:1215-22.
15. Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Menard R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med* 2006;12:220-4.
16. Matuschewski K, Schuler H. Actin/myosin-based gliding motility in apicomplexan parasites. *Subcell Biochem* 2008;47:110-20.
17. Ejigiri I, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Curr Opin Microbiol* 2009;12:401-7.
18. Prudencio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:849-56.
19. Baer K, Roosevelt M, Clarkson AB, Jr., van Rooijen N, Schnieder T, Frevort U. Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver. *Cell Microbiol* 2007;9:397-412.
20. Kappe SH, Kaiser K, Matuschewski K. The *Plasmodium* sporozoite journey: a rite of passage. *Trends Parasitol* 2003;19:135-43.

21. Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, Rubinstein E, Hannoun L, Charoenvit Y, Kocken CH and others. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem* 2004;279:9490-6.
22. Vaughan AM, Aly AS, Kappe SH. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding. *Cell Host Microbe* 2008;4:209-18.
23. Akhouri RR, Sharma A, Malhotra P. Role of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related anonymous protein in host-cell interactions. *Malar J* 2008;7:63.
24. Plassmeyer ML, Reiter K, Shimp RL, Jr., Kotova S, Smith PD, Hurt DE, House B, Zou X, Zhang Y, Hickman M and others. Structure of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein, a leading malaria vaccine candidate. *J Biol Chem* 2009;284:26951-63.
25. Thiberge S, Blazquez S, Baldacci P, Renaud O, Shorte S, Menard R, Amino R. In vivo imaging of malaria parasites in the murine liver. *Nat Protoc* 2007;2:1811-8.
26. Graewe S, Rankin KE, Lehmann C, Deschermeier C, Hecht L, Froehlke U, Stanway RR, Heussler V. Hostile takeover by *Plasmodium*: reorganization of parasite and host cell membranes during liver stage egress. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002224.
27. Kuehn A, Pradel G. The coming-out of malaria gametocytes. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:976827.
28. Pasvol G. Protective hemoglobinopathies and *Plasmodium falciparum* transmission. *Nat Genet* 2010;42:284-5.
29. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 1979;65:418-20.
30. Portugal S, Drakesmith H, Mota MM. Superinfection in malaria: *Plasmodium* shows its iron will. *EMBO Rep* 2011;12:1233-42.
31. Khattab A, Bonow I, Schreiber N, Petter M, Schmetz C, Klinkert MQ. *Plasmodium falciparum* variant STEVOR antigens are expressed in merozoites and possibly associated with erythrocyte invasion. *Malar J* 2008;7:137.
32. Tham WH, Schmidt CQ, Hauhart RE, Guariento M, Tetteh-Quarcoo PB, Lopaticki S, Atkinson JP, Barlow PN, Cowman AF. *Plasmodium falciparum* uses a key functional site in complement receptor type-1 for invasion of human erythrocytes. *Blood* 2011;118:1923-33.
33. Gunalan K, Gao X, Liew KJ, Preiser PR. Differences in erythrocyte receptor specificity of different parts of the *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homologue 2a. *Infect Immun* 2011;79:3421-30.
34. Richard D, MacRaid CA, Riglar DT, Chan JA, Foley M, Baum J, Ralph SA, Norton RS, Cowman AF. Interaction between *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. *J Biol Chem* 2010;285:14815-22.
35. Mitchell GH, Thomas AW, Margos G, Dluzewski AR, Bannister LH. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect Immun* 2004;72:154-8.
36. Riglar DT, Richard D, Wilson DW, Boyle MJ, Dekiwadia C, Turnbull L, Angrisano F, Marapana DS, Rogers KL, Whitchurch CB and others. Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe* 2011;9:9-20.

37. Adams JH, Blair PL, Kaneko O, Peterson DS. An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. Trends Parasitol 2001;17:297-9.
38. Baum J, Chen L, Healer J, Lopaticki S, Boyle M, Triglia T, Ehlgren F, Ralph SA, Beeson JG, Cowman AF. Reticulocyte-binding protein homologue 5 - an essential adhesin involved in invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. Int J Parasitol 2009;39:371-80.
39. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell 2006;124:755-66.
40. Stubbs J, Simpson KM, Triglia T, Plouffe D, Tonkin CJ, Duraisingh MT, Maier AG, Winzeler EA, Cowman AF. Molecular mechanism for switching of *P. falciparum* invasion pathways into human erythrocytes. Science 2005;309:1384-7.
41. Fujioka H, Aikawa M. Structure and life cycle. Chem Immunol 2002;80:1-26.
42. Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, Mboup S, Ndir O, Kwiatkowski DP, Duraisingh MT and others. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. Nature 2011;480:534-7.
43. Singh S, Plassmeyer M, Gaur D, Miller LH. Mononeme: a new secretory organelle in *Plasmodium falciparum* merozoites identified by localization of rhomboid-1 protease. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:20043-8.
44. Maier AG, Cooke BM, Cowman AF, Tilley L. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. Nat Rev Microbiol 2009;7:341-54.
45. Dluzewski AR, Fryer PR, Griffiths S, Wilson RJ, Gratzer WB. Red cell membrane protein distribution during malarial invasion. J Cell Sci 1989;92 ( Pt 4):691-9.
46. Keeley A, Soldati D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. Trends Cell Biol 2004;14:528-32.
47. Cortes A. Switching *Plasmodium falciparum* genes on and off for erythrocyte invasion. Trends Parasitol 2008;24:517-24.
48. Lingelbach K, Joiner KA. The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. J Cell Sci 1998;111 ( Pt 11):1467-75.
49. Haldar K, Uyetake L. The movement of fluorescent endocytic tracers in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. Mol Biochem Parasitol 1992;50:161-77.
50. Dluzewski AR, Zicha D, Dunn GA, Gratzer WB. Origins of the parasitophorous vacuole membrane of the malaria parasite: surface area of the parasitized red cell. Eur J Cell Biol 1995;68:446-9.
51. Murphy SC, Samuel BU, Harrison T, Speicher KD, Speicher DW, Reid ME, Prohaska R, Low PS, Tanner MJ, Mohandas N and others. Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. Blood 2004;103:1920-8.
52. Bietz S, Montilla I, Kulzer S, Przyborski JM, Lingelbach K. Recruitment of human aquaporin 3 to internal membranes in the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte. Mol Biochem Parasitol 2009;167:48-53.
53. Bannister LH, Hopkins JM, Margos G, Dluzewski AR, Mitchell GH. Three-dimensional ultrastructure of the ring stage of *Plasmodium falciparum*: evidence for export pathways. Microsc Microanal 2004;10:551-62.
54. Hanssen E, McMillan PJ, Tilley L. Cellular architecture of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Int J Parasitol 2010;40:1127-35.

55. Bannister LH, Hopkins JM, Fowler RE, Krishna S, Mitchell GH. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol Today* 2000;16:427-33.
56. Abu Bakar N, Klonis N, Hanssen E, Chan C, Tilley L. Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Cell Sci* 2010;123:441-50.
57. De Souza W. Structural organization of the cell surface of pathogenic protozoa. *Micron* 1995;26:405-30.
58. Aikawa M, Hepler PK, Huff CG, Sprinz H. The feeding mechanism of avian malarial parasites. *J Cell Biol* 1966;28:355-73.
59. Slater AF, Swiggard WJ, Orton BR, Flitter WD, Goldberg DE, Cerami A, Henderson GB. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:325-9.
60. Ginsburg H, Krugliak M, Eidelman O, Cabantchik ZI. New permeability pathways induced in membranes of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 1983;8:177-90.
61. Kutner S, Ginsburg H, Cabantchik ZI. Permselectivity changes in malaria (*Plasmodium falciparum*) infected human red blood cell membranes. *J Cell Physiol* 1983;114:245-51.
62. El Tahir A, Malhotra P, Chauhan VS. Uptake of proteins and degradation of human serum albumin by *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Malar J* 2003;2:11.
63. Kirk K, Horner HA, Kirk J. Glucose uptake in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is an equilibrative not an active process. *Mol Biochem Parasitol* 1996;82:195-205.
64. Saliba KJ, Horner HA, Kirk K. Transport and metabolism of the essential vitamin pantothenic acid in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 1998;273:10190-5.
65. Kirk K. Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Rev* 2001;81:495-537.
66. Martin RE, Kirk K. Transport of the essential nutrient isoleucine in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Blood* 2007;109:2217-24.
67. Baumeister S, Winterberg M, Duranton C, Huber SM, Lang F, Kirk K, Lingelbach K. Evidence for the involvement of *Plasmodium falciparum* proteins in the formation of new permeability pathways in the erythrocyte membrane. *Mol Microbiol* 2006;60:493-504.
68. Maurer G. Die malaria perniciosa. *Centralbl. Bakt. Abt. I Orig.* 1902;32:695-719.
69. Atkinson CT, Aikawa M. Ultrastructure of malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells* 1990;16:351-68.
70. Haldar K, Mohandas N. Erythrocyte remodeling by malaria parasites. *Curr Opin Hematol* 2007;14:203-9.
71. Tamez PA, Bhattacharjee S, van Ooij C, Hiller NL, Llinas M, Balu B, Adams JH, Haldar K. An erythrocyte vesicle protein exported by the malaria parasite promotes tubovesicular lipid import from the host cell surface. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000118.
72. Mbengue A, Yam XY, Braun-Breton C. Human erythrocyte remodelling during *Plasmodium falciparum* malaria parasite growth and egress. *Br J Haematol* 2012.



73. Tilley L, Sougrat R, Lithgow T, Hanssen E. The twists and turns of Maurer's cleft trafficking in *P. falciparum*-infected erythrocytes. *Traffic* 2008;9:187-97.
74. Wickert H, Krohne G. The complex morphology of Maurer's clefts: from discovery to three-dimensional reconstructions. *Trends Parasitol* 2007;23:502-9.
75. Sam-Yellowe TY. The role of the Maurer's clefts in protein transport in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* 2009;25:277-84.
76. Crivat G, Tokumasu F, Sa JM, Hwang J, Wellems TE. Tetracysteine-based fluorescent tags to study protein localization and trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *PLoS One* 2011;6:e22975.
77. Rug M, Prescott SW, Fernandez KM, Cooke BM, Cowman AF. The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P. falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood* 2006;108:370-8.
78. Lew VL. Malaria: endless fascination with merozoite release. *Curr Biol* 2005;15:R760-1.
79. Rayner JC. Erythrocyte exit: Out, damned merozoite! Out I say! *Trends Parasitol* 2006;22:189-92.
80. Kwiatkowski D, Cannon JG, Manogue KR, Cerami A, Dinarello CA, Greenwood BM. Tumour necrosis factor production in *Falciparum* malaria and its association with schizont rupture. *Clin Exp Immunol* 1989;77:361-6.
81. Turner GD, Morrison H, Jones M, Davis TM, Looareesuwan S, Buley ID, Gatter KC, Newbold CI, Pukritayakamee S, Nagachinta B and others. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol* 1994;145:1057-69.
82. Clark IA, Cowden WB. Why is the pathology of *falciparum* worse than that of *vivax* malaria? *Parasitol Today* 1999;15:458-61.
83. Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Vassalli P, Hommel M, Lambert PH. Tumor necrosis factor and disease severity in children with *falciparum* malaria. *N Engl J Med* 1989;320:1586-91.
84. Grau GE, Piguet PF, Vassalli P, Lambert PH. Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. *Immunol Rev* 1989;112:49-70.
85. Dondorp AM, Lee SJ, Faiz MA, Mishra S, Price R, Tjitra E, Than M, Htut Y, Mohanty S, Bin Yunus E and others. The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria. *Clinical Infectious Diseases* 2008;47:151-157.
86. Marsh K, Forster D, Waruiru C, Mwangi I, Winstanley M, Marsh V, Newton C, Winstanley P, Warn P, Peshu N and others. Indicators of life-threatening malaria in African children. *N Engl J Med* 1995;332:1399-404.
87. English M, Sauerwein R, Waruiru C, Mosobo M, Obiero J, Lowe B, Marsh K. Acidosis in severe childhood malaria. *QJM* 1997;90:263-70.
88. Udeinya JJ, Schmidt JA, Aikawa M, Miller LH, Green I. *Falciparum* malaria-infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells. *Science* 1981;213:555-7.
89. Pain A, Ferguson DJ, Kai O, Urban BC, Lowe B, Marsh K, Roberts DJ. Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1805-10.



90. Udomsangpetch R, Wahlin B, Carlson J, Berzins K, Torii M, Aikawa M, Perlmann P, Wahlgren M. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes. *J Exp Med* 1989;169:1835-40.
91. Bignami A, Bastianelli G. Osservazioni sulle febbri malariche estive-autunnali. *La Riforma Medica* 1890;232:1334-1335.
92. Trager W, Rudzinska MA, Bradbury PC. The fine structure of *Plasmodium falciparum* and its host erythrocytes in natural malarial infections in man. *Bull World Health Organ* 1966;35:883-5.
93. Cooke BM, Berendt AR, Craig AG, MacGregor J, Newbold CI, Nash GB. Rolling and stationary cytoadhesion of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*: separate roles for ICAM-1, CD36 and thrombospondin. *Br J Haematol* 1994;87:162-70.
94. Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, Taraschi TF, Howard RJ. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 1995;82:77-87.
95. Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, Pinches R, Newbold CI, Miller LH. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 1995;82:101-10.
96. Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, Ravetch JA, Wellems TE. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 1995;82:89-100.
97. Kyes SA, Rowe JA, Kriek N, Newbold CI. Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9333-8.
98. Blythe JE, Yam XY, Kuss C, Bozdech Z, Holder AA, Marsh K, Langhorne J, Preiser PR. *Plasmodium falciparum* STEVOR proteins are highly expressed in patient isolates and located in the surface membranes of infected red blood cells and the apical tips of merozoites. *Infect Immun* 2008;76:3329-36.
99. Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B. CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* 1989;58:95-101.
100. Barnwell JW, Asch AS, Nachman RL, Yamaya M, Aikawa M, Ingravallo P. A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Clin Invest* 1989;84:765-72.
101. Berendt AR, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI, Marsh K. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1989;341:57-9.
102. Chakravorty SJ, Craig A. The role of ICAM-1 in *Plasmodium falciparum* cytoadherence. *Eur J Cell Biol* 2005;84:15-27.
103. Roberts DD, Sherwood JA, Spitalnik SL, Panton LJ, Howard RJ, Dixit VM, Frazier WA, Miller LH, Ginsburg V. Thrombospondin binds *falciparum* malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. *Nature* 1985;318:64-6.
104. Ho M, Schollaardt T, Niu X, Loareesuwan S, Patel KD, Kubes P. Characterization of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte and P-selectin interaction under flow conditions. *Blood* 1998;91:4803-9.

