

Charakterisierung der Interaktion zwischen
Plasmodium infizierten Erythrozyten und humanen
Endothelrezeptoren

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

von

Pedro Henrique Lubiana
geboren am 11. Juni 1986
in Linhares - Brasilien

Hamburg, Januar 2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Iris Bruchhaus

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Abteilung Molekulare Parasitologie
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

2. Gutachter: Prof. Dr. Thorsten Burmester

Universität Hamburg, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie - Abteilung Stoffwechselfysiologie
Biozentrum Grindel - Martin-Luther-King-Platz 3, 20146 Hamburg

Inhaltverzeichnis

Zusammenfassung	4
Summary	6
1 Einleitung	8
1.1 Malaria.....	8
1.2 Der Malariaerreger und die Verlaufsform der Krankheit	9
1.3 Der Lebenszyklus der humanpathogenen Plasmodienarten	11
1.3.1 Der intraerythrozytäre Zyklus	12
1.3.2 Die Wirtszellmodifikationen während des intraerythrozytären Zyklus	15
1.4 Der Proteinexport.....	17
1.4.1 Die Exportsignale.....	20
1.5 Zytoadhäsion – Ein Pathogenitätsfaktor	21
1.5.1 Zytoadhäsion bei <i>P. falciparum</i>	22
1.5.1.1 Die Multigenfamilien und die <i>var</i> -Gene	24
1.5.1.2 Die <i>var</i> -kodierte Proteinfamilie – PfEMP1	26
1.5.2 Zytoadhäsion bei <i>P. vivax</i>	28
1.5.2.1 Die <i>vir</i> -Multigenfamilie.....	29
1.6 Untersuchte humane Endothelrezeptoren	30
1.6.1 CD36.....	30
1.6.2 ICAM-1	31
1.6.3 CD9	31
1.6.4 P-Selektin	32
1.7 Zielsetzung.....	33
1.7.1 Projekt 1	33
1.7.2 Projekt 2	34
2 Material und Methoden	35
2.1 Material.....	35
2.1.1 Verwendete Geräte.....	35
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	36
2.1.3 Chemische und biologische Substanzen	37
2.1.4 Kits.....	39
2.1.5 Softwares und Datenbanken.....	39
2.1.6 Restriktionsendonukleasen.....	40
2.1.7 Plasmide	40
2.1.8 Oligonukleotide.....	40
2.1.9 Synthetische Gene.....	41
2.1.10 Antikörper	41

2.1.10.1	Primäre Antikörper	41
2.1.10.2	Sekundäre Antikörper	42
2.1.11	Puffer, Medien und andere Lösungen	42
2.1.11.1	<i>P. falciparum</i> -Zellkultur	43
2.1.11.2	CHO-Zellkultur	45
2.1.11.3	Weitere verwendete Puffer und Lösungen	46
2.1.12	Zelllinien	47
2.1.12.1	<i>E. coli</i>	48
2.1.12.2	<i>Plasmodium falciparum</i>	48
2.1.12.3	CHO-Zelllinien (engl. <i>chinese hamster ovary cells</i>)	48
2.2	Zellbiologische Methoden	49
2.2.1	<i>Plasmodium falciparum</i> -Zellkultur	49
2.2.1.1	<i>In vitro</i> Kultivierung von <i>P. falciparum</i>	49
2.2.1.2	Giemsa-Färbung	49
2.2.1.3	Synchronisierung der <i>P. falciparum</i> -Kultur mittels Sorbitol	50
2.2.1.4	Anreicherung reifer Parasitenstadien mittels MACS	50
2.2.1.5	Anreicherung von Schizonten mittels Percoll-Gradient	51
2.2.1.6	Transfektion von <i>P. falciparum</i> mittels Elektroporation	51
2.2.1.7	Herstellung von Kryo-Dauerstabilaten	52
2.2.1.8	Auftauen von Kryo-Dauerstabilaten	52
2.2.2	CHO-Zellkultur	53
2.2.2.1	<i>In vitro</i> Kultivierung von CHO-Zellen	53
2.2.2.2	Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie	53
2.2.2.3	Herstellung von Kryo-Dauerstabilaten	54
2.2.2.4	Auftauen von Kryo-Dauerstabilaten	55
2.2.3	Isolieren von Zellen mittels Biocoll-Dichtegradientenzentrifugation	55
2.3	Molekularbiologische Methoden	55
2.3.1	RNA-Extraktion	56
2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	56
2.3.3	DNA-Verdau mittels Turbo DNase	57
2.3.4	RNA-Aufreinigung mit Hilfe magnetischer Kügelchen (<i>Magnetic beads</i>)	57
2.3.5	Überprüfung der RNA-Qualität mittels Bioanalyser	57
2.3.6	DNA-Gelelektrophorese	58
2.3.7	DNA-Aufreinigung	59
2.3.8	Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> - Zellen	59
2.3.9	Klonierungsmethoden	59
2.3.9.1	Ligation	60

2.3.9.2	Transformation	61
2.3.9.3	Selektion positiver Bakterienkolonien.....	61
2.3.10	Präparation der Plasmide	61
2.3.11	Restriktionsanalyse	62
2.3.12	Sequenzierung.....	62
2.3.13	Ethanol-fällung.....	63
2.4	Anreicherung von Rezeptor-spezifisch bindenden <i>PfiE</i> (<i>Panning</i>).....	63
2.5	Transkriptomanalyse mittels NGS (engl. <i>next generation sequencing</i>)	65
2.6	<i>In silico</i> -Analyse der VIR-Proteinsequenzen	66
2.7	Immunfluoreszenzanalyse (IFA)	66
2.8	Bindungsexperiment unter Flussbedingungen.....	68
2.9	Auswertung der Bindungsversuche	70
3	Ergebnisse	72
3.1	Zytoadhäsion von <i>P. falciparum</i> infizierten Erythrozyten (<i>PfiE</i>) an humane Endothelzellrezeptoren unter Flussbedingungen	72
3.2	Dynamik der Interaktion zwischen <i>PfiE</i> und unterschiedlichen humanen Endothelzellrezeptoren	76
3.2.1	Verhaltensunterschiede bei der Interaktion zwischen <i>PfiE</i> und den Rezeptoren CD36 und ICAM-1 unter (mikrovaskulär-) physiologischer Scherkraft.....	80
3.2.2	Expressionsprofil der <i>var</i> -Gene vor und nach Anreicherung an ICAM-1 und CD36.....	83
3.3	Charakterisierung der Interaktion von <i>PfiE</i> mit den Endothelrezeptoren CD9 und P-Selektin.....	88
3.4	Charakterisierung der <i>Plasmodium vivax</i> VIR-Proteine.....	89
3.4.1	<i>In silico</i> Analyse der VIR-Proteine.....	90
3.4.2	Lokalisation der VIR-Proteine mittels Immunfluoreszenzanalyse (IFA).....	93
3.4.3	Homologievergleich zwischen den N-Termini der untersuchten VIR-Proteine	103
4	Diskussion	105
4.1	Die Zytoadhäsion der <i>P. falciparum</i> infizierten Erythrozyten	105
4.1.1	Die Zytoadhäsion der <i>PfiE</i> an CD36.....	105
4.1.2	Zytoadhäsion der <i>PfiE</i> an ICAM-1	108
4.1.3	Zytoadhäsion der <i>PfiE</i> an CD9	110
4.1.4	Zytoadhäsion der <i>PfiE</i> an P-Selektin	111
4.1.5	Die Hypothese.....	112
4.2	Lokalisation der VIR-Proteine in Transgene <i>P. falciparum</i> -Zelllinien.....	114
4.2.1	Der Export von VIR-Proteinen	115
4.2.2	Die Lokalisation der Proteine <i>VIR5-like</i> , <i>VIR12-related</i> , <i>VIR12-like</i> und <i>VIR24-like</i>	116
4.2.3	Die Lokalisation der Proteine <i>VIR14-putative</i> , <i>VIR21-like</i>	117

5	Fazit	120
6	Literaturverzeichnis.....	121
	Abkürzungsverzeichnis.....	141
	Anhang	146
	Eidesstattliche Erklärung.....	163
	Danksagung.....	164

Zusammenfassung

Malaria ist eine durch weibliche *Anopheles*-Mücken übertragene Infektionskrankheit, die bereits seit tausenden von Jahren zu Erkrankungen und Todesfällen beim Menschen führt.

Obwohl sich die Anzahl der Malariafälle laut der Weltgesundheitsorganisation in den letzten Jahren stetig reduziert hat, ist die Anzahl der Erkrankungen und Todesfälle nach wie vor sehr hoch. Besonders Kinder sind anfällig. Jede zweite Minute stirbt ein Kind an Malaria.

Die Hauptursache für diese Todesfälle ist das Auftreten der schweren Malaria, welche u. a. in Form von Anämie, Splenomegalie, pulmonale Ödeme, Leber- und Nierenversagen, Thrombozytopenie, Hypoglykämie und zerebralen Malaria auftreten kann. Die schwere Malaria tritt vor allem bei einer *Plasmodium falciparum*-Infektion auf. Allerdings wurde sie in den letzten Jahren ebenfalls für *Plasmodium vivax*-Infektionen vermehrt beobachtet. Die hohe Pathogenität dieser Parasiten wird u. a. mit der Zytoadhäsion der reifen intraerythrozytären Stadien (Trophozoiten und Schizonten) in den mikrovaskulären Gefäßen assoziiert, welche es ihnen ermöglicht eine Eliminierung durch die Milz zu vermeiden.

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe eines laminaren Flusssystems Untersuchungen zur Charakterisierung der Zytoadhäsion von *P. falciparum* infizierten Erythrozyten (*PfiE*) an die humanen Endothelrezeptoren CD36, ICAM-1, CD9 und P-Selektin durchgeführt. Hierfür wurden transgene CHO-Zelllinien (engl. *chinese hamster ovary cells*), welche die Rezeptoren auf der Oberfläche trugen, verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die *PfiE* bei einer Scherkraft von ≤ 4 dyn/cm² an CD36 adhärirten und anschließend über die Zelloberfläche rollten. Die Adhäsion an ICAM-1 und P-Selektin fand ebenfalls bei ≤ 4 dyn/cm² statt und war statisch. Auf CD9 erfolgte die Adhäsion bei einer Scherkraft von ≤ 2 dyn/cm². Die meisten der an CD9 adhärirten *PfiE* wiesen ebenfalls eine statische Bindung auf, nur für wenige dieser Zellen konnte eine rollende Bewegung beobachtet werden. Weitere Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Bindungsverhalten nicht nur vom Rezeptor, sondern auch vom *P. falciparum*-Liganden (*Plasmodium erythrocyte membran protein 1 (PfEMP1)*) abhängig ist. Anhand der erzielten Ergebnisse wurde in dieser Arbeit eine neue Hypothese für die Dynamik der Zytoadhäsion von *PfiE* an Endothelzellen aufgestellt.

Des Weiteren wurde eine Lokalisationsstudie von *P. vivax*-Proteinen aus der VIR-Proteinfamilie durchgeführt, welche sowohl mit der Antigenvariation als auch mit der Zytoadhäsion assoziiert werden. Da eine kontinuierliche *in vitro* Kultur von *P. vivax* derzeit nicht möglich ist, wurden hierfür transgene *P. falciparum*-Zelllinien generiert.

Es konnte sowohl ein Export als auch eine unterschiedliche Lokalisation der *P. vivax* VIR-Proteine nachgewiesen werden, was auf unterschiedliche Funktionen der Proteine hindeutet.

Zudem wurde ein VIR-Protein (VIR21-like - PVX_088790) identifiziert, welches an die Erythrozytenmembran exportiert wird und somit eine Rolle bei der Zytoadhäsion von *P. vivax* spielen könnte.

Die Zytoadhäsion ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor bei der Malariaerkrankung und kann sowohl bei einer *P. falciparum*- als auch bei einer *P. vivax*-Infektion zur schweren Malaria führen, welche tödlich enden kann. Aus diesem Grund ist es von großer Wichtigkeit diesen Mechanismus genauer zu charakterisieren, damit geeignete Therapien und Impfstoffe gezielt entwickelt werden können.

Summary

Malaria is an infectious disease transmitted by female Anopheles mosquitoes which is leading to diseases and deaths in human history for thousands of years.

Although the number of malaria cases has steadily been reduced in recent years according to the World Health Organization, the number of illnesses and deaths is still very high. Especially children are vulnerable. Every second minute a child dies of malaria.

The main cause of these deaths is the occurrence of severe malaria which can occur, i. a. in form of anemia, splenomegaly, pulmonary edema, liver and kidney failure, thrombocytopenia, hypoglycemia and cerebral malaria. Severe malaria occurs mainly during a *Plasmodium falciparum* infection. However, in recent years it has also been observed in *Plasmodium vivax* infections. The high pathogenicity of these parasites is associated with the cytoadhesion of the mature intraerythrocytic stages (trophozoites and schizonts) at the microvasculature which allows them to avoid the elimination by the spleen.

In this work, the cytoadhesion of *P. falciparum* infected erythrocytes (*PfiE*) to the human endothelial receptors CD36, ICAM-1, CD9 and P-selectin was characterized using a laminar flow system. For this purpose, transgenic CHO cell lines (chinese hamster ovary cells) carrying the receptors on the surface were used. It was shown that the *PfiE* adhered to CD36 at a shear stress of ≤ 4 dynes/cm² and then rolled over the cell surface. Adhesion to ICAM-1 and P-selectin also occurred at ≤ 4 dynes/cm² and was stationary. On CD9 the adhesion was observed at a shear stress of ≤ 2 dynes/cm². Most of the *PfiE* which adhered to CD9 also showed a stationary binding, only for a few of these cells rolling could be observed. Further results indicate that the binding behaviour depends not only on the receptor, but also on the *P. falciparum* ligand (*Plasmodium* erythrocyte membraneprotein 1 (*PfEMP1*)). Based on the results, a new hypothesis for the dynamics of the cytoadhesion of *PfiE* to endothelial cells was proposed.

Furthermore, a localization study of *P. vivax* proteins of the VIR protein family was performed. This protein family is thought to be associated with both, antigen variation and cytoadhesion. Since a continuous *in vitro* culture of *P. vivax* is currently not possible, transgenic *P. falciparum* cell lines were generated.

An export as well as a different localization of the *P. vivax* VIR proteins could be detected which indicates different functions of the proteins. In addition, a VIR protein (VIR21-like - PVX_088790) was identified which is exported to the erythrocyte membrane and could play a role in the cytoadhesion of *P. vivax*.

Cytoadhesion is an important pathogenicity factor in malarial disease and can lead to severe malaria in both *P. falciparum* and *P. vivax* infections which can be fatal. For this reason, it is of great importance to characterize this mechanism more precisely, so that suitable therapies and vaccines can be developed in a targeted manner.

1 Einleitung

1.1 Malaria

Die Malaria ist eine durch weibliche *Anopheles*-Mücken übertragene Infektionskrankheit, die bereits seit tausenden von Jahren zur Erkrankungen und Todesfällen beim Menschen führt. Die erste Beschreibung einer Krankheit, bei der es sich um Malaria handeln könnte, stammt aus einem chinesischen Bericht aus dem Jahr 2700 v. Chr. (Cox, 2010). Andere Berichte aus den Jahren 850 - 400 v. Chr. beschreiben charakteristische Symptome, wie Fieberschübe und vergrößerte Milz bei Personen, die in sumpfigen Gebieten lebten. Lange Zeit dachte man aus diesem Grund, dass die Krankheit durch die Luft in den Sümpfen verursacht wurde, daher der Name Malaria aus dem Italienischen „mala aria“, das übersetzt „schlechte Luft“ bedeutet (Cox, 2010). Im Jahr 1880 entdeckte Charles L. A. Laveran den wahren Malariaerreger (Laveran, 1881) und 1887 wurde die Übertragung des Erregers mit Mücken in Verbindung gebracht (Ross, 1897).

Malaria kommt hauptsächlich in den tropischen und subtropischen Regionen vor (Siehe Abb. 1) und ist auch heute noch eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit. Circa die Hälfte der Weltbevölkerung lebt heute in Malariarisikogebieten.

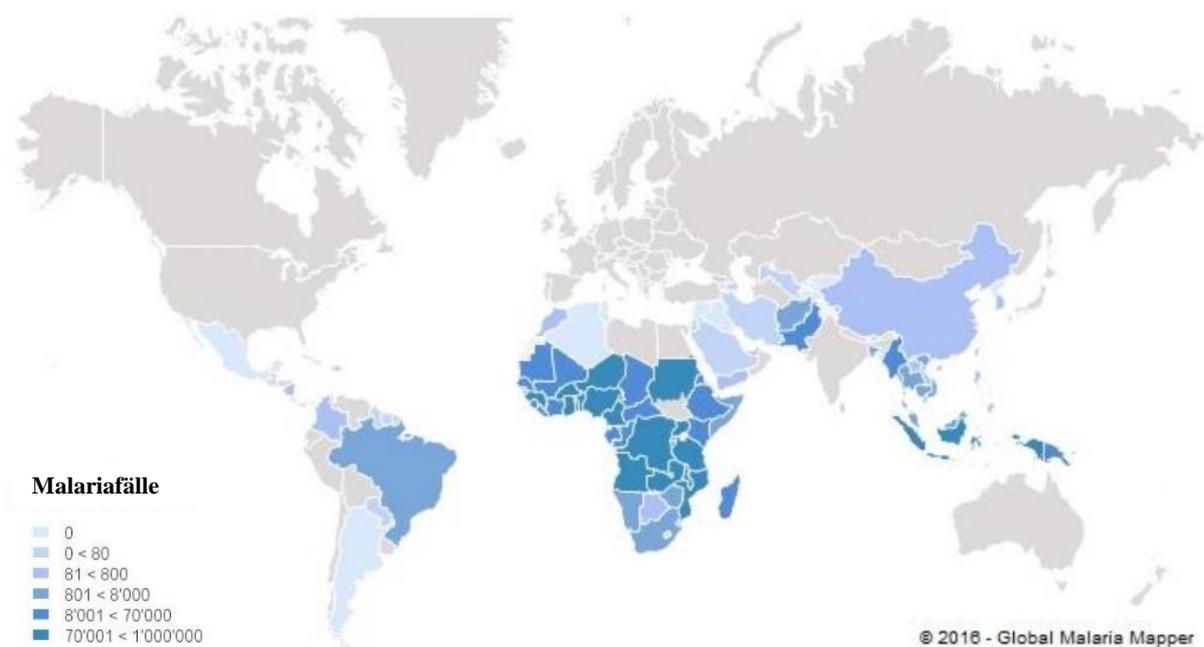


Abbildung 1: Verbreitungsgebiet der Malariafälle. Die Karte zeigt die Verbreitung sowie Häufigkeit der Malariafälle weltweit im Jahr 2015. Laut dem letzten Bericht (2016) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gab es im Jahr 2015 etwa 212 Mio. Malariafälle weltweit und ca. 429.000 davon endeten tödlich. Quelle: WHO, World Malaria Report 2016.

Die letzten Jahre waren in vielerlei Hinsicht sehr optimistisch in Bezug auf die Malariabekämpfung. Laut dem letzten Bericht der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gab es eine Reduzierung von 21 % bei den Erkrankungsfällen sowie von 29 % bei den Todesfällen zwischen 2010 und 2015. Dennoch erkrankten im Jahr 2015 weltweit ca. 212 Millionen Menschen an Malaria und ca. 429.000 starben infolge der Krankheit. Besonders betroffen sind Kinder unter fünf Jahren. Allein im Jahr 2015 starben 303.000 Kinder dieser Altersstufe an Malaria. Damit bleibt Malaria, trotz einer Verbesserung der Statistik, die Hauptursache der Todesfälle bei Kindern unter fünf Jahren (WHO, 2016). In anderen Zahlen ausgedrückt, bedeutet das, dass alle zwei Minuten ein Kind an Malaria stirbt.

1.2 Der Malariaerreger und die Verlaufsform der Krankheit

Malaria wird durch einzellige eukaryotische Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursacht. Diese gehören wiederum zum Phylum der Apicomplexa, dem viele wichtige human- und tiermedizinisch relevante Parasiten wie z. B. *Toxoplasma*, *Theileria*, *Eimeria*, *Babesia* und *Cryptosporidium* zugeordnet sind (Cowman und Crabb, 2006).

Es gibt vier humanpathogene Plasmodienarten (*P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* und *P. falciparum*) sowie eine fünfte Art (*P. knowlesi*), deren natürlicher Wirt der Javaneraffe ist, aber auch den Menschen infizieren kann (Cox-Singh und Singh, 2008; Schottelius *et al.*, 2010). Die verschiedenen Plasmodienarten führen zu unterschiedlichen Verlaufsformen der Krankheit beim Menschen. Dabei können vier Verlaufsformen unterschieden werden, die sich hauptsächlich anhand der auftretenden Fieberschübe differenzieren lassen. Malaria quartana (*P. malariae*), bei der die Fieberschübe alle 72 Stunden auftreten, Malaria tertiana (*P. ovale*, *P. vivax*), mit Fieberschüben alle 48 Stunden, Malaria quotidiana (*P. knowlesi*), die tägliche Fieberschübe zeigt und Malaria tropica (*P. falciparum*), bei der die Fieberschübe unregelmäßig auftreten (WHO, 2016). Die unterschiedlichen Zeitabstände zwischen den Fieberschüben sind auf die Dauer des intraerythrozytären Zyklus der einzelnen Plasmodienarten zurückzuführen (Siehe Punkt 1.3). Am Ende des intraerythrozytären Zyklus kommt es zum Platzen der *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten, wodurch Antigene und andere parasitäre Toxine, wie z. B. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) oder Hämozoin (Abbauprodukt des Hämoglobins) freigesetzt werden (Schofield *et al.*, 1993; Arese und Schwarzer, 1997; Schofield *et al.*, 2002). Dies verursacht eine Immunantwort, wodurch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie beispielsweise dem Tumornekrosefaktor (TNF), induziert wird (Kwiatkowski *et al.*, 1989).

Im Allgemeinen kann der Krankheitsverlauf von asymptomatisch bis zu einem Verlauf mit schweren Komplikationen, die tödlich enden können, variieren. Die meisten Malariasymptome ähneln denen einer Grippe mit Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen, Übelkeit und Erbrechen.

Die Mehrheit der Malariafälle werden durch *P. falciparum* und *P. vivax* verursacht, wobei *P. vivax* eine größere Relevanz außerhalb Afrikas besitzt, wo er für 41 % der Fälle verantwortlich ist, während *P. falciparum* weltweit eine starke Bedrohung darstellt (WHO, 2016). *P. falciparum* ist der gefährlichste der Malariaerreger. 99 % der Malariatodesfälle im Jahr 2015 wurden durch die Infektion mit *P. falciparum* verursacht. Diese kann zu schweren Krankheitsverläufen führen, welche in Form von Anämie, Splenomegalie (Vergrößerung der Milz), Atemnot, pulmonale Ödeme, Krämpfe, Nierenversagen, Thrombozytopenie, Hypoglykämie und zerebralen Malaria auftreten können (Philpott und Keystone 1987, Trampuz *et al.*, 2003; Wassmer *et al.*, 2015).

Auch wenn die Anzahl der fatalen Fälle durch *P. vivax*-Malaria im Vergleich zu *P. falciparum* erheblich geringer ist, tauchten vor allem in den letzten Jahren immer wieder Fälle schwerer *P. vivax*-Malaria auf, wo die obengenannten klinischen Symptomen zu beobachten waren (Kocher *et al.*, 2005; Anstey *et al.*, 2007; Zubairi *et al.*, 2013). Bei *P. falciparum* ist die Entwicklung der schweren Malariaform mit der Zytoadhäsion der infizierten Erythrozyten (iE) in das mikrovaskuläre Gefäßsystem diverser Organe (Gehirn, Lunge, Herz, Leber, Niere) sowie des subkutanen Fettgewebes oder der Plazenta assoziiert (Franke-Fayard *et al.*, 2010; Autino *et al.*, 2012; Ponsford *et al.*, 2012). Zytoadhäsion ist neben der Antigenvariation eine der wichtigsten Immunevasionsmechanismen des Erregers. Die *P. falciparum* infizierten Erythrozyten (PfiE) werden durch den Erreger modifiziert und erhalten so die Kapazität an mikrovaskulären Endothelzellen sowie an Thrombozyten und nicht infizierten Erythrozyten (Rosettierung) zu adhären (Rowe *et al.*, 2009).

Die Zytoadhäsion an mikrovaskulären Endothelzellen kann zu einer Sequestrierung der PfiE in den kleinen Kapillaren führen (Barnwell, 1989; Rogerson *et al.*, 2004; Maier *et al.*, 2009). Damit werden sie aus dem Blutstrom entfernt und umgehen so der Eliminierung durch die Milz (Chotivanich *et al.*, 2002). Die adhären iE verursachen eine Behinderung des Blutflusses in den mikrovaskulären Blutgefäßen, welches zu einer endothelialen Dysfunktion, die wiederum zur Beeinträchtigung der Durchblutung in den Organen, Hypoxie und Laktatazidose führen kann (Dondorp *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2013). Ebenfalls wurde die Adhäsion der iE an Endothelrezeptoren mit der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen in Verbindung gebracht (Tripathi *et al.*, 2009).

1.3 Der Lebenszyklus der humanpathogenen Plasmodienarten

Plasmodien besitzen einen sehr komplexen Lebenszyklus, bei dem extra- und intrazelluläre Parasitenstadien einen obligaten Wirtswechsel während ihres Lebenszyklus durchlaufen. Durch den Stich einer weiblichen *Anopheles*-Mücke bei einer Blutmahlzeit werden über die Speicheldrüse der Mücke Sporozoiten (infektiöses Parasitenstadium) unter die Haut des Menschen injiziert. Diese erreichen die Blutgefäße und gelangen über den Blutstrom in die Leber (Cowman *et al.*, 2012, Prudencio, *et al.*, 2006). Dort infizieren die Sporozoiten Leberzellen (Hepatozyten) und starten die asymptomatische exoerythrozytäre Schizogonie, wodurch sich die Parasiten asexuell vermehren und tausende von Tochterzellen (Merozoiten) bilden. Bei *P. vivax* und *P. ovale* kann es dazu kommen, dass sich die Sporozoiten nicht sofort weiterentwickeln, sondern ein Ruhestadium (Hypnozoit) bilden, das für Wochen bis Jahre in den Hepatozyten verbleiben kann. Während der Reifung der Merozoiten löst sich die parasitophore Vakuolenmembran auf. Von der Hepatozytenmembran gehen Ausläufer durch die Lebersinusoide in die die Merozoiten gepumpt werden. Die in einem Vesikel befindlichen Merozoiten (Merosom) werden dann in den Blutstrom abgegeben (Sturm *et al.*, 2006). Nach dem Platzen des Merosoms gelangen die freien Merozoiten in die Blutbahn und infizieren sofort Erythrozyten. Damit beginnt die intraerythrozytäre Phase des Lebenszyklus. In dieser Phase vermehren sich die Merozoiten asexuell über mehrere Entwicklungsstadien (Ring-, Trophozoiten- und Schizontenstadium) und bilden je bis zu 32 neue Merozoiten. Diese werden nach der Ruptur der infizierten Erythrozyten wieder in den Blutstrom entlassen und infizieren erneut Erythrozyten. Dieser Zyklus wiederholt sich kontinuierlich und führt zu den oben beschriebenen klinischen Symptomen (Greenwood *et al.*, 2005; Prudencio *et al.*, 2006). Einige der Merozoiten entwickeln sich allerdings zu männlichen oder weiblichen Gametozyten und beginnen damit mit der sexuellen Phase des Lebenszyklus. Die Gametozyten werden von der weiblichen *Anopheles*-Mücke während der Blutmahlzeit aufgenommen und entwickeln sich weiter zu Makro- (♀) bzw. Mikrogameten (♂). Im Darm der Mücke findet die Befruchtung statt, wobei eine diploide Zygote entsteht. Die Zygote formt sich zu einem beweglichen Ookineten um und dringt in das Darmgewebe der *Anopheles*-Mücke ein, wo sie sich als Oozyste einnistet. Nach ca. 10 - 14 Tage entlässt die Oozyste zahlreiche ungeschlechtliche Sporozoiten, welche in die Speicheldrüse der Stechmücke vordringen, wo sie bei der nächsten Blutmahlzeit einen Menschen infizieren können (Matuschewski, 2006; Rowe *et al.*, 2009; Portugal *et al.*, 2011; Petter und Duffy, 2015).

