

Marvin Christian Haag

Dr. med.

## **Application of redox-sensitive green fluorescent protein to quantify the redox state of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells**

Fach/Einrichtung: Infektiologie

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Michael Lanzer

Der veränderte Redox-Metabolismus von mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten stellt einen entscheidenden Aspekt der Wirt-Parasit-Biologie dar, da seine Untersuchung potenzielle Medikamentenziele aufdecken und dabei helfen kann, den Schutzmechanismus vor Malaria zu verstehen, der durch mehrere genetische Polymorphismen in roten Blutkörperchen vermittelt wird. Jüngste Fortschritte in der Redoxbiologie ermöglichten *in-vivo*-Beobachtungen von Thiolenzymwechselwirkungen und Proteindisulfidbildung auf der Ebene einzelner Zellen mit genetisch kodierten Redoxsensoren. Während diese Sensoren erfolgreich in Hefen, menschlichen Zelllinien und *Plasmodium falciparum* eingesetzt wurden, sind bestimmte zelluläre Unterkompartimente bisher unbeurteilt geblieben. Aufgrund mehrerer struktureller Besonderheiten in der Architektur sowohl des parasitären Exportwegs als auch der Wirtszelle ist die Anwendung eines Redoxsensors wie roGFP2 in infizierten roten Blutkörperchen schwieriger als die Expression in anderen zellulären Loci. Die Arbeit widmet sich der Frage, ob redoxempfindliche grün fluoreszierende Proteine (roGFPs) in diesem Kompartiment sinnvoll zur Anwendung gebracht werden können, welche Verbesserungen der Methode vorgenommen werden können, und ob mögliche Schlussfolgerungen für die Parasit-Wirt-Wechselwirkung und deren Redoxbiologie gezogen werden können.

Die transiente Expression und der Export über den Sekretionsweg von *Plasmodium falciparum* wird durch Fusion von roGFP2 mit einem N-terminalen Fragment des ‘*Plasmodium* export element’ (PEXEL)-Sequenz tragenden ‘Subtelomeric variable open reading frame’ (STEVOR)-Proteins erreicht. Ergebnisse der Spinning-Disk-Lebendzell-Mikroskopie zeigen, dass zwar eine Vielzahl von roGFP-Varianten in das Kompartiment infizierter roter Blutkörperchen exportiert werden können, die Gesamtintensität der Fluoreszenz jedoch deutlich geringer ausfällt als im Zytoplasma von *P. falciparum*. In einigen Fällen verbleibt ein erheblicher Teil des fluoreszierenden Proteins in der parasitophoren Vakuole. Dies erfordert einen alternativen Ansatz zur Messung des Oxidationsgrades von roGFP2. Es wird ein vereinfachtes Verfahren angewandt, welches nur den fluoreszierenden Kanal mit dem stärkeren Signal verwendet. Zusätzliche Optimierungen auf der Ebene der Expression (unter Verwendung des stärkeren Expressionsvektors pHH2) und der Proteinfaltung (unter Verwendung der Superfolder-Mutationen) werden als Maßnahmen zur Erhöhung der Gesamtausbeute an fluoreszierendem Protein in den infizierten roten Blutkörperchen getestet. Darüber hinaus werden technische Optimierungen der Bilderfassung und der digitalen Bildauswertung implementiert.

Die auf diese Weise etablierte Einkanalanalyse kann unterschiedliche Oxidationsgrade des exportierten Proteins STEVOR<sup>1-80</sup>\_roGFP2 sowohl innerhalb einer einzelnen infizierten Zelle

als auch über den Entwicklungszyklus von *P. falciparum* auflösen. Während sich der Sensor im parasitären Ringstadium in einem weitgehend reduzierten Zustand befindet (mittlerer Oxidationsgrad von roGFP2: 16,9%;  $E_{\text{roGFP2}} = -316$  mV), scheint er im Trophozoiten- und Schizonten-Stadium in einem signifikant stärker oxidierten Zustand zu sein (mittlerer Oxidationsgrad von roGFP2: 68,7%;  $E_{\text{roGFP2}} = -285$  mV). Unter der Annahme, dass die nicht fusionierte Version von roGFP2 auch in infizierten Erythrozyten den Oxidationsgrad von Glutathion widerspiegelt, legen die Ergebnisse nahe, dass (1) wie in anderen zytosolischen Kompartimenten oxidiertes Glutathion nur in nanomolaren Konzentrationen vorhanden ist; (2) in Übereinstimmung mit zuvor veröffentlichten Ergebnissen die Infektion mit *P. falciparum* zu einer Störung der Glutathion-Homöostase des Parasiten führt und (3) dieser veränderte Fluss entweder zu einem Nettoverlust an reduziertem Glutathion oder zu einem Anstieg nanomolarer Mengen an oxidiertem Glutathion führt. Eine alternative Interpretation der Ergebnisse ginge von einer direkten Oxidation von roGFP2 durch eine Thiolperoxidase (bspw. hPrx2) aus. Der Vergleich von infizierten Erythrozyten vom Wildtyp (HbAA) und mit Sichelzellgeneträgerschaft (HbAS) hingegen zeigt sowohl im Trophozoitenstadium als auch über den gesamten Entwicklungszyklus hinweg keine Unterschiede in den jeweiligen Oxidationsgraden von roGFP2. Dies deutet darauf hin, dass das vermutete Redox-Ungleichgewicht der Sichelzellgen tragenden Erythrozyten im Kontext einer Infektion mit *P. falciparum* nicht das Glutathion-system betrifft.

Die Etablierung einer modifizierten Methode der Anwendung von roGFP2 ermöglicht somit die Untersuchung dieses Unterkompartiments mit neuen biochemischen Instrumenten und ebnet den Weg für weitere detaillierte Untersuchungen von Redox-Phänomenen in mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten.