



# Rekombinante Expression und Charakterisierung von *PfEMP1*-Proteinen von *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897) sowie *VIR*-Proteinen von *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890) unter besonderer Betrachtung der Interaktion mit humanen Endothelrezeptoren

---

## **Bachelor-Arbeit**

Zur Erlangung des Grades Bachelor of Science (B. Sc.) im Studiengang  
Biotechnologie der Fakultät Life Sciences an der Hochschule für Angewandte  
Wissenschaften Hamburg

vorgelegt von

**Elena Baron**

Hamburg

14. Dezember 2015

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

**1. Gutachter:** Prof. Dr. Jörg Andrä

Fakultät Life Sciences

Department Biotechnologie

Ulmenliet 20, 21033 Hamburg

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Iris Bruchhaus

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Abteilung Molekulare Parasitologie

Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

# Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis.....	I
II.	Einheiten, Maßeinheiten und Symbole .....	IV
1.	Einleitung .....	1
1.1.	Krankheitsbild der Malaria .....	1
1.2.	Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i> und <i>P. vivax</i> .....	3
1.3.	Zytoadhäsion durch variable Oberflächenantigene an humane Endothelrezeptoren	5
1.4.	Zielsetzung.....	8
2.	Material und Methoden.....	9
2.1.	Materialien .....	9
2.1.1.	<i>P. falciparum</i> -Stämme.....	9
2.1.2.	CHO-Zelllinie.....	9
2.1.3.	Oligonukleotide .....	10
2.1.4.	Antikörper.....	11
2.1.5.	Enzyme und Vektoren .....	12
2.1.6.	Puffer, Lösungen, Medien und Zusätze .....	12
2.1.7.	Patientenproben.....	15
2.2.	Zellbiologische Methoden.....	15
2.2.1.	<i>In vitro</i> Kultivierung von <i>P. falciparum</i> .....	15
2.2.2.	Separation von Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll).....	16
2.2.3.	Anfertigen von Stabilaten einer <i>Plasmodium</i> -Kultur.....	17
2.2.4.	Auftauen von <i>Plasmodium</i> -Stabilaten.....	17
2.2.5.	Synchronisieren von <i>Plasmodium</i> -Kulturen mittels Sorbitol.....	17
2.2.6.	Aufnahme einer Zeitreihe .....	18
2.2.7.	<i>In vitro</i> Kultivierung von CHO-Zellen .....	19
2.2.8.	Zellzahlbestimmung und -einstellung .....	19
2.2.9.	Anreicherung von IE an einen bestimmten Rezeptor ( <i>Panning</i> ) .....	19
2.2.10.	Statistischer Bindungsassay für <i>P. falciparum</i> .....	20
2.3.	Molekularbiologische Methoden .....	21
2.3.1.	PCR aus isolierter gDNA.....	21

2.3.2.	Reinigung von Nukleinsäuren.....	23
2.3.3.	Herstellung kompetenter Zellen.....	24
2.3.4.	Klonierung.....	24
2.3.5.	Isolierung der Plasmid-DNA aus kompetenten Zellen und Sequenzierung .....	26
2.3.6.	Umklonierung und Herstellung von Dauerkulturen .....	27
2.4.	Proteinbiochemische Methoden .....	29
2.4.1.	Rekombinante Proteinexpression.....	29
2.4.2.	Zellaufschluss .....	30
2.4.3.	Immundetektion im Westernblot .....	30
2.4.4.	Proteinaufreinigung .....	32
2.4.5.	Einengung und Entsalzung.....	34
2.4.6.	Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Reaktion .....	34
2.5.	Immunologische Methoden .....	35
2.5.1.	Immunisierung.....	35
2.5.2.	Immunfluoreszenzassay (IFA).....	35
3.	Ergebnisse .....	37
3.1.	Rekombinante Proteinexpression und Charakterisierung .....	37
3.2.	Inhibitionsstudien mittels <i>Static Binding Assay</i> .....	46
3.3.	IFAs von Transfektanten .....	48
4.	Diskussion.....	51
4.1.	Rekombinante <i>PfEMP1</i> -Proteine.....	51
4.2.	Rekombinante VIR-Proteine.....	53
4.3.	Rekombinante VIR-Proteine aus <i>P. falciparum</i> -Transfektanten.....	54
	Zusammenfassung.....	V
	Danksagung .....	VII
III.	Literaturverzeichnis.....	VIII
IV.	Abbildungsverzeichnis .....	XII
V.	Tabellenverzeichnis.....	XIII
VI.	Anhang.....	XIV
a.	Sequenzen .....	XIV

i.	<i>P. vivax</i> Transfektanten.....	XIV
ii.	MAL6P1.252 .....	XIX
b.	Nukleotidabgleich .....	XXV
i.	<i>Vir</i> -Sequenzen .....	XXV
ii.	MAL6P1.252-Sequenzen .....	XXVII
c.	Gebrauchsmaterialien und Reaktionskits.....	XXXII
d.	Chemikalien und Reagenzien .....	XXXIII
e.	Geräte und Software.....	XXXV
f.	Herstellerprotokolle.....	XXXVII

## I. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Anti
A	Adenin
AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest, A. dest.	Einfach destilliertes Wasser
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CIDR	<i>Cysteine Rich Interdomain Region</i>
CSA	<i>chondroitin sulfate A</i>
DBL	<i>Duffy Binding Like</i>
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Erythrozytenmembran
EPCR	<i>endothelial protein C receptor</i>
ETRAMP	<i>Early transcribed membrane protein</i>
G	Guanin
gDNA	<i>Genomic Deoxyribonucleic acid</i>
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GOI	<i>Gene of interest</i>
H + L	<i>Heavy + Light</i>

HA	<i>Human influenza hemagglutinin</i>
His	Histidin
hpi	Stunden nach Infektion ( <i>hours post invasion</i> )
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HS	Humanes Serum
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IE	Infizierte Erythrozyten
IFA	Immunfluoreszenzassay
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Lac	Lactose
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LG	Laborgruppe
<i>M.</i>	Malaria
MFS	<i>Malaria Freezing Solution</i>
MS	Maurer'sche Spalten
MTS	<i>Malaria Thawing Solution</i>
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
NTS	N-terminales Segment
OD	Optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase- Kettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PECAM-1	<i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PEG	Polyethylenglycol
PEXEL	<i>Plasmodium export element</i>
<i>PfEMP1</i>	<i>Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1</i>
pH	<i>pondus hydrogenii</i> (Wasserstoffanteil)
PM	Parasitenmembran
POI	<i>Protein of interest</i>
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>

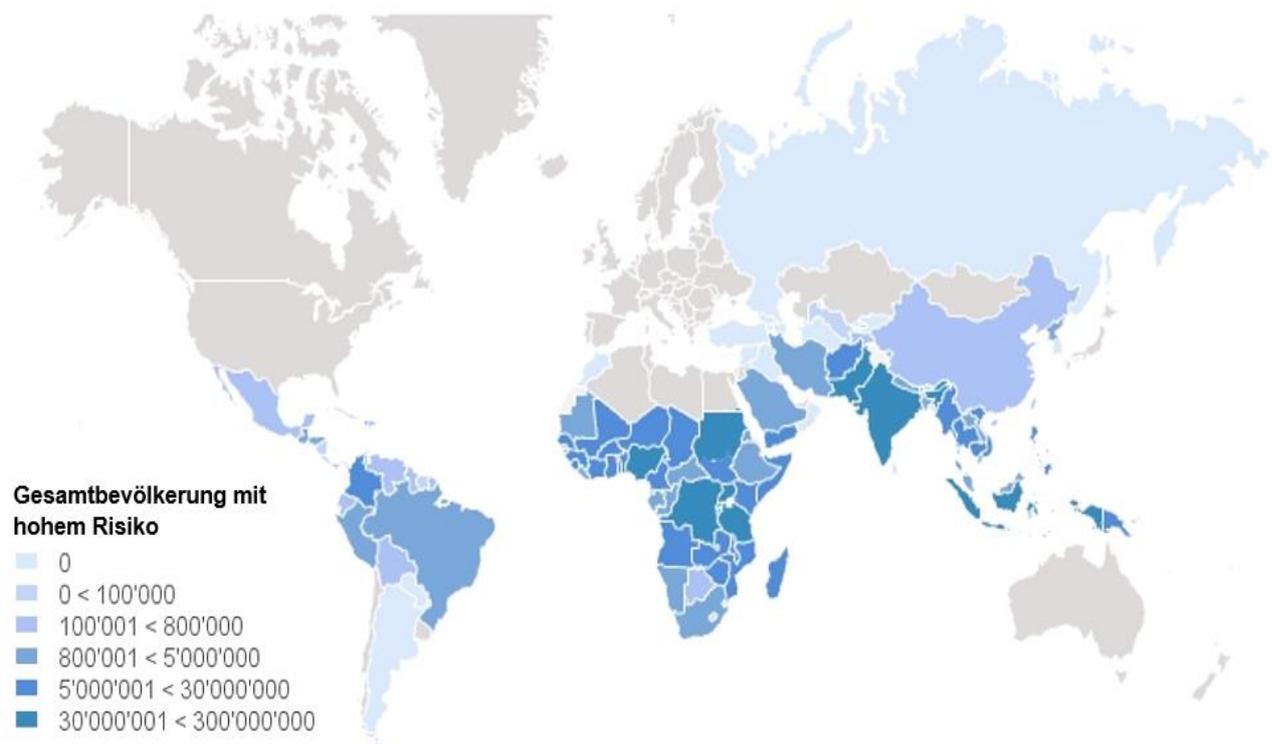
rP	Rekombinantes Protein
s.	siehe
SBP1	<i>Skeleton binding protein 1</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
spp	<i>species pluralis</i>
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE	TRIS-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.A.	Unter Anderem
u.U.	Unter Umständen
UV	Ultraviolettes Licht
ÜS	Überstand
var	<i>Variant gene in P. falciparum</i>
vir	<i>(variant interspersed repeats) Variant gene in P. vivax</i>
WB	<i>Western Blot</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## II. Einheiten, Maßeinheiten und Symbole

A	Ampere	
Da	Dalton	
g	Gramm	
h	Stunde(n)	
l	Liter	
M	molare Masse in g/mol	
m	Meter	
min	Minute(n)	
mol	Mol	
s	Sekunde(n)	
V	Volt	
x g	Multipliziert mit der Erdbeschleunigung ( <i>gravity</i> )	
°	Winkelgrad	
°C	Grad Celsius	
%	Prozent	
∞	unendlich	
k	Kilo	$10^3$
m	Mili	$10^{-3}$
μ	Mikro	$10^{-6}$
n	Nano	$10^{-9}$

## 1. Einleitung

Laut der Weltgesundheitsorganisation WHO leben 45% der Weltbevölkerung in Malaria-gefährdeten Gebieten (s. Abbildung 1). Im Jahr 2013 traten 198 Millionen Malaria-Fälle mit einer 30%igen Todesrate global auf. Zu 90% werden die Todesfälle aus afrikanischen Regionen vermeldet, mit 78% betroffener Kinder unter 5 Jahren. Malaria wird zu einer der gefährlichsten und häufigsten Infektionskrankheiten weltweit eingestuft (WHO, World Malaria Report 2014, 2014).



**Abbildung 1: Globale Lage der Malaria-Gebiete mit hohem Infektionsrisiko.** 3,3 Milliarden Menschen leben in Malaria-endemischen Gebieten, 1,2 Milliarden in Ländern mit hohem Infektionsrisiko.

(<http://worldmalaria.org/map?color=657&circle=707#>)

### 1.1. Krankheitsbild der Malaria

Die meldepflichtige Erkrankung wird durch eine Infektion mit Plasmodien ausgelöst. Dabei handelt es sich um einzellige, parasitäre Organismen, die durch die weiblichen Stechmücken der *Anopheles*-Gattung während der Blutmahlzeit übertragen werden. Von den ca. 400 *Anopheles*-Arten sind etwa 8% als arthropode Vektoren bekannt (Lindner, Miller, & Kappe, 2012; WHO, World Malaria Report 2014, 2014).

Die Tropenkrankheit wird nach Art des Erregers in *Malaria tropica*, *Malaria tertiana* und *Malaria quartana* unterteilt. *Plasmodium falciparum* löst *M. tropica* aus, die mit einer hohen Parasitämie und häufig auftretenden Komplikationen zur gefährlichsten und schwersten Malaria-Erkrankung zählt. *M. tertiana* wird von *P. vivax* oder *P. ovale* hervorgerufen und ist nach den dreitagesrhythmischen Fieberschüben benannt. *M. quartana* hat ebenfalls einen schwächeren Verlauf und wird durch *P. malariae* ausgelöst. Als fünfter humanpathogener Erreger wird *P. knowlesi* gezählt, der bis vor einiger Zeit nur Affen im südöstlichen Asien infizierte (Perlmann & Troye-Blomberg, 2000; Sharma & Khanduri, 2009; Siswanto, et al., 2011; Sabbatani, Fiorino, & Manfredi, 2010; WHO, World Malaria Report 2014, 2014).

Die grippeähnlichen Erstsymptome der Krankheit, die durchschnittlich zwischen 10 und 15 Tagen nach dem Mückenstich auftreten, beginnen meistens mit Fieber, Kopfschmerzen und Übelkeit. Bei *M. tertiana* und *M. quartana* stellt sich daraufhin die bezeichnende Fiebrhythmik von 48 bzw. 72 Stunden ein. Wenn bei *M. tropica* nicht sofort klinische Gegenmaßnahmen ergriffen werden, kann es sich zur schweren Malaria entwickeln. In diesem Stadium treten schwere Anämie, Atemnot, Hämoglobinurie, Hypoglykämie, pulmonale Ödeme oder sogar zerebrale Malaria auf. In den meisten Fällen folgen ein Multiorganversagen und schließlich der Tod (RKI, 2015; Craig, Khairul, & Patil, 2011; Miller, Baruch, Marsh, & Doumbo, 2002).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass neben *P. falciparum* auch *P. vivax* schwere Malaria auslösen kann. Ferner wurden 4 Hauptsymptome definiert, die eine schwere *P. vivax* Malaria klassifizieren. Diese sind schwere Anämie, Schock, Lungenschäden und akutes Nierenversagen. Durch die Fähigkeit von *P. vivax* über längere Zeit in einem Ruhezustand in der Leber zu verbleiben, ermöglicht es dem Parasiten häufige Krankheitsperioden hervorzurufen, die sich u.U. zur schweren Malaria entwickeln können (Quispe, et al., 2014; Kochar, et al., 2005).

Der wichtigste Faktor, der über den weiteren Verlauf der Infektion bestimmt, ist die Zeit. Mit einer schnellen Diagnose und wirksamen Medikamenten kann Malaria behandelt werden. Jedoch treten immer häufiger Resistenzen, besonders bei *P. falciparum* auf, sodass ein vollständiges Verständnis des pathogenen Parasiten notwendig ist, um ein angemessenes und anwendbares Behandlungskonzept generieren zu können (WHO, 2015).

## 1.2. Lebenszyklus von *P. falciparum* und *P. vivax*

Der Lebenszyklus der Plasmodien (s. Abbildung 2) sieht vor, dass sich die Protozoen im Menschen als Zwischenwirt vermehren und heranreifen und in der Mücke als Endwirt fortpflanzen. Die asexuelle Phase im Menschen, auch Schizogonie genannt, beginnt mit dem Stich der Mücke, die hunderte Sporozoiten ins Blut abgibt. Mit dem Blutstrom wandern die Einzeller in die Leber und infizieren die Hepatozyten. Dabei formt der Parasit aus der Plasmamembran der Wirtszelle eine parasitophore Vakuole (PV), die zusätzlich mit Proteinen und Lipiden vom Parasiten modifiziert wird (Sturm, et al., 2006).

Die Sporozoiten differenzieren sich aus der invasiven in die replizierende Form über die Stadien der Lebertrophozoiten zu Leberschizonten. In dieser sogenannten exoerythrozytären Schizogonie produzieren die Leberschizonten tausende von Lebermerozoiten. In Vesikel verpackt, den Merosomen, werden die Merozoiten ins Lebersinusoid freigesetzt. Diese verbreiten sich anschließend über den passiven Transport über den Blutstrom im Wirtsorganismus (Miller, Baruch, Marsh, & Doumbo, 2002; Sturm, et al., 2006).

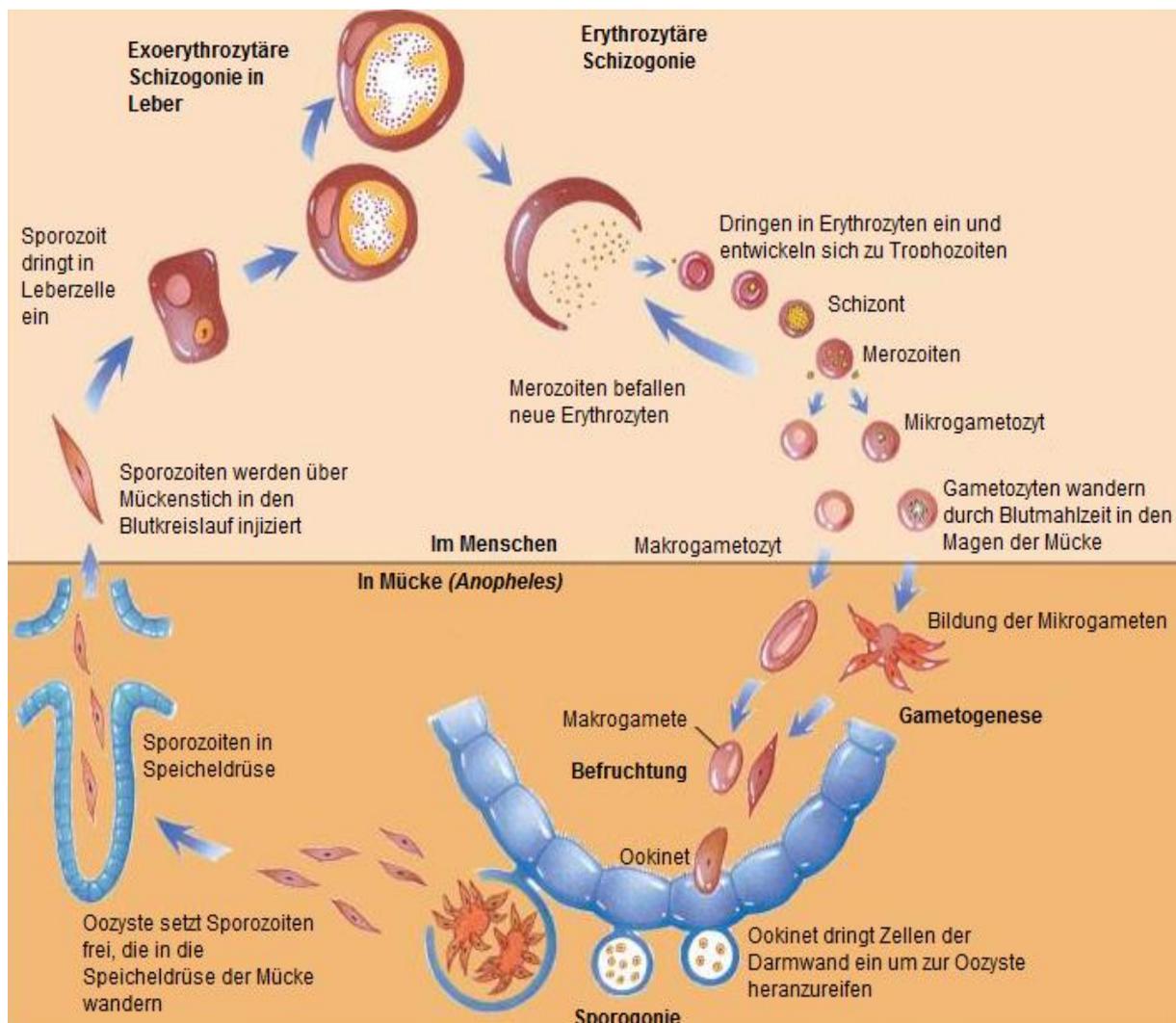
Das Besondere im *P. vivax*-Zyklus ist, dass ein Teil der Merosomen als Hypnozoiten in den Hepatozyten verbleiben kann. In diesem Ruhestadium kann der Parasit über Wochen und Jahre im Wirtsorganismus überdauern und eine erneute Malariaerkrankung hervorrufen. Es ist bis heute nicht bekannt was das Signal zur erneuten Vermehrung gibt, es wird aber vermutet, dass es mit Umweltbedingungen in Zusammenhang steht. Dies könnte die erhöhte Wahrscheinlichkeit sein, eine Stechmücke zu infizieren durch die beispielsweise jahreszeitliche Veränderung vom Winter zum Sommer (Barnwell, et al., 2007).

Im Blutgefäß interagieren die Merozoiten mit den Rezeptormolekülen der roten Blutkörperchen und beginnen die erythrozytäre Schizogonie mit dem Eindringen in die Erythrozyten. Hier grenzt sich *P. vivax* mit der Besonderheit ab, da es nur Retikulozyten infizieren kann. Beim Eindringen in die Wirtszellen wird wieder eine schützende PV aus der Erythrozyten-Plasmamembran (EM) gebildet. Innerhalb des infizierten Erythrozyten (IE) differenziert sich der Parasit von der Ringform zum Trophozoiten und schließlich zum Schizonten. Hier bildet jeder Schizont in der zyklischen Vermehrung 16-32 neue Merozoiten. Durch Aufplatzen der IE und der einhergehenden Verteilung im Blutplasma, werden neue Erythrozyten infiziert.

Nach der ersten Vermehrung in den IE äußert sich die Krankheit mit den ersten Symptomen wie starkem Fieber. *P. vivax* zeichnet sich durch hohe Synchronität der Plasmodien aus, was sich hier in den typischen dreitagesrhythmischen Fieberschüben zeigt. *P. falciparum* grenzt sich mit einer deutlich höheren Parasitämie und ohne erkennbare Synchronität ab.

Im asexuellen Kreislauf entwickeln sich einige Merozoiten zu Gametozyten, der Geschlechtsform der Plasmodien, und können bei einer erneuten Blutmahlzeit einer Mücke von dieser aufgenommen werden. Dort beginnt die ca. 8-16 Tage dauernde sexuelle Phase, auch Sporogonie genannt. Im Darm der Stechmücke entwickeln sich die Gametozyten zu Gameten.

Die männliche Mikrogamete verschmilzt mit der weiblichen Makrogamete und es entsteht eine diploide Zygote, die durch das Darmepithel transmigriert und dabei zum Ookineten heranreift. Im weiteren Verlauf lagert sich der Ookinet an der Basalmembran der Darmwand an und differenziert sich zur Oozyste, die aus den Gewebeschichten herausragt. So werden die darin neu gebildeten Sporozoiten durch Aufplatzen ins Coelom freigesetzt und wandern in die Speicheldrüse der Stechmücke. Bei der nächsten Blutmahlzeit können so bis zu tausend neue Sporozoiten abgegeben werden und einen neuen Menschen infizieren (Sturm, et al., 2006; Miller, Baruch, Marsh, & Doumbo, 2002; Lindner, Miller, & Kappe, 2012).



**Abbildung 2: Lebenszyklus von *Plasmodium* (Levinson, 2012).** Die Parasiten differenzieren sich im asexuellen Zyklus im Menschen und vermehren sich im sexuellen Zyklus in der Mücke.

### 1.3. Zytoadhäsion durch variable Oberflächenantigene an humane Endothelrezeptoren

Als Trophozoiten im intraerythrozytären Stadium exprimieren Plasmodien Proteine, die über die Maurer'schen Spalten (MS), einem tubulären Netzwerk, das sich von der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) bis zur EM ausbreitet, auf die Wirtszellenoberfläche transportiert werden. Mit Hilfe der Oberflächenproteine, die wie Liganden an den Endothelrezeptoren wirken, adhären die IE an Endothelrezeptoren der Blutgefäße und vermeiden so die Eliminierung durch die Milz (Miller, Baruch, Marsh, & Doumbo, 2002; Hinterberg, et al., 1994).

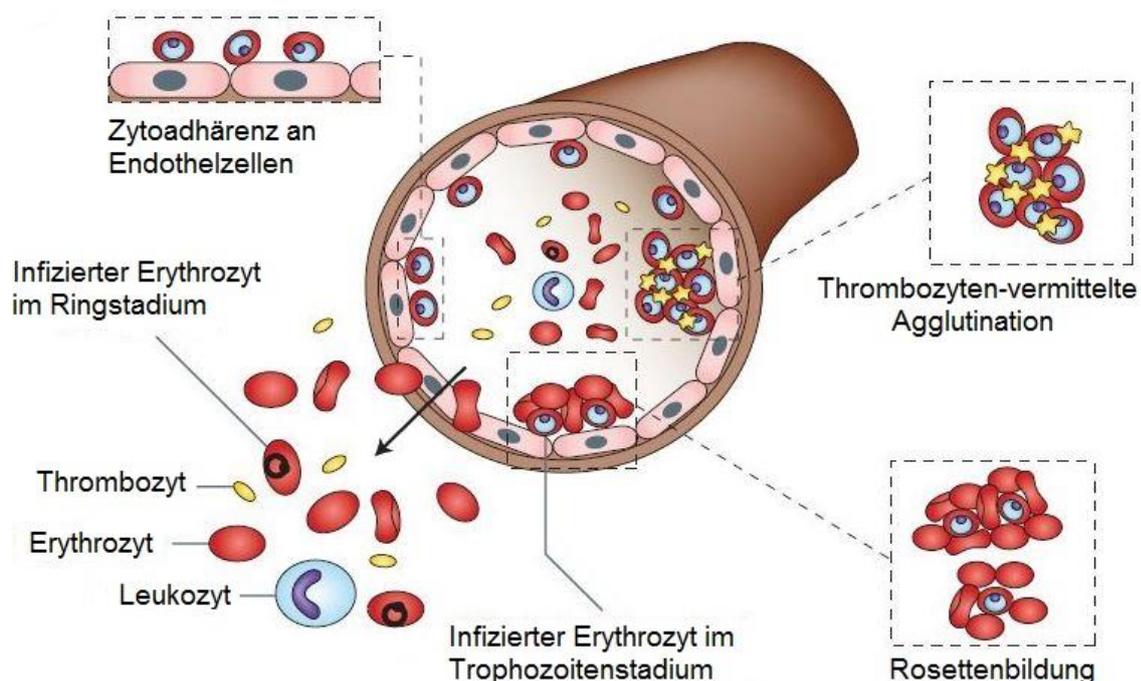


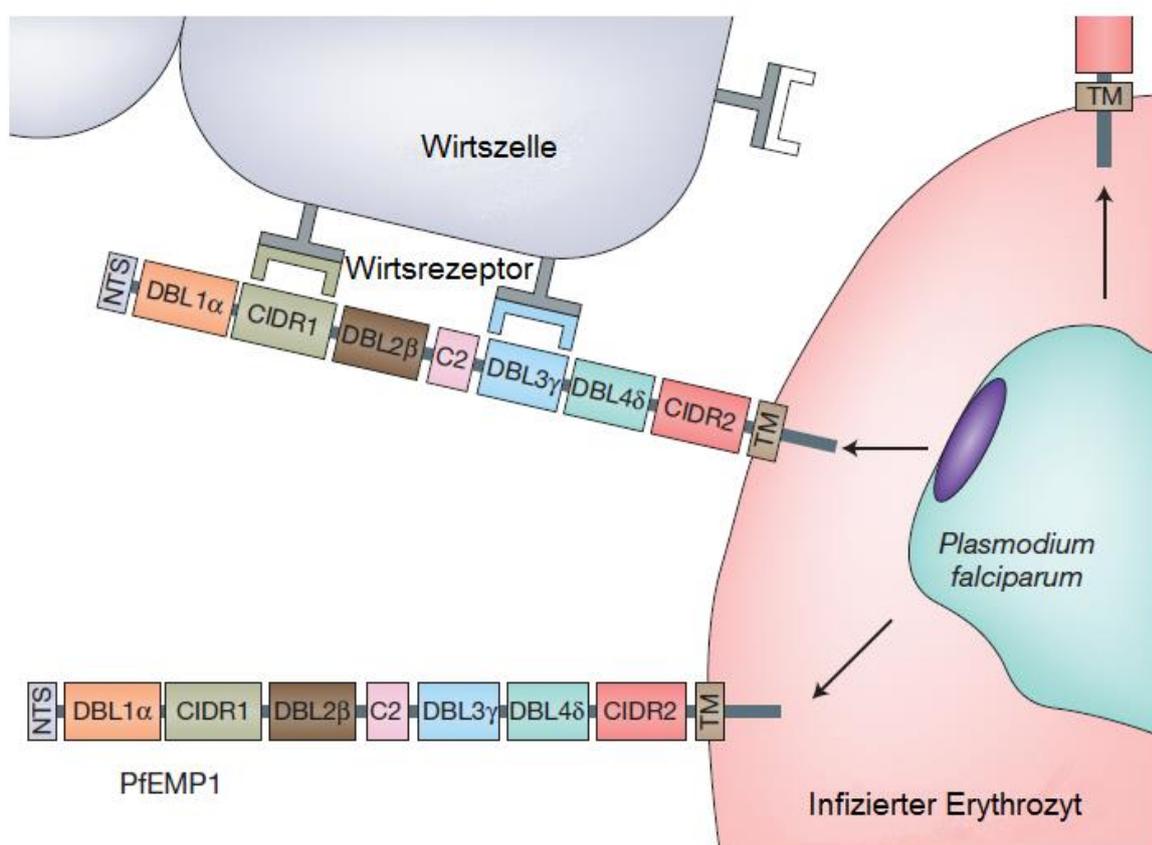
Abbildung 3: Adhäsion von mit *P. falciparum* IE an humanen Zellen (Rowe, Claessens, Corrigan, & Arman, 2009). Trophozoiten von *P. falciparum* sind in der Lage an Endothelzellen zu adhären, durch Thrombozyten-vermittelte Agglutination mit anderen IE oder mit nicht infizierten Erythrozyten Klumpen zu bilden.

Neben der Zytoadhäsion treten Fälle auf, in denen die IE mit nicht infizierten Erythrozyten (Rosettenbildung, *rosetting*) oder mit anderen IE (Agglutination) Klumpen bilden (s. Abbildung 3). Das Auftreten der Rosettenbildung und Agglutination ist noch nicht genau erforscht und die Ursachen und Gründe unklar, jedoch werden alle drei Adhäsionen mit schwerer Malaria in signifikanten Zusammenhang gebracht (Miller, Baruch, Marsh, & Doumbo, 2002).

Eine Schlüsselrolle in der Fähigkeit zur Zytoadhäsion wird in den Multigenfamilien *var* (*variant gene*) in *P. falciparum* und *vir* (*variant interspersed repeats*) in *P. vivax* gesehen. Diese sind wie in den meisten anderen *Plasmodium* spp. hochgradig unterschiedlich, dienen aber vermutlich dem gleichen Ziel, dem Immunsystem des Wirtsorganismus zu entgehen (Singh, Gupta, & Pande, 2014; Miller, Baruch, Marsh, & Doumbo, 2002).

Die *vir*-Multigenfamilie exprimiert VIR-Proteine in *P. vivax*. 264 *vir*-Gene können in 12 Unterfamilien (A-L) eingeteilt werden. Die übrigen 82 können noch keiner Familie zugeteilt werden. Die Funktion von VIR-Proteinen in natürlichen Infektionen ist bis heute noch nicht ausreichend erforscht, jedoch kann man eine Tendenz im Zusammenhang von Zytoadhäsion und den daraus resultierenden chronischen Infektionen erkennen. Im Blutkreislauf des Wirtsorganismus werden gleichzeitig mehrere Unterfamilien transkribiert. Auf diese Weise werden zeitgleich immer mehrere VIR-Proteine exprimiert (Singh, Gupta, & Pande, 2014).

*P. falciparum* verfügt über mehrere Multigenfamilien, wobei 60 *var*-Gene *PfEMP1* (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1) exprimieren. Diese Proteine sind in der Lage an zahlreiche humane Endothelrezeptoren zu binden und anders als bei VIR-Proteinen, wird die Expression streng kontrolliert und epigenetisch gesteuert. Im Blutkreislauf wird immer nur ein *var*-Gen zur gleichen Zeit exprimiert und die restlichen unterdrückt. Dadurch entsteht eine enorme Antigenvariabilität als Reaktion auf die Immunantwort des Wirtsorganismus. Das Resultat ist in hohen Parasitämien in Patienten zu sehen (Singh, Gupta, & Pande, 2014).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der *PfEMP1*-Präsentation vom IE an Wirtszellrezeptoren (Rowe, Claessens, Corrigan, & Arman, 2009). NTS= N-terminales Segment, DBL= *Duffy-binding-like* Domäne mit den vier Typen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), CIDR= *Cystein-rich-interdomain-region* mit den drei Typen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), TM= Transmembrandomäne.

Sowohl PfEMP1- als auch VIR-Proteine bestehen aus Adhäsionsdomänen, die auf extrazellulären Regionen lokalisiert sind. Dabei handelt es sich um *Duffy-binding-like-protein* (DBL) und *Cystein-rich-interdomain-region* (CIDR). Während VIR immer nur über eine DBL-Domäne verfügt, verwendet PfEMP1 mehreren DBL- und CIDR-Domänen zur Rezeptorbindung. Dies ermöglicht PfEMP1 die gleichzeitige Bindung an mehrere humane Endothelrezeptoren, wie in Abbildung 4 dargestellt. Weiter werden die DBL-Domänen in 4 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ) und CIDR in 3 Haupttypen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) unterteilt (Miller, Baruch, Marsh, & Doumbo, 2002; Smith, 2014; Singh, Gupta, & Pande, 2014).

In den letzten drei Dekaden wurden ca. 22 humane Endothelrezeptoren identifiziert, an die IE mit PfEMP1 binden können. Davon sind CD36, *chondroitin sulfate A* (CSA), *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), *platelet/endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1) und *endothelial protein C receptor* (EPCR) umfangreich erforscht. Das integrale Membranprotein CD36 sticht besonders hervor, da beinahe alle *P. falciparum*-Isolate an diesen Rezeptor binden (Barnwell, et al., 1989; Duffy & Fried, 2005; Chakravorty & Craig, 2005; Berger, et al., 2013; Turner, et al., 1994; Rowe, Claessens, Corrigan, & Arman, 2009; Esser, et al., 2014).

## 1.4. Zielsetzung

*P. falciparum* rückt aufgrund seines häufig tödlichen Verlaufs in den Vordergrund der Forschungen, jedoch ist *P. vivax* wesentlich mehr verbreitet (WHO, World Malaria Report 2014, 2014). In dieser Arbeit, aufgeteilt auf zwei Projekte, sollen diese beiden Erreger, die nachgewiesen die Fähigkeit zur Zytoadhäsion besitzen (Craig, Khairul, & Patil, 2011; Lopes, et al., 2014), in ihrer Interaktion mit humanen Endothelrezeptoren untersucht werden.

Im ersten Projekt werden Bindungsdomänen von PfEMP1-Proteinen, die in vorangegangenen Studien als putative Bindungsbereiche identifiziert und deren Aufbau in Domänen klassifiziert wurde, rekombinant exprimiert. Diese als IT4var2 und MAL6P1.252 bezeichneten PfEMP1-Proteine, konnten als Interaktionspartner für CD9 und P-Selektin nachgewiesen werden (Tilly, Metwally, & Bruchhaus, unveröffentlichte Daten; Tilly, Dissertation, 2015). Da noch unklar ist welche der spezifischen Domänen für die Bindungen verantwortlich sind, sollen diese in Inhibitionsstudien charakterisiert werden. Dabei wird der Fokus auf den humanen Endothelrezeptor CD9, welcher u. A. in Blutgefäßen des Gehirns lokalisiert ist, gelegt.