105. Yipp BG, Hickey MJ, Andonegui G, Murray AG, Looareesuwan S, Kubes P, Ho M. Differential roles of CD36, ICAM-1, and P-selectin in *Plasmodium falciparum* cytoadherence in vivo. *Microcirculation* 2007;14:593-602.
106. Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, Benjamin C, Ho M, Kan KE, Thway Y, Win K, Aikawa M, Lobb RR. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med* 1992;176:1183-9.
107. Treutiger CJ, Heddini A, Fernandez V, Muller WA, Wahlgren M. PECAM-1/CD31, an endothelial receptor for binding *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Nat Med* 1997;3:1405-8.
108. Vogt AM, Barragan A, Chen Q, Kironde F, Spillmann D, Wahlgren M. Heparan sulfate on endothelial cells mediates the binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes via the DBL1alpha domain of PfEMP1. *Blood* 2003;101:2405-11.
109. Rowe JA, Moulds JM, Newbold CI, Miller LH. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature* 1997;388:292-5.
110. Stoute JA. Complement receptor 1 and malaria. *Cell Microbiol* 2011;13:1441-50.
111. Rogerson SJ, Chaiyaroj SC, Ng K, Reeder JC, Brown GV. Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Exp Med* 1995;182:15-20.
112. Robert C, Pouvelle B, Meyer P, Muanza K, Fujioka H, Aikawa M, Scherf A, Gysin J. Chondroitin-4-sulphate (proteoglycan), a receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte adherence on brain microvascular endothelial cells. *Res Immunol* 1995;146:383-93.
113. Udomsangpetch R, Todd J, Carlson J, Greenwood BM. The effects of hemoglobin genotype and ABO blood group on the formation of rosettes by *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:149-53.
114. Barragan A, Kremsner PG, Wahlgren M, Carlson J. Blood group A antigen is a coreceptor in *Plasmodium falciparum* rosetting. *Infect Immun* 2000;68:2971-5.
115. Hatabu T, Kawazu S, Aikawa M, Kano S. Binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to the membrane-bound form of Fractalkine/CX3CL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15942-6.
116. Siano JP, Grady KK, Millet P, Wick TM. Short report: *Plasmodium falciparum*: cytoadherence to alpha(v)beta3 on human microvascular endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:77-9.
117. Eda S, Sherman IW. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes bind to the RGD motif of fibronectin via the band 3-related adhesin. *Exp Parasitol* 2004;107:157-62.
118. Sargeant TJ, Marti M, Caler E, Carlton JM, Simpson K, Speed TP, Cowman AF. Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. *Genome Biol* 2006;7:R12.
119. Marti M, Good RT, Rug M, Knuepfer E, Cowman AF. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* 2004;306:1930-3.
120. Hiller NL, Bhattacharjee S, van Ooij C, Liolios K, Harrison T, Lopez-Estrano C, Haldar K. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* 2004;306:1934-7.

121. Boddey JA, Moritz RL, Simpson RJ, Cowman AF. Role of the *Plasmodium* export element in trafficking parasite proteins to the infected erythrocyte. *Traffic* 2009;10:285-99.
122. Russo I, Babbitt S, Muralidharan V, Butler T, Oksman A, Goldberg DE. Plasmepsin V licenses *Plasmodium* proteins for export into the host erythrocyte. *Nature* 2010;463:632-6.
123. Boddey JA, Hodder AN, Gunther S, Gilson PR, Patsiouras H, Kapp EA, Pearce JA, de Koning-Ward TF, Simpson RJ, Crabb BS and others. An aspartyl protease directs malaria effector proteins to the host cell. *Nature* 2010;463:627-31.
124. Hiss JA, Przyborski JM, Schwarte F, Lingelbach K, Schneider G. The *Plasmodium* export element revisited. *PLoS One* 2008;3:e1560.
125. Marti M, Baum J, Rug M, Tilley L, Cowman AF. Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte. *J Cell Biol* 2005;171:587-92.
126. Spycher C, Rug M, Klonis N, Ferguson DJ, Cowman AF, Beck HP, Tilley L. Genesis of and trafficking to the Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol Cell Biol* 2006;26:4074-85.
127. Dixon MW, Hawthorne PL, Spielmann T, Anderson KL, Trenholme KR, Gardiner DL. Targeting of the ring exported protein 1 to the Maurer's clefts is mediated by a two-phase process. *Traffic* 2008;9:1316-26.
128. Haase S, Herrmann S, Gruring C, Heiber A, Jansen PW, Langer C, Treeck M, Cabrera A, Bruns C, Struck NS and others. Sequence requirements for the export of the *Plasmodium falciparum* Maurer's clefts protein REX2. *Mol Microbiol* 2009;71:1003-17.
129. Blisnick T, Morales Betoulle ME, Barale JC, Uzureau P, Berry L, Desroses S, Fujioka H, Mattei D, Braun Breton C. Pfsbp1, a Maurer's cleft *Plasmodium falciparum* protein, is associated with the erythrocyte skeleton. *Mol Biochem Parasitol* 2000;111:107-21.
130. Spielmann T, Gilberger TW. Protein export in malaria parasites: do multiple export motifs add up to multiple export pathways? *Trends Parasitol* 2010;26:6-10.
131. Bullen HE, Charnaud SC, Kalanon M, Riglar DT, Dekiwadia C, Kangwanrangsan N, Torii M, Tsuboi T, Baum J, Ralph SA and others. Biosynthesis, localisation and macromolecular arrangement of the *Plasmodium falciparum* translocon of exported proteins; PTEX. *J Biol Chem* 2012.
132. Spycher C, Rug M, Pachlatko E, Hanssen E, Ferguson D, Cowman AF, Tilley L, Beck HP. The Maurer's cleft protein MAHRP1 is essential for trafficking of PfEMP1 to the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol Microbiol* 2008;68:1300-14.
133. Trelka DP, Schneider TG, Reeder JC, Taraschi TF. Evidence for vesicle-mediated trafficking of parasite proteins to the host cell cytosol and erythrocyte surface membrane in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 2000;106:131-45.
134. Taraschi TF, Trelka D, Martinez S, Schneider T, O'Donnell ME. Vesicle-mediated trafficking of parasite proteins to the host cell cytosol and erythrocyte surface membrane in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Int J Parasitol* 2001;31:1381-91.
135. Taraschi TF, O'Donnell M, Martinez S, Schneider T, Trelka D, Fowler VM, Tilley L, Moriyama Y. Generation of an erythrocyte vesicle transport system by *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Blood* 2003;102:3420-6.

136. Lingelbach K, Przyborski JM. The long and winding road: protein trafficking mechanisms in the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte. *Mol Biochem Parasitol* 2006;147:1-8.
137. Desai SA, Krogstad DJ, McCleskey EW. A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. *Nature* 1993;362:643-6.
138. de Koning-Ward TF, Gilson PR, Boddey JA, Rug M, Smith BJ, Papenfuss AT, Sanders PR, Lundie RJ, Maier AG, Cowman AF and others. A newly discovered protein export machine in malaria parasites. *Nature* 2009;459:945-9.
139. El Bakkouri M, Pow A, Mulichak A, Cheung KL, Artz JD, Amani M, Fell S, de Koning-Ward TF, Goodman CD, McFadden GI and others. The Clp chaperones and proteases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 2010;404:456-77.
140. McLaren CE, Brittenham GM, Hasselblad V. Statistical and graphical evaluation of erythrocyte volume distributions. *Am J Physiol* 1987;252:H857-66.
141. Pandey KB, Rizvi SI. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011;155:131-6.
142. van Leeuwenhoek A. Other microscopical observations made by the same, about the texture of the blood, the sap of some plants, the figures of sugar and salt, and the probable cause of the difference of their tastes. *Philos Trans R Soc Lond* 1675;10:380-385.
143. Gorter E, Grendel F. On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *J Exp Med* 1925;41:439-43.
144. Kooyman DL, Byrne GW, McClellan S, Nielsen D, Tone M, Waldmann H, Coffman TM, McCurry KR, Platt JL, Logan JS. In vivo transfer of GPI-linked complement restriction factors from erythrocytes to the endothelium. *Science* 1995;269:89-92.
145. Civenni G, Test ST, Brodbeck U, Butikofer P. In vitro incorporation of GPI-anchored proteins into human erythrocytes and their fate in the membrane. *Blood* 1998;91:1784-92.
146. Wan J, Ristenpart WD, Stone HA. Dynamics of shear-induced ATP release from red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16432-7.
147. Diesen DL, Hess DT, Stamler JS. Hypoxic vasodilation by red blood cells: evidence for an s-nitrosothiol-based signal. *Circ Res* 2008;103:545-53.
148. Lang KS, Lang PA, Bauer C, Durantou C, Wieder T, Huber SM, Lang F. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 2005;15:195-202.
149. An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol* 2008;141:367-75.
150. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 2008;112:3939-48.
151. Yu J, Fischman DA, Steck TL. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J Supramol Struct* 1973;1:233-48.
152. Bennett V. The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. *Biochim Biophys Acta* 1989;988:107-21.
153. Mohandas N, An X. New insights into function of red cell membrane proteins and their interaction with spectrin-based membrane skeleton. *Transfus Clin Biol* 2006;13:29-30.
154. Bennett V. Proteins involved in membrane--cytoskeleton association in human erythrocytes: spectrin, ankyrin, and band 3. *Methods Enzymol* 1983;96:313-24.

155. Salomao M, Zhang X, Yang Y, Lee S, Hartwig JH, Chasis JA, Mohandas N, An X. Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8026-31.
156. Nicolas V, Le Van Kim C, Gane P, Birkenmeier C, Cartron JP, Colin Y, Mouro-Chanteloup I. Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation. *J Biol Chem* 2003;278:25526-33.
157. Khan AA, Hanada T, Mohseni M, Jeong JJ, Zeng L, Gaetani M, Li D, Reed BC, Speicher DW, Chishti AH. Dematin and adducin provide a novel link between the spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by directly interacting with glucose transporter-1. *J Biol Chem* 2008;283:14600-9.
158. Tripathi AK, Sha W, Shulaev V, Stins ME, Sullivan DJ, Jr. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce NF-kappaB regulated inflammatory pathways in human cerebral endothelium. *Blood* 2009;114:4243-52.
159. Gruenberg J, Allred DR, Sherman IW. Scanning electron microscope-analysis of the protrusions (knobs) present on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Cell Biol* 1983;97:795-802.
160. Taylor DW, Parra M, Chapman GB, Stearns ME, Renner J, Aikawa M, Uni S, Aley SB, Panton LJ, Howard RJ. Localization of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 1 in the erythrocyte skeleton under knobs. *Mol Biochem Parasitol* 1987;25:165-74.
161. Waller KL, Cooke BM, Nunomura W, Mohandas N, Coppel RL. Mapping the binding domains involved in the interaction between the *Plasmodium falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and the cytoadherence ligand *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). *J Biol Chem* 1999;274:23808-13.
162. Pei X, An X, Guo X, Tarnawski M, Coppel R, Mohandas N. Structural and functional studies of interaction between *Plasmodium falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and erythrocyte spectrin. *J Biol Chem* 2005;280:31166-71.
163. Magowan C, Nunomura W, Waller KL, Yeung J, Liang J, Van Dort H, Low PS, Coppel RL, Mohandas N. *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 1 associates with the band 3 binding domain of ankyrin in the infected red cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 2000;1502:461-70.
164. Crabb BS, Cooke BM, Reeder JC, Waller RF, Caruana SR, Davern KM, Wickham ME, Brown GV, Coppel RL, Cowman AF. Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell* 1997;89:287-96.
165. Glenister FK, Coppel RL, Cowman AF, Mohandas N, Cooke BM. Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. *Blood* 2002;99:1060-3.
166. Scherf A, Lopez-Rubio JJ, Riviere L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* 2008;62:445-70.
167. Kyes S, Horrocks P, Newbold C. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:673-707.

168. Cowman AF, Coppel RL, Saint RB, Favaloro J, Crewther PE, Stahl HD, Bianco AE, Brown GV, Anders RF, Kemp DJ. The ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) polypeptide of *Plasmodium falciparum* contains two separate blocks of tandem repeats encoding antigenic epitopes that are naturally immunogenic in man. *Mol Biol Med* 1984;2:207-21.
169. Foley M, Tilley L, Sawyer WH, Anders RF. The ring-infected erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum* associates with spectrin in the erythrocyte membrane. *Mol Biochem Parasitol* 1991;46:137-47.
170. Pei X, Guo X, Coppel R, Bhattacharjee S, Haldar K, Gratzer W, Mohandas N, An X. The ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of *Plasmodium falciparum* stabilizes spectrin tetramers and suppresses further invasion. *Blood* 2007;110:1036-42.
171. Pasloske BL, Baruch DI, van Schravendijk MR, Handunnetti SM, Aikawa M, Fujioka H, Taraschi TF, Gormley JA, Howard RJ. Cloning and characterization of a *Plasmodium falciparum* gene encoding a novel high-molecular weight host membrane-associated protein, PfEMP3. *Mol Biochem Parasitol* 1993;59:59-72.
172. Da Silva E, Foley M, Dluzewski AR, Murray LJ, Anders RF, Tilley L. The *Plasmodium falciparum* protein RESA interacts with the erythrocyte cytoskeleton and modifies erythrocyte thermal stability. *Mol Biochem Parasitol* 1994;66:59-69.
173. Silva MD, Cooke BM, Guillotte M, Buckingham DW, Sauzet JP, Le Scanf C, Contamin H, David P, Mercereau-Puijalon O, Bonnefoy S. A role for the *Plasmodium falciparum* RESA protein in resistance against heat shock demonstrated using gene disruption. *Mol Microbiol* 2005;56:990-1003.
174. Pei X, Guo X, Coppel R, Mohandas N, An X. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) destabilizes erythrocyte membrane skeleton. *J Biol Chem* 2007;282:26754-8.
175. Waller KL, Nunomura W, An X, Cooke BM, Mohandas N, Coppel RL. Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) of *Plasmodium falciparum* binds to the 30-kDa domain of protein 4.1 in malaria-infected red blood cells. *Blood* 2003;102:1911-4.
176. Black CG, Proellocks NI, Kats LM, Cooke BM, Mohandas N, Coppel RL. In vivo studies support the role of trafficking and cytoskeletal-binding motifs in the interaction of MESA with the membrane skeleton of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Mol Biochem Parasitol* 2008;160:143-7.
177. Glenister FK, Fernandez KM, Kats LM, Hanssen E, Mohandas N, Coppel RL, Cooke BM. Functional alteration of red blood cells by a megadalton protein of *Plasmodium falciparum*. *Blood* 2009;113:919-28.
178. Hodder AN, Maier AG, Rug M, Brown M, Hommel M, Pantic I, Puig-de-Morales-Marinkovic M, Smith B, Triglia T, Beeson J and others. Analysis of structure and function of the giant protein Pf332 in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 2009;71:48-65.
179. Hawthorne PL, Trenholme KR, Skinner-Adams TS, Spielmann T, Fischer K, Dixon MW, Ortega MR, Anderson KL, Kemp DJ, Gardiner DL. A novel *Plasmodium falciparum* ring stage protein, REX, is located in Maurer's clefts. *Mol Biochem Parasitol* 2004;136:181-9.