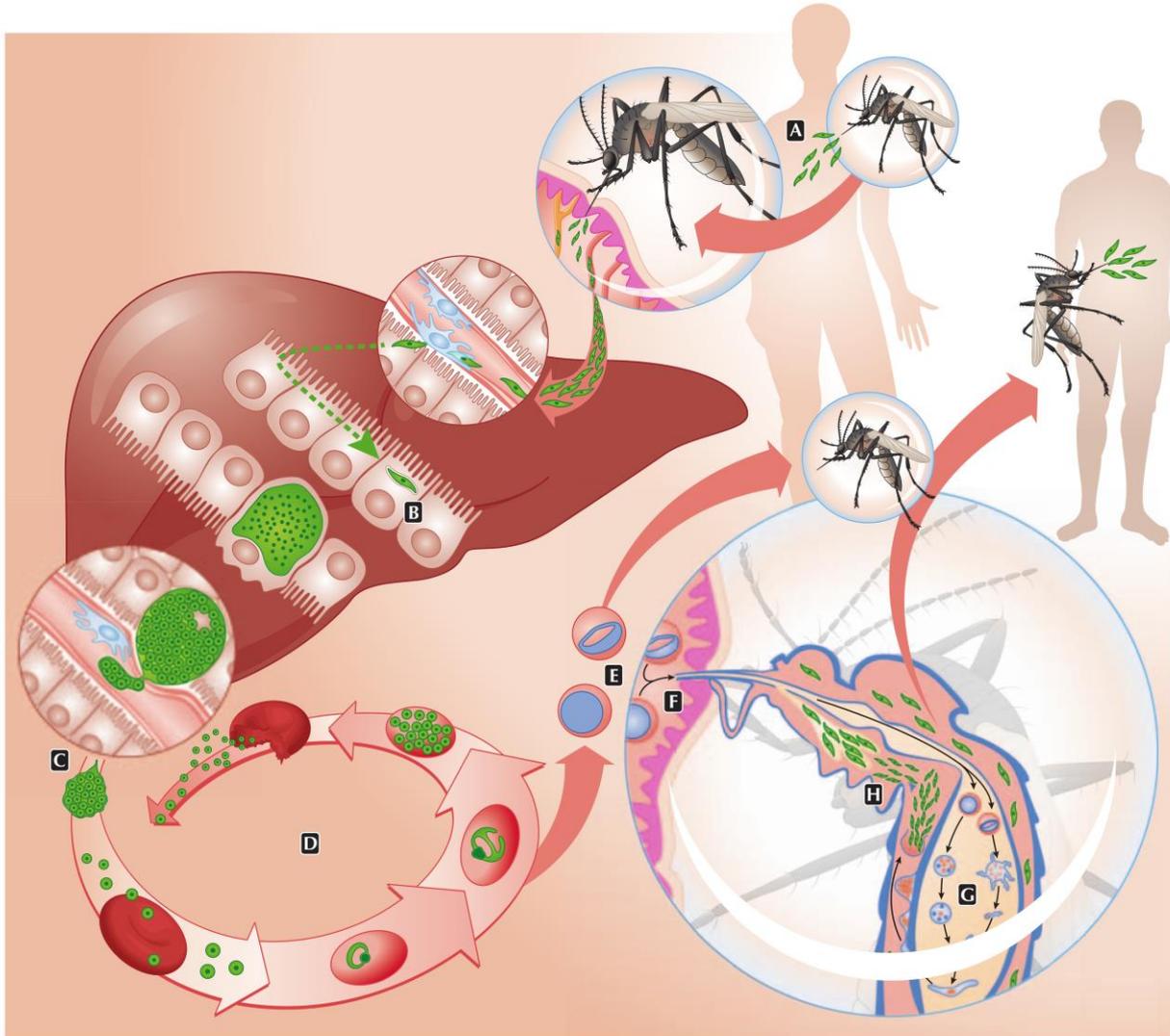


Abbildung 2: Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*. **A:** Bei der Blutmahlzeit einer weiblichen *Anopheles*-Mücke werden infektiöse Sporozoiten unter die Haut des Menschen injiziert, wobei diese über den Blutstrom in die Leber gelangen. **B:** In der Leber entwickeln sich die Sporozoiten zu Merozoiten. **C:** Diese werden anschließend erneut in den Blutstrom entlassen. **D:** Dort befallen die Merozoiten Erythrozyten und entwickeln sich über Ring-, Trophozoyten- und Schizontenstadium zu 16 bis 32 Tochtermerozoiten, welche den Erythrozyten wieder verlassen und neue Erythrozyten befallen. **E:** Einige Merozoiten jedoch entwickeln sich zu männlichen und weiblichen Gametozyten. **F:** Diese können von einer weiblichen *Anopheles*-Mücke über die Blutmahlzeit aufgenommen werden. **G:** Im Darm der Mücke entwickeln sie sich zu Gameten. Nach der Befruchtung entsteht ein beweglicher Ookinet, welcher in den Mitteldarm wandert und sich zu einer sessilen Oozyste ausdifferenziert. In dieser reifen die Sporozoiten heran. **H:** Nach der Ruptur der Oozyste transferieren die Sporozoiten in die Speicheldrüsen und werden bei einer erneuten Blutmahlzeit in den Menschen injiziert (nach Portugal *et al.*, 2011).

1.3.1 Der intraerythrozytäre Zyklus

Der klinisch-relevante intraerythrozytäre Zyklus bei den humanpathogenen Plasmodienarten, kann je nach Art ca. 24 Stunden (*P. knowlesi*), 48 Stunden (*P. falciparum*, *P. vivax* und *P. ovale*) oder 72 Stunden (*P. malariae*) dauern. In den meisten Plasmodienarten sind die Interaktionen zwischen Parasit und Wirt noch weitgehend unbekannt. Daher wird im Folgenden basierend auf den Erkenntnissen aus der *P. falciparum*-Forschung die

Mechanismen der Invasion, des Proteintransports und der Wirtszellmodifikation dargestellt. Im Allgemeinen kann der intraerythrozytäre Zyklus in drei Entwicklungsstadien aufgeteilt werden: das Ring-, das Trophoziten- und das Schizontenstadium.

Nach der Ruptur des Merosoms werden die, in der Leber gebildeten Merozoiten in den Blutstrom entlassen, wo sie Erythrozyten infizieren. Hierbei ist *P. falciparum* im Vergleich zu anderen humanen Malariaerregern in der Lage alle Stadien der roten Blutzellen zu infizieren, während *P. vivax* und *P. ovale* eine starke Präferenz für junge Erythrozyten (Retikulozyten) haben. *P. malariae* dahingegen bevorzugt reife Erythrozyten (Garcia, 2010; Kerlin und Gatton, 2013).

Der erste Kontakt mit der Wirtszelle ist reversibel und wird durch Proteine der MSP-Familie (engl. *merozoite surface protein*) hergestellt, bei der das bestcharakterisierte Protein, das MSP1 ist (Holder, 1988; Blackman *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 2014). Bei diesem ersten Kontakt sind die Merozoiten in der Lage unterschiedliche Zelltypen zu unterscheiden (Bannister und Dluzewski, 1990). Sobald die Zielzelle als ein Erythrozyt erkannt wird beginnt eine Reorientierung des Merozoiten, so dass sich dessen apikaler Pol zum Erythrozyten richtet. Über die apikalen Organellen (Mikronemen, Rhoptrien) werden parasitäre Proteine sezerniert, die spezifisch an Rezeptoren auf der Oberfläche der Erythrozyten binden und die Invasion unterstützen (Duraisingh *et al.*, 2003; Cowman und Crabb, 2006; Boyle *et al.*, 2013). Zum Beispiel die Proteine der Zelladhäsions-Familien EBL (engl. *erythrocyte binding-antigen*) und *PfRh* (engl. *reticulocyte binding-like homologues*), welche in den Mikronemen bzw. Rhoptrien lokalisiert sind und für die Stabilisierung der Bindung durch Interaktion mit Oberflächenrezeptoren der Erythrozyten verantwortlich sind (Sim *et al.*, 1992; Rayner *et al.*, 2000; Triglia *et al.*, 2001; Cowman *et al.*, 2012). Diese Zelladhäsions-Proteine weisen phänotypische Variationen auf, die es dem Parasiten ermöglichen mit unterschiedlichen erythrozytären Rezeptoren zu interagieren. In *P. falciparum* z. B. interagieren die meisten Proteine der EBL-Familie mit Glykophorine, wie EBA175 mit Glykophorin A, Ebl1 mit Glykophorin B, und EBA140, das mit Glykophorin C interagiert (Sim *et al.*, 1994; Lobo *et al.*, 2003; Maier *et al.*, 2003; Mayer *et al.*, 2009). *PfRH4* bindet an den Komplement-Rezeptor 1 (Tham *et al.*, 2010) und *PfRH5* interagiert mit CD147 (Crosnier *et al.*, 2011). Als nächstes werden Rhoptrien-Neck-Proteine (RON-Komplex) und das AMA1 (engl. *apical membrane antigen 1*) vom Parasit sezerniert. Diese tragen bei der Bildung von „tight junction“ zwischen Parasit und Wirtszelle bei (Cowman *et al.*, 2012). Vermutlich verbindet die „tight junction“ die Wirtszelle und die Parasitenmembran (PV) mit dem Aktin-Myosin-Motor des Merozoiten,

wobei davon ausgegangen wird, dass das Protein MTRAP (engl. *merozoite thrombospondin-related anonymous protein*) hierbei eine Rolle spielt (Cowman *et al.*, 2012).

Allerdings bestehen noch Unklarheiten bezüglich der Hauptkomponenten, die diese Verbindung vermitteln sollen (Giovannini *et al.*, 2011). Mit Hilfe des Aktin-Myosin-Motors bewegt sich die „*tight junction*“ vom apikalen zum posterioren Pol des Merozoiten (Keeley und Soldati, 2004). Gleichzeitig sezernieren die Rhoptrien, Lipide und Proteine (Bannister *et al.*, 1986), die zum einen den Abbau von Elementen aus dem Zytoskelett des Erythrozyten induzieren und somit Invasion der Merozoiten erleichtern (Dasgupta *et al.*, 2014) und zum anderen für die Formation der parasitophoren Vakuole (PV) und der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) (Riglar *et al.*, 2011), die am Ende der Invasion den Merozoit umgeben, benötigt werden. Innerhalb von wenigen Stunden entwickelt sich der Merozoit zu dem sogenannten Ringstadium. Dieses bewegt sich frei innerhalb des iE und wechselt seine Form zwischen amöboid und discoidal (Grüning *et al.*, 2011). Während des Ringstadium ist der Parasit metabolisch wenig aktiv, dennoch weist er ein hohes Expressionslevel von Genen auf, die für Proteine kodieren, welche in die Wirtszelle exportiert werden (Marti *et al.*, 2004). Aus diesem Grund wird angenommen, dass das Ringstadium ein Stadium mit Wachstumsverzögerung ist, bei dem der Parasit diverse Wirtszellmodifikationen initiiert, die für sein späteres Wachstum und Überleben eine Rolle spielen (Spielmann *et al.*, 2006b).

Als nächstes entwickelt sich der Parasit vom Ring- zum Trophozitenstadium. Dieses findet man beispielsweise bei den Plasmodienarten mit einem 48-stündigen intraerythrozytären Zyklus zwischen 18 - 36 Std. nach Invasion und wird durch ein rasches Wachstum charakterisiert, bei dem der Parasit bis zu zwei Drittel der Wirtszelle ausfüllt (Leech *et al.*, 1984). In dieser Phase kann auch die Bildung des Hämozoin-Pigments beobachtet werden. Dies entsteht durch den Abbau des Hämoglobins, welches als Nahrungsquelle vom Parasiten verwendet wird. Hierbei kann das giftige Häm des Hämoglobins nicht verwertet werden und akkumuliert als unlösliches Hämozoin in der Nahrungsvakuole des Parasiten (Slater und Cerami, 1992; Pagola *et al.*, 2000; Hempelmann und Egan, 2002).

Etwa 36 Std. nach der Invasion entwickelt sich schließlich das letzte Stadium der Blutphase, das Schizontenstadium. In dieser Phase entsteht durch eine mehrfach mitotische Kernteilung ohne Zytokinese ein (coenocytischer) mehrkerniger Schizont (Gerald *et al.*, 2011). Anschließend werden die einzelnen Tochtergenome durch Einschnürung der nukleären Membran voneinander getrennt und es entstehen bis zu 32 neue Merozoiten, welche durch die Ruptur des Erythrozyten in den Blutstrom entlassen werden und erneut Erythrozyten befallen können (Cowman und Crabb, 2006).

1.3.2 Die Wirtszellmodifikationen während des intraerythrozytären Zyklus

Durch die Infektion von Erythrozyten ergeben sich für die Plasmodien einige Vorteile, wie beispielsweise eine Immunevasion durch die Abwesenheit der durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC – engl. *major histocompatibility complex*) kodierten Rezeptoren auf der Oberfläche der Erythrozyten (Scherf *et al.*, 2008). Da Antigene erst dann von T-Lymphozyten erkannt werden können, wenn sie zuvor aufbereitet und auf diese spezifischen körpereigenen Rezeptoren präsentiert werden (MHC-Restriktion) (Zinkernagel und Doherty, 1974), stellt dies einen partiellen Immunevasionsvorteil für den Parasit dar. Dennoch stellt die Infektion von Erythrozyten in einigen Hinsichten eine Herausforderung für den Parasiten dar, wie z. B. bei der Aufnahme von Nährstoffen. Insbesondere Nährstoffe, die von den Erythrozyten nicht bereitgestellt werden können (z. B. Isoleucin) (Dhangadamajhi *et al.*, 2010).

Im Laufe des intraerythrozytären Zyklus des Parasiten, kommt es zu einer Reihe von Modifikationen in der Wirtszelle, die beispielsweise der Nährstoffaufnahme oder den Transport von Proteinen dienen sollen. Um Nährstoffen aus dem extrazellulären Milieu aufnehmen zu können, kommt es zur Induktion der so genannten NPPs (engl. *New Permeability Pathways*). Diese führen zu einer erhöhten Permeabilität der Erythrozytenmembran (EM), welche die Aufnahme von Zucker, Aminosäuren, Purine, Vitamine und Choline vermitteln und vermutlich auch bei der Entsorgung von Abfallprodukten involviert sind (Desai *et al.*, 2000). Durch die erhöhte EM-Permeabilität könnte die hohe Hämoglobinkonzentration innerhalb der Zelle zu einer unkontrollierten Aufnahme an Flüssigkeit und damit zum Platzen der Wirtszelle führen (Dhangadamajhi *et al.*, 2010). Um die osmotische Stabilität der Wirtszelle zu gewährleisten verdaut der Parasit eine große Menge Hämoglobin (Lew *et al.*, 2003), meistens durch die Zytostomen, eine große Phagosom-ähnliche Struktur des Parasiten (Elliot *et al.*, 2008). Des Weiteren sind 20 - 25 Std. nach der Invasion einige Erweiterungen der PVM-Struktur zu erkennen, welche als tubovesikuläres Netzwerk (TVN) bezeichnet werden (Bannister *et al.*, 2000) und ebenfalls an der Aufnahme von Nährstoffen sowie Lipiden beteiligt sind (Lauer *et al.*, 1997; Lauer *et al.*, 2000; Haldar und Mohandas, 2007).

Während des Ringstadiums kommt es ebenfalls zur Ausbildung von membranösen Vesikelstrukturen, den so genannten Maurer'schen Spalten (MC – engl. *maurer's clefts*), welche bereits 1,5 - 3 Std. nach Invasion beobachtet werden können aber erst im Trophozoitenstadium nahe der EM ihre finale Ziellokalisation einnehmen (Grüning *et al.*, 2011; McMillan *et al.*, 2013). Es wird angenommen, dass die Maurer'schen Spalten als

intermediäres Kompartiment bei der Sortierung und beim Transport von Proteinen an die EM eine Rolle spielen (Mundwiler-Pachtlatko und Beck, 2013). Eine große Anzahl von peripheren sowie integralen Membranproteinen konnten bereits in einer permanenten Assoziation mit den MC identifiziert werden (Lanzer *et al.*, 2006). Zu den peripheren Proteinen zählen beispielsweise REX1 (engl. *ring exported protein 1*) (Hawthorne *et al.*, 2004) und das MSRP6 (engl. *merozoite surface related protein 6*) (Heiber *et al.*, 2013), während die Proteine SBP1 (engl. *skeleton binding protein 1*) (Blisnick *et al.*, 2000), MAHRP1 (engl. *membrane associated histidine rich protein 1*) (Spycher *et al.*, 2003), PfMC-2TM (engl. *P. falciparum Maurer's Clefts 2 Transmembrane*) (Sam-Yellowe *et al.*, 2004) und REX2 (engl. *ring exported protein 2*) (Spielmann *et al.*, 2006b) zu den integralen Proteinen gehören.

Des Weiteren konnten Proteine identifiziert werden, die nur vorübergehend mit den MC assoziiert waren und anschließend in der EM lokalisiert sind. Dies ist der Fall bei den Proteinen PfEMP3 (engl. *P. falciparum erythrocyte membrane protein 3*) und KAHRP (engl. *knobs associated histidine rich protein*) (Waterkeyn *et al.*, 2000; Wickham *et al.*, 2001) sowie Proteine, die von den Multigenfamilien *rif* (engl. *repetitive interspersed family*) (Khattab *et al.*, 2006) und *stevor* (engl. *subtelomeric variable open reading frame*) (Kaviratne *et al.*, 2002; Przyborsky *et al.*, 2005) kodiert werden. Diese vorübergehende Assoziation unterschiedlicher Proteine mit den MC lässt auf die vermutliche Transportfunktion der MC zurückzuführen. Ebenfalls der Transport des größten Virulenzfaktor, die Proteine der Familie PfEMP1 (engl. *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1*), bei *P. falciparum* soll über die MC stattfinden (Cyrklaff *et al.*, 2011). Weitere Strukturen, die eine Rolle beim Proteintransport eine Rolle spielen könnten, sind die mobilen punktförmigen Strukturen, die kürzlich identifiziert wurden und J- bzw. K-Dots genannt wurden (Külzer *et al.*, 2010; Külzer *et al.*, 2012; Kats *et al.*, 2014). Dennoch ist die genaue Zusammensetzung sowie Funktion dieser Strukturen noch nicht untersucht worden.

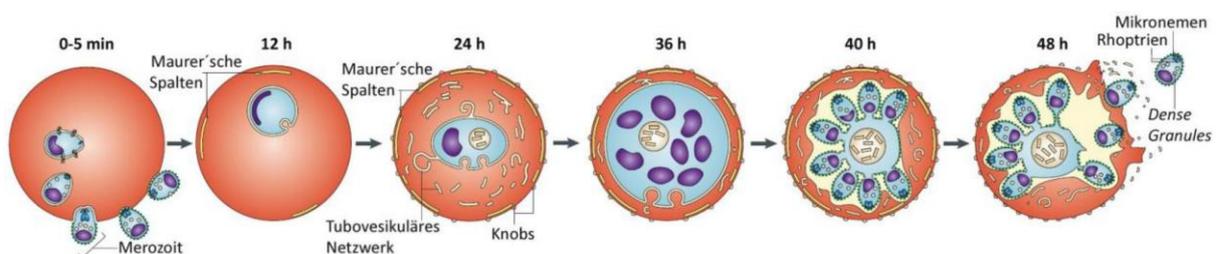


Abbildung 3: Modifikation der Wirtszelle während des intraerythrozytären Zyklus bei *Plasmodium falciparum*. Während der intraerythrozytären Entwicklung des Parasiten finden zahlreiche Modifikationen statt. Zu den zählen beispielsweise die Bildung eines tubovesikulären Netzwerk sowie der Maurer'schen Spalten und der Knobs. (nach Meier *et al.*, 2009; modifiziert)

Eine weitere wichtige Modifikation der Wirtszelle ist die Bildung von elektronendichten kelchförmigen Strukturen auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten, welche Knobs genannt werden (Luse *et al.*, 1971; Langreth *et al.*, 1978; Kilejian, 1979).

Der Hauptbestandteil der Knobs ist das Protein KAHRP (Taylor *et al.*, 1987; Crabb *et al.*, 1997). Dieses interagiert mit Proteinen aus dem Zytoskelett der Erythrozyten, wie Spektrin, Aktin oder Ankyrin (Magowan *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2000; Pei *et al.*, 2005), sowie mit den Proteinen der PfEMP1-Familie (Waller *et al.*, 1999), die auf der Oberfläche der iE lokalisiert sind und bei der Immunevasion (Antigenvariation und Zytoadhäsion) der Parasiten eine wichtige Rolle spielen (Flick und Chen, 2004; Pasternak und Dzikowski, 2009). Der Zeitpunkt der Entstehung der Knobs korreliert mit dem Zeitpunkt, in dem der Parasit die Zytoadhäsion der iE an Endothelzellen induziert sowie mit dem Nachweis der zytoadhärenten Proteine der PfEMP1-Familie auf der Oberfläche der infizierten Zellen (Gardner *et al.*, 1996, Kriek *et al.*, 2003). Die Knobs dienen als Plattform für die Präsentation des im Zytoskelett verankerten PfEMP1 auf der Oberfläche der iE (Wickham *et al.*, 2001; Rug *et al.*, 2006). Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass infizierte Erythrozyten, die keine Knobs mehr bildeten ebenfalls in der Lage waren zu zytoadhärieren (Tilly *et al.*, 2015).

1.4 Der Proteinexport

Das Überleben und die Prävalenz des Parasiten im Wirt erfordert eine Reihe an Modifikationen, die in den Wirtszellen vorgenommen werden. Diese dienen vor allem dem Im- bzw. Export von Nährstoffen und Abfallprodukten sowie dem Export von Proteinen, welche eine wichtige Rolle bei der Immunevasion der Parasiten spielen, an die Oberfläche der iE. Eine Herausforderung, die den Parasit dazu brachte, einen Transportmechanismus innerhalb der Wirtszelle zu etablieren, da Erythrozyten keinen endogenen Transportmechanismus besitzen.

Bis heute sind die meisten Komponenten sowie Transportwege dieses Mechanismus unbekannt. Das aktuelle Modell für den Proteinexport bei *Plasmodium* (nach Elsworth *et al.*, 2014; Spielmann und Gilberger, 2015) (Siehe Abb. 4) nimmt an, dass die Proteine kotranslational in das endoplasmatische Retikulum (ER) eintreten, wobei sich lösliche Proteine im ER-Lumen befinden, während Proteine, die eine Transmembrandomäne (TM) besitzen, in die Membran vom ER integriert werden. Im ER erfolgt die Erkennung des Exportsignals, welches vermutlich durch Chaperonen geschieht. Hierbei lassen sich die zu exportierenden Proteine in zwei Gruppen unterscheiden. Die PEXEL-Proteine (engl. *Plasmodium export element*) und die so genannten PNEPs (engl. *PEXEL negative exported*

proteins) (Siehe Punkt 1.4.1). Für die Proteine mit einem PEXEL-Motiv (RxLxE/Q/D) (Marti *et al.*, 2004) konnte gezeigt werden, dass das Protein dort am konservierten Leucin (RxL⁺xE/Q/D) proteolytisch durch die Aspartatprotease Plasmepsin V gespalten (Boddey *et al.*, 2010; Russo *et al.*, 2010) und anschließend N-acetyliert wird (Chang *et al.*, 2008; Boddey *et al.*, 2009), wobei die genaue Funktion der N-Acetylierung beim Export nicht bekannt ist (Spillman *et al.*, 2015).

Es wurde postuliert, dass das PEXEL-Motiv mit dem Phospholipid PI3P (Phosphatidylinositol-3-Phosphat) an der Lumen-Seite der ER-Membran interagiert, bevor es gespalten wird (Bhattacharjee *et al.*, 2012). Dennoch konnte eine kürzlich publizierte Studie zeigen, dass das PEXEL-Motiv nicht in der Lage ist an PI3P zu binden. Zudem konnte gezeigt werden, dass PI3P nicht in der ER konzentriert ist, sondern in der Nahrungsvakuole sowie in der Apikoplastenmembran (Boddey *et al.*, 2016). Anschließend werden die Proteine vermutlich durch Transportvesikel in die Parasiten-Plasmamembran (PPM) transportiert. Hier werden die löslichen Proteine, nach Fusion der Transportvesikel mit der PPM, in die parasitophoren Vakuole (PV) abgegeben, während die Transmembranproteine in die PPM integriert werden und von dort erst extrahiert werden müssen, bevor sie weiter exportiert werden (Grüning *et al.*, 2012; Marti und Spielmann, 2013).

Der weitere Transport über die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) in das erythrozytäre Zytosol könnte über das Translokon PTEX (engl. *Plasmodium translocon of exported proteins*) erfolgen, wobei die Proteine vorher mit Hilfe von Chaperonen entfaltet werden. PTEX ist ein membranassoziierter Komplex, der aus fünf Komponenten besteht: PTEX88, PTEX150, EXP2 (engl. *exported protein 2*) und Trx2 (engl. *thioredoxin 2*) sowie das Chaperon HSP101 (engl. *heat shock protein 101*) (De Koning-Ward *et al.*, 2009) (Siehe Abb. 4B). Letzteres könnte eine Rolle bei der Entfaltung der zu exportierenden Proteinen spielen (Spillman *et al.*, 2015). Lösliche Proteine erreichen das Zytosol der Erythrozyten und gelangen schließlich durch Diffusion und Interaktion mit spezifischen Bindungsdomänen an ihren Zielort (Marti und Spielmann, 2013; Spielmann und Gilberger, 2015). Hier scheinen die Maurer'schen Spalten beim Sortieren und Exportieren der Proteine eine entscheidende Rolle zu spielen (Mundwiler-Pachtlatko und Beck, 2013).

Ein Geheimnis bleibt jedoch, wie Proteine mit einer Transmembrandomäne von der PVM über das Zytosol in die MC gelangen. Hierbei wird postuliert, dass die Transmembranproteine ebenfalls in löslicher Form als Proteintransportaggregat (PTA) zu den Maurer'schen Spalten gelangen (Papakrivovs *et al.*, 2005; Grüning *et al.*, 2011; Grüning *et al.*, 2012). Diese Theorie wird durch die Entdeckung der so genannten J-Dots im Erythrozytenzytosol unterstützt.

