



Bachelorthesis

Vor- und Zuname
Thi Huyen Trang Nguyen



Titel:
Analyse der Interaktion zweier *Plasmodien*-Arten mit humanen
Endothelzellrezeptoren

Abgabedatum:
13.09.2021

Betreuende/r Professor: Herr Prof. Dr. Jörg Andrä

Zweite/r Prüfende/r: Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus

Fakultät Life Sciences

Department Biotechnologie

Studiengang:

Biotechnologie

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Protozoologie unter Anleitung von Prof. Dr. Iris Bruchhaus am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin angefertigt.

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Jörg Andrä
Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences
Department Biotechnologie
Ulmenliet 20, 21033 Hamburg

- 2. Gutachter:** Prof. Dr. Iris Bruchhaus
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Arbeitsgruppe Protozoologie
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Thi Huyen Trang Nguyen, an Eides statt, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbst verfasst und keine andern als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hamburg, 13. September 2021

Thi Huyen Trang Nguyen

Zusammenfassung / Abstract

Malaria ist eine parasitäre Infektionskrankheit, die von Protozoen der Gattung *Plasmodium* hervorgerufen wird. Diese werden durch die weibliche *Anopheles*-Mücken übertragen. Malaria verursachte im Jahr 2019 weltweit etwa 409.000 Todesfälle. Die Zytoadhäsion ist einer der wesentlichen Pathogenitätsfaktoren bei der *P. falciparum* und wahrscheinlich auch bei der *P. vivax*-Infektion.

P. vivax besitzt eine Multigenfamilie, welche als *vir*-Genfamilie (engl. *variant interspersed repeats*) bezeichnet wird. Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass die *vir*-kodierte VIR-Proteine an der Adhäsion an Endothelzellrezeptoren beteiligt sind (Bernabeu *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2010). Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher das Zytoadhäsionsverhalten der VIR-Proteine von *P. vivax* an die humanen Endothelzellrezeptoren CD36 und ICAM-1 mittels statischen Bindungsversuch charakterisiert. Unter Verwendung von transgenen CHO-Zellen, die CD36 oder ICAM-1 an ihrer Oberfläche präsentieren und von transgenen *P. falciparum*-Zelllinien wurden fünf VIR-Proteine untersucht. Im Vergleich zu der Bindungskapazität der Stammkultur wurde bei den fünf untersuchten VIR-Proteinen eine signifikante Bindung an CD36, jedoch nicht an ICAM-1 nachgewiesen.

Von den 5 Arten der Malariaparasiten ist *P. falciparum* weltweit für eine erhebliche Anzahl der Todesfälle verantwortlich. Hierbei spielt die Zytoadhäsion der infizierten Erythrozyten (iE) über an der Erythrozytenoberfläche präsentierten *Pf*EMP1-Proteine an Endothelzellrezeptoren eine entscheidende Rolle. In einer vorangegangenen Studie wurde als Bindungspartner des Endothelzellrezeptors P-Selektin das *Pf*EMP1 IT4_var02 identifiziert. Allerdings ist die die Zytoadhäsion vermittelnde Domäne noch nicht identifiziert. Mit Hilfe der sieben rekombinant-exprimierten-*Pf*EMP1-var02-Domänen, wurde die Bindung an die Rezeptoren CD36, CD9, CD151, ICAM-1 und P-Selektin untersucht. Dabei wurde für alle sieben *Pf*EMP1-var02-Domänen keine signifikante Bindung an CD151 und ICAM-1 beobachtet. An P-Selektin zeigten die DBL α 1.5-, CIDR δ 1-, DBL γ 12-, DBL δ 5-, CIDR β 3- und DBL β 9-Domänen eine signifikante Bindung, während die DBL α 1.5-, CIDR δ 1-, DBL δ 5- und CIDR β 3-Domänen an CD9 adhären konnten. An CD36 konnten alle sieben *Pf*EMP1-var02-Domänen signifikant binden.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Malaria	1
1.2	Der Lebenszyklus von <i>Plasmodien</i>	1
1.3	<i>P. falciparum</i>	3
1.3.1	Die Zytoadhäsion von <i>P. falciparum</i>	3
1.3.2	Die <i>var</i> -Genfamilie und PfEMP1	4
1.4	<i>P. vivax</i>	5
1.4.1	Die Zytoadhäsion von <i>P. vivax</i>	5
1.4.2	Die <i>vir</i> -Genfamilie und VIR-Proteine	5
1.5	Zielsetzung	6
2	Methoden	7
2.1	Material	7
2.1.1	Geräte	7
2.1.2	Software	8
2.1.3	Gebrauchsmaterialien	8
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	9
2.1.5	Kits	10
2.1.6	Antikörper	11
2.1.7	Primer	11
2.1.8	Restriktionsendonukleasen	12
2.1.9	<i>E. coli</i> -Stämme	12
2.1.10	CHO-Zelllinien	13
2.1.11	<i>P. falciparum</i> -Stämme	13
2.1.12	Lösungen, Puffer und Medien	13
2.2	Zellbiologische Methoden	16
2.2.1	<i>P. falciparum</i> Zellkultur	16

2.2.2	CHO-Zellkultur	18
2.3	Molekularbiologische Methoden	19
2.3.1	Restriktionsverdau	19
2.3.2	Agarosegel-Elektrophorese	20
2.3.3	Ethanol-fällung	20
2.3.4	Immunfluoreszenzanalyse (IFA)	21
2.3.5	Statischer Bindungsversuch der der VIR-Proteine mit humanen Rezeptoren....	21
2.3.6	Bindung der PfEMP1-var02-Domänen an Ni-Beads und die Reinigung.....	23
2.3.7	Bindungsversuch der sieben an Ni-Beats gebundenen PfEMP1-var02-Domänen an Endothelzellrezeptoren	24
2.3.8	Rekombinante Expression der verschiedenen PfEMP1-Domänen des var02-Genes in <i>E. coli</i>	26
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Untersuchung der VIR-Proteine von <i>P. vivax</i>	32
3.1.1	Nachweis der Expression von transfizierten VIR-Proteinen in <i>P. falciparum</i> -Zelllinien.....	32
3.1.2	Untersuchung des Bindungsverhaltens von VIR-Proteinen an die humanen Endothelzellrezeptoren CD36 und ICAM-1 mittels einer statischen Bindungsanalyse...	37
3.1.3	Die Ähnlichkeit der Proteinsequenzhomologie der gebundenen VIR-Proteine.	39
3.2	Identifizierung der für die Bindung an die Rezeptoren CD36, CD9, CD151 und P-Selektin verantwortliche Domäne des PfEMP1 Proteins IT4_var02	40
3.2.1	Die statischen Bindungsversuche der PfEMP1-var02-Domänen mit den Endothelzellrezeptoren CHO-CD9, CHO-CD36, CHO-P-Selektin.....	41
3.2.2	Die statischen Bindungsversuche der PfEMP1-var02-Domänen an die Endothelzellrezeptoren CD151 und ICAM-1.....	43
4	Diskussion	45
4.1	Die Untersuchung der Zytoadhäsion von <i>P. falciparum</i> VIR-Transfektanten an die Endothelzellrezeptoren unter statischen Bedingungen.....	45

4.1.1	Bindungseigenschaft der exportierten VIR-Proteine an den Endothelzellrezeptor CD36	45
4.1.2	Die Bindungseigenschaft der exportierten VIR-Proteine an den Endothelzellrezeptor ICAM-1	49
4.2	Identifizierung der Bindungseigenschaften zwischen den Domänen von IT4_var02 und den Rezeptoren ICAM-1, CD36, CD9, CD151 und P-Selektin mittels Ni-Bead-Assays	50
4.2.1	Die Interaktion zwischen den Rezeptoren ICAM-1, CD151 und den sieben PfEMP1-var02-Domänen	51
4.2.2	Die Interaktion zwischen den Rezeptoren P-Selektin und CD9 und den 7 Domänen von IT4_var02	52
4.2.3	Die Interaktion zwischen dem Rezeptor CD36 und den 7 Domänen von IT4_var02	53
5	Danksagung	9

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CHO	engl. <i>chinese hamster ovary</i>
CIDR	engl. <i>cystein-rich interdomain region</i>
CSA	engl. <i>Chondroitin sulfate A</i>
DBL	engl. <i>Duffy binding like</i>
DC	Domänenkassette
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPCR	engl. <i>endothelial protein C receptor</i>
<i>et al.</i>	lat. et alii= und andere
g	Gramm
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GOI	engl. <i>gene of interest</i>
His	Histidin
ICAM-1	engl. <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
iE	infizierte Erythrozyten
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
iR	infizierte Retikulozyten
L	Liter
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
M	molare Masse
MFS	engl. <i>malaria freezing solution</i>
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MTS	engl. <i>malaria thawing solution</i>
Ni	Nickel
NTA	Nitrilotriessigsäure

OD	Optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PES	putatives positives Exportsignal
PEXEL	engl. <i>Plasmodium falciparum export element</i>
<i>PfEMP1</i>	engl. <i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
pH	lat. <i>Potentia hydrogenii</i> (Wasserstoffanteil)
<i>rif</i>	engl. <i>repetitive interspersed family</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SP	Signalpeptid
<i>stevor</i>	engl. <i>subtelomeric variable open reading frame</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE	TRIS-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
<i>var</i>	engl. <i>variant gene</i>
<i>vir</i>	engl. <i>variant interspersed repeats</i>
VSA	engl. <i>variant surface antigens</i>
w/v	Gewicht/Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
x g	Erdbeschleunigung
α	Anti
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	engl. cluster of differentiation
CHO	engl. chinese hamster ovary
CIDR	engl. cystein-rich interdomain region
CSA	engl. Chondroitin sulfate A
DBL	engl. Duffy binding like
DC	Domänenkassette
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPCR	engl. endothelial protein C receptor
et al.	lat. et alii= und andere
g	Gramm
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GOI	engl. gene of interest
His	Histidin
ICAM-1	engl. intercellular adhesion molecule 1
iE	infizierte Erythrozyten
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
iR	infizierte Retikulozyten
L	Liter
LB	engl. lysogeny broth
M	molare Masse
MFS	engl. malaria freezing solution
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MTS	engl. malaria thawing solution
Ni	Nickel
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
P.	Plasmodium
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PES	putatives positives Exportsignal
PEXEL	engl. Plasmodium falciparum export element
PfEMP1	engl. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1
pH	lat. Potentia hydrogenii (Wasserstoffanteil)
rif	engl. repetitive interspersed family
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SP	Signalpeptid
stevor	engl. subtelomeric variable open reading frame
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE	TRIS-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
var	engl. variant gene
vir	engl. variant interspersed repeats

VSA	engl. variant surface antigens
w/v	Gewicht/Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
x g	Erdbeschleunigung
α	Anti

1 Einleitung

1.1 Malaria

Malaria ist eine Infektionskrankheit, welche durch Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursacht wird. Es existieren 5 humanpathogene *Plasmodien*-Arten: *Plasmodium* (*P.*) *falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, und *P. knowlesi*. Die Parasiten werden durch die infizierte weibliche Anophelesmücke von Mensch zu Mensch übertragen. Die häufigste und schwerste Form der Malariaerkrankung wird durch *P. falciparum* verursacht (WHO, 2020).

Die Malaria tritt weltweit in über 87 Ländern auf und kommt hauptsächlich in tropischen und subtropischen Regionen vor. Im Jahr 2019 erkrankten circa 229 Millionen Menschen an Malaria und Schätzungen gehen weltweit von circa 400.000 Todesfällen pro Jahr aus. Etwa 94% der weltweiten Malaria-Fälle betrafen dabei die afrikanische Region. Besonders von Malaria betroffen sind Kinder unter 5 Jahren und schwangere Frauen.

Circa 80% der Malariafälle sind auf eine Infektion mit *P. falciparum* zurückzuführen, wobei diese Art nahezu allein für die hohe Morbidität verantwortlich ist. Obwohl die Anzahl der *P. vivax*-Malariafälle erheblich geringer ist als die von *P. falciparum*, wurde zuletzt vermehrt von Krankenhausaufenthalten und Todesfällen durch schwere *P. vivax*- Malariainfektionen berichtet (WHO, 2020).

1.2 Der Lebenszyklus von *Plasmodien*

Der Entwicklungszyklus des Malaria-Parasiten verläuft in zwei Wirten: im menschlichen Wirt und in der weiblichen Mücke der Gattung *Anopheles* (Abbildung Lebenszyklus) (Macdonald *et al.*, 1957). Während einer Blutmahlzeit der Mücke werden Sporozoiten über den Speichel in das Blut des Menschen übertragen. Danach dringen die Sporozoiten aus der Blutbahn in die Leber ein. In den Hepatozyten (Leberepithelzellen) entwickeln sich die Parasiten zu Leberschizonten. Durch eine Mitose werden pro Leberschizont 20.000-30.000 Merozoiten produziert. Über die Ausbildung von Merosomen, gelangen die Merozoiten in den Blutstrom (Sturm *et al.*, 2006). Das Stadium in der Leber dauert zwischen 5 und 7 Tagen. Bei *P. vivax* und *P. ovale* kann ein Teil der Leberschizonten über Wochen oder Jahre in einem Ruhestadium (Hypnozoit) im Lebergewebe verbleiben und dadurch Rückfälle verursachen (Hulden *et al.*, 2011, Menard *et al.*, 2013).

Die Merozoiten befallen Erythrozyten, wo die Parasiten sich von Hämoglobin ernähren, um sich über das Ringstadium zum Trophozoiten- und Schizontenstadium entwickeln zu können.

Etwa 48 Stunden nach der Infektion kommt es zum Zerfall des Erythrozyten, wobei ungefähr 10 bis 30 Merozoiten aus dem Schizonten in den Blutkreislauf freigesetzt werden.

Während der asexuellen Fortpflanzung im erythrozytären Kreislauf können sich einige Merozoiten zu weiblichen Makrogametozyten oder männlichen Mikrogametozyten differenzieren. Durch einen Mückenstich gelangen diese Gametozyten aus dem menschlichen Blutkreislauf in den Darm der Mücke. Dort beginnt die sexuelle Vermehrung und es entstehen erneut Sporozoiten. Durch einen Stich der Mücke beginnt der oben beschriebene Zyklus erneut (Lindner *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2002; Memvanga *et al.*, 2021).

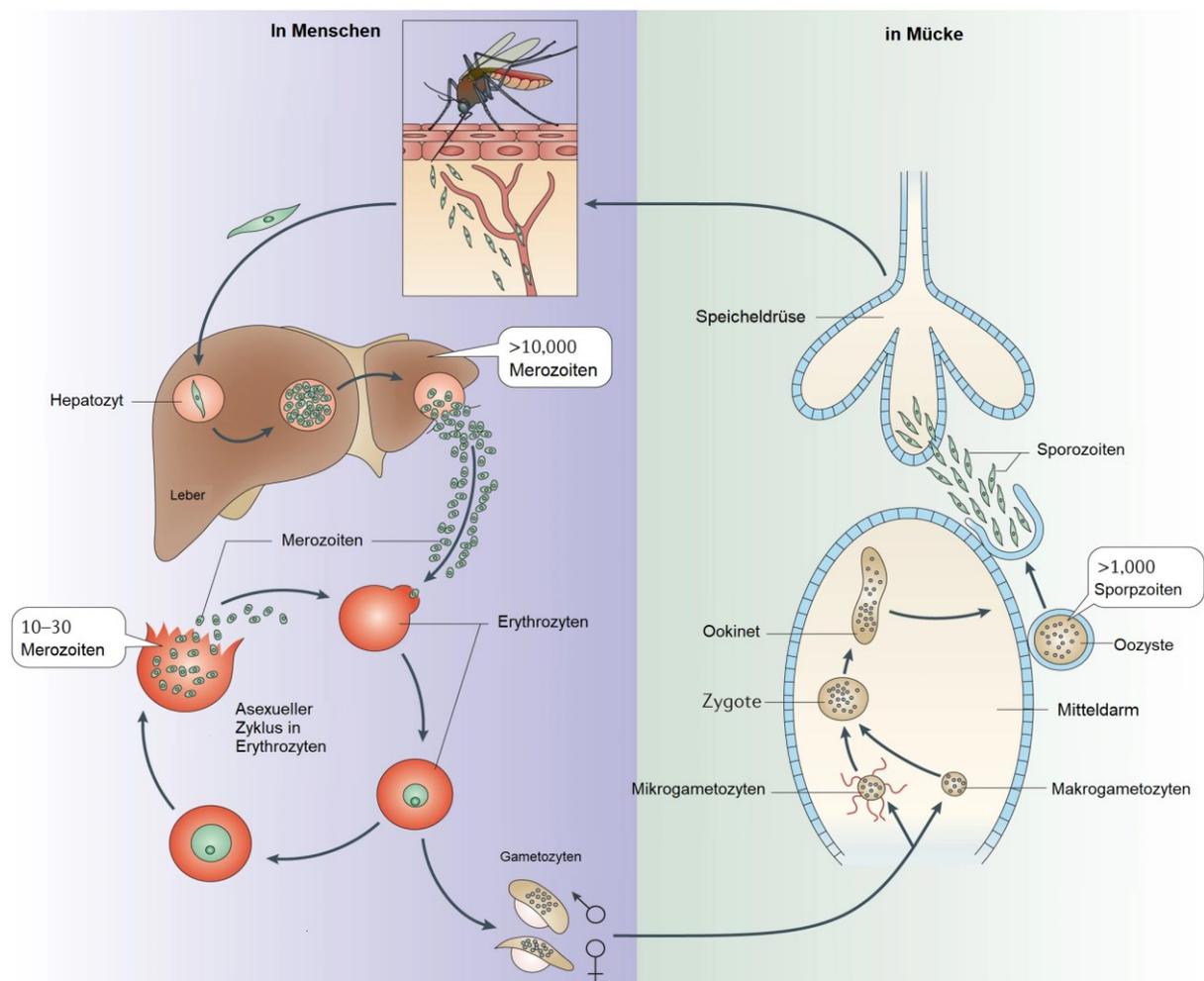


Abbildung 1: Lebenszyklus von Plasmodien verändert nach (Menard *et al.*, 2013)

1.3 *P. falciparum*

Von den fünf humanpathogenen *Plasmodien*-Spezies ist *P. falciparum* am virulentesten und nahezu allein verantwortlich für alle durch eine *Plasmodium*-Infektion auftretenden Todesfälle. Bei *P. falciparum* wird das Phänomen der Zytoadhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten an Endothelzellen von Blutgefäßen als Hauptfaktor für die Pathogenese der Malaria angesehen wodurch die Parasiten die Eliminierung über die Milz verhindern (Smith *et al.*, 2013). Durch die Zytoadhäsion verursacht *P. falciparum* die schwerste Form der Malaria mit Symptomen wie beispielsweise Lungenödeme, Organversagen und cerebrale Malaria (Trampuz *et al.*, 2003).

Es wurde nachgewiesen, dass es 3 größere Genfamilien, *var* (engl. *variant gene*), *rif* (engl. *repetitive interspersed family*) und *stevor* (engl. *subtelomeric variable open reading frame*) gibt, welche für variante Oberflächenantigene (VSA - engl. *variant surface antigens*), welche auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten (iE) präsentiert werden, kodieren. Hierbei handelt es sich um die *PfEMP1*- (engl. *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*), *RIFIN*- (engl. *repetitive interspersed family*) und *STEVOR*-Familien (Howard *et al.*, 1988, Niang *et al.*, 2014, Bachmann *et al.*, 2012).

Bei *P. falciparum* wurden Hinweise darauf gefunden, dass die von *var*-Genen kodierte *PfEMP1*-Familie bei reifen iE eine zentrale Rolle bei der Sequestrierung und Rosettierung spielt (Miller *et al.*, 2002).

1.3.1 Die Zytoadhäsion von *P. falciparum*

Es gibt drei Hauptmechanismen der Adhäsion von *P. falciparum*-iE: die Bindung der iE an verschiedene Wirtszellrezeptoren (Sequestrierung), die Bildung einer kreisförmigen Struktur aus mehreren nicht infizierten Erythrozyten um einen iE (Rosettierung) und die Verklumpung durch eine Wechselwirkung der iE mit Blutplättchen (Esser *et al.*, 2014; Rowe *et al.*, 2009). Die Zytoadhäsion an Endothelzellen der Blutkapillaren ermöglichen iE der Eliminierung durch die Milz während der Blutzirkulation zu entkommen (Miller *et al.*, 2002).

Bisher sind mindestens 23 Endothelzellrezeptoren beschrieben, an denen iE adhären können. Allerdings konnte bisher nur für wenige von ihnen ein bestimmtes *PfEMP1* Protein als Bindungspartner identifiziert werden. Weiterhin konnte nur für die Endothelzellrezeptoren CD36 (*cluster of differentiation 36*), ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*), CSA (*Chondroitin sulfate A*) und EPCR (*Endothelial Protein C Receptor*), die für die Interaktion

verantwortliche Domäne charakterisiert werden (Wassmer *et al.*, 2004, Chakravorty *et al.*, 2005, Pouvelle *et al.*, 2007, Fried *et al.*, 2015, Salinas *et al.*, 2016, Joste *et al.*, 2020).

1.3.2 Die *var*-Genfamilie und *PfEMP1*

Es gibt ungefähr 50-60 verschiedene Varianten der *var*-Gene im haploiden *P. falciparum* Genom, die die *PfEMP1*-Antigene kodieren. Die *var*-Gene sind in subtelomeren und zentralen chromosomalen Regionen von insgesamt 14 Chromosomen lokalisiert. Basierend auf der chromosomalen Position und stromaufwärts des Gens von den Promotorregionen gelegen, wurden die *var*-Gene in die Gruppen A, B, C und E unterteilt. (Kraemer *et al.*, 2007; Otto *et al.*, 2018). Ein *var*-Gen besteht aus Exon 1, welches die vielfältigen extrazellulären Sequenzen des *PfEMP1*-Proteins kodiert, gefolgt von einer kurzen Transmembrandomäne und Exon 2, welches den konservierten zytoplasmatischen Teil des *PfEMP1*-Proteins kodiert.

Das *PfEMP1*-Protein besteht aus einem N-terminalen Segment und mehreren DBL- (engl. *Duffy-binding-like*) und CIDR-Domänen (engl. *cysteine-rich interdomain region*) Wegen der Sequenzähnlichkeit werden die DBL-Domänen in sechs (α , β , γ , δ , ϵ , ξ) und die CIDR-Domänen in vier Hauptklassen (α , β , γ , δ) unterteilt (Smith *et al.*, 2000, Gardner *et al.*, 2002, Otto *et al.*, 2019). Die DBL-CIDR-Kombination enthält ein bestimmtes konserviertes Motiv von *PfEMP1* und wird als Domänenkassette (DC) bezeichnet. In der *PfEMP1*-Familie konnten 23 DC identifiziert werden (Rask *et al.*, 2010).

Neuere Studien haben gezeigt, dass die Adhäsionsfähigkeit der *PfEMP1*-Proteine an den Endothelzellrezeptoren mit dem Vorhandensein bestimmter Unterklassen der Domänen oder Domänenkassetten zusammenhängt (Joste *et al.*, 2020, Jensen *et al.*, 2020). Die CIDR α 1-Domäne zum Beispiel erlaubt das Binden an EPCR, während CIDR α 2-6 der Gruppen B und C verantwortlich für die Interaktion mit dem Rezeptor CD36 sind (Lau *et al.*, 2015, Robinson *et al.*, 2003, Gullingsrud *et al.*, 2013). Des Weiteren wurde DC5 als Bindungspartner für PECAM identifiziert (Berger *et al.*, 2013).