Im zweiten Projekt soll untersucht werden, ob und welche VIR-Proteine auf die Wirtszelloberfläche transportiert werden und somit u.U. eine Rolle in der Zytoadhäsion von *P. vivax* einnimmt. Dafür werden ausgewählte VIR-Proteine einerseits rekombinant exprimiert und andererseits in *P. falciparum* exprimiert. Mittels der rekombinant exprimierten Proteine werden Antikörper generiert, die auf Blutaussstrichen von *P. vivax*-Patienten Proteine auf den Oberflächen der IE detektieren sollen. Die in *P. falciparum* exprimierten Proteine sollen in einer Zeitreihe mittels Immunfluoreszenzassays (IFAs) nachverfolgt und der Transportweg aufgezeichnet werden.

## 2. Material und Methoden

Im Verlauf der Projektbearbeitung wurden viele verschiedene Methoden erlernt und angewendet. Die verwendeten Materialien werden im Folgenden aufgeführt und die Methoden nach ihrem Schwerpunkt unterteilt und erläutert.

### 2.1. Materialien

Die Liste aller verwendeter Geräte mit der Software (s. Anhang VI.e), sowie der Chemikalien und Reagenzien (s. Anhang VI.d) und Gebrauchsmaterialien und Reaktionskits (s. Anhang VI.c) sind dem Anhang zu entnehmen.

#### 2.1.1. *P. falciparum*-Stämme

Der 3D7-Klon stammt aus einem Patientenisolat, bei dem die sogenannte „Flughafen-Malaria“ vermutet wurde. Es lag zu keinem Zeitpunkt ein Aufenthalt in einem Malaria-Endemie Gebiet vor, jedoch war der Patient nahe eines Flughafens in Amsterdam (Niederlande) wohnhaft (Ponnudurai, Leeuwenberg, & Meuwissen, 1981).

Das Patientenisolat FCR3 wurde 1976 in Gambia (West Afrika) nach der Entnahme in Kultur genommen und nach New York City transportiert (Jensen & Trager, 1978). Während der Kultivierung kam es zu einer Vermischung mit einem Patientenisolat aus Brasilien. Heute besteht nur noch einer der beiden Genotypen, es ist aber nicht bekannt welcher.

#### 2.1.2. CHO-Zelllinie

Bei den in dieser Arbeit verwendeten CHO (*Chinese Hamster Ovary*)-Zelllinien handelt es sich um transfizierte CHO-745 vom Wildtyp ATCC (*American Type Culture Collection*) No. CRL-2242.

Die adhärierenden Zellen exprimieren extrazellulär spezifische humane Endothelrezeptoren und intrazellulär GFP (Grün-fluoreszierendes Protein). Die mock-Zelllinie wurde mit dem gleichen Vektor transfiziert, exprimiert aber nur cytosolisches GFP und dient als Negativkontrolle.

Tabelle 1: Verwendete CHO-Zelllinien

Bezeichnung	Vektor	Endothelrezeptor (human)
CHO-745 (mock)	pAcGFP1-N1	-
CHO-745-CD36	pAcGFP1-N1	CD36 ( <i>Cluster of Differentiation 36</i> )
CHO-745-CD9	pAcGFP1-N1	CD9 ( <i>Cluster of Differentiation 9</i> )

## 2.1.3. Oligonukleotide

Aufgelistet sind die verwendeten Oligonukleotide für die Amplifizierung vier verschiedener *vir*-Gene von *P. vivax*, sowie Oligonukleotide für fünf Domänen des PfEMP1-Proteins MAL6P1.252 aus *P. falciparum*.

Die Herstellung erfolgte extern durch die Firma Eurofins Genomics.

**Tabelle 2: Liste der Oligonukleotide für die Amplifizierung verschiedener *vir*- und MAL6P1.252-Moleküle.**

F= forward, R= revers, B= BamHI, E= EcoRI.

BNI-Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'->3')	bp
2254	vir 14_F	GAGA GGATCC AAGCGTTGTTATGATTTAAA	30
2256	vir 14-R2	GAGA GAATTC TTA TCTTTGTTAAGGTATTCAACAT	36
2257	vir 9-F	GAGA GGATCC TGTAATACTTAACTACTTGTT	33
2258	vir 9-R	GAGA GAATTC TTA TCTAAATTCTTCTAGTGCTTCACAAT	39
2259	vir 30-F	GAGA GGATCC TGTGATTCCTTTTCTAGTGC	30
2260	vir 30-R	GAGA GAATTC TTA AAGTTTACTATAGTTCTGATATAAAC	39
2263	vir 5-F2	GAGA GGATCC TATAATAAGGGGCTGGAAAAATG	33
2264	vir 5-R2	GAGA GAATTC TTA TATTTTGGGGAGTTGATGGGTGG	36
2265	D1_B_F30	GAGA GGATCC ACATACAGTAGTGCCAAGGA	30
2266	D1_E_R33	GAGA GAATTC TTA CACTCCACACCAAGGGCAAG	33
2267	D2_B_F30	GAGA GGATCC GATAAAGATACTACTGATAT	30
2268	D2_E_R35	GAGA GAATTC TTA ATCCGGGTTTAAAGAGCGACCT	35
2269	D3_B_F30	GAGA GGATCC AAGAAACAATTGGGTTAGTAG	30
2270	D3_E_R33	GAGA GAATTC TTA AAAGGAATATTTATCCTGGT	33
2271	D4_B_F30	GAGA GGATCC GGTGAAAAAAGTGGTGATAA	30
2272	D4_F_R33	GAGA GAATTC TTA TTTAGCATCACTCCCGCAAT	33
2273	D5_B_F30	GAGA GGATCC GATGTTAATGAAGTTGTTAT	30
2274	D5_E_R33	GAGA GAATTC TTA TGCATTACATTGTTTTGACT	33

Die Oligonukleotide wurden mit den Schnittstellen für *EcoRI* und *BamHI* ausgestattet. Die gesamten Sequenzen und Nukleotidabgleiche sind dem Anhang unter VI.a und VI.b zu entnehmen.

Alle Oligonukleotide werden mit 1xTE auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt, mit HPLC-Wasser 1:10 verdünnt und bei -20°C gelagert.

## 2.1.4. Antikörper

Antikörper wurden sowohl beim Westernblot (WB), als auch bei IFAs verwendet.

**Tabelle 3: Primäre Antikörper für Westernblot (WB) und Immunfluoreszenzassay (IFA) mit den angewendeten Verdünnungen.** Für den WB werden die Antikörper in 5% Milchpulver verdünnt.

Antikörper	Hersteller	WB	IFA	Organismus
$\alpha$ -His	Invitrogen	1:5000	-	Maus (monoklonal)
$\alpha$ -GFP	Roche	1:1000	-	Maus
Alexa Fluor 594 $\alpha$ -HA	BioLegend	1:1000	-	Maus
$\alpha$ -HA	Dianova	1:3000	-	Kaninchen
$\alpha$ -HA, High Affinity	Roche	1:500 1:3000	1:50 1:100	Ratte (monoklonal)
$\alpha$ -GFP	BNITM (AG Spielmann)	-	1:100	Ratte
$\alpha$ -ETRAMP	BNITM (AG Spielmann)		1:400	Maus
$\alpha$ -SBP1	BNITM (AG Spielmann)		1:1000	Maus
$\alpha$ -Spektrin	BNITM (AG Spielmann)		1:200	Kaninchen

**Tabelle 4: Sekundäre Antikörper für Westernblot (WB) und Immunfluoreszenzassay (IFA) mit den eingesetzten Verdünnungen.** Für den WB werden die Antikörper in 5% Milchpulver verdünnt.

Antikörper	Hersteller	WB	IFA	Organismus
$\alpha$ -Maus, IgG/ HRP	Dako	1:7500	-	Kaninchen (polyklonal)
$\alpha$ -Ratte	Dianova	1:3000 1:5000	-	Ziege
$\alpha$ -Maus	Dianova	1:3000	-	Ziege
$\alpha$ -Kaninchen, IgG/ HRP	Dako	1:3000	-	Schwein (polyklonal)
Alexa Fluor 488 $\alpha$ -Ratte IgG (H+L) 2 mg/ml	Invitrogen	-	1:200 1:400	Kaninchen (polyklonal)
Alexa Fluor 488 $\alpha$ -Maus IgG (H+L) 2 mg/ml	Invitrogen	-	1:400	Ziege (polyklonal)
Alexa Fluor 594 $\alpha$ -Kaninchen IgG (H+L) 2 mg/ml	Invitrogen	-	1:400	Ziege (polyklonal)
Alexa Fluor 594 $\alpha$ -Maus IgG (H+L) 2 mg/ml	Invitrogen	-	1:400	Ziege (polyklonal)

## 2.1.5. Enzyme und Vektoren

Im Folgenden sind alle verwendeten Restriktionsenzyme, Klonierungs- und Expressionsvektoren aufgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Restriktionsenzyme, Klonierungs- und Expressionsvektoren

Bezeichnung	Schnittsequenz	Referenz
<i>EcoRI</i>	5'-G↓AATTC-3' 3'-CTTAA↑G-5'	Thermo Fischer Scientific
<i>BamHI</i>	5'-G↓GATCC-3' 3'-CCTAG↑G-5'	Thermo Fischer Scientific
Bezeichnung	Verwendung	Referenz
TOPO®-Vektor	Klonierung	Invitrogen
pRSET®-Vektor	Expression	Thermo Fischer Scientific

## 2.1.6. Puffer, Lösungen, Medien und Zusätze

Die Puffer und Lösungen wurden mit destilliertem Wasser angesetzt. Anschließend wurden sie entweder autoklaviert (20 min, 121°C und 1,2 bar) oder über 0,2 µm steril filtriert.

**Puffer A**, pH 8,0, steril filtriert

10 mM	TRIS HCl
100 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

**Grundpuffer**, steril filtriert

500 mM	NaCl
20 mM	TRIS-HCl (pH 7,9)

**Puffer B**, pH 8,0, steril filtriert

10 mM	TRIS HCl
100 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
8 M	Harnstoff

**Puffer C**, pH 6,3, steril filtriert

10 mM	TRIS HCl
100 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
8 M	Harnstoff

**LB-Agar mit Amp**, Antibiotika nach dem Autoklavieren hinzufügen

35 g/l	LB-Agar (Lennox)
1000 µl/l	Ampicillin

**3x Gelpuffer für Tricin-Gele**, pH 8,45, mit A. dest auffüllen, autoklavieren

363 g/l	TRIS base
3 g/l	SDS

**1% Agarose**, mit 1xTAE-Puffer auffüllen

10 g/l	Agarose
--------	---------

**LB-Medium**, autoklaviert

20 g/l	LB-Medium (Lennox)
--------	--------------------

**10x Kathodenpuffer**, pH 8,25, autoklaviert

1 M	TRIS base
1 M	Tricin
1% (w/v)	SDS

**50x TAE**, pH 8,3, 1l

242 g	TRIS
57,1 ml	Essigsäure
100 ml	0,5 M EDTA

**10x Anodenpuffer**, pH 8,9, autoklaviert

2 M	Tris base
-----	-----------

**0,1% Coomassie-Färbelösung**

1 g	Coomassie Brilliantblau
450 ml	A. dest.
450 ml	Methanol
100 ml	Essigsäure

**Coomassie-Entfärbelösung**

100 ml	Essigsäure
450 ml	Methanol
450 ml	A. dest.

**4x Laemmlipuffer**

0,5 M	TRIS-HCl (pH 6,8)
10%	SDS
1 ml	Glycerin
1 Spatelspitze	Bromphenolblau
10%	$\beta$ -Mercaptoethanol
1,25 ml	A. dest

**6x Loading Dye**

10 mM	TRIS-HCl
0,03%	Bromphenolblau
0,03 %	Xylenecyanol FF
60%	Glycerol
60 mM	EDTA

**10x TBS**

87,66 g/l	NaCl
12,11 g/l	TRIS pure (pH 7,5)

**1x TE**

10 mM	TRIS (pH 8,0)
1 mM	EDTA

**Weiser-Puffer**, pH 7,0; autoklaviert

1,09 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
0,49 g/l	$\text{KH}_2\text{PO}_4$

**Transferpuffer**, pH 8,3- 8,7

2,9 g/l	Glycin
5,8 g/l	TRIS
200 ml	Methanol
0,37 g/l	SDS

**3% BSA/1x PBS**, 0,1 l; steril filtriert

3 g	BSA
0,1 l	10x PBS

**10x CHO-PBS**, pH 7,4; autoklaviert

1,37 M	NaCl
27 mM	KCl
101 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> wasserfrei
18 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

**10x Plasmodium-PBS**, pH 7,4; autoklaviert

1,37 M	NaCl
26,8 mM	KCl
80,6 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
14,7 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

**Bindungsmedium**, pH 7,2, steril filtriert

16,4 g/l	RPMI 1640
2%	Glukose

**5% Sorbitollösung**, steril filtriert

50 g/l	D-Sorbitol
--------	------------

**Malaria Freezing Solution (MFS)**,

steril filtriert

30 g/l	D-Sorbitol
6,5 g/l	NaCl
28 ml	Glycerol (autoklaviert)

**Malaria Thawing Solution (MTS)**,

steril filtriert

35 g/l	NaCl
--------	------

**RPMI + HS (Human serum)**, 1l, steril filtriert

16,4 g/l	RPMI 1640
0,05 g/l	Hypoxanthine
100 ml	Inaktiviertes humanes Serum (Inaktivierung: 2x Inkubation bei 56°C für 30 min)
30 ml	NaHCO <sub>3</sub>
250 µl	Gentamycine

**CHO-Kulturmedium**, steril filtriert

500 ml	Ham's F12 mit L-Glutamin und 25 mM HEPES
50 ml	Inaktiviertes FCS (Inaktivierung: Inkubation bei 56°C für 45 min)
5 ml	Penicillin/Streptomycin Mix (100x)

### 2.1.7. Patientenproben

Die in dieser Arbeit bearbeiteten Patientenproben wurden direkt den in das Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM) eingewiesenen Patienten mit Verdacht auf *Malaria tertiana* abgenommen und in der diagnostischen Abteilung analysiert. Bei Vorliegen der Erkrankung mit *P. vivax* wurden 0,5- 1 ml Patientenblut der LG Bruchhaus zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung gestellt.

Dabei werden zunächst wie unter 2.2.2 beschrieben die infizierten Erythrozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Es werden 7 ml Ficoll-Lösung, die in einem 15 ml Reaktionsgefäß vorgelegt werden, mit 1 ml Patientenprobe, die zuvor mit 6 ml RPMI + HS-Medium (37°C) verdünnt wurde, vorsichtig überschichtet.

Nach der Zentrifugation werden 10 Ausstriche der Patientenprobe angefertigt (s. 2.2.1). Das restliche Sediment wird mit 4 ml TRIzol® (auf 37°C erwärmt) vermischt. Um für spätere DNA- oder RNA-Isolationen verwendet werden zu können, wird das denaturierende Reagenz gleichmäßig verteilt und zusätzlich 5 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsgefäße werden bei -80°C gelagert.

## 2.2. Zellbiologische Methoden

In der Zellkultur wurde sowohl mit *Plasmodium*, als auch mit CHO-Zellen gearbeitet. Die verwendeten Medien und Lösungen sind dem Kapitel 2.1.6 zu entnehmen.

### 2.2.1. *In vitro* Kultivierung von *P. falciparum*

Es wurde humanes Blut der Blutgruppe 0<sup>+</sup> aus dem Universitätskrankenhaus Eppendorf dem BNITM zur Verfügung gestellt. Diese Blutgruppe verfügt über eine hohe Kompatibilität aufgrund der fehlenden A- und B-Antigene und kann somit mit Serum und Plasma von anderen Blutgruppen verwendet werden.

Die Kultivierung erfolgt in Petrischalen (92 x 16 mm) mit 10 ml RPMI + HS-Medium und einem Hämatokrit von 5%. Dabei wird spätestens jeden dritten Tag die Parasitämie bestimmt und die Kultur entsprechend verdünnt oder das Medium gewechselt.

Um die Parasitämie der entsprechenden Kultur zu bestimmen, werden 7 µl der Probe auf einem Objektträger platziert und gemäß Abbildung 5 ausgestrichen. Nach Trocknung an der Luft, wird der Ausstrich für 2 min in Methanol fixiert und anschließend für 10 min

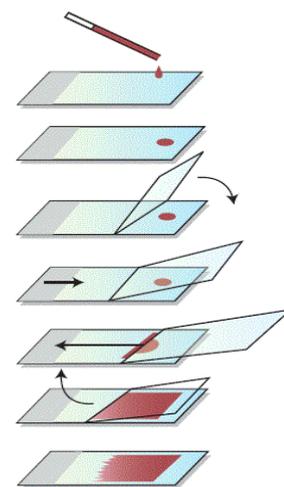


Abbildung 5: Anfertigen von Blutausstrichen (synlab, abgerufen am 17.08.2015)

in Giemsa-Lösung (1:10) gefärbt. Unter dem Mikroskop werden die gesunden und die infizierten Erythrozyten (IE) ausgezählt und der prozentuale Anteil der IE berechnet.

Durch Kippen der Petrischale kann das alte Medium abgenommen und die sedimentierten Erythrozyten in frischem Medium resuspendiert werden. Wenn die Kultur verdünnt werden soll, wird die Parasitämie auf 0,2% (über das Wochenende auf 0,1%) eingestellt.

Die Kulturen werden in speziellen Vakuumbehältern mit einem Gasgemisch von 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 94% N<sub>2</sub> bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt.

Das Verfahren bei Transfektanten ist, bis auf die Zugabe von 1,5 µl WR99210 in 10 ml Kulturmedium, analog. Damit wird das Schlüsselenzym im Zellmetabolismus, Dihydrofolatreduktase (DHFR) inhibiert, was zur Störung der DNA- bzw. Proteinsynthese führt (Hastings & Hopkins Sibley, 2002).

### 2.2.2. Separation von Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll)

Da *P. falciparum* Erythrozyten als Wirtszellen verwendet, kann eine Trennung der IE von anderen Blutbestandteilen bzw. anderen Zellen über die spezifische Sedimentationsgeschwindigkeit erfolgen.

Die *Plasmodium*-Kultur wird durch Kippen der Petrischale aufgenommen, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 800 x g zentrifugiert. Das Sediment wird in 7 ml RPMI + HS-Medium (37°C) resuspendiert und auf 7 ml Ficoll-Lösung vorsichtig aufgeschichtet. Wie in

Abbildung 6 (links) zu sehen, muss sich ein Gradient bilden. Das Reaktionsgefäß wird daraufhin für 20 min bei 1300 x g zentrifugiert (ohne Bremse).

Die Erythrozyten sammeln sich aufgrund der hohen Dichte als Sediment am Boden des Reaktionsgefäßes und der Überstand kann abgenommen und verworfen werden.

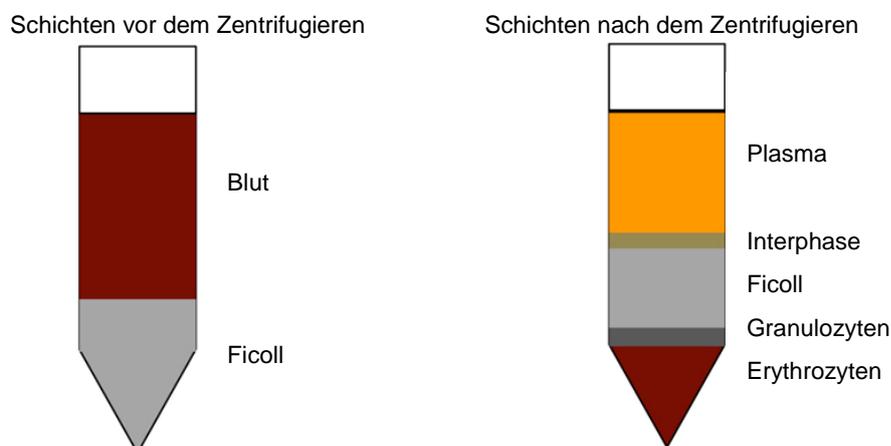


Abbildung 6: Ficoll- Dichtegradient (Zhonghua Lin, 2014)

Nachfolgend wird das Erythrozyten-Sediment 2-mal gewaschen, indem es in 7 ml *Plasmodium*-Medium resuspendiert und 5 min bei 800 x g zentrifugiert wird. Anschließend können die IE weiterbearbeitet werden.

### 2.2.3. Anfertigen von Stabilaten einer *Plasmodium*-Kultur

Beim Anfertigen von Stabilaten muss darauf geachtet werden, dass sich die Kultur im Ringstadium befindet. Weiter entwickelte Parasiten überstehen den Vorgang nicht und die Zellen lysieren. Ebenso sollte eine hohe Parasitämie gewährleistet sein.

Durch Kippen der Petrischale wird das Medium abgenommen und die sedimentierten Erythrozyten in 5 ml frischem Medium resuspendiert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 800 x g wird das Erythrozyten-Sediment im fünffachen Volumen mit *Malaria Freezing Solution* (MFS) aufgenommen und in ein Cryoröhrchen überführt.

Über Nacht werden die Stabilate bei -80°C im Einfrierbehälter gelagert und anschließend in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

### 2.2.4. Auftauen von *Plasmodium*-Stabilaten

Die Stabilate werden im Wasserbad bei 37°C und leichtem Schütteln aufgetaut. Die Kultur, sowie das äquivalente Volumen an *Malaria Thawing Solution* (MTS) werden in ein 15 ml-Reaktionsgefäß gegeben und 5 min bei 800 x g zentrifugiert. Der Waschschrift wird wiederholt, bis der Überstand klar ist und somit alle lysierten Erythrozyten entfernt wurden.

Die Kultur wird, wie bereits unter 2.2.1 beschrieben, in eine Petrischale mit Medium und Blut der Gruppe 0<sup>+</sup> gegeben und im Vakuumbehälter kultiviert.

### 2.2.5. Synchronisieren von *Plasmodium*-Kulturen mittels Sorbitol

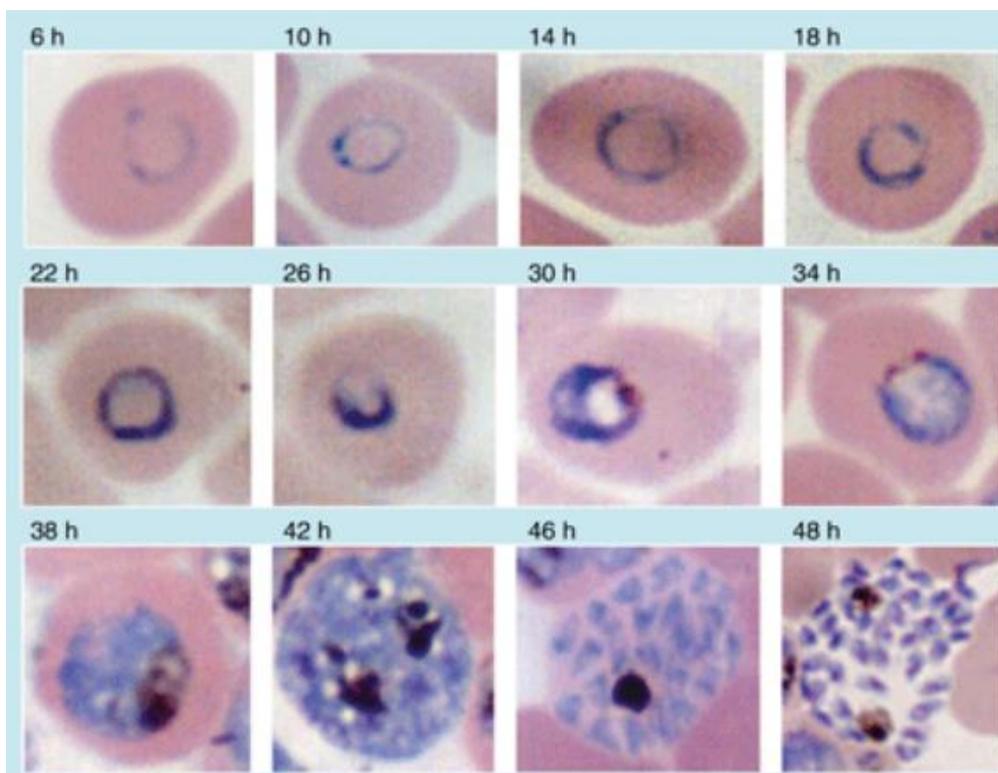
Um die Parasiten im gleichen Entwicklungsstadium zu untersuchen, werden sie synchronisiert. Dafür wird mittels 5% D-Sorbitol das Ringstadium der Parasiten angereichert (Lambros & Vanderberg, 1979).

Im parasitären Zyklus vom Ring über den Trophozoiten zum Schizonten entwickelt sich ein durchlässiges Kanalsystem in der Wirtszelle. Das Sorbitol dringt darin ein und führt zur osmotischen Lyse. Da im Ringstadium diese Permeabilität noch nicht ausgebildet ist, kann auf diese Weise die Kultur synchronisiert werden.

Dafür wird die Kultur für 5 min bei 800 x g zentrifugiert und das Sediment in 2 ml 5% Sorbitol für 5 min bei 37°C im Wasserbad, mit regelmäßigem Schütteln, inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren, werden die Erythrozyten mit Medium gewaschen und in Kultur genommen (s. 2.2.1).

### 2.2.6. Aufnahme einer Zeitreihe

Es sollten 3 Zeitpunkte im intraerythrozytären Lebenszyklus der Transfektanten aufgenommen werden. Frühe Trophozoiten (Vergleich 26 hpi in Abbildung 7), späte Trophozoiten (Vergleich 34 hpi in Abbildung 7) und Schizonten (Vergleich 42 hpi in Abbildung 7). Bei der Aufnahme einer Zeitreihe sollte die Parasitämie  $\geq 5\%$  sein.



**Abbildung 7: Giemsa-Färbung des intraerythrozytären Lebenszyklus von *P. falciparum* (Radfar, et al., 2009).**  
Ringstadium: 6 h - 22 h, Trophozoiten: 23 h – 34 h, Schizonten: 38 h – 46 h, Merozoiten: 48 h.

Die Kulturen wurden im Abstand von 4 h doppelt synchronisiert, um zu gewährleisten, dass sich alle Parasiten im gleichen Entwicklungsstadium befinden. Anschließend wurden alle 2 h Kontrollausstriche angefertigt, um die beabsichtigten parasitären Phasen zu erhalten.

Die Durchführung der IFA-Ausstriche ist unter 2.5.2 einzusehen.

### 2.2.7. *In vitro* Kultivierung von CHO-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten CHO-Zelllinien lagen bereits im Labor Bruchhaus vor. Die Kultivierung der CHO-Zellen erfolgte in 5 ml- bzw. 15 ml- Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup> bzw. 75 cm<sup>2</sup>) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

Spätestens an jedem dritten Tag wird die Konfluenz am inversen Fluoreszenzmikroskop bestimmt und die CHO-Zellen entsprechend verdünnt (1/2 bis 1/30) oder das Medium gewechselt. Das Medium wird abgesaugt und die adhärennten Zellen in der Kulturflasche mit CHO-PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wird Accutase (300 µl bei 25 cm<sup>2</sup> bzw. 1000 µl bei 75 cm<sup>2</sup>) zum Trypsinisieren der Zellen zugegeben und für 5 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zum vollständigen Ablösen der Zellen werden die Kulturflaschen vorsichtig geklopft. Es wird frisches CHO-Kulturmedium aufgegeben und u.U. ein Teil in eine neue Zellkulturflasche überführt. Zur Selektion der CHO-Transfektanten, die entsprechende humane Rezeptoren auf ihrer Zellmembran exprimieren, wird Neomycin als Selektionsmarker in der Endkonzentration von 0,7 mg/ml zugefügt.

### 2.2.8. Zellzahlbestimmung und -einstellung

Für die Ermittlung der CHO-Zellzahl wird die Neubauer-Zählkammer mit 5 µl CHO-Kultur, die zuvor trypsinisiert und resuspendiert wurde, befüllt. Unter dem Mikroskop werden 4 Großquadrate je Zelllinie ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

Zum Einstellen der benötigten Zellzahl, wird diese durch die ausgezählte Zellzahl dividiert und mit dem benötigten Volumen multipliziert.

### 2.2.9. Anreicherung von IE an einen bestimmten Rezeptor (*Panning*)

Um die Bindung von *P. falciparum* an spezielle humane Endothelrezeptoren zu untersuchen, werden die Parasiten bezüglich dieser Bindungseigenschaft angereichert.

Beim *Panning* werden die infizierten Erythrozyten auf die entsprechenden CHO-Zelllinien aufgegeben und weiter *in vitro* kultiviert. Dafür werden die CHO-Zellen 48 h vorher in eine frische Zellkulturflasche (T75) ausgesät. Am Tag der Durchführung sollten sie eine Konfluenz von 80%–90 % aufweisen und werden 1-mal mit CHO-PBS-Puffer gewaschen.

Die *P. falciparum*-Kultur wird 24 h vorher synchronisiert (s. 2.2.5), sodass die Anreicherung im Trophozystenstadium (28 h-30 hpi) durchgeführt werden kann. Die Parasitämie sollte am Tag der Durchführung bei mind. 5% liegen. Die Parasitenkultur wird 5 min bei 800 x g zentrifugiert und das Erythrozyten-Sediment in 15 ml Bindungsmedium resuspendiert.

Die IE werden auf die CHO-Zellen gegeben und für 1,5 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Um unspezifische Bindungen so gering wie möglich zu halten, wird die Flasche alle 15 min leicht geschüttelt. Nach der Inkubation werden die nicht gebundenen IEs durch 5-maliges Waschen mit Bindungsmedium entfernt.

Nach der mikroskopischen Kontrolle werden 12 ml RPMI + HS und 500 µl Blut in die Zellkulturflasche gegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht im Vakuumbehälter mit einem Gasgemisch von 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 94% N<sub>2</sub> bei 37°C. In dieser Zeit sollten sich die Parasiten zu Schizonten weiterentwickeln und beim Platzen neue Merozoiten freisetzen, die die frischen Erythrozyten infizieren.

Am nächsten Tag kann die Ernte des Ringstadiums mittels Ficoll-Dichtegradienten erfolgen (s. 2.2.2). Dies ist notwendig, um abgelöste CHO-Zellen zu entfernen, da diese inhibitorisch auf das Wachstum der Erythrozyten wirken können. Das Erythrozyten-Sediment wird in frischem RPMI + HS-Medium resuspendiert und in Petrischalen überführt (s. 2.2.1).

### 2.2.10. Statistischer Bindungsassay für *P. falciparum*

Zur Vorbereitung werden die CHO-Zellen 48 h vor der Durchführung des statistischen Bindungsassays auf *cover slips* ausgesät. Dafür werden die Deckplättchen (Ø 13 mm) in jede Kavität einer 24-Well-Platte gelegt und mit jeweils 500 µl 1% Gelatine in PBS beschichtet. Nach der Inkubation bei 37°C für 30 min wird die Gelatine abgesaugt und 3 x 10<sup>4</sup> CHO-Zellen/ml je Vertiefung ausgesät (s. 2.2.8). Jede Zelllinie wird im Dreifachansatz untersucht. Die CHO-Zellen werden bis zum Versuchsbeginn bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Für das Bindungsexperiment werden Trophozoiten benötigt, sodass die *Plasmodium*-Kulturen 24 h vorher auf das Ringstadium synchronisiert werden müssen (s. 2.2.5). Am Tag der Versuchsdurchführung werden die 28 h bis 32 h alten *P. falciparum* auf eine Parasitämie von 5% und Hämatokrit von 1% eingestellt.

Die eingestellten IE werden 5 min bei 800 x g zentrifugiert und das Erythrozyten-Sediment in der benötigten Menge Bindungsmedium resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Da pro Well 500 µl IE zugegeben werden müssen, berechnet sich das Volumen abhängig von der Zahl der Ansätze.

Zeitgleich werden CHO-mock-Zellen zur Prä-Absorption vorbereitet, indem diese 5 min bei 37°C mit Bindungsmedium inkubiert werden. Die infizierten Erythrozyten werden zusammen mit den CHO-mock-Zellen für 60 min bei 37°C inkubiert, mit kurzen Schüttelintervallen alle 15 min. In diesem Prä-Absorptionsschritt sollen alle unspezifisch bindenden IE entfernt werden.

Die ausgesäten CHO-Zellen in der 24-Well-Platte werden mit Bindungsmedium gewaschen und anschließend 5 min bei 37°C ebenfalls in Bindungsmedium inkubiert. Als nächstes werden 500 µl IE pro Well aufgetragen und für 60 min bei 37°C und Schüttelintervallen alle 15 min inkubiert.

Die *cover slips* werden einzeln mit einer spitzen Pinzette 2-mal in Bindungsmedium gewaschen und in eine neue 24-Well-Platte, mit der beschichteten Seite nach unten (*face down*) gelegt. Jede Vertiefung enthält jeweils 500 µl Bindungsmedium und die Platte wird für 60 min bei Raumtemperatur mit einer Ausrichtung von 45° aufgestellt. Dies unterstützt das Ablösen der ungebundenen Erythrozyten.

Es folgt die Fixierung in 1% Glutaraldehyd in PBS in einer neuen 24-Well-Platte mit der Zellseite nach oben (*face up*) für 30 min bei Raumtemperatur. Das Glutaraldehyd wird verworfen und Giemsa-Färbelösung (1:10 in Weiser-Puffer, Faltenfilter filtriert) mit 300 µl pro Well aufgetragen. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur werden die Deckplättchen zweifach in Wasser gewaschen und für 10 min an der Luft getrocknet.

Die *cover slips* werden *face down* im Dreifachansatz auf einem Objektträger mit Leica CV Mount Medium eingedeckelt und über Nacht getrocknet. Zur Auswertung werden je Deckplättchen 500 CHO-Zellen sowie die daran gebundenen IEs ausgezählt.

### 2.3. Molekularbiologische Methoden

Die verwendete gDNA wurde bereits von früheren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe isoliert und bei -20°C gelagert. Für *P. vivax* wurden Blutproben von Patienten des BNITM (s.2.1.7), für *P. falciparum* wurde die Isolate FCR3 und 3D7 verwendet (s. 2.1.1).

#### 2.3.1. PCR aus isolierter gDNA

Bei der exponentiellen DNA-Vervielfältigung wird ein Gemisch aus der hitzestabilen *Taq*-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wird, und der *Pwo*-Polymerase mit Korrekturlese-Funktion, die aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus woesei* stammt, verwendet.

Tabelle 6: PCR-Ansatz für 20 µl Gesamt-Volumen

Bezeichnung	Volumen in µl	Finale Konzentration
5x Green Go Taq Flexi Buffer	4,00	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,00	1,5 mM
<i>Forward</i> Primer (10 pmol/µl)	2,00	1,00 µM
<i>Revers</i> Primer (10 pmol/µl)	2,00	1,00 µM
dNTPs (jede 10 mM)	2,00	jede 2,5 mM
DNA-Template	1,00	
<i>Taq</i> -Polymerase & <i>Pwo</i> -Polymerase im Verhältnis 20:1	0,20	
H <sub>2</sub> O	6,80	
Gesamt-Volumen	20,00	

Die Amplifikation erfolgt, indem die doppelsträngige DNA zunächst durch Hitzezufuhr denaturiert wird und sich so die Oligonukleotide komplementär anlagern können (*primer annealing*). Es werden *forward*- und *revers*-Primer verwendet, damit beide Stränge als Matrize genutzt werden können, da die *Taq*-Polymerase nur in 5'-3'-Richtung arbeitet. Die Oligonukleotide besitzen ein freies 3'-Hydroxyende, das die DNA-Polymerase zum Anlagern benötigt. Bei der *Elongation* verwendet die DNA-Polymerase die im Überschuss vorhandenen dNTPs (Desoxy-Nukleosidtriphosphate) und katalysiert die Zusammensetzung des komplementären DNA-Strangs nach den Regeln der Basenpaarung. Die Elongationszeit wird von der Länge der DNA-Matrize bestimmt, dabei wird mit 500 Basenpaaren pro 30 Sekunden gerechnet. Mit dem Ende des ersten Zyklus sollte jeder DNA-Einzelstrang dupliziert worden sein und kann so im folgenden Zyklus ebenfalls als Matrize fungieren.

