

BERNHARD NOCHT INSTITUTE
FOR TROPICAL MEDICINE



BACHELOR THESIS

Anreicherung und Transkriptionsanalyse von *P. falciparum* infizierten Erythrozyten, die an den humanen EPCR Rezeptor binden

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

&

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Studiengang: Biotechnologie

Unter Betreuung von Frau Dr. Nahla Metwally und Herrn Prof. Dr. Claus-

Dieter Wacker

Milad Temori



Hamburg, den 31.August.2022

Diese Arbeit wurde durchgeführt in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus.
Unter Betreuung von Frau Dr. Nahla Galal Metwally am Bernhard Nocht Institut für
Tropenmedizin.

1. Gutachterin: Frau Dr. Nahla Galal Metwally
Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin
Department of Molecular Parasitology
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker
claus-dieter.wacker@haw-hamburg.de



Einführung:

Malaria ist eine schwerwiegende infektiöse Krankheit, die auf den Menschen durch den Stich einer von Plasmodien befallenen Mücke übertragen wird. Nach wie vor stellt die Krankheit mit etwa 200 Millionen infizierten und etwa 400.000 Toten jährlich eine der am häufigsten auftretenden und gefährlichsten Infektionskrankheiten dar.

Von den fünf Plasmodium Spezies die Menscheninfizierend sind, ist die Infektion mit *P. falciparum* die tödlichste, welche severe malaria (SM), einer schwerwiegenden Form der Malaria Erkrankung, auslöst. Angesichts der zunehmenden Resistenz der Parasiten gegen Artemisinin besteht ein dringender Bedarf an neuen präventiven und therapeutischen Optionen, für die ein Verständnis der Mechanismen der Krankheit unerlässlich ist.

Primäres Forschungsziel ist die Entwicklung eines Impfstoffes zur Behandlung der Krankheit durch das Erlangen einer umfassenden Interaktionskarte des Parasiten der Gattung *Plasmodium falciparum* mit den menschlichen auf den Endothel befindlichen Rezeptoren.

Dieses Ziel ist Fokus der Forschung der Arbeitsgruppe Bruchhaus des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin, bei der die Interaktionen zwischen Parasiten und Rezeptoren an den menschlichen Gehirn-Endothel-Zellen erforscht werden.

Die in diesem Rahmen erhaltenen Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten, dass durch eine Anreicherungsverfahren, dem Panning, nur *var19* kodierte PfEMP1 Antigene zur Bindung an menschlichen Gehirn-Endothelzellen angereichert werden konnten.

Gemäß der Literatur sollten jedoch zusätzliche *var*-Gene der Gruppe A und B binden, besonders nachdem die Zellen mit TNF- α stimuliert werden.

Die Ergebnisse der von Yifan Wu durchgeführten Bindungsassays zeigten, dass das angereicherte *var19* kodierte PfEMP1 Antigen an die CHO-ICAM-1 Rezeptoren binden konnte, die Bindung an den CHO-745-EPCR Rezeptor jedoch negativ war, was der vorher beschriebenen Literatur widerspricht.

Die aus dieser Arbeit erlangten Ergebnisse resultierten in diese Forschungsarbeit mit dem Ziel die Bindung eines von *var19* kodierten PfEMP1 Antigens an den menschlichen Gehirn-Endothelzellen EPCR-Rezeptor zu reproduzieren oder um nachzuweisen, dass keine Bindung zwischen dem *var19* kodierten PfEMP1 Antigen und dem EPCR Rezeptor existiert, um dadurch

die Frage zu beantworten, wieso die AG Bruchhaus von der Literatur abweichende Ergebnisse erhalten hat.

Für dieses Forschungsprojekt sollen zwei unterschiedliche EPCR exprimierende CHO-Zelllinien untersucht werden, welche für Bindungsassays von *P. falciparum* infizierten Erythrozyten verwendet werden, um anschließend eine Aussage über die Qualität der EPCR Expression treffen zu können.

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: VERBREITUNG DER MALARIAKRANKHEIT DARGESTELLT AUF DER WELTKARTE. (WHO 2014)	14
ABB. 2: CHRONOLOGISCHE DARSTELLUNG DER ARTEMISININFORSCHUNG VON 2 JH. V. CHR WO ARTEMISININ DAS ERSTE MAL ALS WIRKSTOFF ENTDECKT WURDE BIS 1970 ALS ARTEMISININ ERSTMALS AUS DER PFLANZE ISOLIERT WURDE.	14
ABB. 3: P. FALCIPARUM GIEMSAFÄRBUNG, UNGESCHLECHTLICHE STADIEN DES PARASITEN IM ERYTHROZYTEN MIT ZEITANGABE IN HPI = HOURS POST INVASION, (DATENBANK DES BNITM)	16
ABB. 4: DARSTELLUNG DES MALARIAZYKLUS. LINKS, IN GELB, DER GESCHLECHTLICHE ZYKLUS DES PLASMODIUM FALCIPARUM IN DER. RECHTS, IN ROT, DER UNGESCHLECHTLICHE ZYKLUS DES P. FALCIPARUM IM MENSCHEN. [GENOME RESEARCH LIMITED]	17
ABB. 5: DARSTELLUNG DER LOKALITÄT DER VAR-GEN GRUPPEN AUF DEM CHROMOSOM. GRUPPE A UND B VAR-GENE BEFINDEN SICH SUBTELOMERISCH AUF ALLEN CHROMOSOMEN UND SICH IN ENTGEGENGESETZTER RICHTUNG TRANSKRIBIERT, WOHINGEGEN GRUPPE C DER VAR-GENE ZENTRAL AUF DEM CHROMOSOM BEFINDLICH IST. (JENSEN ET AL. 2020)	19
ABB. 6: DAS PFEMP1 PROTEIN RAGT AUS DEM ERYTHROZYTEN HERAUS UND KOMMT IN KONTAKT MIT DEM MENSCHLICHEN ENDOTHEL, INDEM DURCH BINDUNG, ALSO DER CYTOADHÄSION, DIE KRANKHEIT AUSGELÖST WIRD. (MILNER 2018)	19
ABB. 7: DARSTELLUNG DER PFEMP1 STURKTUR MIT BEISPIELEN FÜR BINDUNGSPARTNER DURCH DBL UND CIDR DOMAINS. (EIGENE DARSTELLUNG)	20
ABB. 8: DARSTELLUNG DER CYTOADHÄSION MIT DEM VOM P. FALCIPARUM EXPRIMIERTEN PFEMP1 PROTEIN IN DER STRUKTURELLEN DARSTELLUNG AN DIE WIRTSREZEPTOREN. (ROWE ET AL. 2009).....	21
ABB. 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KNOBSTRUKTUR VON P. FALCIPARUM INFIZIERTEN ERYTHROZYTEN. (HELMS ET AL. 2016)	22
ABB. 10: ERGEBNIS DER SEQUENZIERUNG ÜBER DAS NGS FÜR DIE IT4 P. FALCIPARUM KONTROLLE GEGENÜBER DER ANREICHERUNG VON IT4 PLASMODIEN ÜBER ENDOTHELZELLEN (A) GRAPHISCHE DARSTELLUNG MIT DIREKTEM VERGLEICH DER IT4 P. FALCIPARUM KONTROLLE ZUR IT4 P. FALCIPARUM ANREICHERUNG ÜBER ENDOTHELZELLEN (B) DARSTELLUNG ZUR ÜBERSICHT ALS KREISDIAGRAMM LINKS: IT4 P. FALCIPARUM KONTROLLE, RECHTS: IT4 P. FALCIPARUM ANREICHERUNG ÜBER ENDOTHELZELLEN.....	27
ABB. 11: BINDUNGSASSAY DES 3. PANNINGS DER VAR19 ANGEREICHERTEN PFEMP1 PROTEINE ÜBER ENDOTHELZELLEN	28
ABB. 12: ABSTRICH VON INFIZIERTEN ERYTHROZYTEN NACH KNOB ENRICHMENT (BNITM 2022)	36
ABB. 13: ABSTRICH VON INFIZIERTEN ERYTHROZYTEN NACH SORBITOL SYNCHRONISATION (BNITM 2022)	37

ABB. 14: DARSTELLUNG DER ANREICHERUNGSRUNDEN PANNING 1-6 VON IT4 P. FALCIPARUM ÜBER CHO-745-EPCR. DER MAßSTABSBALKEN ZEIGT 100 µM AN.	42
ABB. 15: PANNING 4 IT4 P. FALCIPARUM ÜBER CHO-745-EPCR. KONTAMINIERT UND VERWORFEN, PANNING WURDE WIEDERHOLT, JEDOCH WURDE EINE SIGNIFIKANT GERINGERE PARASITENBINDUNG WAHRGENOMMEN, SODASS EIN 6. PANNING DEM VERSUCH ANGEHÄNGT WURDE	43
ABB. 16: DARSTELLUNG DER ANREICHERUNGSRUNDEN PANNING 1-5 (BILD 1-5 ENTSPRECHEN DER JEWEILIGEN PANNINGRUNDE) VON IT4 P. FALCIPARUM ÜBER CHO-K1-EPCR. DER MAßSTABSBALKEN ZEIGT 100 µM AN.	45
ABB. 17: FACS ERGEBNISSE DER ANALYSE DER CHO-WT, CHO-745-EPCR UND CHO-K1-EPCR ZELLINIEN OHNE ANTIKÖRPER, MIT EPCR ANTIKÖRPER UND MIT CSA ANTIKÖRPER. DURCHLAUF 1-3 DES VERSUCHES. MESSUNGEN: (1) LINKS: CHO-WT, MITTE: CHO-WT + EPCR ANTIKÖRPER, RECHTS: CHO-WT + CSA ANTIKÖRPER (2) LINKS: CHO-745-EPCR, MITTE: CHO-745-EPCR + EPCR ANTIKÖRPER, RECHTS: CHO-745-EPCR + CSA ANTIKÖRPER (3) LINKS: CHO-K1-EPCR, MITTE: CHO-K1-EPCR + EPCR ANTIKÖRPER, RECHTS: CHO-K1-EPCR + CSA ANTIKÖRPER	46
ABB. 18: GRAFISCHE DARSTELLUNG DER DREI FACS DURCHLÄUFE AUS DER ABBILDUNG X DER EPCR- UND CSA EXPRESSION DER ZELLINIEN CHO-745-EPCR UND CHO-K1-EPCR MIT EPCR- UND CSA ANTIKÖRPERN. DIE Y-ACHSE STELLT DEN NMFI DAR (NORMALIZED MEDIAN FLUORESCENCE INTENSITY) UND DIEN T ZUR NORMALISIERUNG DER FLUORESZENZ GEGEN DIE JEWEILIGE KONTROLLE	47
ABB. 19: KONTROLLE DER VITALITÄT DER CHO-745-EPCR ZELLEN MITTELS MIKROSKOP. LINKS: PHASENKONTRASTMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG, RECHTS: IM GFP KANAL ..	48
ABB. 20: FACS ERGEBNISSE DER ANALYSE DER CHO-WT, CHO-745-EPCR UND CHO-K1-EPCR ZELLINIEN OHNE ANTIKÖRPER, MIT EPCR ANTIKÖRPER UND MIT CSA ANTIKÖRPER. DURCHLAUF 4. MESSUNGEN: (1) LINKS: CHO-WT, MITTE: CHO-WT + EPCR ANTIKÖRPER, RECHTS: CHO-WT + CSA ANTIKÖRPER (2) LINKS: CHO-745-EPCR, MITTE: CHO-745-EPCR + EPCR ANTIKÖRPER, RECHTS: CHO-745-EPCR + CSA ANTIKÖRPER (3) LINKS: CHO-K1-EPCR, MITTE: CHO-K1-EPCR + EPCR ANTIKÖRPER, RECHTS: CHO-K1-EPCR + CSA ANTIKÖRPER	49
ABB. 21: GRAFISCHE DARSTELLUNG DER ALLER (1.-4.) FACS DURCHLÄUFE DER EPCR- UND CSA EXPRESSION DER ZELLINIEN CHO-745-EPCR UND CHO-K1-EPCR MIT EPCR- UND CSA ANTIKÖRPER NEBEN DER CHO-WT KONTROLLE	50
ABB. 22: BEISPIEL EINER GRAPHISCHEN DARSTELLUNG EINER QUALITÄTSMESSUNG DES BIOANALYZERS MIT EINEM RIN WERT VON 9,8, PROBE: PANNING 5 IT4 P. FALCIPARUM ÜBER CHO-K1-EPCR	53
ABB. 23: ERGEBNIS DER SEQUENZIERUNG ÜBER DAS NGS FÜR DIE IT4 P. FALCIPARUM KONTROLLE GEGENÜBER DER ANREICHERUNG VON IT4 PLASMODIEN ÜBER CHO-745-EPCR ZELLEN, ERSTELLT AUS DER TABELLE X IM ANHANG (A) GRAPHISCHE DARSTELLUNG MIT DIREKTEM VERGLEICH DER IT4 P. FALCIPARUM KONTROLLE ZUR IT4 P. FALCIPARUM ANREICHERUNG ÜBER CHO-745-EPCR (B) DARSTELLUNG ZUR ÜBERSICHT ALS KREISDIAGRAMM LINKS: IT4 P. FALCIPARUM KONTROLLE, RECHTS: IT4 P. FALCIPARUM ANREICHERUNG ÜBER CHO-745-EPCR.....	56

ABB. 24: ERGEBNIS DER SEQUENZIERUNG ÜBER DAS NGS FÜR DIE IT4 P. FALCIPARUM KONTROLLE GEGENÜBER DER ANREICHERUNG VON IT4 PLASMODIEN ÜBER CHO-K1-EPCR ZELLEN, ERSTELLT AUS DER TABELLE X IM ANHANG (A) GRAPHISCHE DARSTELLUNG MIT DIREKTEM VERGLEICH DER IT4 P. FALCIPARUM KONTROLLE ZUR IT4 P. FALCIPARUM ANREICHERUNG ÜBER CHO-K1-EPCR (B) DARSTELLUNG ZUR ÜBERSICHT ALS KREISDIAGRAMM LINKS: IT4 P. FALCIPARUM KONTROLLE, RECHTS: IT4 P. FALCIPARUM ANREICHERUNG ÜBER CHO-K1-EPCR57

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: VERWENDETE GERÄTE FÜR DIESES PROJEKT	29
TABELLE 2: GENUTZTE SOFTWARE FÜR DIESES PROJEKT	29
TABELLE 3: FÜR DIESES PROJEK GENUTZT CHEMISCHE UND BIOLOGISCHE SUBSTANZEN	30
TABELLE 4: GENUTZTE MATERIALIEN IN DIESEM PROJEKT	31
TABELLE 5: VERWENDETE KITS IN DIESEM PROJEKT	31
TABELLE 6: IN DIESEM PROJEKT VERWENDETE ZELLINIEN	31
TABELLE 7: ANSÄTZE FÜR DIE IN DIESEM PROJEKT VERWENDETEN PARASITENKULTUREN	32
TABELLE 8:ANSÄTZE FÜR DIE IN DIESEM PROJEKT VERWENDETEN CHO-ZELLKULTUREN	33
TABELLE 9:ERGEBNISSE DER RNA KONZENTRATIONSBESTIMMUNG MIT OD260/OD280 VERHÄLTNIS ZU ANGABE DER REINHEIT	52
TABELLE 10: AUFLISTUNG DER RIN WERTE ALLER PANNINGRUNDEN FÜR IT4 P. FALCIPARUM ÜBER CHO-745-EPCR UND CHO-K1-EPCR	53
TABELLE 11: STRUKTURELLER AUFBAU DES PFEMP1 PROTEINS, WELCHER PRODUZIERT WURDE VOM IT4_VAR27-GEN	55
TABELLE 12: STRUKTURELLER AUFBAU DES PFEMP1 PROTEINS, WELCHER PRODUZIERT WURDE VOM IT4_VAR04-GEN	57

Abkürzungsverzeichnis

AB	Antikörper
Abb	Abbildung
APC	Activated Protein C Allophycocyanin
ATCC	American Type Culture Collection
ATS	Acidic terminal segment
BNITM	Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin
bzw.	Beziehungsweise
C	Celsius
CHO	Chinese hamster ovary
CIDR	Cysteine rich interdomains
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CR1	Complement receptor 1
CSA	Chondroitin sulfate A
DBL	Duffy binding like
DC	Domain cassette
DDT	Dichloridiphenyltrichloroethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
EPCR	Endothelial protein C receptor, endothelial protein C receptor
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
g	Gramm
GFP	Green fluorescent protein
h	Stunde(n)
H₂O	Wasser
HbC	Hämoglobin C
HBMEC	Human brain microvascular endothelial cells
HbS	Hämoglobin S
HCL	Salzsäure
hpi	hours post invasion

ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IE	Infizierte Erythrozyten
iFCS	Inaktiviertes fötales Rinderserum
IT4	<i>P. faciparum</i> Isolat eines Patienten
KAHRP	Knob-associated histidine-rich protein
kB	Kilo-Basenpaar(e)
KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
MFS	Malaria freezing solution
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MTS	Malaria thawing solution
N₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid/Natronlauge
ng	Nanogramm
NGS	Next generation sequencing
nm	Nanometer
nMFI	Normalized median fluorescence intensity
NTS	N-Terminal Segment
O₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
P	Plasmodium
PAM	Pregnancy associated malaria
PAR1	Protease-aktivierten Rezeptor 1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1

pH	pondus hydrogenii - Potential des Wasserstoffs
Q	Quadrat
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions Per Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SM	severe malaria (schwerwiegende Form der Malaria Krankheit, die mit schweren Symptomen verbunden wird)
TM	Transmembranregion
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
Ups	Upstream promoter sequence
v.Chr	Vor Christus
wt	Wildtype
μL	Mikroliter, Mikroliter
μm	Mikrometer, Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

Einführung:	2
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Theoretische Hintergründe	13
1.1 Die Malaria Krankheit.....	13
1.2 Chronologisch-geschichtlicher Umgang mit Malaria	14
1.3 Lebenszyklus	15
1.4 Var-Gen Familie und ihre antigenetische Variation	18
1.5 Das PfEMP1 Protein	19
1.6 Der EPCR Endothelzellenrezeptor	22
1.7 IT4 P. faciparum.....	23
1.8 CHO Zellen	23
1.9 Parasitenanreicherung: “Panning”	24
1.10 FACS	25
1.11 Bestimmung der RNA Quantität	25
1.12 Evaluierung der RNA Qualität	26
1.13 Next Generation Sequencing (NGS)	26
2 Motivation und Projektidee	27
3 Material und Methoden	29
3.1.1 Verwendete Geräte	29
3.1.2 Software	29
3.1.3 Chemische und biologische Substanzen	30
3.1.4 Materialien	31
3.1.5 Kits	31
3.1.6 Zelllinien	31
3.1.7 Ansätze	32
3.2 Methoden.....	33
3.2.1 Plasmodien Auftauen	33
3.2.2 Plasmodien Kultivieren	34
3.2.3 Plasmodien Auszählung (Giemsa)	34
3.2.4 Plasmodien Einfrieren	35
3.2.5 Synchronisation mittels knob Anreicherung	35
3.2.6 Synchronisierung durch D-Sorbitol	36
3.2.7 CHO-Zellen auftauen, kultivieren und selektieren	37
3.2.8 CHO- Zellen einfrieren	38

3.2.9 Panning.....	38
3.2.10 RNA Isolation und Quantifizierung.....	40
3.2.11 Überprüfung der RNA Qualität für die Transkriptomanalyse.....	40
3.2.12 FACS.....	41
4 Ergebnisse & Diskussion	42
4.1.1 Panning IT4 P. falciparum über CHO-745-EPCR.....	42
4.1.2 Panning IT4 P. falciparum über CHO-K1-EPCR.....	44
4.2 FACS Ergebnisse	46
4.3 Ergebnisse der Quantifizierung der RNA	52
4.4 Ergebnisse der RNA Qualitätsanalyse	53
4.5 NGS Ergebnisse	53
4.5.1 Profil der var-Genexpression von IT4 P. falciparum über CHO-745-EPCR.....	54
4.5.2 Profil der var-Genexpression von IT4 P. falciparum über CHO-K1-EPCR.....	56
5 Zusammenfassung.....	60
5 Literaturverzeichnis.....	62
6 Danksagung.....	65
7 Anhang	67

1 Theoretische Hintergründe

1.1 Die Malaria Krankheit

Die Infektionskrankheit Malaria wird übertragen durch den Stich einer von Parasiten befallenen weiblichen Mücke der Gattung Anopheles. Parasiten sind Organismen die Nahrung aus einem anderen Organismus, dem Wirt, ziehen und diesen schädigen, um selbst zu überleben. Bei den Malaria verursachenden Parasiten handelt es sich um einzellige Parasiten, genannt Plasmodien. (Zekar und Sharman 2022)

Die Übertragung der Plasmodien auf den menschlichen Wirt kann unterschiedliche Formen der Malaria Krankheit auslösen. Diese Malaria-Erkrankungen am Menschen werden von fünf Spezies der Plasmodien verursacht. Bei den Gattungen handelt es sich um Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium knowlesi, Plasmodium malariae und Plasmodium falciparum. (Zekar und Sharman 2022) Unterscheiden tun sich die Plasmodien in ihrer Morphologie, ihrer Epidemiologie und ihrem Krankheitsbild. Letztere Spezies kann sich dabei als einzige auf den menschlichen Wirt tödlich auswirken. Durch Bindung des P. falciparum an die menschlichen Endothelzellrezeptoren umgehen diese die Eliminierung durch die Milz, wodurch diese im menschlichen Wirt überleben und Malaria Krankheitssymptome hervorrufen. (Andrews et al. 2005; Smith et al. 2000)

Eine solche Malariaerkrankung kann sich durch Fieber, einer Anämie, Koma und schließlich auch dem Tod äußern, weist die höchste Mortalitätsrate bei Kindern unter fünf Jahren und schwangeren auf und stellt in Afrika und in großen Teilen Asiens die verbreitetste Krankheit dar. (Metwally 2016)

Eine Akkumulierung von Parasiten in Organen wie dem Gehirn oder der Plazenta kann durch Cytoadhäsion, also der Parasit-Rezeptor-Interaktion, mit den dort befindlichen Rezeptoren zu einer mechanischen Beeinträchtigung des Blutflusses führen die in einer Hypoxie, einem Ödem, einem erhöhtem Hirndruck oder einem Schlaganfall resultieren kann. (Beeson und Brown 2002)

Die mit dem Parasiten befallene Stechmücke ist gemäß der WHO mit 219 Millionen infizierten und etwa 435.000 Toten im Jahre 2017 das tödlichste Tier weltweit. (Florentin et al. 2020)

Durch Genanalyse wurde festgestellt, dass die Erreger in Südamerika aus Afrika südlich der Sahara stammen, demnach mit dem Sklavenhandel eingeschleppt wurden. (National Academy of Sciences 2011)

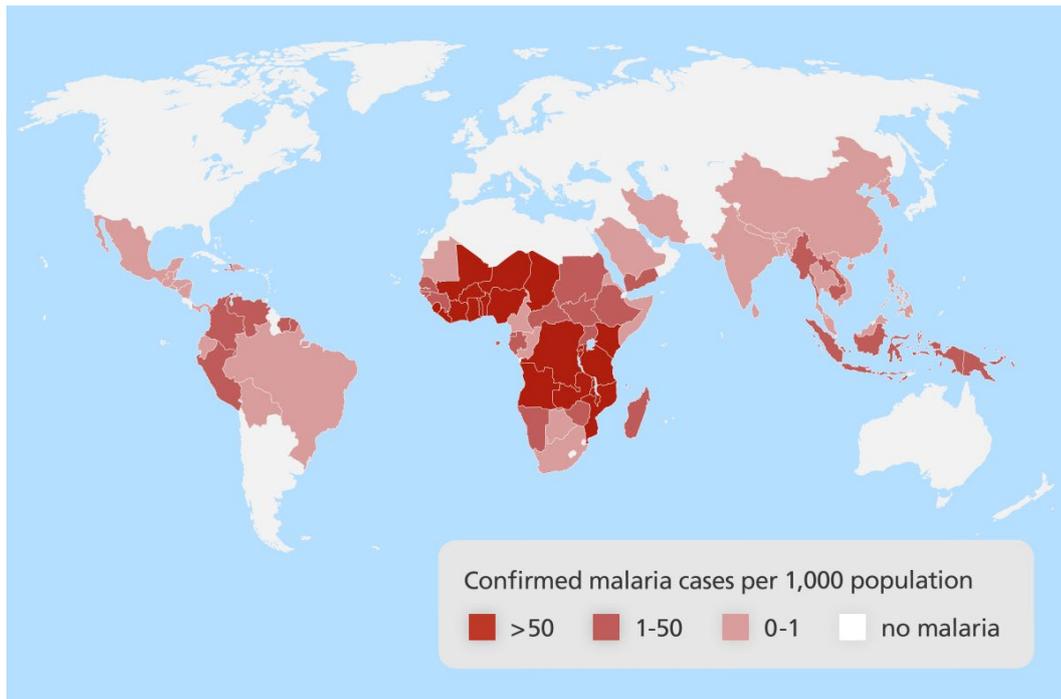


Abb. 1: Verbreitung der Malariakrankheit dargestellt auf der Weltkarte. (WHO 2014)

1.2 Chronologisch-geschichtlicher Umgang mit Malaria



Abb. 2: Chronologische Darstellung der Artemisinforschung von 2 Jh. v. Chr. wo Artemisinin das erste Mal als Wirkstoff entdeckt wurde bis 1970 als Artemisinin erstmals aus der Pflanze isoliert wurde.

Im 2. Jahrhundert v. Chr. nutzte man in China Artemisia Annuua, die Einjährige Beifuß Pflanze, zur prophylaktischen Behandlung von Malaria. Im 16. Jahrhundert behandelte man in Peru Malaria mit der Baumrinde des Chinchona-Baums von dem später 1820 in Frankreich erstmals das Chinin für die intensivere Behandlung von Malaria extrahiert wurde.

1874 wurde vom Othmer Zeidler DDT (Dichloridiphenyltrichloroethan) synthetisiert, welches sich 1939 als Insektizid (einem Pestizid) herausstellte und gut im Kampf gegen Malaria wirkte. Mit der Zeit entwickelten die Parasiten auch Resistenzen gegen die Insektizide und an manchen Orten verbreitete sich die Krankheit noch rasanter. Später kam es unter starken Verdacht Krebs auszulösen und wurde seither nicht mehr gegen Malaria verwendet.