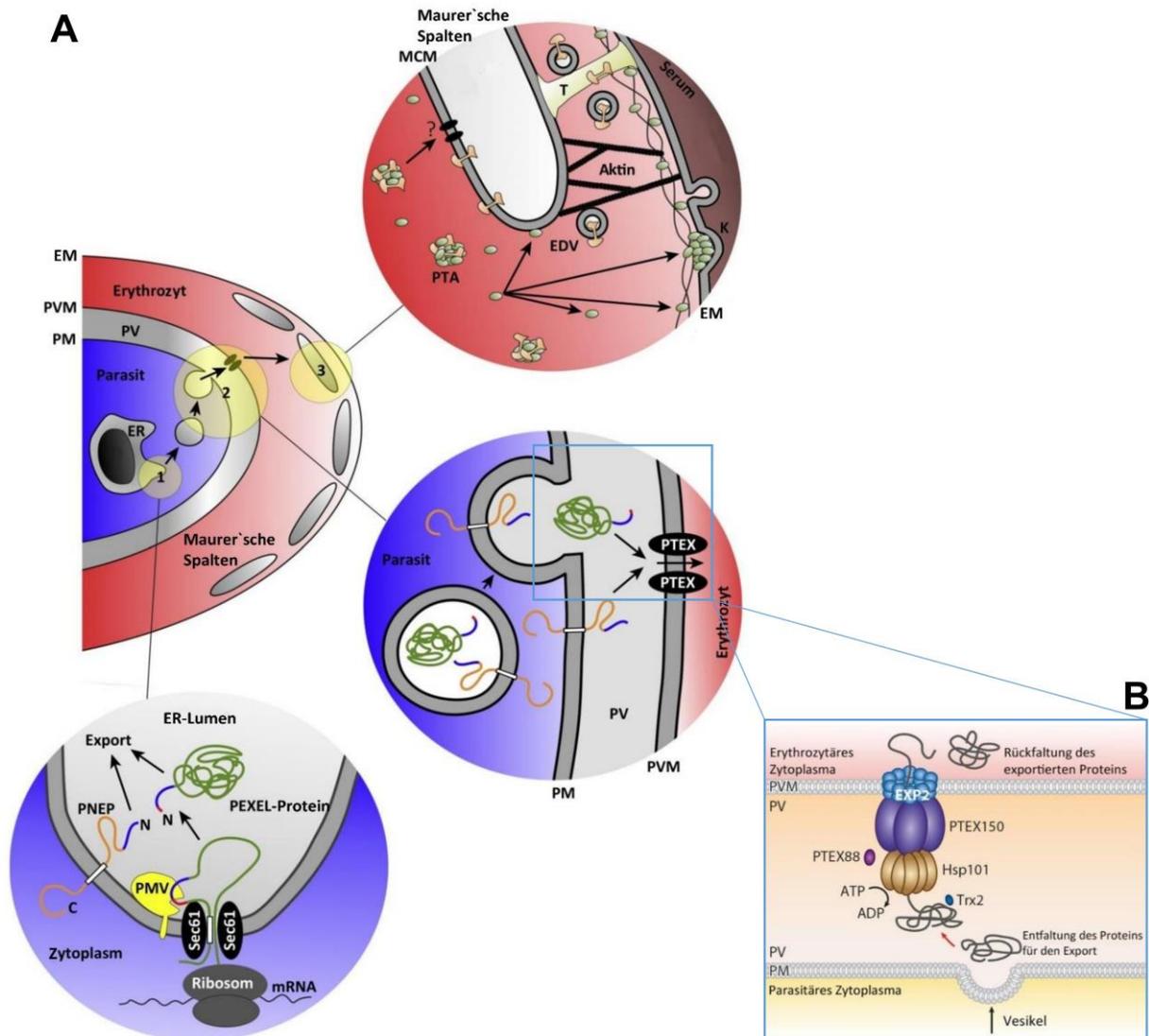


Abbildung 4: Aktuelles Modell für den Export von löslichen und nicht löslichen Proteinen in *P. falciparum*. Überblick der wichtigsten Schritte des Exports 1 – 3 (gelbe Kreise). Die Exportschritte werden hier sowohl für ein lösliches PEXEL-Protein (grün) als auch für ein PNEP mit einer Transmembrandomäne (orange) dargestellt. **Kreis 1:** Die exportrelevanten Ereignisse im endoplasmatischen Retikulum (ER). Hier werden lösliche Proteine, mit Hilfe von Translokatoren, kotranslational ins ER transportiert. Gleichzeitig wird das PEXEL-Motiv (rot) durch Plasmepsin V (PMV) gespalten, wobei der reife N-Terminus entsteht. Die PNEP werden mit Hilfe der TM ans ER aggregiert. **Kreis 2:** Die Proteine werden vesikulär Richtung Parasitenmembran (PM) transportiert. Diese fusionieren mit der PM, wobei die löslichen Proteine in die parasitophore Vakuole (PV) abgegeben werden, während die Transmembranproteine erst an die PM assoziieren und für den Weitertransport eine Extraktion benötigen. Von der PV aus werden die Proteine über das Translokom PTEX (im Detail im blauen Kasten) durch die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) transportiert. Hierbei werden die Proteine für die Translokation entfaltet. Für die Entfaltung der Proteine spielen Chaperone, wie z. B. die PTEX-Komponente Hsp101, eine wichtige Rolle. **Kreis 3:** Das Sortieren und den Weitertransport der Proteine nach der Translokation durch die PVM. Lösliche Proteine erreichen ihr Ziel oder Zwischenziel durch Diffusion, während Transmembranproteine vermutlich in sogenannten Proteintransportaggregate (PTA) weiter transportiert werden. Viele Proteine werden erst zu den Maurer'schen Spalten (MC) transportiert. Hier werden die Transmembranproteine vermutlich über ein Translokom (markiert durch ein Fragezeichen) in die Maurer'sche Spalten-Membran (MCM) integriert. Von den MC markiert der Transport der Proteine zu der Erythrozytenmembran (EM) mit Hilfe von sogenannten EDVs (engl. *electron dense vesicles*) erfolgen, die dann entweder über „*tether*“ (T) oder oder Aktinstränge Richtung EM wandern. Sec61: ER-assoziiertes Translokom. K: Knobs. (**Abbildung 4A:** nach Spielmann und Gilberger, 2015; **Abbildung 4B:** nach Boddey und Cowman, 2013; modifiziert).

Diese sind Chaperonkomplexe, welche aus einem parasitären Chaperon (HSP40) und einem erythrozytären Chaperon (HSP70) bestehen, welche mit den Transmembranproteinen ein PTA bilden könnten und vermutlich beim Transport von Proteinen eine Rolle spielen (Banumathy *et al.*, 2002; Külzer *et al.*, 2010; Külzer *et al.*, 2012). Der letzte Schritt des Exports für die Proteine die an die Erythrozytenoberfläche transportiert werden, könnte schließlich von den Maurer'schen Spalten in sogenannten EDVs (engl. *electron dense vesicles*) über dünne Halterungen (*Tether*) oder Aktinsträngen erfolgen, welche eine Verbindung zwischen MC und EM bilden (Spielmann und Gilberger, 2015).

1.4.1 Die Exportsignale

Wie bereits oben erwähnt, können die exportierten Proteine in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Die PEXEL-Proteine und die PEXEL-negativen Proteine (PNEPs). Das PEXEL-Motiv, auch VTS (engl. *vacuolar targeting signal*) genannt (Hiller *et al.*, 2004; Marti *et al.*, 2004), ist ein konserviertes Motiv bestehend aus fünf Aminosäuren (RxLxE/Q/D), welches 20 - 30 Aminosäuren entfernt des N-terminalen Signalpeptids lokalisiert ist. Die konservierte Lokalisierung des PEXEL-Motivs innerhalb des Proteins (Sargeant *et al.*, 2006) gewährleistet die kotranslationale Spaltung des Proteins durch Plasmepsin V (Boddey *et al.*, 2016). Die Spaltung des PEXEL-Motivs ist essentiell für den Export der Proteine (Chang *et al.*, 2008; Boddey *et al.*, 2009; Boddey *et al.*, 2010; Russo *et al.*, 2010; Sleebs *et al.*, 2014). Hierbei sind die hoch konservierten Aminosäuren in den Positionen 1 (Arginin - R) und 3 (Leucin - L) entscheidend für die Spaltung durch Plasmepsin V, welche nach Leucin zwischen den Positionen 3 und 4 geschieht (RxL⁺xE/Q/D), während die semi-konservierte Position 5, welche aus den Aminosäuren Glutaminsäure (E), Glutamin (Q) oder Asparaginsäure (D) bestehen kann, wichtig für den Export ist (Marti *et al.*, 2004; Hiller *et al.*, 2004; Sargeant *et al.*, 2006; Boddey *et al.*, 2009). Der, nach der Spaltung entstandene N-Terminus (xE/Q/D), auch als reifer N-Terminus bekannt, soll als Signal für die Lenkung des Proteins in die PV dienen, wo sie anschließend über die PVM über ein Translokon in das Erythrozytenzytosol transportiert werden (Boddey *et al.*, 2009; Boddey und Cowman, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass künstlich-erzeugte reife N-Termini ebenfalls zum Export führten (Grüning *et al.*, 2012). Dies weist darauf hin, dass die Anwesenheit eines reifen N-Terminus im ER ausreichend ist, um den Export zu vermitteln (Grüning *et al.*, 2012; Spielmann und Gilberger, 2015; Spillman *et al.*, 2015).

Die zweite Gruppe von exportierten Proteinen umfasst die PEXEL-negativen Proteine, welche wie aus dem Namen zu entnehmen ist, kein PEXEL-Motiv besitzen. Bis heute konnte

kein übereinstimmendes Sequenzmotiv zwischen den PNEPs gefunden werden (Spycher *et al.*, 2006; Haase *et al.*, 2009; Saridaki *et al.*, 2009; Pachlatko *et al.*, 2010), was die Vorhersage und Identifizierung der PNEPs im Vergleich zu den PEXEL-Proteinen schwieriger macht. Den klassischen PNEPs fehlt das N-terminale Signalpeptid, oft besitzen sie eine Transmembrandomäne (Spycher *et al.*, 2008; Haase *et al.*, 2009; Saridaki *et al.*, 2009; Grüring *et al.*, 2012). Zu den bisher bekannten PNEPs gehören beispielsweise SBP1 (engl. *skeleton binding protein 1*) (Blisnick *et al.*, 2000), MAHRP1 und 2 (engl. *membrane associated histidine rich protein 1/2*) (Spycher *et al.*, 2003; Pachlatko *et al.*, 2010) sowie REX1 und 2 (engl. *ring exported protein 1*) (Hawthorne *et al.*, 2004; Spielmann *et al.*, 2006b). Es konnte gezeigt werden, dass die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren von diesen fünf PNEPs in Anwesenheit einer PNEP-Transmembrandomäne in der Lage waren, den Export zu vermitteln (Haase *et al.*, 2009; Saridaki *et al.*, 2009; Grüring *et al.*, 2012; Heiber *et al.*, 2013). Zusätzlich ähnelt der N-Terminus von PNEPs funktionell dem von prozessierten PEXEL-Proteinen (Grüring *et al.*, 2012). Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass der Transport von PNEPs ähnlich wie der von PEXEL-Proteinen Brefeldin-A sensitiv ist, was zeigt, dass beide Proteingruppen über den klassischen sekretorischen Transportweg des Parasiten in die Parasitenmembran transportiert werden (Spycher *et al.*, 2006; Dixon *et al.*, 2008; Haase *et al.*, 2009; Saridaki *et al.*, 2009). Zu dem konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Translokom PTEX den Transport von PNEPs über die PVM vermittelt (Beck *et al.*, 2014; Elsworth *et al.*, 2014). Basierend auf diese gemeinsamen Eigenschaften wird heute angenommen, dass PNEPs und PEXEL-Proteine zumindest zum Teil über die gleichen Transportwege exportiert werden.

1.5 Zytoadhäsion – Ein Pathogenitätsfaktor

Der Malariaerreger besitzt zwei Hauptmechanismen, um das Immunsystem des Wirts während der intraerythrozytären Phase seiner Entwicklung zu evadieren. Der eine ist die Antigenvariation, welche das Erkennen eines spezifischen Antigens und somit die Bildung von spezifischen Antikörpern durch das Immunsystem erschwert (Scherf *et al.*, 2008; Voss *et al.*, 2014). Der zweite wichtige Mechanismus ist die Zytoadhäsion. Circa 16 - 20 Std. nach der Invasion ist ein iE vom Parasit so modifiziert worden, dass er in der Lage ist an Endothelzellen sowie an Thrombozyten und nicht infizierten Erythrozyten zu adhären (Rowe *et al.*, 2009). Die Zytoadhäsion an mikrovaskulären Endothelzellen führt zu einer Sequestrierung der iE in den kleinen Kapillaren (Barnwell, 1989; Rogerson *et al.*, 2004; Maier *et al.*, 2009). Damit werden sie aus dem Blutstrom entfernt und umgehen so der

Eliminierung durch die Milz (Chotivanich *et al.*, 2002). Die Fähigkeit, die infizierten Erythrozyten zur Adhäsion zu induzieren, ermöglicht dem Parasit einerseits im Wirt zu überleben, andererseits ist sie die Hauptursache für die Entwicklung der schweren Form der Krankheit, welche zum Tod des Wirts führen kann (Medana und Turner, 2006; Dondorp *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2013; Storm und Craig, 2014; Wassmer *et al.*, 2015). Die adhärenenten iE verursachen eine Behinderung des Blutflusses in den mikrovaskulären Blutgefäßen, welche zu einer endothelialen Dysfunktion führen, die wiederum zur Beeinträchtigung der Durchblutung in den Organen, Hypoxie und Laktatazidose führen kann (Dondorp *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2013). Die Zytoadhäsion ist somit von zentraler Bedeutung für die Pathogenität von *P. falciparum* und daher ein wichtiger Schwerpunkt in der Malariaforschung. Bis vor kurzen nahm man an, dass die Zytoadhäsion eine exklusive Eigenschaft von *P. falciparum* war, allerdings zeigen aktuelle Studien, dass dies auch bei *P. vivax* der Fall sein könnte (Singh *et al.*, 2014).

1.5.1 Zytoadhäsion bei *P. falciparum*

Die Zytoadhäsion wird durch die Interaktion zwischen parasitären Proteinen, die an die Oberfläche des iE exportiert werden (Liganden) und humanen Endothelrezeptoren vermittelt. Derzeit gelten bei *P. falciparum* als hauptverantwortlich für diese Interaktion die Proteine der PfEMP1-Familie, welche die Adhäsion von infizierten Erythrozyten an unterschiedliche Endothelrezeptoren vermitteln (Magowan *et al.*, 1988; Rogerson *et al.*, 1995; Su *et al.*, 1995; Baruch *et al.*, 1996). Andere *P. falciparum*-Proteine, die mit der Adhäsion in Verbindung gebracht werden, sind die der Protein-Familien RIFIN und STEVOR, welche bei der Adhäsion von infizierten an nicht-infizierten Erythrozyten (*Rosetting*) involviert sein sollen (Niang *et al.*, 2014; Goel *et al.*, 2015). Bis dato kennt man mehr als 20 humane Endothelrezeptoren, die in einer Interaktion mit PfiE involviert sind. Allerdings gibt es für die meisten von ihnen keine genauen Untersuchungen (Rogerson *et al.*, 1995; Baruch *et al.*, 1996; Fried und Duffy 2002; Rowe *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2013; Turner *et al.*, 2013; Esser *et al.*, 2014). Die Zytoadhäsion von PfiE an Endothelrezeptoren kann unterschiedliche Phänotypen aufweisen. Biophysikalisch kann sie beispielsweise in den so genannten „*slip*“ oder „*catch-slip*“ Bindungen unterteilt werden (Helms *et al.*, 2016). Diese Klassifizierung berücksichtigt die Lebensdauer bzw. Stabilität der Bindung unter dem Einfluss einer auf die Bindung wirkenden Zugkraft, wie beispielsweise die Scherkraft, die durch die Flussbedingung erzeugt wird. Bei der *slip*-Bindung gilt, je höher die darauf wirkende Kraft ist, desto kurzlebiger ist sie. Die *catch-slip*-Bindung wird im Gegenteil dazu erst stabiler bei Erhöhung der Scherkraft

und wird bei einer Weitererhöhung der Scherkraft abgerissen (Helms *et al.*, 2016) (Siehe Abb. 5).

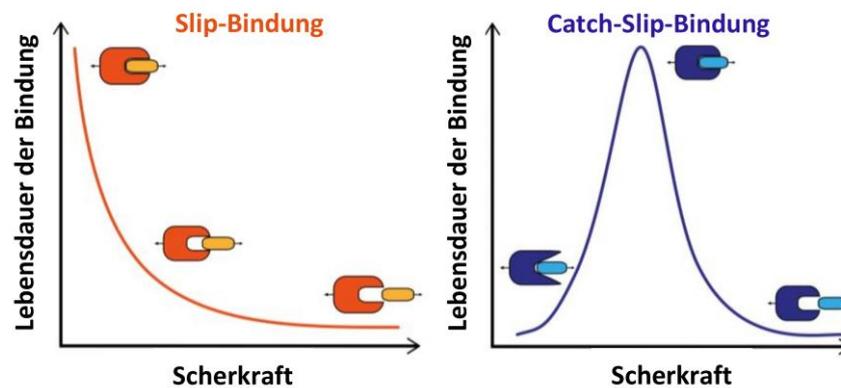


Abbildung 5: Biophysikalische Eigenschaften einer Bindung. Die Diagramme zeigen das Verhältnis zwischen der Lebensdauer einer Bindung und der Scherkraft, die auf die Bindung wirkt. Die Lebensdauer einer Slip-Bindung (links) nimmt bei Erhöhung der Scherkraft ab, während bei der Catch-Slip-Bindung (rechts) die Lebensdauer erst zunimmt und anschließend erneut abfällt. (nach Helms *et al.*, 2016; modifiziert).

Des Weiteren kann die Zytoadhäsion ebenfalls nach ihrer Dynamik unterschieden werden. Hierbei kann man die Bindung anhand ihres Assoziations- bzw Dissoziationsgrades in drei unterschiedliche Verhalten aufteilen: Die transiente, die rollende und die stationäre Bindung. Die transiente Bindung, bei der es zu unregelmäßigen kurzlebigen Bindungen kommt, die schnell wieder dissoziieren. Die rollende Adhäsion, bei der die gebundenen Zellen in einer umklappenden „*flipping*“ Bewegung über die Endothelzellen rollen (Siehe Abb. 6). Diese zeigen einen hohen Assoziationsgrad und einen intermediären Dissoziationsgrad.



Abbildung 6: Rollende Bewegung eines infizierten Erythrozyten. Die Abbildung zeigt die typische umklappende (*flipping*) Bewegung eines rollenden infizierten Erythrozyten. (Helms *et al.*, 2016)

Eine stationäre oder statische Bindung bezeichnet eine Bindung, bei der der Dissoziationsgrad fast Null ist, das bedeutet, dass einzelne Molekülbindungen zwar noch dissoziieren können aber die gebundene Zelle stationär bleibt. Dieses dynamische Verhalten ist bei den Leukozyten bekannt und gut charakterisiert. Wie bei den Leukozyten zeigen die *P. falciparum* infizierten Erythrozyten unterschiedliche Bindungsverhalten, welche von der Rezeptor-Ligand-Interaktion abhängig zu sein scheinen (Ho *et al.*, 2000; Helms *et al.*, 2016). Allerdings

ist es noch sehr umstritten, von welcher Interaktion die jeweiligen Bindungsverhalten vermittelt werden. Einige Studien zeigten, dass *PfiE* eine statische Bindung auf Oberflächen, die mit den humanen Endothelrezeptoren CD36 (engl. *cluster of differentiation*) oder CSA (engl. *chondroitin sulfate A*) bedeckt waren, aufwiesen, während auf ICAM-1 (engl. *intracellular adhesion molecule-1*) und P-Selektin bedeckten Oberflächen eine rollende Bewegung (bei physiologischer Scherkraft) beobachtet wurde (Nash *et al.*, 1992; Cooke *et al.*, 1994; Cooke *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 2000; Yipp *et al.*, 2000). Allerdings konnte auf einer mit CD36 bedeckten Oberfläche ebenfalls eine rollende Bewegung der *PfiE* gezeigt werden (Herricks *et al.*, 2013). Antia *et al.* untersuchte die Dynamik der Zytoadhäsion auf CD36 und ICAM-1 sowohl mit Proteinbedeckten Oberflächen als auch mit transgenen Zelllinien, welche die humanen Rezeptoren auf der Oberfläche trugen. Hierfür wurde die CHO-Zelllinie (engl. *Chinese Hamster Ovary*) verwendet. Dies ist eine immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters (*Cricetulus griseus*). Interessanterweise zeigte diese Studie eine statische Bindung der *PfiE* auf die transgene CHO-ICAM-1-Zelllinie, während eine rollende Bewegung auf der mit ICAM-1 bedeckten Oberfläche beobachtet wurde. Bei der Interaktion mit dem Rezeptor CD36 konnte sowohl bei den Untersuchungen mit der Proteinbedeckten Oberfläche als auch mit der transgenen Zelllinie eine statische Bindung bei niedriger Scherkraft ($< 0,4 \text{ Pa} \sim 4 \text{ dyn/cm}^2$) beobachtet werden, während eine rollende Bewegung bei hoher Scherkraft gezeigt wurde.

Kürzlich konnte ermittelt werden, dass die Anzahl an gebundenen *PfiE* an eine künstliche Membran, welche mit dem Rezeptor CSA beschichtet war, Scherkraft abhängig war. Hierbei hat sich die Anzahl der gebundenen Zellen bei aufsteigender Scherkraft erst erhöht und ist anschließend wieder gesunken (Rieger *et al.*, 2015). Xu *et al.* postulierte, dass sich die Erhöhung der Zytoadhäsion unter Auswirkung einer Scherkraft durch eine Vergrößerung der Berührungsfläche zwischen den Zellen erklären lässt, welche durch die Scherkraft bedingte Deformität der *PfiE* verursacht wird. Dennoch bleiben die genauen Ursachen für die unterschiedlichen Bindungsverhalten der *PfEMP1*-Endothelrezeptor-Interaktion weiterhin unbekannt.

1.5.1.1 Die Multigenfamilien und die *var*-Gene

Die Proteine der *PfEMP1*-Familie sind die Hauptverantwortlichen für die Zytoadhäsion der *PfiE* (Baruch *et al.*, 1996). Sie werden von einer Multigenfamilie Namens *var* kodiert. Die meisten Plasmodienarten besitzen eine Multigenfamilie, welche für die so genannten Oberflächenantigenvarianten (VSA – engl. *variant surface antigen*) kodieren und damit eine

zentrale Rolle bei der Immunevasion (Antigenvariation und Zytoadhäsion) des Parasiten spielen (Ferreira *et al.*, 2004). Die bisher größte identifizierte Multigenfamilie bei *Plasmodium* ist die *pir*-Familie (engl. *Plasmodium interspersed repeats*), welche sechs andere untergeordnete Multigenfamilien in sechs unterschiedlichen Plasmodienarten zusammenfasst. Die *rif* bei *P. falciparum*, die *vir* bei *P. vivax*, *kir* bei *P. knowlesi* und die Multigenfamilien *cir*, *bir* und *yir* in den nicht-humanpathogenen *P. chabaudi*, *P. berghei* und *P. yoelli* (Deutsch und Hviid, 2004; Janssen *et al.*, 2004).

Durch die Vervollständigung der Genomannotation konnten bei *P. falciparum* bisher insgesamt fünf Multigenfamilien identifiziert werden. Die *rif* (engl. *repetitive interspersed family*), *stevor* (engl. *subtolemeric variable open read frame*), *Pfmc-2tm* (engl. *P. falciparum maurer's clefts 2 transmembrane*) und *surf* (engl. *surface associated interspersed*), welche für die RIFIN-, STEVOR-, PfMC-2TM- und SURFIN-Proteine jeweils kodieren sowie die *var*-Multigenfamilie, welche für die Proteine der PfEMP1-Familie kodieren (Gardner *et al.*, 2002; Sam-Yellowe; 2004; Winter *et al.*, 2005). Die *var*-Multigenfamilie besteht aus 60 Genen pro haploiden Parasitengenom (Su *et al.*, 1995; Kyes *et al.*, 2001; Kraemer und Smith 2006), wobei nur eines der 60 *var*-Gene pro Zyklus exprimiert wird, während alle andere durch einen kontrollierten Transkriptionsmechanismus ausgeschaltet werden. Damit wird pro Zyklus auch ein einziges PfEMP1 translatiert (Chen *et al.*, 1998; Scherf *et al.*, 1998; Kyes *et al.*, 2003; Horrocks *et al.*, 2004; Fastman *et al.*, 2012). 35 der 60 *var*-Gene sind subtelomerisch im Chromosom lokalisiert, während die restlichen entweder in Clustern oder einzelne weiter entfernt vom Chromosomende zu finden sind. Die *var*-Gene sind 6-13 kb groß und bestehen jeweils aus zwei Exons, wobei das erste für die variable extrazelluläre Domäne sowie Transmembrandomäne kodiert, während das zweite Exon für die hochkonservierte zytoplasmatische ATS-Domäne kodiert (engl. *acidic terminal segment*) (Kyes *et al.*, 2007, Scherf *et al.*, 2008).

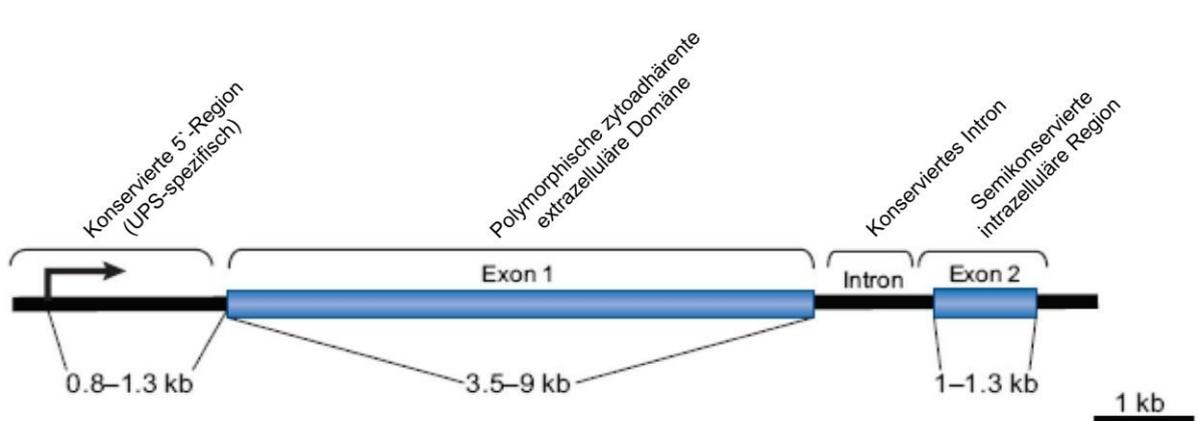


Abbildung 7: Aufbau der *var*-Gene. Das Exon 1 kodiert für die variable extrazelluläre Region sowie für die Transmembrandomäne. Das Exons 2 kodiert für die hochkonservierte zytoplasmatische ATS-Domäne. (nach Scherf *et al.*, 2008; modifiziert).

Basierend auf den Sequenzähnlichkeiten in den 5'-Promoterregionen können die *var*-Gene in fünf Gruppen unterteilt werden: Die Ups (engl. *Upstream*) A, B, C, D und E, wobei das UpsD aus einem einzigen Pseudogen (PFE1640w) besteht (Singh *et al.*, 2014). Genauere Untersuchungen mit dem Laborstamm 3D7 konnten außerdem die intermediären Gruppen A/B und B/C identifizieren (Lavstsen *et al.*, 2003). Die Gruppierung korreliert mit der Lokalisation der Gene auf dem Chromosom und mit der Komplexität der kodierten PfEMP1 (Gardner *et al.*, 2002; Kraemer und Smith, 2003; Lavstsen *et al.*, 2003; Rask *et al.*, 2010). Die *var*-Gene der UpsA und E sind subtelomerisch lokalisiert und werden in die Telomerrichtung transkribiert, während die Gene der UpsC zentral im Chromosom lokalisiert sind und die von UpsB entweder zentral oder subtelomerisch zu finden sind. Die Gene der UpsB und C werden in Richtung des Chromosomzentrums transkribiert (Kraemer *et al.*, 2007; Kyes *et al.*, 2007; Ralph und Scherf, 2005). Die kodierten PfEMP1 besitzen bestimmte Domänen oder Domänenkassetten, die die Bindung an bestimmten Endothelrezeptoren vermitteln, wie z. B. CD36, ICAM-1 oder CSA (Baruch *et al.*, 1996; Gardner *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2003; Howell *et al.*, 2008; Rask *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2013; Turner *et al.*, 2013; Bengtsson *et al.*, 2013; Madkhali *et al.*, 2014). Die *var*-Gene der UpsA kodieren beispielsweise für PfEMP1 Proteine, die keine CD36-Bindungsdomäne aufweisen, während die Gene der UpsB und C für Proteine kodieren, welche eine Bindungsdomäne für den Rezeptor CD36 besitzen (Singh *et al.*, 2014).



Abbildung 8: Lokalisation der *var*-Gene auf dem Chromosom. Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Lokalisation der Ups-Gruppen innerhalb eines Chromosoms. Die *var*-Gene werden anhand von Sequenzähnlichkeiten der 5'-Promoterregion in unterschiedliche Ups-Gruppen unterteilt und diese korreliert mit ihrer Lokalisation im Chromosom. Die Pfeile zeigen die Leserichtung der Gene. Die *var*-Gene der UpsA und E kodieren für PfEMP1, die keine CD36-Bindungsdomäne aufweisen, während der Gene aus den UpsB und C für CD36 bindende Proteine kodieren. TAREs (engl. *telomere associated repetitive elements*). (nach Kyes *et al.*, 2007; modifiziert).

1.5.1.2 Die *var*-kodierte Proteinfamilie – PfEMP1

Die PfEMP1 bestehen aus einem N-terminalen Segment (NTS) sowie zwei bis sieben DBL-Domänen (engl. *Duffy binding like domain*), ein bis zwei CIDR-Domänen (engl. *cysteine rich interdomain regions*), eine Transmembrandomäne und den konservierten ATS-Bereich (Miller *et al.*, 2002; Rask *et al.*, 2010). Die DBL-Domänen werden in sechs Hauptgruppen unterteilt (α , β , γ , δ , ϵ und ζ), während bei den CIDR-Domänen in drei wichtige Gruppen unterschieden werden (α , β , γ) (Su *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2000b; Lavstsen *et al.*, 2003;

Kraemer *et al.*, 2007; Rask *et al.*, 2010). Für einige dieser Domänen konnte bereits eine Interaktion mit anderen Molekülen gezeigt werden. Für die DBL β 5-Domäne konnte beispielsweise eine Interaktion mit dem Rezeptor ICAM-1 ermittelt werden (Howell *et al.*, 2008; Bengtsson *et al.*, 2013), während DBL δ mit dem Rezeptor PECAM-1 (engl. *platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*) interagiert und DBL α bei der Adhäsion an Heparinsulfat (HS), Antigene der Blutgruppe A und an den Komplementrezeptor 1 (CR1 – engl. *complement receptor 1*) involviert ist (Rowe *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000). Bei den CIDR-Domänen scheint die CIDR α -Domäne eine Bindung an Immunglobulin M und PECAM-1 zu vermitteln (Chen *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die meisten PfEMP1 eine N-terminale Kopfstruktur aufweisen, welche aus einer semikonservierten DBL α und einer CIDR-Domäne besteht (Gardner *et al.*, 2002) und eine wichtige Rolle bei der Bindungseigenschaft der PfEMP1 spielt. Die Kopfstrukturen, welche eine CIDR α 2-6-Domäne besitzen, vermitteln eine Bindung an CD36. Diese Kopfstruktur ist in den meisten Proteinen, die von den *var*-Genen aus den UpsB und C kodiert werden, vorhanden (Baruch *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2013). Eine Kopfstruktur mit einer CIDR α 1-Domäne vermittelt eine Bindung an EPCR (engl. *endothelial protein C receptor*). Diese findet man in vielen PfEMP1, welche von den *var*-Genen der UpsA kodiert werden (Turner *et al.*, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die Domänen ebenfalls in bestimmten Kombinationen auftreten können, die so genannten Domänenkassetten (DC – engl. *Domain cassettes*). Bis heute konnten 23 konservierte Domänenkassetten identifiziert werden (Siehe Abb. 9) (Rask *et al.*, 2010). Hierbei wurde die Domänenkassette 2 (DC2), welche in einem einzelnen PfEMP1 (kodiert von *var2csa* aus UpsE) vorkommt, als Bindungsdomäne für CSA identifiziert und in Verbindung mit der „Plazenta-Malaria“ (PAM – engl. *pregnancy associated malaria*) gebracht (Srivastava *et al.*, 2010). Als Plazenta-Malaria wird eine Komplikation der Malaria bezeichnet, die durch die Zytoadhäsion von infizierten Erythrozyten an CSA, welche konzentriert auf der Plazenta lokalisiert ist, hervorgerufen wird. Des Weiteren konnte die Domänenkassette 4 (DC4) als Bindungsdomäne für ICAM-1 identifiziert werden (Bengtsson *et al.*, 2013; Madkhali *et al.*, 2014). Dennoch bleibt für die meisten Domänen und Domänenkassetten unklar, ob sie ebenfalls eine Rolle bei der Zytoadhäsion spielen und wenn ja, ob sie einen Einfluss auf die unterschiedlichen Bindungsphänotypen der PfiE haben.

Ebenfalls wichtig für die Zytoadhäsion scheint der konservierte ATS-Bereich zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass ein PHIST-Protein (engl. *Plasmodium helical interspersed subtelomeric*) mit dem zytoplasmatischen Teil des PfEMP1 interagiert. Das Protein

PFE1605w verbindet die ATS-Domäne der PfEMP1 mit dem Zytoskelett des Erythrozyten und sorgt damit zu einer mechanischen Verstärkung der bindenden Elemente. Dies unterstützt die Zytoadhäsion gegen die Scherkraft, welche im Blutfluss auf die Zellen wirkt (Proellocks *et al.*, 2014; Oberli *et al.*, 2014).

Kassette #	Alias	UPS	PfEMP1-Domänenkassetten								
			DBLpam1	DBLpam2	CIDRpam	DBLpam3	DBLpam4	DBLpam5	DBLp10		
2	VAR2CSA	E	Komponente 1		Komponente 2		Komponente 3		Komponente 4		
3	VAR3	A							DBLα1.3	DBLε8	
1	VAR1	A2	DBLα1.1/4	CIDRα1.2/3	DBLβ1.1/11	DBLy1/15	DBLε1		DBLy8	DBLζ1/2	DBLε5
5		A					DBLy12	DBLδ5	CIDRβ3/4	DBLβ7/9	
16		A	DBLα1.5/6	CIDRδ							
13		A	DBLα1.7	CIDRα1.4							
15		A	DBLα1.2	CIDRα1.5							
11		A	DBLα1.8	CIDRβ2	DBLy7				DBLε11	DBLζ2/3	DBLε6
6		B(A,C)							DBLy14	DBLζ5	DBLε4
7		B(C)							DBLε2	DBLε7	DBLε3
9		B1							DBLy3	DBLζ4	
10		B(A,C)							DBLζ6	DBLε9	
12		B(A)							DBLζ3	DBLε12	
8		B2	DBLα2	CIDRα1.1	DBLβ12	DBLy4/6					
14		B	DBLα0.6	CIDRα3.1	DBLβ5						
17				CIDRα5	DBLβ5						
22		B,C	DBLα0.4/18	CIDRα6	DBLβ5						
21		C(B)	DBLα0.18/21	CIDRα2.1	DBLβ2						
18		B1	DBLα0.14	CIDRα4							
19		B1(C1)	DBLα0.16	CIDRα3.4							
20		B1(C1)	DBLα0.9	CIDRα2.7							

Abbildung 9: Schematische Darstellung der konservierten Domänenkassetten. Die Darstellung zeigt, die bisher identifizierten konservierten Domänenkassetten bei der PfEMP1-Proteinfamilie der *P. falciparum*. (nach Rask *et al.*, 2010; modifiziert).

1.5.2 Zytoadhäsion bei *P. vivax*

Für eine lange Zeit wurde angenommen *P. vivax* sei ein ungefährlicher Malariaerreger, der nur in Ausnahmefällen zu Komplikationen führt (Tan *et al.*, 2007). Allerdings häuften sich in den letzten Jahren immer mehr Fälle von schwerer Malaria und Todesfällen, welche durch eine *P. vivax*-Infektion ausgelöst wurden (Kochar *et al.*, 2005; Barcus *et al.*, 2007; Tjitra *et al.*, 2008; Genton *et al.*, 2008). Der Grund dafür könnte einerseits die Entwicklung von besseren Diagnostikmethoden sein, andererseits könnte es aber auch bedeuten, dass *P. vivax* mit der Zeit virulenter geworden ist (Baird, 2013).

Bereits vor 50 Jahren wurde postuliert, dass „eine nennenswerte Anzahl von Parasiten ihre Vermehrung in Kapillaren vollenden“ (Field und Reid, 1956). Dies korreliert mit aktuelleren Beobachtungen, die eine geringere Anzahl an zirkulierenden Schizonten in Relation zu zirkulierenden Ringen und Trophozoiten bei *P. vivax* Patienten nachgewiesen haben (Lopes *et al.*, 2014). Durch die Bestimmung der parasitären Gesamtbiomasse mit Hilfe eines Markers (parasitäre Laktatdehydrogenase) konnte gezeigt werden, dass die Gesamtbiomasse nicht mit

der Anzahl an zirkulierenden Parasiten korreliert, was auf eine versteckte Parasitämie hindeutet. Allerdings bestand eine Korrelation zwischen der Endothelaktivierung und der Anzahl der zirkulierenden *P. vivax*-Parasiten aber keine zwischen der Gesamtbiomasse der Endothelaktivierung. Dies lässt vermuten dass die versteckten, infizierten Retikulozyten in Bereichen der Organe akkumulieren, die kein Endothelium aufweisen, wie z.B. die langsame, offene Zirkulation in der Milz oder in Bereichen des Knochenmarks (Barber *et al.*, 2015). Bei Untersuchungen mit lethalen und nicht-lethalen Stämmen des murinen Malariaparasiten *P. yoelli* wurde außerdem gezeigt, dass bei der nicht-lethalen Infektion (entsprechend einer chronischen Infektion), die offene Zirkulation in der Milz sich unter der Infektion verändert und sich syncytiale Zellschichten aus kontraktile Fibroblasten ausbilden. Da somit eine physikalische Barriere entsteht, werden diese Zellen auch als *barrier cells* bezeichnet (Weiss, 1990; del Portillo *et al.*, 2004; Martin-Jaular *et al.*, 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nicht-lethale Infektionen ebenfalls die extramedulläre Blutbildung in der Milz stimulieren (Villevall *et al.*, 1990). Durch eine Adhäsion in den *barrier cells* der Milz könnten sich die Parasiten zum einen vor den Makrophagen schützen und zum anderen wären gleichzeitig neue Retikulozyten für eine Invasion vorhanden. Allerdings konnte diese Hypothese bis heute nicht belegt werden.

Weiterhin konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass *P. vivax* infizierte Retikulozyten in der Lage sind an Lungenendothelzellen sowie spezifisch an Endothelrezeptoren wie ICAM-1 oder CSA zu adhären und dass die VIR-Proteine bei dieser Funktion höchstwahrscheinlich eine Rolle spielen (Ansari *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Bernabeu *et al.*, 2012; Chotivanich *et al.*, 2012; De las Salas *et al.*, 2013). Ebenfalls die Rosettierung ist bei *P. vivax* bereits bekannt (Udomsanpetch *et al.*, 1995; Marín-Menéndez *et al.*, 2013). Die Zytoadhäsion assoziiert mit einer endothelialen Aktivierung, zirkulierenden Parasiten und die systemische Entzündungsreaktion, könnten einen Grund für die Pathologie einer *P. vivax* Infektion darstellen (Barber *et al.*, 2015).

1.5.2.1 Die *vir*-Multigenfamilie

Die VIR-Proteine gelten momentan als Kandidaten für die Vermittlung der Zytoadhäsion von *P. vivax* infizierten Retikulozyten (*PviR*). Diese Proteine werden von der *P. vivax* Multigenfamilie *vir* (engl. *variant interspersed repeats*) kodiert und es wird postuliert, dass sie ähnliche Funktionen haben könnten, wie die *P. falciparum* analoge Multigenfamilien *var*, *rif* oder *stevor* (Singh *et al.*, 2014). Erste Annotationen des *vir*-Gen-Repertoires vom *P. vivax*-Stamm Sall zeigten insgesamt 346 *vir*-Gene, einschließlich verkürzter Fragmente (engl.

truncated) und Pseudogene, die in zwölf Subfamilien aufgeteilt werden konnten (del Portillo *et al.*, 2001; Carlton *et al.*, 2008; Fernandez-Becerra *et al.*, 2009). Eine neue *in silico*-Analyse, die mit der gleichen SalI-Genomsequenz durchgeführt wurde, definierte 295 der Gene als Mitglied der *vir*-Multigenfamilie, welche in zehn Subfamilien unterteilt waren und identifizierte drei neue subtelomerische Multigenfamilien (*pvpirA*, *pvpirD* und *pvpirH*) (Lopez *et al.*, 2013). Die *vir*-Gene sind im Vergleich zu den *var*-Genen relativ klein mit ca. 156 – 3434 bp. Sie sind ausschließlich subtelomerisch lokalisiert und bestehen jeweils aus einem bis fünf Exons (Singh *et al.*, 2014). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die *vir*-Gene anders als die *var*-Gene nicht einzeln pro Genom und Zyklus (engl. *mutually exclusive expression*), sondern ubiquitär exprimiert werden (Fernandez-Becerra *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte bei einigen VIR-Proteinen eine unterschiedliche Lokalisation innerhalb der iE ermittelt werden, was darauf hindeutet, dass die Proteine unterschiedliche Funktionen ausüben können (Bernabeu *et al.*, 2012). Kürzlich konnte eine Korrelation der Expression von einigen untersuchten *vir*-Genen mit der Ausbildung einer schweren Malaria nachgewiesen werden (Gupta *et al.*, 2016), was ein Indiz für einen Zusammenhang zwischen den VIR-Proteinen und der Pathogenität der *P. vivax*-Malaria darstellt. Dennoch ist vieles über die *vir*-Multigenfamilie und die dazugehörige VIR-Proteine noch unbekannt. Es ist zum Beispiel unklar, wie sie vom Parasit in den Erythrozyten exportiert werden. Die meisten VIR-Proteine weisen kein Signalpeptid auf und besitzen kein klassisches Exportsignal, wie das PEXEL-Motiv der exportierten *P. falciparum*-Proteine (Singh *et al.*, 2014). Ähnliche Eigenschaften findet man bei den sogenannten PNEPs im *P. falciparum*. Dies könnte auf einen ähnlichen Transportweg hindeuten.

1.6 Untersuchte humane Endothelrezeptoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, für die Weitercharakterisierung der Zytoadhäsion bei *P. falciparum*, die humanen Endothelrezeptoren CD36, ICAM-1, CD9 und P-Selektin, verwendet.

1.6.1 CD36

Der Rezeptor CD36 (engl. *cluster of differentiation 36*), auch bekannt als Glykoprotein IV, ist ein integrales Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 53 kDa, das aber durch Glykosylierung ein Molekulargewicht von 88 kDa erreichen kann (Greenwald *et al.*, 1990). CD36 wird auf der Oberfläche von zahlreichen Zelltypen in Vertebraten gefunden und ist ein Rezeptor, welcher mit vielen Liganden, wie z. B. Kollagen, Thrombospondine, native

Lipoproteine, langkettige Fettsäuren und oxidierte Phospholipide, interagieren kann (Tandon *et al.*, 1989; Silverstein *et al.*, 1992; Baillie *et al.*, 1996; Calvo *et al.*, 1998; Podrez *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wird angenommen, dass CD36 in vielen Mechanismen involviert ist. Außerdem spielt CD36 eine wichtige Rolle bei der Zytoadhäsion von *P. falciparum* (Oquendo *et al.*, 1989) und ist quantitativ betrachtet der wichtigste Rezeptor bei der Interaktion mit PfiE. Es konnte bisher für beinahe alle *P. falciparum*-Stämme aus Patienten-Isolaten eine Bindung an CD36 nachgewiesen werden (Esser *et al.*, 2014). Allerdings konnte eine Korrelation des Rezeptors mit schwerer Form der Malaria, wie z. B. die zerebrale Malaria, noch nicht belegt werden (Turner *et al.*, 1994; Newbold *et al.*, 1997). Bisherige Studien konnten unterschiedliche Bindungsphänotypen von PfiE an den Rezeptor CD36 nachweisen (Antia *et al.*, 2007; Herricks *et al.*, 2013).

1.6.2 ICAM-1

ICAM-1 (engl. *intra cellular adhesion molecule 1*), auch bekannt als CD54, ist ebenfalls ein Transmembran-Glykoprotein und gehört zur Familie der Immunoglobuline. Das Protein kommt in geringer Konzentration in den Endothelzellen vor. Allerdings wird die Expression des Gens, welches für ICAM-1 kodiert, durch inflammatorische Zytokinen, wie Interleukin 6 (IL6) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) induziert (Hunt und Grau 2003; Wung *et al.*, 2005). ICAM-1 vermittelt die Adhäsion und Migration von Leukozyten über eine Interaktion mit den Integrinen LFA-1 (engl. *lymphocyte function-associated antigen 1*) oder Mac-1 (engl. *macrophage-1 antigen*) (Lennartz *et al.*, 2015).

Bei *post mortem* Untersuchungen konnte eine Kolokalisation zwischen dem ICAM-1 Rezeptor und adhärenen PfiE im Gehirngewebe gezeigt werden (Turner *et al.*, 1994) und *in vitro* Analysen mit Parasitenisolaten aus Patienten mit zerebraler Malaria wiesen eine präferenzielle Bindung der PfiE an ICAM-1 auf (Newbold *et al.*, 1997; Ochola *et al.*, 2011). Dennoch konnte bei Studien mit Feldisolaten aus Asien keine Korrelation zwischen der Bindung an ICAM-1 und der schweren Malaria nachgewiesen werden (Ockenhouse *et al.*, 1991; Udomsangpetch *et al.*, 1996).

1.6.3 CD9

CD9 gehört zur Familie der Tetraspanine, welche durch ihre konservierte Struktur mit vier Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Domänen charakterisiert ist. Das Protein CD9 kommt auf der Oberfläche von verschiedenen Zelltypen vor und ist in Ereignissen, wie

der Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten (Boucheix *et al.*, 1991) oder der Migration unterschiedlicher Krebszelllinien, involviert (Powner *et al.*, 2011).

Es konnte gezeigt werden, dass zusammengesetzte Tetraspanin-Mikrodomänen die Leukozytenadhäsion an Endothelzellen regulieren (Barreiro *et al.*, 2005). Außerdem wurde die Interaktion von CD9 mit Integrinen und anderen Membranproteinen, wie beispielsweise CD36, beschrieben (Miao *et al.*, 2001). Im Jahr 2014 wurde CD9 zum ersten Mal als Rezeptor für die Zytoadhäsion von *PfiE* beschrieben (Esser *et al.*, 2014). Zudem wird postuliert, dass die Bindung von *Plasmodium* infizierten Erythrozyten an Tetraspanine zu einer unkontrollierten Transmigration der Leukozyten führt, was eine wichtige Rolle bei der Pathogenität der schweren Malaria spielen könnte (Miller *et al.*, 2002). CD9 kommt außerdem auf der Oberfläche der Thrombozyten vor und könnte in die Verklumpung der iE mit den Thrombozyten, welche mit der schweren Malaria assoziiert ist, involviert sein (Miao *et al.*, 2001; Pain *et al.*, 2001)

1.6.4 P-Selektin

P-Selektin gehört zur Familie der adhäsiven Rezeptoren, die fukosylierte und sialylierte Proteine erkennen und binden (Kansas, 1996). Die Selektine teilen eine konservierte Domänenstruktur, welche aus einer N-terminalen Lektin-Domäne (Lec - engl. *Lectin*), einer epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Domäne (EGF – engl. *epidermal growth factor*), sogenannter SCR-Domäne (engl. *short consensus repeat*), einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen C-terminalen Domäne bestehen (Erbe *et al.*, 1992). P-Selektin kommt sowohl in Endothelzellen als auch in Thrombozyten vor (Ley *et al.*, 2007). Der Rezeptor ist in den Endothelzellen normalerweise in kleinen Zellorganellen (Weibel-Palade-Körperchen) gelagert und wird während einer lokalen Entzündungsreaktion an die Zelloberfläche der Zellen eingesetzt, wo sie an der Rekrutierung von Leukozyten beteiligt sind (Bonfanti *et al.*, 1989; Bevilacqua und Nelson 1993; Mayadas *et al.*, 1993; Granger und Kubes, 1994). Im Jahr 1998 wurde P-Selektin zum ersten Mal als Rezeptor für die Zytoadhäsion von *PfiE* beschrieben (Ho *et al.*, 1998) und drei Jahre später wurde *PfEMP1* als Ligand für P-Selektin identifiziert (Senczuk *et al.*, 2001). In einem Tiermodell mit *P. berghei* infizierten Mäusen, konnte gezeigt werden, dass die Defizienz von P-Selektin im Endothelium vor der Entwicklung zerebraler Malaria schützte (Combes *et al.*, 2004).

1.7 Zielsetzung

Die Zytoadhäsion ist einer der Hauptfaktoren für die hohe Pathogenität von *P. falciparum*. Laut der WHO sterben jährlich über 400.000 Menschen infolge der Malariaerkrankung und obwohl *P. falciparum* der gefährlichste Malariaerreger ist, stellt er nicht als einziger Erreger eine Bedrohung dar. Insbesondere außerhalb Afrikas spielt *P. vivax* eine zentrale Rolle, wo er für über 40 % der Malariaerkrankungen verantwortlich ist. In den letzten Jahren wurde immer mehr von Fällen schwerer Malaria berichtet, welche durch den Erreger *P. vivax* hervorgerufen wurde und es wurde postuliert, dass diese, wie bei *P. falciparum*, u. a. auf die Zytoadhäsion der infizierten Zellen zurückzuführen sind. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob *P. vivax* tatsächlich die Fähigkeit zur Zytoadhäsion besitzt und ob diese auch hier für die Pathogenität dieses Parasiten von Bedeutung ist. Aus diesem Grund ist es wichtig den komplexen Mechanismus der Zytoadhäsion sowohl bei *P. falciparum*, als auch bei *P. vivax* genau zu verstehen, um somit in der Zukunft neue Ansätze insbesondere für die Behandlung der schweren Malaria entwickeln zu können. Im Rahmen dieser Studie sollten zwei Projekte erarbeitet werden.

1.7.1 Projekt 1

In dem ersten Projekt sollten die Bindungseigenschaften von *P. falciparum* mit Hilfe von unterschiedlichen Endothelrezeptoren charakterisiert werden. Die bis dato meisten Erkenntnisse über die Zytoadhäsion von *P. falciparum* beziehen sich auf Ergebnisse von statischen Bindungsexperimenten, welche zwar einen guten Einblick in die Interaktion zwischen iE und Endothelrezeptoren vermitteln, aber eine wichtige physiologische Eigenschaft nicht berücksichtigt, den Blutfluss.

Hier sollte mit Hilfe eines Flusssystems die Dynamik der Zytoadhäsion von *P. falciparum* auf die Rezeptoren CD36, ICAM-1, CD9 und P-Selektin unter Einfluss verschiedener Scherkräfte charakterisiert werden. Des Weiteren sollten die PfiE für die Bindungsstudie spezifisch auf den jeweiligen Rezeptor angereichert werden, um eine Parasitenpopulation zu selektionieren, die eine größere Bindungskapazität als die nicht-angereicherte Population an den jeweiligen Rezeptor zeigt. Schließlich sollte für einen genaueren Vergleich zwischen der Bindung an CD36 und an ICAM-1 eine Transkriptomanalyse beider Anreicherungen sowie der nicht-angereicherten Population durchgeführt werden, um somit einen möglichen Zusammenhang zwischen der *var*-Genexpression und dem Bindungsverhalten darstellen zu können.

1.7.2 Projekt 2

Im zweiten Projekt sollte eine Charakterisierung der *P. vivax* VIR-Proteine durchgeführt werden, um Proteine zu identifizieren, welche eine Rolle bei Zytoadhäsion von *P. vivax* infizierten Retykulozyten spielen.

Als erstes sollte eine *in silico*-Analyse der VIR-Proteine durchgeführt werden, um einen besseren Überblick zu verschaffen und Kandidaten zu identifizieren, die anhand ihrer Eigenschaften in die Erythrozytenmembran exportiert werden und somit eine Rolle bei der Zytoadhäsion spielen könnten. Des Weiteren sollte für die ausgewählten Kandidaten, mit Hilfe transgener *P. falciparum*-Zelllinien sowie Immunfluoreszenzanalyse, eine Lokalisationsstudie durchgeführt werden. Dies soll u. a. dazu dienen VIR-Proteine zu identifizieren, die an die Erythrozytenmembran exportiert werden und somit putative *P. vivax*-Liganden darstellen. Mit diesen Proteinen konnten in der Zukunft Bindungsstudien durchgeführt werden, um einen Zusammenhang mit der Zytoadhäsion zu überprüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Für die Durchführung der Versuche wurden folgende Materialien verwendet.

2.1.1 Verwendete Geräte

Autoklav:	HST (Zirbus Technology, Bad Grund)
Bioanalyser:	Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA)
Brutschrank (ohne CO₂):	Innova 4200 (New Brunswick Scientific, Nürtingen)
Eismaschine:	EF 156 easy fit (Scotsmann, USA)
Elektroporator:	Nucleofector II AAD-1001N (Lonza, Schweiz)
Durchflusszytometer:	BD FACSAria™ (BD Biosciences, USA)
Gefrierlagerung:	Mr. Frosty (Thermo Scientific, Langenselbold) FORMA 700 Series (Thermo Fisher Scientific, USA) Nitrogen Container (Thermo Fisher Scientific, USA)
Gelkammer:	PerfectBlue Gel System (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen)
Heizblock:	Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
Inkubator (mit CO₂):	Function Line (Heraeus Instruments, Hanau)
Magnetrührer:	RH Basic (Janke & Kunkel IKA, Staufen)
Mikroskop:	TEM Tecnai Spirit (FEI, USA) EVOS XL (Thermo Fisher Scientific, USA) EVOS FL Auto (Thermo Fisher Scientific, USA) Axioscope M1 (Zeiss, Jena) cx31 (Olympus, Hamburg)
Mikroskop-Digitalkamera:	Orca C4742-95 (Hamamatsu Phototonics K.K., Japan)
Photometer:	NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Langenselbold)
pH-Meter:	CG840 (Sartorius AG, Göttingen)
Pipettierhilfe:	2 /20/ 200/1000µL (Gilson, USA) S1 Pipettierhilfe (Thermo Scientific, Langenselbold)
Pumpensystem:	Ibidi Pump System-10902 (Ibidi, Martinsried)

Sequenzierplattform:	HiSeq™ 4000 (Illumina, USA)
Sicherheitswerkbank:	Class II BSC (ESCO Labculture®, Singapur)
Spannungsgeber:	EPS301 (Amersham pharmacia biotech, USA)
Thermocycler:	Eppgradient (Eppendorf, Hamburg) ABI 9700 GeneAmp (Applied Biosystems, Darmstadt)
UV-Transilluminator:	PHEROlum289 (Biotec Fischer, Reiskirchen)
Vario MACS™	(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
Vortexer:	VF2 (Janke & Kunkel IKA, Staufen)
Waagen:	SPO 51 (Scaltec, Göttingen) Sartorius BP210S (Sartorius AG, Göttingen)
Wasserbad:	SW 20 (Julabo, Seelbach)
Zentrifugen:	5415D und 5810R (Eppendorf, Hamburg) Rotor JA-10; Rotor JA-12 (Beckman Coulter, Krefeld) Rotina 48 centrifuge (Hettich Technology, Tuttlingen)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

CellTrics® 30 µm	(Sysmex, Nordestedt)
Cryoröhrchen 1,6 ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
DakoCytomation Pen	(Biocompare, Dänemark)
Deckgläschen	(Thermo Fisher Scientific, USA)
Deckgläschen 24 X 65 mm, Dicke 0,13-0,16 mm	(R. Langenbrinck, Emmendingen)
Gasflasche (1 % O ₂ , 5 % CO ₂ , 94 % N ₂)	(Air liquid, Düsseldorf)
Gewebekulturflasche 250 ml (T75)	(Greiner Bio-One, Frickenhausen)
Gewebekulturflasche 50 ml (T25)	(Greiner Bio-One, Frickenhausen)
Hydrophobische Filter, 0,45µm, Steril	(Thermo Fisher Scientific, USA)
MACS® columns CS	(Miltenyi Biotec, Berg. Gladbach)
Mikro-Schraubröhre 2 ml, PP	(Sarstedt, Nümbrecht)
Millipore Stericup Vacuum Filter	(Merck, Darmstadt)
Nitrocellulose blotting, Amersham 0,45 µm	(GE Healthcare, Deutschland)
Membrane Protran, Amersham 0,45 µm	(GE Healthcare, Deutschland)
Objektträger	(Thermo Fisher Scientific, USA)
Parafilm	(Bemis, USA)

Pasteurpipette	(Brand, Wertheim)
Petrischalen mit und ohne Noppen	(Sarstedt, Nümbrecht)
Pipettenspitzen 1-10/20-200/100-1000 µl	(Sarstedt, Nümbrecht)
Pipettenspitzen mit Filter 1-10/20-200/100-1000 µl	(Sarstedt, Nümbrecht)
Serologische Plastikpipetten 5/10/25 ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
Sterile FACS-Röhrchen (PP) (5 ml)	(Falcon, USA)
Transfektionsküvetten 0,2 cm	(Bio-Rad, München)
1,5 ml Safe-lock Reaktionsgefäße	(Eppendorf, Hamburg)
2 ml Safe-lock Reaktionsgefäße	(Eppendorf, Hamburg)
14 ml Polystyrene "round-bottom" Röhrchen	(Falcon, USA)
15 ml Konische Zentrifugationsröhrchen	(Sarstedt, Nümbrecht)
50 ml Konische Zentrifugationsröhrchen	(Sarstedt, Nümbrecht)

2.1.3 Chemische und biologische Substanzen

Accutase (100ml)	(GE Healthcare, Schweden)
Acrylamide/Bisacrylamide solution (40 %)	(Carl Roth, Karlsruhe)
Agar LB (Lennox)	(Carl Roth, Karlsruhe)
Albumax II	(Gibco, Life Technologies, USA)
Ampicillin	(Roche, Mannheim)
Biocoll Trennlösung	(Biochrom, Berlin)
BSA - engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>	(Biomol, Hamburg)
CaCl ₂	(Merck, Darmstadt)
Dako „ <i>Fluorescence Mounting Medium</i> “	(Agilent Technologies, USA)
DMSO - Dimethylsulfoxid 250ml	(Carl Roth, Karlsruhe)
D-sorbitol	(Merck, Darmstadt)
Desoxynucleotide (dNTPs)	(Thermo Fisher Scientific, USA)
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	(Roche, Mannheim)
D-Glucose	(Merck, Darmstadt)
DPBS - engl. <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	(PAN, Biotech, Aidenbach)
DTT (1,4,-dithiothreitol)	(Biomol, Hamburg)
Ethidiumbromid	(Carl Roth, Karlsruhe)
Ethanol	(Carl Roth, Karlsruhe)
GeneRuler™ 100bp	(Thermo Fisher Scientific, USA)
GeneRuler™ 1kb	(Thermo Fisher Scientific, USA)

Gentamicin 40mg/ml	(Ratiopharm, Ulm)
Giemsa-Lösung	(Merck, Darmstadt)
Glycerol	(Carl Roth, Karlsruhe)
G-418 BC (Neomycin) (50 ml)	(Greiner Bio-One, Frickenhausen)
Ham's F12	(PAN Biotech, Aidenbach)
HCl	(Merck, Darmstadt)
HEPES	(Sigma-Aldrich, USA)
Hoechst 33342	(Sigma-Aldrich, USA)
Humanes Blut (0+)	(UKE, Hamburg)
Humanes Serum (A+)	(Interstate Blood Bank, Inc., USA)
Hypoxanthin (9636-5G)	(Sigma-Aldrich, USA)
Immersionsöl 518 N	(Zeiss, Jena)
Isopropanol	(Merck, Darmstadt)
Kaliumacetat	(Merck, Darmstadt)
Kanamycin	(Sigma-Aldrich, USA)
KCl	(Merck, Darmstadt)
KO ₂ PO ₄	(Merck, Darmstadt)
LB-Medium (Lennox)	(Carl Roth, Karlsruhe)
Methanol ≥ 99 %	(Carl Roth, Karlsruhe)
μ-Slide I 0.8 Luer ibiTreat (80196)	(Ibidi, Martinsried)
MnCl ₂	(Promega, USA)
MOPS	(Biomol, USA)
Natriumacetat	(Merck, Darmstadt)
Na ₂ -EDTA (waterfree)	(Merck, Darmstadt)
Na ₂ HPO ₄	(Carl Roth, Karlsruhe)
NaCl	(Carl Roth, Karlsruhe)
NaOH	(Carl Roth, Karlsruhe)
NaPO ₄	(Carl Roth, Karlsruhe)
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)	(Life Technologies, USA)
Percoll®	(Sigma-Aldrich, USA)
Perfusion Set (L: 50 cm, ID: 1,6 mm)	(Ibidi, Martinsried)
Proteaseinhibitor-Mix	(Roche, Mannheim)
RbCl	(Sigma-Aldrich, USA)
RNase AWAY™	(Carl Roth, Karlsruhe)

RPMI + L-Glutamin; + 25 mM HEPES; -NaHCO ₃	(AppliChem, Darmstadt)
Saponin	(Sigma, Steinheim)
Tris (pur)	(Carl Roth, Karlsruhe)
Tris-HCl	(Carl Roth, Karlsruhe)
TRIZOL reagent®	(Life Technologies, USA)
UltraPure™ agarose	(Thermo Fisher Scientific, USA)
Wasser für Molekularbiologie (Ampuwa)	(Fresenius Kabi, Bad Homburg)
WR99210	(Sigma-Aldrich, USA)
10x CutSmart™ Puffer	(New England BioLabs®, USA)
10x T4 DNA Ligase Puffer	(Promega, USA)
6x Loading Dye	(Thermo Fisher Scientific, USA)

2.1.4 Kits

AGENCOURT® RNA Clean up kit	(Beckman Coulter, Krefeld)
Agilent RNA 6000 Pico Kit	(Agilent Technologies, USA)
Agilent High Sensitivity DNA Kit	(Agilent Technologies, USA)
AMPure XP Purification	(Beckman Coulter, Krefeld)
MinElute PCR Purification Kit	(Qiagen, Hilden)
PureLink RNA Mini Kit	(Thermo Fisher Scientific, USA)
Qubit® dsDNA HS Assay Kit	(Thermo Fisher Scientific, USA)
Ribo-Zero™ Magnetic Gold Kit (Human /Mouse/Rat)	(Epicentre, USA)
RNeasy MinElute Cleanup Kit (Cat. No. 74204, Qiagen)	(Qiagen, Hilden)
TURBO DNAase Kit	(Life Technologies, USA)
NucleoBond® Maxi	(Macherey-Nagel, Düren)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean up	(Macherey-Nagel, Düren)
NucleoSpin® Plasmid	(Macherey-Nagel, Düren)

2.1.5 Softwares und Datenbanken

Agilent 2100 Expert Software	(Agilent Technologies, USA)
Axio Vision Rel. 4.7	(Zeiss, Jena)
DEseq (Version 1.18)	(Bioconductor, Open-Source)
FACSDiva™ (Version 6.1.3)	(BD Biosciences, USA)
Gimp 2.8.16 Build 3	(The Gimp Team, USA)
ImageJ (Version 1.48V)	(National institute of health, USA)

Mac Vector 12.6.0 (187)	(MacVector, Inc., USA)
My Samples 2.0	(mydata GmbH, Langenhagen)
PlasmoDB	(EuPathDB Project Team, USA)
Prism® (Version 6)	(GraphPad, USA)
PubMed	(www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)
PumpControl Software (Version 1.5.2)	(Ibidi, Martinsried)
SignalP 4.1	(cbs.dtu.dk/services/SignalP)
SLiMFinder	(Webserver - http://bioware.ucd.ie)
TMHMM 2.0	(cbs.dtu.dk/services/TMHMM)
3of5	(http://www.dkfz.de/mga2/3of5)

2.1.6 Restriktionsendonukleasen

<i>AvrII</i>	5'...C↓CTAGG...3' 3'...GGATC↑C...5'	(New England BioLabs®, USA)
<i>KpnI</i>	5'...GGTAC↓C...3' 3'...C↑CATGG...5'	(New England BioLabs®, USA)
<i>NotI</i>	5'...G↓CGGCCGC...3' 3'...CGCCGG↑CG...5'	(New England BioLabs®, USA)
<i>XhoI</i>	5'...C↓TCGAG...3' 3'...GAGCT↑C...5'	(New England BioLabs®, USA)

2.1.7 Plasmide

pARL1	(BNITM - AG Spielmann)
pMA-RQ	(Thermo Fisher Scientific, USA)
pMK-RQ	(Thermo Fisher Scientific, USA)

2.1.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Eurofins (Ebersberg) synthetisiert und lediglich für die Kontrollsequenzierung der fertigen Konstrukte verwendet.

<i>pARL1_forward</i>	5'...CTATAGATTATTTTCATTGTCTTCACA...3'
<i>pARL1_reverse</i>	5'...CAGTTATAAATACAATCAATTGG...3'

2.1.9 Synthetische Gene

Alle synthetischen Gene wurden von Invitrogen GeneArt Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific, USA) hergestellt. Das Gen für das Fusionsprotein (3 x HA) wurde vom Hämagglutinin des Influenzavirus A (D21182.1) abgeleitet. Die Gensequenzen sind im Anhang (Siehe Anhang A) zu finden.

Name	Transkriptlänge	ID
<i>vir21-like</i>	2415 bp	PVX_088790
<i>vir5-like</i>	1482 bp	PVX_093715
<i>vir14-putative</i>	1529 bp	PVX_108770
<i>vir15-putative</i>	949 bp	PVX_010605
<i>vir14-putative</i>	1113 bp	PVX_115475
<i>vir24-like</i>	2518 bp	PVX_086855
<i>vir</i>	1782 bp	PVX_090295
<i>vir12-like</i>	1347 bp	PVX_090335
<i>vir2/15-like</i>	915 bp	PVX_107750
<i>vir22/23-related</i>	1836 bp	PVX_081850
<i>vir12-related</i>	1395 bp	PVX_124705
<i>vir6-putative</i>	1227 bp	PVX_050690
<i>3 x ha (tag)</i>	120 bp	D21182.1

2.1.10 Antikörper

Hier sind die Erst- und Zweitantikörper sowie die jeweilige Verdünnung aufgelistet, die für die unterschiedlichen Ansätze verwendet wurden. Folgende Ansätze sind mit Hilfe von Antikörpern durchgeführt: Western Blot (WB), Immunfluoreszenzanalyse (IFA) sowie Durchflusszytometrie (FACS – engl. *fluorescence-activated cell scanning*). Die Kernfärbung bei der IFA erfolgte mittels Hoechst33342 (Sigma-Aldrich, USA).

2.1.10.1 Primäre Antikörper

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper aufgelistet.

Tabelle 1: Primäre Antikörper

Name	Organismus	Verdünnung			Quelle
		WB	IFA	FACS	
α -HA, High Affinity	Ratte (monoklonal)	1:3000	1:100	-	Hoffmann-LA Roche, Schweiz
α -SBP1	Maus	-	1:1000	-	BNITM (AG Spielmann)
α -Spectrin	Kaninchen	-	1:200	-	Sigma-Aldrich, USA
α -ATS (6H1)	Maus (monoklonal)	-	1:50	-	BNITM (AG Tannich)
α -ETRAPM	Maus	-	1:400	-	BNITM (AG Spielmann)
α -humanes CD36, IgG, APC-konjugiert	Maus	-	-	1:50	BioLegend, USA
α -P-Selektin (AK4)	Maus (monoklonal)	-	-	1:50	Santa Cruz Biotechnology
α -humanes CD54, IgG, APC-konjugiert	Maus	-	-	1:50	BioLegend, USA

2.1.10.2 Sekundäre Antikörper

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper aufgelistet.

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

Name	Organismus	Konjugat	Verdünnung			Quelle
			WB	IFA	FACS	
α -Ratte	Ziege	HRP	1:5000	-	-	Dianova, Hamburg
α -Ratte, IgG (H+L)	Ziege	Alexa Flour 594	-	1:400	-	Thermo Fisher Scientific, USA
α -Maus, IgG (H+L)	Ziege	Alexa Flour 488	-	1:400	-	Thermo Fisher Scientific, USA
α -Kaninchen, IgG (H+L)	Ziege	Alexa Flour 488	-	1:400	-	Thermo Fisher Scientific, USA
α -Maus, Ig lighth chain λ , IgG	Ratte	APC	-	-	1:400	BioLegend, USA

2.1.11 Puffer, Medien und andere Lösungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Lösungen wurden vor ihrer Anwendung entweder steril filtriert oder autoklaviert.

2.1.11.1 *P. falciparum*-Zellkultur

Folgende Lösungen wurden bei der *P. falciparum*-Zellkultur verwendet.

RPMI mit humanem Serum (Komplettmedium, steril filtriert)

RPMI 1640	16,4 g/l
Hypoxanthin	0,05 g/l
Humanes Serum (A+) (inaktiviert – 2 x bei 56 °C für 30 min)	100 ml/l
NaHCO ₃ (7,5 %)	30 ml/l
Gentamicin (40 mg/ml)	250 µl/l
In 1 Liter dest. H ₂ O	
pH 7,2	
Lagerung bei 4 °C für maximal 2 Wochen	

RPMI mit Albumax II (Komplettmedium, steril filtriert)

RPMI	15,87 g/l
Natriumbicarbonat	1 g/l
Glucose	2 g/l
Albumax II	0,5 %
Hypoxanthin	0,028 g/l
(gelöst in 5 ml, 1 N NaOH)	
Gentamycin	0,2 g/l
In 1 Liter dest. H ₂ O	
pH 7,2	
Lagerung bei 4 °C für maximal 2 Wochen	

Bindungsmedium, steril filtriert

RPMI 1640	16,4 g/l
Glucose (wasserfrei)	20 g/l
In 1 Liter dest. H ₂ O	
pH 7,2	
Lagerung bei 4 °C	

Synchronisierungslösung (5 %iges D-Sorbitol, steril filtriert)

D-Sorbitol	25,0 g
In 500 ml dest. H ₂ O	
Lagerung bei 4 °C	

Einfrierlösung, steril filtriert (MFS – engl. *Malaria freezing solution*)

D-Sorbitol	3 g
NaCl	0,65 g
(gelöst in 72 ml dest. H ₂ O)	
Glycerol (autoklaviert)	28 ml
Lagerung bei 4 °C	

Auftaulösung, steril filtriert (MTS – engl. *Malaria thawing solution*)

NaCl	35 g
In 1 Liter dest. H ₂ O	
Lagerung bei 4 °C	

Giemsalösung (10 %)

Giensa-Stocklösung	10 ml
In 90 ml H ₂ O	

Blut (sterile, humane Erythrozyten, Blutgruppe 0+)

Percoll-Gradientlösungen

90 %ige Percolllösung

Percoll-Stocklösung	45 ml
10x PBS	5 ml

80 %ige Percolllösung

90 %ige Percolllösung	8,9 ml
D-Sorbitol	0,8 g
Zellkulturmedium	1,1 ml

60 %ige Percolllösung

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

40 %ige Percolllösung

90 %ige Percolllösung	4,4 ml
D-Sorbitol	0,8 g
Zellkulturmedium	5,6 ml
Lagerung bei 4 °C	

10x PBS für die *P. falciparum*-Zellkultur, autoklaviert

NaCl	1,37 M
KCl	28,6 mM
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	80,6 mM
KO ₂ PO ₄	14,7 mM
pH 7,4	

WR99210 Stocklösung, steril filtriert

WR99210	20 mM
In 1 ml DMSO	

WR99210 Arbeitslösung

Verdünnung (1:1000) der WR99210-Stocklösung in RPMI mit Albumax (Komplettmedium)

2.1.11.2 CHO-Zellkultur

Folgende Lösungen wurden bei der CHO-Zellkultur verwendet.

Zellkulturmedium (Komplettmedium, steril filtriert)

Ham's F12 mit L-Glutamin und 25 mM HEPES	500 ml
Fetales Kälberserum (FCS – engl. <i>fetal calf serum</i>) (inaktiviert bei 56 °C für 45 min)	50 ml
Penicillin/Streptomycin Mix (100x)	5 ml
Lagerung bei 4 °C für maximal 3 Wochen	

10x PBS für die CHO-Zellkultur, autoklaviert

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

FACS-Puffer, steril filtriert

Fetales Kälberserum (FCS – engl. <i>fetal calf serum</i>) (inaktiviert bei 56 °C für 45 min)	2 ml
CHO-PBS (1x)	100 ml
Lagerung bei 4 °C	

Einfrierlösung für CHO-Zellen

CHO-Zellkulturmedium (Komplettmedium)	45 ml
DMSO (10 % – steril)	5 ml
Lagerung bei 4 °C	

2.1.11.3 Weitere verwendete Puffer und Lösungen

Folgende Lösungen wurden für weitere molekularbiologische Methoden verwendet.

50x TAE-Puffer

Tris (pur)	2 M
Natriumacetate	250 mM
Na ₂ -EDTA (wasserfrei)	100 mM
In 2 Liter dest. H ₂ O	

TB-Puffer (Transfektionspuffer)

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

TE-Puffer

Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA	1 mM

TFBI-Puffer

Kaliumacetat	30 mM
MnCl ₂	50 mM
RbCl	0,2 M
CaCl ₂	10 mM
Glycerin	15 %
pH 5,8	

TFBII-Puffer

MOPS	10 mM
CaCl ₂	75 mM
RbCl	10 mM
Glycerin	15 %
pH 7,0	

Agar-Nährmedium für Agar-Platten (autoklaviert)

LB-Agar (Lennox)	35 g/l
In 1 Liter dest. H ₂ O	
Lagerung bei 4 °C	

LB-Medium (autoklaviert)

LB-Medium (Lennox)	20 g/l
In 1 Liter dest. H ₂ O	
Lagerung bei 4 °C	

2.1.12 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in dieser Arbeit für die unterschiedlichen molekular- und zellbiologischen Ansätze verwendet.

2.1.12.1 *E. coli*

Für die Klonierung der untersuchten Gene wurde der Klonierungsstamm *E. coli* „One-shot™ TOP10“ (Invitrogen, USA) verwendet.

2.1.12.2 *Plasmodium falciparum*

Folgende Laborstämme des *P. falciparum* wurden verwendet.

IT4-Stamm

Dieser Stamm wurde im August 1976 aus einem Patienten in Fajara-Gambia (Westafrika) isoliert (Jensen und Trager, 1978). Dieses Isolat wurde freundlicherweise von Frau Mo Klinkert (BNITM, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

3D7-Stamm

Dieser Stamm ist ein Klon des NF54-Isolates, welches aus einem Patienten stammt, der in der Nähe des Schiphol-Flughafen in Amsterdam lebte und davor nie im Ausland gewesen ist (Ponnudurai *et al.*, 1981). Dieses Isolat wurde ebenfalls von Frau Mo Klinkert (BNITM, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

2.1.12.3 CHO-Zelllinien (engl. *chinese hamster ovary cells*)

Die CHO-Zellen wurden erstmalig im Jahr 1957 von der Laborgruppe von Dr. Theodore T. Puck aus 0,1 Gramm Eierstockgewebe eines chinesischen Zwerghamsters (*Cricetulus griseus*) isoliert (Puck, 1958). In dieser Arbeit wurde der Klon psgA-745 (CHO-745) von ATCC (*American Type Culture Collection*) verwendet, welcher eine Xylosyltransferase-Defizienz aufweist. Die Xylosyltransferase spielt eine Rolle bei der Synthese von Glykosaminoglykanen (GAG), welche Zelladhäsionen vermitteln. Der Klon psgA-745 synthetisiert weniger als 2 % der bei Wildtyp-Zellen vorkommenden GAG (Gantt *et al.*, 1997) und eignet sich somit sehr gut für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente. In dieser Arbeit wurden transgene CHO-745-Zelllinien verwenden, welche humane Endothelrezeptoren als Fusionsprotein mit einem zytoplasmatischen C-terminalen GFP (Engl. *green fluorescent protein*) synthetisieren und auf der Zelloberfläche aufweisen. Als Kontrolle wurde der CHO-745-AcGFP-Klon3 (*mock*) verwendet, welcher keinen Rezeptor sondern lediglich zytoplasmatisches GFP synthetisiert. Die transgenen CHO-Zielllinien (Siehe Tab. 3) wurden freundlicherweise von Birgit Förster (BNITM - AG Horstmann) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3: Transgene CHO-745-Zelllinien

Name	Vektor	Konjugat
CHO-745-AcGFP-Klon3 (<i>mock</i>)	pAcGFP-N1	-
CHO-745-CD36-AcGFP-Klon3	pAcGFP-N1	CD36
CHO-745-ICAM1-AcGFP-Klon3	pAcGFP-N1	ICAM-1
CHO-745-CD9-EGFP-Klon8-3	pEGFP-N1	CD9
CHO-745-P-Selektin-AcGFP-Klon4	pEGFP-N1	P-Selektin

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 *Plasmodium falciparum*-Zellkultur

Folgende zellbiologische Methoden wurden bei der *P. falciparum*-Zellkultur für diese Arbeit verwendet.

2.2.1.1 *In vitro* Kultivierung von *P. falciparum*

Beide Laborstämme (IT4 und 3D7) wurden nach den Standardkulturmethoden von Trager und Jensen (1976) kultiviert. Die *in vitro*-Kultur erfolgte in einem Volumen von 10 ml RPMI 1640 (Komplettmedium), welches entweder mit 10 % humanem Serum (A+) oder 0,5 % Albumax II versetzt wurde. Der Hämatokritwert betrug 5 % und die Inkubation erfolgte bei 37 °C mit einer Gaszusammensetzung von 1 % O₂, 5 % CO₂ und 94 % N₂. Das Medium wurde spätestens jeden dritten Tag gewechselt, wobei die Parasitämie und der Hämatokrit neu adjustiert wurden. Für die Einstellung des Hämatokrits wurden Erythrozyten der Blutgruppe 0+ verwendet.

2.2.1.2 Giemsa-Färbung

Um die Parasitämie sowie das Parasitenstadium in der Kultur zu bestimmen, wurden Blutausstriche auf Objektträger angefertigt. Diese wurden anschließend an der Luft getrocknet und in Methanol (100 %) für ca. 2 min fixiert. Schließlich wurden die Ausstriche für 10 min in einer 10 %igen Giemsalösung angefärbt und konnten nach dem sie erneut an der Luft getrocknet waren unter dem Lichtmikroskop untersucht werden.

2.2.1.3 Synchronisierung der *P. falciparum*-Kultur mittels Sorbitol

Um eine synchrone *P. falciparum*-Kultur zu erhalten, kann man mit Hilfe des Zuckeralkohols Sorbitol die Kultur synchronisieren in dem man die reifen Stadien des Parasiten (Trophozoiten und Schizonten) eliminiert und lediglich die Parasiten im Ringstadium behält. Dies erfolgt aufgrund der höheren Permeabilität der reifen Parasiten, welche durch das Eindringen des Sorbitols lysiert werden. Dafür wurde die Kultur für 5 min bei 800 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Die sedimentierten Zellen wurden in dem 6-fachen Volumen 5 %igen Sorbitol-Lösung (37 °C) resuspendiert und für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und in regelmäßigen Abständen geschüttelt. Um die Sorbitol-Lösung zu entfernen wurde erneut für 5 min bei 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment einmal gewaschen. Dafür wurde das Sediment in 8 ml Kulturmedium resuspendiert und erneut für 5 min und 800 x g zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und wie oben beschrieben (Siehe Punkt 2.2.1.1) weiter kultiviert.

2.2.1.4 Anreicherung reifer Parasitenstadien mittels MACS

Eine weitere Methode, um bestimmte Parasitenstadien zu isolieren ist die Anreicherung der pigmentierten reifen Parasitenstadien mittels MACS (engl. *magnet activated cell sorting*), welche es ermöglicht die späteren Stadien des Parasiten von Parasiten im Ringstadium sowie von nicht-infizierten Erythrozyten zu trennen. Während des intraerythrozytären Zyklus ernährt sich der Parasit u. a. von Hämoglobin, wobei der Fe(III) enthaltende paramagnetische Komplex Hämozin entsteht. Dieser ist bei den Giemsa-angefärbten späteren Parasitenstadien als dunkelbraunes Pigment zu erkennen. Diese Eigenschaft ermöglicht es, diese pigmentierten Parasitenstadien mit Hilfe eines Magneten anzureichern. Die Anreicherung erfolgte nach Ribaut *et al.* (2008) unter Anwendung eines Vario MACSTM Magneten (Miltenyi Biotec). Dafür wurde am Magnet eine MACS CS-Säule befestigt, welche über einen Dreiweghahn zum einen mit einer Kanüle (0,8 mm) und zum anderen mit einer 20 ml-Spritze verbunden war. Die Spritze war mit Bindungsmedium (37 °C) gefüllt, welches für die Äquilibration der CS-Säule verwendet wurde. Dies geschah durch Auf- und Abziehen der Spritze, wodurch Luftblasen aus der Säule entfernt wurden. Anschließend wurde die Durchflussgeschwindigkeit auf ca. einen Tropfen pro Sekunde eingestellt und die Parasitenkultur, welche zuvor auf einen Hämatokrit von 10 - 15 % eingestellt worden war, wurde auf die Säule gegeben. Danach wurde ohne die Säule trocknen zu lassen mit mindestens 50 ml Bindungsmedium solange gewaschen, bis der Durchfluss klar wurde. Zum

Eluieren der Parasiten wurde die Säule vom Magneten getrennt und um 180° gedreht mit der Öffnung in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) gehalten. Mit Hilfe des in der Spritze übriggebliebenen Bindungsmedium wurden die angereicherten Parasiten eluiert. Schließlich wurde eine Giemsa-Färbung eines Ausstriches angefertigt, um die Anreicherung zu kontrollieren.