Tabelle 7: PCR-Programm. \*Wird von der Größe der zu erwartenden Sequenz bestimmt, pro 500 bp/ 30 s

Bezeichnung	Temperatur in °C	Zeit in min	} 30 Zyklen
Initiere Denaturierung	95	2	
Denaturierung	95	0,5	
<i>Annealing</i>	45	0,5	
<i>Elongation</i>	68	1*	
Finale <i>Elongation</i>	68	10	
Ende	4	∞	

2.3.2. Reinigung von Nukleinsäuren

Die DNA wird auf ein 1% bis 2%iges Agarose-Gel, das mit 0,001%igem Ethidiumbromid versetzt ist, aufgetragen. Bei Agarose handelt es sich um ein Polysaccharid, dessen lange Zuckerketten nach dem Aufkochen in einem feinen Netzwerk er härten.

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wandert die negativ geladene DNA beim Anlegen einer Spannung durch das Gel von der Kathode zur Anode. Dabei kommt es zu einer Größentrennung der Nukleinsäuren, da die Wandergeschwindigkeit von der Masse und Ladung der Fragmente abhängt.

Das Gel befindet sich in einer ionischen 1x TAE-Lösung, wodurch die Spannung geleitet wird. Bei kleinen Gelen werden für ca. 30 min 90 V, bei großen für ca. 60 min 120 V angelegt.

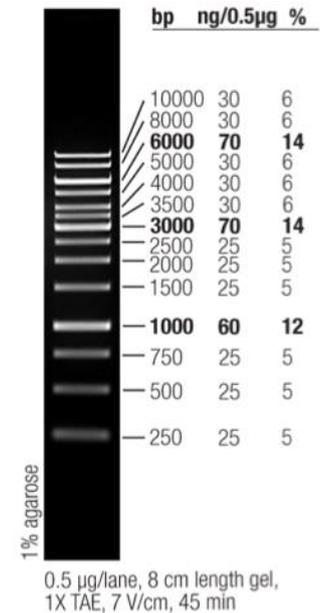
Durch gleichzeitiges Mitführen eines definierten DNA-Markers (s. Abbildung 8), können durch Vergleich der Banden die Größen der DNA-Amplifikate ermittelt werden. Ethidiumbromid wirkt als DNA-Interkalator, der die Nukleinsäuren unter UV-Licht (312 nm) fluoreszieren lässt.

An der Größe können die zu untersuchenden DNA-Sequenzen ermittelt, auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in einzelne Reaktionsgefäße gegeben werden.

Die Reinigung der Nukleinsäuren wird mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up-Kits von Macherey-Nagel gemäß des beiliegenden Protokolls durchgeführt (s. Anhang VI.f).

Im Anschluss wird zur Kontrolle, dass die DNA im Reinigungsprozess nicht verloren wurde, eine weitere Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

**GeneRuler 1 kb DNA Ladder**



**Abbildung 8: GeneRuler 1 kb DNA Ladder für Agarose-Gele**

**Tabelle 8: Probenvorbereitung der Kontroll-Agarose-Gelelektrophorese**

Bezeichnung	Volumen in µl
Loading Dye (6x DNA)	1,00
DNA-Probe	1,00
A. dest.	4,00
Gesamtvolumen	6,00

### 2.3.3. Herstellung kompetenter Zellen

Bakterielle Kompetenz bezeichnet die Fähigkeit freie DNA aus der Umgebung aufnehmen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit zwei unterschiedlichen kompetenten *Escherichia coli*-Stämmen gearbeitet.

Zum Klonieren werden sogenannte Top10-Zellen verwendet. Deren Zellmembran wird mit Calciumchlorid permeabel gemacht, um so leichter Fremd-DNA aufnehmen zu können. In aliquotierten Stocks können diese über mehrere Wochen bei -80°C gelagert werden.

Bei den SHuffle®-Zellen handelt es sich um einen speziellen Expressionsstamm, der besonders bei Proteinen mit Disulfidbrücken Anwendung findet. Sie sollen durch die Generierung der Disulfidbrücken die korrekte Faltung der Proteine unterstützen. Beide *E. coli*-Stämme werden nach der Kultivierung im Schüttelkolben bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3- 0,5 in einem Verhältnis von 10:1 mit Calciumchlorid behandelt.

Die Schüttelkolbenkultur wird dabei pro Ansatz in 500 ml LB-Medium bei 37°C kultiviert und anschließend 15 min bei 2400 x g und 4°C zentrifugiert. Das Bakterien-Sediment wird in 10 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> gelöst und 40 min auf Eis inkubiert. Nach der zweiten Zentrifugation, unter den gleichen Bedingungen, wird das Sediment mit dem halben Volumen an CaCl<sub>2</sub> gelöst und mit 20%igem Glycerin in Aliquots schockgefroren.

### 2.3.4. Klonierung

Die Klonierung besteht aus den 3 Punkten Ligation, Transformation und Selektion. Das Ziel bei der Klonierung ist, das DNA-Fragment, in diesem Fall das gereinigte PCR-Produkt mit den zu untersuchenden *Plasmodium*-Genen, als Plasmid in eine Bakterienzelle zu transformieren. Dadurch kann das Konstrukt identisch vervielfältigt werden.

Bei der klassischen Ligation werden sowohl Fremd-DNA, als auch die Plasmid-DNA mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten, um so die linearisierten Segmente mit dem Ligase-Enzym zu verbinden.

Bei der TOPO®-Ligation bindet die Topoisomerase, die aus dem *Vaccinia Virus* isoliert wird, an das PCR-Produkt. Dieses besitzt den erforderlichen 3'-T-Überhang aufgrund der *Taq*-Amplifizierung (s. Abbildung 9). Der TOPO®-Vektor dient als Transportmittel, um das DNA-Konstrukt in die Top10-Zellen zu transformieren.

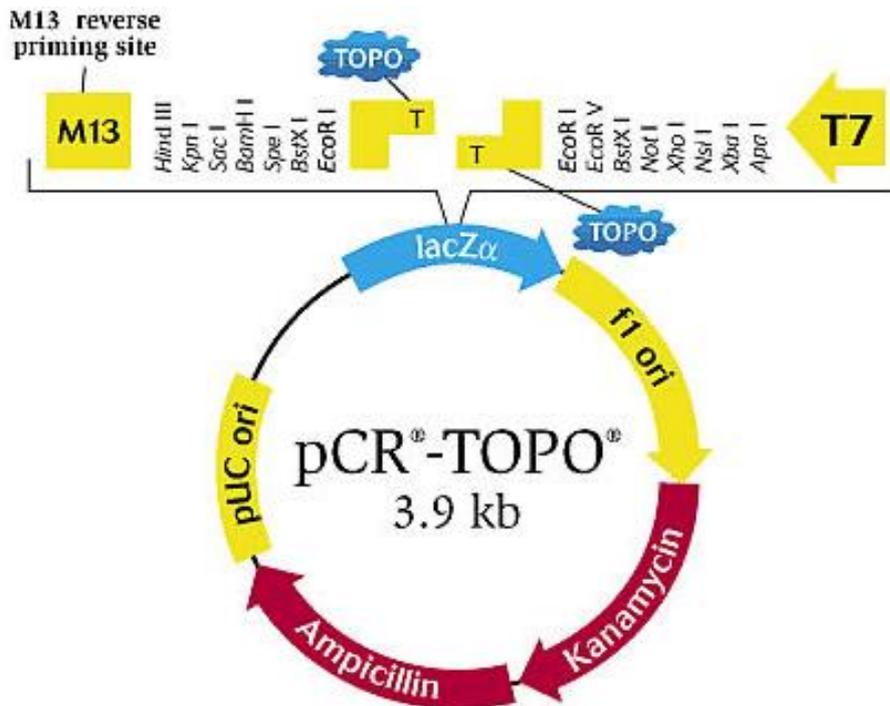


Abbildung 9: Sequenz-Karte des TOPO®-Vektors (LifeTechnologies)

Das TOPO®-TA Cloning-Kit wird in den Mengen wie in Tabelle 9 angewandt. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließenden 5 min auf Eis, werden 2 µl des Ligationsansatzes auf 100 µl Top10-Zellen gegeben.

Tabelle 9: TOPO®-Ligationsansatz

Bezeichnung	Volumen in µl
TOPO®-Vektor	0,50
<i>Salt solution</i>	1,00
H <sub>2</sub> O	2,50
Insert	2,00
Gesamtvolumen	6,00

Um die Effizienz der Transformation der Vektor-Insert-Konstrukte zu erhöhen, erfolgt nach einer 5minütigen Inkubation auf Eis, ein Hitzeschock für 30 s bei 42°C mit anschließenden weiteren 5 min auf Eis. Abschließend werden 250 µl LB-Medium hinzugefügt und die Zellen bei 37°C und 65 x g auf dem Thermocycler für 1 h kultiviert.

Die Selektion erfolgt sowohl durch Antibiotika-Anwendung, als auch über das *blue-white-screening*. Der Transformations-Ansatz wird mit 40 µl 2%iger X-Gal-Lösung vermischt und die Suspension auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank bebrütet.

*E. coli* verfügen über die Eigenschaft Laktose in Glucose und Galaktose zu spalten. Da das enthaltene LacZ-Operon bei Anwesenheit des Zuckers aktiviert wird und  $\beta$ -Galactosidase produziert. Dieses Enzym hilft den Bakterien den Zucker zu metabolisieren, X-Gal wird dabei ebenfalls von der  $\beta$ -Galactosidase hydrolytisch gespalten und es entsteht ein Indigofarbstoff, der die Bakterien blau färbt. Die rekombinanten Bakterien erscheinen im natürlichen weiß, da die Insert-DNA in die LacZ codierende Sequenz eingefügt wird und somit keine  $\beta$ -Galactosidase gebildet und auch kein X-Gal gespalten werden kann.

Pro Platte werden vier weiße Klone gepickt und in LB-Medium mit Amp über Nacht bei 37°C und 0,4 x g kultiviert.

### 2.3.5. Isolierung der Plasmid-DNA aus kompetenten Zellen und Sequenzierung

Um die identisch vervielfachte Plasmid-DNA aus den Top10-Zellen zu isolieren, wird die DNA mit Hilfe des Fast Plasmid MiniKit von 5-Prime isoliert.

Die Flüssigkulturen werden für 1 min bei 18200 x g zentrifugiert und das Bakterien-Sediment in *lysis solution* wieder resuspendiert. Das Lysat wird über eine Säule 60 s bei 15700 x g gewaschen und anschließend mit 50  $\mu$ l für 60 s bei 15700 x g eluiert.

Die Insert-DNA in TOPO® wird auf beiden Seiten durch die *EcoRI*-Schnittstelle flankiert. Das erfordert der Einfachheit halber dein Einsatz von nur einem Restriktionsenzym für den anschließenden Kontrollverdau. Auf dem Agarose-Gel sollten nur noch der TOPO®-Vektor und die korrekte Insert-Sequenz als Banden zu sehen sein.

Tabelle 10: Ansatz für Kontrollverdau mit *EcoRI*

Bezeichnung	Volumen in $\mu$ l
DNA-Eluat	5,00
<i>Fast Digest Buffer (green)</i>	2,00
H <sub>2</sub> O	12,00
<i>EcoRI</i>	1,00
Gesamtvolumen	20,00

Die Sequenzierung bei der die genaue Nukleotid-Abfolge im DNA-Fragment ermittelt wird, erfolgt extern über die Firma SeqLab.

Mit Hilfe der Software *MacVector with Assembler 12.5.1* wird dann die DNA mit der ursprünglichen Sequenz von <http://www.plasmodb.org> auf Fehler abgeglichen.

## 2.3.6. Umklonierung und Herstellung von Dauerkulturen

Da das Ziel die Proteinexpression der zu untersuchenden *Plasmodium*-Gene ist, müssen die Konstrukte aus TOPO® in den pRSET®-Expressionsvektor umkloniert werden. Dieser enthält zudem einen 6xHis-Tag, was eine spätere Protein-Aufreinigung über eine Nickel-Agarose-Säule ermöglicht.

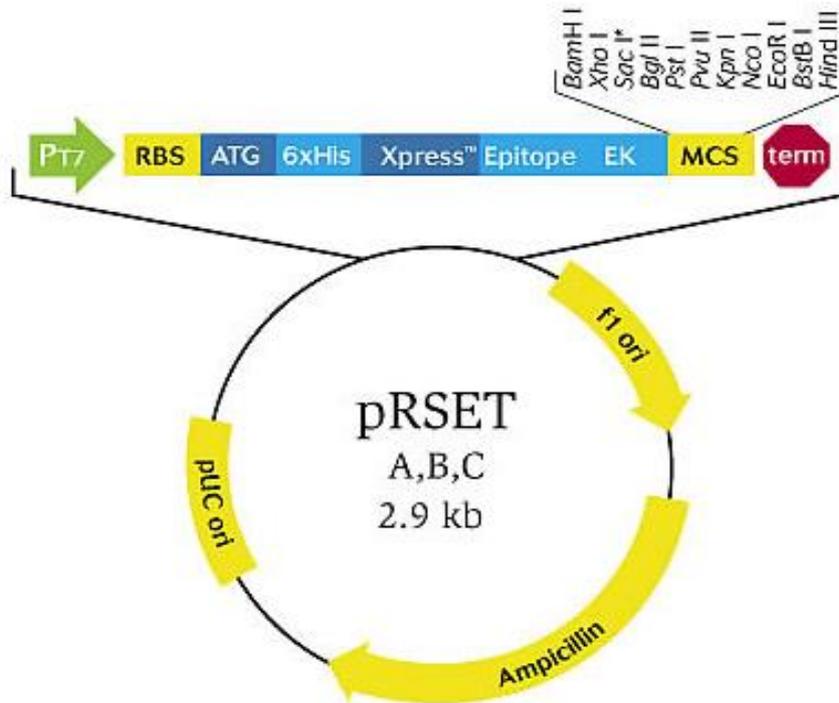


Abbildung 10: pRSET®-Vektor (ThermoFischer)

Für die Umklonierung werden die beiden Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* verwendet, die als Oligonukleotide in der PCR die Enden der DNA-Fragmente auszeichnen. Ebenso verfügt pRSET® über diese Schnittstellen (s. Abbildung 10).

Tabelle 11: Insertverdau mit *EcoRI* und *BamHI* zur Umklonierung

Bezeichnung	Volumen in µl
<i>Fast Digest Buffer (green)</i>	5,00
<i>EcoRI</i>	1,00
<i>BamHI</i>	1,00
DNA-Eluat	43,00
H <sub>2</sub> O (u. U. auffüllen)	x
Gesamtvolumen	50,00

Tabelle 12: pRSET®-Vektorverdau mit *EcoRI* und *BamHI* zur Umklonierung

Bezeichnung	Volumen in µl
<i>Fast Digest Buffer (green)</i>	5,00
<i>EcoRI</i>	2,00
<i>BamHI</i>	2,00
pRSET®-Vektor	5,00
H <sub>2</sub> O (u. U. auffüllen)	36,00
Gesamtvolumen	50,00

Die Inkubation erfolgt für 30 min bei 37°C. Anschließend werden die gesamten Ansätze auf ein Agarose-Gel aufgetragen und sowohl die Insert-, als auch die Vektor-Banden ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up-Kits von Macherey-Nagel gereinigt (s. 2.3.2).

Die Ligation in den Expressionsvektor wird mit der T4-Ligase durchgeführt. Um ein ausreichendes Insert-Vektor-Verhältnis zu erhalten, sollte die DNA-Menge auf dem Agarose-Gel abgeschätzt werden. Hier wurde immer ein Verhältnis von 3:1 gewählt.

Tabelle 13: Ligationsansatz für pRSET®. Insert-Vektor Verhältnis (x:y) von 3:1

Bezeichnung	Volumen in µl
Ligationspuffer	1,50
T4-Ligase	1,00
ATP (10 mM)	2,50
pRSET®-Vektor	y
Insert	x
H <sub>2</sub> O	4,50
Gesamtvolumen	15,00

Wie bereits unter 2.3.4 beschrieben, werden die Konstrukte in Top10-Zellen transformiert, nach Vermehrung der Bakterien die DNA isoliert und in einen anschließenden Kontrollverdau mit beiden Restriktionsenzymen eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgt wieder über die Firma Seqlab.

Tabelle 14: Kontrollverdau mit *EcoRI* und *BamHI*

Bezeichnung	Volumen in $\mu\text{l}$
<i>BamHI</i>	1,00
<i>EcoRI</i>	1,00
DNA (Mini-Prep)	2,00
<i>Fast-Digest-Buffer (green)</i>	1,00
H <sub>2</sub> O	5,00
Gesamtvolumen	10,00

Nach Verifizierung der Korrektheit der DNA-Konstrukte, werden Dauerkulturen hergestellt. Hierfür werden 800  $\mu\text{l}$  der Übernachtskultur eines jeden Konstrukts mit 200  $\mu\text{l}$  Glycerin vermischt und in Cryoröhrchen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.4. Proteinbiochemische Methoden

Zur Charakterisierung der Proteine werden diese mit den hier beschriebenen Methoden aus den Zellen freigesetzt, aufgereinigt und analysiert.

### 2.4.1. Rekombinante Proteinexpression

Zum Transformieren werden die 200  $\mu\text{l}$  SHuffle®-Aliquots langsam auf Eis aufgetaut und mit 2  $\mu\text{l}$  der Plasmid-DNA (nach Fast Plasmid MiniKit) vermengt. Da pro 500 ml Expressionsvolumen ein Aliquot verwendet wird, wurden hier je Konstrukt 3 Ansätze parallel durchgeführt.

Die Zellen werden für 30 min auf Eis mit den Plasmiden inkubiert und anschließend für 30 s bei  $42^{\circ}\text{C}$  hitzegeschockt. Nach weiteren 5 min auf Eis werden je 1,5 ml Reaktionsgefäß 250  $\mu\text{l}$  LB-Medium hinzugefügt und für 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 65 x g inkubiert. Anschließend werden die Ansätze auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  bebrütet.

Der Zellrasen auf den Platten wird mit LB-Medium abgeschwämmt und in jeweils 0,5 l LB-Amp-Medium kultiviert. Damit eine hohe Zelldichte erreicht wird, werden die Kolben im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 0,4 x g inkubiert. Bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3- 0,5 erfolgt die Induktion mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG pro Kolben.

Das IPTG wirkt dabei wie ein Schalter, der die Expression des GOI (*gene of interest*) aktiviert, indem es die Bindung des Repressorproteins am Operator inhibiert. Das Repressorprotein wird vom *lacI*-Gen codiert, dieses ist Bestandteil des Lac-Operon und bindet an vorhandene Lac-Operatoren. Als Konsequenz hieraus wird die Transkription der folgenden Gensequenzen inhibiert.

Im Anschluss an die Expression über Nacht bei 21°C und 0,4 x g, erfolgt der Zellaufschluss, um die produzierten Proteine zu gewinnen.

### 2.4.2. Zellaufschluss

Die Expressionssuspension wird für 15 min bei 4400 x g und 4°C zentrifugiert, um die Bakterienzellen zu sedimentieren und das Medium zu verwerfen. Das Bakterien-Sediment wird in maximal 30 ml Puffer A (ohne GuHCl) komplett gelöst.

Der Sonifier 250 mit Flachkopfspitze zerstört durch impulsartige Ultraschallbeschallung (4 x 1 min mit jeweils 1 min Pause, 50% *Duty Cycle*, 5-6 *Outputcontrol*) die Zellwand der Bakterien, sodass die Proteine frei in der Lösung vorliegen.

Nach erneuter Zentrifugation für 30 min mit 16000 x g bei 4°C, befinden sich vorwiegend lösliche Proteine im Überstand. Der Überstand wird separiert und im Folgenden als ÜSI bezeichnet.

Das erneut entstandene Sediment wird in maximal 15 ml Puffer A (mit 1 M GuHCl) vollständig gelöst und für 10 min im Ultraschallbad beschallt. Wieder wird die Suspension zentrifugiert (15 min, 16000 x g, 4°C) und der Überstand als ÜSII abgenommen.

Erneut wird das Sediment in maximal 15 ml Puffer A (mit 4 M GuHCl) resuspendiert. Im Ultraschallbad werden die restlichen unlöslichen Proteine gelöst und durch zentrifugieren (15 min, 16000 x g, 4°C) im ÜSIII gewonnen.

Die Überstände können bei -20°C gelagert werden.

### 2.4.3. Immundetektion im Westernblot

Für das *Blot*-Verfahren müssen die aus dem Zellaufschluss gewonnen Proteine ihrer Masse nach aufgetrennt werden. Dafür werden Acrylamid-Gelelektrophoresen durchgeführt. Dabei wird je nach Größe des POI (*protein of interest*) eine optimale Acrylamidkonzentration gewählt. Für Proteine kleiner 10 kDa werden Tricin-Gele, die mit zusätzlichem Glycerin versetzt sind, verwendet. Für alle anderen werden standardmäßig 12%-SDS-Gele gegossen.

**Tabelle 15: Ansatz für ein 12% SDS-Gel.** In der Elektrophorese werden je Gel 20 mA für 15 min für das Sammelgel angelegt. Anschließend wird für jedes Trenngel auf 40 mA für weitere 40 min hochgestellt.

Reagenz	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid (30%)	3,0 ml	0,65 ml
Tris-HCl/SDS, pH 8,8	1,88 ml	-
Tris-HCl/SDS, pH 6,8	-	1,25 ml
H <sub>2</sub> O	2,6 ml	3,05 ml
25% APS	25 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl

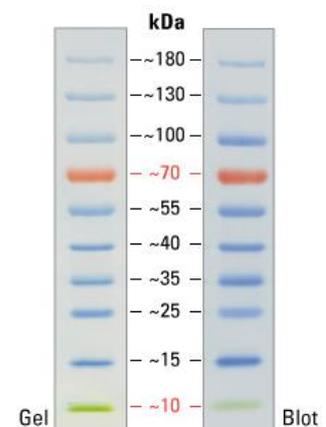
**Tabelle 16: Ansatz für Tricin-Gel.** In der Elektrophorese werden je Gel 20 mA für 30 min für das Sammelgel angelegt. Anschließend wird für jedes Trenngel auf 50 mA für weitere 120 min hochgestellt.

Reagenz	Trenngel	Sammelgel
Glycerin (99%)	2,6 ml	-
Acrylamid (40%), 4K	5,0 ml	-
Acrylamid (30%), 4K	-	1,0 ml
Gelpuffer	4,5 ml	2,25 ml
H <sub>2</sub> O	2,9 ml	6,75 ml
25% APS	25,6 µl	24,0 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl

Das Prinzip ist bei beiden Gelarten gleich. Die netzartige Matrix wird durch Erhärtung des Polyacrylamids hergestellt. Durch Zugabe des SDS-Detergenz (*sodium dodecyl sulfate*) werden die Proteine negativ geladen, diese sind durch vorheriges Aufkochen denaturiert und somit linearisiert.

Beim Anlegen einer Spannung sammeln sich die Proteine zunächst im oberen Sammelgel, wandern anschließend durch das Trenngel zur Anode und werden dabei ihrer Molekülmasse nach in Proteinbanden aufgetrennt. Durch mitführen eines Proteinmarkers (s. Abbildung 11) kann anschließend die Größe der Proteine abgeschätzt werden.

Die Acrylamid-Gelelektrophorese wird immer im Doppelansatz durchgeführt. Ein Gel wird anschließend mit einer Coomassie-Lösung angefärbt, um die einzelnen Proteinbanden einsehen zu können. Das andere Gel wird für die Immundetektion verwendet.



**Abbildung 11: PAGERuler für SDS-Gele und Blots**

Im Westernblot werden die Proteinbanden aus dem Trenngel mittels Elektrophorese (400 mA, 60 min) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Durch mehrere Waschschriffe (2x 10 min mit TBS/Tween, 1x 10 min mit TBS) wird das SDS-Detergenz entfernt und die Proteine falten sich in ihre nativen Tertiärstrukturen zurück.

Auf der Membran erfolgt schließlich die Antigen-Antikörper-Bindung. Die oberflächlich aufgelagerten Proteine wirken als Antigene für die aufzutragenden Primärantikörper. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Unspezifisch gebundene Antikörper werden durch dreifaches Waschen (2x 10 min mit TBS/Tween, 1x 10 min mit TBS) entfernt.

Nach 30 min Blocken der Bindungen in 5% Milchpulver werden die Sekundärantikörper für 2 h aufgetragen. Diese erhöhen die Spezifität und binden nur an den Fc-Teil der Primärantikörper. An den Dreifachwaschschritt folgt die Chemilumineszenz- Färbung.

Tabelle 17: Ansatz für ECL-Lösung und der einzelnen Komponenten

	<b>Volumen/ Einwaage</b>	<b>Reagenz</b>
Lösung A	200 ml	0,1 M Tris-HCl (pH 8,6)
	50 mg	Luminol
Lösung B	10 ml	DMSO
	11 mg	p-Hydroxycoumarinsäure
ECL-Lösung	5 ml	Lösung A
	500 µl	Lösung B
	1,5 µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (35%)

In der Dunkelkammer wird ECL-Lösung auf die Membran gegeben und 2 min inkubiert. Da die verwendeten Sekundärantikörper HRP (Meerrettichperoxidase) gekoppelt sind, wird die Luminol-Umsetzung katalysiert und die Proteinbanden emittieren bei 425 nm. Durch p-Hydroxycoumarinsäure als Verstärker hält die Emission für mehrere Minuten an und es kann ein Film belichtet und entwickelt werden.

Der Film gibt Aufschluss, ob der spezifische Antikörper am POI gebunden hat.

#### 2.4.4. Proteinaufreinigung

Das Aufreinigungsverfahren unterscheidet sich für lösliche und unlösliche Proteine hauptsächlich in den verwendeten Puffern bzw. der Verwendung von GuHCl. Das chaotrope Guanidiniumhydrochlorid wird eingesetzt, um unlösliche Proteine zu denaturieren und somit in Lösung zu bringen.

Eine Aufreinigung ist erforderlich, da die POI nicht allein in der aufgeschlossenen Zellsuspension vorliegen. Sie können aber selektiv von den anderen abgetrennt werden, indem sie an einem Säulenbett immobilisiert und die restlichen weggespült werden. Dafür wird der vom Expressionsvektor pRSET® hineinklonierte Polyhistidin-Tag genutzt. Dabei handelt es sich um 6 aufeinanderfolgende Histidine (His), die eine Affinität zu Nickel haben.

Bei der Ni-NTA-Affinitätschromatographie besteht das Säulenbett aus Nickel-Agarose und bindet den His-Tag selektiv durch Bildung eines Chelatkomplexes. Zur Äquilibrierung werden 0,5- 1 ml Ni-NTA-Agarose für 20 min in Puffer A geschüttelt. Nach der Zentrifugation bei 150 x g für 20 min wird der Überstand verworfen und die Nickel-Agarose zu der Proteinsuspension gegeben.

Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C und unter Schütteln, sollten alle His-Tags Chelatkomplexe mit dem Nickel gebildet haben und die Suspension kann in eine Säule gegeben werden. Zunächst werden mit Waschpuffern die nicht gebundenen Proteine ausgespült und anschließend mit steigender Imidazolkonzentration die POI eluiert. Imidazol funktioniert als Antimetabolit vom Histidin und kann die selektive Bindung ans Säulenbett lösen.

Tabelle 18: Schrittweise Reinigung über die Ni-NTA-Agarosesäule für lösliche und unlösliche Proteine

<b>Lösliche Proteine (ÜSI)</b>		<b>Unlösliche Proteine (ÜSII + ÜSIII)</b>	
<b>Puffer</b>	<b>Volumen</b>	<b>Puffer</b>	<b>Volumen</b>
Puffer A	30 ml	Puffer A + 4 M GuHCl	25 ml
Grundpuffer + 20 mM Imidazol	60 ml	Puffer B	50 ml
Grundpuffer + 60 mM Imidazol	60 ml	Puffer C	30 ml
		Puffer C + 20 mM Imidazol	50 ml
Eluat wird in 2 ml- Fraktionen gesammelt			
Grundpuffer + 200 mM Imidazol	30 ml	Puffer C + 500 mM Imidazol	20 ml
Grundpuffer + 1 M Imidazol	20 ml	Puffer C + 1 M Imidazol	20 ml

Zum Abschluss werden die Fraktionen auf Acrylamid-Gele aufgetragen, um zum einen den Erfolg der Reinigung zu bestätigen und zum anderen die Fraktionen zu verwerfen, die kein eluiertes Protein enthalten.

### 2.4.5. Einengung und Entsalzung

Eine Wanne wird mit PEG 20000 (Polyethylenglycol mit Molekülmasse von 20000) gefüllt und die vereinigten Proteinfractionen in einem Dialyseschlauch (4-6 kDa) hineingelegt. Das hygroskopische Polymer nimmt das Wasser aus dem Schlauch auf, die Proteine verbleiben im Schlauch, da sie zu groß zum Durchwandern der Schlauchporen sind. Es wird auf bis zu 2 ml Restvolumen eingeengt.

Die konzentrierte Proteinlösung wird aus dem Dialyseschlauch pipettiert und auf eine PD-10 Säule gegeben. Dabei handelt es sich um eine Größenausschlusschromatographie. Das Säulen-Bett besteht aus Sephadex-Kugeln, die von kleinen Kanälen netzwerkartig durchzogen sind. Die aufgetragene Suspension besteht zum einen aus Proteinen, die zu groß sind, um die Kanäle zu durchwandern und so nur an den Sephadex-Kugeln vorbeikommen. Zum anderen enthält die Suspension Salze, die die Kanäle durchwandern können und so eine längere Strecke zurücklegen. Es kommt zu einer Größentrennung, wobei die großen Moleküle vor den kleinen eluieren.

Sobald die Proteinsuspension komplett ins Säulenbett eingedrungen ist, werden 3,5 ml *Plasmodium*-PBS-Puffer aufgetragen. Das Eluat wird in 2 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen und die Säule anschließend mit A. dest. gewaschen und in 20% Ethanol gelagert.

Die erfolgreiche Einengung und Entsalzung wird mit Hilfe der Acrylamid-Elektrophorese überprüft.

### 2.4.6. Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Reaktion

Es wird die kolorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung mit BCA (*Bicinchoninic acid*) herangezogen. In diesem Assay wird Lösung A im Verhältnis 50:1 mit Lösung B gemäß der Herstellerangabe des Pierce BCA Protein Assay Kits vermischt. Pro Kavität der 96 Well-Platte werden 200 µl der Versuchslösung mit 200 µl der Proteinlösung vermischt.

Während der 30minütigen Inkubation bei 37°C reagieren die zweiwertigen Kupferionen mit den Proteinen und werden einwertig. So können sie mit dem BCA einen violettfarbenen Komplex bilden, der bei 562 nm photometrisch quantitativ ermittelt werden kann. Als Kalibrierreihe wird eine 2 mg/ml BSA-Stocksolution (*bovine serum albumin*) in folgenden Schritten verdünnt und aufgetragen: 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,063 mg/ml, 0,032 mg/ml.

## 2.5. Immunologische Methoden

Es wird die Immunantwort von Versuchstieren genutzt, um Antikörper zu gewinnen. Die Arbeit mit den Tieren wurde durch das Tierhaus des BNITM durchgeführt.

### 2.5.1. Immunisierung

Pro Protein werden 3 Tiere 3-mal in zweiwöchigen Abständen immunisiert. Dafür werden pro POI 250 µl des löslichen Proteins (ÜSI) mit 250 µl des unlöslichen Proteins (ÜSII+ÜSIII) vermischt und mit einer Spritze aufgenommen. Mit 500 µl Freund's Adjuvant wird über ein Eckventil eine Wasser/Öl-Emulsion hergestellt.

In der ersten Immunisierung wird komplettes Freund's Adjuvant verwendet. Dieses enthält abgetötete Mykobakterien (*Mycobacterium tuberculosis*) um eine starke Immunantwort zu generieren. Die beiden nachfolgenden Immunisierungen erfolgen mit inkomplettes Freund's Adjuvant, welches die Immunantwort verstärken soll, aber keine Mikroorganismen enthält.

Pro Immunisierung werden den Mäusen ca. 100 µl der Suspension intramuskulär injiziert.

### 2.5.2. Immunfluoreszenzassay (IFA)

Aus der *in vitro Plasmodium*-Kultur werden 500 µl entnommen, dabei sollte so wenig Medium und so viel Blut wie möglich aufgenommen werden, damit die verbleibende Kultur weiterkultiviert werden kann. Dieses wird für 5 min bei 800 x g zentrifugiert und das Erythrozyten-Sediment in *Plasmodium*-PBS-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wird das Erythrozyten-Sediment bis zu einer Hämatokrit-Konzentration von 2% mit PBS-Puffer verdünnt. Für die Ausstriche sollte die Parasitämie nicht weniger als 5% betragen.

Die eingestellte Suspension wird auf Objektträger mit 10 Vertiefungen aufgetragen. Dabei wird die gesamte Kavität mit der Kultur gefüllt und direkt mit der Pipette wieder abgesaugt. Es verbleibt ein dünner Film auf dem Objektträger, der an der Luft getrocknet wird. Anschließend erfolgt die Fixierung.

Für die Methanol-Fixierung wurden die Objektträger für 5 min in eiskaltem Methanol gelagert, an der Luft getrocknet und in Alufolie bei -20°C aufbewahrt.

Zum Rehydrieren werden die Objektträger für 5 min mit *Plasmodium*-PBS-Puffer benetzt und anschließend 3-mal mit 50 µl je Kavität gewaschen. Die Primärantikörper werden mit 3% BSA/PBS entsprechend verdünnt und mit 1:1000 Ampicillin (100 mg/ml) vermischt. Je Kavität werden 50 µl aufgetragen und für 1 h in einer Feuchtekammer inkubiert.

Nach 5-maligem Waschen der Objektträger wird der Sekundärantikörper ebenfalls mit 3% BSA/PBS, 1:1000 Ampicillin (100 mg/ml) und 1:1000 Kernfarbstoff Hoechst vorbereitet und mit

50 µl pro Well aufgetragen. Die Inkubation erfolgt für 1 h in einer Feuchtekammer im Dunkeln. Final wird wieder 5-mal gewaschen und mit *mounting media* ein Deckgläschen aufgelegt. Die fertigen Objektträger können in Alufolie bei -20°C gelagert werden.

Ausgewertet wird durch die Auszählung von 50 infizierten Erythrozyten pro Zeitpunkt und Stamm mit der Anmerkung der lokalisierten Färbung. Es werden die Negativkontrollen ohne Inkubation mit dem Primärantikörper ebenfalls kontrolliert.

### 3. Ergebnisse

Die hier beschriebenen Ergebnisse beginnen mit dem Amplifizieren verschiedener Bereiche ausgewählter *vir*-Gene von *P. vivax* und ausgewählter *var*-Gene von *P. falciparum* mittels speziell hergestellter Oligonukleotide für die PCR. Anschließend erfolgte die Klonierung der DNA in einen Expressionsvektor und die rekombinante Expression. Die rekombinanten Proteine sollen zum einen für Inhibitionsstudien zur Charakterisierung der PfEMP1-Bindungsdomänen eingesetzt werden, zum anderen auch für die Immunisierung von Mäusen. Parallel dazu wurden *P. falciparum* Transfektanten, die spezifische *vir*-Gene exprimieren *in vitro* kultiviert und eine Zeitreihe zur Verfolgung des VIR-Proteintransports im IE mittels IFA charakterisiert.