(Talapko et al. 2019) 1907 erhielt Alphonse Laveran in Frankreich den Nobelpreis für die erstmalige Entdeckung des Parasiten im Blut eines Malariapatienten.

In den späten 40ern begann die WHO den Kampf gegen den Malaria-Parasiten und 1955 das Fundament für das „Global Malaria Eradication Programm“ zu bilden.

1969 wurde dieses Programm beendet weil der Kampf gegen Malaria in Afrika verloren war. Grund waren technische Herausforderungen zur Umsetzung der Strategie. Oft mangelte es an einem funktionierendem Gesundheitssystem.

Bis heute bietet das politische System in Afrika noch kein Fundament zur Umsetzung der Strategien.

Von 1969 bis 1991 hat sich die WHO darauf fokussiert die Krankheit zu erforschen, die Technologien weiter zu entwickeln und nach Medikamenten und Impfstoffen zu forschen. (Tanner und Savigny 2008)

1970 war es einer Forschungsgruppe aus China erstmals möglich die aktive Substanz Artemisinin der Pflanze Artemisia Annua zu isolieren, einer nützlichen antimalarischen Substanz für die Behandlung von Malaria. Für diese Entdeckung erhielt Dr. Youyou, Leiterin dieser Forschung, 2015 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. (Talapko et al. 2019)

Bis heute konnte noch kein Impfstoff gegen Malaria entwickelt werden. Grund für den Misserfolg bei der Herstellung des Impfstoffes ist, dass der Malariaparasit ein Organismus mit einem komplexen Lebenszyklus ist, der das Immunsystem umgehen kann. Während der verschiedenen Stadien des Plasmodium-Lebenszyklus unterliegt es morphologischen Veränderungen und weist Antigen-Variationen auf. (Talapko et al. 2019)

Bis heute nutzt man zur Behandlung gegen Malaria hauptsächlich die erwähnten Medikamente Artemisinin und Chinin. Auch etablierte Medikamente wie Mefloquine und Chloroquin haben sich mit der Zeit durch Resistenzbildungen als unwirksam erwiesen. (Talapko et al. 2019)

1.3 Lebenszyklus

Die Morphologie der Plasmodien ist direkt verbunden mit den molekularen Mechanismen der Krankheit. Dabei spielt die Parasit-Wirt-Interaktion eine zentrale Rolle und stellt die grundlegenden Forschungsergebnisse der letzten Jahrzehnte Übersichtlich dar.

Die menschliche Erkrankung beginnt mit der Infektion über eine bereits mit dem Parasiten befallene Mücke. Die Mücke, Wirt des Parasiten *P. falciparum*, sondert durch einen Stich, die in der Speichel vorhandenen Sporozoiten ab, die dann in die Blutlaufbahn des Menschen gelangen. Sporozoiten sind junge Plasmodien in einkerniger Sichelkeimform.

Von dort gelangen sie in die Zellen der Leber, wo sie sich weiterentwickeln und durch Schizogonie, einer ungeschlechtlichen Vermehrung von Einzellern, aus einem ursprünglichen Kern durch Mitose vermehren und dabei zahlreiche Tochterkerne, den sogenannten Merozoiten, entstehen. (Zekar und Sharman 2022)

Diese Merozoiten entwickeln sich zu Leberschizonten weiter, die vielkernige Gebilde darstellen. Durch den Zerfall der Mutterzelle, dem Schizonten, werden zahlreiche Merozoiten freigelassen. Diese Merozoiten gelangen von der Leber in den menschlichen Blutkreislauf und sind bis dahin größtenteils unbemerkt vom Immunsystem.

Die nun im Blutkreislauf befindlichen Plasmodien befallen die menschlichen roten Blutkörperchen und entwickeln sich innerhalb der Erythrozyten weiter. Die Parasiten synthetisieren und scheiden bestimmte Proteine im Erythrozyten aus. Diese Proteine haben die Funktion andere Proteine und Nährstoffe in die Wirtszelle zu transportieren. Dort beginnt das Plasmodium einen Transformationsprozess, indem dieser die roten Blutkörperchen unterjocht. Dabei wird die Permeabilität, die Stabilität und der Metabolismus des infizierten Erythrozyten so geändert, dass es den Bedürfnissen des Parasiten entspricht. Der Parasit erreicht das, indem es hunderte von Proteine über mehrere Zellmembran synthetisiert, transportiert und aus der Wirtsblutzelle exportiert. Dadurch gelingt es dem Parasiten sich im menschlichen Körper zu vermehren und unter dem Deckmantel des Erythrozyten vom Immunsystem nicht erkannt zu werden. (Milner 2018)

In den Blutkörperchen reifen die Merozoiten nun zu Trophozoiten an, die anschließend zu Schizonten heranwachsen, die wiederum Merozoiten produzieren und diese freigeben. Nach Freisetzung der Merozoiten befallen diese weitere uninfizierte Erythrozyten und der erythrozytäre Zyklus beginnt von Neuem.

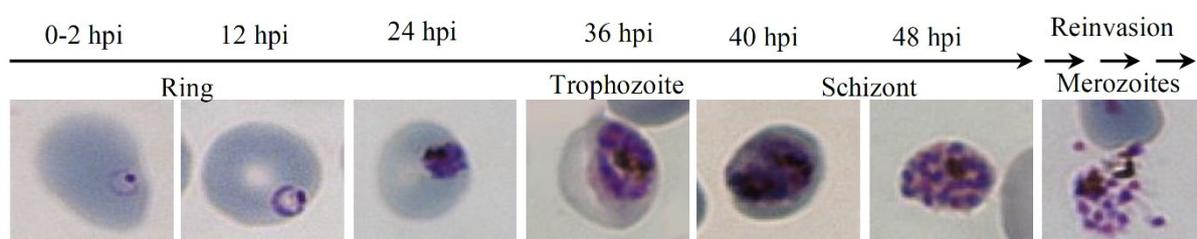


Abb. 3: *P. falciparum* Giemsa-Färbung, ungeschlechtliche Stadien des Parasiten im Erythrozyten mit Zeitangabe in hpi = hours post invasion, (Datenbank des BNITM)

Der Parasit benötigt etwa 24h, um vom Merozoiten zum Trophozoiten heranzuwachsen und weitere 24h um von Trophozoiten zum Schizonten heranzuwachsen. Daraus ergibt sich ein

Zyklus von etwa 48h, worauf auch die alle zwei Tage auftretenden Symptome der Krankheit zurückzuführen sind. (Crutcher und Hoffman 1996)

In seltenen Fällen wachsen aus den Merozoiten im Erythrozyten Gametozyten an, die eine geschlechtliche Form des Parasiten darstellen.

Nimmt die Mücke bei einem erneuten Stich diese Gametozyten auf, kann sich in der Mücke der geschlechtliche Zyklus entwickeln.

Im Magen der Mücke entwickelt sich der Gametozyt zum Gamet, bei denen die weiblichen Gameten von den männlichen befruchtet werden. Daraus entstehen Zygoten, die befruchtete Eizellen darstellen.

Aus der Zygote entsteht das erste Entwicklungsstadium einzelliger Parasiten, die Oozyste, die den Sporozoiten enthält, welche dann abgesondert wird durch die Speichel über einen Stich der Mücke, wodurch der Kreislauf geschlossen wird. (Aftab et al. 2014) (Abb. 4)

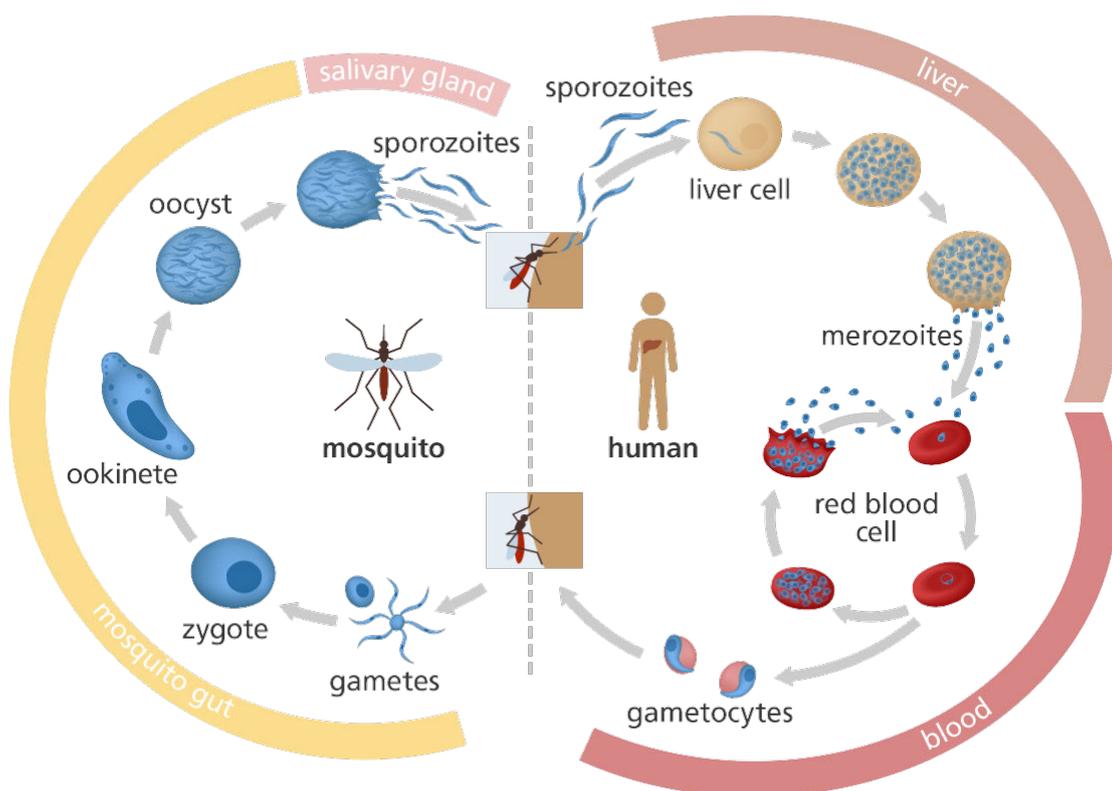


Abb. 4: Darstellung des Malariazyklus. Links, in gelb, der geschlechtliche Zyklus des Plasmodium falciparum in der. Rechts, in rot, der ungeschlechtliche Zyklus des P. falciparum im Menschen. [Genome Research Limited]

1.4 Var-Gen Familie und ihre antigenetische Variation

Die von den *P. falciparum* infizierten Erythrozyten exprimieren unterschiedliche Proteine auf ihrer Oberfläche. Das PfEMP1 ist eines dieser Proteine und spielt in *P. falciparum* Malaria die wahrscheinlich zentrale Rolle der Krankheit. Produziert wird das PfEMP1 von etwa 60 unterschiedlichen *var* Genen. (Milner 2018) Jedes dieser *var* Gene kodiert das PfEMP1 Protein unterschiedlich, sodass dieser mit jedem *var*-Gen strukturell unterschiedlich aufgebaut ist.

Da das PfEMP1 Protein auf der Zelloberfläche der Erythrozyten präsentiert wird, werden vom menschlichen Wirt Antikörper gegen das Parasitenprotein gebildet. Um diese Immunreaktion zu umgehen, kann das *P. falciparum* das PfEMP1 Protein mit einem anderen *var*-Gen kodierten PfEMP1 Protein austauschen, wobei normalerweise immer nur eine PfEMP1 Variante exprimiert ist. Wird das aktive *var*-Gen gewechselt und ein anderes PfEMP1 produziert, läuft die erworbene Immunität des Wirts in die Leere.

Diese Fähigkeit das Protein auszutauschen bezeichnet sich als „clonal antigenic variation“ und ist eine Schlüsseleigenschaft der Infektion, da das PfEMP1 nahezu immerwährend ausgetauscht wird und sich dadurch keine Immunreaktion entwickeln kann. (Jensen et al. 2020; Guizetti und Scherf 2013; Kraemer und Smith 2006)

Die *var* Gene befinden sich überwiegend in der subtelomerischen Region eines jeden der 14 Chromosomen, bestehend aus zwei Exons und weisen etwa eine Größe von 6-13 kB auf. (Pasternak und Dzikowski 2009; Kyes et al. 2007) Das Exon 1 kodiert die extrazellulären Strukturen des Proteins und weist eine Vielfalt von Nucleotiden auf, wohingegen das Exon 2 den transmembranen Bereich und die ATS (engl. acidic terminal segment) Domäne kodiert und kurz und hochkonserviert vorliegt. (Scherf et al. 2008; Kyes et al. 2007)

Aufgrund der Vielfalt der *var*-Gene können diese entsprechend ihrer chromosomalen Position, dem upstream promoter sequence (Ups) und der Richtung der Transkription gruppiert werden. Gruppe A bestehend aus 10 Genen, Gruppe B bestehend aus 22 Genen und Gruppe B/A bestehend aus 4 Genen befinden sich alle in den subtelomerischen Regionen auf allen 14 Chromosomen und werden in entgegengesetzten Richtungen transkribiert (siehe Abb. 5). Weiter besteht die Gruppe C aus 13 Genen und Gruppe B/C aus 9 Genen die sich auf in internalen Regionen zentral auf den Chromosomen 4, 7, 8 und 12 befinden. Zusätzlich gibt es noch eine Ups-E Gruppe, welche nur das *var2csa* Gen beinhaltet (siehe Abb.5). (Jensen et al. 2020)



Abb. 5: Darstellung der Lokalität der var-Gen Gruppen auf dem Chromosom. Gruppe A und B var-Gene befinden sich subtelomerisch auf allen Chromosomen und sich in entgegengesetzter Richtung transkribiert, wohingegen Gruppe C der var-Gene zentral auf dem Chromosom befindlich ist. (Jensen et al. 2020)

Auch die Unterscheidung der var-Gene in Hinblick auf die Ups bezieht sich auf die Ähnlichkeiten der Sequenzen hinsichtlich der Transkriptionsrichtung und der Lokalität auf dem Chromosom. (Kraemer und Smith 2006; Kyes et al. 2007; Ralph et al. 2005)

1.5 Das PfEMP1 Protein

Das vermutlich zentralste Protein, das vom Parasiten an die Oberfläche des Erythrozyten exprimiert wird, ist das var-Gen kodierte *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1), welcher aus dem roten Blutkörperchen herausragt und so in Kontakt tretet mit den auf dem menschlichen Endothel befindlichen Rezeptoren und ist dadurch Ursache für die schwerwiegende Form der Malaria Erkrankung (severe malaria (SM)). Die Bindung des Proteins an die menschlichen Rezeptoren gilt als Auslöser der Krankheitssymptome. Entsprechend ist eine gut erforschte Interaktionskarte zwischen PfEMP1 und menschlichen Rezeptoren von großer Bedeutung. (Abb. 6)

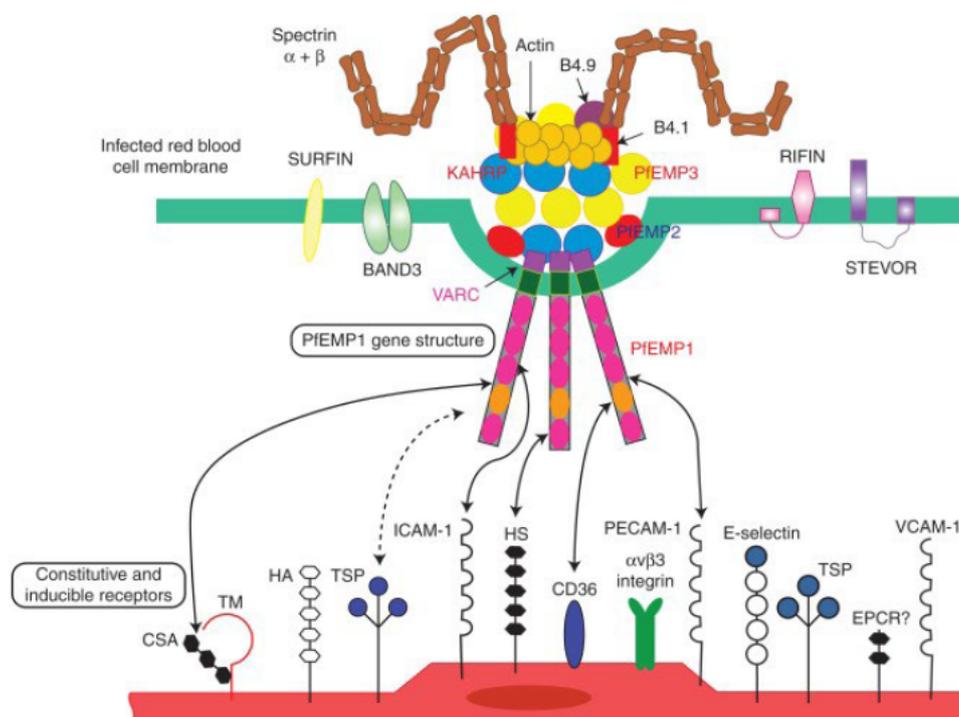


Abb. 6: Das PfEMP1 Protein ragt aus dem Erythrozyten heraus und kommt in Kontakt mit dem menschlichen Endothel, indem durch Bindung, also der Cytoadhäsion, die Krankheit ausgelöst wird. (Milner 2018)

Aus dem Aufbau der von den vielen *var*-Genen kodierten PfEMP1's, lassen sich die Bindungspartner auf der menschlichen Endothelseite, bestimmen. Aufgebaut ist das PfEMP1 aus einem N-Terminal Segment (NTS), Unterklassen der Duffy binding like Domains (DBL) und Cysteine rich interdomains (CIDR), C2 Domains, einer transmembranen Region (TM) und dem Acidic Terminal Segment (ATS) (siehe Abb. 7). Die sechs Unterklassen der DBL Domäne basieren auf Ähnlichkeiten ihrer Aminosäuresequenz und werden als DBL α - ϵ bezeichnet. Oft ist die spezifische Funktionalität der DBL Domäne abhängig von der Zahl der Schleifen ihrer Helix-Struktur. (Gangnard et al. 2015)

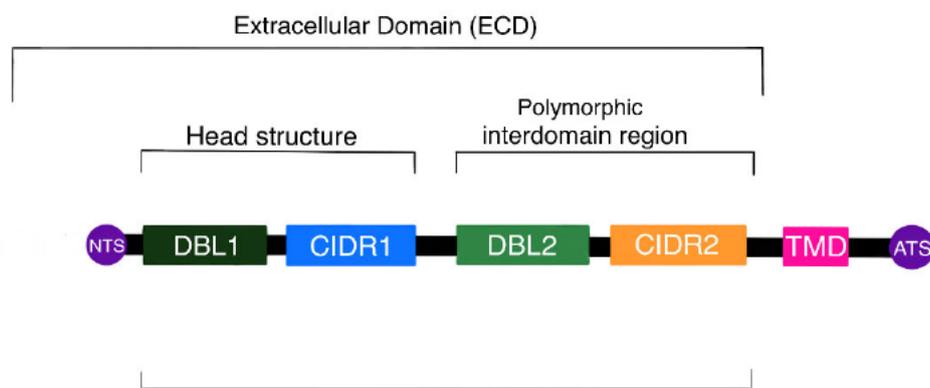


Abb. 7: Darstellung der PfEMP1 Struktur mit Beispielen für Bindungspartner durch DBL und CIDR Domains. (Eigene Darstellung)

DBL α in der Struktur des PfEMP1 weist eine Affinität auf an den Complement receptor 1 (CR1) zu binden, welcher mit dem „Rosetting“-Phänomen in Verbindung gebracht wird. Dabei binden von Plasmodium falciparum infizierte Erythrozyten an uninfizierten Erythrozyten. Rosetting tritt nur bei der SM Erkrankung auf. (Rask et al. 2010) Bei der DBL β Domäne wird eine Adhäsion an den menschlichen Endothelzellrezeptor ICAM-1 beobachtet und die DBL δ Domäne bindet an PECAM-1. (Metwally 2016)

Die CIDR Domäne wird in drei Unterklassen geteilt, welche als CIDR α - γ bezeichnet werden. Beispielsweise ist von CIDR α 2-6 bekannt, dass diese zur Bindung an den CD36 Rezeptor beitragen, welche im allgemeinen häufig auftritt. (Robinson 2003; Smith 2014; Smith et al. 2000). Weiter wird die Idee der Ups-Klassen der *var*-Gene auf die PfEMP1 Proteine übertragen. Da die Ups-A und Ups-B Gene vom 3' zu 3' Ende orientiert sind, und das zentrale Ups-C vom 5' zum 3' Ende als Tandem Repeat vorliegt, definiert man die PfEMP1 Proteine entsprechend dieser Definition als PfEMP1 Proteine der Gruppen A, B und C und den zwischenliegenden Gruppen B/A und B/C die chromosomale Positionen, oder

Domainkompositionen aufweisen, die sich von ihren Ups Klassen unterscheiden. (Rask et al. 2010)

Widerkehrende Abfolgen von PfEMP1 Proteinstrukturen weisen Affinitäten zu bestimmten Rezeptoren auf Endothelzellen auf. Diese Abfolgen werden bezeichnet als Domänenkassetten (DC) und werden bestimmten var-Genen zugeordnet. Beispielsweise kodiert das var01-Gen ein PfEMP1 Protein mit einer Struktur, die eine DBL β 5-Domäne beinhaltet, die nachweislich an den ICAM-1 Rezeptor bindet. (Rask et al. 2010; Metwally 2016).

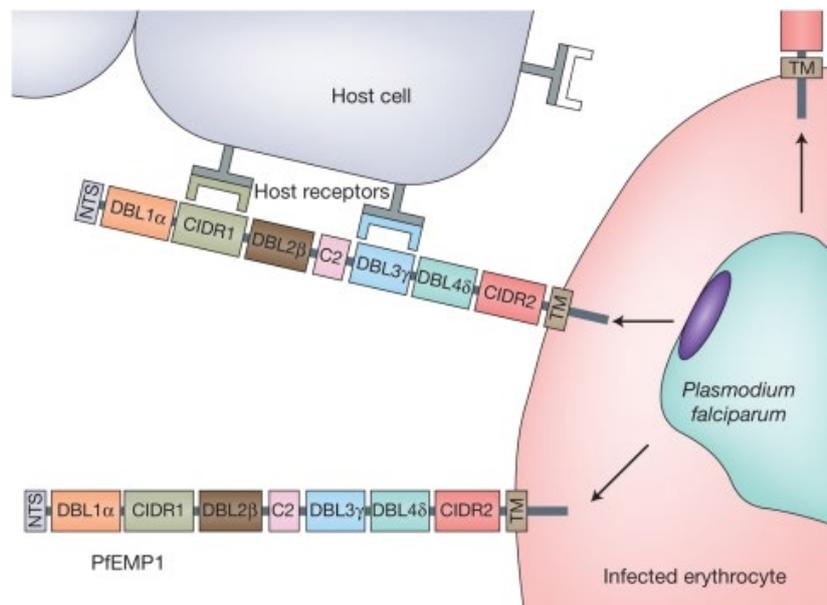


Abb. 8: Darstellung der Cytoadhäsion mit dem vom *P. falciparum* exprimierten PfEMP1 Protein in der strukturellen Darstellung an die Wirtsrezeptoren. (Rowe et al. 2009)

Exprimiert werden die PfEMP1 Proteine auf der Oberfläche der Erythrozyten auf sogenannten „knobs“ die Membranwölbungen darstellen, welche indirekt als Hauptakteure für die Adhäsion zwischen IE und Endothel fungieren. Zur Bildung dieser knobs wird das Strukturgebende KAHRP (knob-associated histidine-rich protein) benötigt. Die Funktion des KAHRP Proteins ist bislang nicht gänzlich verstanden, jedoch beobachtet man eine signifikant höheren Adhäsion durch die knobs. (Taylor et al. 1987; Crabb et al. 1997)

Auch wurde beobachtet, dass eine Inhibierung des KAHRP Proteins dazu führt, dass keine knobs geformt werden können und dadurch geringere Mengen PfEMP1 exprimiert werden, wodurch letztendlich die Cytoadhäsion (siehe Abb. 8) stark sinkt. (Hviid und Jensen 2015)

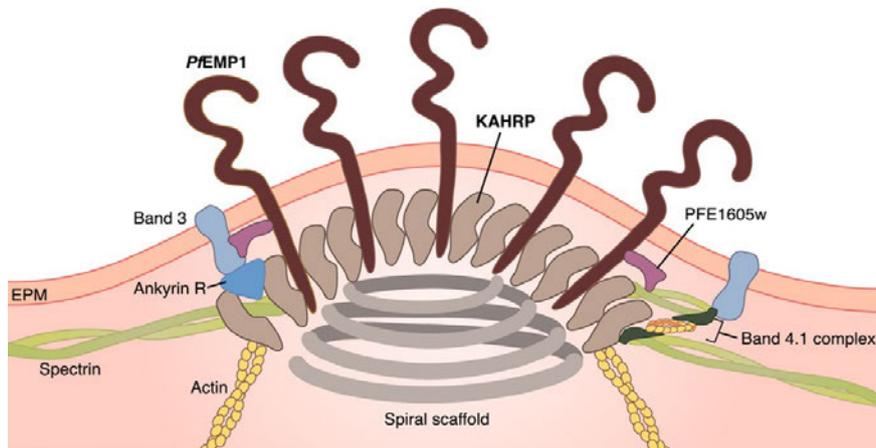


Abb. 9: Schematische Darstellung der Knobstruktur von *P. falciparum* infizierten Erythrozyten. (Helms et al. 2016)

Die Spezifität des PfEMP1 Proteins und die Verbindung zur Wirtsmembran haben entscheidende Auswirkungen auf die Adhäsion von infizierten Erythrozyten. Die Fähigkeit der Parasiten, das Zytoskelett der Erythrozyten umzubauen (siehe Abb. 9) ist durch Bildung von abnormalen knobs gefährdet, welche in einer verminderten PfEMP1-Expression und einer dementsprechend schwächeren Adhäsion resultiert. Ursache für dieses Phänomen sind die Hämoglobinvarianten HbS und HbC und die α -Thalassämie, welche die Adhäsion von infizierten Erythrozyten im Wirt durch Hämoglobinopathien hemmen. (Rask et al. 2010)

1.6 Der EPCR Endothelzellenrezeptor

Der EPCR Rezeptor (engl. endothelial protein C receptor) ist bekannt für dessen essentielle Rolle in der Endothelaktivierung im System des Protein C und dessen Zellschutz. Protein C ist eine Protease, welche bei Aktivierung (activated Protein C (APC)), durch Inhibierung der TNF- α Synthese, antikoagulativ und entzündungshemmend im Gehirn, den Lungen, den Nieren und der Leber wirkt. (Mosnier und Lavstsen 2016)

Durch das Thrombin-Thrombomodulin Komplex erhöht das EPCR die Aktivierung des Protein C. Das APC übt sich zytoprotektiv in Endothelzellen aus, indem es den Protease-aktivierten Rezeptor 1 (PAR1) an Arg46 spaltet und Signalwege schützt, die eine anti-apoptotische und entzündungshemmende Reaktion fördern und die Endothelbarriere stärken.