Außerdem werden die *PfEMP1*-Proteine der Gruppe A, welche DC5 (DBL γ 12-DBL δ 5-CIDR β 3/4-DBL β 7/9) enthalten, in Zusammenhang mit schwerer Malaria bei Kindern gebracht (Rask *et al.*, 2010 Joste *et al.*, 2020). Metwally und Kollegen zeigten, dass das Gruppe A *var02*-Gen in Parasitenpopulationen, die an die Rezeptoren P-Selektin und CD9 angereichert wurden, verstärkt im Vergleich zur Kontrolle exprimiert war (Metwally *et al.*, 2017).

1.4 *P. vivax*

Neben *P. falciparum* ist *P. vivax* der zweithäufigste Malariaerreger und verursacht den größten Teil der Malariafälle in Amerika (fast 75%), Südostasien (46%) sowie der westpazifischen Region (32%) (WHO 2020). Im Vergleich zu *P. falciparum* kann sich *P. vivax* bei niedrigeren Temperaturen sporogonally entwickeln, jedoch kann *P. vivax* nur Retikulozyten infizieren. Deshalb ist die Anzahl der infizierten Blutzellen in der Regel geringer (die Parasitämie beträgt normalerweise 1-2%) und *P. vivax* verursacht weniger gravierende Infektionen als *P. falciparum* (Kitchen *et al.*, 1938, Vogel *et al.*, 2013, Gething *et al.*, 2011).

1.4.1 Die Zytoadhäsion von *P. vivax*

Wegen des Vorhandenseins aller Parasitenstadien im peripheren Blutkreislauf wurde lange Zeit angenommen, dass *P. vivax* die Fähigkeit zur Zytoadhäsion wie für *P. falciparum* beschrieben, fehlt. In neueren Studien wurde jedoch gezeigt, dass *P. vivax* infizierte Retikulozyten (iR) in der Lage sind, an verschiedene Zellen oder Rezeptoren wie HLEC (engl. *Human Lymphatic Endothelial Cells*), CD36, ICAM-1 und CSA zu zytoadhärieren (Carvalho *et al.*, 2010, Chotivanich *et al.*, 2012, Marín-Menéndez *et al.*, 2013). Darüber hinaus wurden bei einem *P. vivax* infizierten Patienten eine große Anzahl von intakten *P. vivax*-iR in der Milz identifiziert, die zu einer Milzruptur jedoch ohne klinische Symptome führten (Machado *et al.*, 2012). Da auf der Oberfläche der *P. vivax*-iR keine PfEMP1-Proteine präsentiert werden, deutet die große Anzahl von intakten *P. vivax*-iR in der Milz darauf hin, dass bei *P. vivax*-iR andere Proteine für die Zytoadhäsion an der Oberfläche präsentieren werden müssen (del Portillo *et al.*, 2001).

1.4.2 Die *vir*-Genfamilie und VIR-Proteine

Bei *P. vivax* gibt es Hinweise darauf, dass die *vir*-Genfamilie (engl. *variant interspersed repeats*) eine Schlüsselrolle bei der Zytoadhäsion spielt. Die *vir*-Genfamilie lässt sich in 12 verschiedenen Unterfamilien (A bis L) unterteilen und besteht aus 295 *vir*-Genen. Bei den von den *vir*-Genen kodierten Proteinen konnte für 171 eine Transmembrandomäne und bei 160 ein PEXEL (*Plasmodium export element*) Motiv gefunden werden, welches ein intrazelluläres Signal zum Export der Proteine in den iE oder an die Oberfläche der iE vermittelt. Jedes dieser Gene hat 1 bis 5 Exons, wobei zumeist das erste Exon kurz ist und keine Signalpeptidsequenz besitzt. Das zweite Exon kodiert eine Transmembrandomäne an seinem 3'-Ende und konservierte Cysteinreste. Das dritte Exon kodiert die mutmaßliche zytosolische Domäne (del Portillo *et al.*, 2001, Fernandez-Becerra *et al.*, 2009, Singh *et al.*, 2014).

Im Gegensatz zu PfEMP1 bilden die VIR-Proteine eine extrem vielfältige Familie. Für einige der VIR-Proteine konnte eine Oberflächenlokalisierung auf den iE nachgewiesen werden und es gibt Hinweise darauf, dass sie die Adhärenz von *P. vivax*-iR an humane Endothelzellrezeptoren vermitteln (Carvalho *et al.*, 2010, Chotivanich *et al.*, 2012, Marín-Menéndez *et al.*, 2013).

1.5 Zielsetzung

Es ist bekannt, dass *P. falciparum* für die höchste Virulenz der Malariaparasiten und Malaria Todesfälle verantwortlich ist. Dagegen ist *P. vivax* weniger gefährlich, jedoch am weitesten verbreitet und hauptsächlich für Rückfallinfektionen verantwortlich. Bei *P. falciparum* spielt die Zytoadhäsion der *P. falciparum*-iE an die humanen Endothelzellrezeptoren eine Schlüsselrolle der Pathogenese. Bei *P. vivax* ist mutmaßlich die *vir*-Genfamilie an der Interaktion zwischen Parasiten und Wirtszelle beteiligt. Außerdem ist noch nicht bekannt, welches VIR-Protein die Zytoadhäsion an einen Endothelzellrezeptor vermitteln kann.

In dieser Arbeit sollen erstens VIR-Proteine identifiziert werden, die die Bindung an Endothelzellrezeptoren vermitteln. In der vorangegangenen Arbeit wurde eine signifikante Bindung von sieben VIR-Proteinen an den Rezeptor CD36 im Trophozoitenstadium nachgewiesen. Allerdings ist bisher unklar, ob Parasiten im Schizontenstadium die gleichen Eigenschaften aufweisen. Daher soll die Interaktion zwischen diesen sieben VIR-Proteinen und den humanen Endothelzellrezeptoren CD36 und ICAM-1 untersucht werden, wobei die Parasiten sich im Schizontenstadium befinden. Dafür werden transgene *P. falciparum* Zelllinien verwendet, welche diese entsprechenden sieben *vir*-Gen exprimieren. Da *P. vivax*, wie oben beschrieben, nur Retikulozyten infiziert, ist die Kultivierung von *P. vivax* sehr aufwändig. Transgene *P. falciparum* Zelllinien sind einfacher zu kultivieren und präsentieren die entsprechenden *P. vivax* Proteine auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten. Mittels Immunfluoreszenzanalyse soll die Expression der *vir*-Gene überprüft und mittels von Bindungsversuchen soll die Zytoadhäsionsfähigkeit untersucht werden.

Im zweiten Teil sollen die Zytoadhäsionseigenschaften der einzelnen PfEMP1-var02-Domänen von *P. falciparum* analysiert werden. Von Metwally und Kollegen wurde IT4_var02 als Bindungspartner für die Endothelzellrezeptoren P-Selektin und CD9 identifiziert (Metwally *et al.*, 2017). Allerdings ist bisher nicht bekannt, welche PfEMP1-Domäne die Bindung vermittelt. Deshalb soll hier mittels Ni-Beads untersucht werden, ob eine der sieben PfEMP1-var02-Domänen als Bindungspartner für fünf ausgewählten Endothelzellrezeptoren CD36, ICAM-1, CD9, CD151 und P-Selektin dienen kann.

2 Methoden

In den folgenden Abschnitten wird ein Überblick über das verwendete Material und die Methoden der Versuchsdurchführung gegeben.

2.1 Material

Zuerst erfolgt ein Überblick über das verwendete Material, untergliedert in Laborgeräte, Software und Verbrauchs-/Gebrauchsmaterial.

2.1.1 Geräte

Für die Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden die folgenden Geräte benutzt.

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte und deren Hersteller

Geräte	Hersteller/ Firma
2 /20/ 200/1000µL Pipetten	Gilson
Axioscope M1	Zeiss
Centrifuge 5424	Eppendorf AG
Class II BSC	ESCO Labculture®
Cx31	Olympus, Hamburg
EPS301	Amersham pharmacia biotech
EVOS FL Auto	Thermo Fisher Scientific
EVOS XL	Thermo Fisher Scientific
Function Line CO ₂ (Brutschrank)	Heraeus Instruments
Innova 42000	New Brunswick Scientific
Mikro rapid/K	Hettich Technology
Mikroprozessor-Labor-pH-Meter CG 840	Sartorius AG
Mr. Frosty	Fisher Scientific GmgH
NanoDrop 2000	Thermo Scientific
Nucleofactor™ 2B Decice	Lonza Group Ltd
Orca C4742-95	Hamamatsu Photonis K.K
PerfectBlue Gel System	PEQLAB Biotechnologie
PerfectBlue Tank-Elektroblotter Web S	VWR International, LLC
Primus 25 advanced PCR Cycler	PeqLab
RH Basic	Janke & Kuunkel IKA

Rotina 48 centrifuge	Hettich Technology
Rotor JA-10; Rotor JA-12	Beckman Coulter
S1 Pipettierhilfe	Thermo Scientific
Sartorius BP210S	Sartorius AG
SPO 51	Scaltec
SW 20 (Wasserbad)	Julabo, Seelbach
Thermomixer compact	Eppendorf AG
VF2	Janke & Kuunkel IKA

2.1.2 Software

Zur Auswertung der Versuche wurden die folgenden Software-pakete benutzt.

Tabelle 2: Verwendete Software und deren Hersteller

Software	Hersteller/ Firma
ImageJ 1.52p	National Institute of Health
Prism® (Version 9)	GraphPad
Microsoft Excel	Microsoft corporation
Axiovision	Zeiss

2.1.3 Gebrauchsmaterialien

Die folgenden Gebrauchsmaterialien und Laborutensilien wurden für die Durchführung der Versuche benötigt.

Tabelle 3: Verwendete Ge- und Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

Gebrauchsmaterialien	Hersteller/ Firma
1,5 mL, 2 mL Safe-lock Reaktionsgefäße	Sarstedt
15 mL, 50 mL Konische Zentrifugationsröhrchen	Sarstedt
20 mL Spritze	B. Braun Melsungen AG
Cover Slips 13 mm	Sarstedt
Cryoröhrchen 1,6 mL	Sarstedt
DakoCytomation Pen	Biocompare
Deckgläschen 24 x 65 mm, Dicke 0,13-0,16 mm	R. Langenbrinck
Gasflasche (1 % O ₂ , 5 % CO ₂ , 94 % N ₂)	Air liquid
Gelkassetten	Thermo Fisher Scientific
Gewebekulturflasche 50 mL(T25)	Greiner Bio-One
Hydrophobische Filter, 0.45 µm, Steril	Thermo Fisher Scientific,

Hyperfilm-ECL	GE Healthcare
Mikro-Schraubröhre 2 mL, PP	Sarstedt
Millipore Stericup Vacuum Filter	Merck
Nitrocellulose blotting, Amersham 0,45 µm	GE Healthcare
Nunc™ 14 mL “round-bottom” Röhren, PS	Falcon
Parafilm	Bemis
Pasteurpipette	Brand
Petrischalen mit Noppen, 60 mm, 92 mm, 140 mm	Sarstedt
Pipettenspitzen 1-10/20-200/100-1000 µL	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter 1-10/20-200/100-1000 µL	Sarstedt
Serologische Plastikpipetten 5/10/25 mL	Corning
TC-Platte 24 Wellm Standard F	Sarstedt
Transfektionsküvetten 0,2 cm	Bio-Rad

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Die folgenden Chemikalien und Reagenzien kamen bei der Durchführung der Versuche zur Verwendung.

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller

Chemikalien / Reagenzien	Hersteller/ Firma
Accutase	PAN-Biotech
Albumax II	Gibco, Life Technologies
BSA - engl. Bovine Serum Albumin	Biomol
Dako „Fluorescence Mounting Medium“	
Ampicillin, LB-Medium, LB-Agar und DMSO	Roth
Nukleosidtriphosphate (dNTP's)	Invitrogen
HPLC gradient grade	JT Baker
PageRuler Prestained Protein Ladder	ThermoFisher
30 % Acrylamid 4K Mix 37,5:1	AppliChem
25 % APS	Roth
TEMED	Roth
GeneRuler 1kb DNA Ladder	ThermoFisher
GeneRuler 100bp DNA Ladder	ThermoFisher

Agarose Ultrapure	Fa. Invitrogen, CatNr.16500-500
G-418 BC (Neomycin) (50 mL)	Greiner Bio-One
Ham's F12	PAN Biotech
Humanes Blut (0+)	UKE, Hamburg
Immersionsöl 518 N	Zeiss
MOWIOL 4-88	Calbiochem
Leica CV Mount	Leica Biosystems
RPMI + L-Glutamin; + 25 mM HEPES; - NaHCO ₃	AppliChem
UltraPure™ agarose	Thermo Fisher Scientific,
10x CutSmart™ Puffer	New England BioLabs
6x Loading Dye	Thermo Fisher Scientific
MagneHis™ Ni Particles	Promega
BSA - <i>Bovine Serum Albumin</i>	Biomol
GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase	Promega
PWO -100 units	Roche
5x Green Go Taq Flexi Buffer	Promega
X-Gal	Biomol
FastDigest Restriction Enzymes	ThermoFisher
FastDigest 10x FastDigest Buffer (grün)	ThermoFisher
10x T4 – Ligasebuffer	ThermoFisher
T4 – Ligase	ThermoFisher
ATP	SigmaAldrich

2.1.5 Kits

Des Weiteren wurden die folgenden Kits benötigt.

Tabelle 5: Verwendete Kits und deren Hersteller

Name	Hersteller/ Firma
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel
NucleoBond® Maxi	Macherey-Nagel
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
Nucleospin Gel und PCR Clean up	Macherey-Nagel
<i>Nucleo Spin Plasmid Kit</i>	Macherey-Nagel
TOPO TA Cloning-Kit	Invitrogen

2.1.6 Antikörper

Die folgenden primären und sekundären Antikörper wurden verwendet.

Tabelle 6: Verwendete Primäre Antikörper

Name	Organismus	Verdünnung		Quelle
		IFA	WB	
α -HA, High Affinity	Ratte (monoklonal)	1:100		Roche
Anti-HIS	mouse		1:5000	Sigma

Tabelle 7: Verwendete Sekundäre Antikörper

Name	Organismus	Konjugat	Verdünnung		Quelle
			IFA	WB	
α -Ratte, IgG (H+L)	Esel	Alexa Fluor 594	1:400		ThermoFischer Scientific
Anti-mouse-HRP	Kaninchen			1:10000	Dako

Weiterhin wurde zur Anfärbung von Zellkernen der Farbstoff Hoechst33342 (SigmaAldrich, USA) verwendet

2.1.7 Primer

Tabelle 8: Verwendete Primer. Bezeichnung der Domäne nach Rask *et. al.* (2010)

Interne Nr. der Domäne	Bezeichnung der Domäne	Forward Primer	Reverse Primer	Größe der Domäne (Bp)
# 40	DBL α 1.5	GAGA GGATTC TACTATAAAAGTGCC TGTGA	GAGA GAATTC TTA TTTAAACGTTTCTA CAAATT	1080
# 41	CIDR δ 1	GAGA GGATTC CAATATGACACTTTTT CCCA	GAGA GAATTC TTA AGACTTTTGATTGT TACTTT	807

# 42	DBL β 3	GAGA GGATTC GAGGTGAAGAAGGG GATGTTG	GAGA GAATTC TTA AACAAACATTTTGTT TTGCTTTTTG	1080
# 43	DBL γ 12	GAGA GGATTC AACGATGTGAATGTG TGCG	GAGA GAATTC TTA GCATTGACATTTGA TTCCAAG	1086
# 44	DBL δ 5	GAGA GGATTC TGCGAAATCGTGGAT AAAACACTG	GAGA GAATTC TTA GAATCCAATTACA GAACATGG	1254
# 45	CIDR β 3	GAGA GGATTC TCTGTAATTGGATTC AAATG	GAGA GAATTC TTA CGCATCTTTGTCGC CACATG	864
# 46	DBL β 9	GAGA GGATTC GGCTTCAAACAGTTG TGTAC	GAGA GAATTC TTA TTGTGGCCTGTCTT TACACT	1224

2.1.8 Restriktionsendonukleasen

Tabelle 9: Verwendete Restriktionsendonukleasen

Name	Erkennungssequenz	Hersteller/ Firma
AvrII	5'...C↓CTAGG...3' 3'...GGATC↑C...5'	New England BioLabs
KpnI	5'...GGTAC↓C...3' 3'...C↑CATGG...5'	New England BioLabs
BamHI	5'...G↓GATCC...3' 3'...CCTAG↑G...5'	ThermoFisher
EcoRI	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTTAA↑G...5'	ThermoFisher

2.1.9 *E. coli*-Stämme

One Shot™ TOP10 E.coli (Invitrogen)

SHuffle T7 Express Competent E. coli (BioLabs)

2.1.10 CHO-Zelllinien

Tabelle 10: Verwendete CHO-Zelllinien

Name	Vektor	Konjugat
CHO-745-AcGFP-Klon3	pAcGFP-N1	-
CHO-745-CD36-AcGFP-Klon3	pAcGFP-N1	CD36
CHO-745-ICAM-1-AcGFP	pAcGFP-N1	ICAM-1
CHO-745-P-Selektin-AcGFP-clon4	pAcGFP-N1	P-Selektin
CHO-745-CD9-EGFP-clon8-3	pEGFP-N1	CD9
CHO-745-CD151-EGFP-clon14-10	pEGFP-N1	CD151

2.1.11 *P. falciparum*-Stämme

3D7-Stamm (AG Spielmann, BNITM, Hamburg)

2.1.12 Lösungen, Puffer und Medien

Vor der Verwendung wurden angesetzte Lösungen autoklaviert oder steril filtriert.

Giemsa -Lösung

Giemsa-Stocklösung 10%
Ad 100 mL mit Aqua dest.

90 %ige Percolllösung

Percoll-Stocklösung 45 mL
10x PBS 5 mL

60 %ige Percolllösung

90 %ige Percolllösung 6,7 mL
D-Sorbitol 0,8 g
Zellkulturmedium 3,3 mL

RPMI mit Albumax II (Komplettmedium)

für *P. falciparum* Kultur

RPMI 15,87 g/L
D-(+)-Glucose-Monohydrat 2 g/L
Natriumbicarbonat 1 g/L
Hypoxanthin 0,028 g/L
Albumax II 5 g/L
Gelöst in 5 mL, 1M NaOH
Gentamycin 0,2 g/L
Ad 100mL mit Aqua dest. pH 7,2

Malaria Thawing Solution (MTS)

NaCl 35 g/L
Ad 1 L Aqua dest.

Malaria Freezing Solution (MFS)

D-Sorbitol 30 g/L
NaCl 6,5 g/L
Ad 1 L Aqua dest.

WR99210 Stocklösung

WR99210	20 mM
In 1 mL DMSO	
1:1000 der WR99210- Stocklösung in RPMI mit Albumax II	

Bindungsmedium

RPMI 1640	16,4 g/L
Glucose (wasserfrei)	20 g/L
Ad 1 L Aqua dest., pH 7,2	

CHO-Zellkulturmedium**(Komplettmedium)**

Ham's F12 mit L-Glutamin und 25 mM	
Fetales Kälberserum	50 mL
HEPES	500 mL
(inaktiviert bei 56 °C für 45 min)	
Penicillin/Streptomycin Mix	
5 mL	

1x TAE-Puffer

Natriumacetat	5 mM
Tris base	40 mM
Na ₂ -EDTA (wasserfrei)	2 mM
Ad 2 L Aqua dest. pH 7,9	

TBS-Tween

Tween 20 in 1x TBS (v/v)	0,05%
--------------------------	-------

10x PBS für die *P. falciparum* Zellkultur

KCl	28,6 mM
NaCl	1,37 M
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	80,6 mM
KO ₂ PO ₄	14,7 mM
Ad 1 L Aqua dest.; pH 7,4	

Weiser Puffer

KH ₂ HPO ₄	0,98 g
Na ₂ HPO ₄	2,18 g
Ad 2 L Aqua des., pH 7,0	

10x PBS für die CHO-Zellkultur

NaCl	1,37 M
KCl	27 mM
KH ₂ PO ₄	18 mM
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	101 mM
Ad 1 L Aqua dest., pH 7,4	

10x TBS

Tris-HCl pH 7,5	0,5 M
NaCl	1,5 M

LB-Medium

LB-Medium	20 g/L
Ad 1 L Aqua dest.	

SDS-PAGE-Trenngelpuffer

Tris-Pure	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)
pH 8,8	

SDS-PAGE-Sammelgelpuffer

Tris-Pure	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)
pH 6,8	

10x SDS-Elektrophoresepuffer

SDS	1 % (w/v)
Glycin	1,92 M
Tris	250 mM

10x Transferpuffer

Glycin	960 mM
Tris pH 8,3	125 mM
SDS	0,2 % (w/v)
Vor Verwendung 20 % Methanol (v/v) zugeben	

Coomassie-Lösung

Methanol	50 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R	0,05 % (w/v)

Coomassie-Entfärber

Methanol	45 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)
Aqua dest.	45 % (v/v)

TB-Puffer

Na ₂ PO ₄	90 mM
CaCl ₂	0,15 mM
KCl	5 mM
HEPES	50 mM
pH 7,3	

LB-Agar

LB-Agar	35 g/L
Ad 1 L Aqua dest.	

Lösung B

p-Coumarinsäure in DMSO	6,7 mM
-------------------------	--------

Lösung A

Tris-HCl	100 mM
Luminol	0,025%
pH 8,6	

Lösung C

H ₂ O ₂	30%
-------------------------------	-----

ECL-Lösung

Lösung A	5 mL
Lösung B	500 µL
Lösung C	1,5 µL

Puffer A		Puffer A mit 1 M Imidazol	
NaCl	500 mM	Puffer A	25 mL
Tris-HCl	20 mM	Imidazol	1,7 g
pH 7,9			

2.2 Zellbiologische Methoden

Die folgenden Zellbiologischen Methoden kamen bei den Versuchen die in dieser Arbeit beschrieben werden zur Anwendung.

2.2.1 *P. falciparum* Zellkultur

In dieser Arbeit wurde der Laborstamm *P. falciparum* 3D7-BNI verwendet. Die folgenden Abschnitte beschreiben die Methoden der Kultivierung, Transfektion und Lagerung dieser *P. falciparum* Zellkultur.

2.2.1.1 In vitro Kultivierung von *P. falciparum*

Für die Kultivierung wurde RPMI 1640 mit 0,5% Albumax II versetzt. Die Kultivierung erfolgte in Petrischalen (Volumen von 5 oder 10 mL) mit der Blutgruppe 0+, wobei der Hämatokritwert 5% betrug. Die Kulturen wurden bei 37°C mit einer Gaszusammensetzung von 1% O₂, 5% CO₂ und 94%N₂ inkubiert. Jeden dritten Tag wurde die Parasitämie kontrolliert und das Medium gewechselt. Wenn die Parasitämie größer als 5% war, musste das Kulturmedium täglich gewechselt werden.