180. Hanssen E, Hawthorne P, Dixon MW, Trenholme KR, McMillan PJ, Spielmann T, Gardiner DL, Tilley L. Targeted mutagenesis of the ring-exported protein-1 of *Plasmodium falciparum* disrupts the architecture of Maurer's cleft organelles. *Mol Microbiol* 2008;69:938-53.
181. Spycher C, Klonis N, Spielmann T, Kump E, Steiger S, Tilley L, Beck HP. MAHRP-1, a novel *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein, binds ferriprotoporphyrin IX and localizes to the Maurer's clefts. *J Biol Chem* 2003;278:35373-83.
182. Cooke BM, Buckingham DW, Glenister FK, Fernandez KM, Bannister LH, Marti M, Mohandas N, Coppel RL. A Maurer's cleft-associated protein is essential for expression of the major malaria virulence antigen on the surface of infected red blood cells. *J Cell Biol* 2006;172:899-908.
183. Maier AG, Rug M, O'Neill MT, Beeson JG, Marti M, Reeder J, Cowman AF. Skeleton-binding protein 1 functions at the parasitophorous vacuole membrane to traffic PfEMP1 to the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte surface. *Blood* 2007;109:1289-97.
184. Hanssen E, Sougrat R, Frankland S, Deed S, Klonis N, Lippincott-Schwartz J, Tilley L. Electron tomography of the Maurer's cleft organelles of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes reveals novel structural features. *Mol Microbiol* 2008;67:703-18.
185. Kun JF, Hibbs AR, Saul A, McColl DJ, Coppel RL, Anders RF. A putative *Plasmodium falciparum* exported serine/threonine protein kinase. *Mol Biochem Parasitol* 1997;85:41-51.
186. Moskes C, Burghaus PA, Wernli B, Sauder U, Durrenberger M, Kappes B. Export of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 1 to the parasitophorous vacuole is dependent on three N-terminal membrane anchor motifs. *Mol Microbiol* 2004;54:676-91.
187. Blisnick T, Vincensini L, Fall G, Braun-Breton C. Protein phosphatase 1, a *Plasmodium falciparum* essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites. *Cell Microbiol* 2006;8:591-601.
188. Matesanz F, Duran-Chica I, Alcina A. The cloning and expression of Pfacs1, a *Plasmodium falciparum* fatty acyl coenzyme A synthetase-1 targeted to the host erythrocyte cytoplasm. *J Mol Biol* 1999;291:59-70.
189. Tellez M, Matesanz F, Alcina A. The C-terminal domain of the *Plasmodium falciparum* acyl-CoA synthetases PfACS1 and PfACS3 functions as ligand for ankyrin. *Mol Biochem Parasitol* 2003;129:191-8.
190. Vincensini L, Fall G, Berry L, Blisnick T, Braun Breton C. The RhopH complex is transferred to the host cell cytoplasm following red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 2008;160:81-9.
191. Lalle M, Curra C, Ciccarone F, Pace T, Cecchetti S, Fantozzi L, Ay B, Breton CB, Ponzi M. Dematin, a component of the erythrocyte membrane skeleton, is internalized by the malaria parasite and associates with *Plasmodium* 14-3-3. *J Biol Chem* 2011;286:1227-36.
192. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996;13:19-50.



193. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S and others. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002;419:498-511.
194. Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, Moch JK, Muster N, Sacci JB, Tabb DL and others. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 2002;419:520-6.
195. Lasonder E, Ishihama Y, Andersen JS, Vermunt AM, Pain A, Sauerwein RW, Eling WM, Hall N, Waters AP, Stunnenberg HG and others. Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature* 2002;419:537-42.
196. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 1999;17:121-7.
197. Grant SG, Blackstock WP. Proteomics in neuroscience: from protein to network. *J Neurosci* 2001;21:8315-8.
198. Sanders PR, Gilson PR, Cantin GT, Greenbaum DC, Nebl T, Carucci DJ, McConville MJ, Schofield L, Hodder AN, Yates JR, 3rd and others. Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in Raft-like membranes of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2005;280:40169-76.
199. Gelhaus C, Fritsch J, Krause E, Leippe M. Fractionation and identification of proteins by 2-DE and MS: towards a proteomic analysis of *Plasmodium falciparum*. *Proteomics* 2005;5:4213-22.
200. Ranjan R, Chugh M, Kumar S, Singh S, Kanodia S, Hossain MJ, Korde R, Grover A, Dhawan S, Chauhan VS and others. Proteome analysis reveals a large merozoite surface protein-1 associated complex on the *Plasmodium falciparum* merozoite surface. *J Proteome Res* 2011;10:680-91.
201. Sam-Yellowe TY, Florens L, Johnson JR, Wang T, Drazba JA, Le Roch KG, Zhou Y, Batalov S, Carucci DJ, Winzeler EA and others. A *Plasmodium* gene family encoding Maurer's cleft membrane proteins: structural properties and expression profiling. *Genome Res* 2004;14:1052-9.
202. Vincensini L, Richert S, Blisnick T, Van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Rabilloud T, Braun Breton C. Proteomic analysis identifies novel proteins of the Maurer's clefts, a secretory compartment delivering *Plasmodium falciparum* proteins to the surface of its host cell. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:582-93.
203. Sam-Yellowe TY, Florens L, Wang T, Raine JD, Carucci DJ, Sinden R, Yates JR, 3rd. Proteome analysis of rhoptry-enriched fractions isolated from *Plasmodium* merozoites. *J Proteome Res* 2004;3:995-1001.
204. Nyalwidhe J, Baumeister S, Lingelbach K. Proteomic approach towards the characterization of the parasitophorous vacuole in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *International Journal of Medical Microbiology* 2004;293:92-93.
205. Nyalwidhe J, Lingelbach K. Proteases and chaperones are the most abundant proteins in the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Proteomics* 2006;6:1563-1573.
206. Rabilloud T, Blisnick T, Heller M, Luche S, Aebersold R, Lunardi J, Braun-Breton C. Analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis: comparison of the proteins extracted from normal or *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte ghosts. *Electrophoresis* 1999;20:3603-10.

207. Florens L, Liu X, Wang Y, Yang S, Schwartz O, Peglar M, Carucci DJ, Yates JR, 3rd, Wub Y. Proteomics approach reveals novel proteins on the surface of malaria-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 2004;135:1-11.
208. Wu Y, Craig A. Comparative proteomic analysis of metabolically labelled proteins from *Plasmodium falciparum* isolates with different adhesion properties. *Malar J* 2006;5:67.
209. Molloy MP. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal Biochem* 2000;280:1-10.
210. Santoni V, Molloy M, Rabilloud T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* 2000;21:1054-70.
211. Chevalier F. Highlights on the capacities of "Gel-based" proteomics. *Proteome Sci* 2010;8:23.
212. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976;193:673-5.
213. Kilejian A. Characterization of a protein correlated with the production of knob-like protrusions on membranes of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4650-3.
214. Kutner S, Breuer WV, Ginsburg H, Aley SB, Cabantchik ZI. Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of *Plasmodium falciparum*: association with parasite development. *J Cell Physiol* 1985;125:521-7.
215. Azim-Zadeh O, Hillebrecht A, Linne U, Marahiel MA, Klebe G, Lingelbach K, Nyalwidhe J. Use of biotin derivatives to probe conformational changes in proteins. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:21609-21617.
216. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4.
217. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
218. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007-21.
219. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 1975;26:231-43.
220. Rabilloud T, Valette C, Lawrence JJ. Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* 1994;15:1552-8.
221. Nothwang HG, Schindler J. Two-dimensional separation of membrane proteins by 16-BAC-SDS-PAGE. *Methods Mol Biol* 2009;528:269-77.
222. Kang DH, Gho YS, Suh MK, Kang CH. Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 2002;23:1511-1512.
223. Heukeshoven J, Dernick R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 1988;9:28-32.

224. Lasaosa M, Jakoby T, Delmotte N, C GH, Heinzle E, Tholey A. Rapid selection of peptide containing fractions in off-line 2-D HPLC in shotgun proteome analysis by screening with MALDI TOF MS. *Proteomics* 2009;9:4577-81.
225. Decherf G, Egee S, Staines HM, Ellory JC, Thomas SL. Anionic channels in malaria-infected human red blood cells. *Blood Cells Mol Dis* 2004;32:366-71.
226. Baumeister S, Endermann T, Charpian S, Nyalwidhe J, Duranton C, Huber S, Kirk K, Lang F, Lingelbach K. A biotin derivative blocks parasite induced novel permeation pathways in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 2003;132:35-45.
227. Macfarlane DE. Use of benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride ("16-BAC"), a cationic detergent, in an acidic polyacrylamide gel electrophoresis system to detect base labile protein methylation in intact cells. *Anal Biochem* 1983;132:231-5.
228. Hartinger J, Stenius K, Hogemann D, Jahn R. 16-BAC/SDS-PAGE: a two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. *Anal Biochem* 1996;240:126-33.
229. Kramer ML. A new multiphasic buffer system for benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride polyacrylamide gel electrophoresis of proteins providing efficient stacking. *Electrophoresis* 2006;27:347-56.
230. Langreth SG, Jensen JB, Reese RT, Trager W. Fine structure of human malaria in vitro. *J Protozool* 1978;25:443-52.
231. Cohn JV, Alkhalil A, Wagner MA, Rajapandi T, Desai SA. Extracellular lysines on the plasmodial surface anion channel involved in Na<sup>+</sup> exclusion. *Mol Biochem Parasitol* 2003;132:27-34.
232. Kirk K, Horner HA, Elford BC, Ellory JC, Newbold CI. Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. *J Biol Chem* 1994;269:3339-47.
233. Pouvelle B, Gormley JA, Taraschi TF. Characterization of trafficking pathways and membrane genesis in malaria-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 1994;66:83-96.
234. Pouvelle B, Spiegel R, Hsiao L, Howard RJ, Morris RL, Thomas AP, Taraschi TF. Direct access to serum macromolecules by intraerythrocytic malaria parasites. *Nature* 1991;353:73-5.
235. Bhakdi SC, Ottinger A, Somsri S, Sratongno P, Pannadaporn P, Chikka P, Malasit P, Pattanapanyasat K, Neumann HP. Optimized high gradient magnetic separation for isolation of *Plasmodium*-infected red blood cells. *Malar J* 2010;9:38.
236. Jensen JB. Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1978;27:1274-6.
237. Howard RJ, Lyon JA, Diggs CL, Haynes JD, Leech JH, Barnwell JW, Aley SB, Aikawa M, Miller LH. Localization of the major *Plasmodium falciparum* glycoprotein on the surface of mature intraerythrocytic trophozoites and schizonts. *Mol Biochem Parasitol* 1984;11:349-62.
238. Mbengue A, Yam XY, Braun-Breton C. Human erythrocyte remodelling during *Plasmodium falciparum* malaria parasite growth and egress. *Br J Haematol* 2012;157:171-9.

239. Eravci M, Fuxius S, Broedel O, Weist S, Krause E, Stephanowitz H, Schluter H, Eravci S, Baumgartner A. The whereabouts of transmembrane proteins from rat brain synaptosomes during two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2008;8:1762-70.
240. Braun RJ, Kinkl N, Beer M, Ueffing M. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal Bioanal Chem* 2007;389:1033-45.
241. Rais I, Karas M, Schagger H. Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics* 2004;4:2567-71.
242. Burre J, Beckhaus T, Schagger H, Corvey C, Hofmann S, Karas M, Zimmermann H, Volkandt W. Analysis of the synaptic vesicle proteome using three gel-based protein separation techniques. *Proteomics* 2006;6:6250-62.
243. Helling S, Schmitt E, Joppich C, Schulenburg T, Mullner S, Felske-Muller S, Wiebringhaus T, Becker G, Linsenmann G, Sitek B and others. 2-D differential membrane proteome analysis of scarce protein samples. *Proteomics* 2006;6:4506-13.
244. Yamaguchi Y, Miyagi Y, Baba H. Two-dimensional electrophoresis with cationic detergents: a powerful tool for the proteomic analysis of myelin proteins. Part 2: analytical aspects. *J Neurosci Res* 2008;86:766-75.
245. Yamaguchi Y, Miyagi Y, Baba H. Two-dimensional electrophoresis with cationic detergents, a powerful tool for the proteomic analysis of myelin proteins. Part 1: technical aspects of electrophoresis. *J Neurosci Res* 2008;86:755-65.
246. Swank RT, Munkres KD. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem* 1971;39:462-77.
247. Deng X, Hahne T, Schroder S, Redweik S, Nebija D, Schmidt H, Janssen O, Lachmann B, Watzig H. The challenge to quantify proteins with charge trains due to isoforms or conformers. *Electrophoresis* 2012;33:263-9.
248. Ui N. Conformational studies on proteins by isoelectric focusing. *Ann N Y Acad Sci* 1973;209:198-209.
249. Alexandre JS, Kaewthamasorn M, Yahata K, Nakazawa S, Kaneko O. Positive selection on the *Plasmodium falciparum* *clag2* gene encoding a component of the erythrocyte-binding rhoptry protein complex. *Trop Med Health* 2011;39:77-82.
250. Comeaux CA, Coleman BI, Bei AK, Whitehurst N, Duraisingh MT. Functional analysis of epigenetic regulation of tandem *RhopH1/clag* genes reveals a role in *Plasmodium falciparum* growth. *Mol Microbiol* 2011;80:378-90.
251. Hiller NL, Akompong T, Morrow JS, Holder AA, Haldar K. Identification of a stomatin orthologue in vacuoles induced in human erythrocytes by malaria parasites. A role for microbial raft proteins in apicomplexan vacuole biogenesis. *J Biol Chem* 2003;278:48413-21.
252. Goel S, Valiyaveetil M, Achur RN, Goyal A, Mattei D, Salanti A, Trenholme KR, Gardiner DL, Gowda DC. Dual stage synthesis and crucial role of cytoadherence-linked asexual gene 9 in the surface expression of malaria parasite var proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:16643-8.
253. Ling IT, Florens L, Dluzewski AR, Kaneko O, Grainger M, Lim BYSY, Tsuboi T, Hopkins JM, Johnson JR, Torii M and others. The *Plasmodium falciparum* *clag9* gene encodes a rhoptry protein that is transferred to the host erythrocyte upon invasion. *Mol Microbiol* 2004;52:107-118.

254. Holt DC, Gardiner DL, Thomas EA, Mayo M, Bourke PF, Sutherland CJ, Carter R, Myers G, Kemp DJ, Trenholme KR. The cytoadherence linked asexual gene family of *Plasmodium falciparum*: are there roles other than cytoadherence? *Int J Parasitol* 1999;29:939-44.
255. Ling IT, Florens L, Dluzewski AR, Kaneko O, Grainger M, Yim Lim BY, Tsuboi T, Hopkins JM, Johnson JR, Torii M and others. The *Plasmodium falciparum* clag9 gene encodes a rhoptry protein that is transferred to the host erythrocyte upon invasion. *Mol Microbiol* 2004;52:107-18.
256. Kaneko O, Yim Lim BY, Iriko H, Ling IT, Otsuki H, Grainger M, Tsuboi T, Adams JH, Mattei D, Holder AA and others. Apical expression of three RhopH1/Clag proteins as components of the *Plasmodium falciparum* RhopH complex. *Mol Biochem Parasitol* 2005;143:20-8.
257. Kaneko O, Tsuboi T, Ling IT, Howell S, Shirano M, Tachibana M, Cao YM, Holder AA, Torii M. The high molecular mass rhoptry protein, RhopH1, is encoded by members of the clag multigene family in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*. *Mol Biochem Parasitol* 2001;118:223-31.
258. Ghoneim A, Kaneko O, Tsuboi T, Torii M. The *Plasmodium falciparum* RhopH2 promoter and first 24 amino acids are sufficient to target proteins to the rhoptries. *Parasitol Int* 2007;56:31-43.
259. Cowman AF, Baldi DL, Healer J, Mills KE, O'Donnell RA, Reed MB, Triglia T, Wickham ME, Crabb BS. Functional analysis of proteins involved in *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of red blood cells. *FEBS Lett* 2000;476:84-8.
260. Ndengele MM, Messineo DG, Sam-Yellowe T, Harwalkar JA. *Plasmodium falciparum*: effects of membrane modulating agents on direct binding of rhoptry proteins to human erythrocytes. *Exp Parasitol* 1995;81:191-201.
261. Perkins ME, Ziefer A. Preferential binding of *Plasmodium falciparum* SERA and rhoptry proteins to erythrocyte membrane inner leaflet phospholipids. *Infect Immun* 1994;62:1207-12.
262. Kaneko O. Erythrocyte invasion: vocabulary and grammar of the *Plasmodium* rhoptry. *Parasitol Int* 2007;56:255-62.
263. Kats LM, Black CG, Proellocks NI, Coppel RL. *Plasmodium* rhoptries: how things went pear-shaped. *Trends Parasitol* 2006;22:269-276.
264. Pouvelle B, Buffet PA, Lepolard C, Scherf A, Gysin J. Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum* ring-stage-infected erythrocytes. *Nat Med* 2000;6:1264-8.
265. Sterkers Y, Scheidig C, da Rocha M, Lepolard C, Gysin J, Scherf A. Members of the low-molecular-mass rhoptry protein complex of *Plasmodium falciparum* bind to the surface of normal erythrocytes. *J Infect Dis* 2007;196:617-21.
266. Awah NW, Troye-Blomberg M, Berzins K, Gysin J. Mechanisms of malarial anaemia: potential involvement of the *Plasmodium falciparum* low molecular weight rhoptry-associated proteins. *Acta Trop* 2009;112:295-302.
267. Douki JB, Sterkers Y, Lepolard C, Traore B, Costa FT, Scherf A, Gysin J. Adhesion of normal and *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocytes to endothelial cells and the placenta involves the rhoptry-derived ring surface protein-2. *Blood* 2003;101:5025-32.

268. Baldi DL, Good R, Duraisingh MT, Crabb BS, Cowman AF. Identification and disruption of the gene encoding the third member of the low-molecular-mass rhoptry complex in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 2002;70:5236-45.
269. Garcia J, Curtidor H, Vanegas M, Arevalo-Pinzon G, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Conserved regions of the *Plasmodium falciparum* rhoptry-associated protein 3 mediate specific host-pathogen interactions during invasion of red blood cells. *Peptides* 2010;31:2165-72.
270. Sanders PR, Cantin GT, Greenbaum DC, Gilson PR, Nebl T, Moritz RL, Yates JR, 3rd, Hodder AN, Crabb BS. Identification of protein complexes in detergent-resistant membranes of *Plasmodium falciparum* schizonts. *Mol Biochem Parasitol* 2007;154:148-57.
271. Dixon MW, Kenny S, McMillan PJ, Hanssen E, Trenholme KR, Gardiner DL, Tilley L. Genetic ablation of a Maurer's cleft protein prevents assembly of the *Plasmodium falciparum* virulence complex. *Mol Microbiol* 2011;81:982-93.
272. Maier AG, Rug M, O'Neill MT, Brown M, Chakravorty S, Szeszak T, Chesson J, Wu Y, Hughes K, Coppel RL and others. Exported proteins required for virulence and rigidity of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Cell* 2008;134:48-61.
273. Young JC, Barral JM, Ulrich Hartl F. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem Sci* 2003;28:541-7.
274. Kabani M, Martineau CN. Multiple hsp70 isoforms in the eukaryotic cytosol: mere redundancy or functional specificity? *Curr Genomics* 2008;9:338-248.
275. Botha M, Pesce ER, Blatch GL. The Hsp40 proteins of *Plasmodium falciparum* and other apicomplexa: regulating chaperone power in the parasite and the host. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:1781-803.
276. Pesce ER, Blatch GL. The Hsp40-Hsp70 chaperone machinery of *Plasmodium falciparum*. *African Journal of Biochemistry Research* 2008;3:154-163.
277. Botha M, Chiang AN, Needham PG, Stephens LL, Hoppe HC, Kulzer S, Przyborski JM, Lingelbach K, Wipf P, Brodsky JL and others. *Plasmodium falciparum* encodes a single cytosolic type I Hsp40 that functionally interacts with Hsp70 and is upregulated by heat shock. *Cell Stress Chaperones* 2011;16:389-401.
278. Le Roch KG, Zhou Y, Blair PL, Grainger M, Moch JK, Haynes JD, De La Vega P, Holder AA, Batalov S, Carucci DJ and others. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* 2003;301:1503-8.
279. Steck TL, Weinstein RS, Straus JH, Wallach DF. Inside-out red cell membrane vesicles: preparation and purification. *Science* 1970;168:255-7.
280. Johnson RM. The kinetics of resealing of washed erythrocyte ghosts. *J Membr Biol* 1975;22:231-53.
281. Marchesini N, Vieira M, Luo S, Moreno SN, Docampo R. A malaria parasite-encoded vacuolar H(+)-ATPase is targeted to the host erythrocyte. *J Biol Chem* 2005;280:36841-7.
282. Richards JS, Beeson JG. The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunol Cell Biol* 2009;87:377-90.
283. Zhang N, Li N, Li L. Liquid chromatography MALDI MS/MS for membrane proteome analysis. *J Proteome Res* 2004;3:719-27.



284. Mao S, Luo Y, Bao G, Zhang Y, Li Y, Ma Y. Comparative analysis on the membrane proteome of *Clostridium acetobutylicum* wild type strain and its butanol-tolerant mutant. *Mol Biosyst* 2011;7:1660-77.
285. Veith PD, O'Brien-Simpson NM, Tan Y, Djatmiko DC, Dashper SG, Reynolds EC. Outer membrane proteome and antigens of *Tannerella forsythia*. *J Proteome Res* 2009;8:4279-92.
286. Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J Proteomics* 2010;73:2064-77.
287. Rager N, Mamoun CB, Carter NS, Goldberg DE, Ullman B. Localization of the *Plasmodium falciparum* PfNT1 nucleoside transporter to the parasite plasma membrane. *J Biol Chem* 2001;276:41095-9.
288. Kuhn Y, Sanchez CP, Ayoub D, Saridaki T, van Dorsselaer A, Lanzer M. Trafficking of the phosphoprotein PfCRT to the digestive vacuolar membrane in *Plasmodium falciparum*. *Traffic* 2010;11:236-49.
289. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naude B, Deitsch KW and others. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000;6:861-71.
290. Jackson PR, Winkler DG, Kimzey SL, Fisher FM, Jr. Cytofluorograf detection of *Plasmodium yoelii*, *Trypanosoma gambiense*, and *Trypanosoma equiperdum* by laser excited fluorescence of stained rodent blood. *J Parasitol* 1977;63:593-8.
291. Howard RJ, Battye FL, Mitchell GF. *Plasmodium*-infected blood cells analyzed and sorted by flow fluorimetry with the deoxyribonucleic acid binding dye 33258 Hoechst. *J Histochem Cytochem* 1979;27:803-13.
292. Janse CJ, Van Vianen PH. Flow cytometry in malaria detection. *Methods Cell Biol* 1994;42 Pt B:295-318.
293. Jimenez-Diaz MB, Mulet T, Gomez V, Viera S, Alvarez A, Garuti H, Vazquez Y, Fernandez A, Ibanez J, Jimenez M and others. Quantitative measurement of *Plasmodium*-infected erythrocytes in murine models of malaria by flow cytometry using bidimensional assessment of SYTO-16 fluorescence. *Cytometry A* 2009;75:225-35.
294. Bei AK, Desimone TM, Badiane AS, Ahouidi AD, Dieye T, Ndiaye D, Sarr O, Ndir O, Mboup S, Duraisingh MT. A flow cytometry-based assay for measuring invasion of red blood cells by *Plasmodium falciparum*. *Am J Hematol* 2010;85:234-7.
295. Eklund EH, Schneider J, Fidock DA. Identifying apicoplast-targeting antimalarials using high-throughput compatible approaches. *FASEB J* 2011;25:3583-93.
296. Li Q, Gerena L, Xie L, Zhang J, Kyle D, Milhous W. Development and validation of flow cytometric measurement for parasitemia in cultures of *P. falciparum* vitally stained with YOYO-1. *Cytometry A* 2007;71:297-307.
297. Barkan D, Ginsburg H, Golenser J. Optimisation of flow cytometric measurement of parasitaemia in *plasmodium*-infected mice. *Int J Parasitol* 2000;30:649-53.
298. Campo JJ, Aponte JJ, Nhabomba AJ, Sacarlal J, Angulo-Barturen I, Jimenez-Diaz MB, Alonso PL, Dobano C. Feasibility of flow cytometry for measurements of *Plasmodium falciparum* parasite burden in studies in areas of malaria endemicity by use of bidimensional assessment of YOYO-1 and autofluorescence. *J Clin Microbiol* 2011;49:968-74.



299. Schuck DC, Ribeiro RY, Nery AA, Ulrich H, Garcia CR. Flow cytometry as a tool for analyzing changes in *Plasmodium falciparum* cell cycle following treatment with indol compounds. *Cytometry A* 2011;79:959-64.
300. Hein-Kristensen L, Wiese L, Kurtzhals JA, Staalsoe T. In-depth validation of acridine orange staining for flow cytometric parasite and reticulocyte enumeration in an experimental model using *Plasmodium berghei*. *Exp Parasitol* 2009;123:152-7.
301. Makler MT, Lee LG, Recktenwald D. Thiazole orange: a new dye for *Plasmodium* species analysis. *Cytometry* 1987;8:568-70.
302. Grimberg BT, Erickson JJ, Sramkoski RM, Jacobberger JW, Zimmerman PA. Monitoring *Plasmodium falciparum* growth and development by UV flow cytometry using an optimized Hoechst-thiazole orange staining strategy. *Cytometry A* 2008;73:546-54.
303. Gerena Y, Gonzalez-Pons M, Serrano AE. Cytofluorometric detection of rodent malaria parasites using red-excited fluorescent dyes. *Cytometry A* 2011;79:965-72.
304. Grimberg BT. Methodology and application of flow cytometry for investigation of human malaria parasites. *J Immunol Methods* 2011;367:1-16.
305. Kabani S, Waterfall M, Matthews KR. Cell-cycle synchronisation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* using Vybrant DyeCycle Violet-based sorting. *Mol Biochem Parasitol* 2010;169:59-62.
306. Mathew G, Timm EA, Jr., Sotomayor P, Godoy A, Montecinos VP, Smith GJ, Huss WJ. ABCG2-mediated DyeCycle Violet efflux defined side population in benign and malignant prostate. *Cell Cycle* 2009;8:1053-61.
307. Hennessy F, Nicoll WS, Zimmermann R, Cheetham ME, Blatch GL. Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Sci* 2005;14:1697-709.
308. Fan CY, Lee S, Cyr DM. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones* 2003;8:309-16.
309. Ohtsuka K, Hata M. Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40--a review. *Int J Hyperthermia* 2000;16:231-45.
310. Safeukui I, Correas JM, Brousse V, Hirt D, Deplaine G, Mule S, Lesurtel M, Goasguen N, Sauvanet A, Couvelard A and others. Retention of *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen. *Blood* 2008;112:2520-8.

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methodik zur Anreicherung und Isolierung der Wirtszellmembran von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten erarbeitet. Die Proteine dieser Membranfraktion wurden mittels optimierter 2D 16-BAC/SDS PAGE und 2D CTAB/SDS PAGE, sowie mittels 2D IEF/SDS PAGE aufgetrennt und anschließend durch MALDI TOF/TOF identifiziert. Dabei wurde gezeigt, dass die kationische 2D PAGE gegenüber der 2D IEF/SDS PAGE signifikante Vorteile bei der Auftrennung von Membranproteinen und Membranassoziierten Proteinen dieser Fraktion besitzt. Außerdem wiesen die Gele der kationischen PAGE eine recht hohe Reproduzierbarkeit auf. Die anschließende massenspektrometrische Analyse ergab, dass beide PAGEs sich gegenseitig ergänzten und für einige der identifizierten Proteine eine Interaktion mit dem Zytoskelett oder der Membran der Wirtszelle postuliert werden kann. Darunter befanden sich auch Proteine der Rhoptrien und den *Maurer's clefts*, sowie Proteine deren Funktion sowie Lokalisation bisher unbekannt sind. Aus diesen Daten wurde ein hypothetisches Modell der identifizierten Proteine von spät-infizierten Erythrozyten aufgestellt. Zum Vergleich wurden die Proteine der Membranfraktion in einer 1D SDS PAGE aufgetrennt, mittels LC-MALDI TOF/TOF analysiert und eine umfangreiche Liste mit proteomischen Daten erstellt. Dabei wurden 733 plasmodiale Proteine identifiziert, von denen 45 % als exportierte Proteine, Membranproteine oder Proteinen unbekannter Funktion bzw. Lokalisation zugeordnet wurden, was für eine adäquate Anreicherung exportierter und mutmaßlich exportierter Proteine durch die angewandte Methodik spricht.

Das Verfahren der gelbasierten, kationischen PAGE wurde neben den Wirtszellproteinen später Stadien auch für diejenigen Proteine verwandt, die aus der Wirtszelle früh-infizierter Erythrozyten stammen. Für die Anreicherung von Erythrozyten, die mit viablen frühen Stadien von *P. falciparum* infiziert sind, wurde eine auf Durchflusszytometrie basierende Methode entwickelt. Hierdurch wurde eine Anreicherung von mehr als 98 % erreicht. Bisher war es nicht möglich, eine solche Reinheit früher, lebensfähiger Parasitenstadien zu erreichen. Damit legt die hier erarbeitete Methode den Grundstein, um nun auch auf molekularer und proteomischer Ebene die verschiedenen Parasitenstadien miteinander quantitativ zu vergleichen. Danach wurde, analog zu den spät-infizierten Erythrozyten, die Wirtszellmembran angereichert und die Proteine extrahiert. Bei der 2D CTAB/SDS PAGE wurden drei plasmodiale Proteine gefunden, welche möglicherweise direkt nach der Invasion in die Wirtszelle vom Parasiten exportiert bzw. sezerniert wurden, um dort das Überleben des Parasiten sowie

dessen Entwicklung innerhalb des Erythrozyten zu gewährleisten. Der Vergleich der 2D Gele von spät-infizierten Erythrozyten mit dem 2D Gel der früh-infizierten Erythrozyten ergab deutliche Unterschiede im Proteinbesatz der Membranfraktionen der unterschiedlichen Stadien. Dies zeigt die Notwendigkeit der stadienspezifischen Analyse des Parasiten und seiner Wirtszelle, um ein besseres Verständnis auf molekularer Ebene der von Seiten des Parasiten eingeleiteten Wirtszell-Modifikationen innerhalb des intraerythrozytären Entwicklungszyklus zu erlangen.

Die Daten der vorliegenden Arbeit liefern erste Hinweise auf die Lokalisation verschiedener Proteine des Parasiten innerhalb der Wirtszelle, deren Funktion und Lokalisation bisher unzureichend aufgeklärt sind. Die Untersuchung dieser Proteine könnte wichtige Vorgänge bei der Modifikation der Wirtszelle im intraerythrozytären Entwicklungszyklus aufklären und so zu einem besseren Verständnis über die molekularen Interaktionen des Parasiten mit seiner Wirtszelle führen.

.

## 8 Summary

In the present work, a method for the isolation and purification of the host cell membrane of *P. falciparum*-infected erythrocytes was established. From the membrane fraction, proteins were extracted and separated by optimized 2D 16-BAC/SDS PAGE or 2D CTAB/SDS PAGE. Subsequently, the proteins were analyzed by MALDI TOF/TOF and the data were compared to gels from classical 2D IEF/SDS PAGE. It is shown that the gels from the cationic 2D PAGEs are highly reproducible and superior in separating membrane as well as membrane-associated proteins than the classical 2D IEF/SDS PAGE approach. In gels of the cationic PAGEs, several proteins were identified that might interact with the cytoskeleton or with the membrane of the host cell. Some of these proteins belong to the rhoptries and the Maurer's clefts of the parasite or represent proteins that are still uncharacterized. In an additional 1D SDS PAGE, combined with LC-MALDI TOF/TOF, 733 parasite-derived proteins were identified. From these, 45 % are annotated as exported proteins, membrane proteins or uncharacterized proteins, which show the effectiveness of the applied method.

By use of fluorescence-activated cell sorting, a method for the enrichment of early-infected erythrocytes was established. Using this method, an enrichment of up to 98 % was achieved, and the parasites within the sorted erythrocytes remained viable. The host cell membrane was then isolated according to the protocol established for late stage-infected erythrocytes. Three plasmodial proteins were found in the gel of a first 2D CTAB/SDS PAGE. These proteins are probably exported to the host cell directly after invasion to assure the survival and development of the parasite within its host cell. The comparison of gels from different stages of the parasite clearly showed significant differences in the protein repertoire, which shows the need for stage-specific analysis of the parasite to better understand parasite induced host-cell modifications.

In conclusion, the data of this work form the basis for further analyses of yet uncharacterized proteins identified in the gels of early-infected as well as late-infected erythrocytes. The characterization of these proteins may contribute to better understand the modification of the host cell and the interaction between the parasite and the host cell at the molecular level.

## 9 Danksagung

Prof Dr. Matthias Leippe danke ich für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas und für die wissenschaftlichen Gespräche während der gesamten Arbeit.

Prof. Dr. Ottmar Janßen möchte ich für die Erstellung des Zweitgutachtens und der sehr guten Kooperation während dieser Arbeit danken.

Besonderer Dank gilt Dr. Christoph Gelhaus für die intensive Betreuung und dem Korrekturlesen meiner Arbeit sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft und der konstruktiven Kritik.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Andreas Tholey, Dr. Thomas Jakoby und Dipl.-Biol. Jana Schlenk vom Institut für Experimentelle Medizin für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Heiner Oberg und Sandra Ussat für die Durchführung der Experimente in der Durchflusssyztometrie bedanken.

Ein herzliches Dankeschön auch an alle Mitarbeiter der Zoophysiologie für das kollegiale und angenehme Arbeitsklima. Insbesondere bei Heidrun Ließegang und Saskia Heppner möchte ich mich für die gemeinsame Aufopferung und Zusammenarbeit bedanken.

Meiner Familie danke ich für die immerwährende Unterstützung.

Weiterer Dank geht an Justyna für ihren nie endenden Beistand in allen Höhen und Tiefen während der gesamten Arbeit.

## **10 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit Hilfe der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel unter Anleitung meiner akademischen Lehrer verfasst habe. Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft und wurde bisher keiner anderen Universität zur Begutachtung vorgelegt.

Kiel, im Mai 2012

Stephan Philipp

## 11 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name:	Stephan Philipp
Geburtsdatum:	20.02.1982
Geburtsort:	Elsterwerda
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

### Hochschulausbildung

Juli 2008 - April 2012	Doktorarbeit an der CAU in Kiel, Institut für Zoologie, Abteilung Zoophysiologie, bei Prof. Dr. Matthias Leippe
Juni 2007 - Januar 2008	Master Thesis am UKSH in Kiel, Institut für Immunologie, bei Prof. Dr. Dieter Adam
September 2005 - Januar 2006	Bachelor Thesis am UKSH in Kiel, Institut für Immunologie, bei Prof. Dr. Dieter Adam
Oktober 2002 - Februar 2008	Studium an der Fachhochschule Lausitz in Senftenberg, Studiengang: Biotechnologie

### Schulbildung

August 1994 - Juli 2001	Elsterschloss-Gymnasium in Elsterwerda
August 1988 - Juli 1994	Grundschule in Präsen



## 12 Publikationsliste

### Originalarbeiten

**Philipp S.**, Oberg H.H., Leippe M. and Gelhaus C. Isolation of erythrocytes infected with viable early stages of *Plasmodium falciparum* by flow cytometry. Cytometry Part A, in Revision

**Philipp S.**, Jakoby T., Tholey A., Janssen O., Leippe M., Gelhaus C. Cationic detergents enable the separation of membrane proteins of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by 2D gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 2012; 33(7):1120-8.

**Philipp S.**, Puchert M., Adam-Klages S., Tchikov V., Winoto-Morbach S., Mathieu S., Jung A., Kolker L., Marchesini N., Kabelitz D., Hannun Y.A., Schütze S. and Adam D. The Polycomb Group Protein EED Couples TNF Receptor 1 to Neutral Sphingomyelinase. *Proc Natl Acad Sci*. 2010; 107(3):1112-7.

### Tagungsbeiträge

**Philipp S.**, Jakoby T., Tholey A., Janssen O., Leippe M., Gelhaus C. Das Membranproteom von *P. falciparum*- infizierten Erythrozyten. Vortrag an der Proteomics 2.0 Initiative in Kiel: Neue Entwicklungen und methodische Möglichkeiten in der Proteom-Analyse. 2011.

**Philipp S.**, Janssen O., Leippe M., Gelhaus C. Analysis of the subproteome of membrane ghosts derived from *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells. Posterbeitrag 7. Malaria Tagung am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin – Hamburg

13 Anhang

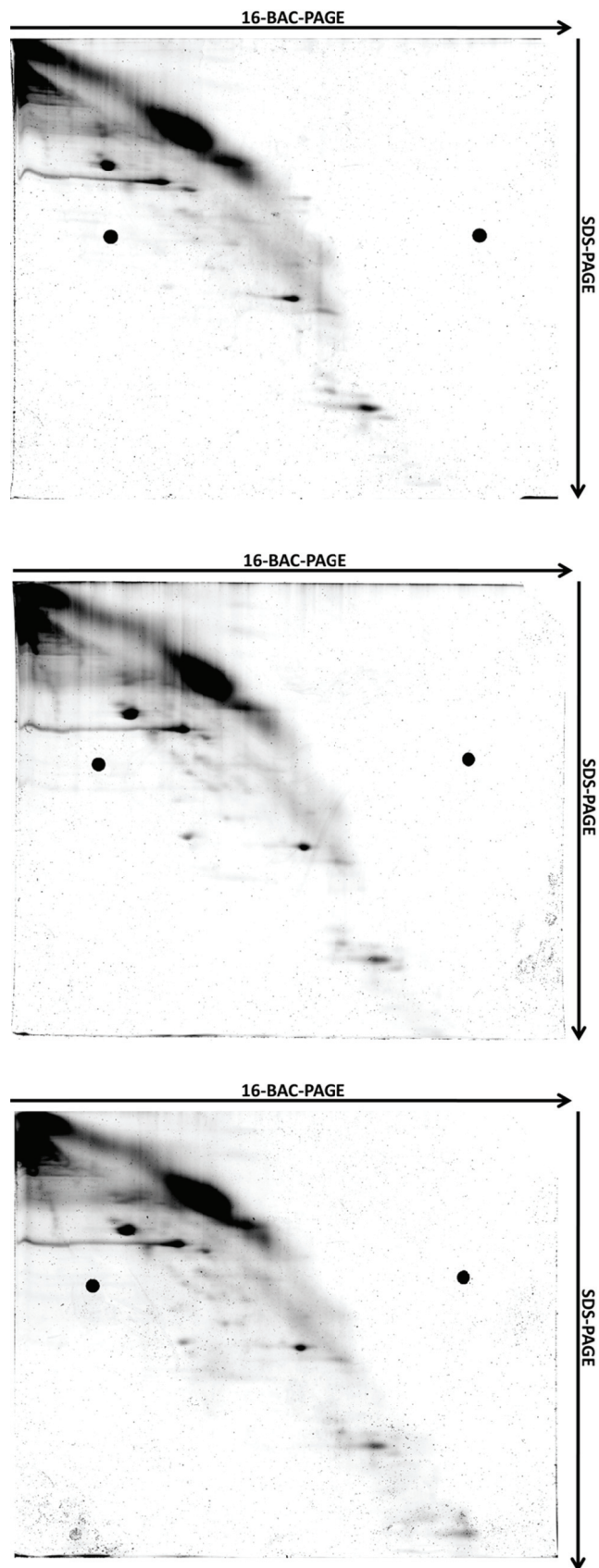


Abb. 33: 2D 16-BAC/SDS Gele aus den biologischen Replikaten von nicht-infizierten Erythrozyten.

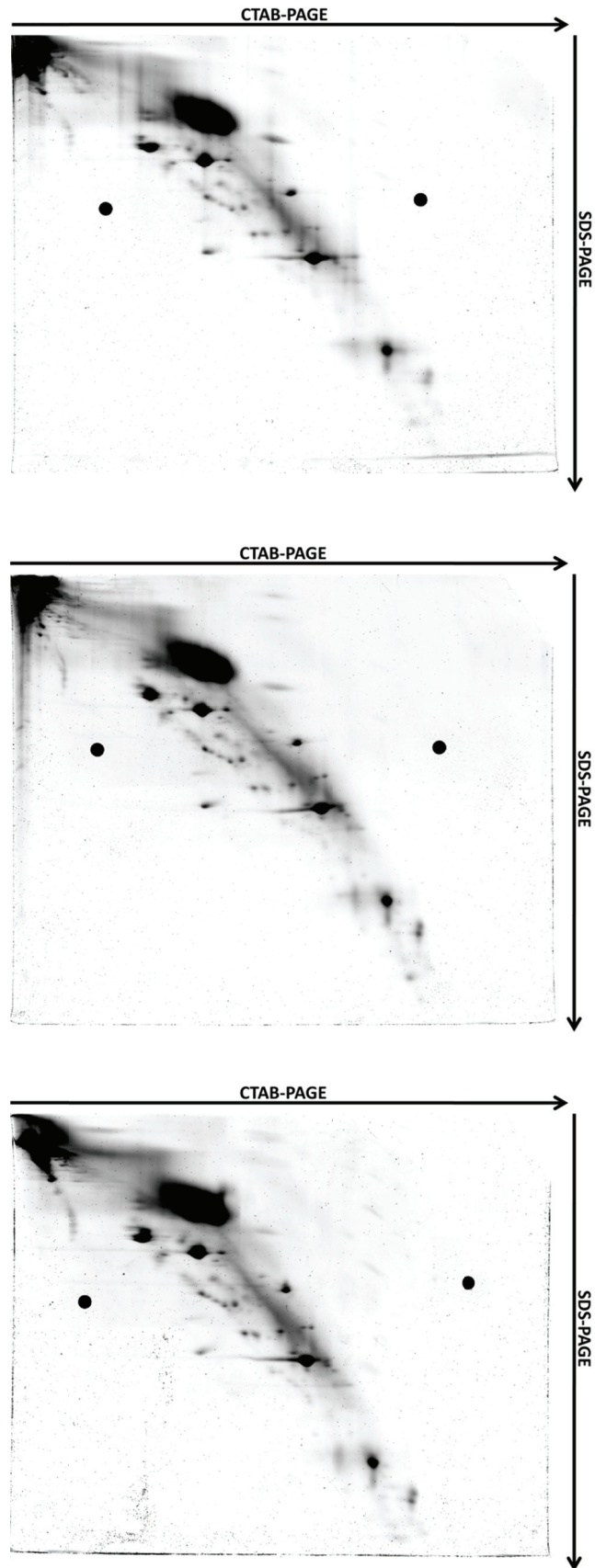


Abb. 34: 2D CTAB/SDS Gele aus den biologischen Replikaten von nicht-infizierten Erythrozyten.

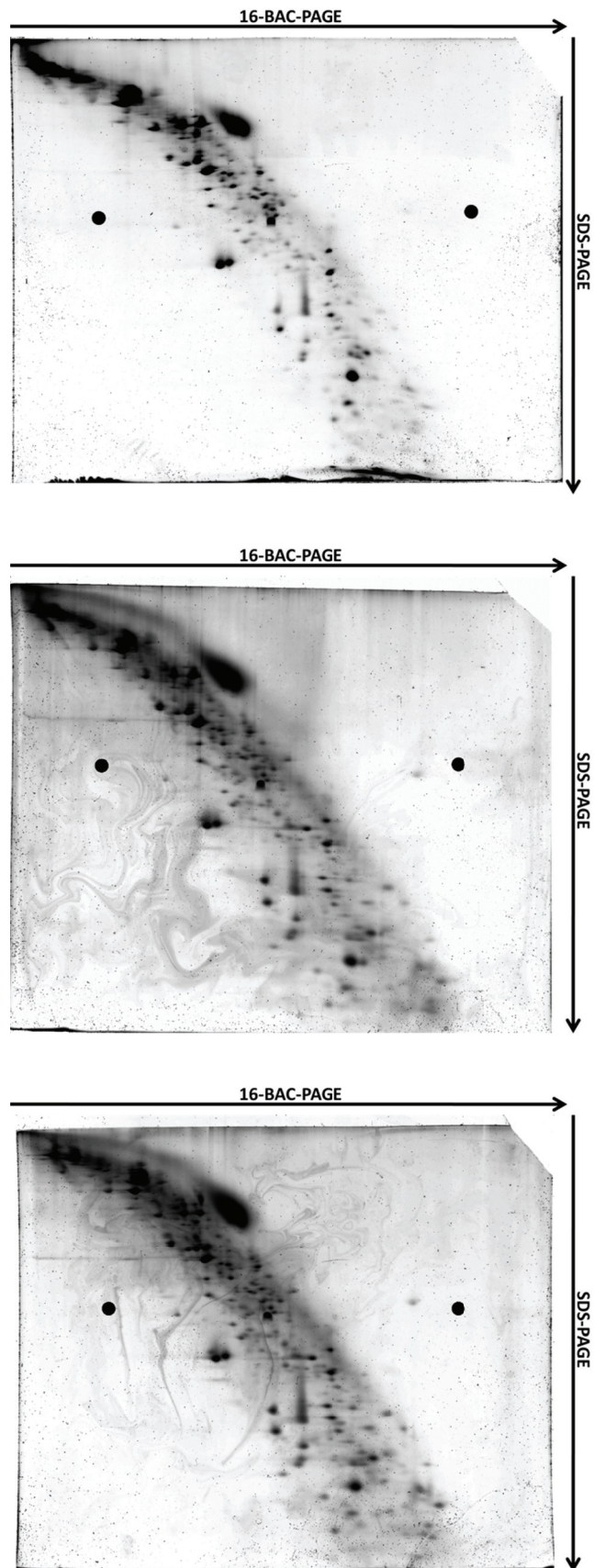


Abb. 35: 2D 16-BAC/SDS Gele aus den biologischen Replikaten von spät-infizierten Erythrozyten.



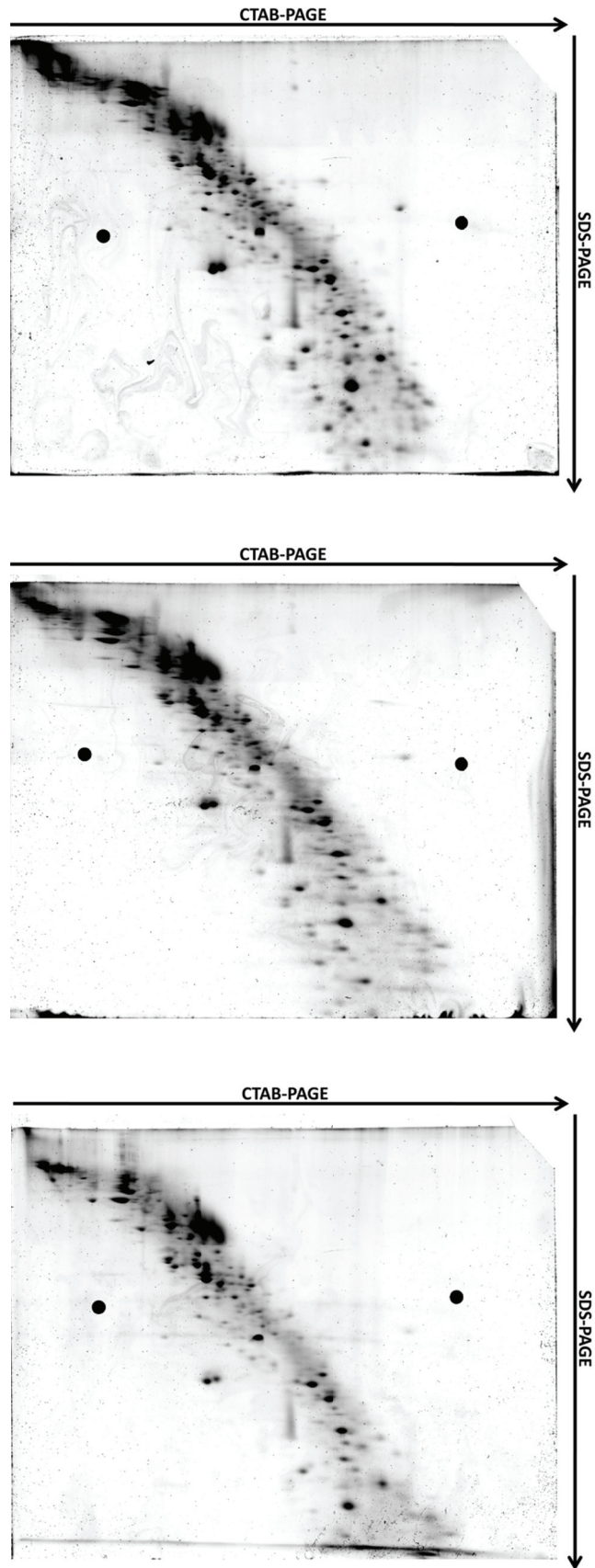


Abb. 36: 2D CTAB/SDS Gele aus den biologischen Replikaten von spät-infizierten Erythrozyten.

Anhang

**Tabelle 5: Identifizierte Proteine der Spots aus dem 2D 16-BAC/SDS Mastergel der nicht-infizierten Erythrozyten.** MW - Molekulargewicht in kDa; % Seq - Sequenzabdeckung in Prozent; M / UM - *matched / unmatched peptides*, x Mal - Häufigkeit der Identifizierung aus drei biologischen Replikaten.

Spot Nr.	Name des identifizierten Proteins	Zugangsnummer	Protein MW	Anzahl Peptide	Protein Score	% Seq	M / UM	x Mal
1	gamma-actin [Homo sapiens]	gi 178045	26147	8	323	48	14; 63	3
2	gamma-actin [Homo sapiens]	gi 178045	26147	13	412	71	18; 59	3
3	Chain P, Crystal Structure Of The Cytoplasmic Domain Of Human Erythrocyte Band-3 Protein [Homo sapiens]	gi 14277739	42623	12	864	44	21; 56	3
4	ACTB protein [Homo sapiens]	gi 15277503	40536	18	879	63	30; 47	3
5	erythrocyte membrane protein band 4.9 isoform 2 [Homo sapiens]	gi 166706881	43118	8	367	26	16; 64	3
6	FLOT1 [Homo sapiens]	gi 48146009	47536	11	230	35	16; 61	3
7	FLOT1 [Homo sapiens]	gi 48146009	47536	12	222	41	17; 60	2
8	glucose transporter glycoprotein [Homo sapiens]	gi 3387905	38140	4	99,7	8	6; 71	2
9	EPB42 protein [Homo sapiens]	gi 68563322	70096	7	254	14	11; 66	2
10	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 3 [Homo sapiens]	gi 260436834	81755	9	120	15	10; 67	2
11	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 4 [Homo sapiens]	gi 42716291	72310	12	326	19	18; 59	2
12	alpha-adducin [Homo sapiens]	gi 559044	73972	10	121	19	14; 63	1
13	Chain A, The Crystal Structure Of The Human Hsp70 Atpase Domain [Homo sapiens]	gi 42543698	42189	6	119	17	7; 70	1
14	EPB42 protein [Homo sapiens]	gi 68563322	70096	11	591	20	17; 60	3
15	EPB42 protein [Homo sapiens]	gi 68563322	70096	23	878	36	31; 46	2
16	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 4 [Homo sapiens]	gi 42716291	72310	14	418	27	20; 57	3

Anhang

17	unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 28714	102013	13	578	21	19; 58	3
18	unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 28714	102013	15	662	22	22; 55	3
19	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 4 [Homo sapiens]	gi 42716291	72310	25	814	36	33; 44	3
20	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 4 [Homo sapiens]	gi 42716291	72310	15	456	27	21; 56	2
21	adducin 2 (beta), isoform CRA_g [Homo sapiens]	gi 119620210	27821	8	107	24	14; 63	3
22	alpha-adducin [Homo sapiens]	gi 559044	73972	6	96,8	10	9; 68	2
23	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) [Homo sapiens]	gi 68563369	102053	26	1160	32	36; 41	3
24	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) [Homo sapiens]	gi 68563369	102053	22	847	30	29; 48	3
25	spectrin, beta, erythrocytic (includes spherocytosis, clinical type I) variant [Homo sapiens]	gi 62088410	269042	22	353	12	29; 48	3
26	ankyrin 1, erythrocytic, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119583646	97526	10	202	11	16; 61	2
27	ankyrin [Homo sapiens]	gi 1845265	204538	23	286	16	28; 49	2
28	ankyrin [Homo sapiens]	gi 178646	207138	33	1090	22	45; 32	3
29	spectrin, beta, erythrocytic (includes spherocytosis, clinical type I), isoform CRA_e [Homo sapiens]	gi 119601285	268560	28	534	13	37; 40	3
30	spectrin, beta, erythrocytic (includes spherocytosis, clinical type I) variant [Homo sapiens]	gi 62088410	269042	35	904	17	46; 31	3
31	spectrin, alpha, erythrocytic 1 (elliptocytosis 2), isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119573203	178906	24	526	19	30; 47	1
32	unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 28714	102013	13	468	19	19; 58	1
32	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) [Homo sapiens]	gi 68563369	102053	23	770	31	29; 48	2
33	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) [Homo sapiens]	gi 68563369	102053	23	779	30	31; 46	3



Anhang

I	erythrocyte membrane protein band 4.9 isoform 2 [Homo sapiens]	gi 166706881	43118	11	90	32	17;60	3
II	erythrocyte membrane protein band 4.9 isoform 1 [Homo sapiens]	gi 166706875	45600	15	344	37	23;54	3
III	palmitoylated membrane protein 1 isoform 1 [Homo sapiens]	gi 4505237	52492	22	550	56	35;42	3
IV	palmitoylated membrane protein 1 isoform 2 [Homo sapiens]	gi 262118255	50409	22	654	54	36;41	3
V	Chain P, Crystal Structure Of The Cytoplasmic Domain Of Human Erythrocyte Band-3 Protein [Homo sapiens]	gi 14277739	42623	16	1030	48	28;49	3
VI	T-complex protein 1 isoform a [Homo sapiens]	gi 57863257	60819	15	113	25	17;60	1
VII	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 4 [Homo sapiens]	gi 42716291	72310	15	267	25	22;55	3
VIII	kell blood group antigen Cellano [Homo sapiens]	gi 113524757	83428	19	262	26	27;50	2
IX	beta I spectrin form betal sigma3 [Homo sapiens]	gi 18481635	117819	23	228	25	30;47	3
X	unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 28714	102013	13	224	16	19;58	3

**Tabelle 6: Identifizierte Proteine der Spots aus dem 2D CTAB/SDS Mastergel der nicht-infizierten Erythrozyten.** MW - Molekulargewicht in kDa; % Seq - Sequenzabdeckung in Prozent; M / UM - *matched / unmatched peptides*, x Mal - Häufigkeit der Identifizierung aus drei biologischen Replikaten.

Spot Nr.	Name des identifizierten Proteins	Zugangsnummer	Protein MW	Anzahl Peptide	Protein Score	% Seq	M / UM	x Mal
1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1) [Homo sapiens]	gi 51094461	17071	9	320	62	14; 63	3
2	aquaporin [Homo sapiens]	gi 3242761	15229	3	149	39	5; 72	3
3	band 7.2b stomatin [Homo sapiens]	gi 1103842	32741	15	360	52	22; 55	1
4	stomatin peptide [Homo sapiens]	gi 181184	31860	24	751	78	40; 37	3

Anhang

5	protein 4.2 (P4.2L) (put.); putative [Homo sapiens]	gi 189434	80808	5	99,2	10	8; 69	1
6	erythrocyte membrane protein band 4.2 isoform 2 [Homo sapiens]	gi 166362737	77816	5	89	8	7; 70	2
7	hypothetical protein [Homo sapiens]	gi 51476352	43149	13	315	41	19; 58	1
8	Chain P, Crystal Structure Of The Cytoplasmic Domain Of Human Erythrocyte Band-3 Protein [Homo sapiens]	gi 14277739	42623	12	170	25	10; 67	3
9	Chain P, Crystal Structure Of The Cytoplasmic Domain Of Human Erythrocyte Band-3 Protein [Homo sapiens]	gi 14277739	42623	12	456	44	20; 57	3
10	Chain P, Crystal Structure Of The Cytoplasmic Domain Of Human Erythrocyte Band-3 Protein [Homo sapiens]	gi 14277739	42623	10	540	40	21; 56	3
11	ACTB protein [Homo sapiens]	gi 15277503	40536	10	278	45	15; 62	2
11	Chain P, Crystal Structure Of The Cytoplasmic Domain Of Human Erythrocyte Band-3 Protein [Homo sapiens]	gi 14277739	42623	14	593	55	25; 52	3
12	ACTB protein [Homo sapiens]	gi 15277503	40536	20	723	68	35; 42	3
13	tropomodulin 1 [Homo sapiens]	gi 4507553	40658	12	353	49	18; 59	3
14	erythrocyte membrane protein band 4.9 isoform 2 [Homo sapiens]	gi 166706881	43118	16	400	63	25; 52	3
15	flotillin 1 [Homo sapiens]	gi 5031699	47554	27	644	58	37; 40	3
16	flotillin 1 [Homo sapiens]	gi 5031699	47554	24	510	54	36; 41	3
17	FLOT2 protein [Homo sapiens]	gi 13277550	42938	18	658	49	28; 49	3
18	glucose transporter glycoprotein [Homo sapiens]	gi 3387905	38140	5	216	16	10; 67	3
19	hypothetical protein [Homo sapiens]	gi 51476352	43149	10	316	35	17; 60	3
20	spectrin, alpha, erythrocytic 1 [Homo sapiens]	gi 115298659	281039	13	225	8	18; 59	3
21	palmitoylated membrane protein 1 isoform 1 [Homo sapiens]	gi 4505237	52492	19	385	55	29; 48	3
21	aging-associated gene 12 [Homo sapiens]	gi 54632179	50022	17	365	53	27; 50	3

Anhang

22	membrane protein, palmitoylated 1, 55kDa, isoform CRA_e [Homo sapiens]	gi 119593065	41203	16	361	69	24; 53	3
23	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 4 [Homo sapiens]	gi 42716291	72310	19	342	34	27; 50	3
24	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 4 [Homo sapiens]	gi 42716291	72310	15	230	23	19; 58	2
25	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 4 [Homo sapiens]	gi 42716291	72310	22	489	36	31; 46	3
26	Chain P, Crystal Structure Of The Cytoplasmic Domain Of Human Erythrocyte Band-3 Protein [Homo sapiens]	gi 14277739	42623	17	703	58	27; 50	3
27	glucose transporter glycoprotein [Homo sapiens]	gi 183303	54425	7	249	15	12; 65	2
28	alpha-adducin [Homo sapiens]	gi 559044	73972	10	106	22	15; 62	3
29	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 4 [Homo sapiens]	gi 42716291	72310	14	213	25	20; 57	3
30	Chain P, Crystal Structure Of The Cytoplasmic Domain Of Human Erythrocyte Band-3 Protein [Homo sapiens]	gi 14277739	42623	6	246	27	11; 66	3
31	heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 variant [Homo sapiens]	gi 62896815	53581	13	260	38	20; 57	3
32	protein 4.2 (P4.2L) (put.); putative [Homo sapiens]	gi 189434	80808	19	551	33	27; 50	3
33	EPB42 protein [Homo sapiens]	gi 68563322	70096	30	907	56	39; 38	3
34	EPB42 protein [Homo sapiens]	gi 68563322	70096	15	520	29	23; 54	3
35	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 4 [Homo sapiens]	gi 42716291	72310	17	330	27	24; 53	3
36	EPB41 protein [Homo sapiens]	gi 110430928	70246	27	629	46	36; 41	3
37	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 4 [Homo sapiens]	gi 42716291	72310	20	341	34	28; 49	3
38	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) [Homo sapiens]	gi 68563369	102053	12	319	20	19; 58	3
39	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) [Homo sapiens]	gi 68563369	102053	25	702	36	35; 42	3

Anhang

40	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) [Homo sapiens]	gi 68563369	102053	28	720	35	38; 39	3
41	adducin 2 isoform b [Homo sapiens]	gi 89276787	62940	15	190	33	21; 56	2
41	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) [Homo sapiens]	gi 68563369	102053	11	205	17	17; 60	3
42	ankyrin [Homo sapiens]	gi 178646	207138	17	136	13	23; 54	1
43	ankyrin 1, erythrocyte splice form 3 [Homo sapiens]	gi 1360744	204518	19	119	15	27; 50	2
44	ankyrin 1, erythrocyte splice form 3 [Homo sapiens]	gi 1360744	204518	16	174	16	21; 56	2
45	ankyrin 1, erythrocyte splice form 3 [Homo sapiens]	gi 1360744	204518	32	510	24	45; 32	3
46	ankyrin 1 isoform 4 [Homo sapiens]	gi 70780353	204476	32	611	28	44; 33	3
47	clathrin, heavy polypeptide (Hc), isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119614803	193703	23	313	18	34; 43	2
48	ankyrin 1 isoform 2 [Homo sapiens]	gi 70780355	189965	35	627	30	47; 30	3
49	spectrin, alpha, erythrocytic 1 [Homo sapiens]	gi 115298659	281039	39	470	25	51; 26	2
50	spectrin beta isoform b [Homo sapiens]	gi 67782319	247171	47	886	29	62; 15	3
51	spectrin beta isoform b [Homo sapiens]	gi 67782319	247171	41	614	23	48; 29	2
I	tropomyosin 3 isoform 2 [Homo sapiens]	gi 24119203	29242	5	104	26	7;70	1
II	erythrocyte membrane protein band 4.9 isoform 1 [Homo sapiens]	gi 166706875	45600	12	256	34	19;58	3
III	adducin 2 isoform b [Homo sapiens]	gi 89276787	62940	17	188	35	24;53	3

Anhang

**Tabelle 7: Identifizierte Proteine der Spots aus dem 2D 16-BAC/SDS Mastergel der spät-infizierten Erythrozyten.** Humane Proteine wurden nicht nach Transmembrandomänen oder Signalpeptiden bioinformatisch durchsucht und besitzen weder eine PlasmoDB Nummer noch ein *host targeting signal*. MW - Molekulargewicht in kDa; % Seq - Sequenzabdeckung in Prozent; M / UM - *matched / unmatched peptides*, TM - Transmembrandomäne; SP - Signalpeptid; HTS - HTS - Häufigkeit der Identifizierung aus drei biologischen Replikaten.

Spot Nr.	Name des identifizierten Proteins	Zugangsnummer	PlasmoDB Nummer	Protein MW	Anzahl Peptide	Protein Score	% Seq	M / UM	TM	SP	HTS	x Mal
1	conserved Plasmodium protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]	gi   124511652	PF07_0007	14243	5	155	33	9; 68	1	nein	nein	1
2	60S ribosomal protein L12, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi   225631678	PFE0850c	18272	5	233	30	8; 69	0	nein	nein	1
3	PSMA2 protein [Homo sapiens]	gi   39644890	/	24968	5	124	22	8; 69	/	/	/	1
4	proteasome subunit alpha type 1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi   124810483	PF14_0716	29219	2	84,1	11	4; 73	0	nein	nein	1
5	Plasmodium exported protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]	gi   124513774	PF13_0275	32877	6	155	21	9; 68	2	nein	ja	2
6	40S ribosomal protein S4, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi   258597201	PF11_0065	29867	6	95,2	22	7; 70	0	nein	nein	1
7	40S ribosomal protein S8e, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi   124808201	PF14_0083	25206	8	280	44	13; 64	0	nein	nein	3
8	stomatin isoform a [Homo sapiens]	gi   38016911	/	31882	10	155	32	15; 62	/	/	/	2
9	proteasome subunit alpha type 1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi   124810483	PF14_0716	29219	2	146	11	4; 73	0	nein	nein	1
10	26S proteasome regulatory subunit S14 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi   124504907	PFC0520w	35651	3	114	11	5; 72	0	nein	nein	1
11	ribosomal phosphoprotein [Plasmodium falciparum]	gi   41059964	PF11_0313	34030	5	193	22	8; 69	0	nein	nein	3
12	Plasmodium exported protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]	gi   124511654	PF07_0008	27713	5	318	36	8; 69	1	nein	nein	3
13	40S ribosomal subunit protein S6 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi   124513570	PF13_0228	35477	8	202	23	9; 68	0	nein	nein	2
14	rhostry-associated protein 3 [Plasmodium falciparum]	gi   21591743	PFE0075c	47232	3	159	9	6; 71	0	ja	nein	2
15	rhostry-associated protein 2 [Plasmodium falciparum]	gi   237665430	PFE0080c	43672	9	163	21	12; 65	0	ja	nein	3

## Anhang

16	conserved Plasmodium protein [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124802266	PF10_0138	173624	5	120	3	8; 69	0	ja	nein	2
17	actin, beta [Homo sapiens]	gi 14250401	/	41321	18	734	57	27; 50	/	/	/	1
18	26S proteasome regulatory subunit [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124512870	PF13_0033	45048	7	122	26	9; 68	0	nein	nein	3
19	60S ribosomal protein L3, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124802670	PF10_0272	44649	9	145	23	16; 64	0	nein	nein	2
20	60S ribosomal subunit protein L4/L1 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124506063	PFE0350c	46525	9	252	23	14; 63	0	nein	nein	3
21	tat-binding protein homolog [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124806952	PFL2345c	49856	12	269	33	17; 60	0	nein	nein	3
22	FLOT1 protein [Homo sapiens]	gi 124504560	/	26348	6	93,3	34	9; 68	/	/	/	1
23	flotillin 2 [Homo sapiens]	gi 94538362	/	47434	6	86,8	19	9; 68	/	/	/	1
24	tropomodulin 1 [Homo sapiens]	gi 55958041	/	26055	2	98,5	20	4; 73	/	/	/	1
25	vacuolar ATP synthase subunit b [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124505265	PF0305c	56095	3	99,5	7	5; 72	0	nein	nein	1
26	26S protease subunit regulatory subunit 6a, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124804380	PF11_0314	49681	6	76	17	9; 68	0	nein	nein	1
27	26S proteasome regulatory subunit 4, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 258596995	PF10_0081	49978	10	236	24	14; 63	0	nein	nein	2
28	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta), isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119617634	/	46276	4	136	16	6; 71	/	/	/	1
29	catalase [Homo sapiens]	gi 13562132	/	59924	12	422	26	19; 58	/	/	/	3
30	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124802093	PF10_0077	63527	11	97,5	19	14; 63	0	nein	nein	3
31	rhoGTP-associated protein 1 [Plasmodium falciparum]	gi 237665398	PF14_0102	89323	14	131	16	17; 60	0	ja	nein	2
32	KIAA0098 protein [Homo sapiens]	gi 58257644	/	61467	4	91,1	7	7; 70	/	/	/	1
32	unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 221046140	/	55770	6	96,4	10	10; 67	/	/	/	2

## Anhang

33	t-complex polypeptide 1 [Homo sapiens]	gi 36796	/	60869	8	179	13	12; 65	/	/	3
34	TCP-1/cpn60 chaperonin family [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124804435	PF11_0331	60565	9	172	25	12; 65	0	nein	2
35	glutamine synthetase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 225631833	PF11110w	64159	9	309	18	16; 61	0	nein	3
36	parasitophorous vacuolar protein 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124804341	PF11_0302	52147	5	161	6	8; 69	0	ja	2
37	T-complex protein eta subunit [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124504829	PFC0350c	60281	4	108	12	6; 71	0	nein	2
38	TCP-1/cpn60 chaperonin family, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124513866	MAL13P1.283	58506	6	146	15	9; 68	0	nein	1
39	Chain P, Crystal Structure Of The Cytoplasmic Domain Of Human Erythrocyte Band-3 Protein	gi 14277739	/	42623	7	202	20	10; 67	/	/	1
40	high molecular weight rhopty protein 3 [Plasmodium falciparum]	gi 221326646	PF10265c	26378	1	125	9	2; 75	0	ja	2
41	myo-inositol 1-phosphate synthase [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124506155	PFE0585c	69639	6	112	10	8; 69	0	nein	1
42	heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 [Homo sapiens]	gi 24234686	/	53598	14	527	37	21; 56	/	/	2
43	Heat shock protein 70 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124506906	PF10875w	72457	14	500	26	18; 58	0	ja	2
44	aminopeptidase [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124507185	PF11570c	66449	8	194	16	11; 66	0	nein	3
45	heat shock 70 kDa protein [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124512406	PF08_0054	74382	14	649	22	21; 56	0	nein	3
46	EPB42 protein [Homo sapiens]	gi 68563322	/	70096	15	572	32	22; 55	/	/	2
47	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124506273	PFE0885w	84517	13	281	17	18; 59	0	nein	1
48	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 4 [Homo sapiens]	gi 42716291	/	72310	13	293	23	17; 60	/	/	3
49	rhopty-associated protein 1 [Plasmodium falciparum]	gi 237665402	PF14_0102	89185	24	248	36	30; 47	0	ja	2
50	translocon component PTEX88 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 258597205	PF11_0067	91243	5	132	11	8; 69	0	ja	1



## Anhang

51	ALDH16A1 protein [Homo sapiens]	gi 27769116	/	51341	5	199	10	9; 68	/	/	/	2
52	CAPN1 protein [Homo sapiens]	gi 49900979	/	82406	7	88,5	9	11; 66	/	/	/	1
53	homologue of human HSPC025 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 86170908	PFF0590c	78593	5	93,3	6	7; 70	2	nein	nein	1
54	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) [Homo sapiens]	gi 68563369	/	102053	15	373	19	21; 56	/	/	/	2
55	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) [Homo sapiens]	gi 68563369	/	102053	18	623		25; 52	/	/	/	2
56	high molecular weight rhoptry protein 3 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124506661	PF10265c	105587	13	276	13	20; 57	0	ja	nein	3
57	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) [Homo sapiens]	gi 68563369	/	102053	13	353	17	18; 59	/	/	/	1
58	merozoite surface protein 9 [Plasmodium falciparum]	gi 237665278	PFL1385c	81396	11	111	16	16; 61	0	ja	nein	2
59	ring-exported protein 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124507253	PF11735c	82991	7	86,3	9	10; 67	1	nein	nein	1
60	coat protein, gamma subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124804850	PF11_0463	125716	5	80,8	5	8; 69	0	nein	nein	1
61	karyopherin beta [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124506397	PFE1195w	128698	6	114	6	9; 68	0	nein	nein	1
62	26S proteasome subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124810234	PF14_0632	133938	10	110	8	16; 61	0	nein	nein	1
63	RhopH1/Clag3.1 [Plasmodium falciparum]	gi 71361250	PFC0120w	169640	14	334	9	22; 55	0	ja	nein	3
64	cytoadherence linked asexual protein (CLAG) [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124507251	PF11730w	161168	16	220	10	24; 53	1	ja	nein	1
65	ankyrin 1 isoform 2 [Homo sapiens]	gi 70780355	/	207334	12	195	10	15; 62	/	/	/	2
66	ankyrin 1, erythrocytic, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119583645	/	190551	30	642	24	42, 35	/	/	/	3
67	spectrin, alpha, erythrocytic 1 [Homo sapiens]	gi 115298659	/	281039	15	258	10	19; 58	/	/	/	3

## Anhang

68	spectrin, beta, erythrocytic (includes spherocytosis, clinical type I), isoform CRA_d [Homo sapiens]	gi 119601284	/	247172	32	687	19	40; 37	/	/	/	3
69	spectrin, beta, erythrocytic (includes spherocytosis, clinical type I), isoform CRA_e [Homo sapiens]	gi 119601285	/	268559	9	128	4	13; 64	/	/	/	1
I	peroxiredoxin 2 isoform a [Homo sapiens]	gi 32189392	/	22049	13	414	53	21; 56	/	/	/	1
II	proteasome subunit MB1 [Homo sapiens]	gi 786582	/	23777	14	501	53	21; 21	/	/	/	1
III	TSA [Homo sapiens]	gi 1617118	/	18486	5	126	35	7; 24	/	/	/	3
IV	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2, isoform CRA_b	gi 119627813	/	20365	5	210	28	8; 22	/	/	/	1
V	proteasome subunit alpha type 5 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124512076	PF07_0112	28712	9	159	48	11; 27	0	nein	nein	1
VI	ribosomal protein S2 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124809606	PF14_0448	30281	9	204	29	12; 27	0	nein	nein	1
VII	DNA/RNA-binding protein Alba, putative	gi 124512500	PF08_0074	27299	11	147	37	15; 40	0	nein	nein	2
VIII	Chain A, Plasmodium Falciparum Lactate Dehydrogenase Complexed With 2-((4-Chloro-[hydroxy(methoxy)methyl]cyclohexyl)amino) Ethane-1,1,2-Triol	gi 71041954	PF13_0141	35213	12	110	32	18; 59	0	ja	nein	1
IX	F-actin capping protein alpha-1 subunit variant [Homo sapiens]	gi 62898013	/	33057	13	245	45	16; 34	/	/	/	1
X	rhostry-associated protein 2 [Plasmodium falciparum]	gi 237665430	PFE0080c	43672	12	120	34	18; 59	0	ja	nein	2
XI	parasite-infected erythrocyte surface protein	gi 124505947	PFE0060w	48747	4	114	15	6; 23	2	ja	ja	1
XII	FLOT2 protein [Homo sapiens]	gi 211827004	/	45494	20	480	51	27; 38	/	/	/	1
XIII	elongation factor 1 alpha [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124513850	PF13_0304	49156	15	233	37	21; 37	0	nein	nein	3
XIV	glucose transporter glycoprotein [Homo sapiens]	gi 3387905	/	38140	6	154	9	8; 19	/	/	/	3
XV	enolase [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124802328	PF10_0155	48989	13	175	34	19; 58	0	nein	nein	1
XVI	Plasmodium exported protein, unknown function	gi 124505193	PF00115c	31114	2	105	9	3; 19	1	nein	ja	1

Anhang

**Tabelle 8: Identifizierte Proteine der Spots aus dem 2D CTAB/SDS Mastergel der spät-infizierten Erythrozyten.** Humane Proteine wurden nicht nach Transmembrandomänen oder Signalpeptiden bioinformatisch durchsucht und besitzen weder eine PlasmoDB Nummer noch ein *host targeting signal*. MW - Molekulargewicht in kDa; % Seq - Sequenzabdeckung in Prozent; M / UM - *matched / unmatched peptides*; TM - Transmembrandomäne; SP - Signalpeptid; HTS - *host targeting signal*; x Mal - Häufigkeit der Identifizierung aus drei biologischen Replikaten.

Spot Nr.	Name des identifizierten Proteins	Zugangsnummer	PlasmoDB Nummer	Protein MW	Anzahl Peptide	Protein Score	% Seq	M / UM	TM	SP	HTS	x Mal
1	ribosomal protein L6 homologue [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124513230	PF13_0129	21759	6	116	27	8; 69	0	nein	nein	2
2	thioredoxin peroxidase 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124809308	PF14_0368	21964	5	84	41	7; 70	0	nein	nein	1
2	TSA [Homo sapiens]	gi 1617118	/	18486	6	179	50	8; 69	/	/	/	1
3	hypothetical protein [Homo sapiens]	gi 31874085	/	28962	4	88	19	6; 71	/	/	/	1
4	60S ribosomal protein L23a [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124513236	PF13_0132	22307	1	100	8	2; 75	0	nein	nein	1
5	PSMA2 protein [Homo sapiens]	gi 39644890	/	24968	5	306	22	9; 68	/	/	/	2
6	translation initiation factor E4 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124504957	PFC0635c	27045	5	96	25	8; 69	0	nein	nein	1
7	proteasome subunit alpha type 2 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 86170740	PFF0420c	26683	6	81	28	8; 69	0	nein	nein	1
8	proteasome subunit [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124513788	PF13_0282	28044	6	124	30	9; 68	0	nein	nein	1
9	proteasome subunit beta type 1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 225631686	PFE0915c	27536	2	86	13	3; 74	0	nein	nein	1
10	proteasome subunit alpha type 5 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124512076	PF07_0112	28712	8	266	48	14; 63	0	nein	nein	1
11	proteasome subunit alpha type 1, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124810483	PF14_0716	29219	3	239	19	5; 72	0	nein	nein	2
12	proteasome component C8 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124504997	PFC0745c	29727	4	119	25	5; 72	0	nein	nein	1
13	Plasmodium exported protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124513774	PF13_0275	32877	9	191	27	11; 66	2	nein	ja	2
14	proteasome subunit alpha, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 225632219	MAL8P1.128	29937	6	217	39	10; 67	0	nein	nein	1