Untersuchungen an EPCR ergaben, dass die Bindung des PfEMP1 Proteins an EPCR in einem Defizit in der Funktionalität des Protein C Systems resultiert. (Mosnier und Lavstsen 2016)

Zusätzlich wird die Bindung an den Parasiten mit der SM Erkrankung verbunden. (Bernabeu und Smith 2017; Shabani et al. 2016)

Die Bindung des Parasiten an EPCR ist bestimmt durch DC8 PfEMP1 Proteine der Gruppe A var-Gene, die eine CIDR α 1 Domäne in der Kopfgruppe aufweist. (Turner et al. 2013; Shabani et al. 2016; Bernabeu und Smith 2017)

1.7 IT4 *P. faciparum*

Im August 1976 wurde aus einem Malaria erkrankten Patienten aus Fajara-Gambia in Westafrika Blut entnommen, aus dem der in diesem Projekt verwendete IT4-Stamm isoliert und kultiviert wurde. (Jensen und Trager 1978) Heute ist das IT4-Isolat ein verbreiteter Laborstamm. Von Wichtigkeit ist die Eigenschaft des IT4-Isolats, dass dieser die Fähigkeit hat die PfEMP1 Proteine aller var-Gene zu exprimieren.

1.8 CHO Zellen

Chinesische Hamster wurden erstmals 1919 anstelle von Mäusen als Labortiere für die Kategorisierung von Pneumokokken verwendet. Da diese aus ihrem natürlichen Lebensraum entnommen werden und über Generationen hinweg gezüchtet werden müssen, gab es Domestizierungsversuche in der Mitte des 20. Jahrhunderts, welche zur Entwicklung spontaner Erbkrankheiten aufgrund von Inzucht führten. Diese Beobachtung war Motivation für weitere Forschungen an chinesischen Hamstern. Mit Feststellung der geringen Chromosomenzahl des chinesischen Hamsters ($2n = 22$), wurde diese als ein nützliches Modell für Gewebekulturstudien gesehen. Als die Zellen für die Zellgenetik untersucht wurden, wurden die Zellen eines Eierstockes (engl. ovary) aus einem weiblichen chinesischen Hamster isoliert und in Petrischalen kultiviert. (Tjio und Puck 1958)

Es stellte sich heraus, dass die Zellen widerstandsfähig waren und sich für die In-vitro Kulturen eigneten (Jensen et al. 2020; Rask et al. 2010), wodurch sich die CHO (engl. chinese hamster ovary) Zellen in der Kultivierungstechnik etabliert haben.

Die in dieser Arbeit verwendete CHO-745 Klon mit der Bezeichnung psgA-745 stammt von der ATCC (American Type Culture Collection) und stellt eine Mutation der ursprünglichen CHO Zelllinie dar, wodurch diese ihre Fähigkeit verloren hat Glykosaminoglykane zu synthetisieren (Gantt et al. 1997) und keinen CSA (chondroitin sulfate A) Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimiert. Verwendet werden transfizierte CHO-745 Zellen, die CHO-745-EPCR Zellen, welche den humanen Endothelzellenrezeptor EPCR auf ihrer Oberfläche exprimieren und zusätzlich mit einem GFP Vektor versehen sind, wodurch die Vitalität der CHO Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert werden kann. Der fluoreszierende GFP Vektor befindet sich im Zytoplasma der Zelle.

Weiter wird in dieser Arbeit die CHO-K1 Zelllinie verwendet, welche auch eine Mutation der ursprünglichen CHO Zelllinie darstellt, abgeleitet als Subklon der CHO Elternzelle. Dabei werden DNA Sequenzen von einem Vektor zu einem anderen Vektor bewegt bzw. kloniert. Unterscheiden tut sich die CHO-K1 Zelllinie von der CHO-745 Zelllinie, durch die Expression des CSA Rezeptor auf ihrer Oberfläche (Obiakor et al. 2013). Ebenfalls sind diese Zellen transfiziert, um die Fähigkeit zu erhalten den humanen Endothelzellenrezeptor EPCR zu exprimieren. Verwendet werden die CHO-K1-EPCR Zellen in diesem Projekt, weil diese in der Literatur mehrfach Anwendung gefunden haben und für Modelle verwendet wurden. (Avril et al. 2016)

1.9 Parasitenanreicherung: "Panning"

Ziel der Parasitenanreicherung (engl. panning) ist es das Parasitenwachstum zu kontrollieren, um die Bindung an einen gewünschten Rezeptor anzureichern.

Es beschreibt ein Experiment für eine Langzeit-Anreicherung von spezifischen Parasiten. Diese Parasiten exprimieren PfEMP1 Proteine, welche von bestimmten *var*-Genen kodiert wurden und die nur an einen spezifischen Rezeptor binden können.

Für die Anreicherung müssen zwei unterschiedliche Organismen kultiviert werden.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Kulturen handelt es bei den Parasiten um das IT4 Isolat des *P. falciparum* und um die zwei CHO-Zelllinien CHO-745-EPCR und CHO-K1-EPCR. Die CHO-Zelllinien exprimieren durch Selektion mittels Selektionsmarker nur den gewünschten EPCR Rezeptor.

Durch das Zusammenführen dieser beiden Kulturen, binden spezifische PfEMP1 Proteine des Parasiten an den vorhandenen EPCR Rezeptor der CHO-Zelllinien (Cytoadhäsion). Abschließend müssen die an den CHO-Zellen gebundenen Parasiten geerntet und erneut kultiviert werden.

Um die Zahl der Bindungen zu erhöhen, wird dieser Vorgang mehrfach wiederholt. Nach jedem Durchlauf erhöht sich die Zahl der Plasmodien in Kultur, dessen *var*-Gene dazu neigen PfEMP1 Proteine zu kodieren, die an den vorhandenen Rezeptoren binden können, wodurch man eine Anreicherung eines spezifischen bindenden PfEMP1 Proteins erlangt. Für eine Sequenzierung müssen dann die Erythrozyten der Proben aufgeschlossen werden, um die RNA zu isolieren.

1.10 FACS

Das FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) ist eine spezielle Form der Durchflusszytometrie (engl. Flow Cytometry). Der Mechanismus ist eine auf die Zelleigenschaften (relative Zellgröße, Granularität oder der internen Komplexität), oder eine auf Antikörper basierende Methode zur Zählung und Sortierung von Partikeln. Verwendet werden hierfür homogene Flüssigkeiten. Dabei bindet ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff eingefärbter Antikörper an die zugehörigen Partikel des Antikörpers. Die nun markierten Partikel werden von dem Detektor des Durchflusszytometers erkannt und gezählt.

Die für diese Arbeit verwendeten CHO-Zelllinien werden durch das FACS analysiert, um zu prüfen, ob diese den EPCR- bzw. den CSA Rezeptor exprimieren. Das ist nötig, um zu prüfen, ob die angereicherten Parasiten durch die Anreicherungsvorgänge tatsächlich an diese Rezeptoren binden können.

Außerdem wurden die in dieser Arbeit verwendeten transgenen CHO-745-EPCR Zellen zuvor von Frau Dr. Jana Brehmer über das FACS zweifach nach den auf der Oberfläche der Zellen exprimierten EPCR Rezeptoren aussortiert.

1.11 Bestimmung der RNA Quantität

Der NanoDrop (Thermo Scientific) ist ein Spektrophotometer, welches die Konzentration von DNA, RNA und Proteinen photometrisch bestimmen kann.

In dieser Arbeit wird der Nanodrop dafür verwendet die RNA Konzentration der RNA Isolierten Proben nach den Anreicherungszyklen zu bestimmen.

Eingestellt auf einer Wellenlänge von 260 nm, kann der NanoDrop die aromatischen Ringe der Basen der RNA an ihrem Absorptionsmaximum messen.

Zusätzlich kann der NanoDrop die Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 280 nm messen, wodurch die Reinheit der RNA bzw. eine Proteinverunreinigung durch das Verhältnis der Messung bei 260 nm und der Messung bei 280 nm bestimmt werden kann. Ist das Verhältnis unter 1,8, liegt eine Verunreinigung vor. Ein Wert zwischen 1,8 - 2,1 deutet auf eine reine RNA-Lösung hin. (Jensen et al. 2020; Rask et al. 2010)

1.12 Evaluierung der RNA Qualität

Der Bioanalyzer (Agilent Technologies) ist ein Gerät zur Überprüfung der Qualität der RNA. Dafür führt das Gerät eine Kapillar-Elektrophorese durch und überprüft dadurch, ob die RNA intakt ist. Der RIN-Wert (engl. RNA integrity number) wird vom Bioanalyzer bestimmt, welche eine numerische Aussage über die Qualität der RNA angibt. Der Wert der RIN Bestimmung liegt zwischen 1 und 10. Je niedriger der Wert, desto degradiert ist die RNA und je höher der RIN Wert, desto intakter ist die RNA.

1.13 Next Generation Sequencing (NGS)

Das Next Generation Sequencing (NGS) ist eine Transkriptomanalyse zur Untersuchung der RNA (oder auch DNA) Sequenzen und dient in dieser Arbeit dazu, die var-Genexpression der durch die Pannings angereicherten IT4 *P. falciparum* PfEMP1 Proteine zu bestimmen. Die RNA wurde für diesen Zweck der Analyse aus *P. falciparum* infizierten Erythrozyten im Ring-Stadium isoliert, da in diesem Stadium die höchste var-Gen Expression aufgrund der parasitären Entwicklung vorliegt, die zuvor über mehrere Durchläufe auf transgenen CHO-Zellen angereichert wurden. Durchgeführt wurde die Sequenzierung von Herrn Dr. Dániel Cadar aus NGS facility des BNITM.

2 Motivation und Projektidee

Hintergrund dieser Arbeit sind die Forschungsergebnisse die innerhalb der AG Bruchhaus von Yifan Wu erzielt wurden, welcher IT4 *P. falciparum* auf menschlichen Endothelzellen durch Pannings angereichert hat.

Das Ergebnisse der Transkriptomanalyse der Pannings war, dass nur var19 kodierte PfEMP1 Proteine angereichert wurden. (Abb. 10)

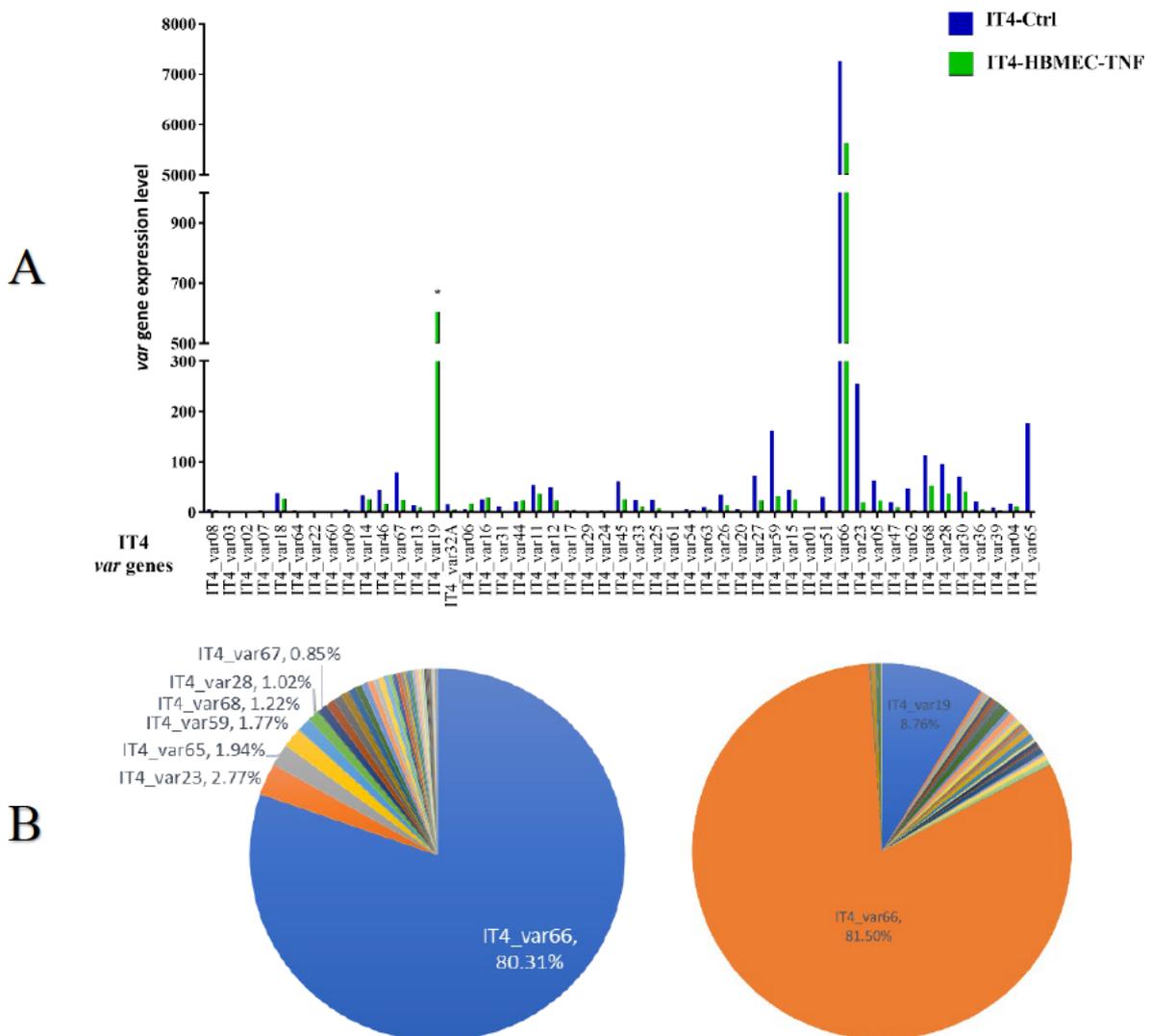


Abb. 10: Ergebnis der Sequenzierung über das NGS für die IT4 *P. falciparum* Kontrolle gegenüber der Anreicherung von IT4 Plasmodien über Endothelzellen (A) Graphische Darstellung mit direktem Vergleich der IT4 *P. falciparum* Kontrolle zur IT4 *P. falciparum* Anreicherung über Endothelzellen (B) Darstellung zur Übersicht als Kreisdiagramm links: IT4 *P. falciparum* Kontrolle, rechts: IT4 *P. falciparum* Anreicherung über Endothelzellen

In Abb. 10 Bild B ist in den Kreisdiagrammen die Anreicherung von var19 dargestellt. Es ist das einzige Gen, welches von der Kontrolle (links) mit 0,04%igen Bindungsanteil an den Endothelzellen, durch das Panning signifikant angereichert wurde (rechts) und dadurch an 8,76 % der Bindungen beteiligt war.

Fraglich ist, dass durch die Anreicherung kein weiteres var-Gen produzierendes PfEMP1 Protein angereichert wurde, da viele weitere var-Gene hätten binden müssen.

Daher wurden die angereicherten Populationen mittels Bindungsassay nochmals über CHO-Zellen angereichert, um zu kontrollieren, an welche Rezeptoren die Parasiten tatsächlich binden (siehe Abb. 11).

Da das var19-Gen in der PfEMP1 Protein Domänenstruktur die DC8 aufweist, welche die CIDR α 1 Domäne beinhaltet, die für die EPCR Bindung verantwortlich ist, bindet das var19 PfEMP1 Protein an den EPCR Rezeptor. (Shabani et al. 2016)

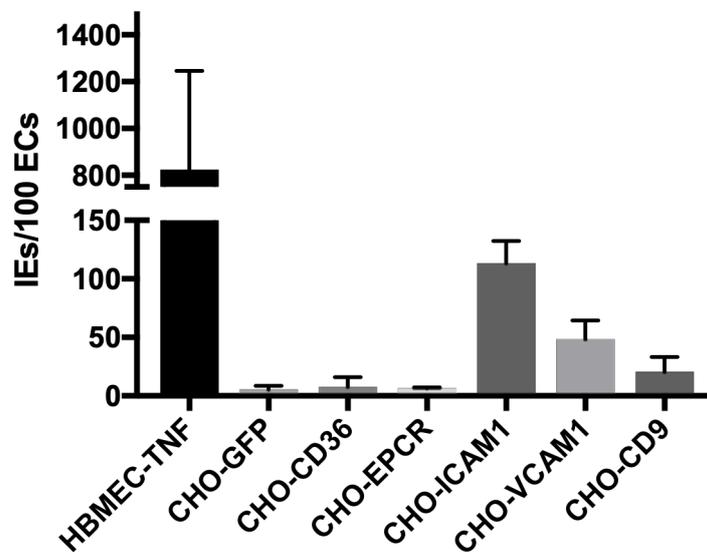


Abb. 11: Bindungsassay des 3. Pannings der var19 Angereicherten PfEMP1 Proteine über Endothelzellen

Überraschenderweise zeigen die Ergebnisse des Bindungsassays, dass die angereicherte Population des 3. Pannings nicht an den EPCR Rezeptor bindet. Stattdessen binden die Parasiten signifikant an den ICAM-1 Rezeptor (siehe Abb. 11).

Entsprechend gilt nun durch diese Arbeit zu untersuchen, warum die Bindung an den CHO-745-EPCR Zellen nicht funktioniert hat.

Außerdem werden in der Literatur CHO-K1-EPCR Zellen verwendet, um durch Anreicherungsvorgänge die Bindung an EPCR zu reproduzieren, was ebenfalls fragwürdig ist, da diese Zelllinie CSA an der Oberfläche besitzt, welcher die Bindung an EPCR inhibieren könnte. Entsprechend muss mittels Transkriptomanalyse in dieser Arbeit untersucht werden, welche Rezeptorspezifisch-bindenden PfEMP1 Proteine auf den CHO-K1-EPCR Zellen angereichert werden. (Avril et al. 2016)

3 Material und Methoden

3.1.1 Verwendete Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte für dieses Projekt

Gerät	Modell	Hersteller
Sicherheitswerkbank	Class II BSC	ESCO Labculture®
	MSC Advantage	Thermo Scientific
Mikroskop	cx31	Olympus
Inverses Mikroskop	Eclipse, TS100	Nikon
Fluoreszenzmikroskop	EVOS FL	Thermofisher
Zentrifuge	5427 R	Eppendorf
	5415 D	Eppendorf
Inkubator mit CO ₂	Function Line	Heraeus Instruments
Wasserbad	SW 20	Julabo
Gefrierschrank -80 °C	FORMA 700 Series	Thermo Scientific
pH-Elektrode	CG 840	Schott
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf
Durchflusszytometer	BD Accuri™ C6	BD Biosciences
Spektrophotometer	NanoDrop 2000	Thermo Scientific
Bioanalyzer	Agilent 2100	Agilent Technologies
Nitrogen Container		Thermo Fisher Scientific
Vortex	VF2	JANKE & KUNKEL
Pumpensystem	Pump System-10902	Ibidi
Feinwaage	BP210S	Sartorius
Eismaschine	EF 156 easy fit	Scotsmann

3.1.2 Software

Tabelle 2: Genutzte Software für dieses Projekt

Software	Hersteller
Agilent 2100 Expert Software	Agilent Technologies
Prism® (Version 9)	Grappa
FlowJo, 10.4.2	LLC

3.1.3 Chemische und biologische Substanzen

Tabelle 3: Für dieses Projekt genutzt Chemische und biologische Substanzen

Medienname	Herkunft
RPMI 1640 Pulvermedium	PanReac AppliChem
Ham's F12 Medium	PAN-Biotech
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAN Biotech
Accutase	PAN-Biotech
Inaktiviertes fötales Rinderserum (iFCS)	Capricorn Scientific
Menschliches Blut der Gruppe 0 ⁺	UKE
NaOH	Carl Roth
HCL	Carl Roth
NaCl	Carl Roth
Glycerol	Merck
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich
Giemsa	Merck
Methanol	Sigma-Aldrich
Gelatine	Sigma-Aldrich
Biocoll Trennlösung	Biochrom
Floureszierende APC-Tag EPCR Antikörper	BioLegend
Floureszierende PE-Tag CSA Antikörper	BioLegend
Hypoxanthine (9636-5G)	Sigma-Aldrich
Gentamicin-ratiopharm 40mg/ml	Ratiopharm
TRizol® Reagent	Life Technologies
Chloroform	Carl Roth
NaHCO ₃	Carl Roth
Gas mixture CRYSTAL-mix (1% O ₂ , 5% CO ₂ , 94% N ₂)	Air Liquide
Zeocin	InvivoGen
G418 (Neomycin)	Greiner Bio-One

3.1.4 Materialien

Tabelle 4: Genutzte Materialien in diesem Projekt

Name	Hersteller
Petrischalen 92x16mm	Sarstedt
Gewebekulturflasche 250 ml (T75) mit Filterdeckel	Sarstedt
Pipetten (20 µL; 200 µL; 1000 µL)	Gilson
Pipettenspitzen (20 µL; 200 µL; 1000 µL)	Sarstedt
Objektträger	Thermo Fisher Scientific
Elektronische Pippetierhilfe	Pipetboy
0,22 µm Stericup Vacuum Filter	EMD
Sterile FACS-Röhrchen (5 mL)	Falcon™
1,5/2 mL Safe-lock Reaktionsgefäße	Eppendorf
Kryoröhrchen 1,6 mL	Sarstedt
Zentrifugationsröhrchen (15 mL; 50 mL)	Falcon™
Messpipetten (5 mL; 15 mL)	Sarstedt
Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific

3.1.5 Kits

Tabelle 5: Verwendete Kits in diesem Projekt

Name	Hersteller
Agilent RNA 6000 Pico Kit (Bioanalyzer Kit)	Agilent Technologies
PureLink™ RNA Mini Kit (RNA-Isolation Kit)	Thermo Fisher Scientific

3.1.6 Zelllinien

Tabelle 6: In diesem Projekt verwendete Zelllinien

Zelllinie	Vektor	Rezeptor
IT4		
CHO-K1-Zellen		EPCR
CHO-745-Zellen	pAc-GFP1-N1	EPCR
CHO-wildtype		

3.1.7 Ansätze

Tabelle 7: Ansätze für die in diesem Projekt verwendeten Parasitenkulturen

Plasmodienkultur	
RPMI-Plasmodien Medium, steril filtriert (0,22 µm)	
RPMI 1640 Pulver	16,4 g
Hypoxanthin	0,05 g
7,5% NaHCO ₃	30 mL
Gentamicin	250 µL
Inaktiviertes Humanes Serum	100 mL
Destilliertes H ₂ O	1 L
pH-Wert: 7,2, Lagerung bei 4 °C für maximal 2 Wochen	
Malaria thawing solution (MTS) – 3,5% NaCl, steril filtriert (0,22 µm)	
NaCl	35 g
Destilliertes H ₂ O	1 L
Lagerung bei 4 °C	
Malaria freezing solution (MFS), steril filtriert (0,22 µm)	
D-Sorbitol	3 g
NaCl	0,65 g
Glycerol	28 mL
Destilliertes H ₂ O	72 mL
Lagerung bei 4 °C	
5% D-Sorbitol Plasmodium Synchronisationsmedium	
D-Sorbitol	25 g
Destilliertes H ₂ O	500 mL
Lagerung bei 4 °C	
20% Giemsalösung	
Giemsa	20 mL
Destilliertes H ₂ O	80 mL
Lagerung bei RT für maximal 2 Tage	
1% Gelatinelösung für die Synchronisation mittels knob-Selektion, steril filtriert (0,22 µm)	
RPMI-Plasmodien Medium ohne humanem Serum	100 mL
175 Bloom Gelatine Pulver (vom Schwein)	1 g
Bei 37 °C verrühren, Lagerung bei 4 °C	

Tabelle 8: Ansätze für die in diesem Projekt verwendeten CHO-Zellkulturen

CHO-Zellkultur	
CHO-Zellkulturmedium Ham's F12 mit L-Glutamin + 25 mL HEPES Inaktiviertes Fetales Kälberserum (iFCS) Penicillin/Streptomycin Mix (100x) Lagerung bei 4 °C	500 mL 50 mL 5 mL
CHO-Gefrierlösung CHO-Zellkulturmedium DMSO (10% - steril) Lagerung bei 4 °C	45 mL 5 mL
FACS Puffer Inaktiviertes Fetales Kälberserum (iFCS) PBS (1X) pH-Wert: 7,4	2 mL 98 mL
10x PBS, autoklaviert NaCl 1,37 M KCl 27 mM Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) 100 mM KH ₂ PO ₄ 18 mM Destilliertes H ₂ O pH-Wert: 7,4	80 g/L 2 g/L 14.4 g/L 2.4 g/L 5 L

3.2 Methoden

3.2.1 Plasmodien Auftauen

Zu Beginn der Kultivierung musste zunächst eine bereits existierende und eingefrorene Kultur aufgetaut werden. Dafür wurde aus einem -80°C Gefrierschrank, eine in einem 1 mL Kryoröhrchen befindliche IT4 P. falciparum Kultur entnommen und in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurde die aufgetaute Kultur in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Um die Kultur zu waschen, wurde zusätzlich dasselbe Volumen MTS hinzugegeben und für 2 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pumpensystem verworfen. Das Pellet wurde zwei weitere Male mit 1 mL MTS resuspendiert und bei gleichen

Einstellung zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10 mL bei 37 °C vorgewärmtem RPMI Kulturmedium resuspendiert und auf eine Petrischale überführt. Um der Kultur Erythrozyten beizufügen, wurde dieser 500 µL menschliches Blut der Blutgruppe O⁺ hinzugegeben.