2.2.1.2 Giemsa-Färbung

Zur Bestimmung der Parasitämie und Überprüfung des Entwicklungsstadiums der Parasiten wurden Kulturausstriche angefertigt und 20 Sekunden in Methanol fixiert. Danach wurden sie 10 Minuten in einer 10 %igen Giemsa-Lösung gefärbt. Anschließend wurde die Giemsa-Lösung mit Wasser abgewaschen. Unter dem Lichtmikroskop konnte der Blutausstrich untersucht werden.

2.2.1.3 Isolation der Schizonten mittels Percoll-Lösung

Wegen ihrer verschiedenen Dichteigenschaften konnten die verschiedenen Parasitenstadien getrennt und die Schizonten mittels eines Percoll-Gradients angereichert werden. Für die Transfektion von *P. vivax* Genen in *P. falciparum* mittels Elektroporation wurden Parasiten im Schizontenstadium benötigt. Hierfür wurden 4 mL einer 60% igen Percoll-Lösung in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Eine Kultur mit einer Parasitämie von mehr als 5% wurde in 8 mL Kulturmedium resuspendiert und danach vorsichtig auf die Percoll-Lösung aufgeschichtet.

Das Zentrifugenröhrchen wurde für 6 min bei 2000 x g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren bildete sich eine bräunliche Phase zwischen der Percoll-Lösung und dem Medium. Diese bräunliche Phase wurde entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen mit neuem Kulturmedium überführt. Zum Entfernen der restlichen Percoll-Lösung wurde diese Zellsuspension noch einmal zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Dabei sammelten sich die isolierten Schizonten als Sediment am Boden des Zentrifugenröhrchens.

2.2.1.4 Transfektion von *P. falciparum* mittels Elektroporation

Die Kultivierung von *P. vivax* im Labor ist sehr aufwändig. Für Untersuchungen eines VIR-Proteins wurden daher transgene *P. falciparum*-Zelllinien generiert, welche die zu untersuchenden *vir*-Gene exprimieren. Dafür wurden zirkuläre Plasmide mittels Elektroporation in den Kern von *P. falciparum* eingebracht (Moon *et al.*, 2013). 50 µg Plasmid-DNA wurde in 10 µL TE-Puffer resuspendiert und mit 90 µL Na₂PO₄-Puffer verdünnt. Danach wurde 15 µL der mittels des Percoll-Gradients isolierten Schizonten mit der verdünnten Plasmid-DNA gemischt und in eine Transfektionsküvette überführt. Die Elektroporation wurde bei 310 V und 950 µF unter Verwendung eines NucleofectorTM 2b Device der Firma Lonza, Schweiz durchgeführt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß, in welchem 500 µL warmes Kulturmedium mit 300 µL frischem Blut (0+) versetzt wurde, für 30 min bei 37 °C und 650 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension aufgenommen und in eine Petrischale mit 5 mL Kulturmedium überführt. In den ersten sieben Tagen wurde das Medium täglich gewechselt. Die Kultur wurde weiter kultiviert, wie im Kapitel In vitro Kultivierung von *P. falciparum* beschrieben. Nach 24 Stunden wurde der Selektionsmarker zur Kultur hinzugegeben, um die transgenen Parasiten zu selektieren.

2.2.1.5 Anfertigen von Stabilaten einer *P. falciparum*-Kultur

Für die Konservierung der Parasitenkultur ist es notwendig, dass die Parasiten sich im Ringstadium befinden, und die Kultur eine Parasitämie von mehr als 5% hat. Die Kulturen wurden für 5 min bei 800 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen. Das Erythrozyten-Sediment wurde im vierfachen Volumen mit vorgewärmter *Malaria freezing solution* (MFS) resuspendiert und in sterile Kryoröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde über Nacht bei -80 °C unter kontrollierten Bedingungen (-1 °C pro Minute) im Einfrierbehälter eingefroren. Für die langfristige Konservierung wurden die Stabilate bei -170 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.6 Auftauen von *P. falciparum*-Stabilaten

Zum Auftauen wurden die in Stickstoff eingefrorenen Zellen bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Danach wurde die Zellsuspension in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt, in dem sich das gleiche Volumen von vorgewärmter *Malaria Thawing Solution* (MTS) befand. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 800 x g zentrifugiert und danach der Überstand entsorgt. Für das Entfernen der lysierten Erythrozyten wurde das Sediment zweimal mit jeweils 1 mL MTS gewaschen. Anschließend wurden das Sediment in 5 mL Kulturmedium resuspendiert und in einer Petrischale mit frischem Blut kultiviert, wie in Kapitel In vitro Kultivierung von *P. falciparum* beschrieben.

2.2.2 CHO-Zellkultur

Weiterhin wurden in dieser Arbeit transgenen und nicht-transgenen CHO-Zellen verwendet. Für deren Herstellung, Kultivierung und Lagerung wurden die folgenden Methoden angewandt.

2.2.2.1 In vitro Kultivierung von CHO-Zellen

Für die Kultivierung der transgenen und nicht-transgenen CHO-Zellen wurden 25cm² Zellkulturflaschen verwendet, wobei die CHO-Zellen in 5mL kompletten CHO-Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank wuchsen. Die Grundfläche der Zellkulturflaschen ist für adhären-wachsende Zellen geeignet. Die verwendeten CHO-Zelllinien waren bereits zuvor von der Doktorandin Jana Brehmer und anderen vorliegenden Arbeiten etabliert worden. Mittels eines Fluoreszenzmikroskops wurde das Wachstum der Zellen (Konfluenz) und ihre Vitalität kontrolliert. Spätestens an jedem dritten Tag wurde das Kulturmedium gewechselt, oder die CHO-Zellen verdünnt. Das verbrauchte Kulturmedium wurde abgesaugt. Danach wurden die Zellen einmal mit vorgewärmtem (37°C) CHO-PBS gewaschen. Um die Zellen vom Boden der Flasche abzulösen, wurde 300 µL Accutase zugegeben und für 5 min bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert. Durch vorsichtiges Klopfen der Zellkulturflasche wurden die Zellen vollständig gelöst. Dies wurde unter einem inversen Mikroskop kontrolliert. Durch Zugabe von Kulturmedium wurde die Aktivität der Accutase danach inhibiert. Das Zellvolumen wurde in einer Pipette gemessen und je nach Konfluenz ein Teil des Zellvolumens (1:2 bis 1:30) zurück in der Zellkulturflasche pipettiert. Es wurde daraufhin wieder 5 mL frisches Medium hinzugegeben. Bei den transgenen CHO-Zelllinien wurde zur Selektion der Marker Neomycin in der Endkonzentration von 0,7 mg/mL zu den Zellen hinzugegeben. Schließlich wurden diese transgenen Zellen bei 37 °C und 5% CO₂ weiter kultiviert.

2.2.2.2 Anfertigung von Stabilaten der CHO-Zellen

Auf der Oberfläche von CHO-Zellen wird der jeweilige humane Rezeptor nur ungefähr drei Wochen stabil präsentiert. Daher war ein regelmäßiges Anfertigen und Auftauen von CHO-Stabilaten notwendig. Die Zellen wurden wiederum, wie oben beschrieben, mit Accutase abgelöst. Danach wurden die Zellen in 5 mL Kulturmedium resuspendiert, für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die sedimentierten Zellen wurden in 3 mL CHO-Einfrierlösung resuspendiert. Schließlich wurde je 1 mL Zellsuspension in mehrere Kryoröhrchen überführt und in einem Einfrierbehälter bei -80 °C eingefroren. Durch diesen wurde die Temperatur pro Minute um 1°C gesenkt. Für die langfristige Konservierung wurden die Zellen im Stickstofftank bei -170 °C gelagert.

2.2.2.3 Auftauen der CHO-Zellen

Das Auftauen der CHO-Zellen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Danach wurde die aufgetauten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen (15 mL) überführt. Zum Waschen wurde 10 mL vorgewärmtes Kulturmedium dazugeben. Dann wurde das Zentrifugenröhrchen für 2 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die sedimentierten Zellen wurden in 5 mL Kulturmedium resuspendiert und dann in eine Zellkulturflasche (25cm²) überführt. Die aufgetauten CHO-Zelle wurden wieder inkubiert und am nächsten Tag das Kulturmedium gewechselt. Bei transgenen CHO-Zelllinien wurde wiederum Neomycin hinzugegeben, selektiert, und die Kultur wurde anschließend, wie in Kapitel *In vitro* Kultivierung von CHO-Zellen beschrieben, weiter kultiviert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Von den Zellbiologischen Methoden sind die Molekularbiologischen Methoden zu unterscheiden. Die in dieser Arbeit angewendeten Molekularbiologischen Methoden werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

2.3.1 Restriktionsverdau

Für die Restriktionsanalyse wurden Restriktionsenzyme der Firma *New England Biolabs GmbH* verwendet, um ein ligiertes DNA-Fragment aus dem pARL1-Vektor herauszuschneiden. Für diese Arbeit wurde das synthetische *vir*-Gen *pvx_108770* aus dem Vektor geschnitten, um seine Größe mit der Agarosegel-Elektrophorese zu kontrollieren, wie unten beschrieben. Der Ansatz zum Restriktionsverdau ist auf der nächsten Seite beschrieben:

Tabelle 11: Ansatz Restriktionsverdau 1

2 μ L	Plasmidlösung
1 μ L	KpnI
1 μ L	AvrII
1 μ L	<i>10x CutSmart Buffer</i>
5 μ L	Nukleasefreies Wasser
<hr/>	
10 μ L	gesamt

Der Restriktionsverdau erfolgte für 1,5 Stunden bei 37 °C im Heizblock.

2.3.2 Agarosegel-Elektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese können DNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt werden. Somit wurde nicht nur das ligierte DNA-Fragment von dem Vektor getrennt, sondern auch seine Größe überprüft. Dafür wurde 1% oder 2% Agarose in 1 x TAE-Puffer (w/v) durch Aufkochen gelöst und mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (0,1 μ L/mL) versetzt. Die nötige Konzentration des Agarose-Gels ist von der Größe der aufzutrennenden Fragmente abhängig. Nach der Herstellung des Gels und seiner Polymerisierung, wurde das Gel in einem Gerät mit 1 x TAE-Puffer als Laufpuffer überschichtet. Jede DNA-Probe wurde mit 6x Ladepuffer (*Thermo Fischer Scientific, USA*) vermischt und danach 5 μ L in je eine Geltasche einpipettiert. Der Marker *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific, USA)* wurde ebenfalls in eine Geltasche pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt. Anschließend konnten die DNA-Banden unter UV-Licht mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht und analysiert werden.

2.3.3 Ethanolfällung

Zur Transfektion von *P. falciparum* wurde 50 μ g Plasmid-DNA benötigt. Hierfür wurde die Plasmid-DNA mittels Ethanol präzipitiert und mit 10 μ L TE-Puffer versetzt. Je nach Konzentration der Plasmid-DNA wurde das entsprechende Volumen von TE-Puffer eingesetzt. Dazu wurde 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat bei pH 5,4 und das dreifache Volumen 100% Ethanol vermengt. Nach dem Zentrifugieren, für 10 min bei 14000 x g, wurde der Überstand abgenommen. Danach wurde 50 μ L 70 %iger Ethanol hinzugefügt und erneut für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum vorsichtig abpipettiert und das Sediment in einer Sicherheitswerkbank getrocknet. Nach der Trocknung wurde 10 μ L TE-Puffer hinzugegeben und die Plasmid-DNA bei -20 °C für die Transfektion gelagert.

2.3.4 Immunfluoreszenzanalyse (IFA)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Immunfluoreszenzanalyse zur Charakterisierung der Expressionen der *vir*-Gene und der Entwicklungsstadien der Plasmodien in iE durchgeführt. An den C-Terminus jedes *vir*-Gens wurde das 3x HA-Tag angefügt, sodass das HA-Fusionsprotein durch Bindung des primären α -HA-Antikörpers (Hoffmann-LA Roche, Schweiz) und sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpers detektiert werden konnte. Der sekundäre Antikörper war mit dem roten Farbstoff Alexa Fluor 594 (Thermo Fischer Scientific, USA) konjugiert. Für die IFA wurde eine Parasitenkultur auf Objektträgern ausgestrichen und luftgetrocknet, wobei die Parasitämie größer als 5% sein musste. Die Fixierung erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur (RT) in Aceton. Unter Verwendung eines Silikonstiftes (DakoCytomation, USA) wurde ein Feld (ca. 1,5 cm x 2,5 cm) abgegrenzt. Zum Rehydrieren wurde 100 μ L 1x PBS auf das Feld gegeben und der Objektträger für 10 min inkubiert. Die α -HA-Primärantikörper wurden in 1x PBS / 1% BSA verdünnt (Tabelle 6: Verwendete Primäre Antikörper) und danach 60 μ L davon auf das Feld pipettiert. Dieser Ansatz wurde für 2 Stunden bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung vorsichtig abpipettiert und es folgten drei zehninuitige Waschschrirte mit 1x PBS-Puffer auf einem Tischschüttler. Danach folgte eine Inkubation mit 60 μ L der verdünnten sekundären Antikörper (Tabelle 7: Verwendete Sekundäre Antikörper), wiederum zusammen mit dem Kernfarbstoff Hoechst 33342 (ein Verhältnis von 1:500 in PBS), für 1 Stunde bei RT unter Lichtausschluss in einer feuchten Kammer. Anschließend wurde der Ausstrich dreimal mit 1x PBS-Puffer, wie oben beschrieben, gewaschen. Schließlich wurde zur Fixierung ein kleiner Tropfen MOWIOL auf das Feld gegeben. Der Ausstrich wurde mit einem Deckgläschen bedeckt und über Nacht bei RT im Dunkeln getrocknet. Danach wurde der Ausstrich lichtgeschützt bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Visualisierung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioskop M1 mit einer 100x/1,4 Immersionsölinse, unter Verwendung einer Hamamatsu Orca C4742-95 Kamera und der Zeiss Axiovision Software. Die Bilder wurden mit Hilfe der Software ImageJ (*National Institute of Health*, USA) bearbeitet.

2.3.5 Statischer Bindungsversuch der der VIR-Proteine mit humanen Rezeptoren

In diesem Versuchsansatz wurde die Zytoadhäsion der VIR-Proteine an die humanen Rezeptoren CD36 und ICAM-1 unter statischen Bedingungen untersucht, wobei die *Plasmodium*-Kultur sich in Schizontenstadium befand. In diesem Versuch wurden zwei transfizierte CHO-745-Zelllinien verwendet, wobei einer der beiden Endothelzellrezeptoren

CD36 oder ICAM-1 auf ihrer Oberfläche präsentiert wurden, wohingegen GFP intrazellulär synthetisiert wurde.

Als Kontrollzelllinie wurde ebenfalls die CHO-745-Zelllinie verwendet, welche mit dem gleichen Vektor transfiziert wurde. Jedoch enthielt dieser Vektor nur das *gfp*-Gen. Bei der Kontrollzelllinie (CHO-GFP) wurde daher nur GFP in das Cytoplasma aber kein extrazellulärer Rezeptor synthetisiert. Alle CHO-Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe Bruchhaus zur Verfügung gestellt.

Für den Bindungsversuch wurde eine Parasitämie von mindestens 5% im Schizontenstadium benötigt. Die Parasitenkultur war deshalb im Alter zwischen 34 und 40 Stunden nach Infektion.

Plastik-Deckplättchen wurden in Vertiefungen einer 24-Well-Platte gelegt. Jedes Plastik-Deckplättchen wurde mit 500 µL 1% Gelatine in PBS beschichtet, dann wurde die 24-Well-Platte für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Gelatine abgesaugt. 48 Stunden vor dem Versuch wurden dann die CHO-Zellen vorbereitet, wobei die CHO-Zellen mit dem entsprechenden Endothelzellrezeptor als Triplikat auf den Plastik-Deckplättchen ausgesät wurden. Dafür wurde 500 µL Zellsuspension auf jedes Deckplättchen pipettiert, wobei die Konzentration der Zellen im Kulturmedium 3×10^4 CHO-Zellen/mL betrug. Die CHO-Zellen wurden daraufhin im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Für die Präabsorption wurde pro Parasiten-Zelllinie zusätzlich eine 25cm² Zellkulturflasche mit CHO-GFP-Zellen vorbereitet (Präabsorptionsfläche).

Am Tag des Versuchs wurde die Parasitämie bestimmt und auf 5% mit Bindungsmedium eingestellt. Um einen Hämatokritwert von 1% zu erreichen, wurde frisches Blut dazugegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Vorbereitung des Präabsorptionsschritts wurde 10 Minuten vor dem Ablauf der Inkubationszeit die Präabsorptionsfläche mit 4 mL Bindungsmedium gewaschen, und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Bindungsmedium abgesaugt. Die Parasiten wurden in die Präabsorptionsfläche überführt und zusammen mit den CHO-GFP-Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert, alle 15 Minuten wurde die Flasche geschwenkt. Dadurch wurde die Anzahl von Erythrozyten, die eine unspezifische Bindung aufwiesen, minimiert.

15 Minuten vor dem Ablauf des Präabsorptionsschritts wurde das Medium aus den Vertiefungen der 24-Well-Platte abgesaugt, dann wurde jeweils 500 µL Bindungsmedium hinzugegeben und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dem Präabsorptionsschritt wurden

jeweils 500 μL der nicht gebundenen iE zu den CHO-Zellen hinzugegeben und dann für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, wobei die Platte wiederum jede 15 Minuten geschwenkt wurde.

Für das Waschen wurde eine neue 24-Well-Platte benötigt, wobei 600 μL frisches Bindungsmedium in die Vertiefungen pipettiert wurde. Die Platte wurde in einem Winkel von 45° aufgestellt. Nach der Inkubationszeit wurden die Deckgläschen einzeln aus den Vertiefungen genommen, vorsichtig in ein mit Bindungsmedium gefülltes Becherglas getaucht und dann mit der zellbewachsenen Seite schräg nach unten in die vorbereitete Platte überführt. Die Zellen wurden für 45 Minuten bei RT inkubiert, wodurch die ungebundenen Erythrozyten nach unten sinken konnten. Zur Fixierung der Zellen wurde 1% Glutaraldehyd in 1x PBS verwendet. In eine neue 24-Well-Platte wurden die Deckplättchen mit der zellbewachsenen Seite nach oben überführt, danach wurde 500 μL Fixierlösung auf die Deckplättchen pipettiert und die Platte für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Glutaraldehyd entsorgt und pro Vertiefung 300 μL filtrierter Giemsa-Lösung (10% in Weiser-Puffer) hinzugegeben. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei RT angefärbt. Zum Waschen der Farbrückstände wurden die Deckplättchen dreimal in mit destilliertem Wasser gefüllten Bechergläsern eingetaucht und an der Luft getrocknet. Mit einem Tropfen CV Leica Mounting Solution wurden die Deckplättchen mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf einem Objektträger fixiert und über Nacht bei RT getrocknet.

Für die Auswertung wurde pro Deckplättchen an drei zufällig ausgewählten Stellen die Anzahl der CHO-Zellen und der daran gebundenen iE ausgezählt. Danach wurde die Anzahl der gebundenen iE an 100 CHO-Zellen ermittelt.

2.3.6 Bindung der PfEMP1-var02-Domänen an Ni-Beads und die Reinigung

Für die Reinigung und Markierung der rekombinanten Domänen wurde Ni-Beads verwendet. Ein Vorteil der Verwendung der Ni-Beads ist, dass eine zusätzliche Reinigung der Domänen wie über eine Ni-Agarose-Säule nicht mehr nötig ist und die Domänen nach der Lyse der Bakterien direkt weiter bearbeitet werden können. Um eine Bindung mit den Ni-Beads zu ermöglichen, wurden die PfEMP1-Domänen im Rahmen der rekombinanten Expressierung mit einem HIS-Tag gekoppelt, wobei sich zwischen dem HIS-Tag und der Domäne noch eine Löslichkeitserhöhende TEV-Domäne befindet.

2 mL der in Reaktionsgefäße aufgeteilten gefrorenen Domänen-Lösung wurden aufgetaut, 12,5 μL Ni-Beads hinzugegeben und beides gut gemischt. Diese Lösung wurde über Nacht bei 4 °C auf einen Rollenmischer gelegt.

Am nächsten Tag wurden die Reaktionsgefäße für den Waschschrift für etwa 30 Sekunden an einen Magnetständer gehangen. Wegen der magnetischen Eigenschaft der Ni-Beads wurden die an Ni-Beads gebundenen Domänen vom Magnetständer angezogen, der Überstand wurde abpipettiert. Dann wurde Puffer A mit 1M, 10mM und 20mM Imidazol versetzt. Die Reaktionsgefäße wurden aus dem Magnetständer genommen, 1 mL Puffer A mit 10 mM Imidazol in jedes Reaktionsgefäß hinzugegeben und gut gemischt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße wieder für ca. 2 Minuten an den Magnetständer befestigt.

Der Waschschrift wurde einmal mit 1 mL Puffer A mit 10 mM Imidazol, zweimal mit 1 mL Puffer A mit 20 mM Imidazol und zweimal mit 1 mL Puffer A mit 1 M Imidazol wiederholt. Danach wurde der Überstand abpipettiert, und in jedes Reaktionsgefäß 1 mL Puffer A hinzugegeben. Die Ni-Beads-Domäne-Lösungen wurden daraufhin für den Bindungsversuch bei 4 °C gelagert.

2.3.7 Bindungsversuch der sieben an Ni-Beads gebundenen *PfEMP1-var02*-Domänen an Endothelzellrezeptoren

Im Gegensatz zu dem Bindungsversuch der VIR-Proteine wurde in diesem Versuch keine iE sondern rekombinante Domänen verwendet, um das Bindungsverhalten zwischen den *PfEMP1-var02*-Domänen und den Endothelzellrezeptoren CD36, ICAM-1, CD9, CD151 und P-Selektin zu untersuchen. Diese fünf transfizierten CHO-Zelllinien und die *PfEMP1-var02*-Domänen wurden freundlicherweise von der Doktorandin Jana Brehmer (BNITM) zur Verfügung gestellt.

Zwei Tage vor dem Bindungsversuch wurden die CHO-Zellen ausgesät, wobei die Zellkonzentration 1×10^5 Zellen/mL betrug. Für die Kontrolle wurden bei jeder 24-Well-Platte auf drei Plastik-Deckplättchen nur die CHO-ICAM-1-Zellen ausgesät, auf den Rest wurden die zu untersuchenden transgenen CHO-Zellen ausgesät. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Am Tag des Bindungsversuchs wurde das Bindungsmedium mit 10 mM Imidazol und 0,5% BSA versetzt (Medium A). Das Kulturmedium in den Vertiefungen wurde abgesaugt und danach 500 µL Bindungsmedium hinzugegeben. Die CHO-Zellen wurden für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Beadlösung, in der sich die an Ni-Beads gebundenen Domänen befanden, mit angesetztem Bindungsmedium verdünnt (1:10). Nach der Inkubationszeit wurde das Bindungsmedium abgesaugt und 500 µL Beadlösung in die Vertiefungen pipettiert. Mit jeder 24-Well-Platte wurden sieben *PfEMP1-var02*-Domänen untersucht, wobei jede Domäne dreifach untersucht wurde. Für die Kontrolle

wurde 500 μL Beadlösung der an Ni-Beads gebundenen DBL β 5-Domäne von IT4-var27 in die Vertiefungen, in welchen sich die CHO-ICAM-Zellen befanden, hinzugegeben. Die Platten wurden für 30 Minuten bei 37 °C und 5%CO₂ inkubiert und alle 10 Minuten geschwenkt. Während der Inkubationszeit wurde eine neue 24-Well-Platte mit 500 μL Bindungsmedium in jeder Vertiefung vorbereitet und im 45° Winkel aufgestellt. Zum Waschen wurden 2 Bechergläser mit Bindungsmedium vorbereitet. Nach der Inkubationszeit wurden die Deckplättchen dreimal vorsichtig in diese Bechergläser getaucht. Die Deckplättchen wurden mit der zellbewachsenen Seite nach unten in die vorbereitete Platte überführt. Dann wurden die Zellen für 45 Minuten bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde eine neue 24-Well-Platte mit 500 μL 1%iger Glutaraldehyd-Lösung in jeder Vertiefung vorbereitet. Die Deckplättchen wurden mit der zellbewachsene Seite nach oben in diese neue Platte überführt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Glutaraldehyd-Lösung verworfen, 300 μL gefilterte Giemsa-Lösung zu jeder Vertiefung hinzugegeben und die Platte für 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Deckplättchen mit Wasser wurde die zellbewachsene Seite der Deckplättchen mit Hilfe von CV Leica Mounting Solution auf einem Objektträger fixiert, wie oben beschrieben.

Für die Auswertung wurden unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops pro Deckplättchen drei Aufnahmen an drei zufällig ausgewählten Stellen gemacht. Mit Hilfe des Programms ImageJ wurden die Bilder in Graustufenbilder umgewandelt, wobei die Ni-Beads dunkler als die CHO-Zellen und die CHO-Zellen dunkler als der Hintergrund sind.

Aus einem Bild wurden 2 Bilder gemacht, wobei auf dem ersten Bild nur die Ni-Beads und auf dem zweiten Bild nur die Ni-Beads und die CHO-Zellen erkennbar sind.

Durch die Binarisierungsmethode (ein Schwellenwertverfahren) werden Bildpunkte (Pixel) eines Graustufenbildes aufgrund ihrer Intensität in verschiedene Gruppen eingeordnet, wodurch sich die Ni-Beads, die CHO-Zellen und der Hintergrund unterscheiden lassen. Danach wurde die Anzahl der dunklen Pixel, welche mit der Anzahl der Ni-Beads und der CHO-Zellen korrespondiert, vom Programm gezählt. Anschließend wurde der Anteil der CHO-Zellen, die durch die Bindung mit den an Ni-Beads gebundenen Domänen bedeckt wurden, bestimmt. Deren Anzahl korrespondiert mit der Anzahl der hellen Pixel.

2.3.8 Rekombinante Expression der verschiedenen *PfEMP1*-Domänen des *var02*-Genes in *E. coli*

Die Herstellung der sieben rekombinanten *PfEMP1*-*var02*-Domänen in dem bakteriellen Expressionssystem *E. coli* wurde freundlicherweise von der Doktorandin Jana Brehmer durchgeführt.

2.3.8.1 Gewinnung genomischer DNA

Zum Extrahieren genomischer DNA wurde eine *P. falciparum*-Kultur für 5 Minuten bei 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Danach wurde ein gleiches Volumen von HT-PBS hinzugegeben. Das Extrahieren genomischer DNA wurde nach dem beiliegenden Protokoll von QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) durchgeführt, wobei die genomische DNA mit einem Volumen von 50 bis 100 µL eluiert. Die DNA-Konzentration wurde durch photometrische Messung bei 260 nm bestimmt. Anschließend wurde die genomische DNA bei -20°C aufbewahrt.

2.3.8.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Vervielfältigung bestimmter Gen-Sequenzen erfolgte mittels PCR. Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µL wurde nach dem folgenden Schema angewendet:

Tabelle 12: Reaktionsansatz PCR

2 µL	DNA-Template
5 µL	Forward Primer 10 µM
5 µL	Reverse Primer 10 µM
5 µL	dNTPs 10 mM
10 µL	5x Green Go Taq Flexi Buffer
4 µL	MgCl ₂ 25 mM
0,5 µL	Go Taq DNA Polymerase 5 U/ µL + PWO (19:1)
18,5 µL	Wasser HPLC gradient grade
<hr/>	
50 µL	Gesamtvolumen

Die Vervielfältigung wurde in einem programmierbaren Thermoblock durchgeführt, wobei das folgende Temperaturprogramm eingestellt wurde (siehe nächste Seite).

Tabelle 13: Temperaturprogramm PCR

Zyklus	Temperatur	Zeit
1	95 °C	2 min
35-40	95 °C	45 sec
	Annealingtemperatur	30 sec
	68 °C	2 min
1	68 °C	10 min

Die Annealingtemperatur ist dabei von der Länge und die Sequenz des verwendeten Primers (Tabelle 8: Verwendete Primer. Bezeichnung der Domäne nach Rask *et. al.* (2010)) abhängig.

2.3.8.3 Präparative Agarosegel-Elektrophorese

Der Erfolg der PCR wurde mittels der Agarosegel-Elektrophorese überprüft, wobei enthaltene DNA-Fragmente identifiziert und getrennt werden (Abschnitt Agarosegel-Elektrophorese). Da der PCR-Puffer (Promega) gleichzeitig als Ladepuffer dient, wurde zu den zu identifizierenden PCR-Produkten kein Ladepuffer (*Thermo Fischer Scientific, USA*) hinzugegeben.

Die gewünschten DNA-Fragmente, welche die richtige Größe aufwiesen, wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel entfernt. Unter Verwendung des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* Kit von Macherey und Nagel wurde die DNA extrahiert und gereinigt. Anschließend wurde die Größe der gereinigten DNA nochmals durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft (Abschnitt Agarosegel-Elektrophorese).

2.3.8.4 Klonierung der PCR-Amplifikate in den TOPO-Vektor

Die gereinigten DNA-Fragmente wurden in den TOPO pCR2.1-Vektor (Invitrogen) kloniert. Nach Herstellerangaben des *pCR 2.1-TOPO Kits* (Invitrogen) wird die Klonierung und Transformation in One Shot TOP 10-Zellen durchgeführt. Anschließend wurden 40 µL 20 %iges 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-galaktopyranosid (X-Gal) in DMSO (w/v) zu den Zellen hinzugegeben, um die positiven Bakterienkolonien durch die Blau-Weiß-Selektion zu selektieren. Die transformierten Bakterien wurden auf einer vorgewärmten Agarplatte mit einem Selektionsantibiotikum (LB-Agar + 100 µg/mL Ampicillin) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Anschließend wurden die weißen Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und in einem Kulturröhrchen mit vorbereitetem LB-Amp-Medium (3 mL LB/ 3 µL Amp) resuspendiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht auf einem Schüttler. Am Folgetag wurde die Isolierung der Plasmid-DNA mittels *Nucleo Spin Plasmid*

Kit von Macherey und Nagel durchgeführt. Schließlich wurde die erhaltene DNA in 50 μL Elutionspuffer gelöst.

2.3.8.5 Kontrolle der erfolgreichen Integration des gewünschten Inserts in den TOPO-Vektor

Um sicher zu gehen, dass das Plasmid das gewünschte Insert (engl. *gene of interest*, GOI) enthielt, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt (Abschnitt Restriktionsverdau). Hierbei wurden die Enzyme BamHI und EcoRI (ThermoFisher) und 1 μL von *10x FastDigest Buffer* (grün) ThermoFisher statt *10x CutSmart Buffer* verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte für 15 Minuten bei 37 °C und 5 Minuten bei 65 °C im Heizblock. Anschließend folgte die Agarosegel-Elektrophorese (Abschnitt Agarosegel-Elektrophorese), um die Größe des gewünschten Inserts zu überprüfen. Im Anschluss erfolgte die Sequenzierung dieses Ansatzes durch die Firma *Microsynth SeqLab*, damit die erhaltene Sequenz mit der gewünschten Sequenz abgeglichen werden konnten.

2.3.8.6 Aufreinigung des Inserts aus dem TOPO-Vektor

Nach Bestätigung der erfolgreichen Sequenzierung wurde das GOI aus dem Vektor ausgeschnitten und gereinigt, damit die jeweiligen GOIs in den Expressionsvektor pRSET integriert werden konnten (Tidow *et al.*, 2009). Hierbei erfolgte ein Restriktionsverdau des GOI und des pRSET-Zielvektors für 30 Minuten bei 37 °C. Hierbei wurde folgender Reaktionsansatz angewendet:

Tabelle 14: Reaktionsansatz Restriktionsverdau 2

42 μL	TOPO-Vektor mit Insert / pRSET
1,5 μL	BamHI
1,5 μL	EcoRI
5 μL	<i>10x FastDigest Buffer</i> (grün)

Anschließend erfolgte eine präparative Agarosegel-Elektrophorese. Für die Reinigung des Inserts und des linearisierten pRSET Vektors wurde das *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* von Macherey und Nagel verwendet. Schließlich erfolgte zur Abschätzung der Konzentration des Inserts und des linearisierten pRSET Vektors erneut eine Agarosegel-Elektrophorese.

2.3.8.7 Ligation

Das gewünschte Insert und der linearisierte pRSET-Vektor konnten mittels des T4-Ligase-Kits (ThermoFisher) ligiert werden. Im Folgenden ist der Ansatz in 0,2 mL PCR-Tubes aufgeführt:

Tabelle 15: Reaktionsansatz Ligation

1,5 µL	10x T4-Ligasebuffer
1,0 µL	T4-Ligase
2,5 µL	ATP (10mM)
3,0 µL	Insert
1,0 µL	Vektor DNA
3-fache Konzentration der Vektor-DNA an Insert-DNA	
Mit H ₂ O auf 15 µL auffüllen	

Die Inkubation erfolgte bei 14 °C über Nacht oder bei 4 °C für 36 Stunden.

2.3.8.8 Hitzeschocktransformation und Isolierung der Plasmid-DNA

Nach der Ligation wurden 2 µL je Ansatz zu 100 µL kompetenten One Shot TOP 10-Zellen hinzugefügt und dann für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeschocktransformation bei 42 °C für 30 Sekunden. Die Zellsuspensionen wurden danach wiederum für 5 Minuten auf Eis inkubiert und dann 250 µL LB-Medium hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37°C für 30 Minuten auf einem Schüttler. Die transformierten Bakterien wurden daraufhin auf einer vorgewärmten Agarplatte mit einem Selektionsantibiotikum (LB-Agar + 100 µg/mL Ampicillin) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Anschließend wurden die gewachsenen Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und in einem Kulturröhrchen mit vorbereitetem LB-Amp-Medium (3 mL LB/ 3 µL Amp) resuspendiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht auf einem Schüttler. Am Folgetag wurde die Isolierung der Plasmid-DNA mittels des *Nucleo Spin Plasmid Kit* von Macherey und Nagel durchgeführt. Schließlich wurde die erhaltene DNA in 50 µL Elutionspuffer gelöst.

2.3.8.9 Die Expression der Proteindomänen in Shuffle-Zellen und der Zellaufschluss

Der *Suffle T7 Express Competent E.coli* Stamm (BioLabs) wurde verwendet, da dieser Stamm bei der korrekten Disulfidbrücken-Bildung von besonders gefalteten Proteinen unterstützen kann. Zur Erhöhung der Löslichkeit und der Bindungsfähigkeit der finalen Proteine an Ni-Beads wurde an das Ende des N-Terminals der Proteindomänen ein HIS-Tag und eine Lipoyl-Domäne gekoppelt.

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden 200 µL kompetente Shuffle-Zellen mit 2 µL Vektor-DNA versetzt. Der Ansatz wurde für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden. Die Zellen wurden für 5 Minuten erneut auf Eis

inkubiert. Nach Zugabe von 300 µL LB-Medium erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 1 Stunde auf einem Schüttler. Die transformierten Bakterien wurden auf einer vorgewärmten Agarplatte mit einem Selektionsantibiotikum (LB-Agar + 100 µg/mL Ampicillin) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Die Bakterienkolonien wurden mit 10 mL LB-Medium von der Agarplatte abgeschwemmt und dann in einen Kolben mit 500 mL LB-AMP-Medium (500 mL LB/ 500 µL Amp) überführt. Zunächst wurde der Kolben bei 37 °C in einem Schüttelinkubator gelegt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 (ca. 2-2,5 h) erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 500 µL 1M IPTG (Endkonzentration 1 mM). Im Anschluss wurde die Kultur bei 21 °C über Nacht in einem Schüttelinkubator inkubiert.

Für den Zellaufschluss wurde die Expressionskultur am nächsten Tag für 15 Minuten bei 4 °C, 800 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 30 mL Puffer A resuspendiert und dann in ein Becherglas überführt.

Die Zellsuspension wurde 3 x 1 Minute mit jeweils einminütiger Pause sonifiziert (50% Intervallbeschallung, Outputkontroll 5-6, Branson Sonifier 250). Schließlich wurde das Zellysate in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten bei 4 °C, 10000 g zentrifugiert. Der Überstand, in welchem sich die gewünschten HIS-getaggte Domänen befanden, wurde in je 2 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Für die Kontrolle der Expression wurde 100 µl Aliquot der Domäne abgenommen.

2.3.8.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der Nachweis der Domäne erfolgte mit SDS-PAGE. Hierzu wurden 10%iges Trenngel und 5%iges Sammelgel verwendet.

Tabelle 16: Zusammensetzung von SDS-Gelen

Komponente	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
Wasser (mL)	4,65	3,05
30 % Acrylamid 4K, Mix 37,5:1 (mL)	3,25	0,65
SDS-Trenngelpuffer pH 8,8 (mL)	2,82	-
SDS-Sammelgelpuffer pH 6,8 (mL)	-	1,25
25 % APS (µL)	75	25
TEMED (µL)	15	5

10 µl der zu analysierenden Proben wurden mit jeweils 10 µl 2x Laemmli-Puffer gemischt und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, um sie zu denaturieren. Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde das Gel mit 1x SDS-Elektrophoresepuffer überschichtet. Zunächst erfolgte die

Gelelektrophorese bei 90 V. Als die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreichte, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Zur Detektion der Domänenbanden wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung über Nacht auf einen Schüttler gelegt. Für die Bestimmung der Größe und der Menge der zu analysierenden Domänen wurde die *PageRuler Prestained Protein Ladder* (ThermoFisher) verwendet.

2.3.8.11 Western Blot-Analysen

Mit Hilfe der Western Blot-Analyse können spezifische Proteine in einem Proteingemisch nachgewiesen werden, wobei die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine in 1x Transferpuffer auf eine Nitrocellulosemembran transferiert wurden. Der Proteintransfer erfolgte während einer Stunde bei 400 mA. Die Membran wurde mit einer Milchlösung (5 % Milchpulver in TBS) für 30 Minuten bei RT auf einem Rollenmischer geblockt und danach mit dem primären Antikörper (Anti-HIS (*mouse*) Verdünnung 1:5000 in PBS 2,5 % Milchpulver) bei 4°C über Nacht auf einem Rollenmischer inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte zweimaliges Waschen für je 10 Minuten in TBS-Tween auf einem Rollenmischer und ein dritter Waschgang in TBS, ebenfalls auf einem Rollenmischer. Schließlich wurde die Membran erneut mit der Milchlösung für 30 Minuten bei RT auf einem Rollenmischer geblockt und danach mit dem sekundären Antikörper (Anti-mouse-HRP (Kaninchen) Verdünnung 1:10000 in TBS 2,5 % Milchpulver) für 2 Stunden bei RT auf einem Rollenmischer inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die ECL-Lösung angesetzt. Schließlich wurde die ECL-Lösung auf die Membran gegeben und es erfolgte eine Inkubation für 2 Minuten bei RT. Abschließend wurden die Chemilumineszenz-Signale auf einem Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) detektiert.

3 Ergebnisse

Wie bereits in Abschnitt Zielsetzung beschrieben, verfolgt diese Arbeit zwei Hauptziele. Das erste Ziel ist die Untersuchung der Interaktion zwischen humanen Endothelzellrezeptoren und spezifischen Oberflächenantigenen von *P. vivax*. Das zweite Ziel ist die Identifikation von Domänen der PfEMP1-Moleküle, welche die Bindung an verschiedene Endothelzellrezeptoren vermitteln können.

3.1 Untersuchung der VIR-Proteine von *P. vivax*

Neben *P. falciparum* ist auch *P. vivax* für eine erhebliche Krankheitslast verantwortlich (Mendis *et al.*, 2001). *P. vivax* unterscheidet sich von *P. falciparum* unter anderem dadurch, dass *P. vivax* eine ruhende Form der parasitären Protozoen in der Leber aufweist (Hypnozoitenstadium). Viele unabhängige Studien haben gezeigt, dass *P. vivax* in der Lage ist, an verschiedenen Wirtsrezeptoren zu zytoadhärieren. Die Interaktionspartner, die diese Zytoadhäsion vermitteln sind aber bisher noch nicht identifiziert (Bernabeu *et al.*, 2012, Carvalho *et al.*, 2010, Chotivanich *et al.*, 2012, Marín-Menéndez *et al.*, 2013). Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wurde die Bindungsfähigkeit von fünf dieser VIR-Proteine an die humanen Endothelzellrezeptoren CD36 und ICAM-1 ermittelt. Für diese fünf VIR-Proteine konnte in einer vorangegangenen Studie (Dissertation - Torben Rehn, 2020) gezeigt werden, dass im Trophozitenstadium befindliche infizierte Erythrozyten an CD36 binden können. In dieser Studie soll dieses Ergebnis mit transgenen *P. falciparum*-Parasiten, die sich im Schizontenstadium befinden, verifiziert werden.

3.1.1 Nachweis der Expression von transfizierten VIR-Proteinen in *P. falciparum*-Zelllinien

Wie in der Einleitung erwähnt wurden in dieser Arbeit 7 VIR-Proteine analysiert. Sechs der entsprechenden Transfektanten wurden während vorhergehenden Arbeiten hergestellt und im Stickstofftank bei -180 °C gelagert. In dieser Arbeit wurde zusätzlich noch eine neue Transfektante hergestellt, welche das VIR-Protein PVX_108770 exprimiert. Die erfolgreiche Expression der *vir*-Gene wurde mittels des Immunfluoreszenz-Assays (IFA) überprüft.

Zur Markierung der Lokalisierung der exprimierten VIR-Proteine wurde ein dreifacher HA-Tag (Hemagglutinin) an den C-Terminus des VIR-Proteins fusioniert (Abbildung 2: Aufbau der VIR-Proteine, rote Färbung).

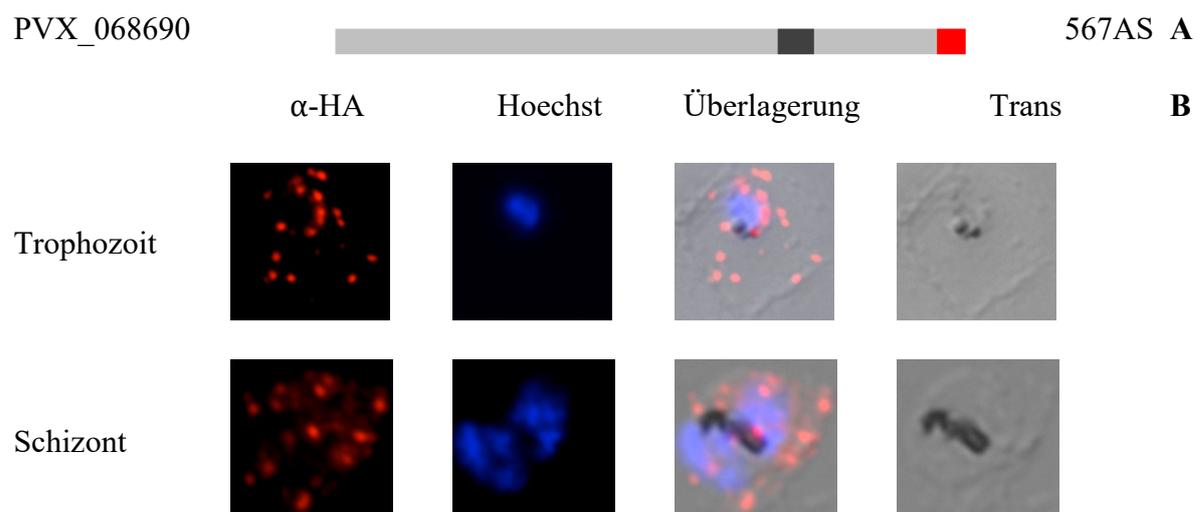
ID-Gen	Schematische Darstellung der Genstruktur	Länge	Name
PXV_050690		405 AS	VIR6- <i>putative</i>
PXV_060690		694 AS	VIR18- <i>related</i>
PXV_093715		528 AS	VIR5- <i>like</i>
PXV_068690		567 AS	VIR18- <i>putative</i>
PXV_113230		430 AS	VIR14- <i>relat</i>
PXV_108770		409 AS	VIR14- <i>putative</i>
PXV_096925		307 AS	VIR15- <i>like</i> <i>hypothetical Protein</i>

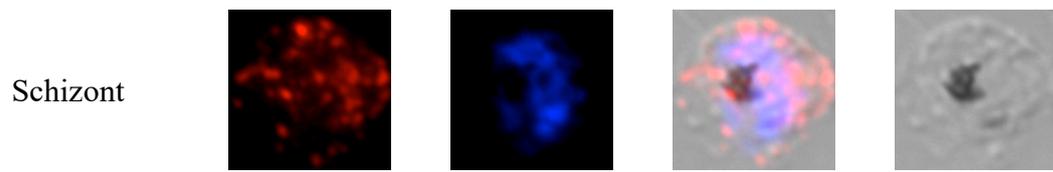
Abbildung 2: Aufbau der VIR-Proteine

Die Abbildung zeigt den Aufbau von sieben untersuchten VIR-Proteinen mit ihrer Gen-ID und der molekularen Masse der VIR-Proteine inklusive des 3xHA-Tags. PVX_050690 sollte als Kontrolle dienen, da es keine vorhergesagte Transmembrandomäne enthält. VIR-Protein (hellgrau); Transmembrandomäne (dunkelgrau); 3xHA-Tag (rot); PEXEL-Motiv (gelb).

Die in einem Stickstofftank gelagerten Transfektanten aus vorhergehenden Arbeiten wurden entnommen, aufgetaut und kultiviert. Mittels eines Immunfluoreszenz-Assays (IFA) und der spezifischen Antikörper konnte das mit dem dreifach HA-Tag markierte Fusionsprotein innerhalb der iE im Trophozoiten- und Schizontenstadium unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Dadurch konnte ermittelt werden, ob die transfizierten *P. falciparum* Zelllinien das *vir*-Gen exprimieren und das entsprechende Fusionsprotein translatieren.

Zusätzlich wurde der Farbstoff Hoechst33342 (SigmaAldrich, USA) zur Färbung der Zellkerne verwendet. Für eine erfolgreiche Durchführung der Untersuchung war eine Parasitämie von mindestens 5% erforderlich.

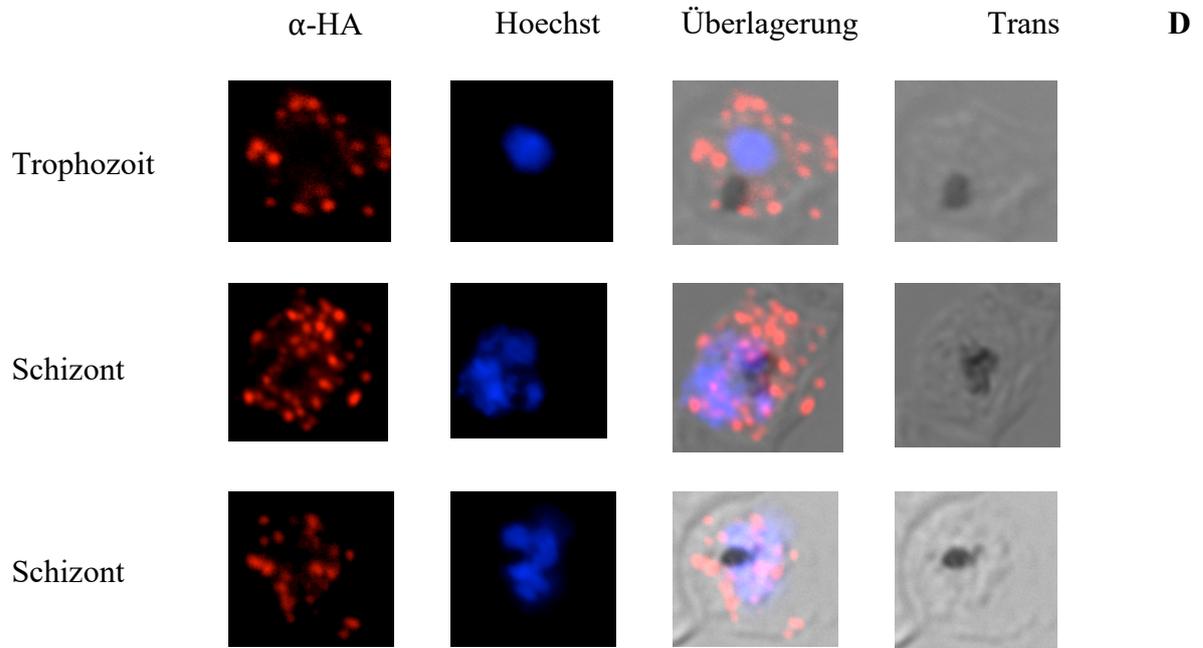




PVX_093715



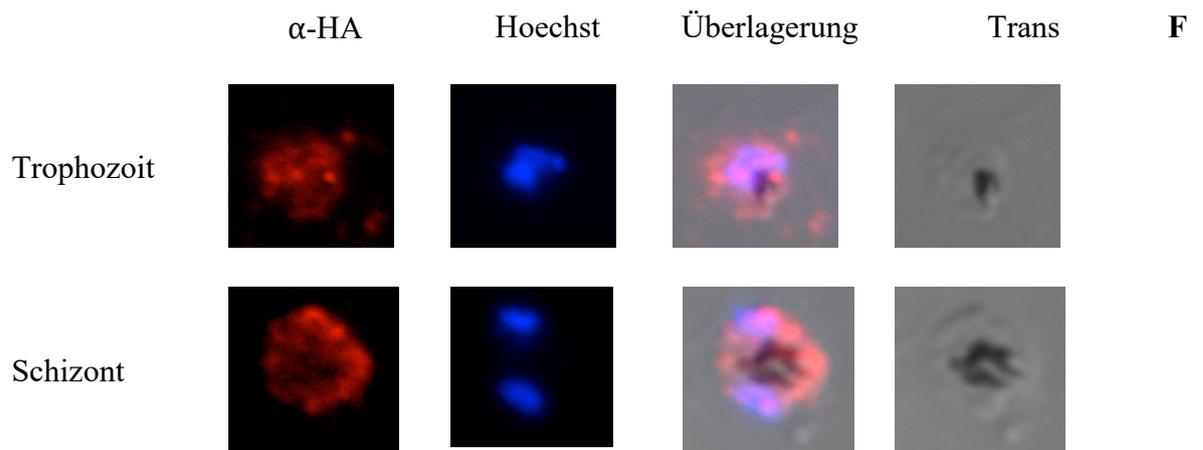
528 AS C

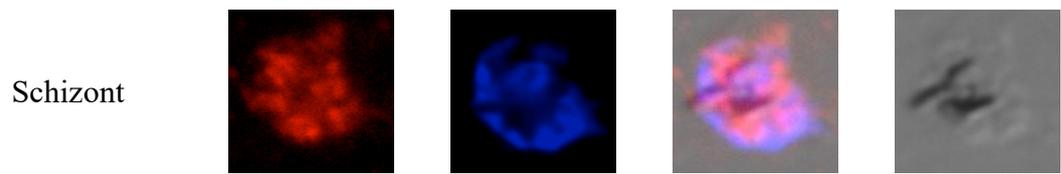


PVX_113230



430AS E

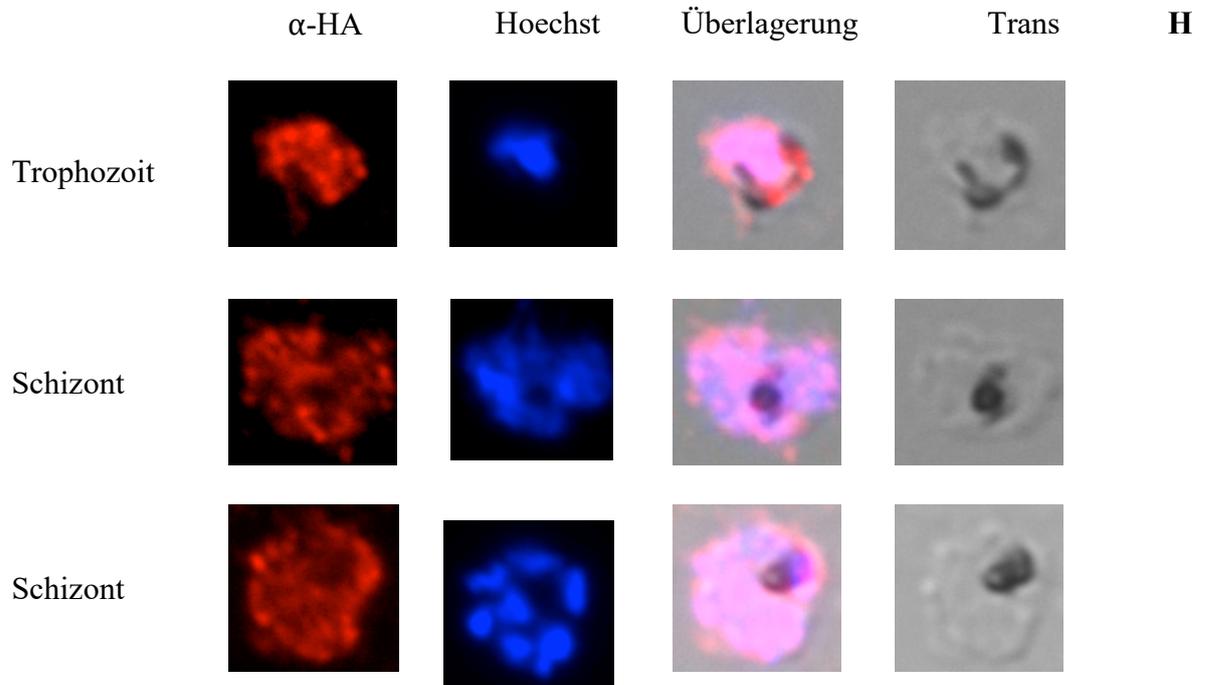




PVX_050690



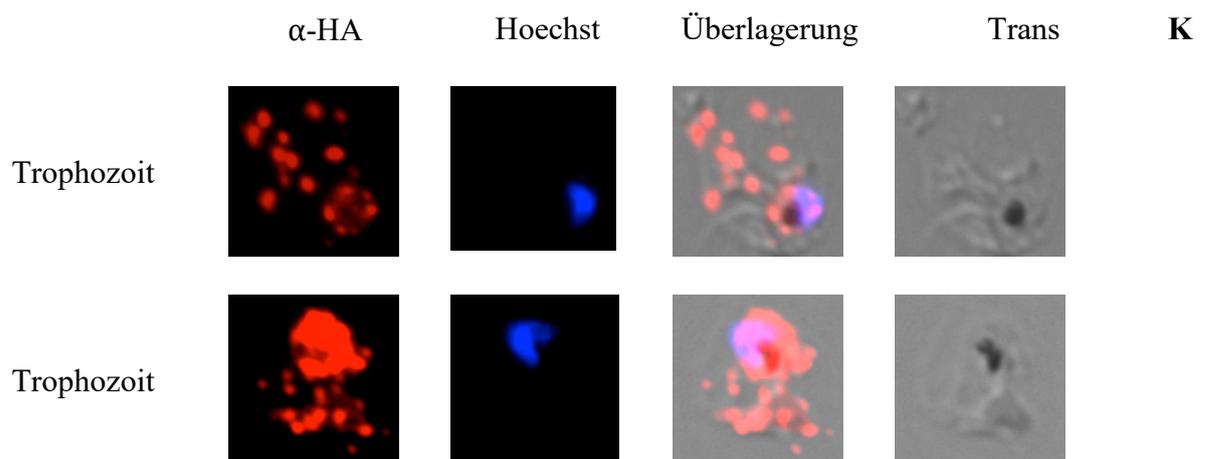
443AS G



PVX_096925



307AS I



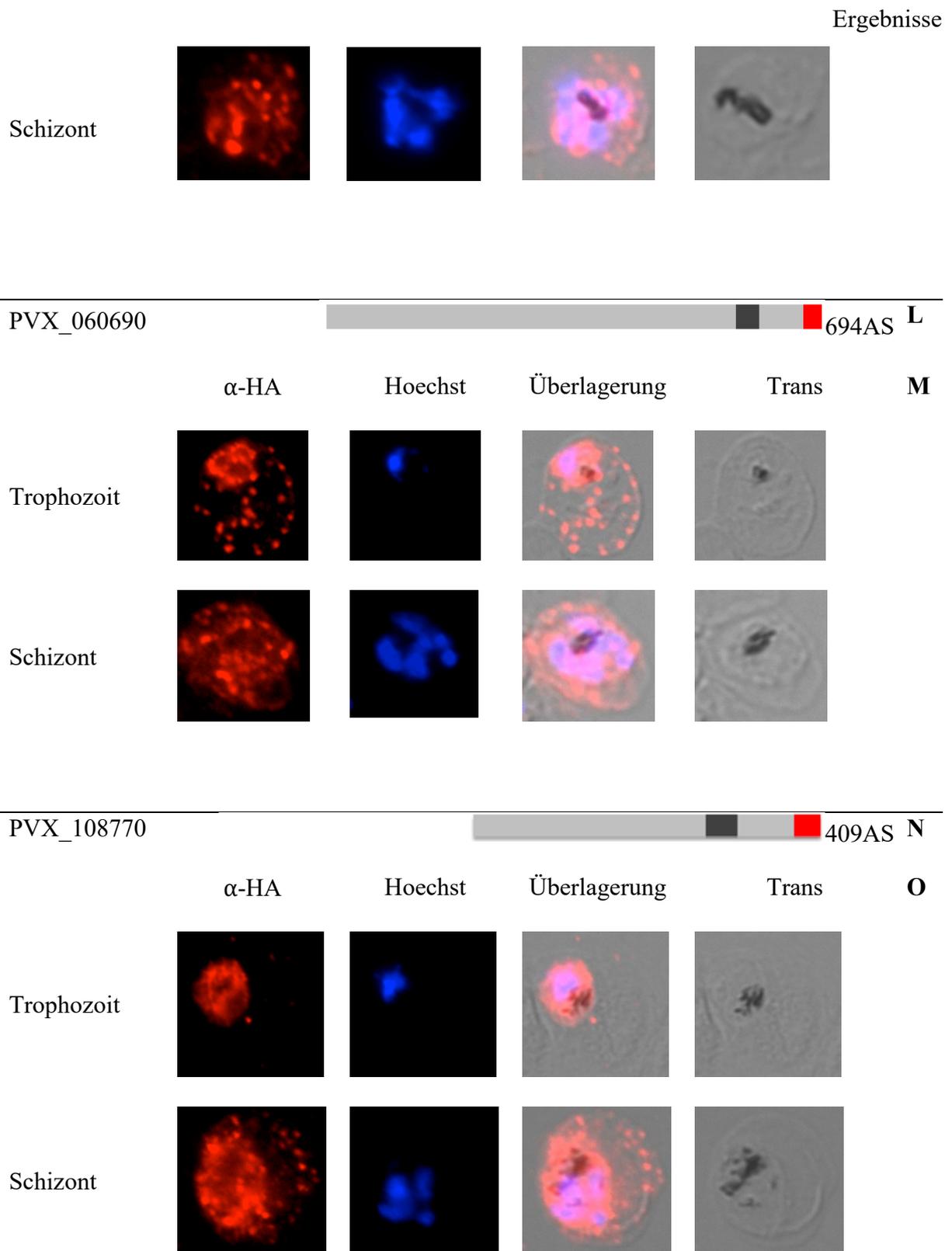


Abbildung 3: Immunfluoreszenz-Analyse der VIR-Proteine in transgenen *P. falciparum* Zelllinien.

Unter Verwendung von α -HA-Primärantikörpern und sekundären rot fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurden VIR-Proteine detektiert. Zur Anfärbung von DNA wurde ein Kernfarbstoff Hoechst 33342 (Blau) verwendet. A, C, E, G, I, L, N: Schematische Darstellung der VIR-Proteine, welche mit einem 3xHA-Tag (rot) fusioniert sind (Transmembrandomäne: dunkelgrau, PEXEL-Motiv: gelb). B, D, F, H, K, M, O: Immunfluoreszenz-Analyse der transgenen *P. falciparum* Parasiten in Trophozoiten- und Schizontenstadium.

Bei allen Transfektanten können sowohl im Trophozoitenstadium als auch im Schizontenstadium die jeweiligen Fusionsproteine detektiert werden. Dieses gilt auch für die neu generierten PVX_108770-Transfektanten (Abbildung 3: Immunfluoreszenz-Analyse der VIR-Proteine in transgenen *P. falciparum* Zelllinien.).

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, besitzt PVX_050690 keine vorhergesagte Transmembrandomäne (TM), kein PEXEL-Motiv, kein Signalpeptid (SP) sowie kein putatives positives Exportsignal (PES) in der Aminosäuresequenz. Diese Vorhersagen werden durch die Lokalisation innerhalb des Parasiten bestätigt; das Protein wird nicht exportiert. Somit kann die entsprechende Transfektante als Negativkontrolle für die nachfolgenden Bindungsassays verwendet werden. Eine ähnliche Lokalisation ist für PVX_113230 zu erkennen, obwohl dieses eine vorhergesagte Transmembrandomäne besitzt.

Alle anderen untersuchten Proteine PVX_108770, PVX_060690, PVX_096925, PVX_113230, PVX_093715, PVX_068690 wurden exportiert und zeigten eine für die Maurer'schen Spalten typische Lokalisierung, was die Ergebnisse vorangegangener Studien (Torben Rehn, Dissertation 2020) bestätigt. Bei keiner der Transfektanten kann eine klassische Oberflächenfärbung der Erythrozytenmembran nachgewiesen werden. Teilweise, insbesondere für VIR_060690 sieht man allerdings eine punktuelle Lokalisation in unmittelbarer Nähe zur Erythrozytenmembran.

Des Weiteren zeigte sich bei den Proteinen PVX_108770, PVX_060690, PVX_096925, PVX_050690 und PVX_113230 eine Akkumulation der roten Färbung im Parasiten, was darauf schließen lässt, dass ein Teil des Proteins nicht exportiert wird (Abbildung 4 Spalte „Überlagerung“).

Aufgrund der Ergebnisse konnten alle transgenen *P. falciparum*-Zelllinien in den nachfolgenden Experimenten eingesetzt werden.

3.1.2 Untersuchung des Bindungsverhaltens von VIR-Proteinen an die humanen Endothelzellrezeptoren CD36 und ICAM-1 mittels einer statischen Bindungsanalyse

Im nächsten Schritt wurde die Interaktion zwischen den *P. falciparum* VIR-Transfektanten und den Endothelzellrezeptoren CD36 und ICAM-1 unter statischen Bedingungen analysiert. Für diese Untersuchungen wurden Parasiten eingesetzt, die sich im späten Trophozoiten- oder

Schizontenstadium befanden. Der Laborstamm 3D7 wurde hierbei als Kontrolle verwendet und mit den VIR-Transfektanten verglichen.

Bedauerlicherweise war es nur möglich fünf von sieben VIR-Transfektanten in dem Zeitraum dieser Arbeit zu analysieren.

Für die Expression der menschlichen Endothelzellrezeptoren wurden zwei transgene CHO-Zelllinien (engl. *chinese hamster ovary cells*) verwendet, welche die Rezeptoren CD36 bzw. ICAM-1 auf der Zelloberfläche präsentieren. Sowohl CD36 als auch ICAM-1 sind am C-terminus mit GFP fusioniert. Außerdem wurde eine CHO Zelllinie, welche GFP cytoplasmatisch exprimiert, als Negativkontrolle verwendet. In Abbildung 4: Statische Bindungsversuche sind die Ergebnisse des Bindungsverhaltens der verschiedenen VIR-Transfektanten dargestellt.

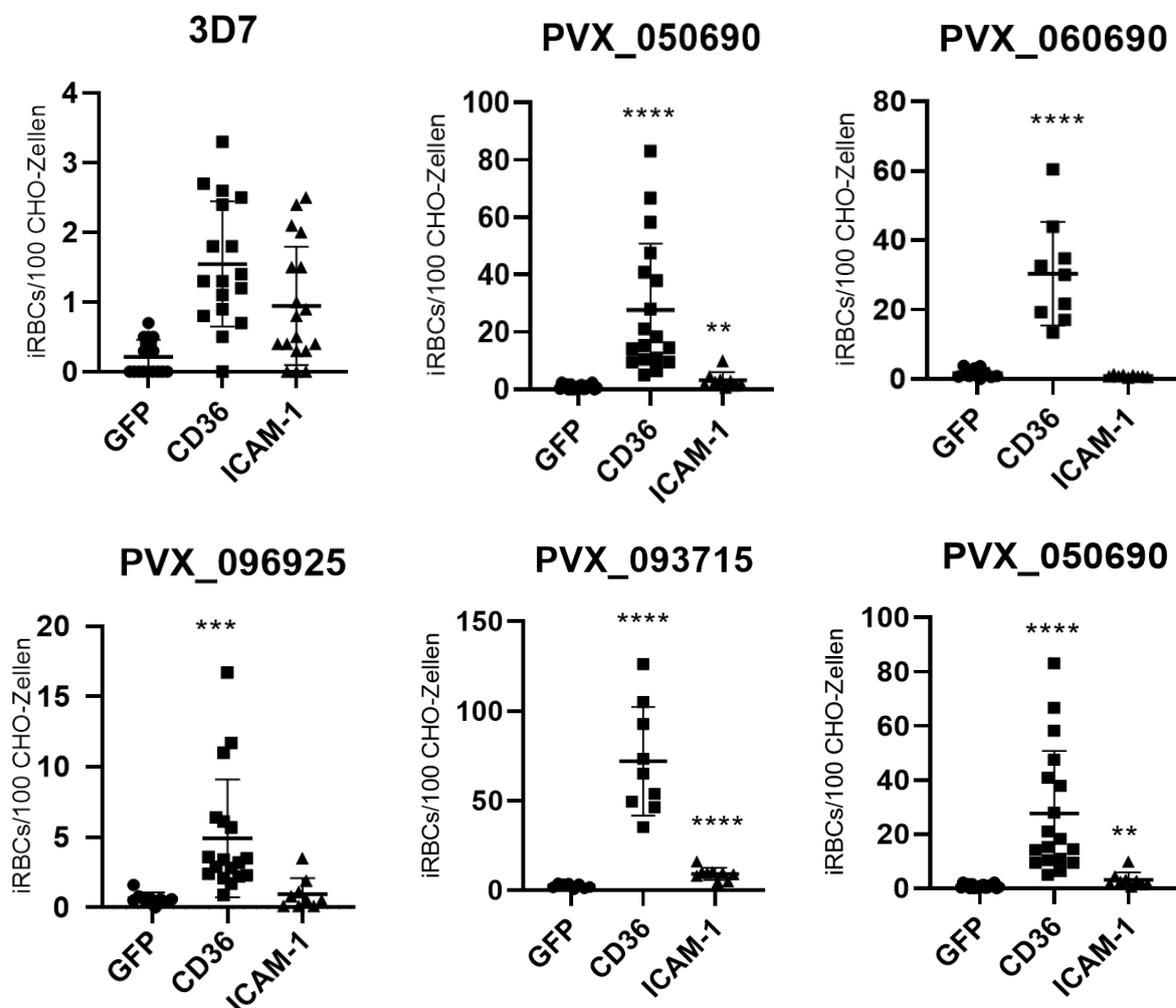


Abbildung 4: Statische Bindungsversuche

Zur Überprüfung des Bindungsverhaltens der Stammkultur 3D7 und den iE der 5 unterschiedlichen *P. falciparum*-Zelllinien an den Rezeptoren CD36 und ICAM-1. Jeder Punkt

repräsentiert einen Bindungsversuch mit einer Anzahl der gebundenen iE an 100 CHO-Zellen. Die CHO-GFP-Zellen (GFP) dienen als eine Negativekontrolle, wobei keine Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen präsentiert wurden. Die Bindungsversuche wurden jeweils im Triplikat durchgeführt. Für die Auswertung wurden die Anzahl der CHO-Zellen und der daran gebundenen iE an drei zufällig ausgewählten Stellen mikroskopisch ausgezählt. Die Anzahl der gebundenen iE wurde unter Verwendung der Software Prism mit einem t-Test analysiert, wobei die Werte auf die Stammkultur bezogen wurden. **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$.

Für den Laborstamm 3D7 konnte sowohl an CD36 als auch an ICAM-1 keine signifikante Bindung nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu zeigten alle untersuchten VIR-Transfektanten eine signifikante Bindung an CD36. Bei der PVX_093715-Transfektante wurde die stärkste Bindung detektiert; die Anzahl der gebundenen iE betrug $71,9 \pm 28,6$ iE/100 CHO-Zellen. Die PVX_060690-Transfektante wies im Vergleich zur PVX_093715-Transfektante eine etwa halb so starke Bindung mit einer Anzahl von $30,4 \pm 14,1$ iE/100 CHO-Zellen auf. Dicht gefolgt wird PVX_060690 von der PVX_050690-Transfektante mit $27,6 \pm 22,4$ iE/100 CHO-Zellen und der PVX_068690-Transfektante mit $25,6 \pm 8,6$ iE/100 CHO-Zellen. Die PVX_096925-Transfektante weist mit $4,9 \pm 4,1$ iE/100 CHO-Zellen eine sehr schwache, jedoch immer noch signifikante Adhärenz an den Endothelzellrezeptor CD36 auf.

Im Gegensatz zu CD36 zeigen nur zwei der VIR-Transfektanten eine im Vergleich zu dem Laborstamm 3D7 schwache, aber signifikante Bindung an ICAM-1 auf (PVX_093715: $9,1 \pm 3,2$ iE/100 CHO-Zellen; PVX_050690: $3,2 \pm 2,6$ iE/100 CHO-Zellen).