#### 3.1. Rekombinante Proteinexpression und Charakterisierung

Es wurden sowohl die PfEMP1- als auch die VIR-Proteine erfolgreich rekombinant exprimiert. Von *P. vivax* wurden die 4 Moleküle *vir5*, *vir9*, *vir14* und *vir30* aus gDNA-Isolaten mittels spezieller Oligonukleotide amplifiziert. Aus *P. falciparum* 3D7 wurde die DNA für 5 protein-codierende Sequenzen aus MAL6P1.252 (DBLa0.21, CIDRa2.1, DBLb4, DBLd1, CIDRb1) mit Oligonukleotiden mittels der PCR amplifiziert.

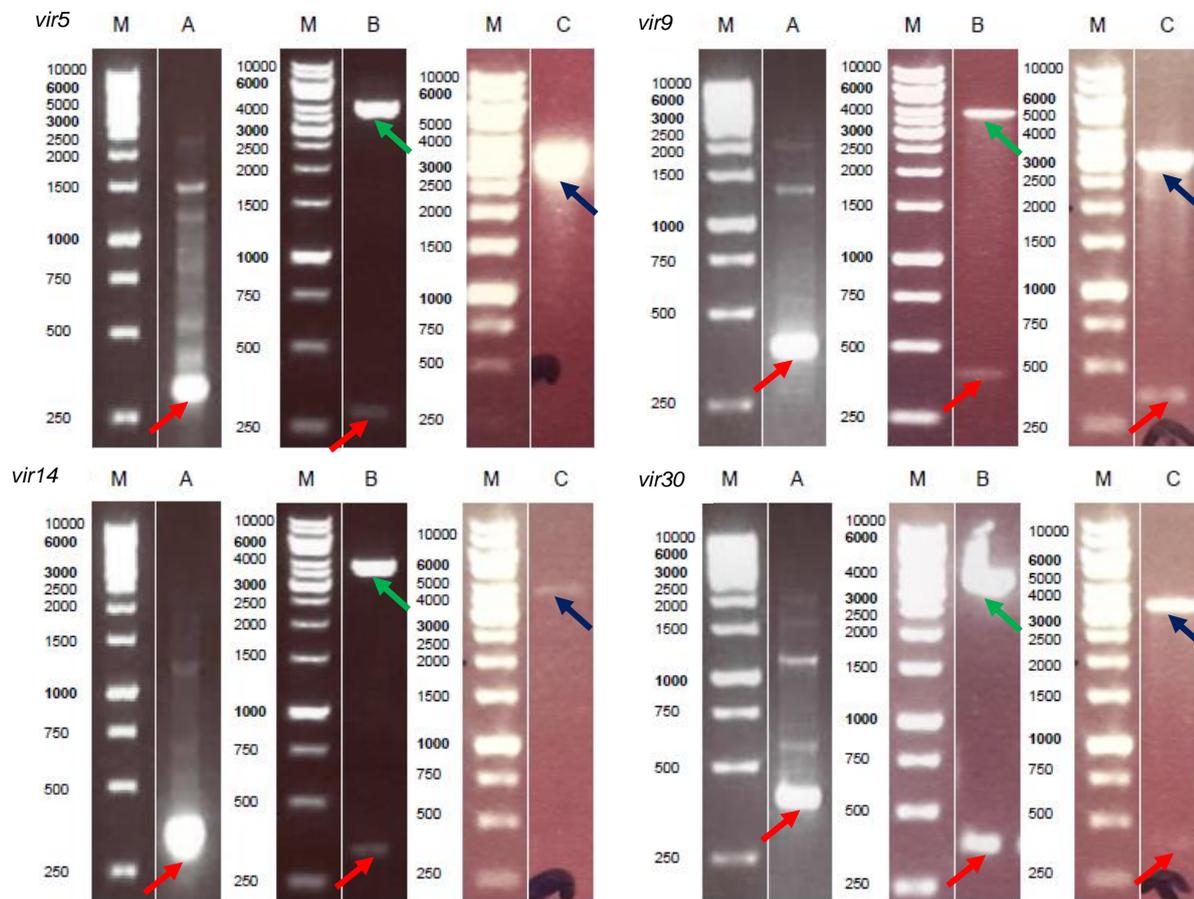
Über den TOPO®-Klonierungsvektor zum pRSET®-Expressionsvektor wurden schließlich die rekombinanten Proteine in SHuffle®-Zellen exprimiert. Um diese Proteine aus den *E. coli*-Bakterien zu gewinnen, wird ein Zellaufschluss durch Ultraschall durchgeführt. Dabei werden gleichzeitig die löslichen Proteine (ÜSI) von den unlöslichen (ÜSII und ÜSIII) getrennt.

Die anschließende Immundetektion der Proteine wird im Westernblot mit einem  $\alpha$ -His-Antikörper durchgeführt. Diese zeigt, dass die exprimierten Proteine die gewünschte Antigen-Antikörper-Bindung aufweisen. Aufgrund der geringen Molmasse der VIR-Proteine, werden diese auf Tricin-Gelen aufgetragen, die größeren MAL6P1.252 auf 12% SDS-Gelen.

Durch den C-terminal eingebauten His-Tag werden die löslichen und unlöslichen Proteine nach dem jeweiligen Protokoll über eine Nickel-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt und in Fraktionen gesammelt. Zusätzlich wurden hier bereits rekombinant exprimierte IT4var2-Proteine aus *P. falciparum* FCR3 mitbearbeitet.

Die löslichen Proteine werden darüber hinaus noch im Dialyseschlauch in PEG 20000 eingengt und mit einer Größenausschlusschromatographie entsalzt, damit die Gefahr der falschen Rückfaltung und Denaturierung durch zu hohe Salzkonzentrationen minimiert wird. Sowohl die gereinigten Fraktionen, als auch die eingengten und entsalzten Proteine werden nochmals in SDS-Gelen kontrolliert und schließlich deren Konzentration mittels BCA-Reaktion bestimmt.

Hier zeigt sich, dass von den insgesamt 20 rekombinanten Proteinen 3 im Aufreinigungsprozess verloren wurden. Diese konnten weder im Acrylamidgel, noch mittels BCA-Reaktion nachgewiesen werden. Ferner liegen 5 der rekombinanten Proteine in sehr geringen Konzentrationen vor, was vermutlich ebenfalls dem Aufreinigungsprozess zugrunde liegt.



**Abbildung 12:** DNA-Amplifikate der *vir*-Moleküle *vir5*, *vir9*, *vir14* und *vir30* aus *P. vivax*. M= 1 kb DNA-Marker. A: DNA-Amplifikate nach der PCR aus gDNA-Isolaten. Die roten Pfeile markieren die Bande der zu untersuchenden DNA. *Vir5* mit 315 bp, *vir9* mit 348 bp, *vir14* mit 318 bp und *vir30* mit 357 bp. B: DNA nach Kontrollverdau mit *EcoRI* im TOPO®-Vektor mit 3,9 kb (grüner Pfeil). C: DNA nach Kontrollverdau mit *EcoRI* und *BamHI* in pRSET® mit 2,9 kb (blauer Pfeil).

Unter A in Abbildung 12 sind bei allen 4 Amplifikaten die Banden auf der zu erwartenden Höhe zu erkennen. Unter B und C sieht man jeweils 2 Banden nach dem Kontrollverdau aus dem 3,9 kb großen TOPO®-Vektor bzw. dem 2,9 kb großen pRSET®-Vektor. Bei *vir5* und *vir14* kann keine eindeutige Bande auf der erwarteten Höhe erkannt werden. Jedoch bestätigte die Sequenzierung die Korrektheit aller 4 Moleküle.

Die rekombinanten Proteine (rP) der *vir*-Moleküle erhielten folgende Nummerierung: *vir5* – rP55, *vir9* – rP52, *vir14* – rP54, *vir30* – rP53.

Ein analoges Verfahren wurde mit MAL6P1.252 durchgeführt. Dort wurden die 5 Domänen aus Abbildung 13 untersucht.



Abbildung 13: Die 5 untersuchten MAL6P1.252-Domänen aus *P. falciparum* 3D7 mit der Nummerierung der rekombinanten Proteine.

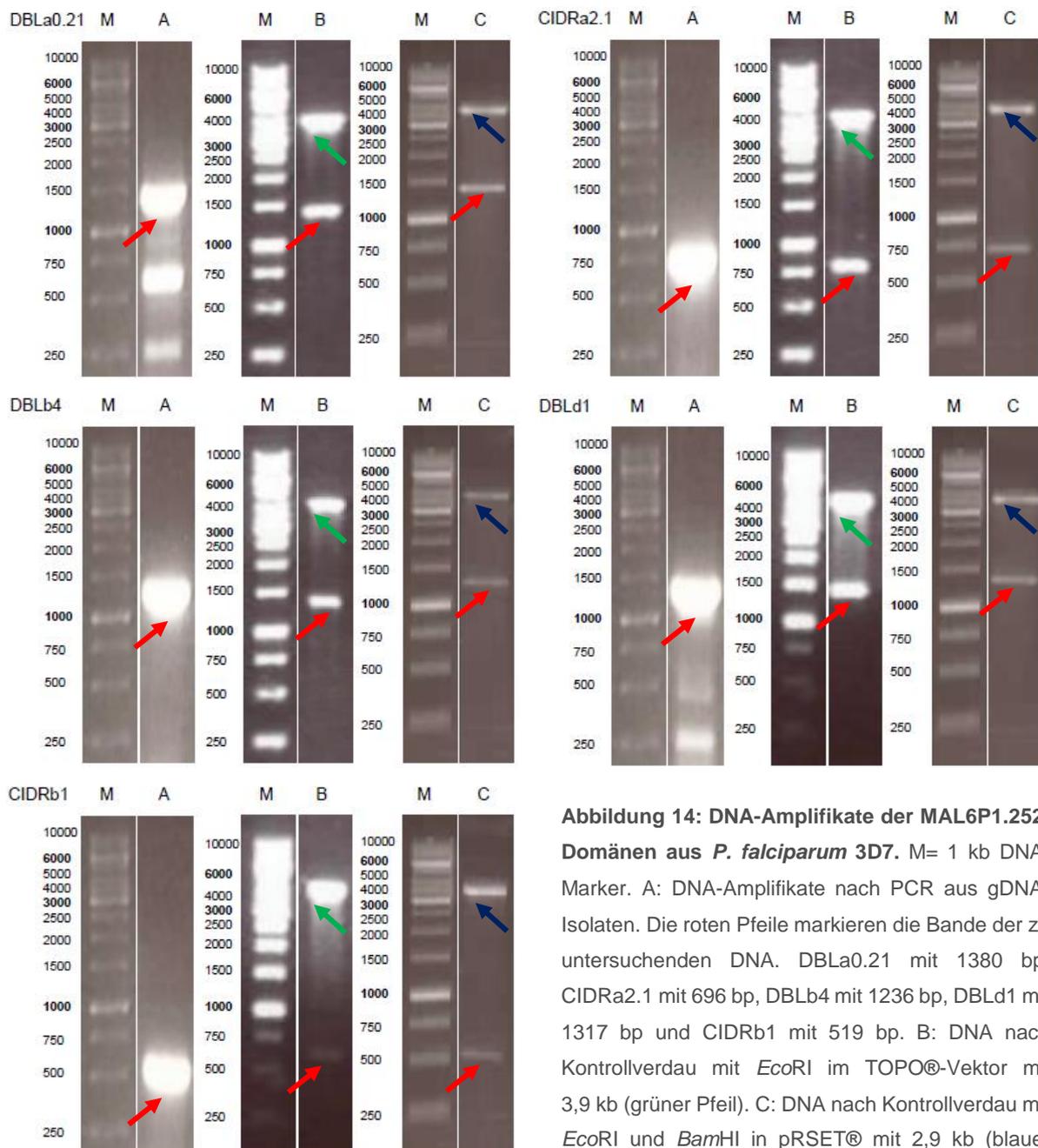
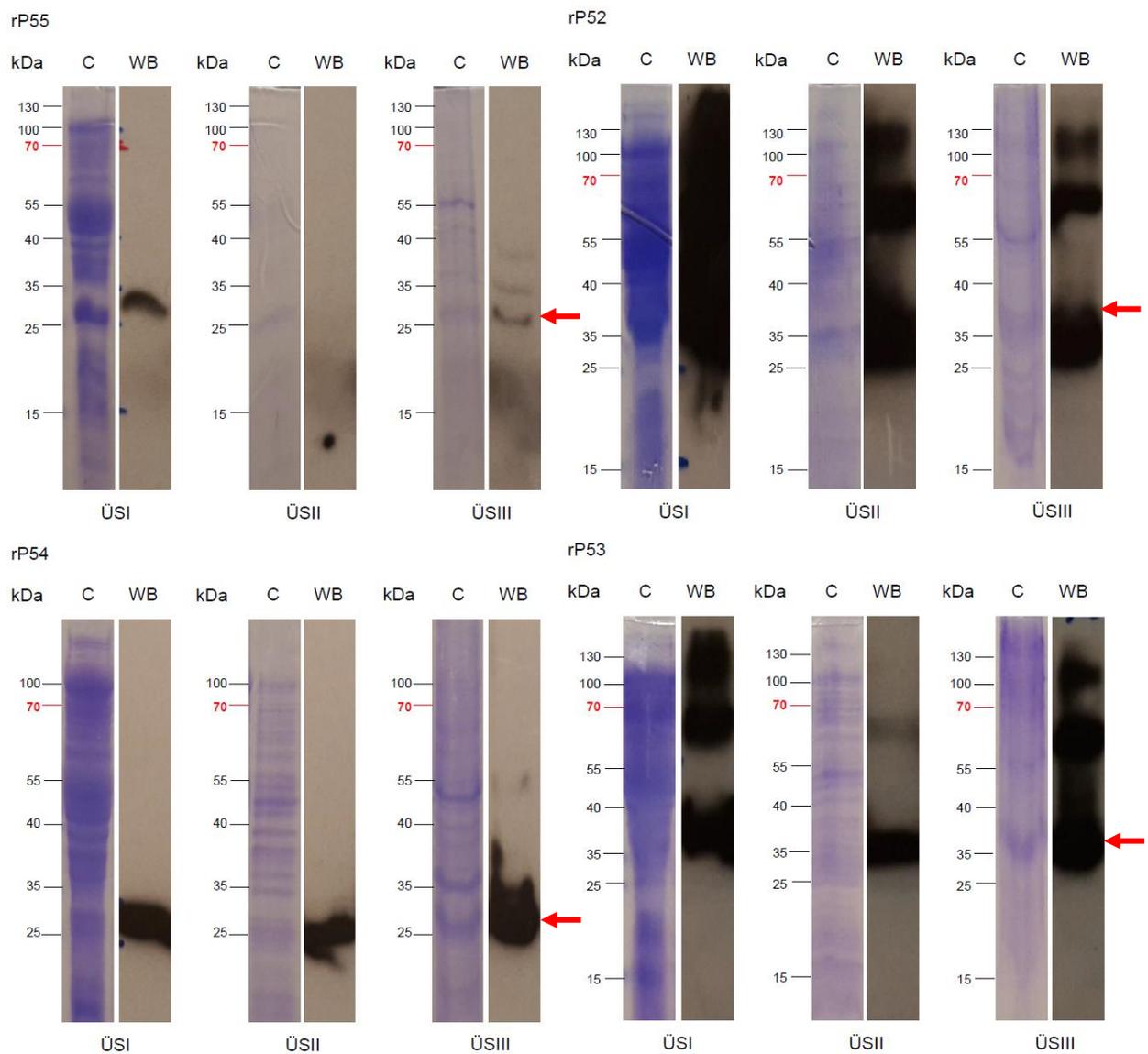


Abbildung 14: DNA-Amplifikate der MAL6P1.252-Domänen aus *P. falciparum* 3D7. M= 1 kb DNA-Marker. A: DNA-Amplifikate nach PCR aus gDNA-Isolaten. Die roten Pfeile markieren die Bande der zu untersuchenden DNA. DBLa0.21 mit 1380 bp, CIDRa2.1 mit 696 bp, DBLβ4 mit 1236 bp, DBLδ1 mit 1317 bp und CIDRb1 mit 519 bp. B: DNA nach Kontrollverdau mit *EcoRI* im TOPO®-Vektor mit 3,9 kb (grüner Pfeil). C: DNA nach Kontrollverdau mit *EcoRI* und *BamHI* in pRSET® mit 2,9 kb (blauer Pfeil).

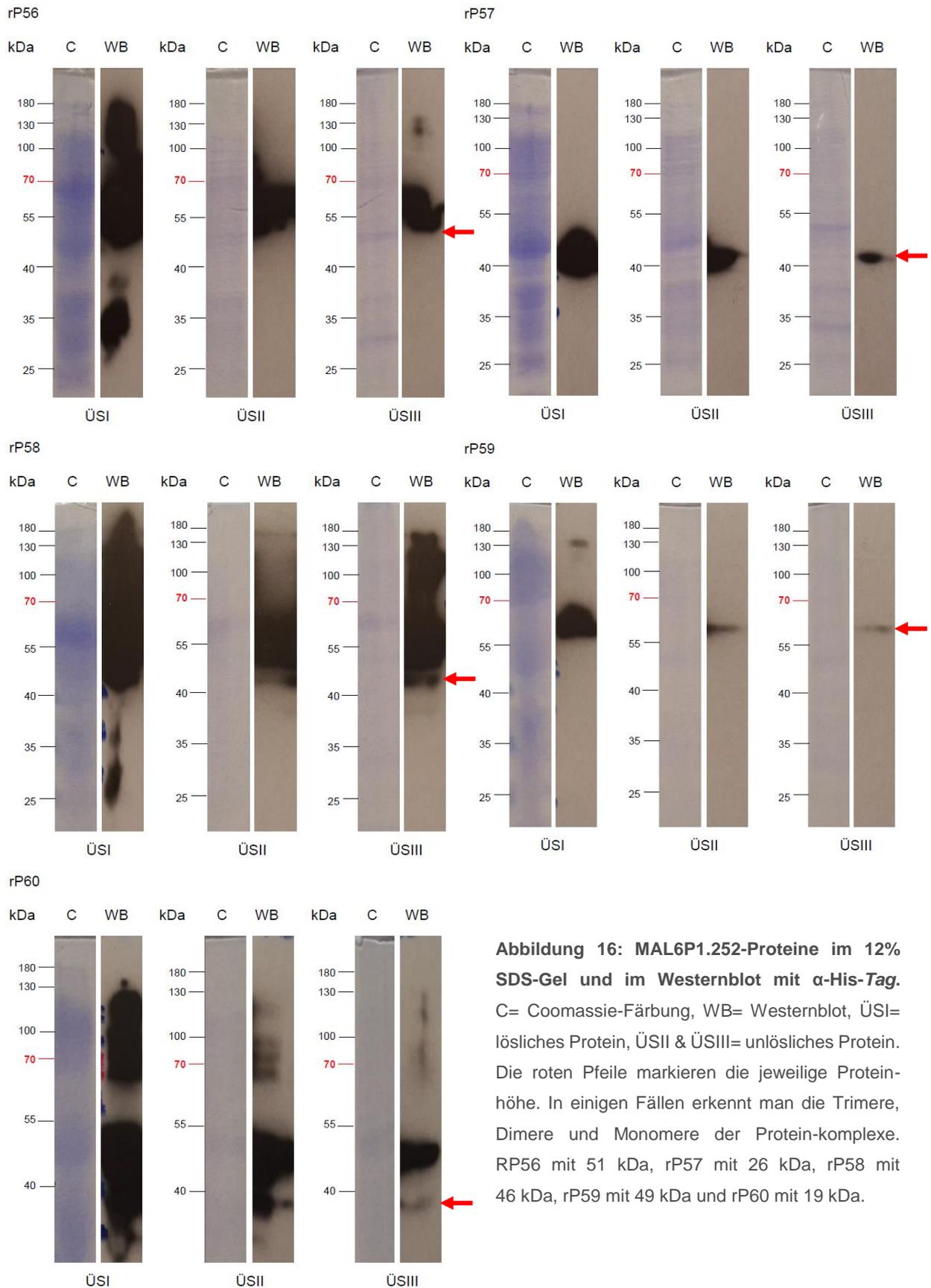
Auch hier sind unter A in Abbildung 14 bei allen 5 Amplifikaten die Banden auf der zu erwartenden Höhe zu erkennen. Bei den kleineren Banden handelt es sich vermutlich um DNA-Fragmente, die aber nicht weiter untersucht wurden. In B und C sind wieder jeweils 2 Banden zu erkennen, wobei es sich bei der kleineren um das jeweilige zu untersuchende DNA-Molekül und der größeren um vermutlich den jeweiligen Vektor handelt.

Wie bereits oben beschrieben wird ein Zellaufschluss durch Ultraschall durchgeführt und dabei die löslichen Proteine (ÜSI) von den unlöslichen (ÜSII und ÜSIII) getrennt. Die rekombinanten Proteine werden sowohl im Polyacrylamidgel als auch im Westernblot analysiert.



**Abbildung 15: VIR-Proteine im Tricin-Gel und im Westernblot mit  $\alpha$ -His-Tag.** C= Coomassie-Färbung, WB= Westernblot, ÜSI= lösliches Protein, ÜSII und ÜSIII= unlösliches Protein. Die roten Pfeile markieren die jeweilige Proteinhöhe. In einigen Fällen erkennt man die Trimere, Dimere und Monomere der Proteinkomplexe. RP55 mit 28 kDa, rP52 mit 38 kDa, rP54 mit 35 kDa und rP53 mit 39 kDa.

### 3. Ergebnisse

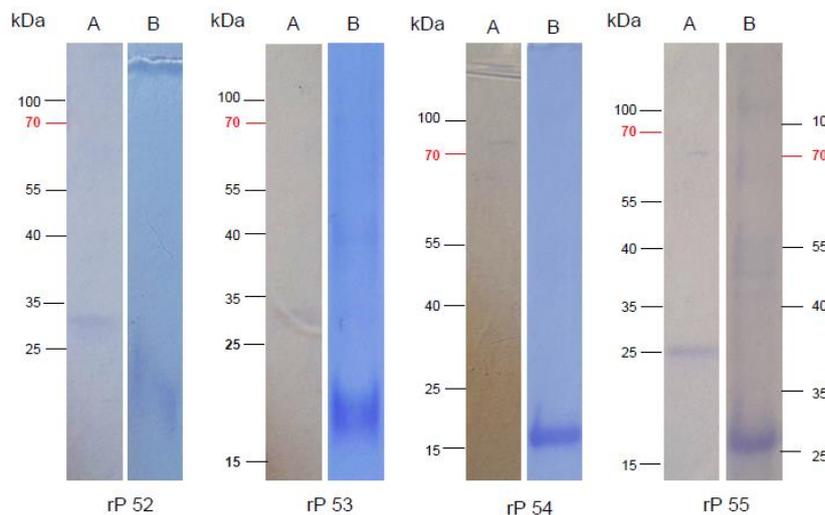


**Abbildung 16: MAL6P1.252-Proteine im 12% SDS-Gel und im Westernblot mit  $\alpha$ -His-Tag.** C= Coomassie-Färbung, WB= Westernblot, ÜSI= lösliches Protein, ÜSII & ÜSIII= unlösliches Protein. Die roten Pfeile markieren die jeweilige Proteinhöhe. In einigen Fällen erkennt man die Trimere, Dimere und Monomere der Protein-komplexe. RP56 mit 51 kDa, rP57 mit 26 kDa, rP58 mit 46 kDa, rP59 mit 49 kDa und rP60 mit 19 kDa.

Abbildung 15 und Abbildung 16 zeigen die SDS- bzw. Tricin-Gele der aufgetragenen Proteinüberstände nach dem Zellaufschluss. Parallel dazu wurde ein Westernblot mit  $\alpha$ -His-Tag durchgeführt, der die POI (*protein of interest*) markieren sollte. Die mit Coomassie gefärbten Gele zeigen eine Vielzahl an unerwünschten Banden, die in weiteren Schritten entfernt werden müssen. Betrachtet man den Westernblot, der nur das POI detektiert hat, kann von einer erfolgreichen Proteinexpression ausgegangen werden. In einigen Fällen sieht man Banden der Monomere, Dimere und Trimere der Proteinkomplexe.

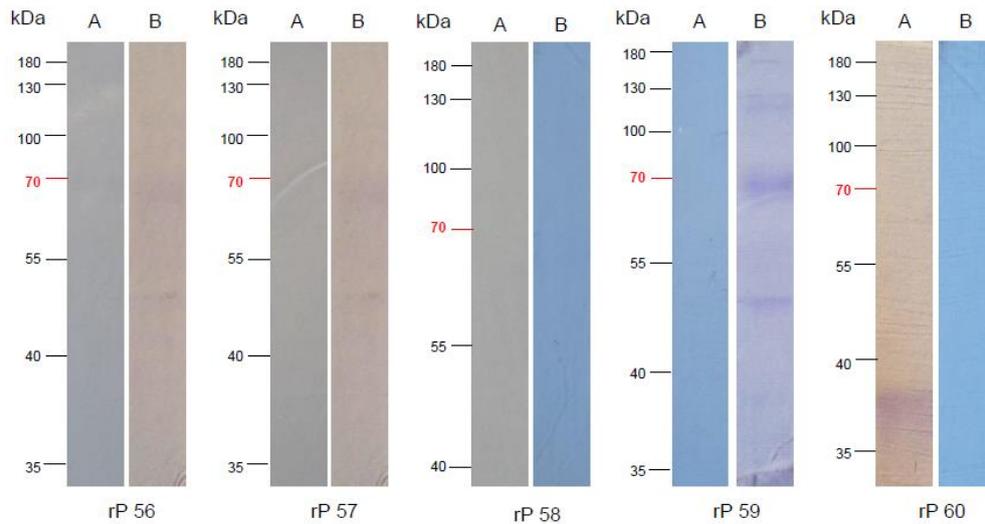
Um die unspezifischen Proteine von den POI zu trennen, werden die Proteinüberstände über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt. Anschließend werden die POI in Fraktionen eluiert, wobei dasselbe Verfahren bezüglich der löslichen und unlöslichen Proteine verwendet wird, jedoch mit unterschiedlichem Puffereinsatz (s. 2.4.4). Die Fraktionen werden wieder auf SDS- bzw. Tricin-Gele aufgetragen.

VIR – Aufgereinigte Proteine



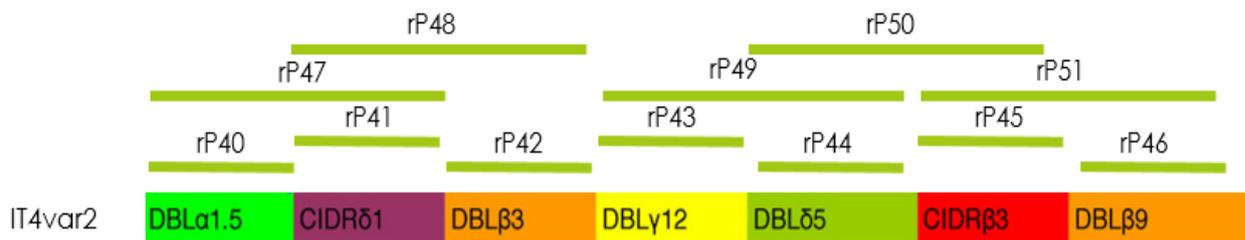
**Abbildung 17: Aufgereinigte Fraktionen von VIR- Proteinen.** A= lösliches rP (ÜSI), B= unlösliches rP (ÜSII+ÜSIII). Dargestellt ist pro rP die stärkste Bande aus dem Gel. Es wurden Tricin-Gele verwendet.

MAL6P1.252 – Aufgereinigte Proteine



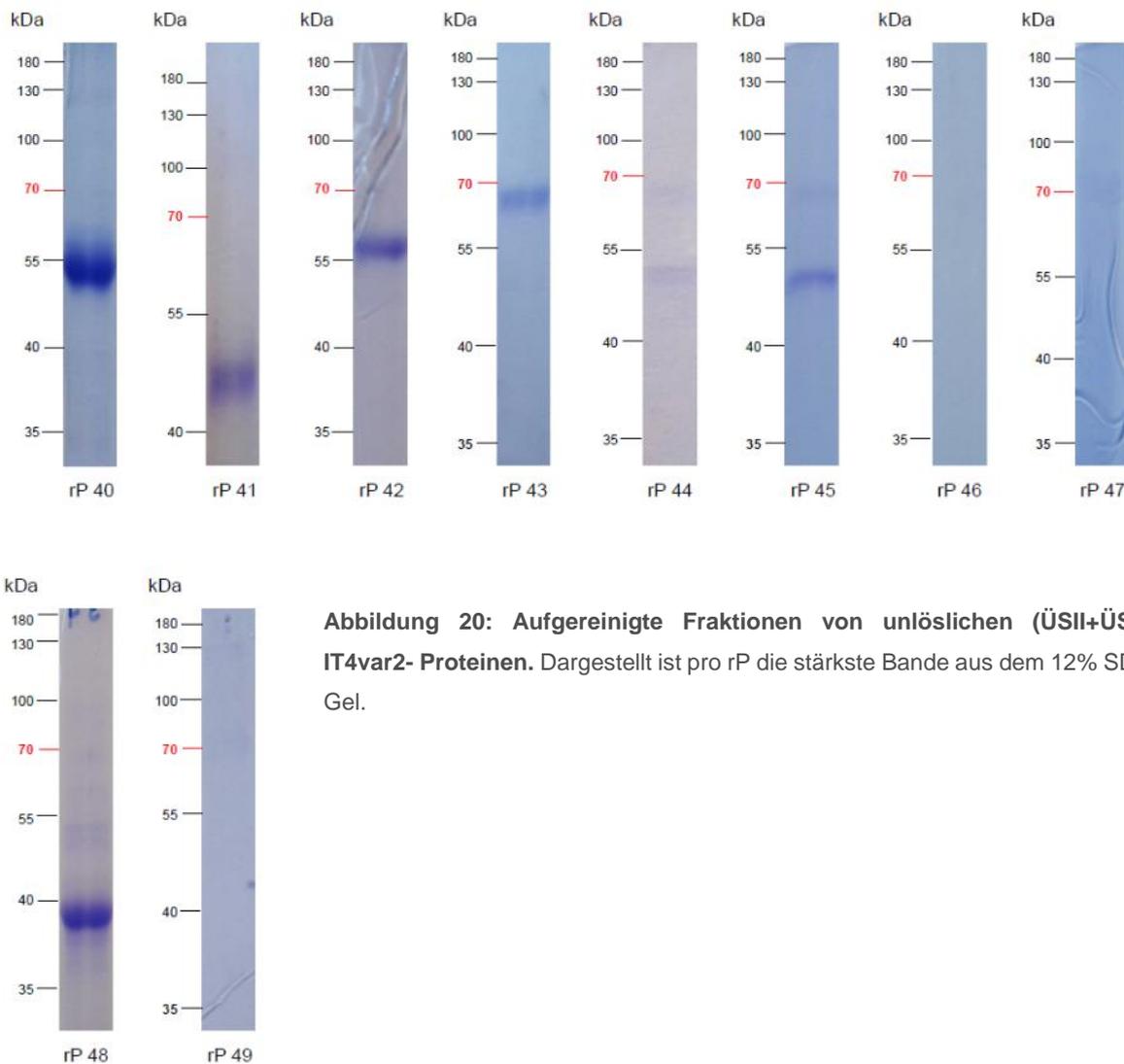
**Abbildung 18: Aufgereinigte Fraktionen von MAL6P1.252- Proteinen.** A= lösliches rP (ÜSI), B= unlösliches rP (ÜSII+ÜSIII). Dargestellt ist pro rP die stärkste Bande aus dem Gel. Es wurden 12% SDS-Gele verwendet.

Die rekombinanten Proteine von IT4var2 waren bereits exprimiert und die Proteine wurden mit den anderen hier in Abbildung 19 aufgeführten rekombinanten Proteinen weiter bearbeitet.



**Abbildung 19: Die untersuchten IT4var2-Domänen aus *P. falciparum* FCR3 mit der Nummerierung der rekombinanten Proteine.**

## IT4var2 – Aufgereinigte Proteine

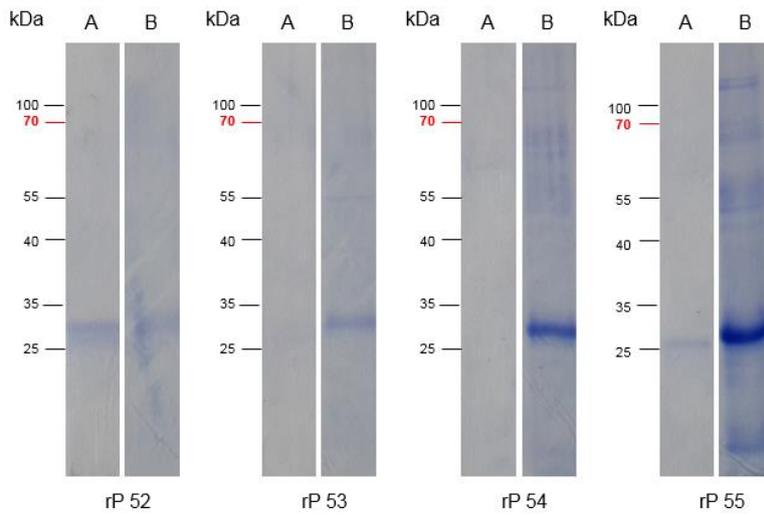


**Abbildung 20: Aufgereinigte Fraktionen von unlöslichen (ÜSII+ÜSIII) IT4var2- Proteinen.** Dargestellt ist pro rP die stärkste Bande aus dem 12% SDS-Gel.

Die in Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 20 dargestellten Proteinfractionen sind teilweise sehr schwach zu erkennen. Dies und die Gefahr der Denaturierung der Proteine durch die hohen Imidazolkonzentrationen im Elutionspuffer führten zum nächsten Schritt, dem Einengen im Dialyseschlauch in PEG 20000 und Entsalzen mittels Größenausschlusschromatographie.

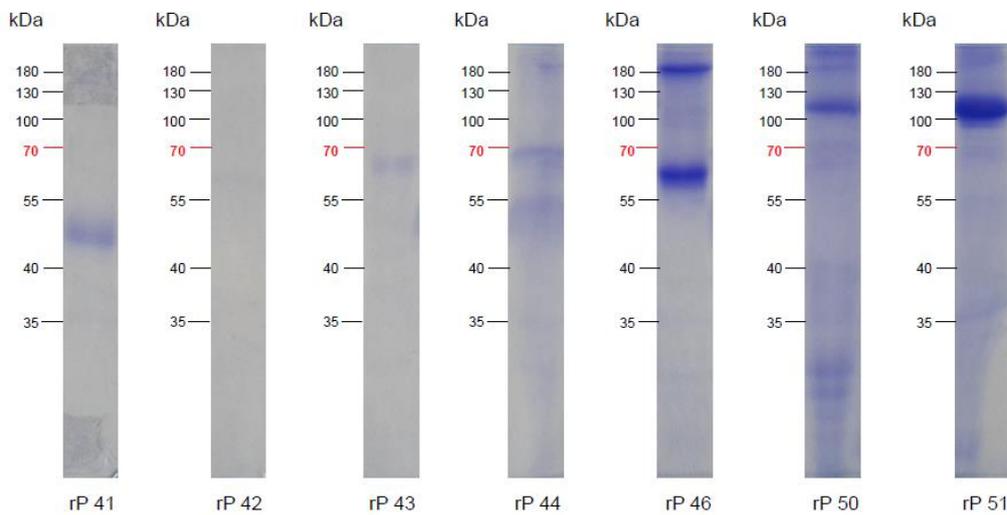
### 3. Ergebnisse

#### VIR – Eingengte Proteine



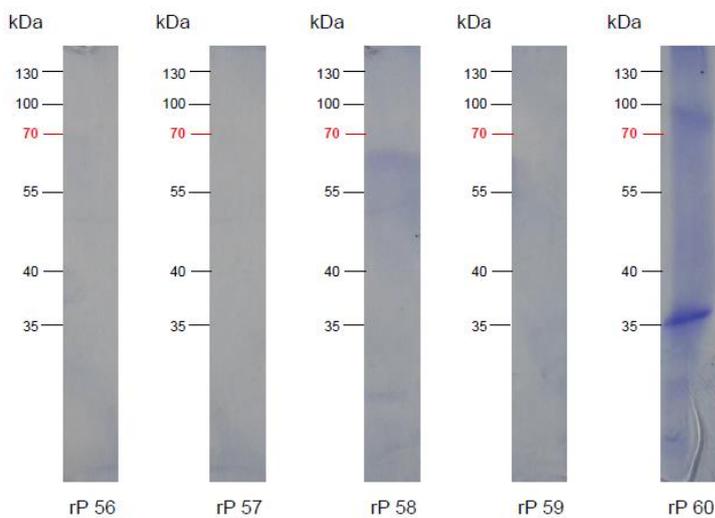
**Abbildung 21: VIR-Proteine, eingengt und entsalzt.** A= lösliches rP (ÜSI), B= unlösliches rP (ÜSII+ ÜSIII). Es wurden Tricin-Gele verwendet.

#### IT4var2 – Eingengte und entsalzte ÜSI – lösliche Proteine



**Abbildung 22: Lösliche IT4var2-Proteine, eingengt und entsalzt.** Es wurden 12% SDS-Gele verwendet.

#### MAL6P1.252 – Eingengte und entsalzte ÜSI – lösliche Proteine



**Abbildung 23: Lösliche MAL6P1.252-Proteine, eingengt und entsalzt.** Es wurden 12% SDS-Gele verwendet.

Die Abbildung 21- Abbildung 23 zeigen, dass die rekombinanten Proteine rP42, rP53, rP54, rP56, rP57 und rP59 nicht mehr vorhanden sind. Eine Erklärung wäre, dass beim Einengen der Proteinsuspension ein großer Teil an der Innenwand des Dialyseschlauchs adsorbierte und somit nicht entnommen werden konnte. Um die genaue Menge der vorliegenden Proteine zu bestimmen, wurde eine Konzentrationsmessung mittels BCA-Reaktion durchgeführt.

**Tabelle 19: Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Reaktion der rekombinanten Proteine (rP) nach Einengung und Entsalzung.**

rP	Konzentration [mg/ml]	rP	Konzentration [mg/ml]
41	0,227	53	0,045
42	0,076	54	0,053
43	0,107	55	0,063
44	0,739	56	0
46	1,357	57	0
50	3,53	58	0,315
51	1,804	59	0
52	0,08	60	0,83

Die Konzentrationsbestimmung bestätigt, dass kein Protein von rP56, rP57 und rP59 mehr vorliegt. Von rP42, rP52, rP53, rP54 und rP55 liegt nur sehr wenig Protein vor und von den restlichen Proteinen sind ausreichende Mengen für die Immunisierung der Mäuse und Gewinnung der Antikörper vorhanden. Die Funktionalität der generierten Antikörper von rP52-rP55 (VIR-Proteine) können anschließend auf den Ausstrichen der *P. vivax*-Patienten getestet werden (s. 2.1.7). Insgesamt wurden 14 Ausstriche im Bearbeitungszeitraum dieser Arbeit angefertigt.

### 3.2. Inhibitionsstudien mittels *Static Binding Assay*

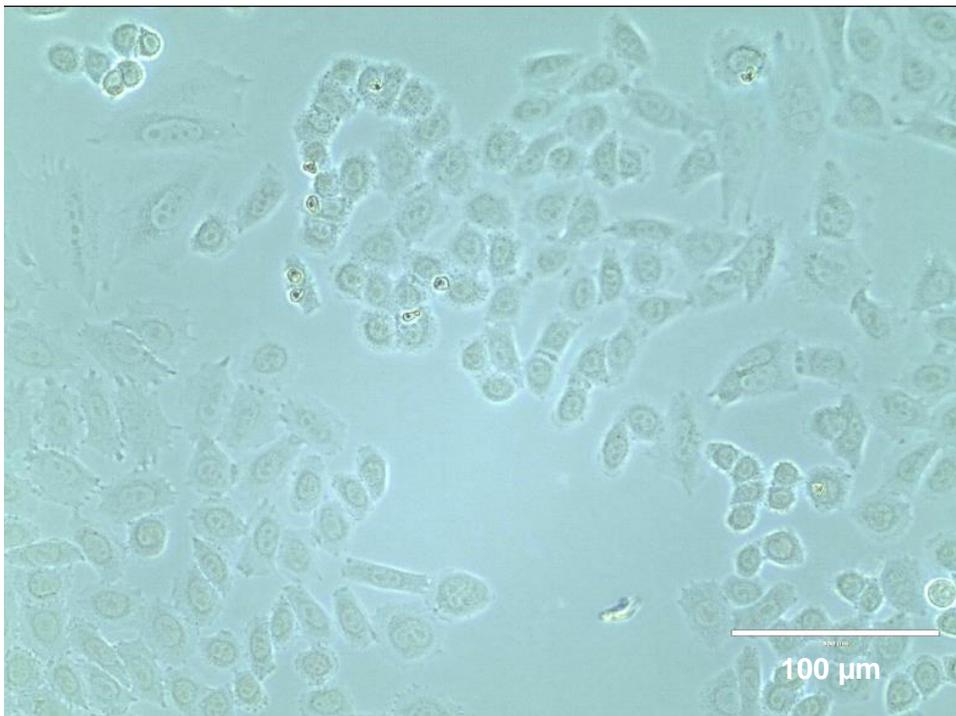
Es sollte die Interaktion von infizierten Erythrozyten an humanen Endothelrezeptoren charakterisiert werden. Insbesondere sind die Bereiche der PfEMP1-Proteine, über die diese Interaktion vermittelt wird, größtenteils unbekannt. Daher sollte mit Hilfe der rekombinanten Proteine, die verschiedene Bereiche spezifischer PfEMP1-Moleküle abdecken, in statischen Bindungsstudien (*Static Binding Assays*), die Bindungsdomänen kartiert werden.

Dafür wurde die unter 2.2.10 beschriebene Methode des statistischen Bindungsassays abgewandelt. Bevor IE zu den CHO-Zellen in der 24-Well-Platte hinzugefügt werden, erfolgt ein Inhibitionsschritt mittels rekombinanter Proteine. Diese werden mit 100 µg Protein in 500 µl Puffer pro Kavität auf die CHO-Zellen aufgetragen und für 60 min bei 37°C inkubiert. Diese sollen mögliche Bindungsstellen der PfEMP1-Moleküle eingrenzen.

Da sich die rekombinanten Proteine in *Plasmodium*-PBS befinden, der Bindungsassay jedoch mit CHO-PBS durchgeführt wird, sollte im ersten Versuch untersucht werden, ob die leichten Konzentrationsabweichungen im Salzgehalt des *Plasmodium*-Puffers einen Einfluss auf die CHO-Zellen und somit auf das Bindungsergebnis haben.

Dafür wurde im Dreifachansatz, wie im Protokoll des *Static Binding Assays* vorgeschrieben, pro Kavität 500 µl IE in Bindungsmedium auf die CHO-Zellen gegeben und für 60 min bei 37°C inkubiert. Parallel dazu wurden zunächst 250 µl einer 1:2 Mischung von Bindungsmedium und *Plasmodium*-PBS für 30 min bei 37°C zu den CHO-Zellen gegeben. Anschließend wurden ebenfalls für 60 min bei 37°C 250 µl IE in Bindungsmedium mit den CHO-Zellen inkubiert.

Als zu untersuchender Rezeptor wurde CD9 ausgewählt und CD36 diente als Positivkontrolle. CHO-GFP wurde verwendet, um unspezifische Bindungen ermitteln zu können. *P. falciparum* FCR3 wurde 1-mal Angereichert (s. 2.2.9) und wies zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung eine Parasitämie von 8% auf. Abbildung 24 zeigt die IE nach einem *Panning* mit CHO-CD9.



**Abbildung 24: FCR3-CD9 nach einer Anreicherung an CHO-Zellen.** Vergrößerung 10 x 40, Maßstab 100 µm. Zu erkennen sind die kleinen dunklen infizierten Erythrozyten, die an die großen CHO-CD9-Zellen gebunden haben.

Bei der Auswertung des ersten Bindungsversuches wurde festgestellt, dass überdurchschnittlich viele IE gebunden hatten. Diese waren teilweise nicht an CHO-Zellen gebunden, sodass ein Durchführungsfehler vermutet wurde. Aus zeitkritischen Gründen konnte kein weiterer Versuch durchgeführt werden.

### 3.3. IFAs von Transfektanten

Von den beiden hier untersuchten Arten, *P. falciparum* und *P. vivax*, kann nur die erste in Kultur gehalten werden. *P. vivax* ist stark limitiert, da es Retikulozyten infiziert, dies aber nur sehr schwer *in vitro* umsetzbar ist (Udomsangpetch, Kaneko, Chotivanich, & Sattabongkot, 2008).

Es wurden 3 *vir*-Moleküle *vir5*-, *vir9*- und *vir14* ausgewählt, die 3 *P. vivax* VIR-Unterfamilien abdecken und in *P. falciparum* 3D7 exprimiert. Es sollte durch Aufnahme einer Zeitreihe, die den Transportweg eines Proteins während der parasitären Entwicklung zeigt, untersucht werden, wohin die exprimierten VIR-Proteine transportiert werden.

Die Transfektanten wurden bis zu einer Parasitämie von ca. 5% kultiviert (s. 2.2.1), 2-mal synchronisiert, zur Gewährleistung des gleichen Entwicklungsstadiums (s. 2.2.5) und Ausstriche von 3 Zeitpunkten mit frühen Trophozoiten (26 hpi), späten Trophozoiten (34 hpi) und Schizonten (46 hpi) angefertigt (s. Abbildung 25).



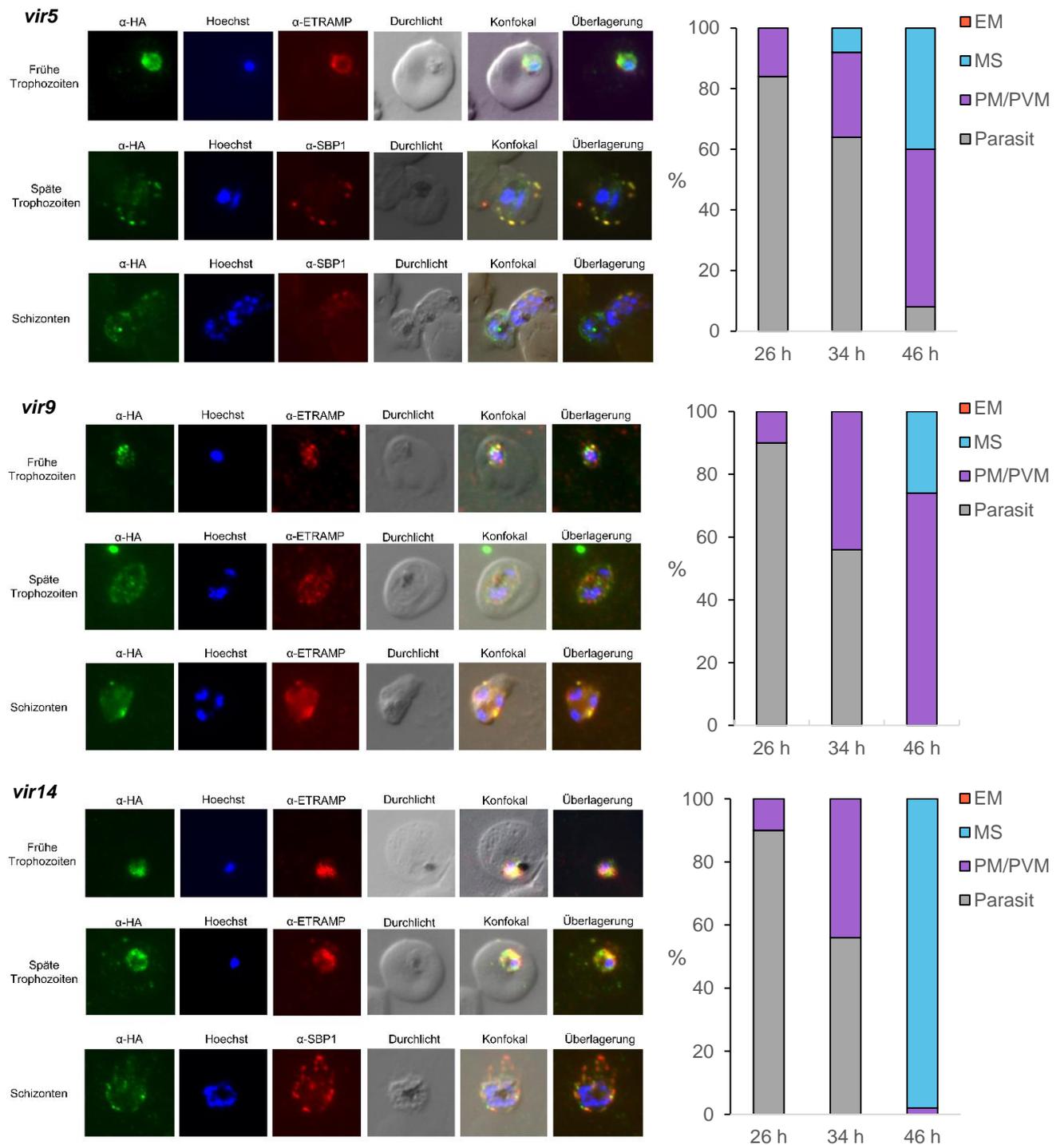
Abbildung 25: Aufnahme der Zeitreihe

Das entsprechende VIR-Protein wird als Fusionsprotein gekoppelt an einen HA-Tag vom *Plasmodium* synthetisiert. Somit kann das VIR-Protein mit Hilfe eines gegen den HA-Tag gerichteten Antikörpers detektiert werden. Durch Verwendung eines zweiten Primärantikörpers, der gegen spezifische Zellbestandteile gerichtet ist, kann eine Kolokalisation unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt werden (s. 2.1.4). Dadurch kann die Position des angefärbten Proteins in der Zelle im IFA analysiert werden.

Zur Quantifizierung wurden 50 IE pro Zeitpunkt und Transfektante ausgezählt. Dabei wurden nicht leuchtende IE von der Auszählung ausgeschlossen. Für die Einordnung wurde die Lokalisation des angefärbten Proteins mit HA-Tag und des angefärbten subzellulären Bereichs bestimmt. Dabei wurde zwischen dem Parasiten, der parasitophoren Vakuole (PV) bzw. parasitophoren Vakuolenmembran (PVM), den Maurer'schen Spalten (MS) und der Erythrozytenmembran (EM) unterschieden.

Um den Transportweg des Proteins im Erythrozyten nachverfolgen zu können, wurden die PVM mit  $\alpha$ -ETRAPM, die MS mit  $\alpha$ -SPB1 und die EM mit  $\alpha$ -Spektrin lokalisiert. Die Färbung der EM hat aus unbekanntem Gründen in allen Ausstrichen nicht funktioniert, die Färbung der PVM und MS nur teilweise. Dadurch konnte nicht immer eine bestätigende Kolokalisation ausgewertet werden.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 26: IFAs der Transfektantenzitreihe von *vir5*, *vir9* und *vir14*.** 100x/1.4 Öl mit Immersionslinse. Standardkultivierung für *P. falciparum* 3D7 mit Verwendung von WR99210 für Transfektanten. Primäntikörper waren  $\alpha$ -HA (1:100; 488 nm),  $\alpha$ -ETRAPM (1:400; 559 nm),  $\alpha$ -SBP1 (1:1000; 559 nm) und  $\alpha$ -Spektrin (1:200; 559 nm), die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst (1:1000; 408 nm). Links: Darstellung der IE mit spezifischer Immunfluoreszenz-Färbung, DNA-Färbung sowie Durchlicht und die Überlagerung der konfokalen und fluoreszierenden Aufnahmen. Rechts: Quantitative Angabe der 50 ausgezählten IE. Nicht mit  $\alpha$ -HA detektierten Zellen wurden von der Auszählung ausgeschlossen. EM= Erythrozyten Membran, MS= Maurer'sche Spalten, PM/PVM= Parasitophore Vakuole/ Parasitophore Vakuolenmembran.

Es wird ein Proteintransport vermutet, der im Parasiten beginnt und im frühen Trophozoiten in der PV/PVM ( $\alpha$ -ETRAMP) lokalisiert wird. Im weiteren Verlauf soll das Protein im späten Trophozoiten in den MS ( $\alpha$ -SPB1) oder sogar schon an der EM ( $\alpha$ -Spektrin) zu lokalisieren sein. Spätestens im Schizonten sollten die rekombinanten Proteine auf der EM präsentiert werden. Da die Kolokalisation nicht immer funktioniert hat, konnte nicht immer eindeutig erkannt werden, wo das Protein genau lokalisiert ist. Besonders die Differentiation zwischen den MS und der EM ist ohne Kolokalisation sehr schwierig.

Die *vir5*-Transfektante zeigt im frühen Trophozoitenstadium hauptsächlich eine Proteinlokalisierung im Parasiten, die später in den MS zu erkennen ist. Dies sieht man sehr deutlich in der oberen Abbildung 26 in der Kolokalisation von  $\alpha$ -HA und  $\alpha$ -SPB1. Die Färbung im Schizonten zeigt ebenfalls eine Kolokalisation in den MS. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Protein nicht nach Außen transportiert wird, jedoch würde eine Kolokalisation mit  $\alpha$ -Spektrin mehr Aufschluss darüber geben. Die Quantifizierung zeigt in der zeitlichen Abfolge ein Absinken der VIR5-positiven Signale im Parasiten und ein Ansteigen in den MS sowie eine Verdreifachung in der PV/PVM. Dies könnte als erfolgreicher Proteintransport vom Parasiten über die PVM bis in die MS ausgewertet werden.

Besonders bei den *vir9*-Ausstrichen hat nur die Färbung mit  $\alpha$ -ETRAMP funktioniert. In den frühen Trophozoiten lokalisiert VIR9 im gesamten Parasiten. In den späten Trophozoiten ist noch keine Kolokalisation von  $\alpha$ -HA und  $\alpha$ -ETRAMP zu erkennen, dies wird erst in den Schizonten sichtbar. Die quantifizierten Daten zeigen einen Übergang der Proteinlokalisierung vom Parasiten in die PV/PVM. Vermutlich wird kein VIR9 an die EM transportiert.

VIR14 zeigt im frühen Trophozoitenstadium eine eindeutige Proteinlokalisierung im Parasiten, im späten Trophozoiten lokalisiert VIR14 in der PV/PVM. In den Schizonten zeigt sich eine drastische Verschiebung des lokalisierten Proteins in die MS. Hier sieht man in der Abbildung, dass das typische MS-Muster mit  $\alpha$ -HA zu erkennen ist, jedoch keine Kolokalisation mit  $\alpha$ -SBP1 vorliegt, das Protein sich also nicht in den mit  $\alpha$ -SBP1 lokalisierten MS befindet. Dies legt die Vermutung nahe, dass es u.U. an die EM transportiert wurde, jedoch fehlt eine Bestätigung mit  $\alpha$ -Spektrin an dieser Stelle.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei Projekte parallel bearbeitet. Im Ersten sollten zwei Bereiche der PfEMP1-Proteine rekombinant exprimiert und die Bindungsfähigkeit der einzelnen Domänen an CD9 kartiert werden. Im zweiten Projekt wurden einerseits, mittels rekombinanter VIR-Proteine Antikörper generiert, um in Bindungsstudien charakterisiert zu werden und andererseits *vir*-Genome in *P. falciparum* exprimiert, um den Proteintransport im IE durch Aufnahme einer Zeitreihe nachverfolgen zu können.

### 4.1. Rekombinante PfEMP1-Proteine

In vorangegangenen Studien wurden die MAL6P1.252- und IT4var2-Proteine des PfEMP1-Moleküls als putative Bindungspartner an CD9 und P-Selektin identifiziert (Tilly, Dissertation, 2015; Tilly, Metwally, & Bruchhaus, unveröffentlichte Daten; Esser, et al., 2014). Jedoch ist noch nicht bekannt welche Domänen dieser PfEMP1-Bereiche die entsprechenden Bindungen vermitteln. Dies sollte hier untersucht werden.

Durch Klonierung in einen Expressionsvektor, rekombinante Expression einzelner Bindungsdomänen der MAL6P1.252- und IT4var2-Bereiche und anschließende Inhibitionsstudien, sollte deren Bindungsfähigkeit zunächst an CD9 kartiert werden. Parallel zu den Inhibitionsstudien wurden mittels der rekombinanten Proteine Antikörper generiert, die ebenfalls in den Inhibitionsversuchen Anwendung finden sollten. Aus zeitkritischen Gründen konnten die polyklonalen Antikörper nicht mehr auf deren Funktionalität getestet werden.

Die Schritte bis zur Proteinexpression zeigen, dass die amplifizierte DNA-Abschnitte erfolgreich sowohl in den TOPO®- als auch anschließend in den pRSET®-Vektor kloniert wurden. Ferner identifiziert die Immundetektion mittels Westernblot die erfolgreich rekombinant exprimierten MAL6P1.252-Proteine.

Beim Aufbereiten der Proteine zur Antikörpergenerierung konnten nach den Schritten der Aufreinigung, Einengung und Entsalzung 3 der MAL6P1.252-Proteine weder im Gel, noch mittels BCA-Reaktion detektiert werden. Zur Kontrolle der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie wurden die gewonnenen Proteinfractionen auf SDS-Gele aufgetragen. Dort konnte die Anwesenheit aller 5 MAL6P1.252-Proteine nachgewiesen werden.

Die anschließende Einengung im Dialyseschlauch diente als Zwischenschritt zur Entsalzung mittels Größenausschlusschromatographie. Die Proteinsuspensionen wurden gemäß des Entsalzungsprotokolls (s. VI.f) auf ein Volumen von  $\leq 2,5$  ml eingeeengt und direkt auf die PD-10-Säule gegeben. Erst im Anschluss an die Entsalzung wurden wieder die gewonnenen Proteinfractionen in SDS-Gele kontrolliert. Dort konnten nur noch 2 MAL6P1.252-Proteine detektiert werden.

Zur Kontrolle wurde der Durchfluss nach der Säulenreinigung ebenfalls auf ein SDS-Gel aufgetragen, was keine Anwesenheit von Proteinen zeigte. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass sich die Proteine noch im Säulenbett befanden. Somit wurden die Proteine vermutlich im Einengungsschritt mittels Dialyseschlauch verloren.

Es wäre möglich, dass ein Großteil der Proteine an den Innenwänden des Dialyseschlauchs adsorbierte. Dadurch wurde ein so geringer Teil im eingengten Volumen aufgenommen, dass es im SDS-Gel nicht mehr sichtbar angefärbt werden konnte und unterhalb des Kalibrierbereichs der BCA-Reaktion lag. Eine Alternative zum Dialyseschlauch, wie beispielsweise Zentrifugen Filter, könnten eingesetzt werden, wenn das Volumen der Proteinaufschlüsse unter der maximal empfohlenen Menge von 15 ml bleibt. Dies wäre mit Einschränkungen im Proteinaufschluss durchführbar. Eine andere Möglichkeit wäre, den hier eingesetzten Expressionsansatz von 1,5 l zu erhöhen. Auf diese Weise würden Proteinverluste in den Aufreinigungsschritten nicht so stark hervortreten.

Um die Bindungsfähigkeit der verbliebenen rekombinanten MAL6P1.252- und IT4var2-Proteine zu untersuchen, wurde ein Inhibitionsversuch etabliert, der auf den Grundlagen eines statischen Bindungsassays beruht. Dabei dient CD36 als Überprüfung der Funktionalität des Assays, da von diesem Rezeptor bereits bekannt ist, dass die meisten IE daran binden (Barnwell, et al., 1989; Craig, Khairul, & Patil, 2011; Rowe, Claessens, Corrigan, & Arman, 2009; Tilly, Dissertation, 2015).

Zur Etablierung des Inhibitionsversuchs sollte zunächst ein Puffertest vorangehen, der einen negativen Einfluss des verwendeten *Plasmodium*-Puffers auf den Assay ausschließen sollte. Aufgrund technischer Probleme konnte dieser am Ende nicht ausgewertet werden. Vermutlich wurden die Waschschritte nicht sorgsam genug durchgeführt, sodass überdurchschnittlich viele IE auf den *cover slips* verblieben sind. Es konnte unter dem Mikroskop nicht erkannt werden, ob die auszählenden IE an den CHO-Zellen gebunden haben oder frei vorlagen. Eine Wiederholung des Versuchs war aus zeitkritischen Gründen nicht mehr möglich.

Wenn dieser Versuch gezeigt hätte, dass der *Plasmodium*-Puffer inhibitorisch auf die CHO-Zellen wirkt, hätten alle rekombinanten Proteine in CHO-Puffer umgepuffert werden müssen. Ansonsten hätte im nächsten Assay vor der Zugabe der IE ein weiterer Inkubationsschritt mit den rekombinanten Proteinen eingefügt werden müssen. Die Proteine hätten u.U. mögliche Bindungsstellen blockiert, sodass keine IE daran binden können. Auf diese Weise könnte man die noch gebundenen IE auszählen und so daraus schließen welche Bindungsdomänen von MAL6P1.252 und IT4var2 an CD9 binden.

## 4.2. Rekombinante VIR-Proteine

Aufgrund des mildereren Verlaufs einer *P. vivax*-Malaria lag bis jetzt der Forschungsschwerpunkt deutlich mehr auf dem verwandten und häufig tödlich verlaufendem Infekt mit *P. falciparum*. Jedoch rückt *P. vivax* immer mehr in den Fokus der Untersuchungen. Ein wichtiger Grund ist, dass der Parasit weitreichend verbreitet ist und wesentlich mehr Menschen damit infiziert sind als mit *P. falciparum* (Singh, Gupta, & Pande, 2014). Ein weiterer Grund ist, dass neuste Erkenntnisse darauf schließen lassen, dass *P. vivax* ebenso wie *P. falciparum* zur Zytoadhäsion fähig ist und somit ebenfalls zu einer schweren Malaria führen könnte (Lopes, et al., 2014; Quispe, et al., 2014).

Es wird angenommen, dass einige der 346 *vir*-Gene Proteine exprimieren, die an die Oberfläche der IE transportiert werden, um eine Schlüsselrolle bei der Zytoadhäsion der Schizonten einnehmen zu können (Lopes, et al., 2014). Jedoch ist über die Funktionen der exprimierten VIR-Proteine noch nicht viel bekannt (Singh, Gupta, & Pande, 2014).

Da eine *in vitro*-Kultivierung von *P. vivax* nicht auf Dauer möglich ist, wurde diese Annahme bis jetzt nur mittels *P. falciparum*-Transfektanten, die spezifische VIR-Proteine exprimieren, untersucht (Udomsangpetch, Kaneko, Chotivanich, & Sattabongkot, 2008; Bernabeu, et al., 2012). Allerdings sind diese Modelle nicht vorbehaltlos auf natürliche *P. vivax*-Infektionen übertragbar und es ist bis heute nicht bekannt welche Proteine von *P. vivax* tatsächlich an die Oberfläche der IE transportiert werden.

Dies führte zu der Studie in der Vertreter von *vir*-Unterfamilien der VIR-Proteine über die Klonierung in einen Expressionsvektor, rekombinant exprimiert wurden. Mit Hilfe der 4 rekombinanten Proteine wurden anschließend Antikörper generiert. Parallel dazu wurden insgesamt 14 Blutaussstriche von *P. vivax*-Patienten angefertigt. Im nächsten Schritt kann mittels der polyklonalen Antikörper auf den *P. vivax*-Ausstrichen über die Antigen-Antikörper-Bindung analysiert werden, welche VIR-Moleküle an die Zelloberfläche der IE transportiert werden.

Dieses vielversprechende Projekt kann mit den fertig generierten Antikörpern und einer großen Anzahl an Blutaussstrichen fortgeführt werden. Es wird interessant zu sehen sein, ob und welche Bindungen analysiert werden können. Einerseits sind in *P. vivax*-Blutproben alle parasitären Stadien vertreten, sodass die Wahrscheinlichkeit spätere Entwicklungsstadien wie Trophozoiten und Schizonten, die die putativen VIR-Proteine auf der Zelloberfläche präsentieren, zu binden, relativ hoch sein kann (Bernabeu, et al., 2012; Lopes, et al., 2014).

Andererseits ist die Parasitämie in *P. vivax*-Patienten durch die selektive Infizierung von Retikulozyten in den meisten Fällen nicht sehr hoch (Miller, Baruch, Marsh, & Doumbo, 2002). Dazu kommt, dass *P. vivax* synchron verläuft und die meisten Patienten in der Fieberphase

ärztliche Hilfe aufsuchen. In dieser Phase infizieren die Parasiten im Merozoitenstadium neue Wirtszellen, sodass sich in Blutproben hauptsächlich frühe Entwicklungsstadien befinden (Kochar, et al., 2005; Miller, Baruch, Marsh, & Doumbo, 2002; Quispe, et al., 2014).

Es ist somit nicht klar, welche Daten und Ergebnisse aus diesem Projekt gewonnen werden können. Jedoch wäre es ein großer Fortschritt einen Hinweis zu erhalten ob eines der 4 VIR-Proteine auf die Zelloberfläche des IE transportiert wird und so u.U. eine Rolle in der Zytoadhäsion einnehmen könnte.

#### 4.3. Rekombinante VIR-Proteine aus *P. falciparum*-Transfektanten

Bis heute konnte keine *in vitro*-Kultivierungsmethode für *P. vivax* etabliert werden, die eine Kultivierungsdauer ermöglicht, um eine hohe und bearbeitungsfähige Parasitämie zu erhalten (Udomsangpetch, Kaneko, Chotivanich, & Sattabongkot, 2008). Um untersuchen zu können, ob und welche VIR-Proteine an die Zelloberfläche transportiert werden, gibt es die Möglichkeit die ausgewählten *vir*-Gene in *P. falciparum* exprimieren zu lassen (Bernabeu, et al., 2012).

Der gesamte Versuch wurde an Bernabeu et al. angelehnt, in dem *vir*-Genome in *P. falciparum* 3D7 transfiziert wurden. Dort konnte gezeigt werden, dass VIR14 in Schizonten an der EM lokalisiert wurde. Interessanterweise wurde das Protein aber nicht wie üblich mittels SBP1 über die MS auf die Zelloberfläche transportiert. Vielmehr wurde vermutet, dass der Transport durch die in *vir14* enthaltene J-Domäne vermittelt wird. Deren Proteine sind in der Lage unabhängig von den MS Proteine im IE zu transportieren. Die Lokalisation von VIR14 auf der EM wurde mittels Immunelektronen Mikroskop und Bindungsstudien bestätigt (Bernabeu, et al., 2012).

Im Labor Bruchhaus wurden 3 *P. falciparum*-Transfektanten hergestellt, die über die gleichen *vir*-Gene verfügten, wie die rekombinant exprimierten VIR-Proteine. Die 3 ausgewählten Proteine VIR5, VIR9 und VIR14 wurden in *P. falciparum* 3D7 exprimiert und deren Transportweg im IE mittels IFAs nachverfolgt.

Zur Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit wurde VIR14 in diesem Versuch mitgeführt. Es konnte bestätigt werden, dass keine Kolo-kalisation von  $\alpha$ -SBP1 und  $\alpha$ -HA vorliegt und das Protein somit nicht in den MS lokalisiert ist. Allerdings konnte aufgrund technischer Probleme keine EM-Färbung mit  $\alpha$ -Spektrin ausgewertet werden. Somit konnte nicht gezeigt werden, dass VIR14 an die Zelloberfläche transportiert wird. Eine Möglichkeit dies nachzuholen wäre, die generierten polyklonalen *vir14*-Antikörper zur Detektion des Proteins auf der Zelloberfläche einzusetzen.

Eine Ursache für die nicht auswertbare Färbung kann nur in unsachgemäß ausgeführten Waschschritten bei der Anfertigung der IFAs vermutet werden. Da die eingesetzten Antikörper bereits mehrfach in den hier angegebenen Konzentrationen getestet und verwendet wurden (Bachmann, et al., 2015).

Mit VIR9 konnte kein Transport aus der PV heraus detektiert werden. Zwar wurde in 25% eine Lokalisation in den MS erkannt, dies könnten aber auch unspezifische  $\alpha$ -HA-Bindungen sein. Es wurde leider keine 3D7-Kontrolle mitgeführt, die ein Maß der unspezifischen Antikörperbindungen geliefert hätte. Für den Transport des Proteins aus der PV in den IE ist das im Transfektanten-Genom enthaltene PEXEL (*Plasmodium export element*)-*motif* verantwortlich (Hiller, et al., 2004). Die Färbung mit  $\alpha$ -ETRAMP bestätigt, dass VIR9 in der PVM kolokalisiert ist (Spielmann, Ferguson, & Beck, 2003). Ein abwesendes oder fehlerhaftes PEXEL-*motif* könnte eine mögliche Erklärung für den Verbleib von VIR9 in der PVM sein.

Die Kolokalisation von  $\alpha$ -HA und  $\alpha$ -SBP1 in VIR5 zeigt, dass das Protein in die MS, aber nicht auf die Zelloberfläche transportiert wird. Da das MS-Protein SBP1 eine wichtige Rolle im Proteintransport in den IE auf die Zelloberfläche einnimmt (Cooke, et al., 2006) aber nicht bekannt ist ob VIR5 tatsächlich auf der EM präsentiert wird, ist unklar ob der Transport korrekt abgelaufen ist. Allerdings könnte u.U. eine Wiederholung des Versuchs das Ergebnis reproduzieren und somit die Korrektheit bestätigen.

Weiterhin sollten diese Daten mit den Ergebnissen verglichen werden, die in den Bindungsstudien mit den generierten Antikörpern der rekombinant exprimierten VIR-Proteine und den Blutaussstrichen von *P. vivax*-Patienten ermittelt werden. Diese können Aufschluss darüber geben ob VIR14 tatsächlich auf die Zelloberfläche transportiert wird und VIR5 und VIR9 in den IE verbleiben.

Durch einen Vergleich beider Methoden könnten so auch Rückschlüsse auf das *P. falciparum*-Transfektantenmodell gezogen werden. Denn es ist noch unklar ob beide *Plasmodium*-Arten über gleichartige Transportwege verfügen und ob diese übertragbar sind. Denn es könnte ein denkbares Problem sein, dass die Expression von VIR-Proteinen in *P. falciparum* anders verläuft und somit nicht mit natürlichen *P. vivax*-Infektionen verglichen werden kann.

Sollte sich zeigen, dass *P. falciparum*-Transfektanten einen vergleichbaren Proteintransport aufweisen, können in weiteren Studien Inhibitionsversuche mit der hier etablierten Methode durchgeführt werden. So können zusätzlich zu ICAM-1 und CSA (Lopes, et al., 2014) weitere humane Endothelrezeptoren an die *P. vivax* bindet, identifiziert werden, um so u.U. ein besseres Verständnis über den Erreger und dessen Zytoadhäsionsmechanismus zu erhalten.

## Zusammenfassung

Die Pathogenität des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* beruht unter anderem auf dessen Fähigkeit zur Zytoadhäsion. Durch die Expression parasitärer Proteine in den infizierten Erythrozyten (IE) und deren Transport an die Wirtszelloberfläche ist er in der Lage an humanen Endothelrezeptoren der Blutgefäße zu binden und so der Eliminierung über die Milz zu umgehen. Die Fähigkeit zur Zytoadhäsion der weniger letalen humanpathogenen Art *Plasmodium vivax* wird erst seit kurzer Zeit angenommen und ist noch kaum untersucht.

Bisher sind ca. 22 Endothelrezeptoren als Interaktionspartner für mit *P. falciparum* IE bekannt. Für 7 von ihnen wurden Mitglieder der PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1)- Familie als Liganden identifiziert. Ebenfalls konnte für einige dieser Rezeptoren die Bindungsdomäne auf Seiten der PfEMP1-Moleküle lokalisiert werden. In noch unveröffentlichten Studien der Laborgruppe Bruchhaus am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM) konnten vor kurzem für die Endothelrezeptoren CD9 und P-Selektin ebenfalls PfEMP1-Moleküle (IT4var2 und MAL6P1.252) als Liganden nachgewiesen werden. Allerdings sind hier die bindungsvermittelnden Bereiche noch nicht charakterisiert. Um die entsprechenden Bindungsdomänen zu identifizieren, sollten die einzelnen Proteindomänen der PfEMP1-Moleküle in löslicher Form rekombinant exprimiert und gereinigt werden, um anschließend in Inhibitionsstudien eingesetzt zu werden. Im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit ist es gelungen, 7 Domänen von IT4var2 und 2 Domänen von MAL6P1.252 rekombinant zu exprimieren und zu reinigen. Ferner konnte der entsprechende Bindungsassay etabliert werden, so dass im nächsten Schritt die gereinigten Proteine in Inhibitionsstudien eingesetzt und so der Bindungsbereich eingegrenzt werden kann.

Die Fähigkeit zur Zytoadhäsion von mit *P. vivax* IE ist erst seit neuester Zeit bekannt. Welche Moleküle dabei auf Seiten des Wirtes und auch auf Seiten des Parasiten in dieser Interaktion involviert sind, ist noch weitestgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass Mitglieder der *P. vivax* VIR-Proteinfamilie an humane Endothelrezeptoren binden können. Allerdings wurde bisher nur für eines der ca. 346 Mitglieder umfassenden VIR-Proteinfamilie der Transport an die Erythrozytenmembran nachgewiesen. Um zu klären, ob diese tatsächlich eine Funktion bei der Zytoadhäsion übernehmen können, sollten verschiedene VIR-Proteine im IE lokalisiert werden. Dafür wurden 4 VIR-Proteine rekombinant exprimiert, gereinigt und folgend in Mäusen Antikörper generiert. Parallel dazu wurden von 14 *P. vivax*-Patienten Blutaussstriche angefertigt. Mittels der Antikörper kann nun im Folgenden in Immunfluoreszenzassays (IFAs) untersucht werden, ob die entsprechenden VIR-Proteine an der Oberfläche der IE nachweisbar sind.

Des Weiteren wurden *P. falciparum*-Transfektanten generiert, die einzelne VIR-Proteine als HA-Fusionsproteine exprimieren. Durch die Aufnahme einer Zeitreihe war es anschließend möglich, den Transport der VIR-Proteine im IE mittels IFAs zu untersuchen. Für VIR9 konnte während der Entwicklung vom frühen Trophozoiten zum Schizonten ein Transport vom Parasiten zu der parasitophoren Vakuole/ parasitophoren Vakuolenmembran (PV/PVM) und für VIR5 zu den Maurer'schen Spalten (MS) beobachtet werden. VIR14 wurde in den späten Stadien der Entwicklung hauptsächlich in den MS nachgewiesen. Keines der 3 untersuchten VIR-Proteine konnte auf der Erythrozytenmembran lokalisiert werden.

Durch die Charakterisierung der VIR-Proteine können erste Hinweise auf den Proteintransport im IE erlangt und somit ein Fundament zur bislang kaum untersuchten Zytoadhäsion von *P. vivax* gelegt werden. Ebenso ergänzt die Kartierung der PfEMP1- Bindungsdomänen die bislang gewonnenen Erkenntnisse und kann so zu einem besseren Verständnis der Pathogenität von *P. falciparum* beitragen.

## Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Jörg Andrä für die Unterstützung und die Betreuung dieser Arbeit, sowie Frau Professor Dr. Iris Bruchhaus für ihre Bereitschaft diese Bachelorarbeit zu ermöglichen und ihre unermüdliche Hilfestellung bei technischen und wissenschaftlichen Problemen. An dieser Stelle möchte ich mich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit im Projekt und die unerschöpfliche Geduld im Rahmen der zahlreichen konstruktiven Gesprächen bedanken. Durch die Bearbeitung des Projekts habe ich nicht nur reichlich an Wissen hinzugewonnen, sondern auch mein Interesse an der molekularen Parasitologie erheblich verstärkt.

Herrn Professor Dr. Egbert Tannich danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Materialien am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, sowie die ein oder andere Anregung, bestimmte Ergebnisse zu hinterfragen und in einem anderen Licht zu betrachten.

Bei sämtlichen Mitarbeitern der Labore 4, 5 und 6 bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft. Besonders hervorheben möchte ich Susann Ofori, die mit mir ihre Materialien und zahlreichen Methoden geteilt hat, sowie Pedro Lubiana und Nahla Metwally, ohne die die äußerst lehrreiche Schlacht um und an der Zellkulturbank nur halb so viel Spaß gemacht hätte. Mein herzlicher Dank geht an das Labor 4, besonders an Dr. Jenny Matthiesen für die kreativen und konstruktiven Gespräche und ihre Art zu einer entspannten und amüsanten Atmosphäre im Labor beizutragen, Martin Meyer für das stets offene Ohr, den einen oder anderen *running gag* und das Initiieren kollegialer Abende, sowie Michael Dörpinghaus für das anfängliche an die Hand nehmen.

Für die Geduld und die Unterstützung möchte ich mich bei allen bedanken, die im privaten Bereich von dieser Arbeit betroffen waren. Insbesondere bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Eltern, die mich immer in allem, was ich machen wollte, unterstützt haben.

### III. Literaturverzeichnis

- Bachmann, A., Scholz, J. A., Janßen, M., Klinkert, M.-Q., Tannich, E., Bruchhaus, I., & Petter, M. (2015). *A comparative study of the localization and membrane topology of members of the RIFIN, STEVOR and PfMC-2TM protein families in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. *Malar J*.
- Barnwell, J. W., Asch, A. S., Nachman, R. L., Yamaya, M., Aikawa, M., & Ingravallo, P. (1989). *A Human 88-kD Membrane Glycoprotein (CD36) Functions In Vitro as a Receptor for a Cytoadherence Ligand on Plasmodium falciparum-infected Erythrocytes*. *J. Clin. Invest.*
- Barnwell, J., Carlton, J., Colins, W., Escalante, A., Mullikin, J., & Saul, A. (2007). *Neglected Burden of Human vivax Malaria: Comparative Analysis of Plasmodium vivax and Key Related Species*.
- Berger, S. S., Turner, L., Wang, C. W., Petersen, J. E., Kraft, M., Lusingu, J. P., . . . Lavstsen, T. (2013). *Plasmodium falciparum Expressin Domain Cassette 5 Type PfEMP1 (DC5-PfEMP1) Bind PECAM1*. *PLOS ONE*.
- Bernabeu, M., Lopez, F. J., Ferrer, M., Martin-Jaular, L., Razaname, A., Corradin, G., . . . Fernandez-Becerra, C. (2012). *Functional analysis of Plasmodium vivax VIR proteins reveals different subcellular localizations and cytoadherence to the ICAM-1 endothelial receptor*. *Cellular Microbiology*.
- Chakravorty, S. J., & Craig, A. (2005). *The role of ICAM-1 in Plasmodium falciparum cytoadherence*. *Eur J Cell Biol*.
- Cooke, B. M., Buckingham, D. W., Glenister, F. K., Fernandez, K. M., Bannister, L. H., Marti, M., . . . Coppel, R. L. (2006). *A Maurer's cleft-associated protein is essential for expression of the major malaria virulence antigen on the surface of infected red blood cells*. *The Journal of Cell Biology*.
- Craig, A. G., Khairul, M. M., & Patil, P. R. (2011). *Cytoadherence and Severe Malaria*. *Malays J Med Sci*.
- Duffy, P. E., & Fried, M. (2005). *Malaria in the pregnant woman*. *Curr Top Microbiol Immunol*.
- Esser, C., Bachmann, A., Kuhn, D., Schudt, K., Förster, B., Thiel, M., . . . Horstmann, R. D. (2014). *Evidence of promiscuous endothelial binding by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. *Cellular Microbiology*.
- Hastings, M. D., & Hopkins Sibley, C. (2002). *Pyrimethamine and WR99210 exert opposing selection on dihydrofolate reductase from Plasmodium vivax*. *PNAS*.

- Hiller, N. L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estran˜o, C., & Haldar, K. (2004). *A Host-Targeting Signal in Virulence Proteins Reveals a Secretome in Malarial Infection*. Science.
- Hinterberg, K., Scherf, A., Gysin, J., Toyoshima, T., Aikawa, M., Mazie, J. C., . . . Mattei, D. (1994). *Plasmodium falciparum: - The Pf332 Antigen Is Secreted from the Parasite by a Brefeldin A-Dependent Pathway and Is Translocated to the Erythrocyte Membrane via the Maurer's Clefts*. Exp Parasitol. .
- Jensen, J. B., & Trager, W. (1978). *Plasmodium falciparum in culture: establishment of additional strains*. Am J Trop Med Hyg. .
- Kochar, D. K., Saxena, V., Singh, N., Kochar, S. K., Kumar, S. V., & Das, A. (2005). *Plasmodium vivax Malaria*. Emerging Infectious Diseases.
- Külzer, S., Rug, M., Brinkmann, K., Cannon, P., Cowman, A., Lingelbach, K., . . . Przyborski, J. M. (2010). *Parasite-encoded Hsp40 proteins define novel mobile structures in the cytosol of the P. falciparum-infected erythrocyte*. Blackwell Publishing Ltd.
- Lambros, C., & Vanderberg, J. P. (1979). *Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture*. J Parasitol.
- Levinson, W. E. (2012). *Review of Medical Microbiology and Immunology, 12th Edition*. Lange Medical Books.
- LifeTechnologies. (10. 08 2015). Von <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/K450002> abgerufen
- Lindner, S. E., Miller, J. L., & Kappe, S. H. (2012). *Malaria Parasite Pre-erythrocytic Infection: Preparation Meets Opportunity*. Cell Microbiol.
- Lopes, S. C., Albrecht, L., Carvalho, B. O., Siqueira, A. M., Thomson-Luque, R., Nogueira, P. A., . . . Costa, F. T. (2014). *Paucity of Plasmodium vivax Mature Schizonts in Peripheral Blood Is Associated With Their Increased Cytoadhesive Potential*. The Journal of Infectious Diseases.
- Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., & Doumbo, O. K. (2002). *The pathogenic basis of malaria*. Bethesda, Maryland, USA: Nature.
- Perlmann, P., & Troye-Blomberg, M. (2000). *Malaria blood-stage infection and its control by the immune system*. Folia Biol.
- Ponnudurai, T., Leeuwenberg, A. D., & Meuwissen, J. H. (1981). *Chloroquine sensitivity of isolates of Plasmodium falciparum adapted to in vitro culture*. Trop Geogr Med.

- Quispe, A. M., Pozo, E., Guerrero, E., Durand, S., Baldeviano, G., Edgel, K. A., . . . Lescano, A. G. (2014). *Plasmodium vivax Hospitalizations in a Monoendemic Malaria Region: Severe Vivax Malaria?* The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.
- Radfar, A., Méndez, D., Moneriz, C., Linares, M., Marín-García, P., Puyet, A., . . . Bautista, J. M. (2009). *Synchronous culture of Plasmodium falciparum at high parasitemia levels.* nature protocols.
- RKI. (2015). *RKI-Ratgeber für Ärzte.* Von [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Malaria.html](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Malaria.html) abgerufen
- Rowe, A. J., Claessens, A., Corrigan, R. A., & Arman, M. (2009). *Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications.* Cambridge University Press.
- Sabbatani, S., Fiorino, S., & Manfredi, R. (2010). *The emerging of the fifth malaria parasite (Plasmodium knowlesi): a public health concern?* Braz J Infect Dis.
- Sharma, A., & Khanduri, U. (2009). *How benign is benign tertian malaria?* J Vector Borne Dis.
- Singh, V., Gupta, P., & Pande, V. (2014). *Revisiting the multigene families: Plasmodium var and vir genes.* J Vector Borne Dis.
- Siswantoro, S., Russell, B., Ratcliff, A., Prasetyorini, B., Chalfein, F., Marfurt, J., . . . Price, R. N. (2011). *In Vivo and In Vitro Efficacy of Chloroquine against Plasmodium malariae.* ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY.
- Smith, J. D. (2014). *The role of PfEMP1 adhesion domain classification in Plasmodium falciparum pathogenesis research.* Molecular & Biochemical Parasitology.
- Spielmann, T., Ferguson, D. J., & Beck, H.-P. (2003). *etramps, a New Plasmodium falciparum Gene Family Coding for Developmentally Regulated and Highly Charged Membrane Proteins Located at the Parasite–Host Cell Interface.* Molecular Biology of the Cell.
- Sturm, A., Amino, R., Van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., . . . Heussler, V. T. (2006). *Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids.* Science.
- synlab. (abgerufen am 17.08.2015). Von <http://www.synlab.com/uploads/pics/Ausstrich.gif> abgerufen

- ThermoFischer. (10. 08 2015). Von <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V35120> abgerufen
- Tilly, A.-K. (2015). *Dissertation*.
- Tilly, A.-K., Metwally, N., & Bruchhaus, I. (kein Datum). *unveröffentlichte Daten*.
- Tilly, A.-K., Thiede, J., Metwally, N., Lubiana, P., Bachmann, A., Roeder, T., . . . Bruchhaus, I. (2015). *Type of in vitro cultivation influences cytoadhesion, knob structure, protein localization and transcriptome profile of Plasmodium falciparum*. Scientific Reports.
- Turner, G. D., Morrison, H., Jones, M., Davis, T. M., Looareesuwan, S., Buley, I. D., . . . et al. (1994). *An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration*. Am J Pathol.
- Udomsangpetch, R., Kaneko, O., Chotivanich, K., & Sattabongkot, J. (2008). *Cultivation of Plasmodium vivax*. Elsevier.
- WHO. (2014). *World Malaria Report 2014*. Von [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/report/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/) abgerufen
- WHO. (2015). *Guidelines for the Treatment of Malaria. 3rd edition*. WHO.
- Wickham, M. E., Rug, M., Ralph, S. A., Klonis, N., McFadden, G. I., Tilley, L., & Cowman, A. F. (2001). *Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes*. EMBO J.
- Zhonghua Lin, N. Y. (2014). *nature protocols (abgerufen am 14.08.15)*. Von In vivo antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells: [http://www.nature.com/nprot/journal/v9/n7/fig\\_tab/nprot.2014.104\\_F5.html](http://www.nature.com/nprot/journal/v9/n7/fig_tab/nprot.2014.104_F5.html) abgerufen

## IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Globale Lage der Malaria-Gebiete mit hohem Infektionsrisiko. ....	1
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i> (Levinson, 2012).....	4
Abbildung 3: Adhäsion von mit <i>P. falciparum</i> IE an humanen Zellen (Rowe, Claessens, Corrigan, & Arman, 2009).....	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung von der PfEMP1-Präsentation vom IE an Wirtszellrezeptoren (Rowe, Claessens, Corrigan, & Arman, 2009).....	6
Abbildung 5: Anfertigen von Blutaussstrichen .....	15
Abbildung 6: Ficoll- Dichtegradient (Zhonghua Lin, 2014) .....	16
Abbildung 7: Giemsa-Färbung des intraerythrozytären Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i> (Radfar, et al., 2009).....	18
Abbildung 8: GeneRuler 1 kb DNA Ladder für Agarose-Gele .....	23
Abbildung 9: Sequenz-Karte des TOPO®-Vektors .....	25
Abbildung 10: pRSET®-Vektor .....	27
Abbildung 11: PAGERuler für SDS-Gele und Blots .....	31
Abbildung 12: DNA-Amplifikate der <i>vir</i> -Moleküle <i>vir5</i> , <i>vir9</i> , <i>vir14</i> und <i>vir30</i> aus <i>P. vivax</i> . ....	38
Abbildung 13: Die fünf untersuchten MAL6P1.252-Domänen aus <i>P. falciparum</i> 3D7 mit der Nummerierung der rekombinanten Proteine. ....	39
Abbildung 14: DNA-Amplifikate der MAL6P1.252-Domänen aus <i>P. falciparum</i> 3D7.....	39
Abbildung 15: VIR-Proteine im Tricin-Gel und im Westernblot mit $\alpha$ -His- <i>Tag</i> .....	40
Abbildung 16: MAL6P1.252-Proteine im 12% SDS-Gel und im Westernblot mit $\alpha$ -His- <i>Tag</i> . ....	41
Abbildung 17: Aufgereinigte Fraktionen von VIR- Proteinen. ....	42
Abbildung 18: Aufgereinigte Fraktionen von MAL6P1.252- Proteinen.....	43
Abbildung 19: Die untersuchten IT4var2-Domänen aus <i>P. falciparum</i> FCR3 mit der Nummerierung der rekombinanten Proteine. ....	43
Abbildung 20: Aufgereinigte Fraktionen von unlöslichen (ÜSII+ÜSIII) IT4var2- Proteinen. ....	44
Abbildung 21: VIR-Proteine, eingengt und entsalzt.....	45
Abbildung 22: Lösliche IT4var2-Proteine, eingengt und entsalzt.....	45
Abbildung 23: Lösliche MAL6P1.252-Proteine, eingengt und entsalzt. ....	45
Abbildung 24: FCR3-CD9 nach einer Anreicherung an CHO-Zellen. ....	47
Abbildung 25: Aufnahme der Zeitreihe .....	48
Abbildung 26: IFAs der Transfektantenzeitreihe von <i>vir5</i> , <i>vir9</i> und <i>vir14</i> . ....	49

## V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete CHO-Zelllinien.....	9
Tabelle 2: Liste der Oligonukleotide für die Amplifizierung verschiedener <i>vir</i> - und MAL6P1.252-Moleküle.....	10
Tabelle 3: Primäre Antikörper für Westernblot (WB) und Immunfluoreszenzassay (IFA) mit den angewendeten Verdünnungen.....	11
Tabelle 4: Sekundäre Antikörper für Westernblot (WB) und Immunfluoreszenzassay (IFA) mit den eingesetzten Verdünnungen.....	11
Tabelle 5: Verwendete Restriktionsenzyme, Klonierungs- und Expressionsvektoren .....	12
Tabelle 6: PCR-Ansatz für 20 µl Gesamt-Volumen.....	22
Tabelle 7: PCR-Programm. ....	22
Tabelle 8: Probenvorbereitung der Kontroll-Agarose-Gelelektrophorese .....	23
Tabelle 9: TOPO®-Ligationsansatz .....	25
Tabelle 10: Ansatz für Kontrollverdau mit <i>EcoRI</i> .....	26
Tabelle 11: Insertverdau mit <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> zur Umklonierung .....	27
Tabelle 12: pRSET®-Vektorverdau mit <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> zur Umklonierung.....	28
Tabelle 13: Ligationsansatz für pRSET®.....	28
Tabelle 14: Kontrollverdau mit <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> .....	29
Tabelle 15: Ansatz für ein 12% SDS-Gel.....	31
Tabelle 16: Ansatz für Tricin-Gel. ....	31
Tabelle 17: Ansatz für ECL-Lösung und der einzelnen Komponenten.....	32
Tabelle 18: Schrittweise Reinigung über die Ni-NTA-Agarosesäule für lösliche und unlösliche Proteine.....	33
Tabelle 19: Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Reaktion der rekombinanten Proteine (rP) nach Einengung und Entsalzung. ....	46

## VI. Anhang

### a. Sequenzen

<b>GAGA</b>	→ Spacer
<b>GGATCC</b> bzw. <b>GAATTC</b>	→ Schnittstelle <i>Bam</i> HI bzw. <i>Eco</i> RI
<b>TTA</b>	→ Übergangssequenz

#### i. *P. vivax* Transfektanten

##### Vir14 (PVX\_108770) / Unterfamilie C - (UPC 3.1.2.1)

Vir14\_for **GAGAGGATCC**AAGCGTTGTTATGATTTAAA (57,2 °C) 30 bp

Vir14\_rev **GAGAGAATTCTTA**ACAAGAGTCTCTCCATGTGTAAT (56,9 °C) 36 bp

Alternative:

Vir14\_rev **GAGAGAATTCTTA**TCTTTGTTAAGGTATTCAACAT (56,0 °C) 36 bp

##### DNA-Sequenz (Introns in rot und Oligonukleotide in blau); Länge 1525 bp:

ATGTT**CGATCTGGAAGGAGGCG**GGACACAAGTAGAGGCAGATGATGAAACCATATCGG  
AAAGTACTATACAA**GTATGTTTATTAGATTTTTTTTAAGTAATCCTTTACTTGAAATTTATA**  
**TGAACATTCTATGGATAATAAAGAACAATAATTTTTATGTATCACCAATGTGTATTTCTAT**  
**AATAATGTATATTTTTTAACTTTTTAG**GGTCAACGTATCATCTTTGAACATCTACCTGCA  
TACATATTTGAACAAAAGCTGAAGGAAGATGCAACGGATAATAATTTTAGCGGATATTAC  
AATGTAGTAAAGCATATCAGTGAACGTTATGGATGGGGCAATGATTTATTCAAGAAACTC  
AGTAGAAATATATCATTGGTGCACGATAGTTATATTGAGGGAGACGAATTCAATAGAA**AG**  
**CGTTGTTATGATTTAAA**TATTGGTTATATGATAATGTATATAAAAATCTTGAATCATCAAA  
TACAAATGATACCGATTATTTTAAAGATATTTCTACAAAGCTTCAAGGAGTATGGAAAAAT  
ATTGTTGATAATGAGTTTAAAGATAGACCTTATCAGTGTATCCCGATAAAGAACTACTAC  
TTAACATGGGTTATTTACAAGAAATTAAGATTTATTTGATTTTTACGAAGATTATAATGAA  
ATGAAAAAGGAAATTATTGCAGATACTTCTGGTTCATGTCGTAGA**TATGTTGAATACCTTA**  
**AACAAA****GAATTC**CAGTATATTACACATGGAGAGACTCTTGTAAGTGCCCGAATATACAT  
GCAAAAGATATATTGATGATTATATGAAGTATCGTCCAGCAAGTATTGTGCCGGATTTAA  
GTCCGTGGGTTGTTCTTACGTATCCTGGTAATAAATGTTACGCAACTGTTTATGATATATT  
TGTAAGGCCAAAAGAGCAGCCTAACGTAATGATGGTATATATAAAAAAAAAAATGGAAAA  
GCTTGAAAAGTTAAATCCTGGAAAAAGTTTACTTAAACATTAGCATGGGAGAGGGATTACG  
AGGAAGTGAATTTTTTATTCTGGTGATCATGATGATTACTGGTTACGTCTAAAGTGGGA

TATATTGCTGTACATAACTGACGATATCACCCACCTGTGCTAGGTATAGTGGGTACACT  
 ACTAATTTTTTTGGGCCTTGTATAAGGTAATTATATAAATTTGCAGTTAAAGATATGCCAAT  
 TTTATGCTTTTAAAGTTAAATACACTATTATAAAAATTGTCATATTAATGATTACAATGTTGT  
 TTATGTGATTTTTTTTTAGTTTACGCCATTGGTAAAACGGTGCGACGCACACGAGCAA  
 GGTAAGGAAACGAATTAGACCAAACATTAATTATGATGATATTAAGTTATTATATGGAAGT  
 GAAGAATCTTTGAACAGCAGCACAGATTCTTATGATTATAATAATGATTATGATAATGATT  
 ATGATAATGATGATTATAGTGATAGTAATAGTTCGTATAATTTATCTTACGCTTCCACATT  
 GGATTAT

Vir9 (PVX\_000020) / Unterfamilie J \*\*\* - (UPC 1.1.1)

Vir9\_for **GAGAGGATCC**TGTAATACTTAACTACTTGT (56,2 °C) 33 bp

Vir9\_rev **GAGAGAATTCCTTA**TCTAAATTCTTCTAGTGCTTCACAAT (58,1 °C) 39 bp

**DNA-Sequenz (Introns in rot und Oligonukleotide in blau); Länge 970 bp:**

ATGCTAAATTTTTTATGGTTTTTTTTCTACTATTTTTTTCTTCCATAGTATAATTTTGTAA  
 GTACGTATTCTAAATATAAAGACATATATTATGACAGAACTACAGATGAACTTCTATTAA  
 TGATATATGCGAAGACTACATTTTATCTCATTTCGATCCTGATGTAGAGCAGGGTAGCCA  
 AGAATGTTTTAGGAAGGTGTGTTCAAAGTTAAGAACTACTTAAATTATGTAAGTAAT  
 TCTGAATCCCTTGATATACCAAATGTGTAATACTTAACTACTTGTATATGACCAAG  
 CAATTTATAATTTACTTTCTGGTTACACTACATTATCACTGTACATTGAACTTCAAAAATTG  
 TATGATGAGCATAATTTGATTTGGTAATATGTAATGAGCATAAAGAGGACGTTAATTAT  
 GAACTTATAAAAACTTAATGAACTAATTACACTATACAAGGATTTTGATACATATAAAG  
 CATCAAGTGATCCAAAAGAGAATAATGAATGTAAATGTGTTTCGAAAATGTGCAAATTCAT  
 ATAAAACGTACATAAAGAAATGTGAAGATGGCACTCAACGAAATATTGTGAAGCACTAG  
 AAGAATTTAGAATACATATAATCAACATATGCAAATGGAACTAATTGTAACAATGTAGA  
 CATATACTTACCATCCACAAAAAAGTTAACATCATTGTTCTTATTACAATTCGTCTATTA  
 TTATATTAACCTTTGTTTCCTTTATTTATTCTGTATAAAGGTAGAAATTTTTTTTATTA  
 AATATAATTATTATGATAAAATTTAATTATACAGTTTCATATAAAAATTATTATGTTATAAT  
 TGCTGTATTATTAATATAATTTTTCCCTTACTATTAGTTTACTACAGTTGTGCTCATGC  
 ATAAATGCTCAAAAAGGAAGAGAAAATATGAAGGAAAGTTTAA

**Vir30 (PVX\_042690) / Unterfamilie K - (UPC 4.1.1)**Vir30\_for **GAGAGGATCC**TGTGATTCCCTTTTCTAGTGC (59,9 °C) 30 bpVir30\_rev **GAGAGAATTCTTA**AAGTTTACTATAGTTCTGATATAAAC(54,6 °C) 39 bp**DNA-Sequenz (Introns in rot und Oligonukleotide in blau); Länge 1288 bp:**

ATGAATAGTCTATATCTTTGTATTATAAACACACACATATATGTTATGTTTCATTACATTATT  
 TTTTCATCTTATTAAGTTCAATAAAGCAAATGTCGTGTGCCGGAAAAATAGAGGATTATA  
 GCGTATATTTTCATTTAAATTATTAACAATTTATCTATTGCATATTTTATAAATATTATAT  
 ACATATCATATATTTTATTTATTTAAATCTGTTCTTAGTAATAAATTAATAATATGTCTTTTA  
 ATTTTTAGTATGACTTTTTTCGACAATATTAGTAATTATATGAAAGATGGAAAAAGTATTGA  
 AGATACTGTTAGATCGGTTGACGCATCTAAATAT**TGTGATTCCCTTTTCTAGTGC**ACGGC  
 ATCTCAATTAGGAGATAAAGAAAATGCAAATATATATGTGAAATATTTACAAAACATGT  
 AATCATTTCCCAATTGTAAAAACAAGAACAGAATACTAGTTATAAACAAAATTGTGGG  
 CTGTTAAATTATTGGTTAAATATGAAATTGAACGATGATAAAATTAATGGAAAAACATGTG  
 TTTTAGAAATCGAAAATACTATACAGAGTCAGTGTTCTGATATATTCGAATTTAATTTCGA  
 TTCATTAATTTTTTATACGACATTA AAAAGGAAGAACTTCATAAAATGAATATATTATAT  
**GTTTATATCAGA**ACTATAGTAAACTTAAAAATATTATAGAAAATAAGTCGGGGCCGGAAA  
 AACGTCATTATTACCTCACTCAACTGCATGTTGCGCTGATTACAATAAAGCTAAATATAT  
 ATGCAGTGATGATAATAATAAGATTACATTTTGTAAAAACTAGTAACATTTGAATCAAAA  
 TATGATGAACTTTATAATACATTCAAAGGAAAAAATCTGAATTTTCTGATGATCTTATAAA  
 ATTATCAGAATGCACCGATAATAAAATTATAACAACCGCAGTTACAGGAACAGTTGTTGG  
 ATTAATCCCTTATTTGGGGTTTTATATAAG**GTTAGTGAATAAAATATTA**AACTATTAATAT  
**TATATTGATATCAATAAATTAATATTTTTCGTTATTTAATATTATACAGAATCGTATTTTATT**  
**ATACATATATTTTTTAATTATAG**TTTACTCCAATGGGACAATTGCTTAAATCAAAAATAG  
 GAATATTAATAATGATATTAGCAATAATGATGAAGAATATACAAAATATCATTAATGGA  
 GCAAGAAAGTGATCATATAAGTTCACGGCAAGGGACATATAATATTAATATCAAACATT  
 A

**Vir5 (PVX\_093715) / Unterfamilie, not clustered - (UPC 3.1.5.1)**Vir5\_for **GAGAGGATCC**TTCTTGA<sup>→</sup>ACTACTGGTT (57,6 °C) 27 bpVir5\_rev **GAGAGAATTCTTA**GCATTTTTCCAGCCCCTTATTAT (59,8 °C) 36 bp**Alternative:**Vir5\_for **GAGAGGATCC**TATAATAAGGGGCTGGAAAAATG (59,6 °C) 33 bpVir5\_rev **GAGAGAATTCTTA**TATTTTGGGGAGTTGATGGGTGG (61,0 °C) 36 bp**DNA-Sequenz (Introns in rot und Oligonukleotide in blau); Länge 1906 bp:**

ATGTCACACGAACCGGACGTAAGGGCACAACGTCGCCGATTAAATATGCGTTCATGAG  
 CCTTTACTTCTACTATTCTCAGCGCATCTGCGAATTTGCTCGCTTTTACATTTTCTCAC  
 TCCCCGTTTAAACGCTCTTTCTCCAACCTTCATAGTACGAAATCTTCCAAAACCTGACG  
 GAGTACCGAAAAATGAAGGCTCATCGATTTGAAAGAGTACACAGCGGAGACTTCCTT  
 CTGCGGTGATCCGAAGTCACCCTTGAAGTCAAATTCTGGCGGGTAGATATTTGCAAAA  
 GGTTTGTAACTCTTTAAGCGTTTAAACCCTAGCGAAGGCACCACTGCTGAAAGATCTG  
 ACGGCCACCCCGCTTCTTCAATTTCTAGCGCCACCCCAACACGCAGCC**TTCTTGAAC**  
**TACTGGTT**GAGCACCAATTGAGGGATAAAAACATCCCTGAAAATCTGAGGCCCTTCT  
 TTACCTACACCTGAAGACGCACTACGATAAGTTTAAAGGCAAATACAAATTAACGGACCA  
 ATTCCACCCCATGAAAGTGCCCACTTGAAAACTTGACATACTGCACGAGCTGTATA  
 GACAATACTACGAATTAATAAATAACAACTGGGAGGAGGAGAAAAAAGAAGGCGAT  
 AGGGATGAGGGGTGTCTGAATTTTCTCCAGAAGTCAAGGATAAT**ATAATAAGGGCT**  
**GGAAAAATG**CTCCCCAAGCTGATAACCAGTTCTGCATAGCATTAAACCGTTTTAGAAA  
 CTTATATGAAGAAGATAAGGCCTCCTTCTCAGCCGCCTGTCACAATAAACGTTGCCTTC  
 TCTGCCAGAAATAGCATCACTTCGGTTACCCAAGGCAGTAAGTGGGGGAACTCCCAAAA  
 TAGGGGGTGA<sup>←</sup>CTTAGTTCAGGCGGAGCAAAGCAGT**CCACCCATCAACTCCCCAAAATA**  
 GTGGACGACGTGGTATTCTCATCATTITTTCTTTAACAAAAATACACAAATTATTGTCAGAC  
 CATCATCATTITTCCTTACAAAGCGTGGTCAGACCCCACCATCCTTCTCACAAGCATG  
 CATCACACTAGACACATTATATTCCCCACACACCCCTCCTTCTTAGTACCCCAACC  
 TGTATAAGCTCCTACTTCTGCAATACACTTCCCTCTTTGAGTACGACGAGGAGAAGATAA  
 AAAACA<sup>←</sup>ACTTAATGGAGGTTCTGCACGAATTTCTTAAATATTACAATCTGAATAGAGGGA  
 ATTCCAGCGTAGATTTATTTATAAAGGAATTCTTCTACGATTATTATAAAAACAAAAAGGA  
 GGAATATGAAAAAATATACGCAGAATGTTCCAACAAAAAACCGCTAACCTCCTACTGCAA  
 GTTGTACTATAGATGTAACGACCAGCTGAGGGACGACCTCTTTTCCATCAAAGAAGATG  
 TTGCCAAGTACCTTGGAGACAAAGCTAAATCATATCAGCAGGCGCTTTCTGGAAATCCC  
 CCAACTGAAACAGAGATGCATAAAATAGGAAGAAGTTCGCTTATATCATTACACAGATTC

GCGATCGTGTCCACAGTGATAGGAGTGTTTTCTTTCTATTCTCTATATATGAGGTTTGT  
AAAAATTGCCTTAAAATGTATATACTCTTCATGTGCATGTTATAAACGTTGCTTGTGAGA  
TTGTTCTCCAAAGGGATGGTCACGAAAAGGGACACTTCTAATCGATTGACTTTTTTTTT  
TTCTTTCTTCAGTTCACCCCCCTTGGATGCTGGTCCGAAGAAAATTCAACAAGACCAAA  
CGGGTTGCTTATAATTTTTACATGCAACAGATTTCGTTATATAATGGAAATGAATTCTCCAT  
TTGAGGATGTTAGGCTGGATAGCAGGGAAGCCAACATAGGCTACCAATCCACG

## ii. MAL6P1.252

## Aminosäuresequenz

MGPAPRTATT TYSSAKDLLEDIGESVQKEAKKQALGRSESVLHGLLSNATIKGVKNKATKPI  
 QLEYEYHTNVTGGFDKNNPCANRLDVRFSDIYGGQCTDNKINGNDDDETGGTCAPLRRLFLC  
 DQHLSTMKEGNINNTDNLLEVSLLAAKYEGDSIINNYPDNRDKKEGICTALARSFADIGDIIRG  
 KDLFLGYTKKDEKEKEKVQKNLKRIFNEIYKKMQDPAKSHYSGDSSDFYKLREDWWALNRK  
 EVWKAITCKAKNDAEYFRKKDSDGKHCSVQNCKCVDGDPPTNLDYVPQHLRWFDWEWSEE  
 FCRKRKDQLKISLEKCRGKNKDKYCSLNGCNCKTTVRGKKKFDYQQECNDCLVACDPFVH  
 WIDNEKLEFLKQKKKYKNEIKEREPTKKTSHGTINMYAKEFYETLEKEHRTVDTFLKLLNEE  
 KECKNHPEVGEGKKTFFIDFNDNIETFSHTKICEPCPWCGV KPGGPPWKDNDIDSCGKKEISF  
 S DKDTTDISILSTDRAKKNILQKLENFCRDTEHINHDIWKCHYENTDNDNCILQNTGSEKQ  
 KIMPFDAFFFLWLTQMLDDSIEWRKKLKTCCINNEKPTNCIRGCKKPCFCFERWVEQKEEEWI  
 SIEKHFQKQRDISEEERYITLEYILNEFFMDKIEKAYGIEKSKELKEKLSNKGHGIIRDTEHSQ  
 DAIKILLEHELEDAKKCTETHNDEKCKEQEESGGRSLNPDPESSDDEEETDNVKENPCAVGK  
 KLTKTVKQIARQMHQAAKKQLGSSSSRALKAHAHLGTYKHTNKRDDFKTICKITKDHSNATH  
 NYPQGPCHGKNNDKSMFKTEEGWKPGNQINMNDEYAFMPPRRQHFCTSNLEYLETADRT  
 LNGIGDDPNVLNHSFLGDVLLAAKFEADFIKEYNEQSNEYKDFSTICRAMKYSFADLGDIKGG  
 TDLWDKNGGEQKTQGKLEKIFCKIKNKLPEDIQEKYINDDKNSPQYKLLREDWWEANRKEV  
 WRAMTCATTSGKIPCSIVTPLDDYIPQRLRWMTSEWSEWFCKEQSKLYGELVKDCASCKKK  
 GKEKCTQGDNDCTPCDKKCKEYGGKIRTWKDQWTKMDGIYQMLYLQAQTARNAGDTAF  
 DNPNDQYVIDFFKLLQKANGDNNFGVNTSPYFTPAGYIHQEARVGECEVQKHFCNNNGNQ  
 DKYSFRNQPYDHEEACACKKNTKAPEKKEETPPAGPNVCEIVDKLFEDTTTPHAACQQKY  
 INGHEKFPNWKCVTPS GEKSGDKGAICVPPRRRRLYIHDLQSLDEKPSDTALRDWVFKSAA  
 VETFFLWHRYKKQKEKKPQEGSLLSGSTLLSQFSIDLGDEEQPPEKQLAGGKIPDDFLRQM  
 FYTLGDYRDICIGDENVIKTLKYSYGDKDDIMEKIQEKIKAVFPTSGGTSHIPDVKPGGALSRGD  
 WVEQHKGDIWHGMICALTYKETSGSGEKGEKTTITQDGTLDALLDLDGKKPKRDYQYTS  
 VTLKEDDSGEKAANVPAKVEPTTLADFTRRPAYFRWLEEWGDGFCRERKKRLAQIKKDCYE  
 DGGTGEKQYSGYGEACDRTNTSNEGASADLEGPSCANSYRKYERKKYEFKKQEKAY  
 GGQKQNCCKERKAAESNDNDKQFCGTPETTCNTAEAFLLQNLGSCCKYNGEGKKIFENTEE  
 TFKPAIDCEPCSEFKVKLEKCNCGSDAKGNTCTTGKITAENFENKTDVNEVVMRVSDNAES  
 GFKGDLKSSCENAHIFEGIKENKWKCRNVCGYIVCKLEEVNGEKDNGKILLIRALVTHWVD  
 NFLQDYNKIKKKLNTCMNSSDATPCIKGCVDKWIKLKKDEWEEIKKPYLEQYKNGYGENYV  
 KTILEKFQDQPEFKKAIGPCPTLDAFEKSKQC NATASSEKGDGNKSYVIDCLLQELEKLQEK  
 AKKCHDQHSDNPQEKCDPHPDEPDEEDLLLEEEENTANSAPEICKDVIKAPPKQEEKGGC  
 EPASPLEPEEVEEETASVPPGSEPEADKGPVKPAELPKPPKRNRKQPKKLYFPTPALQNAM  
 LSNTIMWTIGIGFAAISYFFLKKKTKSTIDLLRVINIPKGDYGIPTMKSKNRYVPYKSGQYNGKK



**Domain 2\_CIDRalpha2.1**D2\_B\_F30 **GAGA** **GGATCC** GATAAAGATACTACTGATATD2\_E\_R35 **GAGA** **GAATTC** **TTA** ATCCGGGTTTAAAGAGCGACCT**DNA-Sequenz (Oligonukleotide in blau); Länge 696 bp:**

**GATAAAGATACTACTGATAT**ATCAATACTTTCCACTGATAGAGCAAAAAAAAAATATTTTAC  
 AAAAATTAGAAAATTTTTGCAGAGATACTGAGCATATTAATCATGATATTTGGAAATGTCA  
 TTATGAGAATACTGATAATGATAATTGCATACTACAAAATGAGAACACGGGCTCAGAAAA  
 AAAAAAATTATGCCCTTTGATGCATTTTTTTTCTTTGGCTAACACAAATGTTAGATGAT  
 TCTATAGAATGGAGAAAAAACTTAAACCTGTATAAATAATGAAAAACCAACTAATTGTA  
 TACGGGGTTGTAAAAGCCCTGCGAATGTTTTGAAAGATGGGTTGAACAAAAGAAGAA  
 GAATGGATTTCAATTGAAAACATTTTGACAAACAAAGAGATATATCAGAAGAAGAACGT  
 TATATAACACTTGAATATATTTTGAATGAATTTTTTATGGATAAAATTGAAAAGCTTATGG  
 AATAGAAAATCAAAGAATTAAGGAGAAATTAATCAAATAAAGGTCACGGAATTATA  
 AGAGATACAGAACATTCACAGGATGCAATAAAAATATTGCTAGAACATGAATTAGAAGAT  
 GCAAAAAATGCACAGAAACCCATAATGATGAAAATGTAAAGAACAAGAAGAGAGCGG  
**AGGTCGCTCTTTAAACCCGGATCCAGAATCC**

**Domain 3\_DBLbeta4**D3\_B\_F30 **GAGA GGATCC** AAGAAACAATTGGGTAGTAGD3\_E\_R33 **GAGA GAATTC TTA** AAAGGAATATTTATCCTGGT**DNA-Sequenz (Oligonukleotide in blau); Länge 1236 bp:**

**AAGAAACAATTGGGTAGTAG** TAGTAGTAGGGCATTGAAGGCTCATGCACATCTAGGAAC  
 ATATAAACATACCAATAAACGCGATGATTTCAAACAATATGTAAAATAACGAAGGATCAT  
 TCCAATGCTACCCATAACTATCCGCAAGGACCATGTCATGGAAAAATAACGATAAATCT  
 ATGTTTAAGACAGAAGAAGGTTGGAAACCTGGGAACCAGATAAATATGAACGACGAATA  
 CGCCTTTATGCCTCCTCGACGTCAACATTTTTGTACATCGAATTTAGAATATTTAGAAAC  
 GGCTGACAGAACACTTAATGGTATTGGTGACGATCCTAATGTTCTTAATCATTCCTTTTTA  
 GGTGATGTTCTGCTCGCAGCAAAGTTTGAGGCAGATTTTCATAAAAGAGAAGTATAATGA  
 GCAATCTAACTATAAGGACTTTTCAACTATATGTAGAGCAATGAAATATAGTTTTGCGGA  
 CCTTGGAGATATAATTAAGGAACAGATTTATGGGATAAGAATGGTGGCGAACAAAAAA  
 CACAAGGAAAGTTGGAAAAATATTCTGTAAAATTA AAAACAAACTTCCTGAAGATATCC  
 AAGAAAAATATATCAATGATGACAAAAATTCACCCCAATATAAAAAATTACGAGAAGATTG  
 GTGGGAGGCAAACAGAAAAGAAGTTTGGAGAGCTATGACGTGTGCAACAACCAGTGGA  
 AAAATCCCATGCAGTATTGTCACACCACTTGATGATTACATTCCTCAAAGATTACGTTGG  
 ATGACTGAATGGTCCGAATGGTTTTGCAAAGAGCAGTCGAACTGTATGGAGAGTTGGT  
 GAAGGATTGTGCAAGTTGTAAGAAAAAGGGTAAAGAAAAATGTACACAAGGCGATAATG  
 ACTGTACACCGTGTGATAAAAAATGTAAAGAATATGGAAAAAAATAAGAACATGGAAAG  
 ATCAATGGACAAAAATGGATGGAATATACCAAATGTTATACCTACAAGCACAACTACTG  
 CTCGTAATGCTGGTGATACTGCTTTTGATAATCCCAACGATCAATATGTGATTGATTTCTT  
 CAAAAAATTACAAAAGCAAATGGTGATAACAATTTTGGTGTCAACACCTCCCCGTACTT  
 CACCCAGCAGGGTACATCCACCAGGAGGCACGTGTAGGTGAATGCGAAGTACAAAAA  
 CATTTTTGTAATAATAACGGCA**ACCAGGATAAATATTCCTTT**

**Domain 4\_DBLdelta1**D4\_B\_F30 **GAGA** **GGATCC** GGTGAAAAAAGTGGTGATAAD4\_F\_R33 **GAGA** **GAATTC** **TTA** TTTAGCATCACTCCCGCAAT**DNA-Sequenz (Oligonukleotide in blau); Länge 1317 bp:**

GGTGAAAAAAGTGGTGATAAGGGTGCCATATGTGTGCCACCCAGGAGGCGACGACTAT  
ACATACACGATTTACAATCACTAGACGAGAAGCCGAGCGATACCGCGCTACGTGATTGG  
TTTGTGAAAAGTGCCGCGGTTGAGACGTTTTTTCCTATGGCATAGATACAAAAACAAAAG  
GAAAAGAAACCACAGGAAGGGTCACTACTTTCCGGGTCAACACTACTTAGCCAGTTCAG  
CATAGACCTCGGTGATGAGGAACAGCCCCCGAAAAACAATTGGCTGGTGGCAAATA  
CCTGATGATTTCTTGCGCCAAATGTTCTACACATTGGGAGACTATAGAGATATATGCATA  
GGTGATGAAAACGTGATTAAGACGTTAAAATATAGTGGTGATAAAGACGACATTATGGA  
GAAAATACAAGAGAAAATAAAGGCTGTTTTTCCAAGTAGTGCGGCACATCTCACATACC  
TGATGTCAAACCTGGTGGCGCCCTATCGCGCGGCGACTGGTGGGAACAACATGGTAAA  
GATATATGGCATGGAATGATTTGCGCTTTAACCTATAAAGAGACAAGTGGTAGTGCGGA  
AAAGGGTGAAAAACAACACTATTACCCAGGATGGTACTCTGAAAGATGCACTTTTGGATAC  
CGACGGCAAAAAGCCAAAACGTGACTACCAATACACAAGTGTCACTTAAAGAAGATG  
ATAGTGGAGAAAAAGCCGCAATGTCCCGGCCAAAGTGAACCCACTACACTGGCCGA  
CTTCACGCGCCGCCAGCGTACTTCCGCTGGCTGGAAGAGTGGGGCGACGGCTTCTG  
TCGAGAGAGGAAAAACGATTGGCACAATTA AAAAAGATTGCTACGAAGACGGTGGAA  
CAGGTGAAAAACAATACAGCGGTTATGGGGAAGCGTGTGATCGAACAAATACATCAAAT  
GAAGGAGCTTCTGCTGATTTAGAAGGTCCAAGTTGTGCAAATTCTTGTAGTTCTTATAGA  
AAATGGATAGAAAGAAAAAATACGAATTTAAAAACAAGAAAAGGCATATGGTGGACAA  
AAACAAAACCTGCAAAAAGGAACGTAAAGCTGCTGAAAGTAATGATAATGATAACAATTT  
TGCGGAACACCAGAAACAACATGCAATACAGCTGAAGCATTTTTACAAAATTTAGGATCA  
TGTA AAAAGTATAATGGAGAGGGTAAAAAATTTTTGAGAATACAGAGGAAACATTTAAA  
CCTGCAATCGATTGCGAACCATGTTCTGAATTTAAAGTTAAATTAGAAAAGTGTAATTGCG  
GGGAGTGATGCTAAA

**Domain 5\_CIDRbeta1**

D5\_B\_F30 **GAGA** **GGATCC** GATGTTAATGAAGTTGTTAT

D5\_E\_R33 **GAGA** **GAATTC** **TTA** TGCATTACATTGTTTTGACT

**DNA-Sequenz (Oligonukleotide in blau); Länge 519 bp:**

**GATGTTAATGAAGTTGTTAT**GCGTGTTAGTGATAACGCTGAAAGTGGTTTTAAAGGTGAT  
 TTAAAGAGTTCTTGTGAAAACGCACATATTTTTGAAGGTATTAAGAAAATAAATGGAAAT  
 GTCGTAATGTATGTGGTTATATTGTATGTAAACTGGAAGAAGTCAATGGGGAAAAAGATA  
 ATGGTAAAAAATTTTATTAATTAGAGCATTGGTTACACATTGGGTAGATAATTTTTTACA  
 AGATTATAATAAAATTAATAAAAAAATTAACACATGTATGAATAGTAGTGATGCAACCCCA  
 TGTATAAAGGGATGCGTAGATAAATGGATAAAGCTGAAAAAGGATGAATGGGAAGAAAT  
 AAAAAACCTTACCTTGAACAATATAAAAATGGCTATGGAGAAAATTACAATGTGAAAAC  
 ATTTTGGAGAAATTTCAAGATCAACCTGAATTTAAAAAAGCTATAGGACCTTGTCCAACCT  
 TAGATGCTTTCGAGA**AGTCAAACAATGTAATGCA**

## b. Nukleotidabgleich

i. *Vir*-Sequenzen

## Formatted Alignments

```

10          20          30          40          50          60          70
vir5_PDB TA TAA TAAGGGGCTGGAAAAATGCC TCCCCCAAGCTGA TAAACCAGTTC TGCA TAGCATTAAACCGTTTTA
vir5      TA TAA TAAGGGGCTGGAAAAATGCC TCCCCCAAGCTGA TAAACCAGTTC TGCA TAGCATTAAACCGTTTTA
10          20          30          40          50          60          70
vir5_PDB GAAACTTATA TGAAGAAGA TAAAGGCC TCC TCTCA GCGCCTGTCACAA TAAAAACGTTGCC TCTCTGCC
vir5      NAAACTTATA TGAAGAAGA TAAAGGCC TCC TCTCA NCGCCTGTCACAA TAAAAACGTTGCC TCTCTGCC
80          90          100         110         120         130         140
vir5_PDB AGAAA TAGCA TCAC TTCGGTTACCCAAGGCAGTAAC TGGGGGAACTCCCAAAA TAGGGGGTGACTTAGTT
vir5      AGAAA TAGCA TCAC TTCGGTTACCCAAGGCAGTAAC TGGGGGAACTCCCAAAA TAGGGGGTGACTTAGTT
150         160         170         180         190         200         210
vir5_PDB AGAAA TAGCA TCAC TTCGGTTACCCAAGGCAGTAAC TGGGGGAACTCCCAAAA TAGGGGGTGACTTAGTT
vir5      AGAAA TAGCA TCAC TTCGGTTACCCAAGGCAGTAAC TGGGGGAACTCCCAAAA TAGGGGGTGACTTAGTT
220         230         240         250         260         270         280
vir5_PDB CAGGCGGAGCAAAGCAGTTCCACCCA TCAACTCCCCAAAA TA
vir5      CAGGCGGAGCAAAGCAGTTCCACCCA TCAACTCCCCAAAA TA

```

## Formatted Alignments

```

10          20          30          40          50          60          70
vir9_PDB TGTAAA TACTTAAACTACT TGTGTTATA TGACCAAGCAATT TATAA TTT ACTTTC TGGTTACACTAC ATATA
vir9      TGTAAA TACTTAAACTACT TGTGTTATA TGACCAAGCAATT TATAA AAC ACTTTC TGGTTACACTAC CA TAT
10          20          30          40          50          60          70
vir9_PDB CACTGTACA T TGAAC TTCAAAAA TTGTA TGA TGAG CA TAA TTTG GATTT GG TAAATGTAA TGA GCATAA
vir9      CACTGTACA G TGAAC TTCAAAAA TTGTA TGA TGAG A A A G TTTG A A TTT A A TAAATGTAA C G A C CATAA
80          90          100         110         120         130         140
vir9_PDB CACTGTACA TGAAC TTCAAAAA TTGTA TGA TGAG A A TTTG A A TTT A A TAAATGTAA C G A C CATAA
vir9      CACTGTACA TGAAC TTCAAAAA TTGTA TGA TGAG A A TTTG A A TTT A A TAAATGTAA C G A C CATAA
150         160         170         180         190         200         210
vir9_PDB AGAG G ACGTTAA T T A TGAAAC T T A T A A A A A C T T A A T G A A C T A A T T A C A C T A T A C A A G G A T T T T G A T A C A
vir9      AGAG T ACGTTAA A G A T G A A A C A T A T A T A A A G C T T A A T G A A C T A A T T A C A C T A T A C A A G G A T T T T G A T G A A
150         160         170         180         190         200         210
vir9_PDB AGAG ACGTTAA ATGAAAC TATA AAA CTTAATGAACTAATTACACTATACAAGGATTTTGA T A C A
vir9      AGAG ACGTTAA ATGAAAC TATA AAA CTTAATGAACTAATTACACTATACAAGGATTTTGA T A C A
220         230         240         250         260         270         280
vir9_PDB TA TAAAAGCA TCAAGTGA T CCAAAAAGA GA A TAA T GAA TGTAAA TGTG T T C G A AAA TGTGCAAATTC A TATA
vir9      TA TAAAAGCA TCAAGTGA G A CCAAAAAGA A G A TAA A GAA TGTAAA TGTG C T T G G AAA TGTGCAAATTC T TATA
220         230         240         250         260         270         280
vir9_PDB TA TAAAAGCA TCAAGTGA CCAAAAAGA A TAA GAA TGTAAA TGTG T G AAA TGTGCAAATTC TATA
vir9      TA TAAAAGCA TCAAGTGA CCAAAAAGA A TAA GAA TGTAAA TGTG T G AAA TGTGCAAATTC TATA
290         300         310         320         330         340         350
vir9_PDB AAA C GTACA T A AAGA A ATGTGAAGA TGGCACTCAACGA A A TTA TTGTGAAGCACTAGAAAGAA TTTAGA
vir9      AAA A GTACA T G AAGA T ATGTGAAGA TGGCACTCAACGA G A TTA TTGTGAAGCACTAGAAAGAA TTTAGA
290         300         310         320         330         340         350
vir9_PDB AAA GTACAT AAGA ATGTGAAGA TGGCACTCAACGA ATTA TTGTGAAGCACTAGAAAGAA TTTAGA
vir9      AAA GTACAT AAGA ATGTGAAGA TGGCACTCAACGA ATTA TTGTGAAGCACTAGAAAGAA TTTAGA

```

## Formatted Alignments

```

      10          20          30          40          50          60          70
vir14_PDB  CGTTGTTATGATTTAAATTA TGGTTATATGATGATGTA TATAAAAAATCTT GAATCATC AAATAACA ATG
vir14      CGTTGTTATGATTTAAATTA C TGGTTATAT AT A GT TATAAAAAATCTT AATCATC A A AT
      80          90          100         110         120         130         140
vir14_PDB  A T A C C G A T T A T T T T A A A G A T A T T T C T A C A A G C T T C A A G A G A T A T G G A A A A A T A T T G T T G A T A A T G A G T T
vir14      T T A T A - - - T A C T T T A A T G A G A T T A C T A C T G A T C T T A A A G A G A T A T G G A A A A A G A T C G T C G A T G A T G T G T T
      TA TA TTTAA GA ATT CTAC A CTT AA GAGTATGGAAAAA AT GT GAT ATG GTT
      150         160         170         180         190         200         210
vir14_PDB  T A A A G A T A G A C T T T A T C A G T G T T A T C C A G A T A A A G A A C T A C T A C T T T A A C A T G G G T T A T T T A C A A G A A A T T
vir14      T A G A A A T G A C C A T T A T A A A T G T T A T C C A G A T A A A A A G T A C T T G T T A A C A T G G G T T C T T G C A A G A A A T T
      TA A AT C TTAT A TGTTATCC GAT AA A TACT TTAACATGGG T TT CAAGAAAT
      220         230         240         250         260         270         280
vir14_PDB  A A A G A T T T A T T T G A T T T T A C G A A G A T T A T A A T G A A A T G A A A A A G G A A A T T A T T G C A G A T A C T T C T G G T T
vir14      A A G A T T T A T T T G A T T T T A T G A A G A T T T A A T G A A A T G A A A A A G G A A A T C G T T G A T G A T A C T T A T A A T T
      AA GATTTATTTGATTTTAA GAAGATT TAATGAAATGAAAAAGGAAAT TTG GATACTT T TT
      290         300         310         320         330         340         350
vir14_PDB  C A T G T C G T A G A T A T G T T G A A T A C C T T A A A C A A A G A
vir14      C A T G C T T T A A A T A T G T T G A A T A C C T T A A A C A A A G A
      CATG TA ATATGTTGAATACCTTAAACAAAGA

```

## Formatted Alignments

```

      10          20          30          40          50          60          70
vir30_PDB  TGTGATTCCTTTTCTAGTGCTACGGCATCTCAATTAGGAGATAAAAGAAAATGCAAAAATATAATGTGAAA
vir30      TGTGATTCCTTTTCTAGTGCTACGGCATCTCAATTAGGAGATAAAAGAAAATGCAAAAATATAATGTGAAA
      TGTGATTCCTTTTCTAGTGCTACGGCATCTCAATTAGGAGATAAAAGAAAATGCAAAAATATAATGTGAAA
      80          90          100         110         120         130         140
vir30_PDB  T A T T T A C A A A A C T A T G T A A T C A T T T C C C C A A T T G T A A A A A C A A G A A C A G A A T A C T A G T T A T A A A C A A A A
vir30      T A T T T A C A A A A C T A T G T A A T C A T T T C C C C A A T T G T A A A A G A G C A A G A C A G A G A T A C T A G T T A T A A A C A A A A
      T A T T T A C A A A A C T A T G T A A T C A T T T C C C C A A T T G T A A A A A C A A G A A C A G A T A C T A G T T A T A A A C A A A A
      150         160         170         180         190         200         210
vir30_PDB  T T G T G G G C T G T T A A A T T A T T G G T T A A A T A T G A A A T T G A A C G A T G A T A A A A T T A A T G G A A A A A C A T G T G T T
vir30      T T G T G G G C T G T T A A A T T A T T G G T T A A A T A T G A A A T T G A A C G A C G A T A A A A T T A A T G G A A A A A C A T G T G T T
      T T G T G G G C T G T T A A A T T A T T G G T T A A A T A T G A A A T T G A A C G A G A T A A A A T T A A T G G A A A A A C A T G T G T T
      220         230         240         250         260         270         280
vir30_PDB  T T A G A A A T C G A A A A T A C T A T A C A G A G T C A G T G T T C T G A T A T A T T C G A A T T T A A T T C G A T T C A T T A A A T T
vir30      T C A G A A A T C G A A A A T C T T A T A C A G A G T C A T T G T T C T G A T A T A T T T G A T T T A G T T C A T T C A T T A G A T T
      T A G A A A T C G A A A A T T A T A C A G A G T C A T G T T C T G A T A T A T T G A T T T A T T A T T A T T A T T C A T T A T T A T T
      290         300         310         320         330         340         350
vir30_PDB  T T T T A T A C G A C A T T A A A A A G G A A G A A C T T C A T A A A A T G A A T A T A T T A T A T A G T T T A T A T C A G A A C T A T A G
vir30      T T T T A T A C G A C A T T A A A A A A A A A G A A C T T C A T A A A A T G A A T A T A T T A T A T A G T T T A T A T C A G A A C T A T A G
      T T T T A T A C G A C A T T A A A A A A A G A A C T T C A T A A A A T G A A T A T A T T A T A T A G T T T A T A T C A G A A C T A T A G
      360         370         380         390         400         410         420
vir30_PDB  T A A A C T T
vir30      T A A A C T T
      T A A A C T T

```

## ii. MAL6P1.252-Sequenzen

## Formatted Alignments

```

10          20          30          40          50          60          70
D1_DB      A C A T A C A G T A G T G C C A A G G A C C T T T T G G A A G A C A T T G G A G A A A G T G T G C A G A A A G A A G C A A A A A A G C A A G
MAL6P1.252_D1 A C A T A C A G T A G T G C C A A G G A C C T T T T G G A A G A C A T T G G A G A A A G T G T G C A G A A A G A A G C A A A A A A G C A A G
A C A T A C A G T A G T G C C A A G G A C C T T T T G G A A G A C A T T G G A G A A A G T G T G C A G A A A G A A G C A A A A A A G C A A G

80          90          100         110         120         130         140
D1_DB      C T C T T G G A C G T A G T G A G A G T G T T T T G C A T G G C T T G T T G T C A A A T G C A A C A A T T A A A G G T G T G A A A A A C A A
MAL6P1.252_D1 C T C T T G G A C G T A G T G A G A G T G T T T T G C A T G G C T T G T T G T C A A A T G C A A C A A T T A A A G G T G T G A A A A A C A A
C T C T T G G A C G T A G T G A G A G T G T T T T G C A T G G C T T G T T G T C A A A T G C A A C A A T T A A A G G T G T G A A A A A C A A

150         160         170         180         190         200         210
D1_DB      A G C C A C A A A A C C A A T C C A A C T T G A A T A T G A A T A T C A C A C T A A C G T T A C C G G T G G T T T T G A T A A A A A T A A T
MAL6P1.252_D1 A G C C A C A A A A C C A A T C C A A C T T G A A T A T G A A T A T C A C A C T A A C G T T A C C G G T G G T T T T G A T A A A A A T A A T
A G C C A C A A A A C C A A T C C A A C T T G A A T A T G A A T A T C A C A C T A A C G T T A C C G G T G G T T T T G A T A A A A A T A A T

220         230         240         250         260         270         280
D1_DB      C C T T G C G C A A A T A G G T T G G A C G T C C G A T T T T C C G A T A T A T A T G G A G G T C A A T G T A C T G A T A A T A A A A T A A
MAL6P1.252_D1 C C T T G C G C A A A T A G G T T G G A C G T C C G A T T T T C C G A T A T A T A T G G A G G T C A A T G T A C T G A T A A T A A A A T A A
C C T T G C G C A A A T A G G T T G G A C G T C C G A T T T T C C G A T A T A T A T G G A G G T C A A T G T A C T G A T A A T A A A A T A A

290         300         310         320         330         340         350
D1_DB      A T G G A A A T G A T G A T G A A A C T G G T G G A A C G T G T G C T C C A T T A A G G A G G T T A T T T C T A T G T G A T C A G C A T T T
MAL6P1.252_D1 A T G G A A A T G A T G A T G A A A C T G G T G G A A C G T G T G C T C C A T T A A G G A G G T T A T T T C T A T G T G A T C A G C A T T T
A T G G A A A T G A T G A T G A A A C T G G T G G A A C G T G T G C T C C A T T A A G G A G G T T A T T T C T A T G T G A T C A G C A T T T

360         370         380         390         400         410         420
D1_DB      G T C G C A C A T G A A G G A A G G T A A T A T T A A T A A C A C A G A T A A T T T A T T A T T A G A G G T G T C T C T T G C A G C A A A
MAL6P1.252_D1 G T C G C A C A T G A A G G A A G G T A A T A T T A A T A A C A C A G A T A A T T T A T T A T T A G A G G T G T C T C T T G C A G C A A A
G T C G C A C A T G A A G G A A G G T A A T A T T A A T A A C A C A G A T A A T T T A T T A T T A G A G G T G T C T C T T G C A G C A A A

430         440         450         460         470         480         490
D1_DB      T A T G A A G G A G A T T C A A T A A T T A A T A A C T A T C C T G T A T A A C C G T G A C A A A A A G A A G G A A T T T G T A C A G C A T
MAL6P1.252_D1 T A T G A A G G A G A T T C A A T A A T T A A T A A C T A T C C T G T A T A A C C G T G A C A A A A A G A A G G A A T T T G T A C A G C A T
T A T G A A G G A G A T T C A A T A A T T A A T A A C T A T C C T G T A T A A C C G T G A C A A A A A G A A G G A A T T T G T A C A G C A T
T A T G A A G G A G A T T C A A T A A T T A A T A A C T A T C C T G T A T A A C C G T G A C A A A A A G A A G G A A T T T G T A C A G C A T

500         510         520         530         540         550         560
D1_DB      T G G C A C G A A G T T T T G C T G A T A T A G G T G A C A T T A T C A G A G G A A A A G A T C T G T T T C T T G G T T A T A C C A A A A
MAL6P1.252_D1 T G G C A C G A A G T T T T G C T G A T A T A G G T G A C A T T A T C A G A G G A A A A G A T C T G T T T C T T G G T T A T A C C A A A A
T G G C A C G A A G T T T T G C T G A T A T A G G T G A C A T T A T C A G A G G A A A A G A T C T G T T T C T T G G T T A T A C C A A A A

570         580         590         600         610         620         630
D1_DB      A G A T G A A A A A G A A A A A G A A A A A G T A C A G A A A A A T T T A A A A G A A T A T T C A A T G A A A T A T A A A A A A A T G
MAL6P1.252_D1 A G A T G A A A A A G A A A A A G T A C A G A A A A A T T T A A A A G A A T A T T C A A T G A A A T A T A A A A A A A T G
A G A T G A A A A A G A A A A A G T A C A G A A A A A T T T A A A A G A A T A T T C A A T G A A A T A T A A A A A A A T G
A G A T G A A A A A G A A A A A G T A C A G A A A A A T T T A A A A G A A T A T T C A A T G A A A T A T A A A A A A A T G

640         650         660         670         680         690         700
D1_DB      C A A G A T C C T G C A A A A T C T C A T T A T A G T G G T G A T T C T T C A G A T T T T T A T A A A C T A A G A G A A G A T T G G T G G G
MAL6P1.252_D1 C A A G A T C C T G C A A A A T C T C A T T A T A G T G G T G A T T C T T C A G A T T T T T A T A A A C T A A G A G A A G A T T G G T G G G
C A A G A T C C T G C A A A A T C T C A T T A T A G T G G T G A T T C T T C A G A T T T T T A T A A A C T A A G A G A A G A T T G G T G G G

710         720         730         740         750         760         770
D1_DB      C A C T T A A T A G A A A A G A G G T A T G G A A A G C T A T C A C A T G T A A A G C A A A A A T G A T G C T G A A T A T T T T A G A A
MAL6P1.252_D1 C A C T T A A T A G A A A A G A G G T A T G G A A A G C T A T C A C A T G T A A A G C A A A A A T G A T G C T G A A T A T T T T A G A A
C A C T T A A T A G A A A A G A G G T A T G G A A A G C T A T C A C A T G T A A A G C A A A A A T G A T G C T G A A T A T T T T A G A A A

780         790         800         810         820         830         840
D1_DB      A A A A G A T T C T G A T G G A A A A C A T T G C T C T G T T C A A A A T T G C A A A T G C G T T G A T G G A G A T C C T C C T A C A A A T
MAL6P1.252_D1 A A A A G A T T C T G A T G G A A A A C A T T G C T C T G T T C A A A A T T G C A A A T G C G T T G A T G G A G A T C C T C C T A C A A A T
A A A A G A T T C T G A T G G A A A A C A T T G C T C T G T T C A A A A T T G C A A A T G C G T T G A T G G A G A T C C T C C T A C A A A T

850         860         870         880         890         900         910
D1_DB      C T A G A C T A C G T T C C T C A A C A T T T A C G T T G G T T T G A T G A A T G G A G C G A A G A A T T T T G T A G A A A A A G A A A A G
MAL6P1.252_D1 C T A G A C T A C G T T C C T C A A C A T T T A C G T T G G T T T G A T G A A T G G A G C G A A G A A T T T T G T A G A A A A A G A A A A G
C T A G A C T A C G T T C C T C A A C A T T T A C G T T G G T T T G A T G A A T G G A G C G A A G A A T T T T G T A G A A A A A G A A A A G

920         930         940         950         960         970         980
D1_DB      A T C A A T T A A A A A T T T C T T T A G A G A A T G T C G T G G A A A A A A T A A A G A T A A A T A T T G T A G T C T T A A T G G A T G
MAL6P1.252_D1 A T C A A T T A A A A A T T T C T T T A G A G A A T G T C G T G G A A A A A A T A A A G A T A A A T A T T G T A G T C T T A A T G G A T G
A T C A A T T A A A A A T T T C T T T A G A G A A T G T C G T G G A A A A A A T A A A G A T A A A T A T T G T A G T C T T A A T G G A T G

990         1000        1010        1020        1030        1040        1050
D1_DB      C A A C T G T A A A A C A A C T G T T A G A G G A A A A A A A A A A A T T C G A T T A T C A A C A A G A A T G T A A T G A C T G T T T G G T T
MAL6P1.252_D1 C A A C T G T A A A A C A A C T G T T A G A G G A A A A A A A A A A A T T C G A T T A T C A A C A A G A A T G T A A T G A C T G T T T G G T T
C A A C T G T A A A A C A A C T G T T A G A G G A A A A A A A A A A A T T C G A T T A T C A A C A A G A A T G T A A T G A C T G T T T G G T T
C A A C T G T A A A A C A A C T G T T A G A G G A A A A A A A A A A A T T C G A T T A T C A A C A A G A A T G T A A T G A C T G T T T G G T T

1060        1070        1080        1090        1100        1110        1120
D1_DB      G C A T G T G A T C C T T T C G T A C A T T G G A T A G A T A A C G A A A A A A C T A G A A T T T T T A A A A C A A A A A A A A A A T A T A
MAL6P1.252_D1 G C A T G T G A T C C T T T C G T A C A T T G G A T A G A T A A C G A A A A A A C T A G A A T T T T T A A A A C A A A A A A A A A A T A T A
G C A T G T G A T C C T T T C G T A C A T T G G A T A G A T A A C G A A A A A A C T A G A A T T T T T A A A A C A A A A A A A A A A T A T A
G C A T G T G A T C C T T T C G T A C A T T G G A T A G A T A A C G A A A A A A C T A G A A T T T T T A A A A C A A A A A A A A A A T A T A

1130        1140        1150        1160        1170        1180        1190
D1_DB      A A A A T G A A A T A A A A G A A A G A A C C T A C A A A A A A A A C A T C A C A T G G A A C T A T C A A T A A T A T G T A T G C C A A
MAL6P1.252_D1 A A A A T G A A A T A A A A G A A A G A A C C T A C A A A A A A A A C A T C A C A T G G A A C T A T C A A T A A T A T G T A T G C C A A
A A A A T G A A A T A A A A G A A A G A A C C T A C A A A A A A A A C A T C A C A T G G A A C T A T C A A T A A T A T G T A T G C C A A
A A A A T G A A A T A A A A G A A A G A A C C T A C A A A A A A A A C A T C A C A T G G A A C T A T C A A T A A T A T G T A T G C C A A

```

```

D1_DB      1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260
MAL6P1.252_D1  A G A G T T T T A T G A A A C A C T G G A A A A G G A A C A T A G A A C T G T C G A T A C A T T T T A A A A T T A T T A A A T G A A G A A
A G A G T T T T A T G A A A C A C T G G A A A A G G A A C A T A G A A C T G T C G A T A C A T T T T A A A A T T A T T A A A T G A A G A A
A G A G T T T T A T G A A A C A C T G G A A A A G G A A C A T A G A A C T G T C G A T A C A T T T T A A A A T T A T T A A A T G A A G A A

D1_DB      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330
MAL6P1.252_D1  A A A G A A T G T A A A A A T C A C C C T G A A G T A G G A G A G G G A A A A A A A C T T T T A T T G A C T T T A A T G A T A A T A T C G
A A A G A A T G T A A A A A T C A C C C T G A A G T A G G A G A G G G A A A A A A A C T T T T A T T G A C T T T A A T G A T A A T A T C G
A A A G A A T G T A A A A A T C A C C C T G A A G T A G G A G A G G G A A A A A A A C T T T T A T T G A C T T T A A T G A T A A T A T C G

D1_DB      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
MAL6P1.252_D1  A A A C A T T T T C T C A T A C A A A A A T T T G C G A A C C T T G C C C T T G G T G T G G A G T G
A A A C A T T T T C T C A T A C A A A A A T T T G C G A A C C T T G C C C T T G G T G T G G A G T G
A A A C A T T T T C T C A T A C A A A A A T T T G C G A A C C T T G C C C T T G G T G T G G A G T G
    
```