3.2.2 Plasmodien Kultivieren

Damit die Parasiten wachsen, sich entwickeln und vermehren können, muss die Umgebung der Parasiten kontrolliert sein. Vorzugsweise wird das RPMI Kulturmedium der Plasmodien täglich, spätestens jeden zweiten Tag, mit 10 mL frischem RPMI Kulturmedium mittels Pumpensystem gewechselt. Dafür wurde die obere Phase in der Petrischale, bei der es sich um das „alte“ RPMI Kulturmedium handelt abgenommen, bevor „neues“ RPMI Kulturmedium hinzugefügt werden konnte. Damit die Merozoiten wachsen und sich vermehren konnten, mussten der Parasitenkultur regelmäßig Erythrozyten zugeführt werden. Dazu wurde den Plasmodien wöchentlich 200-500 µL O⁺ Blut hinzugegeben. Abschließend wurde das Kulturhäuschen mit einem Gasgemisch aus 1% O₂, 5% CO₂ und 94% N₂ begast und luftdicht verschlossen. Da der Entwicklungszyklus des *P. falciparum* vom Trophozoiten zum Schizonten etwa 24h beträgt, wird in diesem Zeitraum keine Vermehrung des Parasiten beobachtet. Ebenfalls benötigt die Entwicklung vom Schizonten zum Trophozoiten 24h, bei der nun die Merozoiten nach dem Aufbruch des Schizonten freigelassen werden und zur weiteren intraerythrozytären Entwicklung umliegende Erythrozyten befallen. Durch diesen Entwicklungsschritt erhöht sich die Dichte der Kultur um den Faktor 5 bis 10.

3.2.3 Plasmodien Auszählung (Giemsa)

Um den fortlaufenden Umgang mit den Parasiten zu planen, ist eine regelmäßige Beobachtung des Parasitenwachstums nötig. Abgeleitet von der durch die Parasitenausählung erhaltenen prozentualen Dichte, der Parasitämie, wird die spezifische Behandlung der Kultur bestimmt.

Für die Parasitenausählung wurde ein 10 µL Abstrich der auf den Boden der Petrischale sedimentierten Kultur auf einen Objektträger durchgeführt. Zum fixieren des Abstriches wurde der Objektträger für etwa 30 Sekunden in Methanol getaucht. Anschließend wurde der Objektträger für 10 Minuten in eine 20% Giemsalösung getaucht, welche die Erythrozyten und

die darin befindlichen Plasmodien einfärbt. Unter dem Mikroskop wurde dann die Parasitämie auf dem Objektträger bestimmt.

3.2.4 Plasmodien Einfrieren

Um Vorräte und Zwischenspeicher der parasitären Kulturen zu erstellen, werden diese eingefroren. Dafür sollte die Kultur >1% Ring-Trophozoiten aufweisen. Dafür wurde die Kultur resuspendiert und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen übertragen und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Für jeden geplanten Vorrat wurde 1 mL MFS auf das Pellet gegeben, um es zu darin zu resuspendieren. Je 1 mL wurde in Kryoröhrchen übertragen, für mind. 1 Tag in einem Mr. Frosty Gefrierbehälter bei -80 °C eingefroren und anschließend ohne Mr. Frosty bei -80 °C aufbewahrt.

Ein Mr. Frosty ist ein mit Ethanol gefüllter Behälter in dem Proben in einem Gefrierschrank schonend bei einer Kühlung von -1 °C/min eingefroren werden können.

3.2.5 Synchronisation mittels knob Anreicherung

Durch sporadische Mutationen, die entstehen durch den Verlust von Chromosom 2 aus der subtelomerischen Region, verlieren die Plasmodien die Fähigkeit knobs auf der Oberfläche der Erythrozyten zu produzieren. Um die mutierten Parasiten von den gesunden Schizonten zu trennen, wurde eine Synchronisation der gesunden ausgereiften Trophozoiten und Schizonten der Kultur mittels knob Anreicherung durchgeführt. Mittels 1% Gelatine, bei dem die Schizonten mit knobs nach einer Zentrifugation an der Gelatine binden, trennten sich die knob-losen Parasiten, zu denen die Schizonten ohne knobs, Ring-Form Trophozoiten, Merozoiten und uninfizierte Erythrozyten im Pellet gehören, von den knob-besitzenden Parasiten im Überstand. Dadurch wurde das Entwicklungsstadium der Plasmodienkultur synchronisiert.

Dafür musste die Kultur in der Petrischale resuspendiert, in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen übertragen und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen. Auf das Pellet wurden vorsichtig 500 µL 37 °C vorgewärmtes RPMI Kulturmedium und 2 mL einer 1%igen bei 37 °C vorgewärmten Gelatinelösung gegeben, um Bläschen zu vermeiden und wurden dann mittels Pipette miteinander vermischt. Das Zentrifugenröhrchen

wurde nun für 20-30 Minuten bei 37 °C inkubiert, sodass durch Sedimentation zwei Phasen entstanden, bei der sich die Schizonten mit knobs in der oberen Phase, der Gelatine, befinden. Nach der Inkubation wurde 1 mL vom Überstand in ein neues 15 mL Zentrifugenröhrchen übertragen, zum Waschen mit 3 mL RPMI Kulturmedium vermischt und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Der Erfolg der Synchronisation wurde mittels eines 2 µL Abstrich des Pellets auf einem Objektträger unter dem Mikroskop kontrolliert (siehe Abb. 12) und abschließend wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben in einer Petrischale kultiviert.

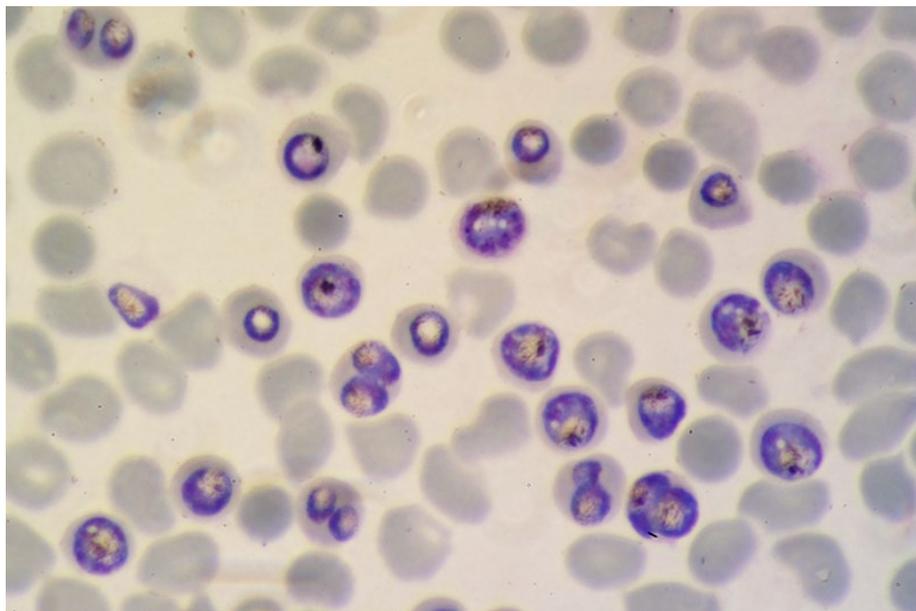


Abb. 12: Abstrich von infizierten Erythrozyten nach knob enrichment (BNITM 2022)

3.2.6 Synchronisierung durch D-Sorbitol

Durch Behandlung der Plasmodienkultur mit D-Sorbitol war eine Synchronisation der Entwicklungsstufen möglich, indem die reifen Trophozoiten, Schizonten und Merozoiten von den jungen Trophozoiten in Ring-Form getrennt wurden. (Lambros und Vanderberg 1979) Dabei wurde die Plasmodienkultur resuspendiert und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen übertragen und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit dem 6-fachen Volumen des Pellets in 37 °C vorgewärmten 5% D-Sorbitol-Lösung resuspendiert. Die Lösung wurde für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde nun durch 4-5 Maliger Inversion des Zentrifugenröhrchen vermischt und dann für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen. Der Erfolg der Synchronisation wurde durch einen 10 µL Abstrich des Pellets auf einen Objektträger unter

einem Mikroskop kontrolliert. (siehe Abb. 13) Das Pellet wurde abschließend mit 500 μL 0^+ Blut und 10 mL 37°C vorgewärmtem RPMI Kulturmedium resuspendiert und auf eine

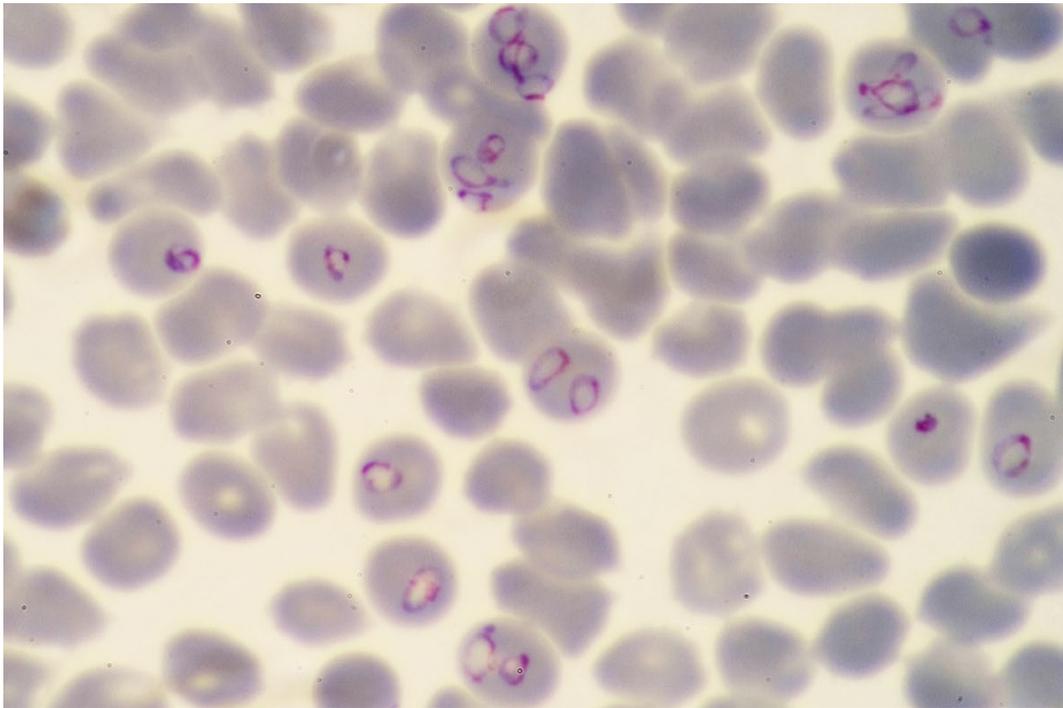


Abb. 13: Abstrich von infizierten Erythrozyten nach Sorbitol Synchronisation (BNITM 2022)

Petrischale übertragen und bei 37°C inkubiert.

3.2.7 CHO-Zellen auftauen, kultivieren und selektieren

Zu Beginn wurden die CHO Zellen mit einem Volumen von 1 mL in einem Kryoröhrchen aus dem -80°C Gefrierschrank in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Nachfolgend wurden die aufgetauten CHO Zellen und 5 mL des Ham's F12 Zellkulturmedium in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen mittels Pipette miteinander vermischt und zum Waschen für 2 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Abschließend wurde das Pellet mit 5 mL Ham's F12 Zellkulturmedium resuspendiert und in eine 250 ml Gewebekulturflasche mit Filterdeckel gegeben und bei 37°C inkubiert.

Zusätzlich zum Zellkulturmedium wurde für die Selektion der transgenen CHO-Zellen Zellen 0,1 mL (20 $\mu\text{L}/\text{mL}$) der G418 (Neomycin) Selektionsmarker hinzugegeben.

Für die CHO-K1-EPCR Zellen wurden anstatt des G418 Selektionsmarkers 25 μL (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) des Zeocin Selektionsmarkers verwendet.

Der Konfluenz entsprechend wurde das Medium der CHO-Zellen täglich, spätestens jeden zweiten Tag, mit neuem Ham's F12 Zellkulturmedium und Selektionsmarker mittels Pumpensystem und Pipette ausgetauscht. Da es sich bei CHO-Zellen um adhärenente Zellen handelt, konnte das gesamte Medium entfernt werden, da die Zellen an der Gewebekulturflasche hafteten.

Bei einer zu hohen Zelldichte wurde das in der Gewebekulturflasche befindliche Kulturmedium mittels Pumpensystem entnommen und zum Waschen mit 3 mL einer bei 37 °C vorgewärmten PBS (1x)-Lösung befüllt, leicht geschwenkt und wieder abgenommen. Nachfolgend wurden die Zellen zum Lösen vom Flaschenboden mit 500 µL Accutase behandelt. Nach einer 5 minütigen Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ Zufuhr wurden die Zellen durch intensives Klopfen an der Flasche nahezu vollständig gelöst. Zur Inhibierung der Accutase wurden die Zellen abschließend in der Kulturflasche mit 5 mL des Ham's F12 Zellkulturmedium resuspendiert, der Konfluenz entsprechend gesplittet und mit dem Zellkulturmedium wieder auf 5 mL aufgefüllt. Für die Rezeptorselektion musste der Kultur je nach Zelllinie das Neomycin (100 µL bei CHO-745-EPCR), oder das Zeocin (25 µL bei CHO-K1-EPCR) beigefügt und bei 37 °C und 5% CO₂ Zufuhr inkubiert werden.

3.2.8 CHO- Zellen einfrieren

Um Vorräte der CHO-Zellen zu erstellen, wurden diese eingefroren. Dafür wurden die Zellen wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben, von der Flasche gelöst, mit 5 mL Zellmedium befüllt, in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen übertragen und bei 1200 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet, in dem sich nun die CHO-Zellen befanden, wurden mit 1 mL/Vorrat CHO-Gefrierlösung resuspendiert und in Kryoröhrchen übertragen. Diese wurden für mind. 1 Tag in einem Mr. Frosty Gefrierbehälter bei -80 °C gelagert und anschließend ohne Mr. Frosty bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.9 Panning

Da bei der Anreicherung von bestimmten Zielparasiten, dem Panning, die Parasiten an die CHO-Zellen binden sollten und Parasiten nur in der Entwicklungsstufe des Schizonten das PfEMP1 Protein zur Bindung exprimieren, musste eine knob Anreicherung durchgeführt

werden, um die anderen Entwicklungsstufen von dem Stadium des Schizonten und den reifen Trophozoiten zu trennen. Die knob Anreicherung geschah wie unter Kapitel 3.2.5 beschrieben, dabei sollte die Parasitenkultur keine Parasitämie $< 5\%$ aufweisen.

Anschließend wurde das Pellet mit 5 mL des RPMI Kulturmedium für Plasmodien ohne humanem Serum resuspendiert und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet erneut mit 5 mL des RPMI Kulturmediums ohne humanem Serum resuspendiert. Parallel dazu wurde das Ham's F12 Kulturmedium der CHO-Zellen, die eine Konfluenz $> 70\%$ aufwies, auch mit dem RPMI Kulturmedium ohne humanem Serum gewechselt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Kulturmedium aus der Kulturfalsche entnommen. Die im vorherigen Schritt vorbereiteten Plasmodien wurden nun vollständig in die Kulturflasche der CHO-Zellen überführt und für eine Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Dabei wurde die Flasche für 1h alle 15 Minuten für 45 Sekunden geschwenkt, um Parasiten auf den CHO-Zellen zu bewegen um neue Bindungsplätze zu schaffen. Um die ungebundenen Parasiten aus der Parasit-CHO-Zellen-Kultur zu entfernen, wurde die Kulturflasche drei Mal mit dem RPMI Kulturmedium ohne humanem Serum mittels Pipette gewaschen, indem das Medium vorsichtig in die umgedrehte Kulturflasche gegeben wurde, damit das hinzugeführte Medium die gebundenen Parasiten durch den Druck der Pipette nicht löst, um das Medium dann wieder zu entfernen. Abschließend wurden die Bindungen unter einem Mikroskop kontrolliert und dann wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, nun aber in der Gewebekulturflasche, wieder kultiviert.

Am Folgetag wurde die Kultur in der Kulturflasche resuspendiert und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen übertragen und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. In ein weiteres 15 mL Zentrifugenröhrchen wurde 7 mL einer Biocolllösung gegeben. Die Zentrifugierte Parasiten-CHO-Zellenkultur wurde langsam auf die Biocolllösung gegeben, sodass diese sich nicht vermischten und man zwei Phasen erhielt. Zweck dieser Prozedur war es die CHO-Zellen von den Parasiten zu trennen. Bezeichnet wurde dieser Vorgang als Ernte. Die Lösung wurde für 20 Minuten bei 2300 rpm zentrifugiert, dabei wurde die Zentrifuge ohne Stop-Funktion betrieben, damit sich aufgrund der Trägheit der Massen, durch die Bremse der Zentrifuge, die beiden Lösungen nicht wieder vermischten. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde nun mit dem Medium gewaschen. Dafür wurde das Pellet mit 5 mL des humanen Serum enthaltenden RPMI Kulturmedium resuspendiert und für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet, das nun

die geernteten Plasmodien beinhalten, wurde nun wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben auf eine Petrischale übertragen und kultiviert.

Abschließend wurden die infizierten Erythrozyten der Anreicherungsverfahren mit der höchsten Parasitenbindungszahl, welche üblicherweise die letzten drei Pannings sind, mittels TRIzol® Reagent aufgeschlossen, um die RNA aus den Zellen zu befreien. Zur Vorbereitung für den Aufschluss musste die Kultur aufgrund der starken Genexpression junge Ring-Trophozoiten aufweisen. Diese erreicht man durch die in Kapitel 3.2.6 beschriebene D-Sorbitol Synchronisation. Das nach der Synchronisation vorhandene Pellet wurde ein weiteres Mal mit 5 mL RPMI Kulturmedium gewaschen und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde nun mit 3 mL TRIzol® Reagent resuspendiert, für 15 Sekunden kräftig geschüttelt und dann für 5 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Abschließend wurde das Zentrifugenröhrchen bei -80 °C eingefroren.

3.2.10 RNA Isolation und Quantifizierung

Zur Isolierung der RNA wurden die gefrorenen Lysat-Proben aus Kapitel 3.2.9 für 5 Minuten in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend auf Eis kühl gehalten, da diese ansonst degradieren würden.

Weiter erfolgte die RNA Isolierung nach Herstellerangaben über das PureLink™ RNA Mini Kit des Herstellers Thermo Fisher Scientific.

Die Quantifizierung, und damit auch die Kontrolle über den Erfolg der isolierten RNA, erfolgte als photometrische Bestimmung mittels NanoDrop.

Abschließend wurde die isolierte RNA bei -80 °C eingefroren.

3.2.11 Überprüfung der RNA Qualität für die Transkriptomanalyse

Um die RNA isolierten Proben für die Qualitätsüberprüfung vorzubereiten, wurden die eingefrorenen Proben bei RT aufgetaut und zur Kühlung auf Eis gelegt. Anschließend wurden Aliquots aus den Proben erstellt, welche dann entsprechend der in Kapitel 3.2.10 gemessenen RNA Konzentration für den Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies) auf eine Konzentration von 5 ng/μL in RNase freiem Wasser verdünnt wurden.

Die Proben aus denen die Aliquots hergestellt wurden, wurden zügig wieder bei -80 °C eingefroren.

Nachfolgend wurde die RNA Qualitätsüberprüfung mit den verdünnten Aliquots nach Herstellerangaben über das Agilent RNA 6000 Pico Kit des Herstellers Agilent Technologies durchgeführt.

3.2.12 FACS

Für das FACS-Experiment wurden drei unterschiedliche CHO Zelllinien kultiviert. Zu den bislang beschriebenen CHO-745-EPCR und den CHO-K1-EPCR Zellen wurden nun CHO-wildtype (CHO-wt) Zellen kultiviert, die nicht mit einem Selektionsmarker behandelt wurden und zur Kontrolle dienten. Um die Zellen für das FACS vorzubereiten, mussten diese erst aufgereinigt und mit dem fluoreszierenden Antikörper versetzt werden. Um die CHO-wt Zellen, die CHO-K1-EPCR Zellen und die CHO-EPCR Zellen zu ernten, wurden die Zellen wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben mit 500 µL Accutase von der Kulturflasche gelöst. Die gelösten Zellen wurden nun in 5 mL Ham's F12 Medium verdünnt und in 15 mL Zentrifugenröhrchen zum Waschen für zwei Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Die Pellets wurden jeweils in 4 mL FACS Puffer resuspendiert und mit je 2 mL auf zwei FACS Tubes aufgeteilt. Die FACS Tubes wurden nun zum Waschen für 5 Minuten bei 1200 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden dekantiert. Die Pellets wurden mit 2 mL FACS Puffer resuspendiert. Die Waschung wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nun wurde einem FACS Tube aus jeder CHO-Zelllinie 2 µL des APC (Allophycocyanin) getaggten EPCR Antikörper hinzugegeben und mittels Vortex in Lösung gebracht. Die FACS Tubes wurden zum Kühlen auf Eis gelegt und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert, um eine Degradierung der Fluoreszenz der Antikörper zu verhindern und nachfolgend gevortex zu werden. Drei weitere Waschvorgänge wurden, wie vorher beschrieben, durchgeführt. Die Pellets des letzten Waschvorganges wurden nun mit 500 µL FACS Puffer mittels Vortex resuspendiert.

Die Lösungen wurden abschließend mit dem Accuri Durchflusszytometer BD C6 (BD Biosciences) gemessen. Dafür wurde das Limit der Partikelzählung auf 20000 gesetzt.

4 Ergebnisse & Diskussion

4.1.1 Panning IT4 *P. falciparum* über CHO-745-EPCR

Nach jedem Anreicherungsdurchlauf der IT4 *P. falciparum* Parasiten auf den CHO-745-EPCR Zellen, durch das Panning, wurden mittels Mikroskop Bilder aufgenommen, bei denen die Parasitenbindungen an die CHO Zellen sichtbar wurden (siehe Abb. 14).

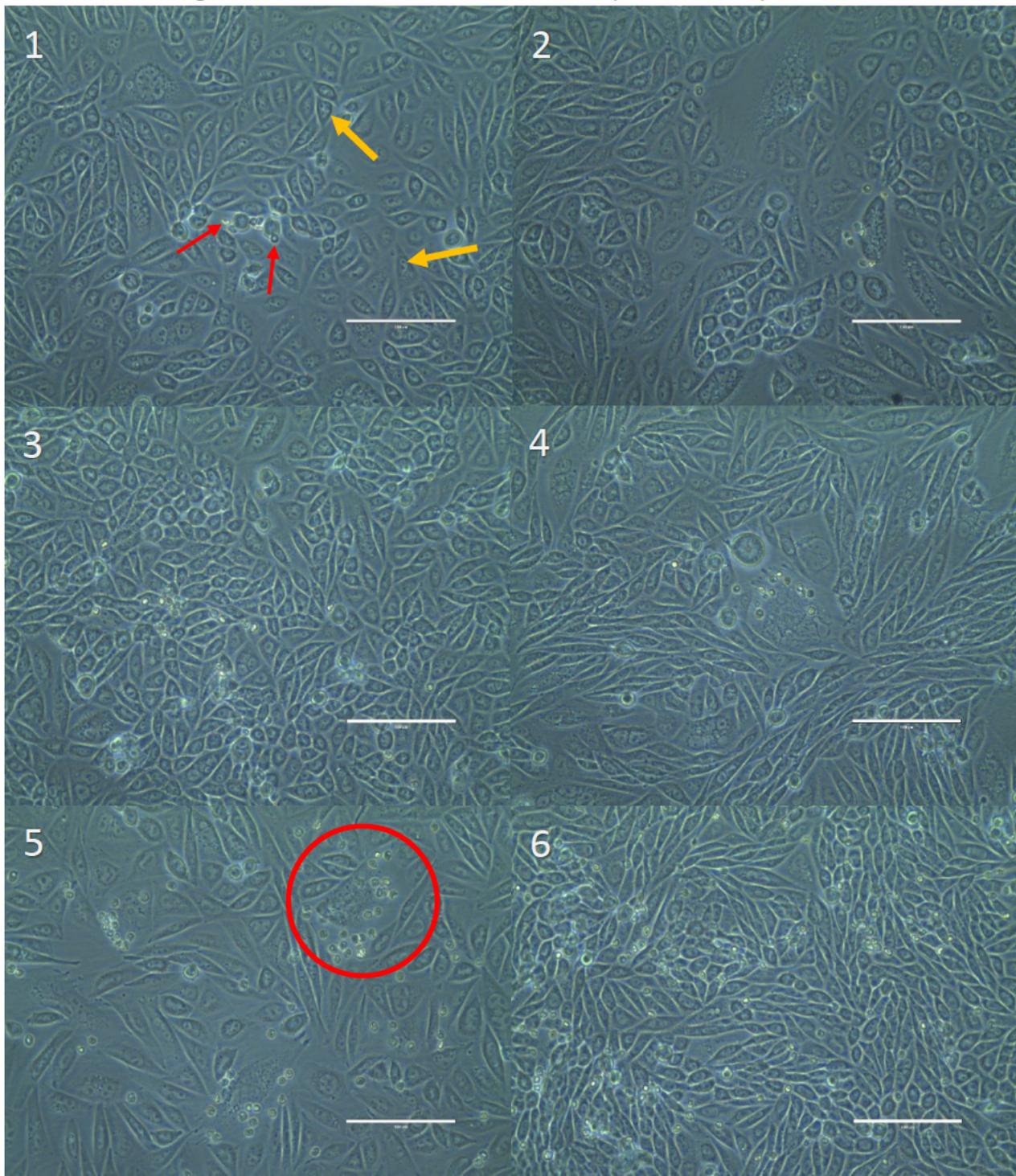


Abb. 14: Darstellung der Anreicherungsrounds Panning 1-6 von IT4 *P. falciparum* über CHO-745-EPCR. Der Maßstabsbalken zeigt 100 μm an.