3.1.3 Die Ähnlichkeit der Proteinsequenzhomologie der gebundenen VIR-Proteine

Um den Unterschied zwischen bindenden und nicht bindenden VIR-Proteinen zu identifizieren, wurden deren Aminosäuresequenzen miteinander verglichen, sodass möglicherweise ein Zusammenhang mit einer Funktion der VIR-Proteine erkannt werden kann.

Dafür wurden die Aminosäuresequenzen der 13 VIR-Proteine, von welchen die Bindungseigenschaft der vorangegangenen Studien (Torben Rehn, Dissertation 2020) untersucht wurde, aus der biologischen Datenbank PlasmoDB entnommen (<https://plasmodb.org/plasmo/app/>) und mittels der Software MacVector analysiert.

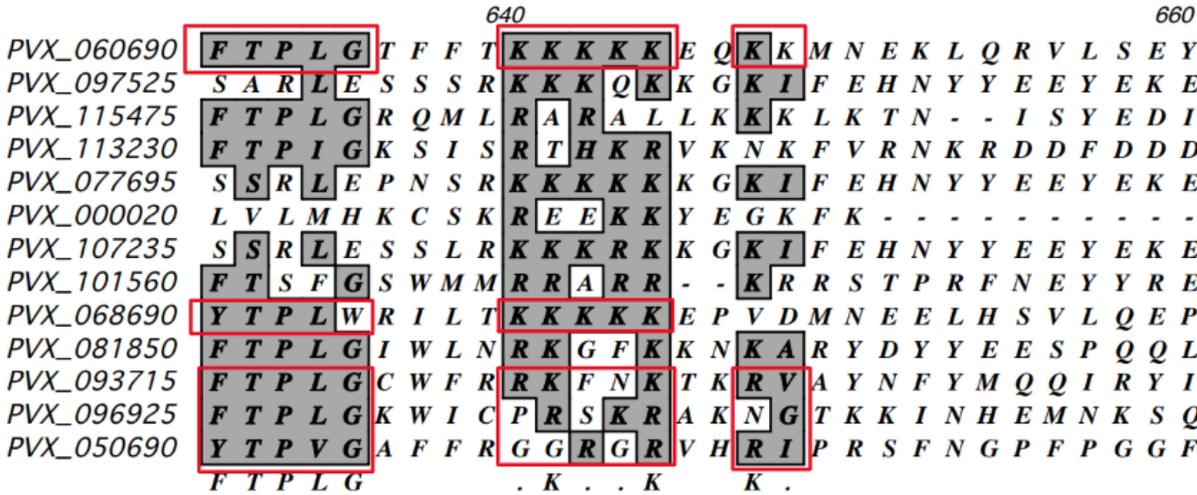


Abbildung 5: Sequenzvergleich der untersuchten VIR-Proteine

Gleichartige Aminosäuresequenzen sind grau hinterlegt, rot Ähnliche Aminosäure Abschnitte

Im Vergleich zu den nicht bindenden VIR-Proteinen, ähneln sich die Ausrichtungen der Aminosäuresequenzen der bindenden VIR-Proteine von der Aminosäureposition 631 bis 648 in 3 Abschnitten stärker (Abbildung 5: Sequenzvergleich der untersuchten VIR-Proteine, rot markiert).

3.2 Identifizierung der für die Bindung an die Rezeptoren CD36, CD9, CD151 und P-Selektin verantwortliche Domäne des PfEMP1 Proteins IT4_var02

Wie in der Einleitung beschrieben, konnte für die Mitglieder der PfEMP1 Gruppe A ein Zusammenhang mit der Ausbildung einer schweren Malaria gezeigt werden. Deshalb war das zweite Ziel dieser Arbeit Domänen des Gruppe A Mitgliedes, IT4_var02, welche als Bindungspartner für die Endothelzellrezeptoren CD36, CD9, CD151, ICAM-1 sowie P-Selektin fungieren könnten, zu identifizieren.

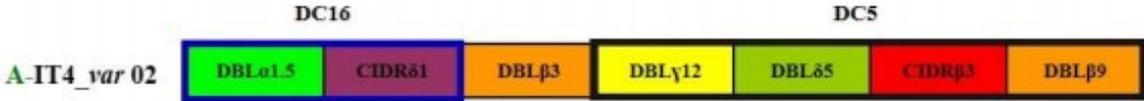


Abbildung 6: Schematische Domänenstruktur des PfEMP1-Proteins

welches von dem Gen it4_var02 kodiert wird. Dieses Pf EMP1-Protein enthält Domänenkassette (DC) 5 und DC16 (Rask et al., 2010)

Die Etablierung des Bindungsassays zwischen den einzelnen an magnetische Ni-NTA-Beads gebundenen *PfEMP1*-Domänen und auf transgenen CHO-Zellen präsentierten Endothelzellrezeptoren war bereits zuvor von Jana Brehmer etabliert worden und nicht Teil dieser Arbeit. Die Exprimierung der verwendeten rekombinanten Domänen und die Herstellung der verwendeten verschiedenen transgenen CHO-Zelllinien mit den unterschiedlichen zu testenden Rezeptoren, sind ebenfalls im Vorfeld durchgeführt worden und befinden sich daher auch nicht im Rahmen dieser Arbeit.

Ebenso wie bei dem oben beschriebenen Bindungsversuch mit VIR-Proteinen (siehe Abschnitt: Statischer Bindungsversuch der der VIR-Proteine mit humanen Rezeptoren) wurden verschiedene transgene CHO-Zelllinien mit den humanen Endothelrezeptoren ICAM-1, CD36, CD9, CD151 sowie P-Selektin verwendet. Die Ni-Beads wurden im Laufe des Assays auf die konfluenten adhärennten CHO-Zellen gegeben. Findet eine Bindung statt, können die Ni-Beads anschließend nicht abgewaschen werden. Die mehr oder weniger bedeckten CHO-Zellen wurden anschließend unter dem Mikroskop fotografiert und durch die dunklere Farbe der Ni-Beads gegenüber den CHO-Zellen konnten die Pixel welche den Beads bzw. den Zellen entsprachen mithilfe des Bildbearbeitungsprogrammes Image J selektiert und ausgezählt werden. So konnte der Anteil der CHO-Zellen bestimmt werden, welcher mit Ni-Beads bedeckt war.

Wegen der hohen Affinität der DBL β 5-Domäne von IT4_var27 zu ICAM-1 wurde die Bindung dieser Domäne an ICAM-1 als Positivkontrolle für die erfolgreiche Versuchsdurchführung benutzt (Bengtsson et al., 2013, Lennartz et al., 2019). Die CHO-GFP-Zellen, auf deren Oberfläche kein Rezeptor exprimiert wurde, wird als Negativkontrolle verwendet. Kam es hier zu einer Bindung, ist dies ein Hintergrund von unspezifischen Bindungen zwischen den Domänen und der CHO-Zelloberfläche. Daher wurde dieser Hintergrundwert von den erhaltenen Werten für den jeweiligen Rezeptor abgezogen.

3.2.1 Die statischen Bindungsversuche der *PfEMP1*-var02-Domänen mit den Endothelzellrezeptoren CHO-CD9, CHO-CD36, CHO-P-Selektin

Alle in Abbildung 7 (Seite 42) und Abbildung 8 (Seite 43) dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführten biologischen Replikaten, die wiederum jeweils 3 technische Replikate umfassen. Die Werte der Positivkontrolle, also der Prozentanteil mit dem CHO-ICAM-1-Zellen mit an Ni-Beads gebundenen DBL β 5-Domänen

bedeckt wurden, liegen im Mittel bei ca. 40%. Dieser Wert hatte sich bereits bei der Etablierung der Assays gezeigt und bestätigt eine erfolgreiche Versuchsdurchführung.

Zwischen dem Rezeptor CD36 und allen var02-Domänen scheint eine Bindung stattgefunden zu haben, wenn auch im Vergleich zur Positivkontrolle mit Werten zwischen 8-14% ein geringerer Anteil der CHO-Zellen mit Ni-Beads bedeckt war. Die DBL γ 12-Domäne zeigt mit 14% den höchsten Bedeckungsgrad der CHO-CD36 Zellen.

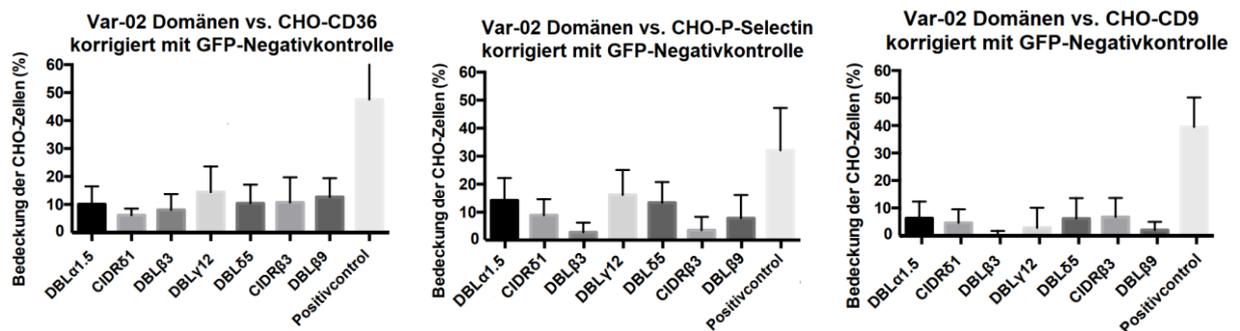


Abbildung 7: Bindungsversuche zur Überprüfung des Bindungsverhaltens der sieben PfEMP1-var02-Domänen an die Rezeptoren CD36, CD9 und P-Selektin

Die Bestätigung eines erfolgreichen Bindungsversuches erfolgte durch die positive Kontrolle der Bindung der DBL β 5-Domäne von IT4-var27 an den Rezeptor ICAM-1. Der Bedeckungsgrad der CHO-Zellen von jeder Domäne repräsentiert einen Mittelwert von 9 Bindungsversuchen, welche an drei verschiedenen Tagen und jeweils im Triplikat durchgeführt wurden. Für die Auswertung wurden pro Deckplättchen drei Aufnahmen an drei zufällig ausgewählten Stellen gemacht und zur Auszählung die Software ImageJ verwendet.

Gegenüber P-Selektin zeigten die an Ni-Beads gebundenen DBL α 1.5-, DBL γ 12-, DBL δ 5- und CIDR δ 1-Domänen im Vergleich zu CHO-CD36 eine höhere Bedeckung der CHO-Zellen. Die DBL γ 12-Domäne zeigt hier mit ca. 16% wieder den höchsten Bedeckungsgrad der CHO-P-Selektin Zellen im Vergleich der Domänen untereinander. Auch hier haben die restlichen Domänen eine leichte Bindung gezeigt, die Werte befanden sich allerdings auch hier bei allen Domänen unterhalb des Levels der Positivkontrolle.

Im Vergleich zu den Bindungsfähigkeiten der var02-Domänen an CHO-CD36- und CHO-P-Selektin-Zellen, wurde ein geringeres Bindungsverhalten an CHO-CD9-Zellen beobachtet. Die DBL α 1.5-, DBL δ 5- CIDR β 3-Domänen zeigten hier im Vergleich untereinander die höchsten Werte mit ca. 8%. Der Anteil der bedeckten CHO-CD9-Zellen mit der an Ni-Beads gebundenen DBL β 3-, DBL γ 12- und DBL β 9-Domäne war kleiner als 2% (Abbildung 7).

3.2.2 Die statischen Bindungsversuche der PfEMP1-var02-Domänen an die Endothelzellrezeptoren CD151 und ICAM-1

Auch bei den Versuchen mit den Rezeptoren CD151 und ICAM-1 lag die Positivkontrolle erneut bei durchschnittlich ca. 40 % und zeigt eine ordnungsgemäße Versuchsdurchführung an. Im Gegensatz zu den Versuchen an CD36, P-Selectin und CD9 wurden allerdings nur minimale Bedeckungen der CHO-Zellen mit den an Ni-Beads gebundenen var02-Domänen detektiert. Bei der DBL α 1.5-, CIDR δ 1-, DBL δ 5-, und CIDR β 3-Domäne zeigten sich geringe Zellbedeckungen gegenüber CHO-CD151 allerdings bewegen sich die Werte bei Werten $\leq 2\%$. Negative Werte bedeuten das eine stärkere Bedeckung der CHO-Zellen ohne eingebrachten Rezeptor stattgefunden hat, als von der CHO-CD151 bzw. -ICAM-1 Zelllinie.

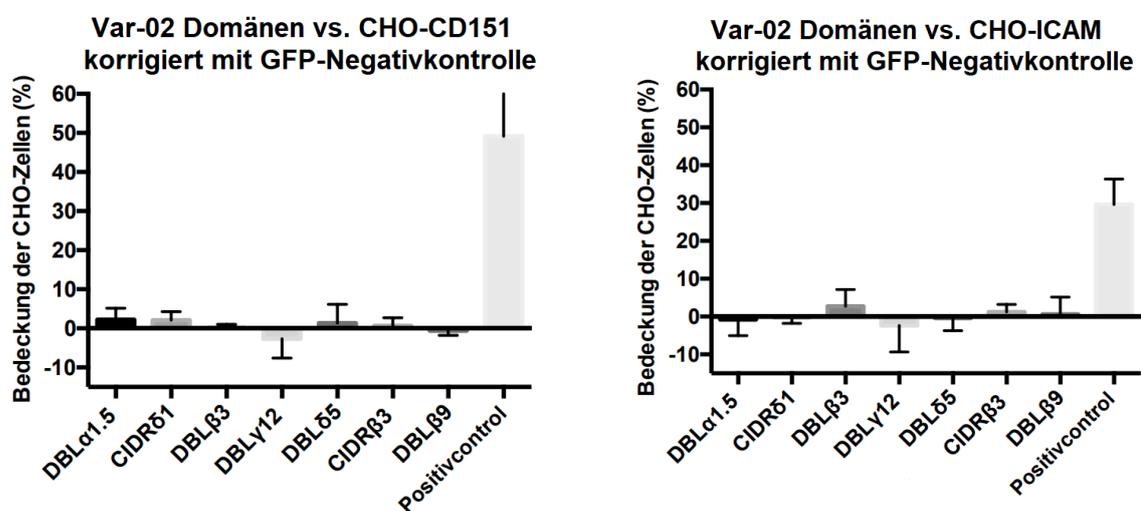


Abbildung 8: Bindungsversuche zur Überprüfung des Bindungsverhaltens der sieben PfEMP1-var02-Domänen an die Rezeptoren CD151 und ICAM-1

Die Bestätigung eines erfolgreichen Bindungsversuches erfolgte durch die positive Kontrolle der Bindung der DBL β 5-Domäne von IT4-var27 an den Rezeptor ICAM-1. Der Bedeckungsgrad der CHO-Zellen von jeder Domäne repräsentiert einen Mittelwert von 9 Bindungsversuchen, welche an drei verschiedenen Tagen und jeweils im Triplikate durchgeführt wurden. Für die Auswertung wurden pro Deckplättchen drei Aufnahmen an drei zufällig ausgewählten Stellen gemacht und zur Auszählung die Software ImageJ verwendet.

Bei dem Versuch mit dem Endothelrezeptor ICAM-1 konnten nur die DBL β 3-, CIDR β 3-, und DBL β 9-Domäne leicht anhaften. Die Bindungskapazitäten waren aber ebenso wie an CHO-CD151-Zellen sehr gering $\leq 5\%$ (Abbildung 8).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PfEMP1-var02-Domänen an CD36, P-Selektin, und auch in geringerem Maße an CD9, Bindungen aufgewiesen haben, wobei die Werte geringer waren als die, zwischen der DBL β 5-Domäne von IT4_var27 zu ICAM-1, welche als Positivkontrolle fungierte. Welche Domäne in erster Linie für die Bindung zwischen dem PfEMP1-Protein und den jeweiligen Rezeptoren verantwortlich ist, kann nicht klar aus den

Ergebnissen abgelesen werden, wobei bei CD36 als auch bei P-Selektin die an Ni-Beads gebundene DBL γ 12-Domäne die höchsten Bedeckungswerte zeigt. Zwischen den PfEMP1-var02-Domänen und CD151 sowie ICAM-1 hat keine nennenswerte Bindung stattgefunden.

4 Diskussion

Die Fähigkeit von *P. falciparum* iE und *P. vivax* iE zur Zytoadhäsion mit den Wirtsrezeptoren auf Endothelzellen wurde in viele Studien untersucht und wird als Hauptvirulenzfaktor der Pathogenese betrachtet (Wassmer *et al.*, 2004, Chakravorty *et al.*, 2005, Fried *et al.*, 2015, Joste *et al.*, 2020, Bernabeu *et al.*, 2012, Carvalho *et al.*, 2010, Chotivanich *et al.*, 2012, Marín-Menéndez *et al.*, 2013).

4.1 Die Untersuchung der Zytoadhäsion von *P. falciparum* VIR-Transfektanten an die Endothelzellrezeptoren unter statischen Bedingungen

In den vergangenen Jahren wurde gezeigt, dass *P. vivax* iR zu einer Zytoadhäsion an verschiedene Endothelzellrezeptoren wie ICAM-1, HLECs, Hyaluronsäure und CSA befähigt sind (Bernabeu *et al.*, 2012, Carvalho *et al.*, 2010, Lopes *et al.*, 2014, Chotivanich *et al.*, 2012). Im Unterschied zu *P. falciparum* verfügt *P. vivax* weder über *knobs*, noch die in den *knobs* lokalisierten PfEMP1-Proteine an der Oberfläche der iE, die für die Zytoadhäsion an verschiedene Endothelzellrezeptoren des Wirts verantwortlich sind (Su *et al.*, 1995, Oh *et al.*, 2000, Jensen *et al.*, 2020).

Es wurde postuliert, dass die Aufgabe der PfEMP1-Moleküle die VIR-Proteine bei *P. vivax* übernehmen können. Wie in der Einleitung beschrieben handelt es sich um eine 295 Mitglieder umfassende Proteinfamilie.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bindungseigenschaften von fünf *P. vivax* VIR-Proteinen, welche aus den 12 von Dr. Torben Rehn (Dissertation - Torben Rehn, 2020) untersuchten VIR-Proteinen ausgewählt wurden, an die zwei Endothelzellrezeptoren CD36 und ICAM-1 unter statischen Bedingungen untersucht. Sieben verschiedene VIR-Transfektanten standen eigentlich zur Verfügung. Bedauerlicherweise konnten die VIR-Proteine PVX_108770 und PVX_113230 im Zeitrahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

4.1.1 Bindungseigenschaft der exportierten VIR-Proteine an den Endothelzellrezeptor CD36

Im Vergleich zu dem Laborstamm 3D7 konnten alle fünf untersuchten VIR-Transfektanten an CD36 signifikant zytoadhärieren.

Für alle fünf untersuchten VIR-Transfektanten konnte eine signifikante Bindung an CD36 nachgewiesen werden, wobei sich die Parasiten im Schizontenstadium befanden. Für die

PVX_050690- und PVX_093715-Tranfektanten wurde eine signifikante Bindung auch an ICAM-1 beobachtet, die jedoch viel schwächer als an CD36 war.

Einen Vergleich erlauben Tabelle 17 und Abbildung 9 (nächste Seite), in der die Ergebnisse zusammen mit den Bindungsversuchen aus der vorhergehenden Arbeit von Dr. Torben Rehn (Dissertation - Torben Rehn, 2020) dargestellt sind.

Tabelle 17: Bindungseigenschaften der Transfektanten im Trophozoiten- und Schizontenstadium an CD36 und ICAM-1

		PVX_050690	PVX_060690	PVX_096925	PVX_093715	PVX_068690
Schizonten- stadium	CD36	27,6 ± 22,4	30,4 ± 14,1	4,9 ± 4,1	71,9 ± 28,6	25,6 ± 8,6
	ICAM-1	3,2 ± 2,6	0,9 ± 0,3	1 ± 1,1	9,1 ± 3,2	1,9 ± 1,4
Trophozoiten- stadium	CD36	28,8 ± 15,5	17 ± 12,9	8,3 ± 5,4	48,3 ± 41	8,7 ± 10,1
	ICAM-1	0,3 ± 0,6	0,1 ± 0,3	1,5 ± 1,2	0,1 ± 0,2	1,8 ± 2,4

In der Dissertation wurden die sieben *vir*-Gene mit entsprechenden CHO-Zelllinien untersucht, allerdings im Trophozoitenstadium. Bei fast jedem der fünf in dieser Arbeit untersuchten VIR-Proteine haben die Parasiten im Trophozoitenstadium eine hohe Affinität an CHO-CD36 gezeigt, weisen jedoch keine Bindung an CHO-ICAM-1 auf (Dissertation - Torben Rehn, 2020).

Bemerkenswerterweise ist die Anzahl der gebundenen iE in den für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen, bei den signifikanten Bindungen an CHO-CD36 bis zu drei Mal größer als in der vorhergehenden Arbeit; PVX_050690-iE bildet hierbei jedoch eine Ausnahme.

Zusätzlich gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl der an CHO-CD36 gebundenen PVX_050690-iE aus beiden Versuchen. Wobei PVX_050690, wie in der Einleitung beschrieben, keine Exporteigenschaften wie die anderen VIR-Proteine aufweist.

Ein Unterschied zwischen den beiden Bindungsversuchen ist, dass in dieser Arbeit die Untersuchung der gebundenen iE im späten Trophozoiten- und Schizontenstadium durchgeführt wurde, bei der Dissertation jedoch nur im Trophozoitenstadium.

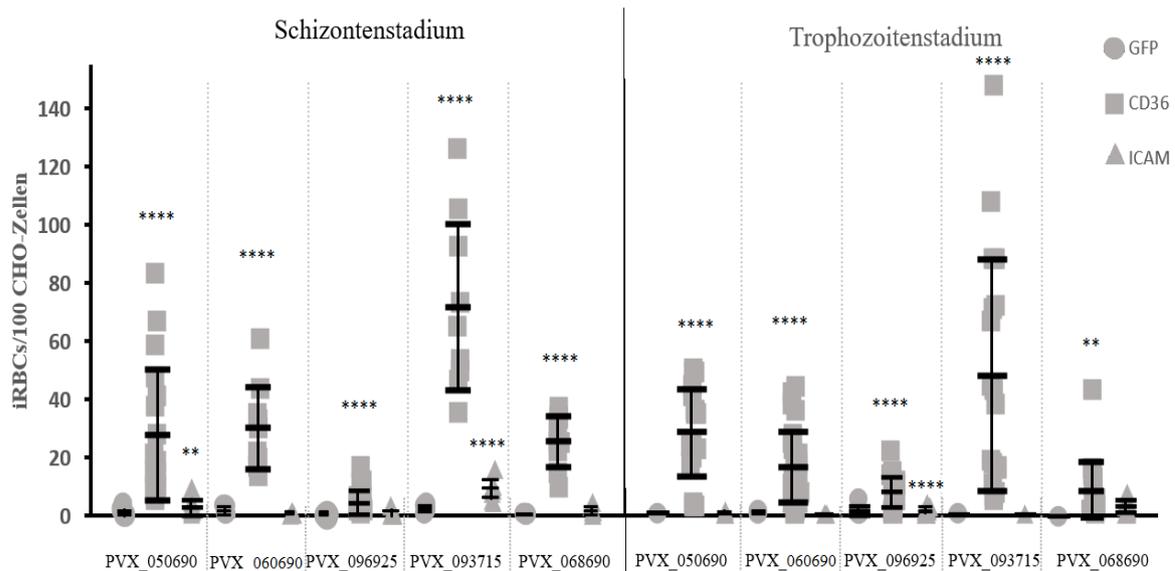


Abbildung 9: Bindungseigenschaften der Transfektanten im Trophozoiten- und Schizontenstadium an CD36 und ICAM-1.

Im Vergleich zu den Ergebnissen von Dr. Torben Rehn (Dissertation – 2020) gibt es keinen größeren Unterschied der Bindungseigenschaft der untersuchten VIR-Proteine PVX_060690, PVX_096925, PVX_093715 und PVX_068690, obwohl die Anzahl der gebundenen iE an CD36 in dieser Arbeit größer ist (Tabelle 17).

Dies könnte durch die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der eingesetzten Parasiten erklärt werden. In der von Dr. Rehn durchgeführten Studie kamen Parasiten im Trophozoitenstadium im Alter zwischen 28 und 30 Stunden nach Infektion zum Einsatz, während in dieser Arbeit Parasiten im Schizontenstadium im Alter zwischen 34 und 40 Stunden nach Infektion verwendet wurden.

Diese Beobachtung wird gestützt von einer Studie von Lopes und Kollegen, die Hinweise darauf gibt, dass *P. vivax* iE im Schizontenstadium eine höhere Bindungsfähigkeit an humane Lungenendothelzellen (HLECs) zeigten als Parasiten im Trophozoitenstadium. Weiterhin ist herauszuheben, dass eine positive Korrelation zwischen dem Anteil der Schizonten im Blut und der Zytoadhäsionsrate bestand (Lopes *et al.* 2014).

Das putative VIR-Protein PVX_050690 besitzt keine Transmembrandomäne, kein klassisches PEXEL-Motiv, kein Signalpeptid sowie keinen reifen N-Terminus. Das heißt, dieses VIR-Protein müsste nur im Parasiten lokalisieren und dürfte nicht in den iE exportiert werden bzw. an der Oberfläche des iE präsentiert werden. Die Lokalisation im Parasiten wurde sowohl durch die in dieser Arbeit durchgeführten, als auch von Dr. Rehn durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen bestätigt. Daher sollten die PVX_050690-Transfektanten auch

nicht zytoadhärieren und somit als Kontrolle eingesetzt werden. Überraschenderweise wurde jedoch eine signifikante Bindung der PVX_050690-Transfektanten sowohl beim Trophoziten- als auch beim Schizontenstadium an CD36 nachgewiesen (Tabelle 17). Diese Eigenschaft steht im Kontrast zu dem oben genannten Experiment von Lopes und Kollegen. Je höher der Schizontenanteil ist, desto ist höher die Adhäsionskapazität (Lopes *et al.*, 2014).

Im Falle wäre von PVX_050690 denkbar, dass ein anderer Faktor eine Rolle bei dem zytoadhäsiven Phänomen spielen könnte. Phosphatidylserin (PS) wurde als ein potentielles Molekül für die Beteiligung an der Zytoadhäsion an den CD36-Rezeptor betrachtet (Setty *et al.*, 2002). Während des Zelltodprozesses seneszenten Erythrozyten kommt es zu einer Präsentation von PS auf der Zellmembranoberfläche. Dies führt zur Entwicklung einer Anämie mit klinischen Symptomen vergleichbar der Malaria (Lang *et al.*, 20005; Totino *et al.*, 2010). Deshalb ist es möglich, dass andere Faktoren die Interaktion zwischen iE und Endothelzellrezeptoren beeinflussen könnten, obwohl das VIR-Protein PVX_050690 nicht an der Oberfläche der iE präsentiert wird.

Bemerkenswert ist auch, dass die Verteilung der Anzahl der gebundenen iE der PVX_060690 Transfektante und der PVX_068690-Transfektante an CHO-CD36 und ICAM-1 in der Abbildung 9 sehr ähnlich ist. Beide gehören zur *pypirH*-Mutigenfamilie (Cunningham *et al.*, 2010).

In der Analyse der Genexpressionsdaten der Blutproben von symptomatischen *P. vivax* infizierten Patienten wurden die Gene der *pypirH*-Familie mit einer hohen Expressionsrate (91%) exprimiert (Lopez *et al.*, 2013). Das lässt vermuten, dass die Zytoadhäsion von VIR-Proteinen aus der *pypirH*-Familie mit einer symptomatischen *P. vivax* Infektion assoziiert sein könnte.

Die Ergebnisse der signifikanten Bindungen von fünf VIR-Proteinen an CD36 zeigten sich nicht in Übereinstimmung mit Carvalho *et al.*, (2010) und Chotivanich *et al.*, (2012). Bei den Bindungsversuchen von Carvalho und Kollegen wurden drei *P. vivax* iE Proben, welche direkt aus dem Blut von Patienten entnommen und gereinigt wurden, untersucht. Keine dieser Proben zeigte eine Fähigkeit zur Zytoadhäsion an CD36 (Carvalho *et al.*, 2010). In den Experimenten von Chotivanich und Kollegen wurden ebenfalls keine Bindung der *P. vivax*-iE Proben von 33 Patienten an CD36 beobachtet (Chotivanich *et al.*, 2012).

4.1.2 Die Bindungseigenschaft der exportierten VIR-Proteine an den Endothelzellrezeptor ICAM-1

Bei den Bindungsversuchen mit ICAM-1 konnte von den fünf untersuchten Zelllinien nur für die PVX_050690-Transfektante und die PVX_093715-Transfektante eine signifikante Bindung festgestellt werden, wobei die Anzahl der *P. vivax* iE an ICAM-1 sehr gering war ($3,2 \pm 2,6$ und $9,1 \pm 3,2$ iE/100 CHO-ICAM-1-Zellen).

Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der veröffentlichten Literatur von Carvalho, wo bei Bindungsversuchen an ICAM-1, die Menge der *P. vivax* Parasiten beträchtliche 29 ± 6 iE/100 CHO-ICAM-1-Zellen betrug (Carvalho *et al.*, 2010).

Eine weitere Studie von Bernabeu und Kollegen zeigte, dass transgene *P. falciparum* iE, welche PVX_108770 (VIR14-putative) auf ihrer Oberfläche präsentieren, an ICAM-1 sowohl unter statischen Bedingungen als auch unter strömungsphysiologischen Bedingungen binden können. Die Anzahl der zytoadhärierten iE ist war hoch (ca. 100 ± 30 iE/ 100 CHO-ICAM-1-Zellen) und die Bindung konnte mittels spezifischer Antikörper teilweise inhibiert werden (Bernabeu *et al.*, 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine PVX_108770-Transfektante generiert, konnte aber leider aus zeitlichen Gründen nicht mehr untersucht werden.

Im Gegensatz zu der signifikanten Bindung an ICAM-1 aus den oben beschriebenen Studien konnten *P. vivax* iE, die von 33 thailändischen Patienten gewonnen wurden, nicht an ICAM-1, aber an Chondroitinsulfat A (CSA) in der Plazenta und dem sekundären Rezeptor Hyaluronsäure (HA) zytoadhärieren (Chotivanich *et al.*, 2012).

Im Vergleich zu den Ergebnissen der publizierten Studien, ergab diese Untersuchung, dass die fünf VIR-Proteine eine nur geringe, aber dennoch signifikante Adhäsionskapazität an ICAM-1 besitzen.

Von Lopez *et al.*, 2013 wurden nachgewiesen, dass bei PVX_093715 eine Übereinstimmung mit der Familie der β -Glucan-Synthese-assoziierten Proteine zu denen SKN1, KRE6 und Sbg1 gehören, gefunden wurde. β 1,6-Glucan kommt in den Zellwänden von Hefe vor (Montijn *et al.*, 1999, Sethi *et al.*, 2016). Daher ist es möglich, dass das VIR-Protein PVX_093715 ein Bestandteil der Zellwand ist.

Die genomische Sequenz von PVX_068690 erhält den Homologieblock des Proteins Intimin. Intimin ist ein bakterielles Adhäsionsmolekül, welches auf der Oberfläche des Enteropathogens *Escherichia coli* (EPEC) exprimiert wird. Dieses Molekül ist an der Adhäsion von EPEC an

das Darmepithel beteiligt (Jerse *et al.*, 1990, Stevens *et al.*, 2006). Das Vorhandensein, dieser Sequenz könnte ein Hinweis auf die Interaktion des VIR-Proteins sein.

Hinsichtlich der Ergebnisse und Literaturrecherche ist es nicht möglich, detailliertere Aussagen über Funktionen der fünf untersuchten VIR-Proteine zu treffen. Wie ein konserviertes Motiv oder eine funktionelle Domäne der VIR-Proteine in einer Wechselbeziehung zu der Oberflächenrezeptoren der Wirtszellen stehen, bleibt unklar.

Daher sollten diese VIR-Proteine mit anderen Methoden wie Inhibitionsassays mittels spezifischer Antikörper oder Transkriptomanalyse analysiert werden, um die Funktionen der VIR-Proteine zu verstehen. Mit Hilfe der Transkriptomanalyse bei Malariaparasiten in verschiedenen Stadien wird die RNA-Expression des gesamten Genoms untersucht. Dadurch kann die Aktivität bestimmter Gene in Bezug auf eine Bindungskapazität an Rezeptoren analysiert werden. Des Weiteren ermöglicht ein Inhibitionsassay eine Identifizierung der Bindungspartner zwischen VIR-Proteine und Rezeptoren.

4.2 Identifizierung der Bindungseigenschaften zwischen den Domänen von IT4_var02 und den Rezeptoren ICAM-1, CD36, CD9, CD151 und P-Selektin mittels Ni-Bead-Assays

Die Proteine der PfEMP1-Familie, welche von der *var*-Multigenfamilie kodiert werden, werden als ein zentrales Element für die Zytoadhäsion bei *P. falciparum* erkannt (Wassmer *et al.*, 2004, Chakravorty *et al.*, 2005, Pouvelle *et al.*, 2007, Fried *et al.*, 2015, Salinas *et al.*, 2016, Joste *et al.*, 2020).

Des Weiteren wurden die PfEMP1-Proteine der Gruppe A häufiger bei jungen afrikanischen Kindern mit schwerer Malariaerkrankung gefunden (Janes *et al.*, 2011, Rask *et al.*, 2010). Interessanterweise wurde gezeigt, dass das PfEMP1-var02-Protein der Gruppe A eine Bindung an P-Selektin und CD9 vermitteln könnte. Zu CD151 zeigte sich in der Studie von Metwally *et al.*, 2017 keine Bindung (Metwally *et al.*, 2017).. CD36 und ICAM-1 sind schon länger als Bindungspartner für *P. falciparum* infizierte Erythrozyten bekannt (Janes *et al.*, 2011, Bengtsson *et al.*, 2013, Lennartz *et al.*, 2019, Brown *et al.*, 2013).

Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die Interaktion zwischen den Oberflächenrezeptoren CD36, ICAM-1, CD9, P-Selektin, und CD151, und den sieben PfEMP1-var02-Domänen untersucht, indem die Domänen über einen HIS-Tag an Ni-Beads gebunden wurden und diese auf CHO-Zellen gegeben wurden, welche den jeweiligen Rezeptor an der Oberfläche exprimierten. Kam es zu einer Bindung, blieben trotz Waschschritten im

Rahmen des Assays Ni-Beads auf den CHO-Zellen haften. Die Bedeckung konnte im Anschluss im Rahmen einer Bildanalyse quantifiziert werden.

4.2.1 Die Interaktion zwischen den Rezeptoren ICAM-1, CD151 und den sieben *PfEMP1*-var02-Domänen

Die Infektion mit *P. falciparum* kann den schwersten neurologischen Krankheitszustand einer Malaria verursachen (die zerebrale Malaria) (Rénia *et al.*, 2012). In früheren Studien wurde vermutet, dass die zerebrale Malaria mit dem Rezeptor ICAM-1 in Verbindung gebracht werden kann (Turner *et al.*, 1994, Chakravorty *et al.*, 2005). Weitere Studien haben gezeigt, dass die Bindung an ICAM-1 durch die Untergruppe der DBL β -Domänen von *PfEMP1* vermittelt wird (Janes *et al.*, 2011, Bengtsson *et al.*, 2013, Lennartz *et al.*, 2019, Brown *et al.*, 2013).

Wie in dieser Arbeit wurde, in der Studie von Brown und Kollegen, das prokaryotische Expressionssystem von *E. coli* verwendet, wobei fünf DBL β -Domänen aus dem *P. falciparum* IT4-Stamm hergestellt wurden (IT4-VAR16, -27, -31, -13 und -41). Hinsichtlich der Evolution sind 46% der Sequenzen dieser DBL β -Domänen identisch. Für die Herstellung der vollständigen *PfEMP1*-Ektodomäne, die aus fünf DBL- und zwei CIDR-Domänen besteht und von dem *var*-Gen *it4_var13* kodiert ist, wurde zusätzlich ein eukaryotisches Baculovirus-System benutzt (die Reihenfolge ist: DBL α - CIDR α - DBL β - DBL δ - CIDR γ - DBL γ - DBL ζ). Durch SPR (engl. *Surface Plasmon Resonance*) wurde charakterisiert, dass alle diese DBL β -Domänen an den Rezeptor ICAM-1 binden konnten. Außerdem wurde gezeigt, dass allein die DBL β -Domäne des *PfEMP1*-*var13*-Proteins für die Bindung an ICAM-1 verantwortlich ist (Brown *et al.*, 2013). Das deutet darauf hin, dass trotz des Fehlens der eukaryotischen posttranslationalen Modifikationen bei *E. coli* eine korrekte Faltung der DBL β -Domänen erfolgte.

Im Gegensatz zu der Gruppe B und C gibt es in der Gruppe A *PfEMP1* Proteine, welche das konservierte Sequenzmotiv (I[V/L]_{x3}N[E]GG[P/A]_xYX₂₇GPP_{x3}H) enthalten. Weiterhin wurde gezeigt, dass alle diese *PfEMP1* Proteine an ICAM-1 binden. Deshalb ermöglicht die Identifizierung dieses Sequenzmotivs in einer DBL β -Domäne die Vorhersage der Bindungseigenschaft an ICAM-1. Bei IT4_var02 wurde dieses Motiv hingegen nicht gefunden, was darauf hindeutet, dass die DBL β 3 und DBL β 9-Domänen von IT4_var02 nicht an ICAM-1 binden (Lennartz *et al.*, 2017). Daher ist das in dieser Arbeit erhaltende Ergebnis, dass keine der getesteten Domänen an ICAM-1 binden plausibel und bestätigt die voran gegangenen Studien.

Bisher konnten nur Esser und Kollegen zeigen, dass die iEs der Patientenproben die Interaktion mit CD151 vermitteln konnten (Esser *et al.*, 2014). Aber bereits in der Arbeit von Metwally *et al.* wurde mittels Transkriptionsanalysen gezeigt, dass nach wiederholter Selektierung der an CD151 bindenden IT4-Parasiten keine Population, die das *var02*-Gen auf RNA-Ebene zeigen, gefunden wurde (Metwally *et al.*, 2017). Daher war das in dieser Arbeit erhaltende Ergebnis, dass die getesteten Domänen alle nicht an CD151 binden, zu erwarten und bestätigt das Ergebnis von Metwally und Kollegen

Die Bedeckung der CHO-Zellen zeigt zwischen den CHO-ICAM-1-Zellen und der DBL α 1.5-, CIDR δ 1-, CIDR δ 1- und DBL δ 5-Domäne, sowie zwischen den CHO-CD151-Zellen und der DBL γ 12- und DBL β 9-Domäne negative Werte. Das bedeutet, der erhaltende Wert der Zellbedeckung beim Aufeinandertreffen der Domänen mit der Negativkontrolle, ist größer als die erhaltenden Werte mit den CHO-ICAM-1 bzw CHO-CD151-Zellen. Die Negativkontrolle sind jeweils CHO-GFP-Zellen, die den gleichen Vektor wie die CHO-Rezeptor Zellen beinhalten, aber dieser codiert lediglich cytosolisches GFP. Auf der Oberfläche der Zellen befindet sich also kein zusätzlicher Rezeptor. Die erhaltenden Bindungen, die mit diesen CHO-GFP-Zellen entstehen, sind unspezifisch. Ein Grund, warum diese unspezifischen Bindungen bei den CHO-ICAM-1 bzw CHO-CD151-Zellen in geringerem Maße beobachtet werden, könnte sein, dass der zusätzliche Rezeptor die natürliche Oberfläche der CHO-Zellen abschirmt.

Neuere Studien haben gezeigt, dass die Häufigkeit der Expressierung der DBL β 1/3-Domänen, die an den Rezeptor ICAM-1 gebunden haben, bei der zerebralen Malaria mit 50% ähnlich groß ist wie bei leichteren Malaria Erkrankungen (41%). Die an endothelialen Protein C-Rezeptor (EPCR) gebundenen Domänen (CIDR α 1.1, CIDR α 1.4 bis 1.8) jedoch hatten bei zerebraler Malaria eine 5- bis 22- mal höhere Häufigkeit als bei leichteren Malaria Erkrankungen (Joste *et al.*, 2020). Diese neueren Erkenntnisse deuten im Gegensatz zu den oben beschriebenen älteren Vermutungen darauf hin, dass der Rezeptor ICAM-1 zwar eine kritische Rolle bei der Adhäsion von *P. falciparum* iE spielt aber nicht direkt mit der klinischen zerebralen Malaria assoziiert werden kann.

4.2.2 Die Interaktion zwischen den Rezeptoren P-Selektin und CD9 und den 7 Domänen von IT4_var02

Die Bindung an den Rezeptor CD36 ist der häufigste Zytoadhäsions-Phänotyp von *P. falciparum* bei Malaria Patienten (Newbold *et al.*, 1997, Mayor *et al.*, 2011), jedoch ist die

Rolle von CD36 bei der Infektion mit *P. falciparum* unklar. Ebenso wurde gezeigt, dass die Endothelzellrezeptoren P-Selektin und CD9 für die Bindung mit *P. falciparum* iE relevant sind (Senczuk *et al.* 2001, Esser *et al.*, 2014). In der Studie von Metwally *et al.* wurde mittels Transkriptomanalyse gezeigt, dass nach Selektion der an CHO-P-Selektin und CHO-CD9 bindenden Parasiten ein relativ großer Teil der Populationen das *var02*-Gen transkribiert (Metwally *et al.*, 2017).

Im Vergleich zu CHO-CD9 wurde in dieser Arbeit bei den CHO-P-Selektin Zellen mit allen *PfEMP1*-*var02*-Domänen ein höherer Bedeckungsgrad beobachtet. Bei dem Versuch mit CHO-CD9 zeigten die DBL α 1.5-, CIDR δ 1-, DBL δ 5- und CIDR β 3-Domänen eine potenzielle Bindungsfähigkeit. Interessanterweise wurde in der Studie von Metwally und Kollegen berichtet, dass der Anteil der *var02*-Population nach Selektion über P-Selektin ebenfalls höher war als nach Selektion über CD9 (15% und 12%) (Metwally *et al.*, 2017). Bemerkenswerterweise weist DBL β 3 gegenüber den beiden Rezeptoren CD9 und P-Selektin das geringste Bindungsverhalten auf (0% und 2%). Dies legt nahe, dass DBL β 3 einen Einfluss auf die dreidimensionale *PfEMP1*-Struktur sowie Faltung, jedoch nicht auf die Bindungsfähigkeit haben könnte.

Eine eindeutige Zuordnung welche Domäne für die Bindung an die Rezeptoren CD9 und P-Selektin verantwortlich ist, wird aus den erhaltenen Ergebnissen nicht eindeutig ersichtlich.

Mehrere Studien haben darauf hingewiesen, dass eine ganze Domänenkassette (DC: domain cassette), welche aus mindestens zwei konservierten Domänen besteht, für die Bindung an einen Endothelzellrezeptor verantwortlich ist (Berger *et al.*, 2013, Avril *et al.*, 2013, Gillrie *et al.*, 2015). Das *var02*-codierte *PfEMP1*-Protein besteht aus der DC16 welche über die DBL β 3 Domäne mit der DC5 verbunden ist. Die erhaltenen Ergebnisse könnten also darauf hindeuten, dass die DC5 und/oder die DC16 eine Bindung an CD9 bzw. P-Selektin vermitteln. Zur Bestätigung dieser Vermutung müssten die gesamten Domänenkassetten exprimiert werden und die Versuche mit ihnen entsprechend wiederholt werden.

4.2.3 Die Interaktion zwischen dem Rezeptor CD36 und den 7 Domänen von IT4_ var02

Die meisten *PfEMP1*-Proteine der Gruppe B und C besitzen eine halbkonservierte Domänenstruktur am N-Terminus (DBL α 0 und CIDR α 2-6), die für die CD36 Bindung verantwortlich ist, während die Gruppe A diese Domänenstruktur nicht aufweist, sondern stattdessen den DBL α 1-CIDR α 1-Sequenztyp oder den DBL α 1-CIDR $\beta/\gamma/\delta$ -Sequenztyp zeigt

(Smith *et al.*, 2013). Der DBL α 1-CIDR δ -Sequenztyp der Gruppe A spielt eine Rolle bei der Rosettierung mit nicht infizierten Erythrozyten und der DBL α 1-CIDR α 1-Sequenztyp bindet an EPCR (Smith *et al.*, 2013, Smith *et al.*, 2014).

Im Gegensatz dazu hat das Ergebnis der Untersuchung der einzelnen Domänen in dieser Arbeit gezeigt, dass diese Domänen mit 8% bis 16% bedeckten CHO-CD36-Zellen, Bindungspartner an CD36 sein könnten. Obwohl jede der sieben PfEMP1-var02-Domänen eine hohe Bindungskapazität an CD36 zeigte, ist es trotzdem möglich das DC16 und DC5 des PfEMP1-var02-Proteins nicht an CD36 binden. Eventuell sind die erhaltenen Bedeckungen der CHO-CD36-Zellen auf unspezifische Bindungen zwischen den Domänen und CD36 zurückzuführen.

5 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Professor Dr. Jörg Andrä für die Unterstützung und die Betreuung dieser Arbeit, sowie bei Frau Professorin Dr. Iris Bruchhaus für ihre Bereitschaft diese Bachelorarbeit zu ermöglichen, ihre unermüdliche Hilfestellung bei technischen und wissenschaftlichen Fragen und das aufmerksame Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Torben Rehn für seine wertvolle Hilfe und seinen Rat bei der Durchführung der Versuche bedanken. Auch Jana Brehmer, für die Unterstützung der Auswertung und die harmonische Zusammenarbeit und Susann Ofori für die hilfreichen Tipps bei der Durchführung der Versuche möchte ich danken.

Herzlichen Dank auch an Claas für die Hilfsbereitschaft und dass er mir geduldig zugehört hat.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Mutter und meinen Verwandten bedanken, die mich in schwierigen Zeiten immer unterstützen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus von Plasmodien verändert nach (Menard et al., 2013).....	2
Abbildung 2: Aufbau der VIR-Proteine	33
Abbildung 3: Immunfluoreszenz-Analyse der VIR-Proteine in transgenen <i>P. falciparum</i> Zelllinien.....	36
Abbildung 4: Statische Bindungsversuche	38
Abbildung 5: Sequenzvergleich der untersuchten VIR-Proteine	40
Abbildung 6: Schematische Domänenstruktur des PfEMP1-Proteins	40
Abbildung 7: Bindungsversuche zur Überprüfung des Bindungsverhaltens der sieben PfEMP1- var02-Domänen an die Rezeptoren CD36, CD9 und P-Selektin	42
Abbildung 8: Bindungsversuche zur Überprüfung des Bindungsverhaltens der sieben PfEMP1- var02-Domänen an die Rezeptoren CD151 und ICAM-1	43
Abbildung 9: Bindungseigenschaften der Transfektanten im Trophozoiten- und Schizontenstadium an CD36 und ICAM-1.....	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte und deren Hersteller.....	7
Tabelle 2: Verwendete Software und deren Hersteller.....	8
Tabelle 3: Verwendete Ge- und Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.....	8
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller.....	9
Tabelle 5: Verwendete Kits und deren Hersteller	10
Tabelle 6: Verwendete Primäre Antikörper.....	11
Tabelle 7: Verwendete Sekundäre Antikörper	11
Tabelle 8: Verwendete Primer. Bezeichnung der Domäne nach Rask <i>et. al.</i> (2010).....	11
Tabelle 9: Verwendete Restriktionsendonukleasen.....	12
Tabelle 10: Verwendete CHO-Zelllinien.....	13
Tabelle 11: Ansatz Restriktionsverdau 1	20
Tabelle 12: Reaktionsansatz PCR	26
Tabelle 13: Temperaturprogramm PCR	27
Tabelle 14: Reaktionsansatz Restriktionsverdau 2.....	28
Tabelle 15: Reaktionsansatz Ligation.....	29
Tabelle 16: Zusammensetzung von SDS-Gelen.....	30
Tabelle 17: Bindungseigenschaften der Transfektanten im Trophozoiten- und Schizontenstadium an CD36 und ICAM-1.....	46
Tabelle 18: Statische Bindungsversuche von 3D7-iE und iE der 5 Tranfektanten an GFP	19
Tabelle 19: Statische Bindungsversuche von 3D7-iE und iE der 5 Tranfektanten an CD36...20	20
Tabelle 20: Statische Bindungsversuche von 3D7-iE und iE der 5 Tranfektanten an ICAM-1	21

Quellenverzeichnis

- Avril, M., Brazier, A. J., Melcher, M., Sampath, S., & Smith, J. D. (2013). DC8 and DC13 var genes associated with severe malaria bind avidly to diverse endothelial cells. *PLoS pathogens*, *9*(6), e1003430.
- Bachmann, A., Petter, M., Tilly, A. K., Biller, L., Uliczka, K. A., Duffy, M. F., ... & Bruchhaus, I. (2012). Temporal expression and localization patterns of variant surface antigens in clinical *Plasmodium falciparum* isolates during erythrocyte schizogony. *PloS one*, *7*(11), e49540.
- Bengtsson, A., Joergensen, L., Rask, T. S., Olsen, R. W., Andersen, M. A., Turner, L., ... & Jensen, A. T. (2013). A novel domain cassette identifies *Plasmodium falciparum* PfEMP1 proteins binding ICAM-1 and is a target of cross-reactive, adhesion-inhibitory antibodies. *The Journal of Immunology*, *190*(1), 240-249.
- Berger, S. S., Turner, L., Wang, C. W., Petersen, J. E., Kraft, M., Lusingu, J. P., ... & Lavstsen, T. (2013). *Plasmodium falciparum* expressing domain cassette 5 type PfEMP1 (DC5-PfEMP1) bind PECAM1. *PloS one*, *8*(7), e69117.
- Berger, S. S., Turner, L., Wang, C. W., Petersen, J. E., Kraft, M., Lusingu, J. P., ... & Lavstsen, T. (2013). *Plasmodium falciparum* expressing domain cassette 5 type PfEMP1 (DC5-PfEMP1) bind PECAM1. *PloS one*, *8*(7), e69117.
- Bernabeu, M., Lopez, F. J., Ferrer, M., Martin-Jaular, L., Razaname, A., Corradin, G., ... & Fernandez-Becerra, C. (2012). Functional analysis of *Plasmodium vivax* VIR proteins reveals different subcellular localizations and cytoadherence to the ICAM-1 endothelial receptor. *Cellular microbiology*, *14*(3), 386-400.
- Brown, A., Turner, L., Christoffersen, S., Andrews, K. A., Szeszak, T., Zhao, Y., ... & Higgins, M. K. (2013). Molecular architecture of a complex between an adhesion protein from the malaria parasite and intracellular adhesion molecule 1. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(8), 5992-6003. .
- Carvalho, B. O., Lopes, S. C., Nogueira, P. A., Orlandi, P. P., Bargieri, D. Y., Blanco, Y. C., ... & Costa, F. T. (2010). On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *The Journal of infectious diseases*, *202*(4), 638-647.
- Chakravorty, S. J., & Craig, A. (2005). The role of ICAM-1 in *Plasmodium falciparum* cytoadherence. *European journal of cell biology*, *84*(1), 15-27.

- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., Suwanarusk, R., Pukrittayakamee, S., Wilairatana, P., Beeson, J. G., ... & White, N. J. (2012). Plasmodium vivax adherence to placental glycosaminoglycans. *PloS one*, 7(4), e34509.
- Cunningham, D., Lawton, J., Jarra, W., Preiser, P., & Langhorne, J. (2010). The pir multigene family of Plasmodium: antigenic variation and beyond. *Molecular and biochemical parasitology*, 170(2), 65-73.
- del Portillo, H. A., Fernandez-Becerra, C., Bowman, S., Oliver, K., Preuss, M., Sanchez, C. P., ... & Lanzer, M. (2001). A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of Plasmodium vivax. *Nature*, 410(6830), 839-842.
- Esser, C., Bachmann, A., Kuhn, D., Schuldt, K., Förster, B., Thiel, M., ... & Horstmann, R. D. (2014). Evidence of promiscuous endothelial binding by P lasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cellular microbiology*, 16(5), 701-708.
- Fernandez-Becerra, C., Yamamoto, M. M., Vêncio, R. Z., Lacerda, M., Rosanas-Urgell, A., & del Portillo, H. A. (2009). Plasmodium vivax and the importance of the subtelomeric multigene vir superfamily. *Trends in parasitology*, 25(1), 44-51.
- Fried, M., & Duffy, P. E. (2015). Designing a VAR2CSA-based vaccine to prevent placental malaria. *Vaccine*, 33(52), 7483-7488.
- Gardner, M. J., Shallom, S. J., Carlton, J. M., Salzberg, S. L., Nene, V., Shoaibi, A., ... & Fraser, C. M. (2002). Sequence of Plasmodium falciparum chromosomes 2, 10, 11 and 14. *Nature*, 419(6906), 531-534.
- Gething, P. W., Van Boeckel, T. P., Smith, D. L., Guerra, C. A., Patil, A. P., Snow, R. W., & Hay, S. I. (2011). Modelling the global constraints of temperature on transmission of Plasmodium falciparum and P. vivax. *Parasites & vectors*, 4(1), 1-11.
- Gillrie, M. R., Avril, M., Brazier, A. J., Davis, S. P., Stins, M. F., Smith, J. D., & Ho, M. (2015). Diverse functional outcomes of P lasmodium falciparum ligation of EPCR: potential implications for malarial pathogenesis. *Cellular microbiology*, 17(12), 1883-1899.
- Gullingsrud, J., Saveria, T., Amos, E., Duffy, P. E., & Oleinikov, A. V. (2013). Structure-function-immunogenicity studies of PfEMP1 domain DBL2 β PF11_0521, a malaria parasite ligand for ICAM-1. *PloS one*, 8(4), e61323.
- Howard, R. J., Barnwell, J. W., Rock, E. P., Neequaye, J., Ofori-Adjei, D., Maloy, W. L., ... & Saul, A. (1988). Two approximately 300 kilodalton Plasmodium falciparum proteins at the surface membrane of infected erythrocytes. *Molecular and biochemical parasitology*, 27(2-3), 207-223.

Hulden, L., & Hulden, L. (2011). Activation of the hypnozoite: a part of Plasmodium vivax life cycle and survival. *Malaria journal*, 10(1), 1-6.

Janes, J. H., Wang, C. P., Levin-Edens, E., Vigan-Womas, I., Guillotte, M., Melcher, M., ... & Smith, J. D. (2011). Investigating the host binding signature on the Plasmodium falciparum PfEMP1 protein family. *PLoS pathogens*, 7(5), e1002032.

Jensen, A. R., Adams, Y., & Hviid, L. (2020). Cerebral Plasmodium falciparum malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it. *Immunological reviews*, 293(1), 230-252.

Jerse, A. E., Yu, J., Tall, B. D., & Kaper, J. B. (1990). A genetic locus of enteropathogenic Escherichia coli necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(20), 7839-7843.

Joste, V., Guillochon, E., Fraering, J., Vianou, B., Watier, L., Jafari-Guemouri, S., ... & Bertin, G. I. (2020). PfEMP1 A-Type ICAM-1-Binding Domains Are Not Associated with Cerebral Malaria in Beninese Children. *Mbio*, 11(6), e02103-20.

Kitchen, S. F. (1938). The Infection of Reticulocytes by Plasmodium vivax. *American Journal of Tropical Medicine*, 18(4)

Kraemer, S. M., Kyes, S. A., Aggarwal, G., Springer, A. L., Nelson, S. O., Christodoulou, Z., ... & Smith, J. D. (2007). Patterns of gene recombination shape var gene repertoires in Plasmodium falciparum: comparisons of geographically diverse isolates. *BMC genomics*, 8(1), 1-18.

Lang, K., Lang, P., Bauer, C., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S., & Lang, F. (2005). Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 15(5), 195-202.

Lau, C. K., Turner, L., Jespersen, J. S., Lowe, E. D., Petersen, B., Wang, C. W., ... & Higgins, M. K. (2015). Structural conservation despite huge sequence diversity allows EPCR binding by the PfEMP1 family implicated in severe childhood malaria. *Cell host & microbe*, 17(1), 118-129.

Lennartz, F., Adams, Y., Bengtsson, A., Olsen, R. W., Turner, L., Ndam, N. T., ... & Jensen, A. T. (2017). Structure-guided identification of a family of dual receptor-binding PfEMP1 that is associated with cerebral malaria. *Cell host & microbe*, 21(3), 403-414.

Lennartz, F., Smith, C., Craig, A. G., & Higgins, M. K. (2019). Structural insights into diverse modes of ICAM-1 binding by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(40), 20124-20134.

Lindner, S. E., Miller, J. L., & Kappe, S. H. (2012). Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. *Cellular microbiology*, *14*(3), 316-324.

Lopes, S. C., Albrecht, L., Carvalho, B. O., Siqueira, A. M., Thomson-Luque, R., Nogueira, P. A., ... & Costa, F. T. (2014). Paucity of Plasmodium vivax mature schizonts in peripheral blood is associated with their increased cytoadhesive potential. *The Journal of infectious diseases*, *209*(9), 1403-1407.

Lopez, F. J., Bernabeu, M., Fernandez-Becerra, C., & del Portillo, H. A. (2013). A new computational approach redefines the subtelomeric vir superfamily of Plasmodium vivax. *BMC genomics*, *14*(1), 1-12.

Macdonald, G. (1957). The epidemiology and control of malaria. *The Epidemiology and Control of Malaria*.

Machado Siqueira, A., Lopes Magalhães, B. M., Cardoso Melo, G., Ferrer, M., Castillo, P., Martin-Jaular, L., ... & del Portillo, H. A. (2012). Spleen rupture in a case of untreated Plasmodium vivax infection. *PLoS neglected tropical diseases*, *6*(12), e1934.

Marín-Menéndez, A., Bardají, A., Martínez-Espinosa, F. E., Bôtto-Menezes, C., Lacerda, M. V., Ortiz, J., ... & Mayor, A. (2013). Rosetting in Plasmodium vivax: a cytoadhesion phenotype associated with anaemia. *PLoS neglected tropical diseases*, *7*(4), e2155.

Mayor, A., Hafiz, A., Bassat, Q., Rovira-Vallbona, E., Sanz, S., Machevo, S., ... & Chitnis, C. E. (2011). Association of severe malaria outcomes with platelet-mediated clumping and adhesion to a novel host receptor. *PLoS One*, *6*(4), e19422.

Memvanga, P. B., & Nkanga, C. I. (2021). Liposomes for malaria management: the evolution from 1980 to 2020. *Malaria Journal*, *20*(1), 1-33.

Menard, R., Tavares, J., Cockburn, I., Markus, M., Zavala, F., & Amino, R. (2013). Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(10), 701-712.

Mendis, K., Sina, B. J., Marchesini, P., & Carter, R. (2001). The neglected burden of Plasmodium vivax malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *64*(1_suppl), 97-106.

Metwally, N. G., Tilly, A. K., Lubiana, P., Roth, L. K., Dörpinghaus, M., Lorenzen, S., ... & Bruchhaus, I. (2017). Characterisation of Plasmodium falciparum populations selected on the human endothelial receptors P-selectin, E-selectin, CD9 and CD151. *Scientific reports*, *7*(1), 1-14.

Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., & Doumbo, O. K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature*, *415*(6872), 673-679.

Montijn, R. C., Vink, E., Müller, W. H., Verkleij, A. J., Van Den Ende, H., Henrissat, B., & Klis, F. M. (1999). Localization of synthesis of β 1, 6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, *181*(24), 7414-7420.

Moon, R. W., Hall, J., Rangkuti, F., Ho, Y. S., Almond, N., Mitchell, G. H., ... & Blackman, M. J. (2013). Adaptation of the genetically tractable malaria pathogen *Plasmodium knowlesi* to continuous culture in human erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(2), 531-536.

Newbold, C., Warn, P., Black, G., Berendt, A., Craig, A., Snow, B., ... & Marsh, K. (1997). Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *57*(4), 389-398.

Newbold, C., Warn, P., Black, G., Berendt, A., Craig, A., Snow, B., ... & Marsh, K. (1997). Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *57*(4), 389-398.

Niang, M., Bei, A. K., Madnani, K. G., Pelly, S., Dankwa, S., Kanjee, U., ... & Preiser, P. R. (2014). STEVOR is a *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding protein that mediates merozoite invasion and rosetting. *Cell host & microbe*, *16*(1), 81-93.

Oh, S. S., Voigt, S., Fisher, D., Scott, J. Y., LeRoy, P. J., Derick, L. H., ... & Chishti, A. H. (2000). *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is anchored to the actin-spectrin junction and knob-associated histidine-rich protein in the erythrocyte skeleton. *Molecular and biochemical parasitology*, *108*(2), 237-247.

Otto, T. D., Assefa, S. A., Böhme, U., Sanders, M. J., & Kwiatkowski, D. (2019). Evolutionary analysis of the most polymorphic gene family in *falciparum* malaria. *Wellcome Open Research*, *4*.

Otto, T. D., Böhme, U., Sanders, M., Reid, A., Bruske, E. I., Duffy, C. W., ... & Berriman, M. (2018). Long read assemblies of geographically dispersed *Plasmodium falciparum* isolates reveal highly structured subtelomeres. *Wellcome Open Research*, *3*.

Pouvelle, B., Matarazzo, V., Jurzynski, C., Nemeth, J., Ramharter, M., Rougon, G., & Gysin, J. (2007). Neural cell adhesion molecule, a new cytoadhesion receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes capable of aggregation. *Infection and immunity*, *75*(7), 3516-3522.

Rask, T. S., Hansen, D. A., Theander, T. G., Gorm Pedersen, A., & Lavstsen, T. (2010). *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 diversity in seven genomes—divide and conquer. *PLoS computational biology*, *6*(9), e1000933.

- Rénia, L., Howland, S. W., Claser, C., Gruner, A. C., Suwanarusk, R., Teo, T. H., ... & Ng, L. F. (2012). Cerebral malaria: mysteries at the blood-brain barrier. *Virulence*, 3(2), 193-201.
- Robinson, B. A., Welch, T. L., & Smith, J. D. (2003). Widespread functional specialization of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD36 analysed across a parasite genome. *Molecular microbiology*, 47(5), 1265-1278.
- Rowe, J. A., Claessens, A., Corrigan, R. A., & Arman, M. (2009). Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert reviews in molecular medicine*, 11.
- Salinas, N. D., & Tolia, N. H. (2016). Red cell receptors as access points for malaria infection. *Current opinion in hematology*, 23(3), 215.
- Senczuk, A. M., Reeder, J. C., Kosmala, M. M., & Ho, M. (2001). Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 functions as a ligand for P-selectin. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 98(10), 3132-3135.
- Sethi, K., Palani, S., Cortes, J. C., Sato, M., Sevugan, M., Ramos, M., ... & Balasubramanian, M. (2016). A new membrane protein Sbg1 links the contractile ring apparatus and septum synthesis machinery in fission yeast. *PLoS genetics*, 12(10), e1006383.
- Setty, B. Y., Kulkarni, S., & Stuart, M. J. (2002). Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 99(5), 1564-1571.
- Singh, V., Gupta, P., & Pande, V. (2014). Revisiting the multigene families: Plasmodium var and vir genes. *Journal of vector borne diseases*, 51(2), 75.
- Smith, J. D. (2014). The role of PfEMP1 adhesion domain classification in Plasmodium falciparum pathogenesis research. *Molecular and biochemical parasitology*, 195(2), 82-87.
- Smith, J. D., Rowe, J. A., Higgins, M. K., & Lavstsen, T. (2013). Malaria's deadly grip: cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cellular microbiology*, 15(12), 1976-1983
- Smith, J. D., Rowe, J. A., Higgins, M. K., & Lavstsen, T. (2013). Malaria's deadly grip: cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cellular microbiology*, 15(12), 1976-1983.
- Smith, J. D., Subramanian, G., Gamain, B., Baruch, D. I., & Miller, L. H. (2000). Classification of adhesive domains in the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family. *Molecular and biochemical parasitology*, 110(2), 293-310.

Stevens, J. M., Galyov, E. E., & Stevens, M. P. (2006). Actin-dependent movement of bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2), 91-101.

Sturm, A., Amino, R., Van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., ... & Heussler, V. T. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *science*, 313(5791), 1287-1290.

Su, X. Z., Heatwole, V. M., Wertheimer, S. P., Guinet, F., Herrfeldt, J. A., Peterson, D. S., ... & Wellems, T. E. (1995). The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell*, 82(1), 89-100.

Tidow, H., Andreeva, A., Rutherford, T. J., & Fersht, A. R. (2009). Solution structure of the U11-48K CHHC zinc-finger domain that specifically binds the 5' splice site of U12-type introns. *Structure*, 17(2), 294-302.

Torben Rehn. Die Bedeutung der VIR-Proteine von Plasmodium vivax für die Zytoadhäsion infizierter Retikulozyten (2020) Dissertation, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

Totino, P. R., Magalhães, A. D., Silva, L. A., Banic, D. M., Daniel-Ribeiro, C. T., & de Fátima Ferreira-da-Cruz, M. (2010). Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: a putative mechanism involved in the pathogenesis of anaemia. *Malaria journal*, 9(1), 1-5.

Trampuz, A., Jereb, M., Muzlovic, I., & Prabhu, R. M. (2003). Clinical review: Severe malaria. *Critical care*, 7(4), 1-9.

Turner, GD, Morrison, H., Jones, M., Davis, TM, Looareesuwan, S., Buley, ID, ... & Berendt, AR (1994). Eine immunhistochemische Studie zur Pathologie der tödlichen Malaria: Beweise für eine weit verbreitete endotheliale Aktivierung und eine potenzielle Rolle des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 bei der zerebralen Sequestrierung. *The American Journal of Pathology*, 145 (5), 1057.

Vogel, G. (2013). The forgotten malaria.

Wassmer, S. C., Lépolard, C., Traoré, B., Pouvelle, B., Gysin, J., & Grau, G. E. (2004). Platelets reorient Plasmodium falciparum-infected erythrocyte cytoadhesion to activated endothelial cells. *The Journal of infectious diseases*, 189(2), 180-189.

WHO. (2020). World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. World health organization.

Anhang

Tabelle 18: Statische Bindungsversuche von 3D7-iE und iE der 5 Tranfektanten an GFP

	3D7-iE	PVX_050690-iE	PVX_060690-iE	PVX_096925-iE	PVX_093715-iE	PVX_068690-iE
iRBCs/100 CHO-Zellen	0,3	2,3	3,7	0,6	0,6	0,6
	0	1,4	0,7	0,8	3,8	0,6
	0	2,3	1,7	0,5	3,3	0,4
	0	1,7	3,8	0,6	1,1	0,4
	0	1,3	0,6	0	1,9	0,4
	0	4,3	0,9	1,6	1,7	0,5
	0	1,6	0,9	0,4	3,3	0,4
	0	1,7	0	0,7	3,9	0,5
	0	1,2	3,1	0,6		0,8
	0,3	0				
	0,5	0,2				
	0,5	0,4				
	0,4	0				
	0,7	0,3				
	0,3	1,1				
	0	0				
	0,4	0,5				
	0,5	0				

Tabelle 19: Statische Bindungsversuche von 3D7-iE und iE der 5 Tranfektanten an CD36

	3D7-iE	PVX_050690 -iE	PVX_060690 -iE	PVX_096925 -iE	PVX_093715 -iE	PVX_068690 -iE
iRBCs/100 CHO-Zellen	1,2	21,1	17	3,4	65	14,3
	1,8	47,5	34,8	3,5	126,2	29,3
	2,7	83,1	21,7	6,4	46,3	25
	1,3	37,9	19,3	2,2	92,7	22,3
	0,5	58,3	32,7	2,8	105	33,6
	0,8	28	30,1	2,9	35,3	37,1
	0	40,8	13,4	5,7	53,8	9,8
	2,5	18,3	60,5	2,4	49,5	33,5
	1,4	66,7	43,9	3,6	73,4	25,2
	0,9	10,9		11		
	1,8	9,5		2,1		
	2,4	14,5		16,7		
	0,7	6,5		0,9		
	3,3	5		3,2		
	1,1	14,1		11,7		
	1,3	10,5		2,3		
	2,6	9,5		6,1		
		15,3		1,7		

Tabelle 20: Statische Bindungsversuche von 3D7-iE und iE der 5 Tranfektanten an ICAM-1

	3D7-iE	PVX_050690 -iE	PVX_060690 -iE	PVX_096925 -iE	PVX_093715 -iE	PVX_068690 -iE
iRBCs/100 CHO-Zellen	0	1,7	0,4	3,5	5	3
	0,8	3,2	1,2	0,5	9,7	1,3
	1,5	0,6	0,8	0,8	8	1,8
	0	2,5	1,1	1,1	9,7	0,3
	2,5	2,8	1,3	0,6	10,1	0,5
	0,4	4,5	0,6	1,9	9	4,7
	0,9	1,5	0,8	0,1	4,6	1,4
	0,3	9,9	0,7	0,1	10,1	
	0,4	1,7	0,8	0,1	16,1	
	1					
	1,5					
	0,3					
	0					
	2,1					
	2					
	0,5					
	2,4					
	0,4					