## Anhang

15	stomatin peptide [Homo sapiens]	gi 181184	/	31860	19	535	67	26; 51	/	/	2
16	14-3-3 protein homologue [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124512420	MAL8P1.69	29856	4	153	21	7; 70	0	nein	1
17	40S ribosomal protein S8e, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124808201	PF14_0083	25206	9	364	40	13; 64	0	nein	2
18	protein phosphatase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 258597324	PF11_0281	34838	3	84	17	6; 71	1	nein	1
19	26S proteasome regulatory subunit S14 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124504907	PFC0520w	35651	4	260	22	6; 71	0	nein	1
20	exported protein 2 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124810348	PF14_0678	33619	8	224	22	12; 65	0	ja	1
21	ribosomal phosphoprotein [Plasmodium falciparum]	gi 41059964	PF11_0313	34030	9	273	40	12; 65	0	nein	1
22	Plasmodium exported protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124511654	PF07_0008	27713	4	340	30	7; 70	1	nein	2
23	40S ribosomal subunit protein S6 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124513570	PF13_0228	35477	2	154	8	3; 74	0	nein	1
24	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124810131	PF14_0598	37068	8	172	27	11; 66	0	nein	2
25	proteasome regulatory subunit [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124514070	MAL13P1.343	35360	5	133	19	8; 69	0	nein	1
26	ribosomal phosphoprotein [Plasmodium falciparum]	gi 39722357	PF11_0313	34070	18	723	74	27; 50	0	nein	2
27	PSMD7 protein [Homo sapiens]	gi 33875323	/	37313	4	84	15	10; 67	/	/	1
28	rho-try-associated protein 3 [Plasmodium falciparum]	gi 237665438	PFE0075c	44412	8	211	21	14; 63	0	ja	2
29	rho-try-associated protein 2 [Plasmodium falciparum]	gi 237665430	PFE0080c	43672	10	294	26	13; 64	0	ja	2
30	rho-try-associated protein 2 [Plasmodium falciparum]	gi 237665418	PFE0080c	41751	7	88	21	9; 68	0	ja	1
31	26s proteasome aaa-ATPase subunit Rpt3 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124505405	PFD0665c	44753	14	321	46	19; 58	0	nein	2
32	26S proteasome regulatory subunit [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124512870	PF13_0033	45048	7	103	25	11; 66	0	nein	1

## Anhang

33	60S ribosomal protein L3, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124802670	PF10_0272	44649	13	236	27	18, 59	0	nein	nein	2
34	60S ribosomal subunit protein L4/L1 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124506063	PFE0350c	46525	13	529	39	18; 59	0	nein	nein	2
35	conserved Plasmodium protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124513666	MAL13P1.237	42475	10	405	37	15; 62	0	nein	nein	1
36	Actin-1 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 113224	PFL2215w	42044	6	309	26	10; 67	0	nein	nein	2
36	tropomodulin 1 [Homo sapiens]	gi 55958041	/	26055	2	100	11	4; 73	/	/	/	1
37	Actin, cytoplasmic 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 113271	PFL2215w	42163	21	1030	59	32; 45	0	nein	nein	2
38	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, neinn-ATPase, 6, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119585829	/	52346	10	210	22	13; 64	0	nein	nein	1
39	golgi organization and biogenesis factor, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124505497	PFD0880w	51169	10	220	22	14; 63	0	nein	nein	1
40	skeleton binding protein 1 [Plasmodium falciparum]	gi 8247506	PFE0065w	36721	5	97	22	7; 70	1	nein	nein	1
41	proteasome 26S neinn-ATPase subunit 11 [Homo sapiens]	gi 28872725	/	47719	4	121	16	6; 71	0	nein	nein	1
42	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 [Homo sapiens]	gi 3023911	/	43261	2	111	5	4; 73	/	/	/	1
43	FLOT1 [Homo sapiens]	gi 48146009	/	47536	8	219	26	12; 65	/	/	/	2
44	tat-binding protein homolog - malaria parasite [Plasmodium falciparum]	gi 1078797	PFL2345c	49860	17	449	39	23; 54	0	nein	nein	2
45	HSP40, subfamily A, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124809271	PF14_0359	49180	6	86	19	7; 70	0	nein	nein	1
46	rhoptry-associated leucine zipper-like protein 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124511980	MAL7P1.119	88281	4	118	5	5; 72	0	ja	nein	1
47	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta), isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119617634	/	46276	9	415	26	13; 64	/	/	/	1
48	merozoite capping protein-1 [Plasmodium falciparum]	gi 3242986	PF10_0268	37701	3	108	12	4; 73	0	nein	nein	1
49	glucose transporter glycoprotein [Homo sapiens]	gi 3387905	/	38140	3	102	6	5; 72	/	/	/	1

## Anhang

49	26S protease subunit regulatory subunit 6a, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124804380	PF11_0314	49681	9	140	21	12; 65	0	nein	nein	2
50	26s proteasome subunit p55, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124802396	PF10_0174	55744	8	131	19	11; 66	0	nein	nein	2
51	Plasmodium exported protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124505193	PF00115c	31114	4	159	15	6; 71	1	nein	ja	1
52	Chain P, Crystal Structure Of The Cytoplasmic Domain Of Human Erythrocyte Band-3 Protein	gi 14277739	/	42623	12	483	39	18; 59	/	/	/	2
53	TCP-1/cpn60 chaperonin family, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124513866	MAL13P1.283	58506	4	142	16	6; 71	0	nein	nein	1
53	glucose transporter glycoprotein [Homo sapiens]	gi 3387905	/	38140	2	102	6	4; 73	/	/	/	1
54	glucose transporter glycoprotein [Homo sapiens]	gi 3387905	/	38140	3	123	6	5; 72	/	/	/	1
55	26S proteasome regulatory subunit 4, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 258596995	PF10_0081	49978	12	343	32	16; 61	0	nein	nein	2
56	PRP19-like protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124504835	PFC0365w	61116	5	115	14	8; 61	0	nein	nein	1
57	catalase [Homo sapiens]	gi 4557014	/	59947	16	812	29	24; 53	/	/	/	2
58	Plasmodium exported protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124505883	PFA0630c	64651	6	134	10	9; 68	2	nein	ja	2
59	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124802093	PF10_0077	63527	14	539	27	20; 57	0	nein	nein	2
60	rhoptyr-associated protein 1 [Plasmodium falciparum]	gi 237665416	PF14_0102	89236	15	290	25	21; 56	0	ja	nein	1
61	chaperonin containing TCP1, subunit 6A isoform a [Homo sapiens]	gi 4502643	/	58444	7	110	19	10; 67	/	/	/	1
62	KIAA0098 protein [Homo sapiens]	gi 58257644	/	61467	7	227	21	11; 66	/	/	/	1
63	TCP-1/cpn60 chaperonin family [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124804435	PF11_0331	60565	6	340	18	10; 67	0	nein	nein	2
64	glutamate--ammonia ligase (glutamine synthetase) [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124507000	PF11110w	50300	7	189	17	11; 66	0	nein	nein	1
64	glucose transporter glycoprotein [Homo sapiens]	gi 3387905	/	38140	5	126	16	7; 70	/	/	/	1

## Anhang

65	parasitophorous vacuolar protein 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124804341	PF11_0302	52147	4	200	7	6; 71	0	ja	nein	2
65	glucose transporter glycoprotein [Homo sapiens]	gi 3387905	/	38140	4	97,5	8	7; 70	/	/	/	1
66	T-complex protein subunit [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124504829	PFC0350c	60281	5	125	19	7; 70	0	nein	nein	1
67	vacuolar ATP synthase catalytic subunit a [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124512982	PF13_0065	69160	7	132	15	11; 66	0	nein	nein	2
68	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 [Homo sapiens]	gi 121753	/	50087	3	86	9	5; 72	/	/	/	1
69	conserved Plasmodium protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124808620	PF14_0191	59998	6	310	22	10; 67	0	nein	nein	2
70	conserved Plasmodium protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124802266	PF10_0138	173624	4	111	3	6; 71	0	ja	nein	2
71	homologue of human HSPC025 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 86170908	PFF0590c	78593	5	89	12	7; 70	2	nein	nein	1
72	PRP19-like protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124504835	PFC0365w	61116	5	115	14	8; 69	0	nein	nein	1
73	Heat shock protein [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124506906	PF10875w	72457	12	323	28	16; 61	0	ja	nein	1
73	heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 variant [Homo sapiens]	gi 62896815	/	53581	8	232	20	11; 66	/	/	/	1
74	heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 variant [Homo sapiens]	gi 62896815	/	53581	17	749	43	23; 54	/	/	/	3
75	aminopeptidase [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124507185	PF11570c	66449	10	476	22	16; 61	0	nein	nein	2
76	conserved hypothetical protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124513440	PF13_0192	75796	3	140	9	6; 71	1	nein	nein	1
77	heat shock 70 kDa protein [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124512406	PF08_0054	74382	18	984	29	27; 50	0	nein	nein	3
78	EPB42 protein [Homo sapiens]	gi 68563322	/	70096	21	845	37	29; 48	/	/	/	3
79	high molecular weight rhopty protein 3 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124506661	PF10265c	105587	13	276	13	20; 57	0	ja	nein	1



## Anhang

80	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124506273	PFE0885w	84517	10	366	15	16; 61	0	nein	nein	2
80	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 4 [Homo sapiens]	gi 42716291	/	72310	15	241	23	19; 58	/	/	/	2
81	rhoptry-associated protein 1 [Plasmodium falciparum]	gi 237665416	PF14_0102	89236	19	374	29	27; 50	0	ja	nein	3
82	CAPN1 protein [Homo sapiens]	gi 49900979	/	82406	11	179	14	15; 62	/	/	/	3
83	transglutaminase 2 isoform a [Homo sapiens]	gi 39777597	/	78420	5	187	10	8; 69	/	/	/	1
84	cysteine-rich surface protein [Plasmodium falciparum]	gi 238630326	PF13_0338	93496	9	190	17	13; 64	1	ja	nein	3
85	aldehyde dehydrogenase 16 family, member A1 isoform 1 [Homo sapiens]	gi 223972651	/	86100	19	719	27	27; 50	/	/	/	3
86	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 6 [Homo sapiens]	gi 4758274	/	66756	17	562	26	25; 52	/	/	/	3
87	Plasmodium exported protein (PHISTc), unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124512142	MAL7P1.172	103233	8	85	18	11; 66	1	nein	ja	1
88	ring-exported protein 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124507253	PF11735c	82991	10	195	10	15; 62	1	nein	nein	3
89	merozoite surface protein 9 [Plasmodium falciparum]	gi 237665272	PFL1385c	83094	14	418	23	18; 59	0	ja	nein	3
90	cell division cycle protein 48 homologue [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 86171278	PFF0940c	90690	8	211	14	12; 65	0	nein	nein	3
91	heat shock protein 101, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124803903	PF11_0175	103038	12	145	14	15; 62	0	ja	nein	1
92	heat shock protein 86 [Plasmodium falciparum]	gi 505340	PF07_0029	86770	7	123	12	10; 67	0	nein	nein	2
93	cysteine-rich surface protein [Plasmodium falciparum]	gi 238630326	PF13_0338	93496	9	182	12	13; 64	1	ja	nein	1
93	solute carrier family 4 anion exchanger member 1 variant [Homo sapiens]	gi 89513702	/	101978	5	82	8	6; 71	/	/	/	1
93	proteasome 26S regulatory subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 258596875	PFB0260w	109373	6	112	8	8; 69	0	nein	nein	2
94	sortilin, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124809739	PF14_0493	103289	5	305	10	8; 69	2	nein	nein	2

Anhang

95	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) [Homo sapiens]	gi 685633369	/	102053	17	693	21	25; 52	/	/	3
96	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) [Homo sapiens]	gi 685633369	/	102053	17	573	21	25; 52	/	/	3
97	high molecular weight rhopty protein 3 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124506661	PF10265c	105587	26	752	29	36; 41	0	ja	3
97	solute carrier family 4 anion exchanger member 1 variant [Homo sapiens]	gi 89513702	/	101978	14	245	16	19; 58	/	/	3
98	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) [Homo sapiens]	gi 685633369	/	102053	14	260	21	17; 50	/	/	3
98	karyopherin beta [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124506397	PFE1195w	128698	6	158	11	11; 66	0	nein	3
99	merozoite surface protein 9 [Plasmodium falciparum]	gi 237665280	PFL1385c	83199	7	190	14	9; 68	0	ja	2
99	beta subunit of coatomer complex [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124506671	PF10290c	119595	4	89	6	7; 70	0	nein	1
100	ring-exported protein 1 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124507253	PF11735c	82991	8	228	7	12; 65	1	nein	1
101	polyadenylate-binding protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124806145	PFL1170w	97455	10	223	18	17; 60	0	nein	2
102	high molecular weight rhopty protein-2 [Plasmodium falciparum]	gi 27414156	PF11445w	163587	23	450	18	32; 45	0	ja	2
103	conserved Plasmodium protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124512554	PF08_0091	144544	10	232	11	15; 62	0	ja	1
104	26S proteasome subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124810234	PF14_0632	133938	14	293	12	20; 57	0	nein	1
105	26S proteasome subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124810234	PF14_0632	133938	13	300	14	19; 58	0	nein	2
105	ring-infected erythrocyte surface antigen [Plasmodium falciparum]	gi 9961	PFA0110w	88228	5	78,5	5	7; 70	0	nein	1
106	RhopH1/Ctag3.1 [Plasmodium falciparum]	gi 71361250	PFC0120w	169640	28	765	18	39; 38	0	ja	2

Anhang

107	high molecular weight rhoptry protein-2 [Plasmodium falciparum]	gi 27414156	PF11445w	163587	19	295	16	25; 52	0	ja	nein	2
108	high molecular weight rhoptry protein-2 [Plasmodium falciparum]	gi 27414156	PF11445w	163587	25	656	23	33; 44	0	ja	nein	2
109	cytoadherence linked asexual protein clag9 [Plasmodium falciparum]	gi 9887361	PF11730w	75129	9	141	15	12; 65	1	ja	nein	1
110	QF122 antigen [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124802200	PF10_0115	132002	9	219	8	13; 64	0	nein	nein	2
111	QF122 antigen [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124802200	PF10_0115	132002	12	256	11	18; 59	0	nein	nein	2
112	spectrin, beta, erythrocytic (includes spherocytosis, clinical type I), isoform CRA_e [Homo sapiens]	gi 119601285	/	268560	36	754	19	44; 33	/	/	/	1
113	ankyrin 1, erythrocyte splice form 3 [Homo sapiens]	gi 1360744	/	204518	29	489	23	37; 40	/	/	/	3
114	ankyrin 1, erythrocytic, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119583645	/	190551	21	390	21	29; 48	/	/	/	3
115	spectrin, alpha, erythrocytic 1 [Homo sapiens]	gi 115298659	/	281039	24	328	10	31; 46	/	/	/	2
116	spectrin, beta, erythrocytic (includes spherocytosis, clinical type I), isoform CRA_d [Homo sapiens]	gi 119601284	/	247172	36	903	21	45; 32	/	/	/	3
I	60S ribosomal protein L12, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 225631678	PFE0850c	18272	12	252	64	16; 61	0	nein	nein	1
II	60S ribosomal subunit protein L18 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124513556	PF13_0224	21847	16	203	64	22; 55	0	nein	nein	2
III	60S ribosomal protein L15, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 225631638	PF00770c	24290	13	219	40	21; 56	0	nein	nein	2
IV	60S ribosomal protein L13 [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124512504	PF08_0075	25539	8	235	37	12; 65	0	nein	nein	3
V	RESA-like protein, truncated [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 124505615	PF01170c	36224	7	120	22	14; 63	0	nein	ja	2
VI	40S ribosomal protein S4, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 258597201	PF11_0065	29867	18	487	48	25; 52	0	nein	nein	2
VII	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119588883	/	34218	8	120	34	13; 64	/	/	/	1
VIII	DNA/RNA-binding protein Alba, putative	gi 124512500	PF08_0074	27299	11	228	42	14; 63	0	nein	nein	2

Anhang

IX	60S ribosomal protein L7-3, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	gi 258597720	PF14_0231	32946	10	144	33	15; 62	0	nein	nein	2
X	Plasmodium exported protein (PHISTc), unknown function	gi 124512744	PF08_0137	147208	24	289	18	35; 42	1	nein	nein	2
XI	Plasmodium exported protein (PHISTc), unknown function	gi 124512744	PF08_0137	147208	27	281	19	37; 40	1	nein	nein	2