Die in der Abb. 14 dargestellten Anreicherungsrounden sollen repräsentativ für die jeweiligen Panningdurchläufe sein. Die CHO-Zellen sind präsentiert als Monolayer, dargestellt in den Bildern 1-6, welche sich über die gesamte Kulturflasche erstrecken (gelbe Pfeile in Bild 1, Abbildung 14). Sichtbar sind auch die Nuklei im Zentrum der CHO-Zellen. Die deutlich kleineren rund bis ovalen Formen sind die IT4 *P. falciparum* Parasiten (Rote Pfeile in Bild 1, Abbildung 14), welche an die CHO Zellen binden. Vereinzelt finden sich auch Parasiten die nicht an CHO-Zellen gebunden sind, welche durch die Waschvorgänge, die in Kapitel 3.2.9 beschrieben wurden, nicht entfernt werden konnten. In Bild 5 der Abb. 14 (rot markiert) zeigt sich ein Phänomen, welches bisher durch die Malariaforschung nicht erklärt werden konnte (Metwally et al. 2017). Dargestellt ist eine sich nicht replizierte CHO-Zelle, deutlich durch die größere Form der Zelle und den vielen zytoplasmatische Vakuolen und größeren oder multiplen Nuclei zu welcher die Parasiten eine signifikant höhere Bindungsaffinität aufzeigen. Bezeichnet werden diese Zellen die die Fähigkeit verloren haben sich zu vermehren, jedoch noch metabolisch aktiv sind, als „alternde Zellen“ (Metwally et al. 2017)

Bekannt ist, dass diese alternden Zellen stark bindende Moleküle wie den CD44 Rezeptor auf ihrer Oberfläche aufweisen. (Lowe und Raj 2014)

Obwohl fünf Anreicherungsrounden für diesen Versuch geplant waren, wurden sechs durchgeführt. Grund dafür liegt bei einer Kontamination des vierten Pannings. Durch das Auftauen einer eingefrorenen Panning 3 Parasitenkultur Probe und dem anschließenden Wiederholen des 4. Pannings (Abb. 14, Bild 4) wurde eine geringere Bindungszahl der

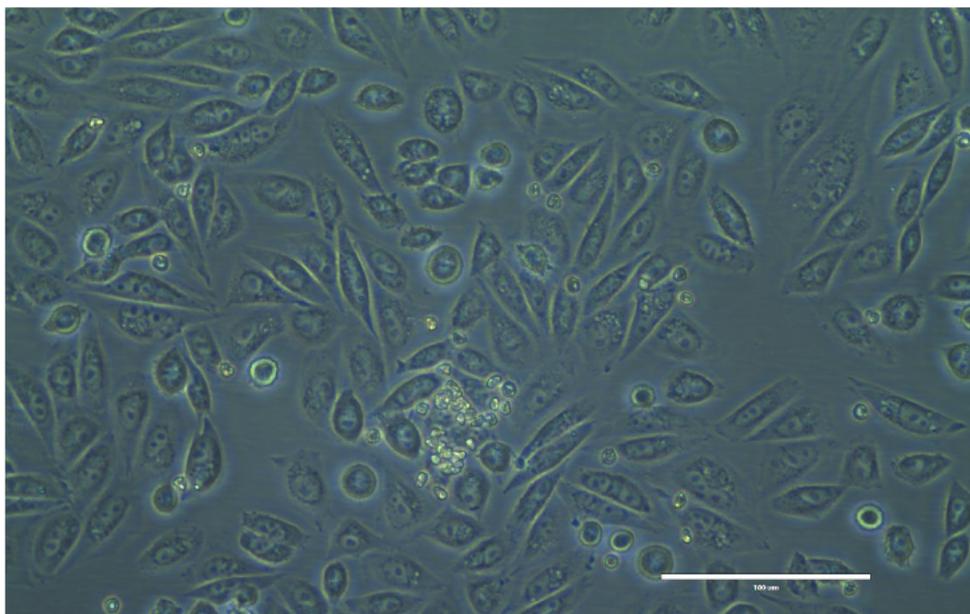


Abb. 15: Panning 4 IT4 *P. falciparum* über CHO-745-EPCR. Kontaminiert und verworfen, Panning wurde wiederholt, jedoch wurde eine signifikant geringere Parasitenbindung wahrgenommen, sodass ein 6. Panning dem Versuch angehängt wurde

Parasiten erzielt als zuvor (siehe Abb. 15) , welche wahrscheinlich durch die Belastung der Gefrierung der Parasiten verursacht wurden, weshalb nach Beratung entschieden wurde, das eine weitere Anreicherungsrunde angehängt wird, dem Panning 6. (siehe Abb. 14, Bild 6).

Auch die Anreicherungsrunde Panning 5 (siehe Abb. 14, Bild 5) scheint noch von der Gefrierung der Panning 3 Parasiten Kultur belastet zu sein. Eine Erholung der Gefrierung wird erst in Panning 6 (siehe Abb. 15, Bild 6) ersichtlich.

Grundsätzlich ist über den Verlauf der Anreicherungsrounden von Panning 1-6 eine Steigerung der Parasitenbindungen an die CHO-745-EPCR Zellen erkennbar. Diese Beobachtung deutet auf den Erfolg der Anreicherung eines Rezeptor-spezifisch bindenden *P. falciparum* infizierten Erythrozyten hin.

4.1.2 Panning IT4 *P. falciparum* über CHO-K1-EPCR

Nach jedem Anreicherungsdurchlauf der IT4 *P. falciparum* Parasiten auf den CHO-K1-EPCR Zellen durch das Panning, wurden mittels Mikroskopen Bilder aufgenommen, bei denen die Parasitenbindungen an die CHO Zellen sichtbar werden (siehe Abb. 16) Diese dargestellten Anreicherungsrounden sollen repräsentativ für die jeweiligen Panningdurchläufe sein.

Ähnlich wie bei der Anreicherung der Parasiten auf der CHO-745-EPCR Zelllinie, werden auch bei dieser Anreicherung beim ersten Panning eine sehr geringe Parasitenbindung an die CHO-Zellen generiert. Deutlich sind die Sprünge in der Zahl Parasitenbindung nach jeder Anreicherungsrunde der Parasiten auf die CHO-K1-EPCR Zelllinie, welche signifikant höher sind als bei der CHO-745-EPCR Zelllinie. Auch hier zeigt die signifikante Affinitätssteigerung der Parasitenbindungen an den Zellen den Erfolg der Parasitenanreicherung mit spezifischen Rezeptor bindenden *P. falciparum* infizierten Erythrozyten.

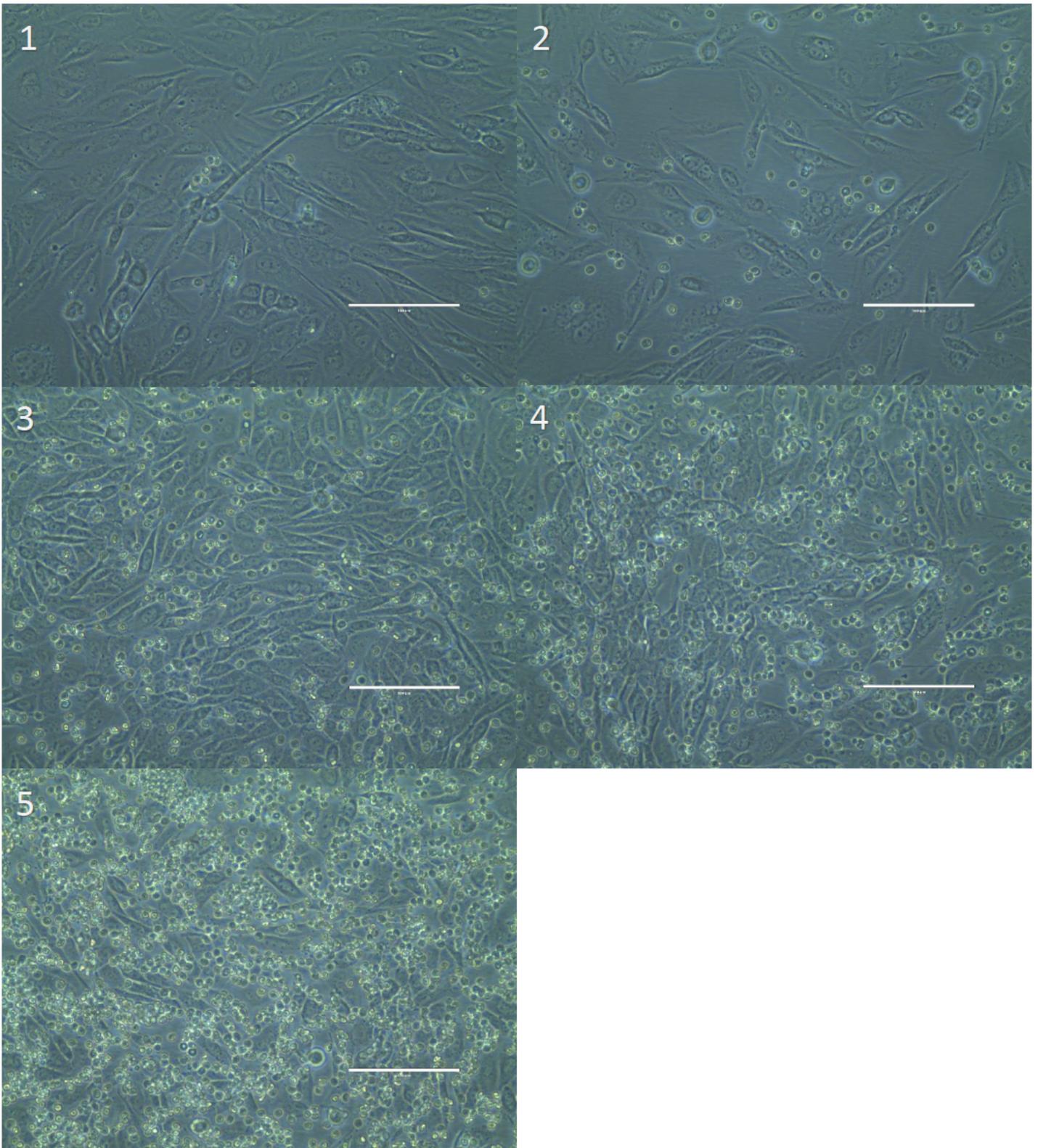


Abb. 16: Darstellung der Anreicherungsrounds Panning 1-5 (Bild 1-5 entsprechen der jeweiligen Panningrunde) von IT4 *P. falciparum* über CHO-K1-EPCR. Der Maßstabsbalken zeigt 100 µm an.

Deutlich wird die exponentiell wachsende Bindungszahl der Parasiten an den CHO-K1-EPCR Zellen. Im direkten Vergleich der Anreicherung der Parasiten auf den beiden CHO-Zelllinien wird deutlich, dass das Panning mit den CHO-745-EPCR Zellen erheblich schlechter ausgefallen

ist. Durch die signifikant höhere Affinität der Parasiten an die CHO-K1-EPCR Zellen kann die Fähigkeit und die Qualität der CHO-745-EPCR die EPCR Rezeptoren an der Zelloberfläche zu exprimieren in Frage gestellt werden. Entsprechend bedarf es einer Analyse der beiden Zelllinien im Bezug auf ihre EPCR Rezeptorexpression.

4.2 FACS Ergebnisse

Für die Analyse der EPCR Rezeptorexpression auf den CHO-745-EPCR und CHO-K1-EPCR Zelllinien wurde die Durchflusszytometrie entsprechend Kapitel 3.2.12 durchgeführt.

Die in Abb. 16 dargestellten Diagramme stellen die Ergebnisse dieser FACS Durchführung dar.

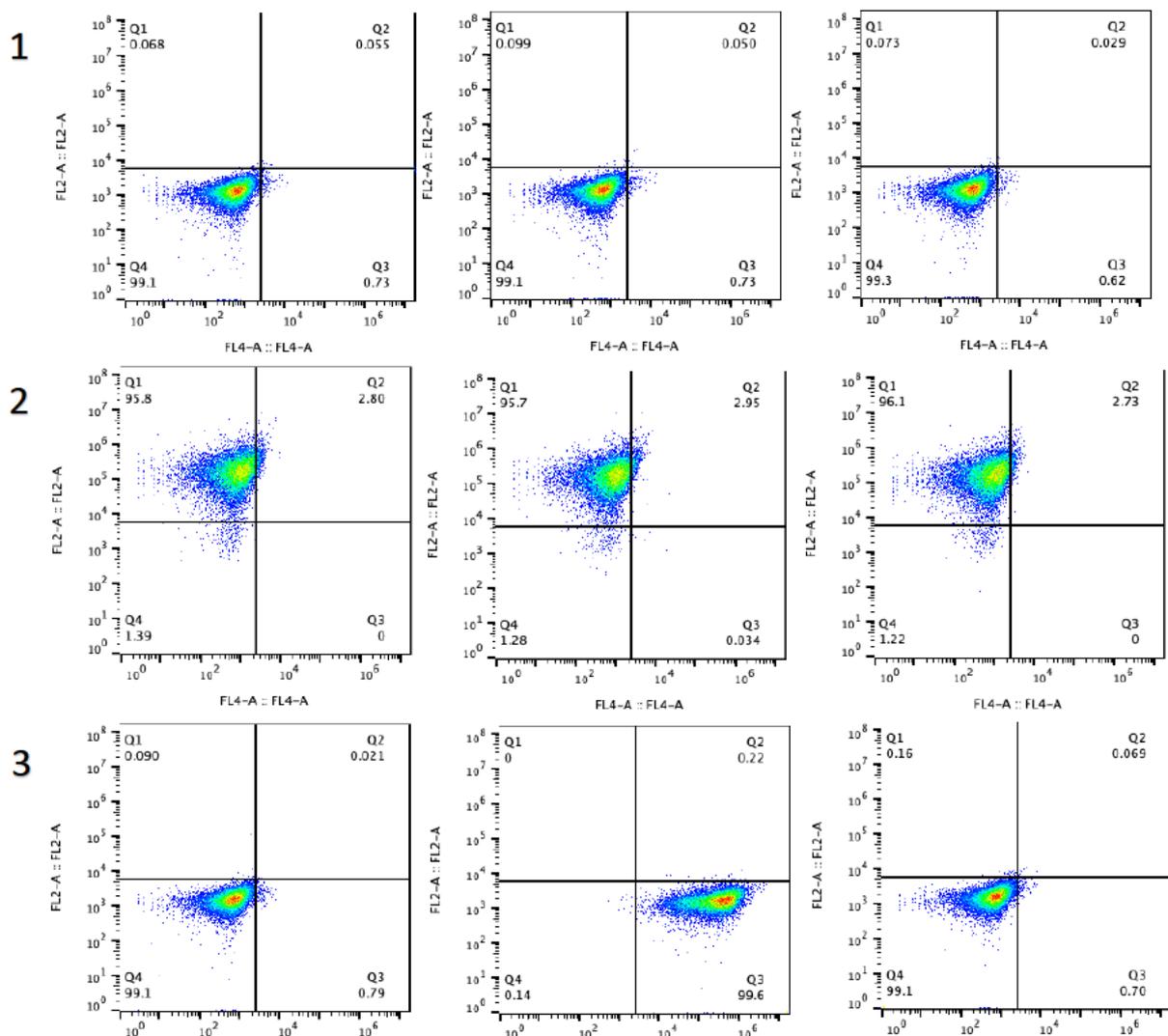


Abb. 17: FACS Ergebnisse der Analyse der CHO-wt, CHO-745-EPCR und CHO-K1-EPCR Zelllinien ohne Antikörper, mit EPCR Antikörper und mit CSA Antikörper. Durchlauf 1-3 des Versuches. Messungen: (1) links: CHO-wt, mitte: CHO-wt + EPCR Antikörper, rechts: CHO-wt + CSA Antikörper (2) links: CHO-745-EPCR, mitte: CHO-745-EPCR + EPCR Antikörper, rechts: CHO-745-EPCR + CSA Antikörper (3) links: CHO-K1-EPCR, mitte: CHO-K1-EPCR + EPCR Antikörper, rechts: CHO-K1-EPCR + CSA Antikörper

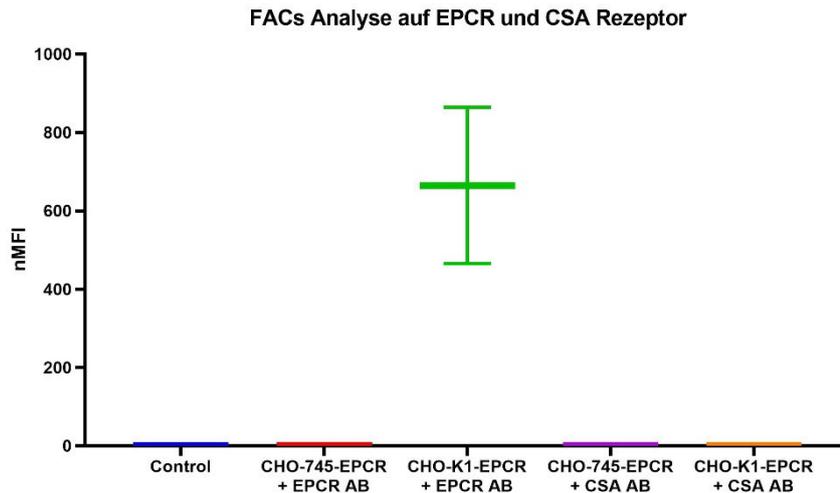


Abb. 18: Grafische Darstellung der drei FACS Durchläufe aus der Abbildung x der EPCR- und CSA Expression der Zelllinien CHO-745-EPCR und CHO-K1-EPCR mit EPCR- und CSA Antikörpern. Die Y-Achse stellt den nMFI dar (normalized median fluorescence intensity) und dient zur Normalisierung der Fluoreszenz gegen die jeweilige Kontrolle

Die in Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse der FACS Analyse veranschaulichen den Unterschied der Zelllinien CHO-wt, CHO-745-EPCR und CHO-K1-EPCR in ihrer Expression des EPCR- und CSA Rezeptors, durch Hinzugabe der fluoreszierenden EPCR- und CSA Antikörper. Durchgeführt wurde der Versuch drei Mal, zeitlich versetzt und jeweils mit neu aufgetauten Zellen. Da alle drei Durchläufe ähnliche Ergebnisse lieferten, soll das Ergebnis aus Abbildung 17 und Abbildung 18 repräsentativ für alle drei Durchläufe sein.

In Abb. 17 werden die Achsen als "FL" bezeichnet und stellen Detektorkanäle zur Messung für fluoreszierende Substanzen (in diesem Falle Antikörper) dar.

Die X-Achse, der FL4 Kanal, identifiziert und zählt den APC markierten EPCR Antikörper. Die Y-Achse bezieht sich auf den FL2 Kanal, der den PE (Phycoerythrin) markierten CSA Antikörper identifiziert und zählt. Die PE- und CSA Tags agieren hier als fluoreszierende Färbung zur Markierung.

Als Kontrolle gilt die Rezeptorexpression des Wildtypen der CHO-Zellen, des CHO-wt, indem die Quadratmarkierung aller Diagramme in Abbildung 17 sich auf die Extrema der CHO-wt Expression beziehen (>99% aller Partikel befinden sich im Quadrat 4).

Entsprechend der Erwartung, weicht das Ergebnis für die CHO-wt Zellen mit Antikörpern nicht von den CHO-wt Zellen ohne EPCR Antikörper ab, da diese nicht transfiziert oder mittels Selektionsmarker behandelt sind. (Abb. 17, Messung "1")

In der zweiten Zeile (Abb. 17, Messung "2") wird die Rezeptorexpression von CHO-745-EPCR mit und ohne EPCR- und CSA Antikörper dargestellt. Abweichend zur CHO-wt Negativkontrolle

weist das CHO-745-EPCR Partikelidentifikationen im FL2 Detektorkanal auf. Da diese CHO-Zellen den fluoreszierenden GFP Vektor pAc-GFP1-N1 beinhalten, besteht die Möglichkeit, dass der FL2-Kanal diese detektiert und dadurch das abweichende Ergebnis zur Kontrolle aufweist. Überraschend ist, dass sich die Messung von CHO-745-EPCR mit EPCR Antikörper, nicht von der Messung ohne EPCR Antikörper unterscheidet. Entsprechend bedeutet es, dass der EPCR Antikörper keinen EPCR-Bindungspartner auf den CHO-745-EPCR Zellen finden konnte, womit das Resultat der FACS Messung, um die Fähigkeit der EPCR Expression auf der Oberfläche der Zellen zu testen, für diese Zellen negativ ist. Demzufolge sind diese CHO-Zellen beschädigt, oder anderweitig nicht in Ordnung.

Um endgültig einen Fehler bei der Durchführung der drei Durchläufe des Versuchs auszuschließen, wurde der Versuch ein viertes Mal wiederholt.

Da die CHO-745-EPCR Zellen nicht sehr langlebig sind, bestand die Vermutung, dass diese möglicherweise vor der Durchflusszytometrie zu lange in Kultur gehalten wurden, wodurch diese dadurch hätten beschädigt sein können. Dafür wurde der GFP fluoreszierende Vektor pAc-GFP1-N1 an den CHO-Zellen mittels Mikroskop einen Tag vor Durchführung des FACS-Versuches untersucht. (siehe Abb. 19)

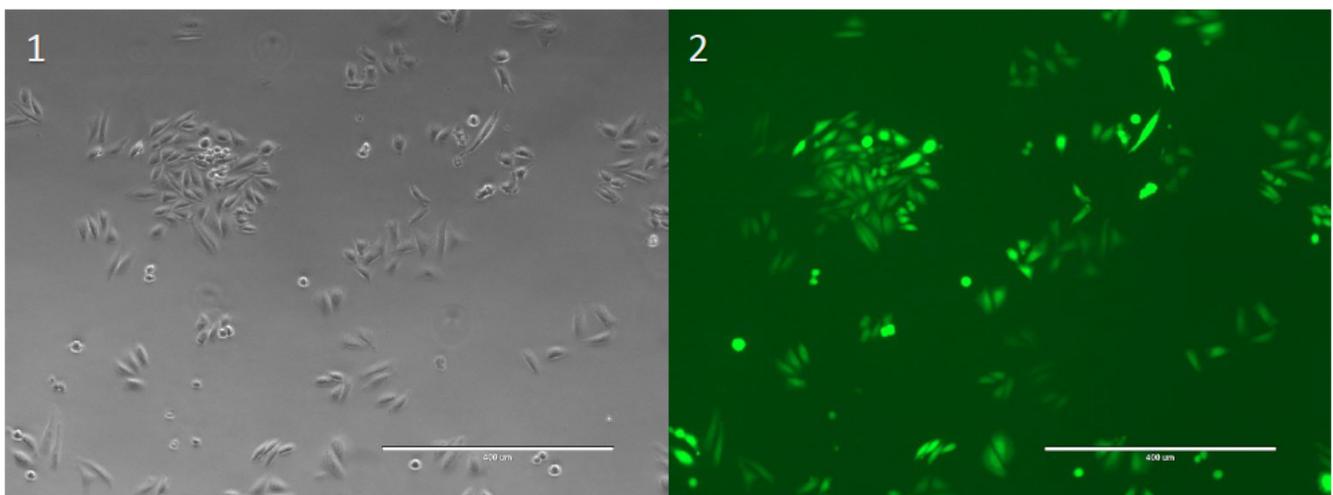


Abb. 19: Kontrolle der Vitalität der CHO-745-EPCR Zellen mittels Mikroskop. Links: Phasenkontrastmikroskopische Darstellung, rechts: Im GFP Kanal

Abbildung 19 stellt im linken Bild (1) durch die Phasenkontrastmikroskopie die CHO-Zellen dar. Diese Darstellung ist unabhängig von der Vitalität der Zellen und zeigt nur die Präsenz dieser an. Demgegenüber sind im rechten Bild (2) dieselben Zellen, nun aber im GFP fluoreszierenden Kanal dargestellt. Da die Vektoren in den Zellen im GFP Kanal durch das zu sehende grüne leuchten erkenntlich werden und die Vektoren direkt mit der Vitalität der Zellen verbunden

sind, und auch nur dann leuchten, zeigt das Bild 2 der Abbildung, dass die Zellen im vitalen Zustand vorliegen.

Der durchflusszytometrische Versuch für die Zählung der Rezeptoren wurde in diesem Durchlauf ebenfalls wie in Kapitel x beschrieben durchgeführt.

Die folgend dargestellten Diagramme zeigen die Ergebnisse des vierten FACS Durchlaufs und dient zur Kontrolle der ersten drei Durchläufe (siehe Abb. 20).

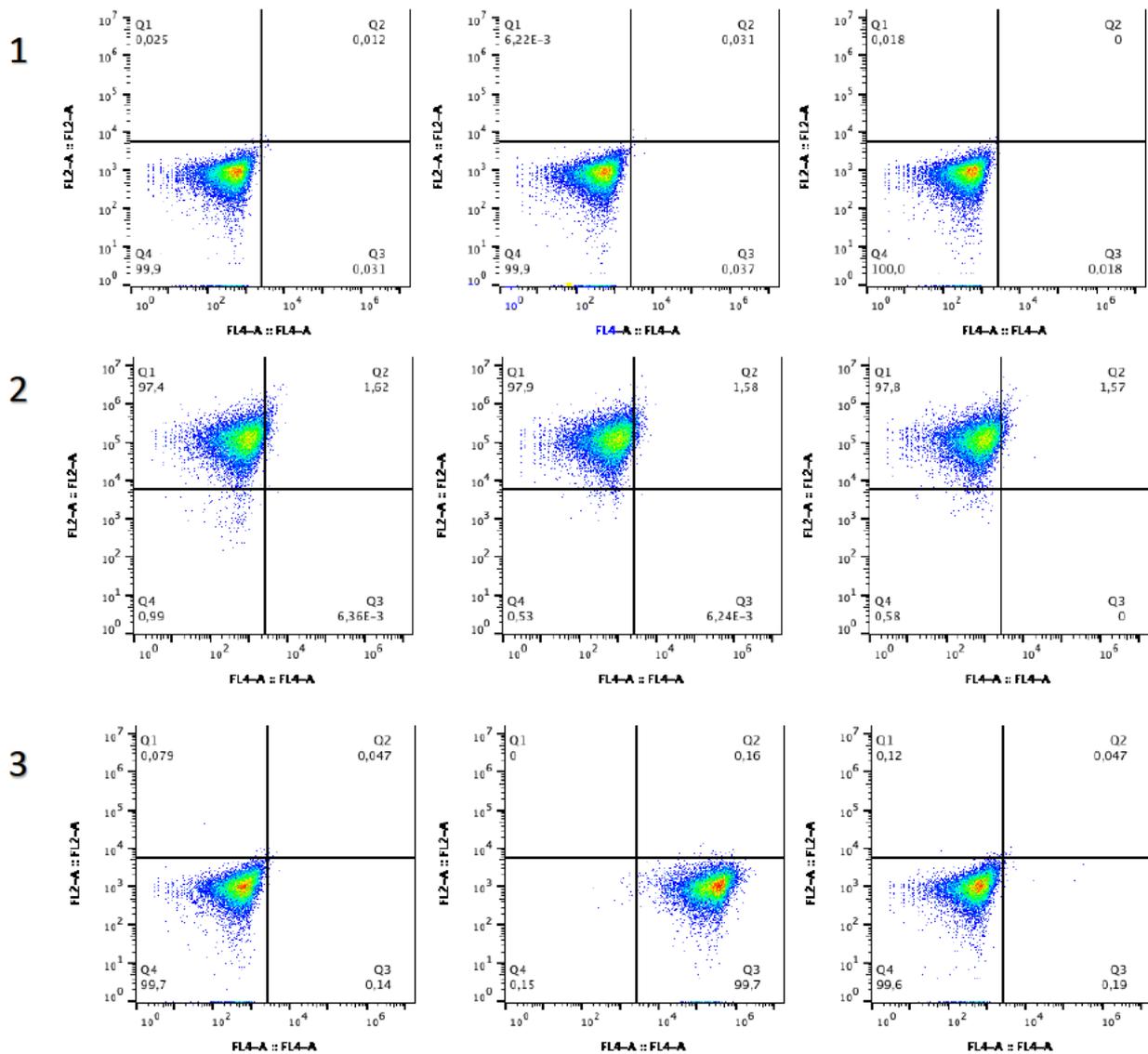


Abb. 20: FACS Ergebnisse der Analyse der CHO-wt, CHO-745-EPCR und CHO-K1-EPCR Zelllinien ohne Antikörper, mit EPCR Antikörper und mit CSA Antikörper. Durchlauf 4. Messungen: (1) links: CHO-wt, mitte: CHO-wt + EPCR Antikörper, rechts: CHO-wt + CSA Antikörper (2) links: CHO-745-EPCR, mitte: CHO-745-EPCR + EPCR Antikörper, rechts: CHO-745-EPCR + CSA Antikörper (3) links: CHO-K1-EPCR, mitte: CHO-K1-EPCR + EPCR Antikörper, rechts: CHO-K1-EPCR + CSA Antikörper

Die identischen Ergebnisse des vierten Durchlaufs in Abbildung 20 bestätigen die Ergebnisse der ersten drei Durchläufe und das Resultat, dass eine EPCR Expression auf der Oberfläche der CHO-745-EPCR Zellen nicht vorhanden ist.

Die aus den vier FACS Durchläufen ermittelten Werte für die EPCR Expressionen werden im folgenden Diagramm veranschaulicht dargestellt und zeigen, dass das CHO-K1-EPCR im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante EPCR Expression auf der Oberfläche besitzt, während das CHO-745-EPCR die gleiche Expression aufweist wie die Kontrolle (siehe Abb. 21).

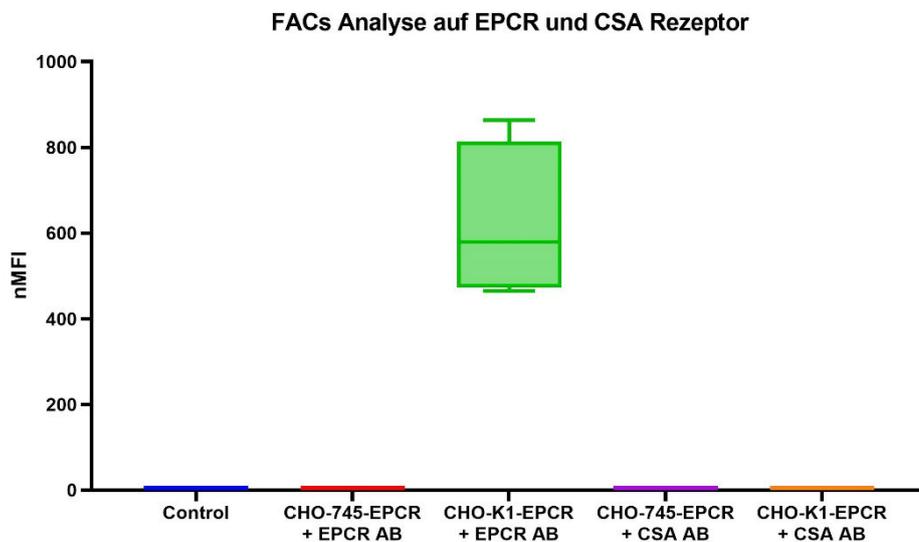


Abb. 21: Grafische Darstellung der aller (1.-4.) FACS Durchläufe der EPCR- und CSA Expression der Zelllinien CHO-745-EPCR und CHO-K1-EPCR mit EPCR- und CSA Antikörper neben der CHO-wt Kontrolle

Ursache für ein solches Ergebnis bei dem die EPCR Antikörper keinen Bindungspartner finden, sodass das FACS kein Signal des APC Marker im FL4 Kanal identifizieren kann, könnte ein falsch gefalteter EPCR Rezeptor sein, oder der EPCR Rezeptor falsch bzw. nicht an die Oberfläche der Zellen transportiert wird. Entsprechend ist das Ergebnis der Sequenzierung über das Next-Generation-Sequencing von großem Interesse, da dadurch ermittelt wird, welche PfEMP1 Proteine durch die Anreicherung an die Rezeptoren der CHO-745-EPCR Zellen gebunden haben.

In der dritten Zeile (Abb. 20, Messung "3") wird die Rezeptorexpression auf CHO-K1-EPCR ohne Antikörper, mit EPCR- und CSA Antikörper Zellen dargestellt. Die CHO-K1-EPCR Zellen ohne Antikörper (links) verhalten sich wie vermutet, wie die CHO-wt Kontrolle.

Die CHO-K1-EPCR Probe mit zugeführtem EPCR Antikörper weist dagegen ein Signal im FL4 Kanal auf. Die Detektion bedeutet, dass sich EPCR auf der Oberfläche der CHO-K1-EPCR Zellen befindet, da das zugesetzte fluoreszierende Antigen vom FACS, durch die Bindung an den EPCR Rezeptor detektiert werden konnte. Entsprechend ist die FACS Kontrolle für die Expression des EPCR Rezeptors auf dieser Zelllinie positiv. (Abb. 21)

Die Probe mit zugeführtem CSA Antikörper entspricht der Rezeptorexpression der CHO-wt Kontrolle und ist somit CSA negativ. Da von den CHO-K1-EPCR Zellen bekannt ist, dass diese CSA auf ihrer Oberfläche besitzen, ist hier auch die Transkriptomanalyse von Interesse, um zu erfahren, zu welchen Rezeptorbindenden Domänen die Anreicherung des Parasiten auf den CHO-K1-EPCR Zellen geführt hat, um festzustellen ob sich die Versuche bestätigen oder sich eine Divergenz der Ergebnisse ergibt.

Insgesamt sind die Ergebnisse der FACS Analyse fraglich und unerwartet. Durch viermaliger Durchführung des Versuches, wurde ein Fokus auf zufällige Fehler gesetzt und besonders Acht geben auf eine gründliche und korrekte Ausführung der Vorgehensweise. Daher liegt der Fehler vermutlich nicht bei einer falschen Durchführung.

Da die CHO-745-EPCR Zellen zweifach durch FACS sortiert wurden (wie in Kapitel 1.10 erwähnt) ist es zwar unwahrscheinlich, dass die Zellen kein EPCR besitzen, besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Zellen beschädigt sind und der EPCR Rezeptor vorliegt, jedoch falsch gefaltet ist. Ein anderer Grund könnte eine Inhibierung beim Transport des Rezeptors an dessen Oberfläche sein.

Auch ist zu untersuchen inwiefern die Antigene funktionsfähig sind, auf denen die ganze FACS Analyse aufbaut. Entsprechend ist über diese Arbeit hinaus die FACS Analyse mit neuen Antikörpern und einem anderen FACS Gerät durchzuführen, um Fehler bei der Durchführung ausschließen zu können.

Nichtsdestotrotz harmonisieren die Ergebnisse des Pannings der IT4 *P. falciparum* Parasiten über den CHO-745-EPCR Zellen, die sehr schwach ausgefallen sind, mit den FACS Ergebnissen der CHO-745-EPCR Zellen mit EPCR Antikörper, welche EPCR negativ war.

Entsprechend wurde durch das Panning auf den CHO-745-EPCR Zellen kein spezifischer Rezeptor angereichert. Im Hintergrund der eigentlichen Anreicherung findet immer eine unspezifische Bindung (eine ungewollte) statt, die wir bei dieser Anreicherung vermutlich beobachten konnten. Was auch die schwache Anreicherung der IT4 Parasiten über den CHO-

745-EPCR Zellen erklären würde. Vergleichbar ist die unspezifische Anreicherung von CHO-Rezeptoren mit einem Hintergrundrauschen sind.

4.3 Ergebnisse der Quantifizierung der RNA

Die Quantifizierung der RNA nach dessen Isolation (Kapitel 3.2.10) aus den Anreicherungsrounden der IT *P. falciparum* Parasiten über den CHO-745-EPCR und den CHO-K1-EPCR Zellen mittels NanoDrop Spektrophotometer ergab folgende Ergebnisse. (Tabelle 9)

Tabelle 9: Ergebnisse der RNA Konzentrationsbestimmung mit OD260/OD280 Verhältnis zu Angabe der Reinheit

IT4 über CHO-745-EPCR		
Anreicherungsrunde	Konzentration [ng/μL]	OD260/OD280
Panning 4	194,7	2,21
Panning 5	251,9	2,27
Panning 6	128,6	2,16
IT4 über CHO-K1-EPCR		
Panning 3	237,5	2,22
Panning 4	102,9	2,02
Panning 5	234,4	2,19

Die in Tabelle 9 präsentierten Daten zeigen, dass die RNA Isolationen der Pannings sowohl bezüglich der Konzentrationen als auch dem Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm zu 280 nm erfolgreich durchgeführt wurden. Die Konzentration aller Proben ist ausreichend für die Erstellung von Aliquots für den Bioanalyser und der Sequenzierung. Bei allen RNA isolierten Proben aus Tabelle 9 handelt es sich entsprechend des OD260/OD280-Wertes um nicht von Proteinen verunreinigten Proben (Wert über >1,8).

4.4 Ergebnisse der RNA Qualitätsanalyse

Die über den Bioanalyzer (MARKE) gemessene Qualität der RNA der Proben aus Kapitel 3.2.11 haben die in Tabelle 10 Dargestellten RIN-Werte ergeben.

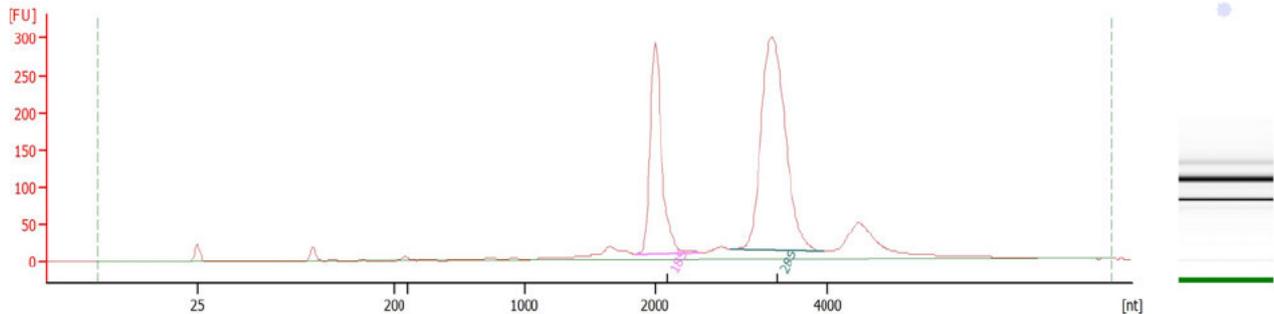


Abb. 22: Beispiel einer graphischen Darstellung einer Qualitätsmessung des Bioanalyzer mit einem RIN Wert von 9,8, Probe: Panning 5 IT4 *P. falciparum* über CHO-K1-EPCR

Tabelle 10: Auflistung der RIN Werte aller Panningrunden für IT4 *P. falciparum* über CHO-745-EPCR und CHO-K1-EPCR

IT4 über CHO-745-EPCR	
Anreicherungsrunde	RIN- Wert
Panning 4	9,7
Panning 5	9,8
Panning 6	9,7
IT4 über CHO-K1-EPCR	
Panning 3	9,7
Panning 4	9,6
Panning 5	9,8

Alle Proben der Anreicherungsrounden weisen hohe RIN-Werte zwischen 9,6-9,8 auf, was bedeutet, dass alle RNA Proben intakt sind und keine Degradierung bei den Proben vorliegt. Entsprechend ist die Messung der Qualität der RNA positiv gewesen.

4.5 NGS Ergebnisse

Die durch die NGS Transkriptomanalyse erhaltenen Ergebnisse zur Bestimmung der Genexpression von IT4 *P. falciparum* nach Anreicherung auf CHO-745-EPCR und CHO-K1-EPCR wurden in den Abbildungen im Anhang dargestellt.

Die Abbildungen wurden aus der im Anhang präsentierten Daten aus der Spalte "foldchange" erstellt, welche aus dem Verhältnis von "basemeanB" zu "basemeanA" errechnet wurde. "BasemeanA" beschreibt dabei den Mittelwert der Genexpression der IT4 Kontrolle, wobei "basemeanB" das Niveau der Genexpression der IT4 angereicherten Proben darstellt. Der erhaltene normierte Wert für das Niveau der Genexpression der jeweiligen var-Gene stellt das Ergebnis der Transkriptomanalyse dar.

Da sich die basemeanb Werte aus drei Werten Zusammenstellen (den drei Panningproben), kann es sein, dass ein hoher foldchange-Wert einen falschen Eindruck erwecken könnte, wenn einer der drei Werte ausreißt. Zur Kontrolle werden die aussagekräftigeren statistischen Werte padj (p-adjust) herangezogen, welche auch in der Tabelle x zu finden sind. Befindet sich der $\text{padj} \leq 0,05$, bestätigt dieser den foldchange. Ein Wert $\text{padj} > 0,05$ würde die Signifikanz des foldchange-Wertes nichtig machen.

Beim IT4_var34 handelt es sich um ein Pseudogen, weshalb dieser in die Betrachtung nicht eingebunden wird und deshalb nicht in den Kreisdiagramm in Abb. 23 und Abb. 24 auftaucht.

4.5.1 Profil der var-Genexpression von IT4 P. falciparum über CHO-745-EPCR

Verglichen wird die Genexpression der IT4 P. falciparum Kontrolle mit der Genexpression des angereicherten IT4 P. falciparums über die CHO-745-EPCR Zellen. (Abb.23)

Dargestellt wird ein Diagramm, erstellt aus den basemeanA- und basemeanB Werten aus der die Genexpression der Plasmodienkultur hervorgeht. Gegenübergestellt wird die IT4 P. falciparum Kontrolle mit der IT4 P. falciparum Anreicherung über CHO-745-EPCR.

Die Kontrolle der IT4 P. falciparum Kultur zeigt eine signifikante var-Genexpressionen bei IT4_var66 (80,22 %).

Die Anreicherung von IT4 P.falciparum über CHO-745-EPCR zeigt dagegen eine alleinige Signifikanz bei der var-Genexpression bei IT4_var27 (90,75 %). In der Kontrolle weist das IT4_var27 einen Anteil von 0,79 % auf. Die signifikante var-Genexpressionen der Kontrolle für IT4_var66 auf 2,15 % gesunken. (Abb. 23) Die signifikante Zunahme des IT4_var27 Anteils in der gesamten var-Genexpression von der Kontrolle zur Anreicherung und die Abnahme der in

der Kontrolle signifikanten var-Gene, weisen zusätzlich zu den dargestellten Ergebnissen in Abb. 12 auf einen Erfolg der Anreicherung eines Rezeptor-spezifisch bindenden P. falciparum infizierten Erythrozyten hin.

Das angereicherte IT4_var27 ($p_{adj} \leq 0,05$) gehört zur Ups-B1 Gruppe und weist in der PfEMP1 Struktur die DC14 auf, welche aus den Domänen DBL α 0,6, CIDR α 3,1 und DBL β 5 besteht. Die vollständige Struktur des IT4_var27 kodierten PfEMP1 ist in der folgenden Tabelle abgebildet. (Rask et al. 2010) (Tabelle 11)

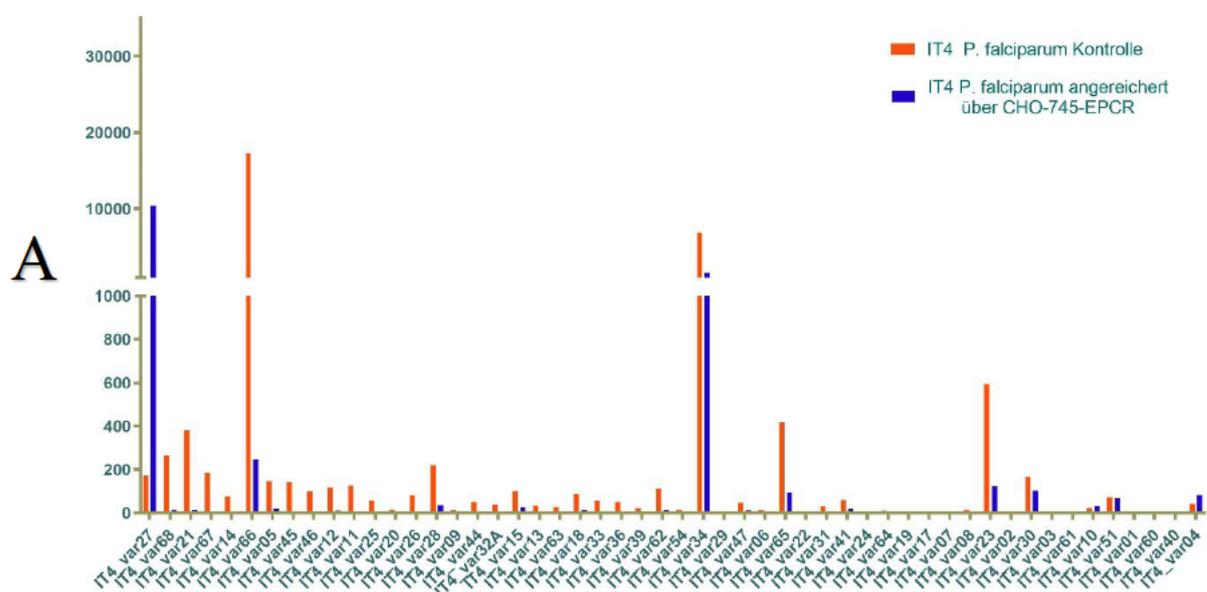
Tabelle 11: Struktureller Aufbau des PfEMP1 Proteins, welcher produziert wurde vom IT4_var27-Gen

Gen	Parasit	Ups	Extrazelluläre Domänenstruktur					
var27	IT4	B1	DBL α 0,6	CIDR α 3,1	DBL β 5	DBL γ 5	DBL δ 1	CIDR β 1

Von den extrazellulären Domänen aus Tabelle 11 ist von einigen Domänen der Bindungspartner auf Seitens des menschlichen Endothel bekannt.

Die CIDR α 3,1 Domäne bindet an den CD36 Rezeptor. (Robinson 2003; Smith et al. 2000; Smith 2014) Von DBL β 5 ist bekannt, dass dieser an den ICAM-1 Rezeptor bindet. (Bengtsson et al. 2013)

Entsprechend ist das durch die Pannings angereicherte IT4_var27 kodierende PfEMP1 auf den CHO-745-EPCR Zellen ein CD36 und ICAM-1 bindendes Protein. Ursprüngliches Ziel der Anreicherung war ein EPCR bindendes PfEMP1 Protein anzureichen, jedoch findet sich in der extrazellulären Domänenstruktur des IT4_var27 keine EPCR bindende Kopfgruppe.



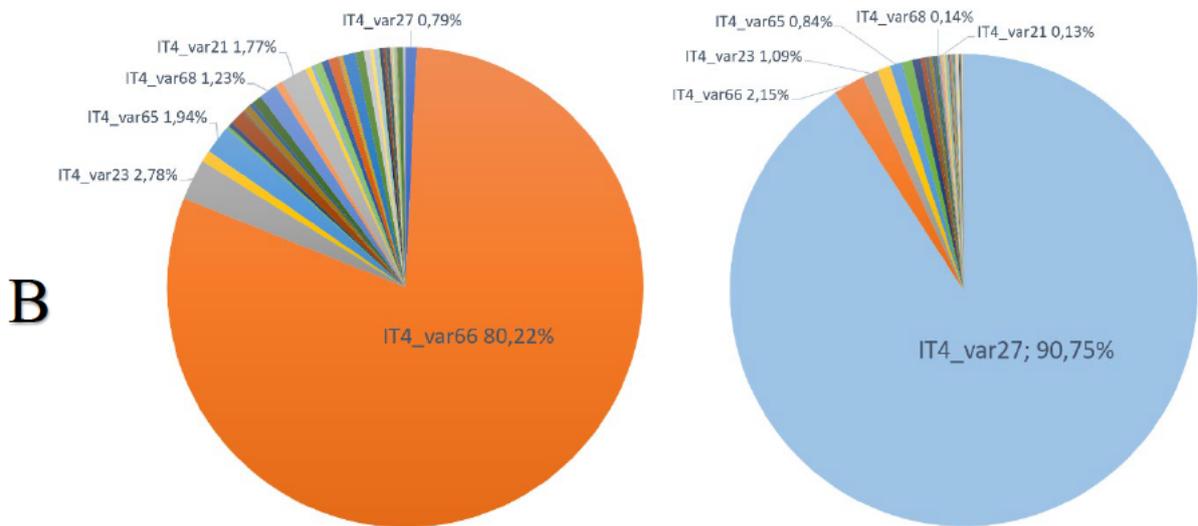
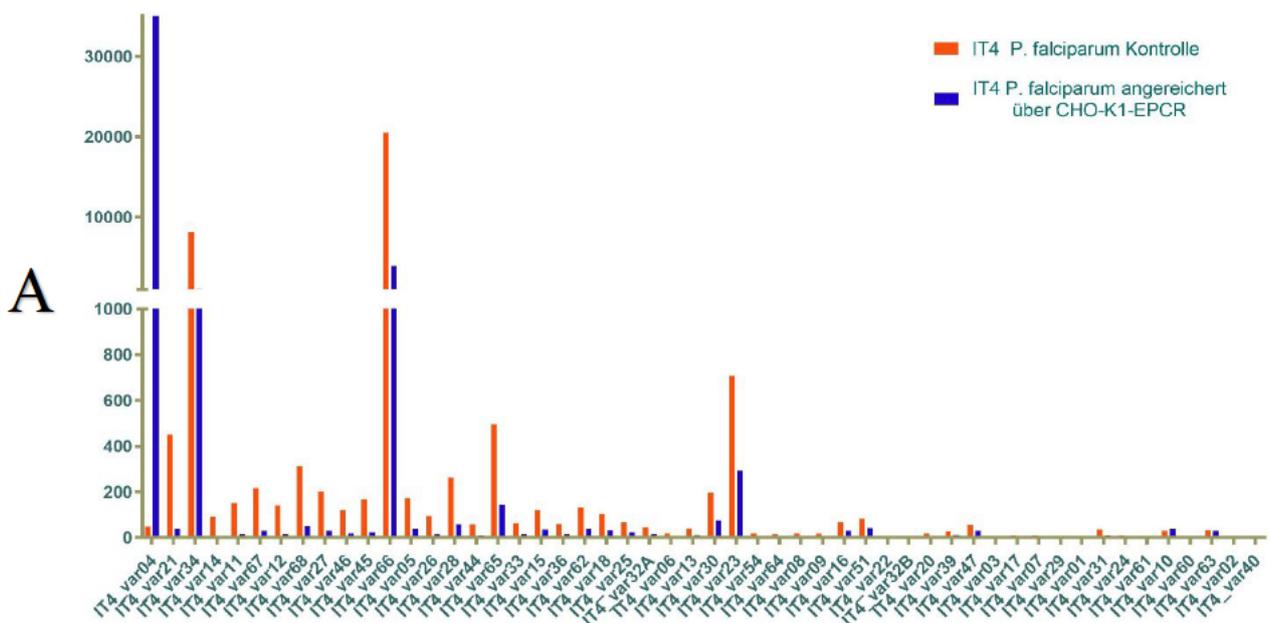


Abb. 23: Ergebnis der Sequenzierung über das NGS für die IT4 *P. falciparum* Kontrolle gegenüber der Anreicherung von IT4 Plasmodien über CHO-745-EPCR Zellen, erstellt aus der Tabelle x im Anhang (A) Graphische Darstellung mit direktem Vergleich der IT4 *P. falciparum* Kontrolle zur IT4 *P. falciparum* Anreicherung über CHO-745-EPCR (B) Darstellung zur Übersicht als Kreisdiagramm links: IT4 *P. falciparum* Kontrolle, rechts: IT4 *P. falciparum* Anreicherung über CHO-745-EPCR

4.5.2 Profil der var-Genexpression von IT4 *P. falciparum* über CHO-K1-EPCR

Dargestellt und verglichen wird die Genexpression der IT4 *P. falciparum* Kontrolle mit der Genexpression des angereicherten IT4 *P. falciparum* über die CHO-K1-EPCR Zellen. (Abb. 24)



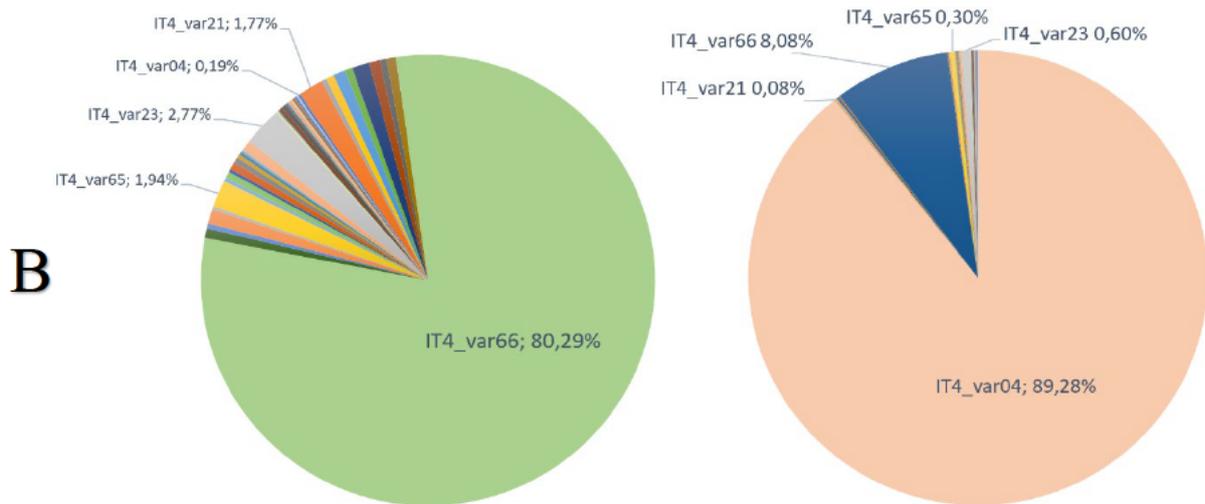


Abb. 24: Ergebnis der Sequenzierung über das NGS für die IT4 *P. falciparum* Kontrolle gegenüber der Anreicherung von IT4 Plasmodien über CHO-K1-EPCR Zellen, erstellt aus der Tabelle x im Anhang (A) Graphische Darstellung mit direktem Vergleich der IT4 *P. falciparum* Kontrolle zur IT4 *P. falciparum* Anreicherung über CHO-K1-EPCR (B) Darstellung zur Übersicht als Kreisdiagramm links: IT4 *P. falciparum* Kontrolle, rechts: IT4 *P. falciparum* Anreicherung über CHO-K1-EPCR

Die IT4 *P. falciparum* Kontrolle aus Abb. 24 ist nahezu identisch mit der Kontrolle aus Abb. 23. Die geringfügigen Unterschiede resultieren aus Messunsicherheiten einer erneuten Messung. Entsprechend ist die signifikante var-Genexpression der Kontrolle ebenfalls das IT4_var66 (80,29 %).