2.2.1.5 Anreicherung von Schizonten mittels Percoll-Gradient

Die Auftrennung der Parasitenstadien kann ebenfalls anhand eines Gradienten durchgeführt werden. Hierfür wird vor allem ein Percoll-Gradient verwendet. Die Herstellung eines Gradienten mit unterschiedlich-konzentrierten Percollösungen und Zentrifugation ermöglicht eine Trennung zwischen Ringstadium/nicht-infizierten Erythrozyten (Sediment), Trophozoiten (die untere der beiden mittleren Phasen, zwischen den 80 %- und 60 %igen Percollösungen), Schizonten (die zweite der beiden mittleren Phasen, zwischen den 60 %- und 40 %igen Percollösungen) sowie Merozoiten und Zelltrümmer ganz oben. In dieser Arbeit wurde eine Variante des Percollgradienten verwendet, um Schizonten zu isolieren. Dafür wurden 4 ml einer 60 %igen Percolllösung in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) pipettiert und anschließend 8 ml einer Kultur mit 5 - 10 % Parasitämie (im Schizontenstadium) vorsichtig auf die Percolllösung gegeben. Der Gradient wurde für 8 min bei 2000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die bräunliche Phase, welche sich zwischen Percoll und Kulturmedium befand, abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Um die Percolllösung zu entfernen, wurde die extrahierte Phase mit warmen Kulturmedium (1x) gewaschen. Schließlich wurde der Überstand verworfen und das Sediment enthielt die isolierten Schizonten, die für die Transfektion verwendet wurden (Siehe Punkt 2.2.1.6).

2.2.1.6 Transfektion von *P. falciparum* mittels Elektroporation

Als Transfektion bezeichnet man den Prozess des Einbringens von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Die Transfektion von zirkulären Plasmiden in den Kern von *P. falciparum* erfolgte in dieser Arbeit mittels Elektroporation (Wu *et al.*, 1995, Spielmann *et al.*, 2006c). Um die Selektionszeit zu reduzieren wurde eine Methode für die Elektroporation von Schizonten angewandt (Moon *et al.*, 2013). Dafür wurden 50 µg Plasmid-DNA mittels Ethanol-fällung präzipitiert und gewaschen (Siehe Punkt 2.3.13). Die Plasmid-DNA wurde in 10 µl TE-Puffer resuspendiert und anschließend in 100 µl TB-Puffer verdünnt. Schließlich wurden die 10 - 12 µl der mittels Percoll-Gradient isolierten Schizonten mit der Plasmid-

DNA im TB-Puffer gemischt und in eine Transfektionsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 310 V und 950 μ F mit Hilfe des Amaxa-4D-Elektroporators. Nach der Elektroporation wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml), welches mit 500 μ l warmem RPMI-Kulturmedium und 300 μ l frischem Blut (0+) versetzt war, überführt und für 30 min bei 37 °C und 650 rpm auf einem Schüttler (Thermomixer compact - Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine Petrischale mit 10 ml RPMI-Kulturmedium überführt und der Hämatokrit auf 5 % eingestellt. In den ersten fünf Tagen nach der Transfektion wurde das Medium täglich gewechselt. Danach wurden die Parasiten nach der Standardmethode weiter kultiviert. Zur Selektion der transgenen Parasiten wurde das Antifolat WR99210 (4 nm) zu der Kultur gegeben. WR99210 ist ein Antifolat, welches die Aktivität des *P. falciparum*-Dihydrofolatreduktase (*PfDHFR*) inhibiert, wodurch die Synthese von wichtigen Nukleotiden gehemmt wird. Allerdings enthält der für die Transfektion verwendete pARL1-Vektor das Gen, das für die humane DHFR kodiert, welches von WR99210 nicht inhibiert wird. Somit können die positiv-transfizierten Parasiten selektioniert werden.

2.2.1.7 Herstellung von Kryo-Dauerstabilaten

Um Kryo-Dauerstabilate von *P. falciparum* herzustellen, wurde die synchrone Parasiten-Kultur mit über 5 % Parasitämie (Ringstadium) zunächst für 5 min bei 800 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entsorgt und das Sediment in dem 4-fachen Volumen Einfrierlösung (MFS) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Schließlich wurden die Kryoröhrchen in einen Einfrierbehälter in dem das Einfrieren kontrolliert stattfindet (1 °C weniger pro Minute) über Nacht bei -80 °C gelagert. Die langfristige Lagerung erfolgte im Stickstofftank bei -170 °C.

2.2.1.8 Auftauen von Kryo-Dauerstabilaten

Das Auftauen der Kryo-Dauerstabilate erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt, mit dem gleichen Volumen vorgewärmter Auftaulösung (MTS) vermischt und für 2 min bei 300 x g zentrifugiert. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Sediment 2-fach mit jeweils 1 ml MTS gewaschen. Schließlich wurde das Sediment in 10 ml RPMI-Kulturmedium resuspendiert und nach den Standardbedingungen kultiviert.

2.2.2 CHO-Zellkultur

Folgende zellbiologische Methoden wurden bei der CHO-Zellkultur für diese Arbeit verwendet.

2.2.2.1 *In vitro* Kultivierung von CHO-Zellen

Die CHO-Zellen wurden sowohl in T25 (25 cm²) als auch in T75 (75 cm²) Gewebekulturflaschen kultiviert, welche für adhären-wachsende Zellen geeignet sind. In der T25-Flasche wurden die Zellen in 5 ml Medium kultiviert, während die Zellen in der T75-Flasche 15 ml Medium bekommen haben. Die Zellen wuchsen bei 37 °C und 5 % CO₂. Das Wachstum der CHO-Zellen (Konfluenz) wurde mit Hilfe eines Inversmikroskops kontrolliert und um zu vermeiden, dass die Zellen überwachsen und um ihre Vitalität zu gewährleisten wurden spätestens an jedem dritten Tag die Zellen gesplittet (Verdünnung der Zellzahl in der Kulturflasche), wobei das Kulturmedium gewechselt wurde. Dafür wurde das „alte“ Medium abgenommen und die adhären Zellen mit vorgewärmten 1 x CHO-PBS (37 °C) einmal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Accutase behandelt, um sie vom Flaschenboden zu lösen. Bei der T25-Flasche wurden 300 µl Accutase verwendet und bei der T75-Flasche wurden 1000 µl Accutase verwendet. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ konnten die Zellen durch leichtes Klopfen der Flasche vom Boden gelöst werden. Schließlich wurden die CHO-Zellen mit Kulturmedium resuspendiert, was zu einer Inhibition der Accutase-Aktivität führte und je nach Konfluenz 1:2 bis 1:30 mit 5 bzw. 15 ml frischem Medium verdünnt. Für die Selektion der transgenen CHO-Zelllinien wurde Neomycin (G418; 50 mg/ml; Endkonz. 0,7 mg/ml) zu den Zellen gegeben.

2.2.2.2 Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie

Um die transgenen CHO-Zellen zu sortieren und somit den Anteil an positiv-transgenen CHO-Zellen zu erhöhen, wurden diese Zellen, die den zu untersuchenden Rezeptor auf der Oberfläche aufwiesen von den negativ-transgenen Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS – engl. *fluorescence activated cell sorting*) getrennt. Dafür wurde die Kultur, wie oben beschrieben, mit Accutase behandelt, in 5 - 10 ml CHO-Kulturmedium resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt. Anschließend wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt (mind. 1 x 10⁶ wurden dafür benötigt). Danach wurde die Zellsuspension für 2 min bei 250 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 5 ml FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein steriles FACS-Röhrchen überführt und für 5 min bei 4 °C und

250 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Markierung der Oberflächenantigene (CD36, ICAM-1, CD9 und P-Selektin) durchgeführt. Hierbei erfolgte die Markierung von CD36, ICAM-1 und CD9 über die direkte Methode mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, welche mit APC (Allophycocyanin) gekoppelt waren, während die Markierung von P-Selektin über eine indirekte Methode mit einem spezifischen Primärantikörper sowie einem monoklonalen α -Maus-Sekundärantikörper der ebenfalls mit APC gekoppelt war, erfolgte (Siehe Tab. 1 und 2). Bei der direkten Methode wurden die Zellen für 15 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert, während bei der indirekten Methode die Zellen erst für 30 min auf Eis mit dem Primärantikörper inkubiert wurden, anschließend mit FACS-Puffer zwei Mal mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugationsschritte: 3 min bei 4 °C, 250 x g) und für 30 min auf Eis und im Dunkeln mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden. Nach der Inkubation mit den APC-gekoppelten Antikörpern wurden die Zellen erneut 2-fach mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 2 ml FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch einen FACS-Filter gefiltert und in ein neues FACS-Röhrchen aufgenommen. Dieses wurde bis zur Sortierung am FACS-Gerät auf Eis gehalten. Die CHO-Zellen wurden zum einen aufgrund der grünen Fluoreszenz des GFP-Fusionsprotein und zum anderen aufgrund der roten Fluoreszenz von APC selektiert. Lediglich die Zellen, die sowohl ein GFP-Signal als auch ein APC-Signal zeigten, wurden in das Zentrifugenröhrchen, welches mit 2 ml CHO-Kultumedium gefüllt war, wieder aufgenommen. Schließlich wurde die Zellsuspension in eine Gewebekulturflasche überführt und wie oben beschrieben weiter kultiviert.

2.2.2.3 Herstellung von Kryo-Dauerstabilaten

Für die Herstellung der Kryo-Dauerstabilate von CHO-Zellen wurden die adhärennten CHO-Zellen, wie oben beschrieben, mit Accutase behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml (T25) bzw. 10 ml (T75) Kulturmedium resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt. Die Zellsuspension wurde für 2 min bei 300 x g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand entsorgt und das Sediment mit 3 ml (T25) bzw. 8 ml (T75) CHO-Einfrierlösung resuspendiert. Schließlich wurde die Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt und mit Hilfe eines Einfrierbehälters kontrolliert bei -80 °C eingefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte entweder bei -80 °C oder im Stickstofftank bei -170 °C.

2.2.2.4 Auftauen von Kryo-Dauerstabilaten

Das Auftauen der Kryo-Dauerstabilate erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt, mit 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium vermischt und für 2 min bei 300 x g zentrifugiert. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 5 ml (T25) bzw. 15 ml (T75) CHO-Kulturmedium resuspendiert. Danach wurde die Kultur nach den Standardbedingungen kultiviert.

2.2.3 Isolieren von Zellen mittels Biocoll-Dichtegradientenzentrifugation

Unterschiedliche Zelltypen können aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation voneinander getrennt werden. Diese Methode wurde in dieser Arbeit für die Trennung von *PfiE* und CHO-Zellen nach jeder Anreicherungsrunde (Siehe Punkt 2.4) verwendet. Hierfür wurde die Biocoll-Trennlösung (Biochrom, Berlin) verwendet, welche Polysucrose enthält. Polysucrose ist ein hydrophiles Polymer mit einem Molekulargewicht von ca. 400 kDa, mit der laut Herstellerangaben wässrige Lösungen bis zu einer Dichte von 1,1 g/ml hergestellt werden können. CHO-Zellen besitzen eine durchschnittliche Dichte von 1,05 g/ml (Anderson *et al.*, 1970), während die Durchschnittsdichte der Erythrozyten bei 1,1 g/ml liegt. Somit wandern die *PfiE* während der Zentrifugation durch die Biocoll-Trennlösung nach unten, während die CHO-Zellen oben bleiben. Um die *PfiE* nach einer Anreicherung von den CHO-Zellen zu trennen, wurden die aufgenommenen *PfiE* erst in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen und für 5 min bei 800 x g zentrifugiert. Währenddessen wurde in ein anderes 15 ml-Zentrifugenröhrchen 7 ml Biocoll-Trennlösung vorgelegt. Nach der Zentrifugation der aufgenommenen *PfiE* wurde der Überstand abgenommen und das Sediment in 7 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension vorsichtig über die vorgelegte Biocoll-Trennlösung geschichtet und der Gradient für 20 min bei 1300 x g zentrifugiert, wobei die Bremse der Zentrifuge ausgeschaltet wurde. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden mit 8 ml Kulturmedium einmal gewaschen und anschließend die *PfiE* entsprechend den oben beschriebenen Kulturbedingungen (Siehe Punkt 2.2.1.1) weiter kultiviert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Die folgenden molekularbiologischen Methoden wurden in dieser Arbeit verwendet.

2.3.1 RNA-Extraktion

Die Isolierung der Gesamt-RNA für die Transkriptomanalyse wurde nach einem modifizierten Protokoll von Kyes *et al.* (2000) durchgeführt. Hierfür wurden die Proben (PfiE-TRIzol-Gemisch) zügig bei 37 °C unter leichtem Schütteln aufgetaut und anschließend in 1 ml-Aliquots aufgeteilt. Zu den Aliquots wurden jeweils 200 µl Chloroform gegeben. Diese wurden durch Schütteln (ca. 15 Sekunden) gut vermischt und für 3 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben für 30 min bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand (ca. 400 µl/Reaktionsgefäß) vorsichtig abgenommen und in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt, welches sich auf Eis befand. Zu dem Überstand wurde das gleiche Volumen 70 %iges Ethanol gegeben und mittels Inversion (3 - 4 Mal) gut vermischt. Die weiteren Schritte erfolgten unter Anwendung des PureLink[®] RNA Mini Kit nach den Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in zwei Schritten mit jeweils 25 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Schließlich wurde die RNA-Konzentration mittels NanoDrop bestimmt. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung entweder auf Eis gehalten oder bei -80 °C gelagert. Bevor die RNA zur BGI (*Beijing Genomics Institute*) für die Transkriptomanalyse geschickt wurde, erfolgte noch eine DNase-Behandlung mittels TURBO DNase[™] (Siehe Punkt 2.3.3), gefolgt von einer RNA-Aufreinigung unter Anwendung des „AGENTOURT[®] RNA Clean up“-Kits (Siehe Punkt 2.3.4) sowie einer Kontrolle der RNA-Qualität mittels Bioanalyser (Agilent 2100[®]) (Siehe Punkt 2.3.5).

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der isolierten RNA sowie die der Plasmide wurden photometrisch mit Hilfe eines Nanodrops (Thermo Scientific, Langenselbold) bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzen die aromatischen Ringe der Basen von DNA und RNA ihr Absorptionsmaximum. Einer optischen Dichte (OD₂₆₀) von eins entsprechen 50 ng/µl doppelsträngiger DNA oder 40 ng/µl einzelsträngiger RNA. Da das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäurenreste in Proteinen bei 280 nm liegt, lässt sich aus dem Verhältnis von 260 nm zu 280 nm die Reinheit der RNA abschätzen. Eine reine RNA-Lösung besitzt einen OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert zwischen 1,8 und 2,1. Ein Wert unter 1,8 deutet auf eine Kontamination mit Proteinen oder Phenol hin.

2.3.3 DNA-Verdau mittels Turbo DNase

Um eine Kontamination durch genomische DNA zu vermeiden, wurde die isolierte RNA mit TURBO DNase™ behandelt. Dafür wurden 50 µl RNA-Probe mit 5 µl 10 x Turbo DNase-Puffer und 1 µl Turbo DNase durch vorsichtiges Pipettieren vermischt und für 20 - 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl DNase-Inhibitor dazu gegeben, gut vermischt und die Probe wurde für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe für 1,5 min bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.3.4 RNA-Aufreinigung mit Hilfe magnetischer Kügelchen (*Magnetic beads*)

Die Aufreinigung der RNA wurde mit Hilfe von magnetischen Kügelchen unter Anwendung des AGENTOURT® RNA Clena up“-Kits durchgeführt. Dafür wurden die magnetischen Kügelchen durch Schütteln resuspendiert und anschließend das 1,8-fache Volumen zu der RNA-Probe gegeben. Nach dem die RNA-Probe mit den Kügelchen durch Auf- und Abpipettieren gut vermischt wurde, wurde sie für 10 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße an einem Magnetständer platziert und weitere 10 min bei RT inkubiert. Nach dem eine Akkumulation der magnetischen Kügelchen an der Wand des Reaktionsgefäßes zu sehen war, wurde die klare Lösung abgenommen und verworfen. Die verbliebenen Kügelchen, an die die RNA gebunden war, wurden anschließend mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Hierbei wurde das Ethanol vorsichtig über die Kügelchen pipettiert und 30 s später wieder abgenommen. Der Waschschrift wurde noch zwei Mal wiederholt und anschließend wurden die Kügelchen für ca. 10 min bei RT getrocknet. Schließlich wurde die RNA mit 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Dies geschah durch mehrfaches Pipettieren des RNase-freien Wassers über die Kügelchen bis diese resuspendiert wurden. Nach einer weiteren 3 - 4-minütigen Inkubation wurde der Überstand (ohne Kügelchen) abgenommen und in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt.

2.3.5 Überprüfung der RNA-Qualität mittels Bioanalyser

Die Überprüfung der RNA-Qualität erfolgte unter Anwendung eines Bioanalyser-Systems (Agilent 2100®). Dieses System verwendet eine automatisierte Kapillar-Elektrophorese, bei der die RNA nach ihrer Größe in mRNA, einzelnen Fraktionen der rRNA (5S, 18S und 28S) sowie fragmentierte RNA aufgetrennt wird. Das Ergebnis wird dann in einem Elektrogramm und als virtuelles Gel-Bild dargestellt. Zudem wird der sogenannte RIN-Wert (engl. *RNA Integrity Number*) generiert, welcher den Vergleich und die Einstufung der RNA-Qualität

ermöglicht. Der RIN-Wert ist ein Wert zwischen 1 und 10, wobei 1 eine stark-degradierte RNA bezeichnet und 10 eine intakte RNA darstellt, welche nicht degradiert oder fragmentiert ist (Schroeder *et al.*, 2006). Die Durchführung der Qualitätskontrolle erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach dem die Qualität der RNA kontrolliert wurde, wurden die zu untersuchenden Proben nach Hong Kong zum BGI geschickt, wo die Sequenzierung des Transkriptoms unter Verwendung einer Illumina HiSeq™ 4000 Plattform durchgeführt wurde.

2.3.6 DNA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode geladene Moleküle (DNA, RNA und Proteine) nach ihrer Größe zu trennen und ihre individuelle Länge durch den Einsatz von Markern bekannter Größe zu bestimmen. Durch die negative Eigenladung der Moleküle wandern diese im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode und passieren dabei die Poren einer Gelmatrix (z. B. Agarose oder Polyacrylamid), wobei für die Trennung von Nukleinsäure Agarosegel verwendet wird. Die Porengröße richtet sich nach der Konzentration der Agarose. Je höher die Konzentration, desto feinmaschiger das Gel. Die kleineren Moleküle bewegen sich schneller durch das Gel als die größeren, wodurch eine Trennung der verschiedenen Fragmente ermöglicht wird. Für die DNA-Gelelektrophorese wurde je nach Größe der Zielfragmente ein 0,8 – 2 %iges Agarosegel mit 1x TAE-Puffer (w/v) angefertigt. Der 1x TAE-Puffer wurde ebenfalls als Laufpuffer verwendet. DNA Fragmente sind nativ nicht sichtbar und werden deshalb klassisch durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid angefärbt. Die Färbung erzeugt die typischen sichtbaren "Banden" im Trägermedium. Dieses geschieht durch die Interkalation einzelner Ethidiumbromidmoleküle zwischen den Basen der Nukleinsäuren, was das Anregungsspektrum des Ethidiumbromids verschiebt. So wird die Fluoreszenz bei Bestrahlung mit UV-Licht stark erhöht, was eine Visualisierung der Nukleinsäurefragmente im Gel ermöglicht. In dieser Arbeit wurde das Agarosegel mit 0,01 % (v/v) einer 1 mg/ml Ethidiumbromidlösung versetzt.

Zum Beladen des Gels wurden die DNA-Proben mit 6x Loading Dye Solution (Thermo Fisher Scientific, USA) versetzt. Als Marker wurde entweder das GeneRuler™ 100 bp oder das GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 90 V bis 130 V durchgeführt. Anschließend konnten die DNA-Banden unter UV-Licht detektiert werden und gegebenenfalls für eine Aufreinigung und Weiterverarbeitung der DNA aus dem Gel geschnitten werden.

2.3.7 DNA-Aufreinigung

Nach dem die spezifische Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten wurde, wurde die DNA aus dem Gel extrahiert und gereinigt. Die Reinigung erfolgte mittels NucleoSpin® Gel und PCR Cleanup (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurde die DNA aus dem Gel extrahiert und in einer Säule an eine Silicamembran gebunden, während Salze und Proteine die Matrix passierten. Anschließend wurde die gebundene DNA mit alkoholhaltigen Puffern gewaschen und zuletzt durch Zugabe von 20 µl nukleasefreiem Wasser DNA von der Säule eluiert. Die gereinigte DNA konnte bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

2.3.8 Herstellung von kompetenten *E. coli*- Zellen

Um Plasmide in Bakterien einschleusen zu können, muss man die Zellmembran dieser Zellen durchlässig machen. Diese durchlässigen Bakterien werden kompetente Bakterien genannt. Für die Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen wurden die *E. coli* TOP10 OneShot Zellen (Invitrogen, USA) verwendet.

Hierfür wurden 4 ml LB-Medium mit 4 µl *E. coli*-Kultur beimpft und für 37 °C unter kontinuierliches Schütteln über Nacht inkubiert. Die 4 ml-Übernachtskultur wurde in 200 ml vorgewärmtes (37 °C) LB-Medium überführt und bis zu einer OD (optischen Dichte) von 0,5 - 0,55 kultiviert. Nach dem der OD-Wert erreicht wurde, wurde die Kultur sofort in 4 vorgekühlte (auf Eis) 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 min bei 4 °C und 2600 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 15 ml TFBII-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension erneut für 20 min bei 4 °C und 2600 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut abgenommen und das Sediment wurde in 2 ml TFBII-Puffer resuspendiert. Schließlich wurde die Zellsuspension in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert (100 µl/Reaktionsgefäß) und mit Hilfe von Trockeneis schockgefroren. Die Aliquots wurden bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.9 Klonierungsmethoden

Für die Untersuchungen der VIR-Proteine, wurden Transkriptsequenzen der Gene, welche für die zu untersuchenden VIR-Proteine (Siehe Punkt 2.1.9) kodieren, synthetisch hergestellt. Da die synthetischen Gene als Konstrukt an einem beliebigen Vektor geliefert wurden, mussten sie erst über Klonierungsmethoden in den Zielvektor pARL1 eingebaut werden. Hierbei

wurden die gelieferten Konstrukte in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (Siehe Punkt 2.3.9.2). Anschließend wurden sie, durch die Klonierung amplifiziert. Aus den Plasmiden wurden die synthetischen Gene ausgeschnitten und in den Zielvektor ligiert (Siehe Punkt 2.3.9.1).

Klonierung ist in der Molekularbiologie der Überbegriff für Methoden zur Gewinnung und identischen Vervielfältigung von DNA. Bei der Klonierung wird ein gewünschtes DNA-Fragment in einen geeigneten Vektor, in diesem Fall Plasmid, integriert (Ligation), der dann wiederum in kompetente Bakterienzellen eingeschleust wird (Transformation). Durch die Vermehrung der Bakterien wird eine gezielte Amplifikation des gesuchten DNA-Fragmentes erreicht. Die Rekombinanten (Plasmid + Insert) können dann mit Hilfe einiger Eigenschaften des Vektors von Nicht-Rekombinanten getrennt werden (Selektion).

2.3.9.1 Ligation

Die Ligation ist eine *in vitro*-Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit einem geeigneten Vektor. Für die Ligation der zu untersuchenden Gene in den linearisierten pARL1-Vektor wurde die T4-DNA-Ligase (Promega, USA) verwendet. Diese katalysiert die Synthese von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen von DNA-Molekülen unter Spaltung eines Wassermoleküls. Die Ligationsansätze wurden nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

Tabelle 4: Pipettierschema der Ligationsreaktionen mit dem pARL1-Vektor

Komponenten	Volumen
T4-DNA-Ligase	1 µl
10x T4-DNA-Ligase-Puffer	1,5 µl
dATP [10mM]	2,5 µl
Linearisierter pARL1-Vektor	0,1 - 1 µl
Aufgereinigtes Gen (Insert)	4 - 6 µl
Nukleasefreies Wasser	Auf 15 µl aufgefüllt

Das Volumen an Vektor bzw. Insert wurde immer im Verhältnis 1:3 und 1:5 angesetzt. Die Ligationsreaktionen erfolgten über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank. Die *vir*-Gene wurden in den pARL1-Vektor über die Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *KpnI* und *AvrII* und das 3-fache HA-Tag wurde über die Schnittstellen für *AvrII* und *XhoI* (Siehe Punkt 2.1.6) ligiert.

2.3.9.2 Transformation

Bei der Transformation werden die rekombinanten Plasmide in eine Wirtszelle eingeschleust. Hierbei wird eine Hitzeschockmethode verwendet, in der die Konstrukte durch einen Hitzeschock in die kompetenten Zellen eingeschleust werden können. Dafür wurde ein Aliquot von 100 µl kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 - 3 µl des Ligationsansatzes versetzt und vorsichtig gemischt. Die Transformation wurde ermöglicht, indem die Ansätze nach einer 20 – 30 minütigen Inkubation auf Eis, für 30 Sekunden in einen 42 °C warmen Heizblock platziert wurden und danach unverzüglich für fünf Minuten auf Eis gestellt wurden. Anschließend wurden die Transformationsansätze, nach Zugabe von 250 µl LB-Medium, für 1 Stunde bei 37 °C und 800 rpm (Thermomixer compact - Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Schließlich wurden die Ansätze für eine Selektion der positiven Bakterienkolonie auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.3.9.3 Selektion positiver Bakterienkolonien

Der für die Klonierung verwendete pARL1-Vektor besitzt das erste Markergen (Amp^r), welches für das Enzym β -Lactamase kodiert, das eine Resistenz gegen Ampicillin vermittelt. Die Bakterien, welche das Plasmid tragen entwickeln damit eine Ampicillin-Resistenz und lassen sich leicht auf mit Ampicillin versehenen Selektionsplatten heranziehen. Somit können positive Bakterienkolonien herangezogen werden. Die Kolonien wurden anschließend mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze in 4 ml LB-Medium überführt, das bereits mit 4 µl Ampicillin (100 µg/ml) versetzt war. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht in einem Brutschrank.

2.3.10 Präparation der Plasmide

Nachdem die Anzucht über Nacht erfolgte, wurden die Plasmide aus den Bakterienzellen isoliert. Zuvor wurden 800 µl der Kultur mit 200 µl Glycerin versetzt und als Dauerkultur bei -80 °C gelagert. Für die Präparation der Plasmide wurden zwei Methoden unter Anwendung von zwei unterschiedlichen Kits verwendet. Eine für die Gewinnung von kleineren Mengen an Plasmid und eine weitere für die Gewinnung größerer Mengen, die für die Transfektion nötig waren. Die kleinere Plasmid-Präparation erfolgte aus der 4 ml-Übernachtskultur unter Anwendung des NucleoSpin® Plasmid-Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers. Für die größere Plasmid-Präparation wurden in einem 2 Liter-Erlenmeyerkolben, 500 ml vorgewärmtes LB-Medium, welches mit 500 µl Ampicillin (100 µg/ml) versetzt war,

mit 500 µl aus der 4 ml Übernacht-Kultur beimpft und anschließend bei 37 °C und 120 rpm (Innova 4200 - New Brunswick Scientific, Nürtingen) über Nacht inkubiert. Die Plasmid-Präparation erfolgte anschließend mit Hilfe des NucleoBond® Xtra Maxi-Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers.

2.3.11 Restriktionsanalyse

Mit Hilfe einer Restriktionsanalyse kann überprüft werden, ob die Plasmide tatsächlich Integrate mit der erwarteten Größe tragen oder einen präparativen Verdau durchzuführen, um ein bestimmtes Gen in größerer Menge aus einem Vektor zu extrahieren oder um einen Vektor zu linearisieren. Dafür wird mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, die in den Vektor ligierte DNA wieder herausgeschnitten.

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die in der Lage sind eine definierte Basenabfolge auf der Plasmid-DNA zu erkennen und innerhalb dieser Basenabfolge den DNA-Strang zu schneiden. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sind unter dem Punkt 2.1.6 aufgelistet. Der Restriktionsansatz wurde nach folgendem Pipettierschema angesetzt:

Tabelle 5: Restriktionsansatz:

Komponenten	Analytischer Verdau	Präparativer Verdau
Plasmidlösung	5 µl	43 µl
10x CutSmart™ Puffer	2 µl	5 µl
Restriktionsenzym I	0,5 µl	1 µl
Restriktionsenzym II	0,5 µl	1 µl
Nukleasefreies Wasser	Auf 20 µl aufgefüllt	Auf 50 µl aufgefüllt

Nach der Zusammensetzung der Komponenten erfolgte eine Inkubation von zwei Stunden bei 37 °C. Anschließend konnte mit Hilfe einer DNA-Gelelektrophorese (Siehe Punkt 2.3.6) eine Auftrennung der verdaute DNA-Fragmente durchgeführt werden.

2.3.12 Sequenzierung

Die Plasmide wurden zur Überprüfung des Integrats bei der Firma Seqlab-Mircosynth (Göttingen) sequenziert. Seqlab-Mircosynth führt die Sequenzierung nach Sanger (1977) durch. Hierbei handelt es sich um eine Kettenabbruchmethode. Nachdem die doppelsträngige DNA durch Hitzeschock in zwei Einzelstränge gespalten wurde, bindet nach Abkühlung ein Primer an einem der Einzelstränge. Die Elongation erfolgt dann so lange, bis ein 2'-3'-Dideoxy-Nukleotid, denen die 3'-Hydoxylgruppe fehlt, an den Strang bindet, was zu einem Abbruch der Reaktion führt. Die Basen der Abbruch-Nukleotide sind dabei jeweils mit einem spezifischen Farbstoff markiert, was eine spätere optische Detektion ermöglicht. Durch die

Sequenzierung der Plasmide, konnte sichergestellt werden, dass es sich bei den Integraten um die gewünschten Gene handelte.

2.3.13 Ethanolfällung

Für die Transfektion von *P. falciparum* wurden 50 µg Plasmid-DNA des fertigen Konstruktes benötigt. Diese wurden mittels Ethanolfällung präzipitiert. Dafür wurde anhand der DNA-Konzentration das benötigte Plasmidlösung-Volumen ausgerechnet und vorgelegt. Anschließend wurde 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat pH 5,4 und das 3 fache Volumen 100 % Ethanol hinzugefügt und gut gemischt. Die Probe wurde entweder für mindestens 1 h oder über Nacht bei -80 °C inkubiert und anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation bei 16000 x g für 10 min wurde der Überstand verworfen und die DNA an der Luft getrocknet. Nach Trocknung wurde die DNA in TE-Puffer resuspendiert und konnte für die Transfektion (Siehe Punkt 2.2.1.6) verwendet werden.

2.4 Anreicherung von Rezeptor-spezifisch bindenden *PfiE* (*Panning*)

Die untersuchten Laborstämme (IT4 und 3D7) zeigten eine schwache Bindungskapazität auf die meisten Rezeptoren (ICAM-1, CD9 und P-Selektin), die in dieser Arbeit untersucht werden sollten (Dissertation - Nahla Metwally, 2016). Aus diesem Grund war eine genaue Analyse zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der *PfiE* an die jeweiligen Rezeptoren unter Flussbedingungen schwierig, da die Anzahl an gebundenen Zellen sehr gering war. Um die Anzahl der gebundenen *PfiE* in den Experimenten zu erhöhen, wurden die *PfiE* bezüglich der Bindung an die jeweilige Rezeptoren selektioniert. Somit konnte eine Rezeptor-spezifisch bindende Parasitenpopulation angereichert werden, welche aus *PfiE* besteht, die einen Rezeptor-spezifischen Liganden (*PfEMP1*) auf der Zelloberfläche aufweist. Durch die Anreicherung konnte eine Erhöhung der Anzahl an gebundenen *PfiE* auf den jeweiligen Rezeptor erreicht werden, was eine bessere Analyse zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften von *PfiE* ermöglichte.

Für die Anreicherung wurde die *P. falciparum*-Kultur so behandelt, dass die Kultur hoch synchron war und eine Parasitämie von mind. 10 % erreicht wurde. Zwei Tage vor dem Ansatz wurden in einer T75-Gewebekulturflasche mit *mock*-transfizierten CHO-Zellen und eine T75-Gewebekulturflasche mit einer der transgenen CHO-Zelllinien (Siehe Tab. 3) vorbereitet. Dabei wurden sie so gesplittet, dass am Tag des Ansatzes eine Konfluenz von mind. 70 % erreicht wurde. Die Flasche mit den *mock*-transfizierten CHO-Zellen diente dem

Präabsorptionsansatz, welcher vor dem Anreicherungsansatz durchgeführt wurde, um nicht-spezifisch bindende *PfiE* aus dem Ansatz zu entfernen.

Am Tag des Ansatzes wurde die *P. falciparum*-Kultur (mit Parasiten im Trophozitenstadium und mind. 10 % Parasitämie) in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 800 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Sediment einmal mit Bindungsmedium gewaschen. Während der Waschschrte der *P. falciparum*-Kultur wurden die CHO-Zellen (*mock*) mit Bindungsmedium gewaschen und anschließend für 5 min mit 10 ml Bindungsmedium inkubiert (37 °C; 5 % CO₂). Danach wurden die *PfiE* in Bindungsmedium resuspendiert und dabei der Hämatokrit auf 5 % eingestellt. Nach dem die *PfiE* resuspendiert wurde, wurde die Zellsuspension vorsichtig auf die CHO-Zellen (*mock*) gegeben und der Ansatz für eine Stunde inkubiert (37 °C; 5 % CO₂), wobei die Flasche alle 15 min geschwenkt wurde (Präabsorption). Nach der Präabsorption wurden die nicht-bindenden *PfiE* mit Hilfe eines Pipettierhelfers und einer 10 ml-Pipette aus der Flasche entnommen und vorsichtig in die zweite T75-Gewebekulturflasche (mit transgener CHO-Zelllinie) überführt, welche zuvor ebenfalls wie die erste Flasche behandelt worden war (Waschschritt plus 5-minütige Inkubation). Anschließend wurde der Ansatz erneut für eine Stunde inkubiert (37 °C; 5 % CO₂) und alle 15 min geschwenkt. Nach der Inkubation wurden die nicht-bindenden *PfiE* durch achtmaliges Waschen mit jeweils 10 ml Bindungsmedium entfernt. Die Bindung der *PfiE* wurde mit Hilfe eines Inversmikroskops kontrolliert. Anschließend wurden 10 ml *P. falciparum*-Kulturmedium (Komplettmedium) und 500 µl Blut (0+) in die Flasche gegeben und der Ansatz wurde bis zum folgenden Tag bei 37 °C und einer Gaszusammensetzung von 1 % O₂, 5 % CO₂ und 94 % N₂ inkubiert.

Am folgenden Tag konnten die Parasiten, welche sich jetzt im nicht-adhärenen Ringstadium befanden, geerntet werden. Dies erfolgte durch Schwenkung der T75-Gewebekulturflasche. Damit wurden die *PfiE* im Medium resuspendiert und konnten so mit Hilfe einer Pipette aufgenommen werden. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 800 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die *PfiE* mittels Biocoll von den CHO-Zellen getrennt (Siehe Punkt 2.2.3) und wieder in die Kultur genommen. Die Anreicherung wurde mind. 6 Mal wiederholt bis die *PfiE* für die Experimente verwendet werden konnten. Für die Transkriptomanalyse der angereicherten Parasiten, wurden die Parasiten im Ringstadium unmittelbar nach einer Anreicherungsrunde (nach ausreichenden Anreicherungsrounden) in TRIzol[®] (Life Technologies, USA) aufgenommen. Hierfür wurden die *PfiE* nach der letzten Anreicherungsrunde und Biocoll-Auftrennung in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 800 x g zentrifugiert. Anschließend wurde

das Sediment 1x mit Kulturmedium gewaschen und in dem 15-fachen Volumen vorgewärmten (37 °C) TRizol[®] lysiert und bis zur RNA-Extraktion (Siehe Punkt 2.3.1) bei -80 °C gelagert.

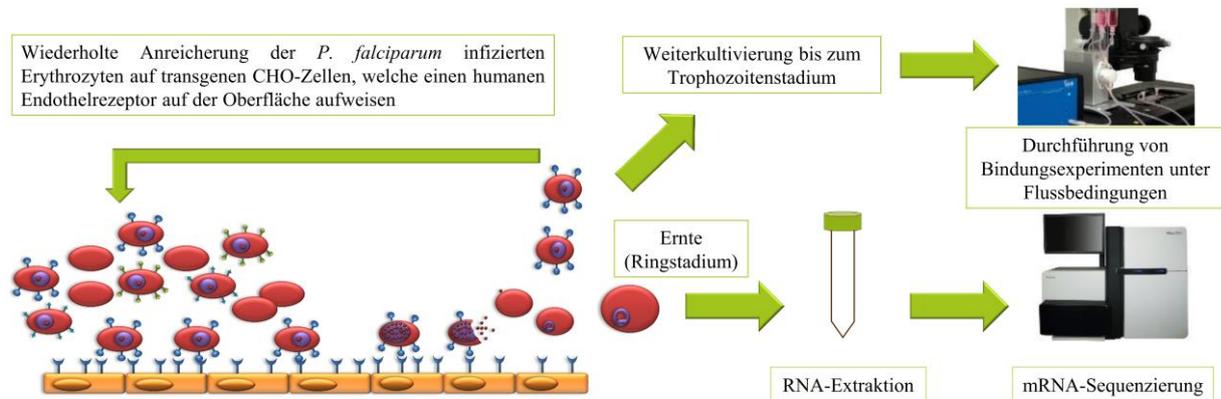


Abbildung 10: Anreicherung von *P. falciparum* auf die Bindung an einem spezifischen Endothelrezeptor.

P. falciparum infizierte Erythrozyten wurden mit RPMI mit Humanserum kultiviert bis die Kultur eine Parasitämie von 10 % erreicht hat. Für die Anreicherung wurden die Parasiten mit transgenen CHO-Zellen, welche den spezifischen humanen Rezeptor auf der Oberfläche trugen, inkubiert. Nicht gebundene *PfiE* wurden nach Inkubation durch mehrmaliges Waschen entfernt. Nach ausreichenden Anreicherungsrounds (5 – 7) wurden junge Parasiten (im Ringstadium) für die Transkriptomanalyse geerntet oder die Parasiten wurden bis zum Trophozoitenstadium für die Verwendung bei Bindungsversuchen weiter kultiviert.

2.5 Transkriptomanalyse mittels NGS (engl. *next generation sequencing*)

Alle Transkriptomsequenzierungen im Rahmen dieser Arbeit wurden in Hong Kong bei der Firma BGI (*Beijing Genomics Institute*) durchgeführt. Dabei wurde eine Hiseq-Plattform verwendet (Illumina Hiseq 4000).

Die bioinformatische Analyse des sequenzierten Transkriptoms wurde freundlicherweise von Dr. Stephan Lorenzen (BNITM, Hamburg) durchgeführt. Für die Abgleichung der sequenzierten Fragmente mit dem Transkriptom von *P. falciparum* wurde Bowtie 2 verwendet. Da die Ausgangszahlen innerhalb einer Probe und zwischen den Proben oft nicht direkt vergleichbar sind, wurde erst eine Normalisierung der Werte mit Hilfe eines Normierungsfaktors durchgeführt. Diese und die anschließende differenzielle Expressionsanalyse wurden in dieser Arbeit unter Anwendung des DEseq 1.18 Bioconductor durchgeführt. Dabei wurde eine paarweise Analyse durchgeführt, um einen Vergleich der Genexpression zwischen nicht-angereicherten Parasiten und rezeptorspezifisch-angereicherten Parasiten (Siehe Punkt 2.4) zu ermöglichen. Schließlich wurde, um einen sogenannten „*family-wise*“ Fehler zu vermeiden, der *p*-Wert mittels der Benjamini-Hochberg-Methode mit einem FDR von 10 % adjustiert.

2.6 *In silico*-Analyse der VIR-Proteinsequenzen

Um VIR-Proteine zu identifizieren, welche an die Oberfläche des Erythrozyten exportiert werden und eine Rolle bei der Zytoadhäsion der *P. vivax* infizierten Erythrozyten (PviE) spielen können, wurden als erstes eine Reihe von *in silico*-Analysen durchgeführt. Diese sollten dazu dienen anhand von definierten Eigenschaften, welche für exportierte Proteine von *P. falciparum* bereits beschrieben wurden, potentielle VIR-Kandidaten für weitere Untersuchungen zu identifizieren. Bei den *in silico*-Analysen handelte es sich vor allem um Vorhersagenanalysen mit dem Ziel Exportsignale bei den VIR-Proteinen zu ermitteln. Es wurde für alle 295 bisher identifizierten VIR-Proteine (Lopez *et al.*, 2013) Vorhersagenanalysen durchgeführt mit dem Ziel ein Signalpeptid mittels SignalIP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), eine Transmembrandomäne mittels TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) sowie ein PEXEL-Motiv mittels 3of5 (<http://www.dkfz.de/mga2/3of5/>) zu identifizieren. Die dafür verwendeten Proteinsequenzen stammen aus dem Sali-Stamm und wurden PlasmoDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>) entnommen.

Des Weiteren wurde in Kooperation mit Dr. Christian Pick (Universität Hamburg) eine Clusteranalyse durchgeführt. Diese diente dazu einen besseren Überblick der VIR-Proteinklassifizierung zu erzeugen. Hierfür wurde das Programm SLiMfinder (engl. *short linear motif finder*) verwendet, welches in der Lage ist, statistisch überrepräsentierte SLiMs innerhalb einer Proteingruppe zu identifizieren sowie anhand eines Blast-basierten Vergleichs, die Proteine in unterschiedlichen UPC (engl. *unrelated protein cluster*) zu klassifizieren (Edwards *et al.*, 2007; Davey *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurde das Programm für die UPC-Klassifizierung verwendet. Die Ähnlichkeit zwischen den Proteinen innerhalb eines UPC kann anhand der Einstellung eines *e-values* beeinflusst werden. In dieser Arbeit wurde die Klassifizierung der VIR-Proteine mit vier unterschiedlichen *e-value*-Einstellungen (1×10^{-15} , 1×10^{-20} , 1×10^{-25} und 1×10^{-30}) durchgeführt.

2.7 Immunfluoreszenzanalyse (IFA)

Die Lokalisationsstudie der VIR-Proteine wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Die VIR-Proteine wurden dafür mit einem 3 x HA-Tag fusioniert und konnten mit Hilfe einer indirekten IFA-Methode angefärbt werden. Dafür wurde der primäre α -HA-Antikörper (Hoffmann-LA Roche, Schweiz) sowie ein sekundärer Antikörper, welcher mit dem Farbstoff Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific, USA) konjugiert war, verwendet. Um eine Kolokalisationsanalyse durchführen zu können, wurden Marker für bestimmte

subzelluläre Strukturen des Parasiten oder des Erythrozyten verwendet. Hierfür wurde als Marker für die Erythrozytenmembran (EM) ein Antikörper gegen das EM-assoziierte Protein Spektrin (α -Spektrin - Sigma-Aldrich, USA) genutzt. Als Marker für die Maurer'schen Spalten (MC) wurde ein Antikörper gegen das MC-assoziierte Protein SBP-1 verwendet (α -SBP1 - BNITM AG Spielmann, Hamburg). Ein Antikörper gegen das Protein ETRAMP (α -ETRAMP - BNITM, AG Spielmann, Hamburg) wurde als Marker für die parasitophore Vakuolenmembran angesetzt und schließlich wurde ein α -ATS-Antikörper (Dr. Anna Bachmann – BNITM, Hamburg) als Marker für die Knobs-assoziierten PfEMP1-Mitglieder verwendet. Die Marker der subzellulären Strukturen wurden mit Hilfe eines sekundären Antikörpers angefärbt, welcher mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, USA) konjugiert war. Für die Durchführung der IFA wurden Aceton-fixierte Blutausstriche verwendet. Die Fläche des Objektträgers wurde mit Hilfe eines Silikonstiftes (DakoCytomation Pen - Biocompare, Dänemark) in acht Felder geteilt und der Ausstrich anschließend für 5 min in 1x PBS-Puffer rehydriert. Währenddessen wurden die Antikörperverdünnungen (Siehe Tab. 1) in 1x PBS/3 % BSA angesetzt.

Nach der Rehydrierung wurde der 1x PBS-Puffer aus den Feldern entfernt und auf jedes Feld jeweils 60 μ l von der entsprechenden Antikörperverdünnung pipettiert. Anschließend wurden die Objektträger für zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Primärantikörperlösung abgenommen und die Ausstriche 3-fach mit 1x PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde der überschüssige 1x PBS-Puffer abgenommen und auf jedes Feld 60 μ l der entsprechenden Sekundärantikörperverdünnungen (Siehe Tab. 2), welche ebenfalls den Farbstoff Hoechst 33342 (1:1000) für die Kernfärbung sowie Ampicillin (1:1000 aus einer 100 μ g/ml Amp-Lösung) enthielten, zugegeben. Die Ausstriche wurden für zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei RT und unter Lichtausschluss inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Antikörperlösung abgenommen und die Ausstriche erneut 3-fach mit 1x PBS-Puffer gewaschen. Nach dem der überschüssige 1x PBS-Puffer entfernt wurde, wurde auf jedes Feld ein kleiner Tropfen einer Fixierlösung (Mowiol - Merck, Darmstadt) gegeben und die Ausstriche mit einem Deckglas bedeckt.

Schließlich wurden die Ausstriche zum Trocknen über Nacht im Dunkeln aufbewahrt und konnten anschließend mikroskopisch analysiert werden. Dabei wurde das Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioskop M1 mit einer 100x/1,4 Immersionsölinse, eine Hamamatsu Orca C4742-95 Kamera und das Zeiss Axiovision Programm benutzt. Eine Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe des Programms Gimp.

2.8 Bindungsexperiment unter Flussbedingungen

In dieser Arbeit wurde die Dynamik der Zytoadhäsion von PfiE an Endothelrezeptoren unter unterschiedlichen Flussbedingungen untersucht. Das Wort Flussbedingung kann für verschiedene Definitionen einer fließenden Bewegung verwendet werden, wie beispielsweise die Art oder die Geschwindigkeit der Bewegung. In dieser Arbeit wurde lediglich eine Art des Flusses untersucht, der unidirektionale Laminarfluss. Somit wird der Begriff „Flussbedingung“ genutzt, um die unterschiedlichen Flussraten (ml/s) zu definieren. Für die Definition der Flussbedingungen, wurde die sogenannte Scherkraft verwendet. Die Scherkraft ist die auf die Zellen wirkende Kraft, welche durch den Fluss erzeugt wird. Je höher die Flussrate, desto höher auch die Scherkraft. Die Scherkraft wird in dyn/cm^2 angegeben ($1 \text{ dyn/cm}^2 \cong 0,1 \text{ Pa}$).

Bei der Durchführung wurde das automatisierte *Flow Chamber System* (deutsch: Flusskammersystem) der Firma Ibidi (Martinsried) verwendet. Dieses ermöglichte die Erzeugung eines kontinuierlichen unidirektionalen Laminarflusses sowie die Einstellung definierter Parameter. Es wurde mit Hilfe einer Software eine Einstellung festgelegt, die für jedes Experiment verwendet wurde.

Um zu untersuchen ab welcher Scherkraft die PfiE in der Lage sind an die jeweiligen Rezeptoren zu binden, wurden die Parameter für die Experimente so definiert, dass zu Beginn eine Scherkraft vorhanden sein sollte, bei der noch keine Bindung stattfindet. Diese wurde nach mehreren Vorversuchen bei 6 dyn/cm^2 festgelegt. Danach sollte die Scherkraft schrittweise alle 10 min reduziert werden bis zu einer vaskulär-physiologisch relevanten Scherkraft von $0,9 \text{ dyn/cm}^2$, bei der das Experiment schließlich für 30 min laufen sollte (Siehe Tab. 6).

Tabelle 6: Parameter des Bindungsexperiments

Scherkraft [dyn/cm^2]	6	4	3	2	1,5	0,9
Zeit [min]	10	10	10	10	10	30

Für die Durchführung eines Experiments wurden zwei Tage vor dem Experiment zum einen eine T75-Gewebekulturflasche mit *mock*-transfizierten CHO-Zellen vorbereitet und so gesplittet, dass am Tag des Versuches mind. 70 % Konfluenz erreicht wurde. Zum anderen wurden $1,5 \times 10^5$ transgenen CHO-Zellen, welche den zu untersuchenden Rezeptor auf der Oberfläche trugen in einer Flusskammer (μ -Slide I 0.8 Luer ibiTreat) ausgesät. Dafür wurden die CHO-Zellen aus einer T25-Gewebekulturflasche wie bereits beschrieben mit Accutase behandelt (Siehe Punkt 2.2.2.1). Anschließend wurden die Zellen in 2 ml CHO-

Kulturmedium aufgenommen und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und die benötigte Zellzahl ($1,5 \times 10^5$) in einem Gesamtvolumen von 200 μl CHO-Kulturmedium eingestellt. Zu der Zellsuspension wurden 2,8 μl Selektionsmarker (G418) gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Danach wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer Pipette in die Flusskammer pipettiert (Siehe Abb. 11) und die Flusskammer für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

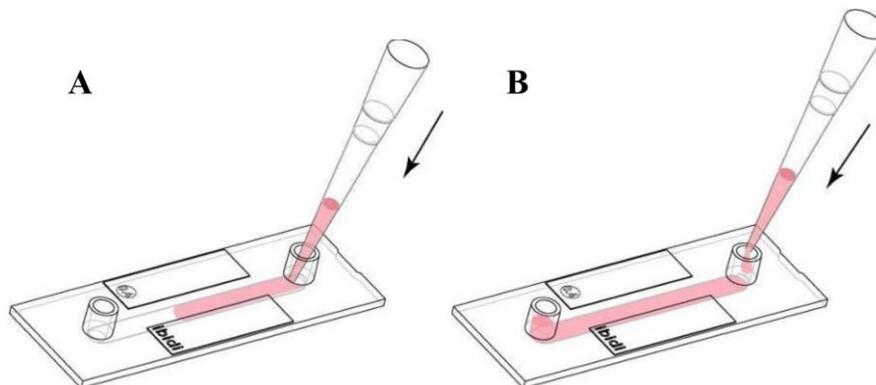


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Aussäens der transgenen CHO-Zellen. A: Pipette direkt in die Öffnung der Flusskammer halten und die Zellsuspension vorsichtig in die Kammer hineingeben B: Nach einer 2-stündigen Inkubation, 120 μl frisches Medium (mit Selektionsmarker) in die Flusskammer geben (60 μl pro Öffnung). Dabei soll vermieden werden, die Innenseite der Öffnungen mit der Pipettenspitze zu berühren (www.ibidi.com).

Nach der Inkubation wurden weitere 120 μl CHO-Kulturmedium, welches mit 1,7 μl Selektionsmarker vermischt wurde, in die Flusskammer gegeben (60 μl je Öffnung). Schließlich wurde die Kammer bis zum folgenden Tag bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Wachstum der transgenen CHO-Zellen mit Hilfe eines Inversmikroskops kontrolliert und das Medium einmal gewechselt. Hierfür wurde das verbrauchte Medium mit einer Pipette abgenommen und frisches Medium sowie Selektionsmarker dazu gegeben. Erneut wurde die Flusskammer bis zum folgenden Tag wie oben beschrieben inkubiert.

Ein Tag vor dem Versuchstag wurde ebenfalls die Flusseinheit mit den Reservoirs und den Schläuchen zusammengebaut und für 24 Std. bei 37 °C inkubiert. Am Versuchstag wurden die *PfiE*, welche hoch-synchron waren und sich im Trophozystenstadium befanden, wie unter Punkt 2.2.1.4 beschrieben mittels MACS isoliert und anschließend mit den *mock*-transfizierten CHO-Zellen für eine Stunde inkubiert (Präabsorption), wobei die Gewebekulturflasche alle 15 min geschwenkt wurde. Während der Präabsorption wurde die Flusseinheit vorbereitet. Dafür wurden 12,6 ml vorgewärmtes Bindungsmedium in die Reservoirs gegeben. Anschließend wurde die Flusseinheit an das Pumpensystem angeschlossen und dieses bei 50 mbar angeschaltet und für ca. 5 min laufen gelassen um noch

vorhandene Luftbläschen aus den Schläuchen zu entfernen. Nach Beendigung der Präabsorption wurden die nicht-gebundenen *PfiE* aufgenommen, in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 800 x *g* zentrifugiert. Anschließend wurden die *PfiE* in 1 ml Bindungsmedium resuspendiert und für die Bestimmung der Zellzahl je nach Größe des Sediments 1:50 oder 1:100 verdünnt. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden 1×10^7 *PfiE* in 1 ml Bindungsmedium aufgenommen. Bevor die *PfiE* in das Reservoir der Flusseinheit gegeben wurden, wurde die Flusskammer an die Flusseinheit angeschlossen. Dabei wurden die Schläuche mit einer Schlauchklemme festgeklemmt damit das Bindungsmedium bei der Verknüpfung nicht auslief. Anschließend wurde die Zellsuspension mit den *PfiE* in das Reservoir der Flusseinheit gegeben, wobei die Schläuche weiter festgeklemmt blieben um zu vermeiden, dass die *PfiE* schon vor Versuchsbeginn in Kontakt mit den CHO-Zellen kamen. Schließlich wurde die Flusseinheit erneut am Pumpensystem angeschlossen, die Flusskammer unter dem Inversmikroskop eingebaut und der Versuch wurde gestartet in dem man gleichzeitig das Kontrollprogramm für das Pumpensystem und das Kontrollprogramm für die Aufnahmen am Mikroskop eingeschaltet hat. Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe des Inversmikroskops EVOS FL Auto (Thermo Fisher Scientific, USA) mit einer 20x/0,5 Linse in dem alle fünf Sekunden ein Bild gemacht wurde.