Formatted Alignments

```

D2_DB      10      20      30      40      50      60      70
MAL6P1.252_D2  G A T A A A G A T A C T A C T G A T A T A T C A A T A C T T T C C A C T G A T A G A G C A A A A A A A A A T A T T T T A C A A A A A T T A G
G A T A A A G A T A C T A C T G A T A T A T C A A T A C T T T C C A C T G A T A G A G C A A A A A A A A A T A T T T T A C A A A A A T T A N
G A T A A A G A T A C T A C T G A T A T A T C A A T A C T T T C C A C T G A T A G A G C A A A A A A A A A T A T T T T A C A A A A A T T A

D2_DB      80      90      100      110      120      130      140
MAL6P1.252_D2  A A A A T T T T T G C A G A G A T A C T G A G C A T A T T A A T C A T G A T A T T T G G A A A T G T C A T T A T G A G A A T A C T G A T A A
A A A A T T T T T G C A G A G A T A C T G A G C A T A T T A A T C A T G A T A T T T G G A A A T G T C A T T A T G A G A A T A C T G A T A A
A A A A T T T T T G C A G A G A T A C T G A G C A T A T T A A T C A T G A T A T T T G G A A A T G T C A T T A T G A G A A T A C T G A T A A

D2_DB      150      160      170      180      190      200      210
MAL6P1.252_D2  T G A T A A T T G C A T A C T A C A A A A T G A G A A C A C G G G C T C A G A A A A A C A A A A A T T A T G C C C T T T G A T G C A T T T
T G A T A A T T G C A T A C T A C A A A A T G A G A A C A C G G G C T C A G A A A A A C A A A A A T T A T G C C C T T T G A T G C A T T T
T G A T A A T T G C A T A C T A C A A A A T G A G A A C A C G G G C T C A G A A A A A C A A A A A T T A T G C C C T T T G A T G C A T T A

D2_DB      220      230      240      250      260      270      280
MAL6P1.252_D2  T T T T T C C T T T G G C T A A C A C A A A A T G T T A G A T G A T T C T A T A G A A T G G A G A A A A A A C T T A A A A C C T G T A T A A
T T T T T C C T T T G G C T A A C A C A A A A T G T T A G A T G A T T C T A T A G A A T G G A G A A A A A A C T T A A A A C C T G T A T A A
T T T T T C C T T T G G C T A A C A C A A A A T G T T A G A T G A T T C T A T A G A A T G G A G A A A A A A C T T A A A A C C T G T A T A A

D2_DB      290      300      310      320      330      340      350
MAL6P1.252_D2  A T A A T G A A A A A C C A A C T A A T T G T A T A C G G G G T T G T A A A A A G C C C T G C G A A T G T T T T G A A A G A T G G G T T G A
A T A A T G A A A A A C C A A C T A A T T G T A T A C G G G G T T G T A A A A A G C C C T G C G A A T G T T T T G A A A G A T G G G T T G A
A T A A T G A A A A A C C A A C T A A T T G T A T A C G G G G T T G T A A A A A G C C C T G C G A A T G T T T T G A A A G A T G G G T T G A

D2_DB      360      370      380      390      400      410      420
MAL6P1.252_D2  A C A A A A A G A A G A A G A A T G G A T T T C A A T T G A A A A A C A T T T T G A C A A A C A A A G A G A T A T A T C A G A A G A A G A A
A C A A A A A G A A G A A G A A T G G A T T T C A A T T G A A A A A C A T T T T G A C A A A C A A A G A G A T A T A T C A G A A G A A G A A
A C A A A A A G A A G A A G A A T G G A T T T C A A T T G A A A A A C A T T T T G A C A A A C A A A G A G A T A T A T C A G A A G A A G A A

D2_DB      430      440      450      460      470      480      490
MAL6P1.252_D2  C G T T A T A T A A C A C T T G A A T A T A T T T T G A A T G A A T T T T T T A T G G A T A A A A T T G A A A A A G C T T A T G G A A T A G
C G T T A T A T A A C A C T T G A A T A T A T T T T G A A T G A A T T T T T A T G G A T A A A A T T G A A A A A G C T T A T G G A A T A G
C G T T A T A T A A C A C T T G A A T A T A T T T T G A A T G A A T T T T T A T G G A T A A A A T T G A A A A A G C T T A T G G A A T A G

D2_DB      500      510      520      530      540      550      560
MAL6P1.252_D2  A A A A A T C A A A A A G A A T T A A A A G G A G A A A T T A A A A T C A A A T A A A G G T C A C G G A A T T A T A A G A G A T A C A G A A C A
A A A A A T C A A A A A G A A T T A A A A G G A G A A A T T A A A A T C A A A T A A A G G T C A C G G A A T T A T A A G A G A T A C A G A A C A
A A A A A T C A A A A A G A A T T A A A A G G A G A A A T T A A A A T C A A A T A A A G G T C A C G G A A T T A T A A G A G A T A C A G A A C A

D2_DB      570      580      590      600      610      620      630
MAL6P1.252_D2  T T C A C A G G A T G C A A T A A A A A T A T T G C T A G A A C A T G A A T T A G A A G A T G C A A A A A A A T G C A C A G A A A C C C A T
T T C A C A G G A T G C A A T A A A A A T A T T G C T A G A A C A T G A A T T A G A A G A T G C A A A A A A A T G C A C A G A A A C C C A T
T T C A C A G G A T G C A A T A A A A A T A T T G C T A G A A C A T G A A T T A G A A G A T G C A A A A A A A T G C A C A G A A A C C C A T

D2_DB      640      650      660      670      680      690      700
MAL6P1.252_D2  A A T G A T G A A A A A T G T A A A G A A C A A G A A G A G A G C G G A G G T C G C T C T T T A A A C C C G G A T
A A T G A T G A A A A A T G T A A A G A A C A A G A A G A G A G C G G A G G T C G C T C T T T A A A C C C G G A T
A A T G A T G A A A A A T G T A A A G A A C A A G A A G A G A G C G G A G G T C G C T C T T T A A A C C C G G A T
    
```

Formatted Alignments

```

D3_DB      10          20          30          40          50          60          70
MAL6P1.252_D3  AAGAAACAATTGGGTAGTAGTAGTAGTAGGGCAATTGAAGGCTCATGCACATCTAGGAACATAAACAATA
AAGAAACAATTGGGTAGTAGTAGTAGTAGGGCAATTGAAGGCTCATGCACATCTAGGAACATAAACAATA

D3_DB      80          90          100         110         120         130         140
MAL6P1.252_D3  CCAATAAACCGGATGATTTCAAAACAATAGTAAAAAACAAGGATCATTTCCAATGCTACCCATAACTA
CCAATAAACCGGATGATTTCAAAACAATAGTAAAAAACAAGGATCATTTCCAATGCTACCCATAACTA

D3_DB      150         160         170         180         190         200         210
MAL6P1.252_D3  TCCGCAAGGACCATGTCTATGGAAAAAATAACGATAAACTATGTTTAAAGACAGAAGAAGGTTGGAAACC
TCCGCAAGGACCATGTCTATGGAAAAAATAACGATAAACTATGTTTAAAGACAGAAGAAGGTTGGAAACC

D3_DB      220         230         240         250         260         270         280
MAL6P1.252_D3  GGGAAACAGATAAAATATGAACGACGAAACCGCTTTATGCCTCCTCGACGTCAACAATTTTTGTACATCGA
GGGAAACAGATAAAATATGAACGACGAAACCGCTTTATGCCTCCTCGACGTCAACAATTTTTGTACATCGA

D3_DB      290         300         310         320         330         340         350
MAL6P1.252_D3  ATTTAGAAATTTAGAAACGGCTGACAGAACACTTAATGGTATTGGTGACGATCCATAATGTTCTTAATCA
ATTTAGAAATTTAGAAACGGCTGACAGAACACTTAATGGTATTGGTGACGATCCATAATGTTCTTAATCA

D3_DB      360         370         380         390         400         410         420
MAL6P1.252_D3  TTCCTTTTTAGGTGATGTTCTGCTCGCAGCAAAAGTTTGAGGCAGATTTCAAAAAAGAGAAGTATAATGAG
TTCCTTTTTAGGTGATGTTCTGCTCGCAGCAAAAGTTTGAGGCAGATTTCAAAAAAGAGAAGTATAATGAG

D3_DB      430         440         450         460         470         480         490
MAL6P1.252_D3  CAATCTAACTATAAAGGACTTTTCAACTATAATGTAGAGCAATGAAATATAGTTTTGCGGACCTTGGAGATA
CAATCTAACTATAAAGGACTTTTCAACTATAATGTAGAGCAATGAAATATAGTTTTGCGGACCTTGGAGATA

D3_DB      500         510         520         530         540         550         560
MAL6P1.252_D3  TAA T T A A A G G A A C A G A T T T A T G G G A T A A G A A T G G T G G C G A A C A A A A A A C A C A A G G A A A G T T G G A A A A A A T
T A A T T A A A G G A A C A G A T T T A T G G G A T A A G A A T G G T G G C G A A C A A A A A A C A C A A G G A A A G T T G G A A A A A A T

D3_DB      570         580         590         600         610         620         630
MAL6P1.252_D3  A T T C T G T A A A A T T A A A A A C A A A C T T C C T G A A G A T A T C C A A G A A A A A T A T A T C A A T G A T G A C A A A A A T T C A
A T T C T G T A A A A T T A A A A A C A A A C T T C C T G A A G A T A T C C A A G A A A A A T A T A T C A A T G A T G A C A A A A A T T C A

D3_DB      640         650         660         670         680         690         700
MAL6P1.252_D3  C C C C A A T A T A A A A A T T A C G A G A A G A T T G G T G G G A G G C A A A C A G A A A A G A A G T T T G G A G A G C T A T G A C C T
C C C C A A T A T A A A A A T T A C G A G A A G A T T G G T G G G A G G C A A A C A G A A A A G A A G T T T G G A G A G C T A T G A C C T

D3_DB      710         720         730         740         750         760         770
MAL6P1.252_D3  G T G C A A C A A C C A G T G G A A A A T C C C A T G C A G T A T T G T C A C A C C A C T T G A T G A T T A C A T T C C T C A A A G A T T
G T G C A A C A A C C A G T G G A A A A T C C C A T G C A G T A T T G T C A C A C C A C T T G A T G A T T A C A T T C C T C A A A G A T T

D3_DB      780         790         800         810         820         830         840
MAL6P1.252_D3  A C G T T G G A T G A C T G A A T G G T C C G A A T G G T T T T G C A A A G A G C A G T C G A A A C T G T A T G G A G A G T T G G T G A A G
A C G T T G G A T G A C T G A A T G G T C C G A A T G G T T T T G C A A A G A G C A G T C G A A A C T G T A T G G A G A G T T G G T G A A G

D3_DB      850         860         870         880         890         900         910
MAL6P1.252_D3  G A T T G T G C A A G T T G T A A G A A A A A G G G T A A A G A A A A T G T A C A C A A G G C G A T A A T G A C T G T A C A C C G T G T G
G A T T G T G C A A G T T G T A A G A A A A A G G G T A A A G A A A A T G T A C A C A A G G C G A T A A T G A C T G T A C A C C G T G T G

D3_DB      920         930         940         950         960         970         980
MAL6P1.252_D3  A T A A A A A T G T A A A G A A T A T G G A A A A A A A A T A A G A A C A T G G A A A G A T C A A T G G A C A A A A T G G A T G G A A T
A T A A A A A T G T A A A G A A T A T G G A A A A A A A A T A A G A A C A T G G A A A G A T C A A T G G A C A A A A T G G A T G G A A T

D3_DB      990         1000        1010        1020        1030        1040        1050
MAL6P1.252_D3  A T A C C A A A T G T T A T A C C T A C A A G C A C A A A C T A C T G C T C G T A A T G C T G G T G A T A C T G C T T T T G A T A A T C C C
A T A C C A A A T G T T A T A C C T A C A A G C A C A A A C T A C T G C T C G T A A T G C T G G T G A T A C T G C T T T T G A T A A T C C C

D3_DB      1060        1070        1080        1090        1100        1110        1120
MAL6P1.252_D3  A A C G A T C A A T A T G T G A T T G A T T T C T C A A A A A A T T A C A A A A A G C A A A T G G T G A T A A C A A T T T T G G T G T C A
A A C G A T C A A T A T G T G A T T G A T T T C T C A A A A A A T T A C A A A A A G C A A A T G G T G A T A A C A A T T T T G G T G T C A

D3_DB      1130        1140        1150        1160        1170        1180        1190
MAL6P1.252_D3  A C A C C T C C C C G T A C T T C A C C C A G C A G G G T A C A T C C A C C A G G A G G C A C G T G T A G G T G A A T G C G A A G T A C A
A C A C C T C C C C G T A C T T C A C C C A G C A G G G T A C A T C C A C C A G G A G G C A C G T G T A G G T G A A T G C G A A G T A C A

D3_DB      1200        1210        1220        1230        1240        1250        1260
MAL6P1.252_D3  A A A A C A T T T T T G T A A T A A T A A C G G C A A C C A G G A T A A A T A T T C C T T T
A A A A C A T T T T T G T A A T A A T A A C G G C A A C C A G G A T A A A T A T T C C T T T

```

## Formatted Alignments

```

D4_DB      10      20      30      40      50      60      70
MAL6P1.252_D4 GGTGAAAAAAGTGGTGA TAAGGGTGCCATA TGTGTGCCA CCCAGGAGGCGACGACTATACATACACGATT
GGTGAAAAAAGTGGTGA TAAGGGTGCCATA TGTGTGCCN CCCAGGAGGCGACGACTATACATACACGATT
GGTGAAAAAAGTGGTGA TAAGGGTGCCATA TGTGTGCC CCCAGGAGGCGACGACTATACATACACGATT

D4_DB      80      90      100     110     120     130     140
MAL6P1.252_D4 TACAA TCAC TAGACGAGAAGCCGAGCGGATACCGCGCTACGTGATTGGTTTGTGAAAAAGTGCCGCGGTTGA
TACAA TCAC TAGACGAGAAGCCGAGCGGATACCGCGCTACGTGATTGGTTTGTGAAAAAGTGCCGCGGTTGA
TACAA TCAC TAGACGAGAAGCCGAGCGGATACCGCGCTACGTGATTGGTTTGTGAAAAAGTGCCGCGGTTGA

D4_DB      150     160     170     180     190     200     210
MAL6P1.252_D4 GACGTTTTTTCCTATGGCATA GATACAAAAAACAAGGAAAAAGAAACCACAGGAAAGGGTCACTACTTTTCC
GACGTTTTTTCCTATGGCATA GATACAAAAAACAAGGAAAAAGAAACCACAGGAAAGGGTCACTACTTTTCC
GACGTTTTTTCCTATGGCATA GATACAAAAAACAAGGAAAAAGAAACCACAGGAAAGGGTCACTACTTTTCC

D4_DB      220     230     240     250     260     270     280
MAL6P1.252_D4 GGGTCAACACTACTTAGCCAGTTCAGCATA GACCTCGGTGATGAGGAAACAGCCCCCGAAAAACAATTGG
GGGTCAACACTACTTAGCCAGTTCAGCATA GACCTCGGTGATGAGGAAACAGCCCCCGAAAAACAATTGG
GGGTCAACACTACTTAGCCAGTTCAGCATA GACCTCGGTGATGAGGAAACAGCCCCCGAAAAACAATTGG

D4_DB      290     300     310     320     330     340     350
MAL6P1.252_D4 CTGGTGGCAAAAATACCTGATGATTTCTTGGCGCAAAATGTTCTACACATTTGGGAGACTATAGAGATATA TG
CTGGTGGCAAAAATACCTGATGATTTCTTGGCGCAAAATGTTCTACACATTTGGGAGACTATAGAGATATA TG
CTGGTGGCAAAAATACCTGATGATTTCTTGGCGCAAAATGTTCTACACATTTGGGAGACTATAGAGATATA TG

D4_DB      360     370     380     390     400     410     420
MAL6P1.252_D4 CATAGGTGATGAAAAACGTGATTAAGACGTTAAAAATATAGTGGTGA TAAAGACGACATTA TGGAGAAAAATA
CATAGGTGATGAAAAACGTGATTAAGACGTTAAAAATATAGTGGTGA TAAAGACGACATTA TGGAGAAAAATA
CATAGGTGATGAAAAACGTGATTAAGACGTTAAAAATATAGTGGTGA TAAAGACGACATTA TGGAGAAAAATA

D4_DB      430     440     450     460     470     480     490
MAL6P1.252_D4 CAAGAGAAAAATAAAGGCTGTTTTTCCAAC TAGTGGCGGCACATCTCACATACCTGATGTCAAACCTGGTG
CAAGAGAAAAATAAAGGCTGTTTTTCCAAC TAGTGGCGGCACATCTCACATACCTGATGTCAAACCTGGTG
CAAGAGAAAAATAAAGGCTGTTTTTCCAAC TAGTGGCGGCACATCTCACATACCTGATGTCAAACCTGGTG

D4_DB      500     510     520     530     540     550     560
MAL6P1.252_D4 GCGCCCTATCGCGCGGGCGACTGGTGGGAAACAACATGGTAAAGATA TATGGCATGGAATGATTTGCGCTTT
GCGCCCTATCGCGCGGGCGACTGGTGGGAAACAACATGGTAAAGATA TATGGCATGGAATGATTTGCGCTTT
GCGCCCTATCGCGCGGGCGACTGGTGGGAAACAACATGGTAAAGATA TATGGCATGGAATGATTTGCGCTTT

D4_DB      570     580     590     600     610     620     630
MAL6P1.252_D4 AACCTATAAAGAGACAAGTGGTAGTGGCGAAAAAGGGTGAAAAACAACATA TTACCCAGGATGGTACTCTG
AACCTATAAAGAGACAAGTGGTAGTGGCGAAAAAGGGTGAAAAACAACATA TTACCCAGGATGGTACTCTG
AACCTATAAAGAGACAAGTGGTAGTGGCGAAAAAGGGTGAAAAACAACATA TTACCCAGGATGGTACTCTG

D4_DB      640     650     660     670     680     690     700
MAL6P1.252_D4 AAAGA TGCAC TTTTGGATACCGACGGCAAAAAGCCAAAACGTGACTACCAA TACACAAGTGTCAACACTTA
AAAGA TGCAC TTTTGGATACCGACGGCAAAAAGCCAAAACGTGACTACCAA TACACAAGTGTCAACACTTA
AAAGA TGCAC TTTTGGATACCGACGGCAAAAAGCCAAAACGTGACTACCAA TACACAAGTGTCAACACTTA

D4_DB      710     720     730     740     750     760     770
MAL6P1.252_D4 AAGAAGA TGA TAGTGGAGAAAAAGCCGCCAAATGTCCC GGCCAAAAGTGGAAACCCACTACACTGGCCGACTT
AAGAAGA TGA TAGTGGAGAAAAAGCCGCCAAATGTCCC GGCCAAAAGTGGAAACCCACTACACTGGCCGACTT
AAGAAGA TGA TAGTGGAGAAAAAGCCGCCAAATGTCCC GGCCAAAAGTGGAAACCCACTACACTGGCCGACTT

D4_DB      780     790     800     810     820     830     840
MAL6P1.252_D4 CACGCGCCGCCAGCGTACTTCCGCTGGCTGGAAAGAGTGGGGCGACGGCTTC TGTGTCGAGAGAGGAAAAAAA
CACGCGCCGCCAGCGTACTTCCGCTGGCTGGAAAGAGTGGGGCGACGGCTTC TGTGTCGAGAGAGGAAAAAAA
CACGCGCCGCCAGCGTACTTCCGCTGGCTGGAAAGAGTGGGGCGACGGCTTC TGTGTCGAGAGAGGAAAAAAA

D4_DB      850     860     870     880     890     900     910
MAL6P1.252_D4 CGA TTGGCACAAA TTA AAAAAGATTGCTACGAAAGACGGTGGAAACAGGTGAAAAACAATACAGCGGTTATG
CGA TTGGCACAAA TTA AAAAAGATTGCTACGAAAGACGGTGGAAACAGGTGAAAAACAATACAGCGGTTATG
CGA TTGGCACAAA TTA AAAAAGATTGCTACGAAAGACGGTGGAAACAGGTGAAAAACAATACAGCGGTTATG

D4_DB      920     930     940     950     960     970     980
MAL6P1.252_D4 GGGAAAGCGTGTGATCGAACAAA TACA TCAAA TGAAGGAGCTTCTGCTGATTTAGAAGGTCCAAGTTGTGC
GGGAAAGCGTGTGATCGAACAAA TACA TCAAA TGAAGGAGCTTCTGCTGATTTAGAAGGTCCAAGTTGTGC
GGGAAAGCGTGTGATCGAACAAA TACA TCAAA TGAAGGAGCTTCTGCTGATTTAGAAGGTCCAAGTTGTGC

D4_DB      990     1000    1010    1020    1030    1040    1050
MAL6P1.252_D4 AAA TTTCTTGTAGTTCTTA TAGAAAA TGGATAGAAAAGAAAAAAA TACGAA TTTAAAAAACAAGAAAAGGCA
AAA TTTCTTGTAGTTCTTA TAGAAAA TGGATAGAAAAGAAAAAAA TACGAA TTTAAAAAACAAGAAAAGGCA
AAA TTTCTTGTAGTTCTTA TAGAAAA TGGATAGAAAAGAAAAAAA TACGAA TTTAAAAAACAAGAAAAGGCA

D4_DB      1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
MAL6P1.252_D4 TATGGTGGACAAAAACA AAC TGCAAAAAGGAACGTAAAGCTGCTGAAAAGTAA TGA TAA TGA TAAACAA T
TATGGTGGACAAAAACA AAC TGCAAAAAGGAACGTAAAGCTGCTGAAAAGTAA TGA TAA TGA TAAACAA T
TATGGTGGACAAAAACA AAC TGCAAAAAGGAACGTAAAGCTGCTGAAAAGTAA TGA TAA TGA TAAACAA T

D4_DB      1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190
MAL6P1.252_D4 TTTGCGGAACACCAGAAACA ACA TGCAAA TACAGCTGAAGCATTTTTACAAAA TTTAGGATCA TGTAAAAA
TTTGCGGAACACCAGAAACA ACA TGCAAA TACAGCTGAAGCATTTTTACAAAA TTTAGGATCA TGTAAAAA
TTTGCGGAACACCAGAAACA ACA TGCAAA TACAGCTGAAGCATTTTTACAAAA TTTAGGATCA TGTAAAAA

```

```

D4_DB      1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260
MAL6P1.252_D4  G T A T A A T G G A G A G G G T A A A A A A A T T T T T G A G A A T A C A G A G G A A A C A T T T A A A C C T G C A A T C G A T T G C G A A
G T A T A A T G G A G A G G G T A A A A A A A T T T T T G A G A A T A C A G A G G A A A C A T T T A A A C C T G C A A T C G A T T G C G A A
G T A T A A T G G A G A G G G T A A A A A A A T T T T T G A G A A T A C A G A G G A A A C A T T T A A A C C T G C A A T C G A T T G C G A A

D4_DB      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330
MAL6P1.252_D4  C C A T G T T C T G A A T T T A A A G T T A A A T T A G A A A A A G T G T A A T T G C G G G A G T G A T G C T A A A
C C A T G T T C T G A A T T T A A A G T T A A A T T A G A A A A A G T G T A A T T G C G G G A G T G A T G C T A A A
C C A T G T T C T G A A T T T A A A G T T A A A T T A G A A A A A G T G T A A T T G C G G G A G T G A T G C T A A A
    
```

Formatted Alignments

```

MAL6P1.252_D5  10      20      30      40      50      60      70
D5_DB          G A T G T T A A T G A A G T T G T T A T G C G T G T T A G T G A T A A C G C T G A A A G T G G T T T A A A G G T G A T T T A A A G A G T T
G A T G T T A A T G A A G T T G T T A T G C G T G T T A G T G A T A A C G C T G A A A G T G G T T T A A A G G T G A T T T A A A G A G T T

MAL6P1.252_D5  80      90      100     110     120     130     140
D5_DB          C T T G T G A A A A C G C A C A T A T T T T T G A A G G T A T T A A A G A A A A T A A A T G G A A A T G T C G T A A T G T A T G T G G T T A
C T T G T G A A A A C G C A C A T A T T T T T G A A G G T A T T A A A G A A A A T A A A T G G A A A T G T C G T A A T G T A T G T G G T T A
C T T G T G A A A A C G C A C A T A T T T T T G A A G G T A T T A A A G A A A A T A A A T G G A A A T G T C G T A A T G T A T G T G G T T A

MAL6P1.252_D5  150     160     170     180     190     200     210
D5_DB          T A T T G T A T G T A A A C T G G A A G A A G T C A A T G G G G A A A A A G A T A A T G G T A A A A A A A T T T T A T T A A T T A G A G C A
T A T T G T A T G T A A A C T G G A A G A A G T C A A T G G G G A A A A A G A T A A T G G T A A A A A A A T T T T A T T A A T T A G A G C A
T A T T G T A T G T A A A C T G G A A G A A G T C A A T G G G G A A A A A G A T A A T G G T A A A A A A A T T T T A T T A A T T A G A G C A

MAL6P1.252_D5  220     230     240     250     260     270     280
D5_DB          T T G G T T A C A C A T T G G G T A G A T A A T T T T T A C A A G A T T A T A A T A A A A T T A A A A A A A A T T A A A C A C A T G T A
T T G G T T A C A C A T T G G G T A G A T A A T T T T T A C A A G A T T A T A A T A A A A T T A A A A A A A A T T A A A C A C A T G T A
T T G G T T A C A C A T T G G G T A G A T A A T T T T T A C A A G A T T A T A A T A A A A T T A A A A A A A A T T A A A C A C A T G T A

MAL6P1.252_D5  290     300     310     320     330     340     350
D5_DB          T G A A T A G T A G T G A T G C A A C C C C A T G T A T A A A G G G A T G C G T A G A T A A A T G G A T A A A G C T G A A A A A G G A T G A
T G A A T A G T A G T G A T G C A A C C C C A T G T A T A A A G G G A T G C G T A G A T A A A T G G A T A A A G C T G A A A A A G G A T G A
T G A A T A G T A G T G A T G C A A C C C C A T G T A T A A A G G G A T G C G T A G A T A A A T G G A T A A A G C T G A A A A A G G A T G A

MAL6P1.252_D5  360     370     380     390     400     410     420
D5_DB          A T G G G A A G A A A T A A A A A A A C C T T A C C T T G A A C A A T A T A A A A A T G G C T A T G G A G A A A A T T A C A A T G T G A A A
A T G G G A A G A A A T A A A A A A A C C T T A C C T T G A A C A A T A T A A A A A T G G C T A T G G A G A A A A T T A C A A T G T G A A A
A T G G G A A G A A A T A A A A A A A C C T T A C C T T G A A C A A T A T A A A A A T G G C T A T G G A G A A A A T T A C A A T G T G A A A

MAL6P1.252_D5  430     440     450     460     470     480     490
D5_DB          A C T A T T T T G G A G A A A T T T C A A G A T C A A C C T G A A T T T A A A A A A A G C T A T A G G A C C T T G T C C A A C T T T A G A T G
A C T A T T T T G G A G A A A T T T C A A G A T C A A C C T G A A T T T A A A A A A A G C T A T A G G A C C T T G T C C A A C T T T A G A T G
A C T A T T T T G G A G A A A T T T C A A G A T C A A C C T G A A T T T A A A A A A A G C T A T A G G A C C T T G T C C A A C T T T A G A T G

MAL6P1.252_D5  500     510     520     530     540     550     560
D5_DB          C T T T C G A G A A G T C A A A A C A A T G T A A T G C A
C T T T C G A G A A G T C A A A A C A A T G T A A T G C A
C T T T C G A G A A G T C A A A A C A A T G T A A T G C A
    
```

### c. Gebrauchsmaterialien und Reaktionskits

Material	Hersteller/Firma
FastPlasmid Mini Kit – 250 Preps	5 Prime
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (250 preps)	Macherey-Nagel
Filmcasette	Rego
High performance chemiluminescence Film	GE Healthcare
Gel Elektrophorese	Peqlab
Blot Membran BA 83	GE Healthcare
SDS Casetten	Novex
Cellophanfolie	Roth
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Objektträger mit Vertiefungen	Thermo Scientific
Deckgläser für Mikroskopie (24 x 55 mm); Stärke 1	Engelbrecht
Discofix Drei-Wege-Hahn	B. Braun Aesculab
Einmalspritzn Injekt®; steril (10 ml)	B. Braun Aesculab
Objektträger, geschnitten (Mattrand); 76 x 26 mm	Engelbrecht
Petrischalen 92 x 16 mm	Sarstedt
Safe-Lock-Tubes (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf
Sterican Einmal-Injektions-Kanüle; Größe 1 (Ø 0,9 x 40 mm)	B. Braun Aesculab
Zellkulturflaschen (50 ml, 25 cm <sup>2</sup> , PS, mit Filterschraubverschluss)	Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen (250 ml, 75 cm <sup>2</sup> , PS, mit Filterschraubverschluss)	Greiner Bio-One
Objektträger mit Vertiefung	Thermo Scientific
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Tissue Culture Coverslips 13 mm (Plastic)	Sarstedt
TC- Platte 24 Well, Standard F	Sarstedt
TC- Platte 96 Well, Standard F	Sarstedt
GP Millipore Express™ PLUS Membrane (0,22 µm)	Millipore
Konisches Röhrchen, 15 ml, besonders klar, PP (17 x 120 mm)	BD Falcon
Konisches Röhrchen, 50 ml, PP (30 x 115 mm)	BD Falcon
Mikro-Schraubröhre (2 ml), PP	Sarstedt

**d. Chemikalien und Reagenzien**

Chemikalien & Reagenzien	Hersteller/Firma
TRIS-HCl	Roth
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	AppliChem
Imidazol	Roth
Harnstoff	Roth
Acrylamid-Lösung (30%) – Mix 37,5:1	AppliChem
Acrylamid 4K-Lösung (40%) – Mix 49:1	AppliChem
Acrylamid 2K-Lösung (30%) – Mix 32:1	AppliChem
TEMED	AppliChem
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
DDT	Sigma Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem
Methanol	Roth
Essigsäure	Roth
Ni-NTA Agarose	MN
5x Green GoTaq Flexi Buffer	Promega
GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (5 u/μl)	Promega
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Promega
Pwo DNA Polymerase (5 u/μl)	Promega
Glycerin (≥ 99,5%)	Roth
Ethanol	Merck
Giemsa's Azur- Eosin- Methylenblaulösung	Merck
GeneRuler 1 kb DNA Ladder 0,5 μg/μl)	Fermentas
Isopropanol	Roth
SDS	Biomol
TRIS base	Roth
TRIS-HCl	Roth
Agarose	Invitrogen
DMSO	Roth
Tween 20	Merck
Milchpulver	Roth
Luminol	Sigma
Hydroxicoumarinsäure	Sigma
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	Merck

Immersol 518 N	Zeiss
Dako Fluorescence Mounting Medium	Dako
TRIZOL®	Ambion/ Life technologies
Ham's F12	PAA bzw. PAN Biotech
Accutase	PAA bzw. PAN Biotech
G418 (Neomycin) (50 mg/ml)	Biochrom
Dako Fluorescence Mounting Medium	Dako
RPMI-1640 + L-Glutamin	AppliChem
HEPES	AppliChem
Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> ; FCS)	PAA
D-Sorbitol	Sigma Aldrich
Gentamicin 40	Hexal
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA bzw. PAN Biotech
Glutaraldehyde	Merck
Hoechst- 33342	Life Technologies

## e. Geräte und Software

Gerät	Hersteller/Firma
Laborwaage precision plus	Ohaus
Elektrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham pharmacia biotech
Tischschüttler PMR-30	Grant bio
Magnetrührer	Janke & Kunkel IKA - Labortechnik
Thermomixer compact	Eppendorf
Centrifuge 5415D	Eppendorf
Centrifuge 5427R	Eppendorf
Centrifuge 5810R	Eppendorf
Vortexer	Janke & Kunkel IKA - Labortechnik
Scanner Epson perfection V700 Photo	Epson
LaminarAir HB 2448 (Labor 7)	Hareus Instrument
GeneAmp PCR System 9700	PE Applied Biosystem
Wasserbad 3047	Köttermann
See-raw rockers SSL4	Stuart
GPKR Centrifuge	Beckman
J2-21 Centrifuge	Beckman
J2-HS Centrifuge	Beckman
Sonorex super	Baadelin
Sonifier 250	Branson
Certomat HK	B Braun Biotech International
pH-Meter CG840	Schott
Wasserbad	GFL
EVOS x1 – transmitted light microscope	AMG
Horizontal-Elektrophoresekammern	peqlab
Innova 4200	Brunswick Scientific
Innova 4230 Incubator Shaker	Brunswick Scientific
BioPhotometer	Eppendorf
Mini-PROTEAN Tetra System	BioRad
Axio Imager.M1	Zeiss
Axio Imager.M2	Zeiss
Axiostar pus (Mikroskop)	Zeiss
CX31 (Mikroskop)	Olympus
Eclipse TS100 (inverses Mikroskop)	Nikon

FluoView FV1000 FL	Olympus
IX81	Olympus
Function Line (Brutschrank mit CO <sub>2</sub> )	Haraeus Instruments
M20 LAUDA (Wasserbad)	Julabo
Neubauer- Zählkammer	Marienfeld
SW 20 (Wasserbad)	Julabo
The Belly Dancer	Stovall Life Science Inc.

Software	Hersteller/Firma
----------	------------------

---

<i>Mac Vector with Assembler</i> Version 12.5.1	Accelrys
Adobe Photoshop CC 2015 64 Bit	Adobe
Axio Vision Rel. 4.7	Zeiss
FLUOVIEW Ver 4.1a	Olympus

## f. Herstellerprotokolle

	PCR clean-up	Gel extraction	DNA clean-up (with SDS)	Single stranded DNA clean-up
<p><b>1</b> <u>PCR clean-up.</u> <u>DNA clean-up, or</u> <u>single stranded DNA</u> <u>clean-up:</u> Adjust binding condition</p> <p><u>Gel extraction:</u> Excise DNA fragment / solubilize gel slice</p>	 200 $\mu$ L NT1/ 100 $\mu$ L PCR	  200 $\mu$ L NT1/ 100 mg gel  50 °C 5–10 min	 500 $\mu$ L NTB/ 100 $\mu$ L sample	 200 $\mu$ L NTC/ 100 $\mu$ L sample
<b>2</b> Bind DNA			11,000 x <i>g</i> 30 s	
<b>3</b> Wash silica membrane			700 $\mu$ L NT3  11,000 x <i>g</i> 30 s  <u>Recommended:</u> 2 <sup>nd</sup> wash  700 $\mu$ L NT3  11,000 x <i>g</i> 30 s	
<b>4</b> Dry silica membrane			11,000 x <i>g</i> 1 min	
<b>5</b> Elute DNA			15–30 $\mu$ L NE  RT 1 min  11,000 x <i>g</i> 1 min	

## 5 Gravity protocol



### 1 PD-10 Desalting column preparation

- Remove the top cap and pour off the column storage solution.
- Cut the sealed end of the column at notch.



### 2 Column equilibration

- Fill up the column with equilibration buffer and allow the equilibration buffer to enter the packed bed completely.
- Repeat 4 times.
- Discard the flow-through.

**Note:** *About 25 ml equilibration buffer should be used in total for all three steps.*



### 3 Sample application

- Add maximum 2.5 ml of sample to the column.
- For sample volumes less than 2.5 ml, add equilibration buffer to adjust the volume up to 2.5 ml *after* the sample has entered the packed bed completely.
- Let the sample or equilibration buffer enter the packed bed completely.
- Discard the flow-through.



### 4 Elution

- Place a test tube for sample collection under the column.
- Elute with 3.5 ml buffer and collect the eluate. A typical elution profile is shown in Fig 2.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich, Elena Baron, an Eides statt, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, 14. Dezember 2015

---

Elena Baron