Anders als bei der IT4. *P. falciparum* Anreicherung über CHO-745-EPCR Zellen weist die Anreicherung des Parasiten über die CHO-K1-EPCR eine Signifikanz in der var-Genexpression bei IT4_var04 (89,28 %) auf. Ebenfalls wurde wie bei der ersten Anreicherung in diesem Fall nur ein var-Gen angereichert.

Das IT4_var04 ($p_{adj} \leq 0,05$) gehört zur Gruppe der Ups-E und weist die DC2 PfEMP1 Struktur auf. Die Vollständige PfEMP1 extrazelluläre Domänenstruktur des IT4_var04 entspricht der DC2 und ist in der folgenden Tabelle dargestellt. (Rask et al. 2010) (Tabelle 12)

Tabelle 12: Struktureller Aufbau des PfEMP1 Proteins, welcher produziert wurde vom IT4_var04-Gen

Gen	Parasit	Ups	Extracelluläre Domänenstruktur						
var04	IT4	E	DBLpam1	DBLpam2	CIDRpam	DBLpam3	DBLepam4	DBLepam5	DBLε10

Das angereicherte IT4_var04 besaß in der Kontrolle einen Anteil an der var-Genexpression von 0,19 %. Die signifikante Zunahme von IT4_var04, durch den Anreicherungsprozess auf CHO-K1-EPCR, beweist zusätzlich zu den Ergebnissen aus Abb. 15 den Erfolg der Anreicherung eines Rezeptor-spezifisch bindenden *P. falciparum* infizierten Erythrozyten.

Die in IT4_var04 beinhaltende Domänenstruktur der DC2 ist kodiert vom var2csa-Gen welche an den CSA Rezeptor bindet

Die DC2, die das var2csa-Gen und dessen speziellen PfEMP1-Domänen repräsentiert, bindet an den CSA Rezeptor. Der CSA Rezeptor taucht in hoher Zahl in der Plazenta auf und ist auslösend für die schwangerschaftsassozierte Malaria Erkrankung (engl. PAM – Pregnancy associated malaria). (Metwally 2016; Duffy und Fried 1999)

Durch die Anreicherungsrounden von IT4 *P. falciparum* über CHO-K1-EPCR wurde das CSA Rezeptor bindende PfEMP1 Protein angereichert und durch die Sequenzierung über das NGS ermittelt und nachgewiesen.

Neben dem CSA Rezeptor exprimieren die CHO-K1-EPCR Zellen zusätzlich den EPCR Rezeptor. Jedoch zeigen die Ergebnisse der Transkriptomanalyse keine Anreicherung eines EPCR bindenden PfEMP1 Proteins. Eine mögliche Erklärung dieses Ergebnisses wäre, dass die Affinität der Cytoadhäsion der Parasiten an die Rezeptoren bei der Parasit-CSA Interaktion um ein vielfaches höher ist als bei der Parasit-EPCR Interaktion. Dadurch könnte es zu einer Anreicherung an den CSA Rezeptor kommen, ohne das EPCR bindende PfEMP1 Proteine angereichert werden, obwohl der EPCR Rezeptor vorhanden wäre.

Die Transkriptomanalyse bestätigt durch das Ergebnis, dass nur CD36 und ICAM-1 bindende PfEMP1 Proteine angereichert wurden sowohl die Ergebnisse der Anreicherung von *P. falciparum* über den fragwürdigen CHO-745-EPCR Zellen, welche im Vergleich zur Anreicherung über den CHO-K1-EPCR Zellen sehr schwach ausgefallen ist, als auch die FACS Ergebnisse bei denen das CHO-745-EPCR EPCR negative war.

Gleichzeitig bestätigt die Transkriptomanalyse auch durch das Ergebnis, dass auf den CHO-K1-EPCR der var2csa-Gen angereichert wurde, welcher ein CSA bindendes PfEMP1 Protein kodiert die Ergebnisse der Pannings bei der IT4 *P. falciparum* Erfolgreich auf den CSA Rezeptoren der CHO-K1-EPCR Zellen angereichert wurde, als auch das FACS Ergebnis, welcher bestätigt, dass sich EPCR auf der Oberfläche der CHO-K1-EPCR Zellen befindet.

Durch die Transkriptomanalyse konnte nicht geklärt werden, wieso die FACS Analyse die CHO-K1-EPCR Zellen als CSA negativ detektiert hat. Jedoch ist dieses fragwürdige FACS Ergebnis ein weiterer Indiz für eine schlechte Qualität der Antigene.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei CHO-Zelllinien auf die Fähigkeit der EPCR-Rezeptorexpression untersucht, indem IT4 *P. falciparum* auf diesen angereichert und mittels Transkriptomanalyse sequenziert wurde, um über die spezifische Rezeptorbindung der *var*-Gene eine Aussage über die Rezeptorexpression auf den CHO-Zelllinien treffen zu können. Weiter galt es ein Anreicherungsmodell des Parasiten über CHO-EPCR Zellen aus der Literatur zu überprüfen, bei der CSA-Rezeptor exprimierende CHO-K1-EPCR Zellen verwendet wurden.

Das Ergebnis der Transkriptomanalyse bestätigt das Nichtvorhandensein des EPCR Rezeptors auf der CHO-745-EPCR Zelllinie, sowohl aus den Ergebnissen der Anreicherung von IT4 *P. falciparum* über diese Zelllinie, als auch den FACS Ergebnissen die diese Zelllinie als EPCR negativ identifizieren konnte. Das Ergebnis der Sequenzierung ergab eine Anreicherung des *var-27* Gens mit DC14 Domänenstruktur, die ICAM-1 bindend wirkt. Welche das Ergebnis von Yifan Wu reproduziert, bei dem trotz *var19*-Gen Anreicherung, welcher EPCR bindend ist, ICAM-1 gebunden hat.

Entsprechend ergibt sich, dass kein EPCR auf der Oberfläche CHO-745-EPCR exprimiert wird. Demnach kann man nach dieser Arbeit empfehlen, die CHO-745 Zelllinie neu zu transfizieren bzw. mittels FACS die Zellen neu auszusortieren, um die Zelllinie letztendlich neu herzustellen.

Bei der Analyse der CHO-K1-EPCR Zelllinie konnte durch die FACS Analyse, der EPCR Rezeptor auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Durch die Transkriptomanalyse dagegen erhielten wir das Ergebnis, dass die IT4 *P. falciparum* angereicherten PfEMP1 Proteine von *var2csa* kodiert sind, welches ein CSA-Rezeptor bindendes PfEMP1 Protein darstellt. Die Ergebnisse der FACS Analyse und der Sequenzierung belegen, dass die CHO-K1-EPCR Zelllinie sowohl den EPCR- als auch den CSA Rezeptor an die Oberfläche exprimiert. Da beide Rezeptoren exprimiert werden, jedoch durch das Panning kein EPCR bindendes PfEMP1 Protein angereichert werden konnte, kann man davon ausgehen, dass die Affinität des Parasiten zum CSA Rezeptor um ein vielfaches höher ist, als zum EPCR Rezeptor, wodurch dieser nicht angereichert wurde.

Entsprechend ist das Modell aus der Literatur (Avril et al. 2016) kein korrektes Modell zur Anreicherung von EPCR bindenden PfEMP1 Proteinen mittels CHO-K1-EPCR Zellen, da die Bindung an den CSA Rezeptor signifikanter scheint als die Bindung an den EPCR Rezeptor.

Insgesamt sind die Ergebnisse aus der FACS Analyse sekundär zu betrachten, da diese in einigen Fällen widersprüchlich scheinen. Das Ergebnis der FACS Analyse, dass die CHO-K1-EPCR Zellen CSA negativ sind, ist divergent zu den Ergebnissen der Transkriptomanalyse. Auch die Ursache einer erhöhten CSA Expression der CHO-745-EPCR Kontrolle der FACS Analyse gegenüber den CHO-wt Zellen konnte nicht geklärt werden. Die naheliegendste Annahme ist, dass die fluoreszierenden Antikörper einen Defekt aufweisen. Für die weitere Arbeit mit den Antigenen müssen diese geprüft, oder ausgewechselt werden.

5 Literaturverzeichnis

- Aftab, Tariq; Jorge F.S. Ferreira; M. Masroor A. Khan; M. Naeem Elisabeth Hsu (2014): *Artemisia annua* - Pharmacology and Biotechnology. In: *Springer Heidelberg New York Dordrecht London*. DOI: 10.1007/978-3-642-41027-7.
- Andrews, K. T.; Adams, Y.; Viebig, N. K.; Lanzer, M.; Schwartz-Albiez, R. (2005): Adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CHO-745 cells and inhibition of binding by protein A in the presence of human serum. *Int J Parasitol*. DOI: 10.1016/j.ijpara.2005.05.007.
- Avril, Marion; Bernabeu, Maria; Benjamin, Maxwell; Brazier, Andrew Jay; Smith, Joseph D. (2016): Interaction between Endothelial Protein C Receptor and Intercellular Adhesion Molecule 1 to Mediate Binding of *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes to Endothelial Cells. In: *mBio* 7 (4). DOI: 10.1128/mBio.00615-16.
- Beeson, J. G.; Brown, G. V. (2002): Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59 (2), S. 258–271. DOI: 10.1007/s00018-002-8421-y.
- Bengtsson, Anja; Joergensen, Louise; Rask, Thomas S.; Olsen, Rebecca W.; Andersen, Marianne A.; Turner, Louise et al. (2013): A novel domain cassette identifies *Plasmodium falciparum* PfEMP1 proteins binding ICAM-1 and is a target of cross-reactive, adhesion-inhibitory antibodies. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (1), S. 240–249. DOI: 10.4049/jimmunol.1202578.
- Bernabeu, Maria; Smith, Joseph D. (2017): EPCR and malaria severity: the center of a perfect storm. DOI: 10.1016/j.pt.2016.11.004.
- Crabb, Brendan S.; Cooke, Brian M.; Reeder, John C.; Waller, Ross F.; Caruana, Sonia R.; Davern, Kathleen M. et al. (1997): Targeted Gene Disruption Shows That Knobs Enable Malaria-Infected Red Cells to Cytoadhere under Physiological Shear Stress. In: *Cell* 89 (2), S. 287–296. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80207-X.
- Crutcher, J. M.; Hoffman, S. L. (1996): Malaria. Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Online verfügbar unter Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Duffy, P. E.; Fried, M. (1999): Malaria during pregnancy: parasites, antibodies and chondroitin sulphate A. In: *Biochem Soc Trans*. DOI: 10.1042/bst0270478.
- Florentin, Anat; Cobb, David W.; Kudyba, Heather M.; Muralidharan, Vasant (2020): Directing traffic: Chaperone-mediated protein transport in malaria parasites. In: *Cellular microbiology* 22 (7), e13215. DOI: 10.1111/cmi.13215.
- Gangnard, Stéphane; Lewit-Bentley, Anita; Dechavanne, Sébastien; Srivastava, Anand; Amirat, Faroudja; Bentley, Graham A.; Gamain, Benoît (2015): Structure of the DBL3X-DBL4ε region of the VAR2CSA placental malaria vaccine candidate: insight into DBL domain interactions. In: *Scientific reports* 5, S. 14868. DOI: 10.1038/srep14868.
- Gantt, S. M.; Clavijo, P.; Bai, X.; Esko, J. D.; Sinnis, P. (1997): Cell adhesion to a motif shared by the malaria circumsporozoite protein and thrombospondin is mediated by its glycosaminoglycan-binding region and not by CSVTCG. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (31), S. 19205–19213. DOI: 10.1074/jbc.272.31.19205.

- Guizetti, Julien; Scherf, Artur (2013): Silence, activate, poise and switch! Mechanisms of antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. DOI: 10.1111/cmi.12115.
- Hviid, L.; Jensen, A. T. (2015): PfEMP1 - A Parasite Protein Family of Key Importance in *Plasmodium falciparum* Malaria Immunity and Pathogenesis. *Adv Parasitol*. DOI: 10.1016/bs.apar.2015.02.004.
- Jensen, Anja Ramstedt; Adams, Yvonne; Hviid, Lars (2020): Cerebral *Plasmodium falciparum* malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it. In: *Immunological reviews* 293 (1), S. 230–252. DOI: 10.1111/imr.12807.
- Jensen, J. B.; Trager, W. (1978): *Plasmodium falciparum* in culture: establishment of additional strains. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 27 (4), S. 743–746. DOI: 10.4269/ajtmh.1978.27.743.
- Kraemer, Susan M.; Smith, Joseph D. (2006): A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. DOI: 10.1016/j.mib.2006.06.006.
- Kyes, Sue A.; Kraemer, Susan M.; Smith, Joseph D. (2007): Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: gene organization and regulation of the var multigene family. In: *Eukaryotic cell* 6 (9), S. 1511–1520. DOI: 10.1128/EC.00173-07.
- Lambros, C.; Vanderberg, J. P. (1979): Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*.
- Lowe, Donna; Raj, Kenneth (2014): Premature aging induced by radiation exhibits pro-atherosclerotic effects mediated by epigenetic activation of CD44 expression. In: *Aging cell* 13 (5), S. 900–910. DOI: 10.1111/accel.12253.
- Metwally, Nahla Galal (2016): Analyses of the transcriptome profiles of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes selected for binding to the human endothelial receptors (ICAM-1, P-selectin, E-selectin, CD9 and CD151). Dissertation.
- Metwally, Nahla Galal; Ann-Kathrin Tilly; Pedro Lubiana; Lisa K. Roth; Michael Damp#x000F6; rpinghaus et al. (2017): Characterisation of *Plasmodium falciparum* populations selected on the human endothelial receptors P-selectin, E-selectin, CD9 and CD151. DOI: 10.1038/s41598-017-04241-3.
- Milner, Danny A. (2018): Malaria Pathogenesis. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 8 (1). DOI: 10.1101/cshperspect.a025569.
- Mosnier, Laurent O.; Lavstsen, Thomas (2016): The role of EPCR in the pathogenesis of severe malaria. In: *Thrombosis Research* 141, S46-S49. DOI: 10.1016/S0049-3848(16)30364-4.
- Obiakor, Harold; Avril, Marion; Macdonald, Nicholas J.; Srinivasan, Prakash; Reiter, Karine; Anderson, Charles et al. (2013): Identification of VAR2CSA domain-specific inhibitory antibodies of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 using a novel flow cytometry assay. In: *Clinical and vaccine immunology : CVI* 20 (3), S. 433–442. DOI: 10.1128/CVI.00638-12.
- Pasternak, Noa D.; Dzikowski, Ron (2009): PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.12.012.
- Ralph, S. A.; Scheidig-Benatar, C.; Scherf, A. (2005): Antigenic variation in *Plasmodium falciparum* is associated with movement of var loci between subnuclear locations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:5414–5419.

Rask, Thomas S.; Hansen, Daniel A.; Theander, Thor G.; Gorm Pedersen, Anders; Lavstsen, Thomas (2010): Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 diversity in seven genomes--divide and conquer. In: *PLoS computational biology* 6 (9). DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000933.

Robinson, Tylor A. W. (2003): Immunity to liver stage malaria: considerations for vaccine design. *Immunol Res.* DOI: 10.1385/IR:27:1:53.

Scherf, Artur; Jose Juan Lopez-Rubio; Loïc Riviere (2008): Antigenic variation in Plasmodium falciparum. In: *Annu Rev Microbiol.* DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093134.

Shabani, Estela; Benjamin Hanisch; Robert O. Opoka; Thomas Lavstsen; Chandy C. John (2016): Plasmodium falciparum EPCR-binding PfEMP1 expression increases with malaria disease severity and is elevated in retinopathy negative cerebral malaria.

Smith, J. D. (2014): The role of PfEMP1 adhesion domain classification in Plasmodium falciparum pathogenesis research. *Mol Biochem Parasitol.* DOI: 10.1016/j.molbiopara.2014.07.006.

Smith, J. D.; Subramanian, G.; Gamain, B.; Di Baruch; Miller, L. H. (2000): Classification of adhesive domains in the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family. *Mol Biochem Parasitol.* DOI: 10.1016/s0166-6851(00)00279-6.

Talapko, Jasminka; Ivana Škrlec; Tamara Alebić; Melita Jukić; Aleksandar Včev (2019): Malaria: The Past and the Present. DOI: 10.3390/microorganisms7060179.

Tanner, Marcel; Savigny, Don de (2008): Malaria eradication back on the table. In: *Bulletin of the World Health Organization* 86 (2), S. 82. DOI: 10.2471/blt.07.050633.

Taylor, D. W.; Parra, M.; Chapman, G. B.; Stearns, M. E.; Rener, J.; Aikawa, M. et al. (1987): Localization of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 1 in the erythrocyte skeleton under knobs. *Mol Biochem Parasitol.* DOI: 10.1016/0166-6851(87)90005-3.

Tjio, J. H.; Puck, Theodore T. (1958): GENETICS OF SOMATIC MAMMALIAN CELLS. II. CHROMOSOMAL CONSTITUTION OF CELLS IN TISSUE CULTURE. DOI: 10.1084/jem.108.2.259.

Turner, L.; Lavstsen, T.; Berger, S. S.; Wang, C. W.; Petersen, J. E.; Avril, M. et al. (2013): Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. DOI: 10.1038/nature12216.

Zekar, Lara; Sharman, Tariq (2022): Plasmodium Falciparum Malaria. In: *reasure Island (FL): StatPearls Publishing.* Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555962/?report=classic>.

6 Danksagung

Die erste Erwähnung und der erste Dank gebühren **Allah**, dem Herren der Welten, der die Erde und die Himmel erschuf, der mir Leben gab und meinen Glauben ins Herz legte.

Weiter gilt mein Dank an **Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus** die mir überhaupt die Möglichkeit gab in ihrer Forschungsgruppe teilzunehmen und mir dadurch einen tiefen Einblick in die Forschung im allgemeinen erlaubte. Vielen Dank.

Einen großen Dank muss ich **Frau Dr. Nahla Galal Metwally** widmen, dafür, dass sie sich um mich und unsere gesamte Plasmodiengruppe wie eine Mutter gekümmert hat. Ich hätte mir keine besser Betreuung vorstellen können. Danke für deine Mühen, deine Geduld und dein offene Ohr. Zu jeder Zeit konnte ich deine Hilfe in Anspruch nehmen.

Auch gilt mein Dank **Herrn Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker** für die angenehme Betreuung dieser Thesis, für die Begutachtung meiner Arbeit, Ihrer Zeit und den anregungsvollen und sympatischen Vorlesungen an der HAW.

Auch muss ich einen großen Dank an **Yifan Wu** aussprechen, der mir während der gesamten Zeit des Praxissemesters und der Thesis beiseite stand, meine unzähligen Fragen beantwortete, mich bei all meinen Experimenten auf Schritt und Tritt begleitete und alles mit einem lächeln hinnahm, auch wenn er mal länger im Labor sein musste wegen mir.

Auch möchte ich mich bedanken bei der **gesamten Arbeitsgruppe**, für die angenehme Atmosphäre, für die Korrekturen, wenn ich mal die Laborregeln nicht eingehalten habe und für die Hilfen immer wieder zwischendurch. Der Dank geht sowohl **an die Plasmodien-, als auch an die Amöbengruppe**.

Auch möchte **Herrn Dr. Dániel Cadar** und **Frau Heike Baum** aus der NGS Facility Abteilung des BNIs für die kurzfristige Sequenzierung danken.

Abschließend möchte ich noch **meinen Eltern, meinen Geschwistern, meiner Ehefrau und meinen Freunden** danken, für alles.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Hamburg, 31.08.2022

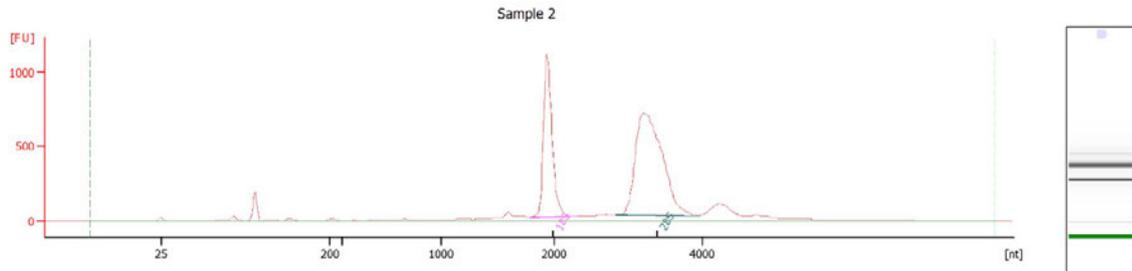
A solid black rectangular box used to redact the signature of the author.

Name (Unterschrift)

7 Anhang

Evaluierung der RNA Qualität mittels Bioanalyser (alle Proben)

Panning 4 IT4 *P. falciparum* über CHO-745-EPCR:



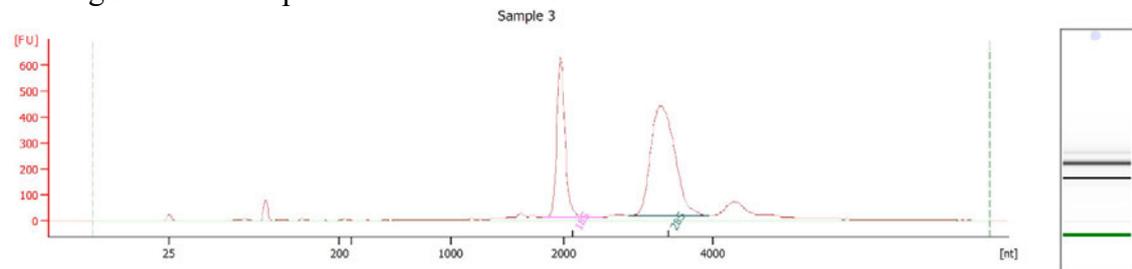
Overall Results for sample 2 : Sample 2

RNA Area: 5.573,9 RNA Integrity Number (RIN): 9.7 (B.02.08)
 RNA Concentration: 12.647 pg/ul Result Flagging Color:
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7 Result Flagging Label: RIN: 9.70

Fragment table for sample 2 : Sample 2

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1.790	2.311	1.343,0	24,1
28S	2.839	3.956	2.331,7	41,8

Panning 5 IT4 *P. falciparum* über CHO-745-EPCR:



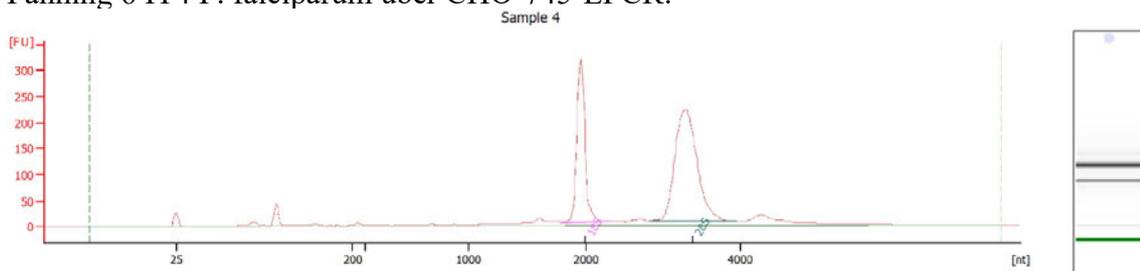
Overall Results for sample 3 : Sample 3

RNA Area: 2.975,6 RNA Integrity Number (RIN): 9.8 (B.02.08)
 RNA Concentration: 6.752 pg/ul Result Flagging Color:
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1,8 Result Flagging Label: RIN: 9.80

Fragment table for sample 3 : Sample 3

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1.821	2.519	728,2	24,5
28S	2.871	3.950	1.295,8	43,5

Panning 6 IT4 *P. falciparum* über CHO-745-EPCR:



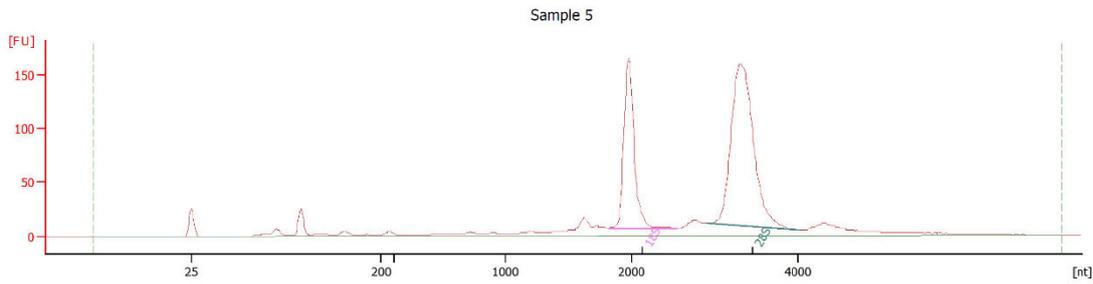
Overall Results for sample 4 : Sample 4

RNA Area: 1.406,2 RNA Integrity Number (RIN): 9.7 (B.02.08)
 RNA Concentration: 3.191 pg/ul Result Flagging Color:
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1,7 Result Flagging Label: RIN: 9.70

Fragment table for sample 4 : Sample 4

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1.792	2.317	343,8	24,5
28S	2.827	3.943	584,4	41,6

Panning 3 IT4 *P. falciparum* über CHO-K1-EPCR:



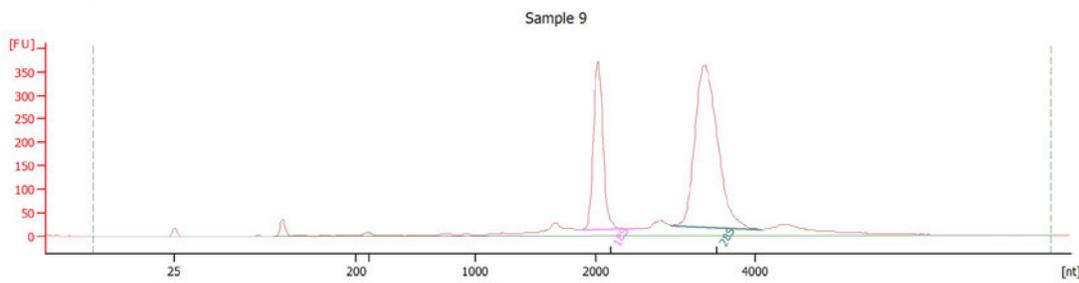
Overall Results for sample 5 : Sample 5

RNA Area: 950,9 RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (B.02.08)
 RNA Concentration: 2.158 pg/μl Result Flagging Color:
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1,9 Result Flagging Label: RIN: 9.40

Fragment table for sample 5 : Sample 5

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1.814	2.541	203,6	21,4
28S	2.905	4.019	379,2	39,9

Panning 4 IT4 *P. falciparum* über CHO-K1-EPCR:



Overall Results for sample 9 : Sample 9

RNA Area: 2.073,7 RNA Integrity Number (RIN): 9.6 (B.02.08)
 RNA Concentration: 4.705 pg/μl Result Flagging Color:
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2,0 Result Flagging Label: RIN: 9.60

Fragment table for sample 9 : Sample 9

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1.878	2.568	462,9	22,3
28S	2.956	4.083	912,8	44,0

Anhang Tabelle 1: Transkriptomanalyse: Vergleich zwischen IT4_Ctrl und dem angereicherten IT4 P. falciptarum über CHO-745-EPCR

	X32000043	X32000044	X32000045	X34011001	X34011002	X34011003	baseMean	baseMeanA	baseMeanB	foldChange	log2FoldChange	pvalue	padj	
PfIT_070016700	IT4_var27	171,914138	123,663849	216,0424317	9499,070729	6797,14528	14966,54009	5295,72972	170,5407396	104,20,9187	61,15315262	8,15481E-33	4,48514E-31	
PfIT_040025300	IT4_var68	203,1588488	265,7930619	322,6074916	18,91585842	14,4919853	14,82180913	139,9648425	263,8531341	10,67655095	0,0060636918	2,12523E-15	1,14763E-13	
PfIT_040017400	IT4_var1	425,71157544	298,9605505	417,9885316	31,45594781	10,32534167	3,285424007	97,9385917	180,8536122	15,02375116	0,039185144	3,84571E-11	2,03823E-09	
PfIT_120045700	IT4_var67	97,14450515	207,0289451	244,9850531	12,58044504	7,225315119	1,642160137	95,10116166	383,0530165	7,149306764	0,039243538	4,671440192	7,63607E-09	
PfIT_130005200	IT4_var14	21,7132658	72,82270092	136,7800168	0	0	0	0	38,55626392	77,10532784	0	0,0003030304	-8,2418746	1,22389E-07
PfIT_040025500	IT4_var66	31971,113891	7662,94671	12051,82545	693,7284187	33,04317365	14,78534046	8737,371333	17228,63702	247,1856443	-6,123870389	9,63672E-08	4,81836E-06	
PfIT_120045600	IT4_var05	52,75686626	147,0565695	199,6239646	23,5977827	16,52291025	18,07242166	82,93341993	146,47791335	19,39770639	0,131676423	2,924931045	1,21372E-07	
PfIT_120005500	IT4_var05	95,48242894	137,9687378	234,3816872	9,43897017	13,42451175	3,285808341	75,66368081	142,6109513	87,16409095	0,062687201	-3,9956685264	1,87166E-07	
PfIT_030029800	IT4_var46	52,97208759	96,37244365	153,7582404	9,427244819	11,34244566	6,561906154	55,07239471	91,10532213	9,110532213	0,091447996	2,64356E-07	1,24247E-05	
PfIT_130007780	IT4_var12	59,00479972	107,0220293	189,2541076	14,14885495	8,25461479	13,13267834	56,13618078	118,42659789	1,108538269	0,095664298	-3,34132805	5,20925E-07	
PfIT_070016600	IT4_var11	60,72784958	142,8540091	177,9038631	11,00628955	10,32008738	0	67,13534977	127,1619072	7,1845792309	0,057284614	4,125708484	5,42392E-07	
PfIT_050038500	IT4_var25	52,87556737	46,5205658	71,1165906	11,01298149	5,163790695	6,572275745	32,21028206	56,83754815	7,583015976	0,130833396	-2,934197251	5,11249E-06	
PfIT_070017000	IT4_var20	15,62747786	11,7769397	20,22780712	0	0	0	7,938704113	15,87740823	0,071690714	-0,010769714	-0,957051802	0,0001458328	
PfIT_120006400	IT4_var26	39,01597792	74,87333772	125,2848236	14,15707484	3,097628194	0	42,73814038	79,72471309	5,751567678	3,875251113	3,87546E-05	0,001588939	
PfIT_070017200	IT4_var28	80,62512704	240,6477946	343,4975438	28,31615652	37,17468496	44,35735358	129,1031101	221,5901551	36,61606502	0,165160589	-2,598058622	5,18044E-05	
PfIT_070005800	IT4_var44	18,222315644	63,68076441	67,94042359	7,860135909	5,158868526	0	7,244003324	14,48800665	0	0,017629493	5,61827E-05	0,002191125	
PfIT_060036800	IT4_var32A	19,95845982	43,88050662	50,95486485	0	5,158921098	6,666067428	21,08646897	49,94811481	4,399668145	0,088218453	-3,50277531	0,000126135	
PfIT_070016900	IT4_var15	69,41978898	106,4894727	129,4078586	22,00878429	24,76311133	34,47225847	64,42687907	101,7723735	27,0813847	0,264971214	-1,916092457	0,000270125	
PfIT_120045700	IT4_var13	6,081144152	47,66387382	45,33158545	3,141524745	2,061565509	0	17,37994895	33,02553447	1,734363418	0,053593542	-4,2211797034	0,000272147	
PfIT_120024600	IT4_var63	27,74416011	20,32248843	29,90626475	7,179090857	0	3,285506203	14,21858056	25,9909711	1,66819902	0,093634435	-0,316818311	0,000321298	
PfIT_030029700	IT4_var18	26,92519743	128,5131465	107,6456977	17,2809747	15,46451148	11,48150636	54,3295846	87,69468055	14,74232440	0,168163899	-2,577600017	0,011493758	
PfIT_040005400	IT4_var33	24,2694641	56,14342538	85,65963912	4,7203030563	12,39366643	1,640789427	35,99645166	64,32516785	7,629271996	0,102332257	-3,052508803	0,000997302	
PfIT_000095000	IT4_var36	14,73415392	72,71606794	63,8378061	9,40468292	7,230011206	0	27,99308458	50,42934265	5,56826499	0,111960329	-3,06795567	0,000932494	
PfIT_100044500	IT4_var39	13,89125689	70,66227731	108,4220193	14,14312265	7,219294326	1,640789427	35,99645166	64,32516785	7,629271996	0,102332257	-3,052508803	0,000997302	
PfIT_040025100	IT4_var62	180,2960679	58,81889214	94,55225618	36,18564844	3,098288513	6,572305698	63,25390982	111,2224054	15,28541422	0,135543494	2,8883172225	0,001125059	
PfIT_110005600	IT4_var54	8,669562219	10,69562496	29,0967528	1,571253382	5,155836965	1,642833154	9,231384707	16,15397999	2,448789422	0,102587744	-2,641525017	0,009817911	
PfIT_080014100	IT4_var29	7524,479786	5062,317876	8014,67283	3666,82413	856,017445	310,4895074	4309,133596	6867,156831	1611,110361	0,234593742	-2,091763566	0,010232528	
PfIT_120046200	IT4_var47	20,80756325	67,91862229	50,11218917	20,44978988	14,45617385	6,571164701	30,05258386	46,27945823	13,82570948	0,298729336	-1,743089174	0,015002013	
PfIT_020027600	IT4_var06	4,3421799106	16,06162013	26,70456626	1,571253382	5,155836965	0	8,97251264	15,70261683	2,242363449	0,155454084	-2,685439577	0,020345706	
PfIT_080013800	IT4_var65	572,0870322	269,0265565	408,2143772	251,6645559	23,74659246	13,14075737	256,3466465	416,509322	96,18396858	0,230548848	-2,11685564	0,027979601	
PfIT_100044000	IT4_var22	6,947888302	4,81897617	9,71181483	0	0,103103791	1,640327512	4,025007454	7,1595959767	0,890455141	0,12616651	-2,986599092	0,033079093	
PfIT_140006200	IT4_var31	17,33523852	21,92258848	49,29449858	0	14,45934456	0	17,16861169	29,51744186	4,819781321	0,174329113	-2,520114573	0,034497829	
PfIT_120024500	IT4_var41	20,83502939	62,62852385	89,80624143	22,0018315	30,9422144	6,563663759	38,79625072	57,75659822	18,83590322	0,347508124	-1,524881388	0,049251902	
PfIT_040030600	IT4_var24	7,801999271	5,882273274	10,50654463	1,573182918	2,065359235	1,6429438	4,912050521	8,063605724	1,760495318	0,223082892	-2,164348216	0,051512077	
PfIT_070017100	IT4_var64	10,41422491	6,422018261	15,36858088	0	5,1584843539	3,282729291	6,774332814	10,73494135	2,813724277	0,2776881	-1,84846274	0,078651736	
PfIT_000010500	IT4_var19	4,342847067	6,961210971	11,33127015	3,14195789	1,03099524	3,280382481	5,014770159	7,545109394	2,484430924	0,314100919	-1,670699929	0,125699082	
PfIT_020005200	IT4_var17	11,28604237	9,100097567	4,045434631	0	6,188252659	0	5,103304539	8,143858191	2,062750886	0,282492274	-1,823716683	0,16672199	
PfIT_060036700	IT4_var07	4,343229181	13,92327911	7,284870815	3,141757817	2,061748075	4,920199077	5,948547346	8,51712637	3,374568323	0,379748304	-1,396884572	0,16818902	
PfIT_070005900	IT4_var08	13,89597603	13,38617935	21,04249299	12,56857426	5,15512563	6,561228553	12,10159614	16,10821612	8,094976147	0,494825323	-1,015008761	0,171379126	
PfIT_040017000	IT4_var23	693,6844663	422,5281703	671,7372929	360,1936871	15,48684607	1,64017047	3,6606050771	595,9833098	125,2268844	0,210044108	-2,251233781	0,250654043	
PfIT_090005100	IT4_var02	7,817239108	2,141933	0	1,5709662307	10,03939367	0	2,366874042	3,319724036	1,414024048	0,423584701	-1,239297761	0,453917165	
PfIT_040025800	IT4_var30	198,5525228	134,7740412	167,3185784	292,574985	12,39028206	6,570780049	135,3634866	166,8816241	103,845349	0,621439611	-0,686313892	0,536784489	
PfIT_140006400	IT4_var03	6,909475384	0,533365056	1,611879981	3,154813827	0	1,648252721	2,309626661	3,01824014	1,601013183	0,512079012	-0,965561666	0,561025324	
PfIT_080037400	IT4_var61	6,934225273	2,67352148	5,656825634	6,293313195	3,098380802	11,50187815	6,026357422	5,088190795	9,64542049	1,356318928	0,439096457	0,644533635	
PfIT_040017300	IT4_var10	13,871844426	28,87898178	27,48108023	90,2255178	7,228025913	6,561109142	17,37609552	23,41063542	31,34155561	1,328777168	-0,101865974	0,916387505	
PfIT_120045800	IT4_var51	99,72865428	43,86090084	68,71557154	166,7132762	24,77648083	6,569695499	68,39409654	70,76837555	66,01981752	0,931826992	-0,101865974	0,916387505	
PfIT_060021400	IT4_var01	5,20730338	4,2814455409	7,280055279	12,575016	2,063312032	3,8262625094	5,781627866	5,589604689	5,973651042	1,04802415	0,067671961	0,946610994	
PfIT_120060300	IT4_var60	0	0,535155438	0,808851931	1,571957441	0	0	0	4,485994135	0,448002456	0,523985814	0,129548574	0,965228455	
PfIT_080005200	IT4_var05	4,145929094	2,072539932	1,562533199	0	5,367674606	1,078059058	0,476126448	2,593667408	2,358577888	0,974584941	-0,037140165	0,9752917133	
PfIT_110005800	IT4_var04	4,145929094	2,072539932	1,562533199	6,499005326	0	0	0	1,078059058	2,664677768	2,593667408	0,025846757	0,985820847	
PfIT_000010800	IT4_var40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#NV	#NV	
PfIT_030005100	IT4_var40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#NV	#NV	
PfIT_120006100	IT4_var04	18,23343426	49,78696724	57,45024105	223,1367743	10,312711085	13,12559286	62,00762009	41,82354751	82,19169267	1,959555397	0,970524886	#NV	

Anhang Tabelle 1: Transkriptomanalyse: Vergleich zwischen IT4_Ctrl und dem angereicherten IT4 P. falciparum über CHO-K1-EPCR

	X32000043	X32000044	X32000045	X340111004	X340111005	X340111006	baseMeanB	baseMeanB	log2FoldChange	pvalue	padj				
PfIT_120006100	IT4_var04	21,76907647	58,57300356	67,84465604	186,4353345	441,911,28617	67,491,02277	217,45,67151	49,39557869	43,441,94744	877,5682472	1,92066E-48	1,09478E-46		
PfIT_040017400	IT4_var21	508,2687414	351,7239464	493,5037676	53,49280354	23,14936018	34,85891205	244,1662552	451,1654851	37,16702525	0,083127395	-3,588532195	1,37597E-09	7,70541E-08	
PfIT_080014100	IT4_var34	8983,685029	5955,767596	9464,901441	1298,214081	819,2700553	979,4170849	4583,542548	8134,784868	1032,300407	0,126933023	-2,977860649	2,85031E-08	1,56767E-06	
PfIT_130005200	IT4_var14	25,92359951	85,67364221	161,52697791	52,6588713624	1,657773313	47,102766471	91,04140054	31,64128285	0,037200269	-4,748543124	1,78596E-07	9,64416E-06	0,000127884	
PfIT_050005500	IT4_var11	168,0652374	210,0935918	18,077277781	18,077277781	4,977580612	82,16594627	150,2210044	14,1108861	0,095906725	-3,382224213	2,4129E-06	0,000170792	3,28446E-06	
PfIT_120004500	IT4_var16	115,9836398	243,5664202	289,3129671	33,99866552	26,99420618	23,23231174	122,4155812	216,2948862	0,132922627	-2,911341389	2,8446E-06	0,000170792	3,28446E-06	
PfIT_130077800	IT4_var12	70,44685518	125,9092812	223,4970754	12,799232364	19,27930902	14,93039041	77,81035581	139,9510706	15,66964102	0,111387756	-3,16633744	3,36802E-06	0,000171769	
PfIT_040025300	IT4_var18	242,5640228	312,7120213	380,9933119	59,67286147	56,71513233	39,92859946	182,0976582	201,9566836	29,41089687	0,167669327	-2,576310075	5,09884E-06	0,000254942	
PfIT_070016700	IT4_var27	205,2499933	145,4871413	255,1329162	173,0107993	235,7455077	47,40673229	17,52084445	104,723036	173,1671388	0,085946712	-3,523724726	5,01108E-05	0,002367287	
PfIT_030029800	IT4_var46	63,24379605	113,3793611	181,5772781	18,0571219	23,12121707	11,60553245	68,49738445	119,4001451	17,59462381	0,148342797	-2,752993222	4,93185E-05	0,002367287	
PfIT_100044100		16,58491889	83,13222886	128,0387899	10,53538386	5,138923752	3,316430581	41,12444172	75,91864588	6,330237563	0,085946712	-3,523724726	5,01108E-05	0,002367287	
PfIT_070016500		76,72911002	335,1206923	496,0272734	59,43313081	47,25349734	18,23594386	172,1782746	302,6256919	41,73085734	0,139004837	-2,846793012	0,000138247	0,006359367	
PfIT_120005500	IT4_var45	66,24205857	162,3189928	276,7924828	31,6473841	30,86930849	4,98036038	95,47505348	168,4511781	22,4989289	0,135713052	-2,881386622	0,000179472	0,008076222	
PfIT_040025500	IT4_var16	38171,23293	9015,382946	14232,56492	3489,310094	3736,259968	4565,114278	12201,64419	20473,06027	3930,228114	0,191967285	-2,381067628	0,000200945	0,008841562	
PfIT_120004500	IT4_var26	46,58223249	88,0870367	147,9546191	23,35620961	15,43302132	4,979881478	54,3989446	94,20818507	14,58970413	0,15928318	-2,650334166	0,000387999	0,01668395	
PfIT_070017200	IT4_var28	96,26061793	283,1199105	405,6524745	73,08861755	45,01638789	54,78283864	159,6534745	261,6776676	57,62928136	0,220801993	-2,179174902	0,000987739	0,040497284	
PfIT_070005800	IT4_var44	21,75692984	74,91910299	80,23327474	17,31569074	12,85228033	1,658855928	34,78935576	58,96976919	10,60894233	0,186005955	-2,426579284	0,003721854	0,148874165	
PfIT_080013800	IT4_var16	683,2683458	316,5066522	482,0787108	228,2696547	96,44951396	106,2299171	318,8004658	493,9512363	143,6496953	0,291938936	-1,776261459	0,003788264	0,148874165	
PfIT_040005400	IT4_var33	28,97605669	66,05235375	101,1597156	17,33328092	19,25966937	3,320675806	39,35629206	65,39604208	13,31654204	0,20793896	-2,265768002	0,00400395	0,152150098	
PfIT_020025100	IT4_var18	82,88146296	69,1999884	111,6613939	60,28714991	15,43596457	31,54359657	31,54359657	31,54359657	83,89843981	132,0407594	35,75612021	-1,868006307	0,0088592	0,310071991
PfIT_030029700	IT4_var12	32,14614721	151,1916765	127,1214887	30,84255995	33,39255995	37,84864375	67,42217146	103,50464375	31,35790546	0,302494542	-1,725018981	0,013826329	0,470095184	
PfIT_050038500	IT4_var25	63,12972618	54,73109876	83,9849689	18,08603869	30,87180348	23,24377775	45,67457196	67,28193061	24,06721331	0,356029115	-1,489993277	0,019488528	0,643121438	
PfIT_060036800	IT4_var32	23,82874028	5,16245081	60,17442847	21,08018954	12,85239753	4,976613095	29,0894795	45,20922562	12,96973339	0,295155923	-1,760450803	0,022467911	0,71897314	
PfIT_020027600	IT4_var06	5,183710549	18,8963074	31,53615976	6,771660642	3,853656477	0	11,04020357	18,53863477	3,541772373	0,205591367	-2,82148411	0,033798934	1	
PfIT_000010500		0	136,9338784	156,0382202	6,954070665	2,629786126	0	50,42259954	97,65736021	31,94618597	0,035334368	-4,898215758	0,036332795	1	
PfIT_140085700	IT4_var13	7,260297569	56,07493152	53,53308745	14,29031156	12,84123326	6,629728887	25,10493171	38,95610552	11,2537579	0,292150392	-1,775216872	0,038667339	1	
PfIT_040025800	IT4_var30	237,0568591	158,5602241	197,5941731	151,435785	38,58191053	41,49832202	137,4545456	197,7370854	77,17200584	0,393847813	-1,344289829	0,047931016	1	
PfIT_040017000	IT4_var23	828,2078552	497,0995134	793,2847324	325,4524404	102,8791127	453,1353682	500,098371	706,197367	293,8223071	0,14591078	-1,265654017	0,050130931	1	
PfIT_110005600	IT4_var54	10,35083302	12,58330125	34,36172197	32,45432809	9,003121961	1,660057369	12,2055614	19,09861875	5,312504046	0,283910428	-1,816492254	0,057550731	1	
PfIT_070017100	IT4_var64	12,43370049	7,555366443	18,14928899	3,763965604	6,425666458	1,658733829	8,331120636	12,71278597	3,949455297	0,317221895	-1,566435746	0,101867284	1	
PfIT_070005900	IT4_var08	16,59409612	15,74842947	24,84962095	9,779916842	8,99074862	0	12,65998949	19,06284885	6,256890568	0,343992147	-1,539552463	0,105776793	1	
PfIT_130005500	IT4_var09	16,58265375	13,85405268	21,01913751	4,51570047	10,27894424	4,975175907	11,87094409	17,15194798	6,589940204	0,381834298	-1,388981399	0,111142216	1	
PfIT_120024500	IT4_var16	24,8751849	73,68085706	106,0549592	49,67057273	25,6993887	13,26663473	48,87409955	68,205445305	43,93218283	-1,186989986	0,117044264	1		
PfIT_120044500	IT4_var51	119,0684846	51,60178296	81,14920897	67,79571836	23,14573351	28,21470503	61,82927223	83,9398255	39,71871897	0,479658786	-1,059919613	0,1218237	1	
PfIT_100040000	IT4_var22	8,295130217	5,669378494	11,46893348	0,752310771	3,85323414	3,315597695	5,559095678	8,477814063	2,640377293	0,295122438	-1,760614481	0,135950563	1	
PfIT_070017000	IT4_var20	18,65781375	13,85525763	23,8876224	11,28800197	10,27794217	3,316461083	13,54718317	18,80023126	8,294135075	0,331217696	-1,593913151	0,151522251	1	
PfIT_120045200	IT4_var39	13,45394601	37,11662685	27,67697223	17,33239296	16,72215895	1,660263105	18,99372668	26,08251503	11,90493834	0,466344084	-1,100533278	0,206369591	1	
PfIT_120046600	IT4_var47	24,84272478	79,90559058	59,17982009	39,17974273	29,58101131	19,92023447	42,10152066	54,64271482	29,5603295	0,453997652	-0,87832767	0,208430946	1	
PfIT_020005200	IT4_var03	8,249733773	0,627523092	1,903618083	0,755984378	1,289999007	0	2,133779805	3,593624983	0,681971128	0,206878135	-2,273146921	0,228192855	1	
PfIT_020005200	IT4_var17	13,474533294	10,70602827	4,777376756	6,773048438	3,854352729	1,658283794	6,7393708	9,652645989	4,0522817	0,444945771	-1,168298581	0,273638499	1	
PfIT_060036700	IT4_var07	5,185400665	16,38028278	8,602876481	3,008757263	8,989575716	1,657563387	7,304076049	10,05618664	4,551966456	0,448190666	-1,157815492	0,281173695	1	
PfIT_140006100	IT4_var29	8,28076751	10,06672672	7,636008276	7,534679539	0	3,320083111	6,139710859	8,661167501	3,618254217	0,43868375	-1,188746828	0,309877865	1	
PfIT_080005200		4,952283606	2,439477617	1,846142206	0	2,662958317	0	1,983476958	3,079301143	0,887652772	0,279180709	-1,840728839	0,336979076	1	
PfIT_110005800		4,952283606	2,439477617	1,846142206	0	2,662958317	0	1,983476958	3,079301143	0,887652772	0,279180709	-1,840728839	0,336979076	1	
PfIT_060021400	IT4_var01	6,21077885	5,037037055	8,597266014	4,516613343	1,285096852	3,317373732	4,2828410814	6,617126985	3,039694642	0,472770852	-1,080787003	0,358135177	1	
PfIT_140006200	IT4_var31	20,69707361	25,79177594	58,214321	30,89860287	0	0	22,60029557	34,90105685	34,90105685	0,299926343	-1,740512104	0,414147415	1	
PfIT_040003600	IT4_var24	9,315032768	6,920444139	12,4076768	6,431188238	6,40683808	7,580435509	9,54771594	5,613151478	5,613151478	0,578846818	-0,78874648	0,4193014	1	
PfIT_080037400	IT4_var61	8,278982919	3,145379203	6,680425	3,768600317	1,286364659	4,980962292	4,690029065	6,034929041	3,4512909	0,56516919	-0,845502545	0,479772797	1	
PfIT_040017300	IT4_var10	16,56197657	33,97583444	32,45368542	30,89145536	29,58078793	51,4602177	32,48732624	27,66383214	37,31082033	1,335241747	0,417100967	0,640557404	1	
PfIT_000010800		0	0	0	1,506981805	0	0	0,251163634	0	0,502327268	3,827672850	1,936111548	0,533314879	1	
PfIT_120063000	IT4_var60	0	0,629598919	0,955201564	0	2,570334231	0	0,692522453	0,528266828	0,856778071	1,577004634	0,657186899	0,825697866	1	
PfIT_120024600	IT4_var63	33,12451049	23,90920111	35,31769249	15,82221654	43,7254632	26,55976366	29,74348843	30,78380136	28,70317551	0,928024802	-0,107764732	0,877847764	1	
PfIT_090005100	IT4_var02	9,333043509	2,519916032	0	4,513426409	5,13719157	3,315314514	4,136482037	3,950986514	4,32197756	1,116780248	0,159345331	0,907166626	1	
PfIT_030005100	IT														