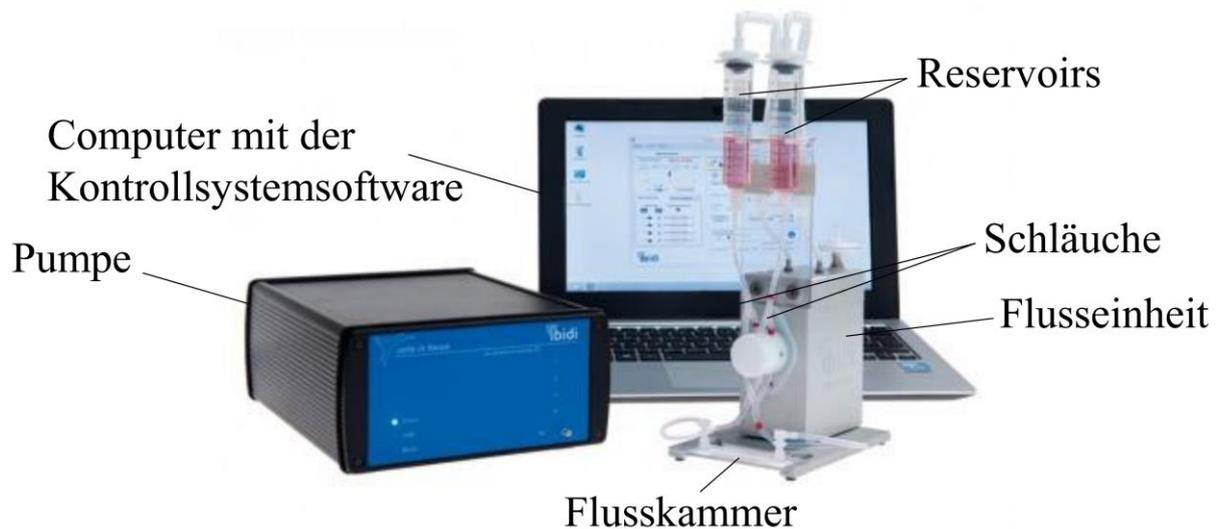


Abbildung 12: Hauptkomponenten des Flusskammer-Systems: Die Abbildung stellt die Hauptkomponenten des Flusskammer-Systems von Ibidi dar. Die Pumpe und dem Computer mit dem Kontrollsystemsoftware, mit den die Flussbedingungen eingestellt und kontrolliert werden. Die Flusseinheit sowie die Silikonschläuche, die Reservoirs und die Flusskammer (www.ibidi.com).

2.9 Auswertung der Bindungsversuche

Für die Auswertung der Bindungsversuche wurde das Programm ImageJ (National institute of health, USA) verwendet. Dafür wurden die Bilder in das Programm als Bildsequenz

importiert. Zum einen wurde die Anzahl der gebundenen PfiE für jede untersuchte Scherkraft bestimmt und zum anderen wurden die einzelnen Zellen verfolgt, um die akkumulierte Distanz, die von den Zellen nach der Bindung zurückgelegt wurde, zu ermitteln. Die Verfolgung der einzelnen Zelle erfolgte mit Hilfe des *Manual Tracking Plugins* und anschließend unter Anwendung des *Chemotaxis Plugins* für die Berechnung der akkumulierten Distanz.

3 Ergebnisse

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Interaktion zwischen *Plasmodium* infizierten Erythrozyten und humanen Endothelrezeptoren zu untersuchen. Diese Interaktion ist bei *P. falciparum* neben der Antigenvariation eine der Hauptmechanismen für die hohe Pathogenität des Parasiten (Miller *et al.*, 2002). Durch die Interaktion werden die PfiE aus dem Blutstrom entfernt und somit wird deren Eliminierung durch die Milz vermieden (Newbold *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000a; Andrews *et al.*, 2005; Smith, 2014; Milner *et al.*, 2015). *P. falciparum* ist der gefährlichste der fünf humanpathogenen Malaria-Erreger und auch die am intensivsten untersuchte *Plasmodium*-Art, wenn es um das Thema „Zytoadhäsion“ geht. Zahlreiche Studien beschäftigten sich bereits mit dieser relativ gut erforschten Eigenschaft des Parasiten, die allerdings immer noch viele Fragen aufwirft. Eine zweite Art des humanpathogenen Malaria-Erregers, *P. vivax*, soll diese Eigenschaft mit *P. falciparum* teilen und ebenso in der Lage sein, an Endothelrezeptoren zu adhären (Ansari *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Bernabeu *et al.*, 2012; Chotivanich *et al.*, 2012; De las Salas *et al.*, 2013).

In dieser Arbeit wurden zum einen Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung der Zytoadhäsion von PfiE an Endothelzellrezeptoren durchgeführt und zum anderen wurden Analysen zur Identifizierung exportierter Proteine, die eine Rolle bei der Zytoadhäsion von *P. vivax* an Endothelzellen spielen können, vorgenommen.

3.1 Zytoadhäsion von *P. falciparum* infizierten Erythrozyten (PfiE) an humane Endothelzellrezeptoren unter Flussbedingungen

Die Zytoadhäsion gilt als Schlüsselereignis bei den Komplikationen, die zur Pathologie der Malaria führen. Zahlreiche Studien beschäftigten sich bereits mit diesem sehr komplexen Thema. Der größte Teil der Studien und somit ein erheblicher Anteil, der bis dato vorhandenen Kenntnisse, basieren auf Bindungsexperimente unter statischen Bedingungen (Gardner *et al.*, 1996; Andrews *et al.*, 2005; Esser *et al.*, 2014).

In dieser Studie wurde die Bindungseigenschaft von PfiE an die Endothelrezeptoren CD36, ICAM-1, CD9 und P-Selektin mithilfe eines laminaren Flusssystems untersucht. Dies sollte einen genaueren Blick auf die Dynamik der Interaktion zwischen den infizierten Erythrozyten und den Endothelzellen in einem System, das der *in vivo* Situation stark ähnelt, ermöglichen. Hierfür wurden Bindungsversuche mit zwei unterschiedlichen *P. falciparum* Laborstämmen (IT4/3D7) und verschiedenen transgenen CHO-Zelllinien unter definierten Flussbedingungen durchgeführt (Siehe Punkt 2.8). Die in dieser Arbeit verwendeten transgenen CHO-Zelllinien

trugen die humanen Endothelrezeptoren CD36, ICAM-1, CD9 oder P-Selektin an der Zelloberfläche.

Die verwendeten Laborstämmen wiesen unterschiedliche Bindungskapazitäten zu den untersuchten Endothelrezeptoren auf (Dissertation – Nahla Metwally, 2016). Daher musste vor Beginn der Experimente eine Anreicherung auf die jeweiligen Rezeptoren erfolgen, um die Parasitenpopulation mit der entsprechend spezifischen Bindung zu erhalten (Siehe Punkt 2.4). Beide verwendeten Isolate wiesen allerdings eine sehr hohe Bindungskapazität für CD36 auf. Somit wurden die Bindungsexperimente an den Rezeptor CD36 sowohl mit nicht angereicherten *PfiE* als auch mit CD36-angereicherten *PfiE* (Siehe Abb. 13 und 14, A1-2 und B1-2) durchgeführt.

Als erstes sollte bei absteigender Scherkraft der Zeitpunkt identifiziert werden, an dem die ersten *PfiE* an den jeweiligen Rezeptor binden und analysiert werden, ob unter bestimmten Scherkräften eine Bindung bevorzugt stattfindet. Diese Experimente zeigten einige Gemeinsamkeiten aber ebenso interessante Unterschiede beim Bindungsverhalten der *PfiE* der zwei untersuchten Isolate an die unterschiedlichen Rezeptoren. An den Rezeptor CD36 adhärten die ersten *PfiE* des Stammes IT4 (IT4-*PfiE*) bei einer Scherkraft von 4 dyn/cm² (Siehe Abb. 13, A1; B1), während *PfiE* des Stammes 3D7 (3D7-*PfiE*) erst bei einer Scherkraft von 3 dyn/cm² adhärten (Siehe Abb. 14, A1; B1). Nach einer Anreicherung der IT4-*PfiE* und 3D7-*PfiE* an CD36 zeigten beide Laborstämmen eine Bindung erst ab 3 dyn/cm² (Siehe Abb. 13 und 14, A2; B2).

Auffällig war außerdem, dass die absolute Anzahl an gebundenen *PfiE* an CD36 bei beiden Laborstämmen nach der Anreicherung geringer wurde. Bei IT4 konnten in dem Versuch mit der nicht-angereicherten Parasitenpopulation im Schnitt 128 gebundene infizierte Erythrozyten beobachtet werden, während lediglich 44 *PfiE* bei dem Versuch mit der CD36-angereicherten Population gezählt werden konnten (Siehe Abb. 13 und 14, A1; A2). 3D7 wies ohne Anreicherung im Schnitt 68 gebundene *PfiE* und ca. 39 gebundene Zellen nach der Anreicherung auf (Siehe Abb. 13 und 14, A1; A2). Bei der Bindung an den Rezeptor ICAM-1 konnte diesbezüglich ähnliches beobachtet werden, mit dem Unterschied, dass dieses Mal 3D7-*PfiE* ab einer Scherkraft von 4 dyn/cm² und IT4-*PfiE* bei einer Scherkraft von 3 dyn/cm² adhärten (Siehe Abb. 13, A3; B3). Bei den Bindungsversuchen an CD9 adhärten beide Laborstämmen bei niedrigeren Scherkräften. Hier adhärten 3D7-*PfiE* bei einer Scherkraft von 2 dyn/cm² und IT4-*PfiE* zeigten eine Bindung sogar erst bei einer Scherkraft von 0,9 dyn/cm² (Siehe Abb. 13, A4; B4). An P-Selektin erfolgte eine Adhäsion von 3D7-*PfiE* ab einer Scherkraft von 3 dyn/cm² und von IT4-*PfiE* ab einer Scherkraft von 4 dyn/cm².

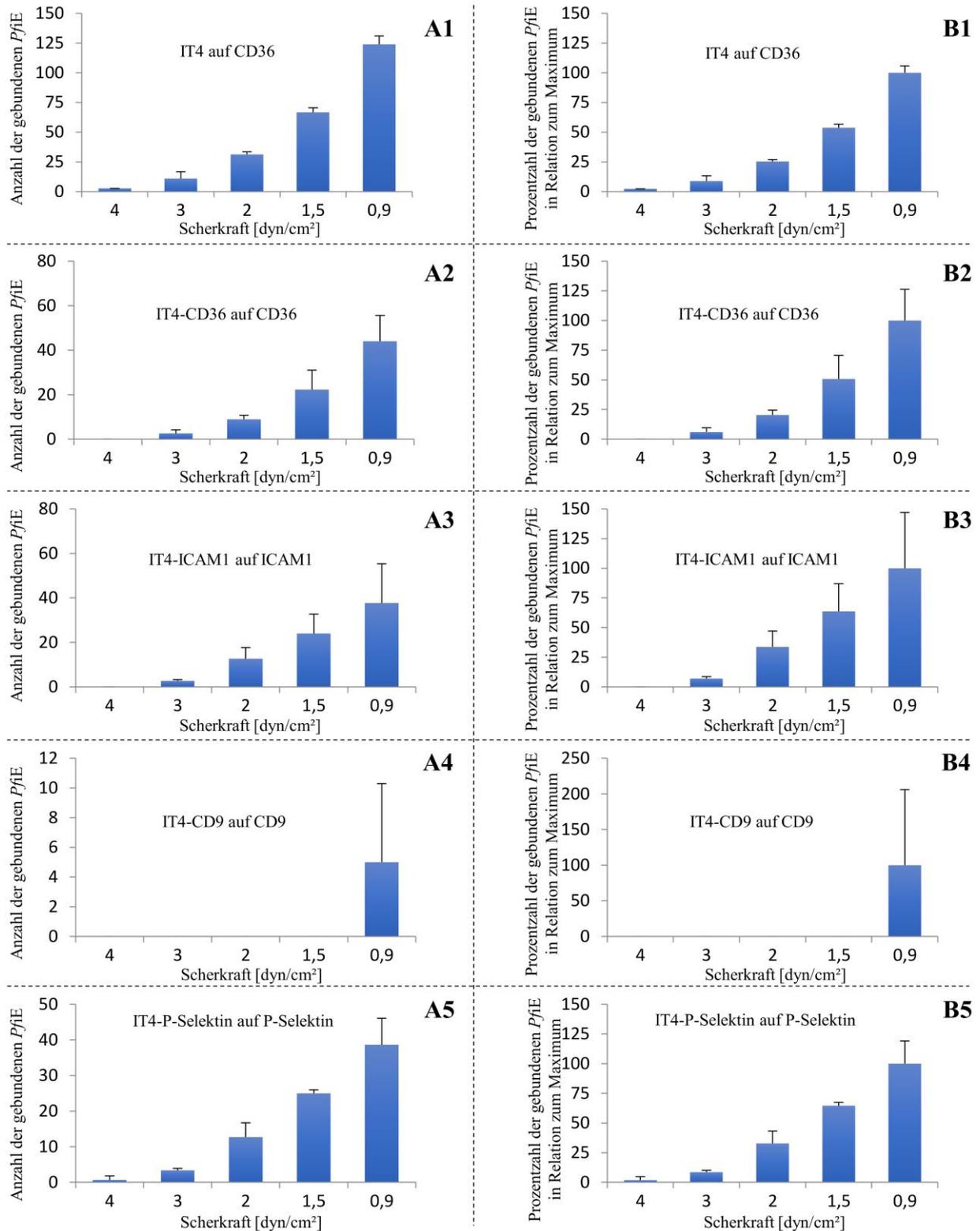


Abbildung 13: Anzahl von gebundenen infizierten Erythrozyten (*PfiE*) des Stammes IT4 an verschiedene Endothelrezeptoren bei unterschiedlichen Scherkräften. Absolute Anzahl (A) und Prozentzahl in Relation zur Gesamtzahl (B) der gebundenen *PfiE* vom Stamm IT4 auf die folgenden humanen Endothelrezeptoren: CD36 mit nicht-angereicherten *PfiE* (A1; B1), CD36 (A2; B2), ICAM-1 (A3; B3), CD9 (A4; B4) und P-Selektin (A5; B5) mit einer auf den jeweiligen Endothelrezeptor angereicherten Parasiten-Population. Jedes Experiment wurde im Triplikat durchgeführt.

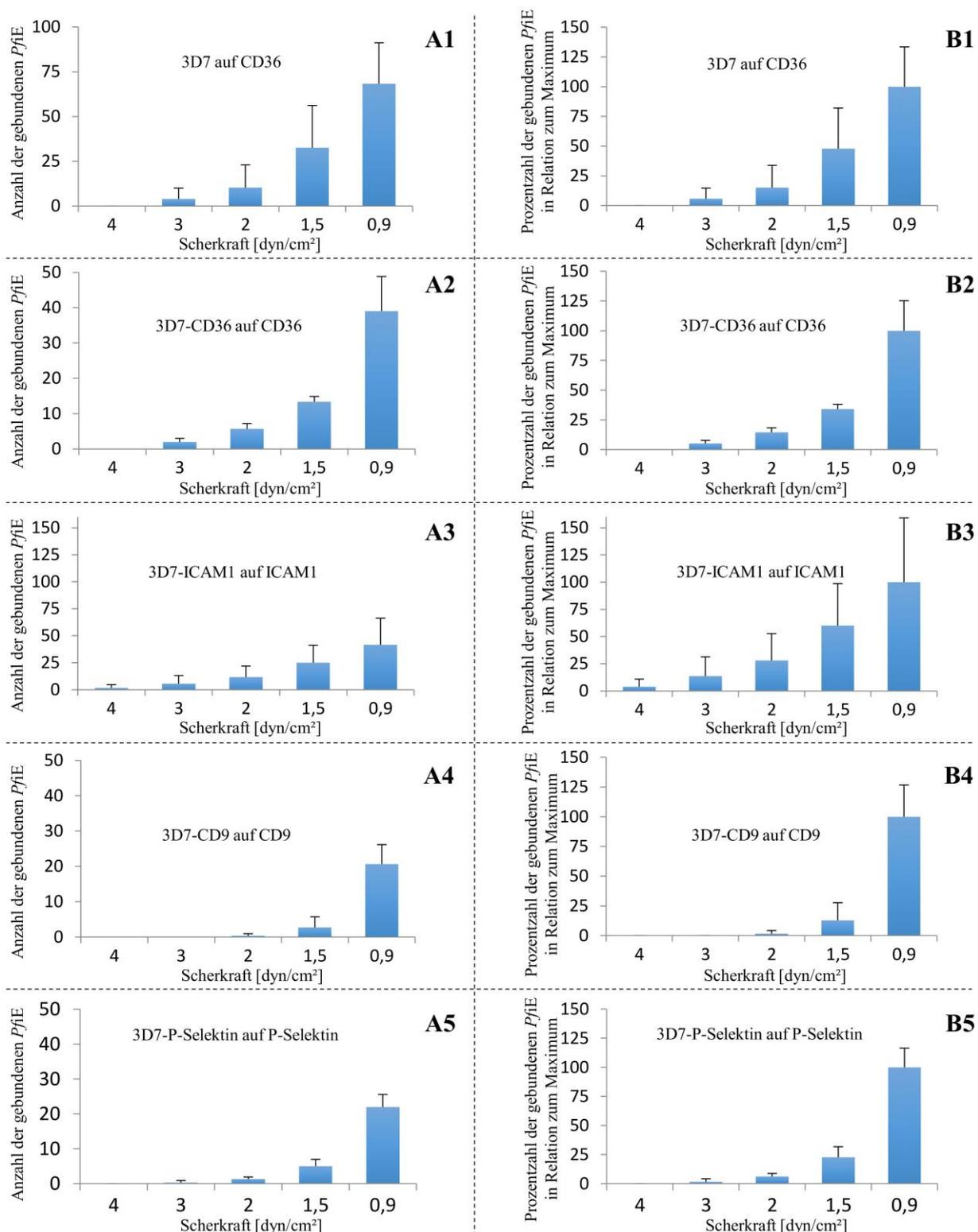


Abbildung 14: Anzahl von gebundenen infizierten Erythrozyten (*PfiE*) des Stammes 3D7 an verschiedene Endothelrezeptoren bei unterschiedlichen Scherkräften. Absolute Anzahl (A) und Prozentzahl in Relation zur Gesamtzahl (B) der gebundenen *PfiE* vom Stamm 3D7 auf die folgenden humanen Endothelrezeptoren: CD36 mit nicht-angereicherter *P. falciparum* Population (A1; B1), CD36 (A2; B2), ICAM-1 (A3; B3), CD9 (A4; B4) und P-Selektin (A5; B5) mit einer auf den jeweiligen Endothelrezeptor angereicherten Parasiten-Population. Jedes Experiment wurde im Triplikat durchgeführt.

Eine weitere interessante Beobachtung konnte bei der Darstellung der Werte in Prozent in Relation zur Gesamtzahl der gebundenen *PfiE* bei einer Scherkraft von 0,9 dyn/cm² gemacht werden. Es wurde beobachtet, dass der Anstieg der Anzahl an gebundenen *PfiE* an ICAM-1 bei beiden Stämmen und an P-Selektin bei IT4 sich relativ konstant verhielt, mit einem Anstieg von 30 - 32 % zwischen 2 und 1,5 dyn/cm² und ca. 35 - 40 % zwischen 1,5 und 0,9 dyn/cm². Im Vergleich dazu zeigten alle anderen Bindungsexperimente einen höheren Anstieg dieser Anzahl bei einer Scherkraft von 0,9 dyn/cm². Diese zeigten eine Steigerung von ca. 46 - 87 % in der Anzahl der gebundenen *PfiE* zwischen 0,9 dyn/cm² und 1,5 dyn/cm², während bei einer Scherkraft von 1,5 dyn/cm² lediglich ca. 11 - 33 % mehr gebundene *PfiE* als bei 2 dyn/cm² beobachtet werden konnten (Siehe Abb. 13 und 14, B1-5; Tab. 7).

Tabelle 7: Anstieg der Anzahl an gebundenen *PfiE* an die unterschiedlichen Rezeptoren.

Stamm	Rezeptor	2 - 1,5 [dyn/cm ²]	1,5 - 0,9 [dyn/cm ²]	Differenz
IT4	CD36, nicht-angereichert	28,5 %	46,2 %	17,7 %
	CD36, angereichert	30,3 %	49,2 %	18,9 %
	ICAM-1, angereichert	30,1 %	36,3 %	6,2 %
	CD9, angereichert	-	100 %	100 %
	P-Selektin, angereichert	31,9 %	35,3 %	3,4 %
3D7	CD36, nicht-angereichert	32,7 %	52,2 %	19,5 %
	CD36, angereichert	19,7 %	65,8 %	46,1 %
	ICAM-1, angereichert	32,0 %	40,0 %	8,0 %
	CD9, angereichert	11,3 %	87,1 %	75,8 %
	P-Selektin, angereichert	16,3 %	77,3 %	61,0 %

3.2 Dynamik der Interaktion zwischen *PfiE* und unterschiedlichen humanen Endothelzellrezeptoren

Des Weiteren sollte die Dynamik der Interaktion zwischen *PfiE* und den humanen Endothelzellrezeptoren analysiert werden. Hierbei sollte der Fokus insbesondere auf der Identifizierung von Unterschieden beim Bindungsverhalten der *PfiE* an die verschiedenen humanen Endothelrezeptoren liegen (Cooke *et al.*, 1994; Antia *et al.*, 2007).

Hierfür wurde anhand von Videoaufnahmen das dynamische Verhalten der Bindung von *PfiE* an die unterschiedlichen Rezeptoren charakterisiert.

Für eine bessere Visualisierung der Ergebnisse, wurden Ausschnitte aus der Gesamtübersicht genommen und diese vergrößert dargestellt (Siehe Anhang F).

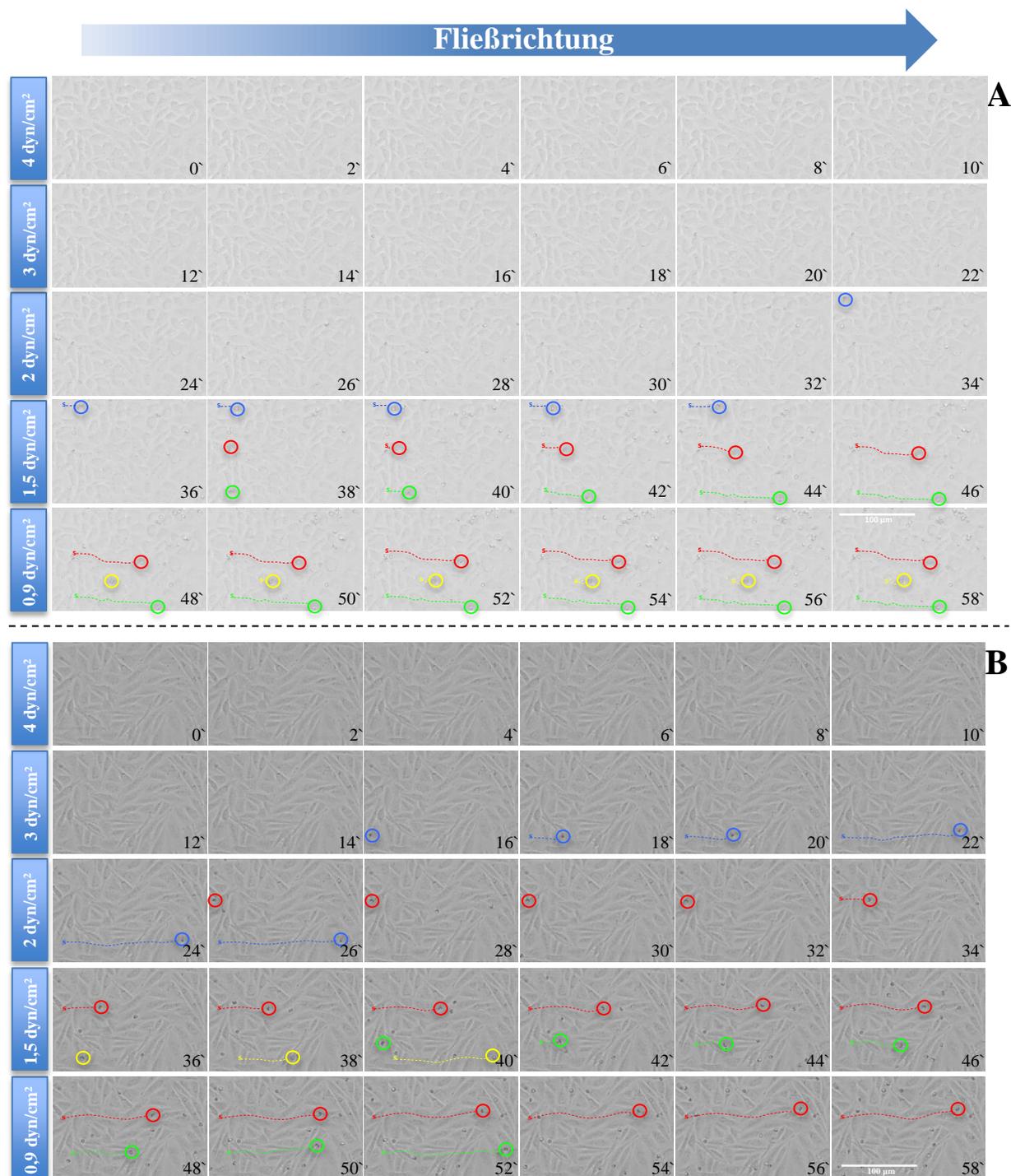


Abbildung 15: Bindungsverhalten von PfIE an transgene CHO-CD36 Zellen unter Flussbedingungen. Die Darstellung eines der biologischen Replikate des Experimentes zeigt das Bindungsverhalten von IT4-PfIE (A) und 3D7-PfIE (B) an transgene CHO-Zellen, die den humanen Endothelrezeptor CD36 auf der Oberfläche tragen, unter unterschiedlichen Scherkräften. Nach der Bindung zeigten ca. 75 – 90 % der PfIE beider Stämme eine rollende Bewegung über die CHO-CD36 Zellen. Die rollende Bewegung konnte unter unterschiedlichen Scherkräften, u. a. auch unter physiologischer Scherkraft (0,9 dyn/cm²) beobachtet werden. Die farbigen Kreise zeigen einzelne PfIE. Jede Farbe markiert eine unterschiedliche Zelle. Das „s“ markiert den Startpunkt der Bindung für die jeweilige Zelle. Die Zeitreihe zeigt eine Aufnahme alle zwei Minuten (0' - 58'). Längenmaßstab: 100 µm.

Erste Untersuchungen zur Dynamik der Interaktion zwischen *PfiE* und Endothelzellrezeptoren zeigten starke Unterschiede beim Verhalten der Bindung zwischen den Rezeptoren CD36 und ICAM-1.

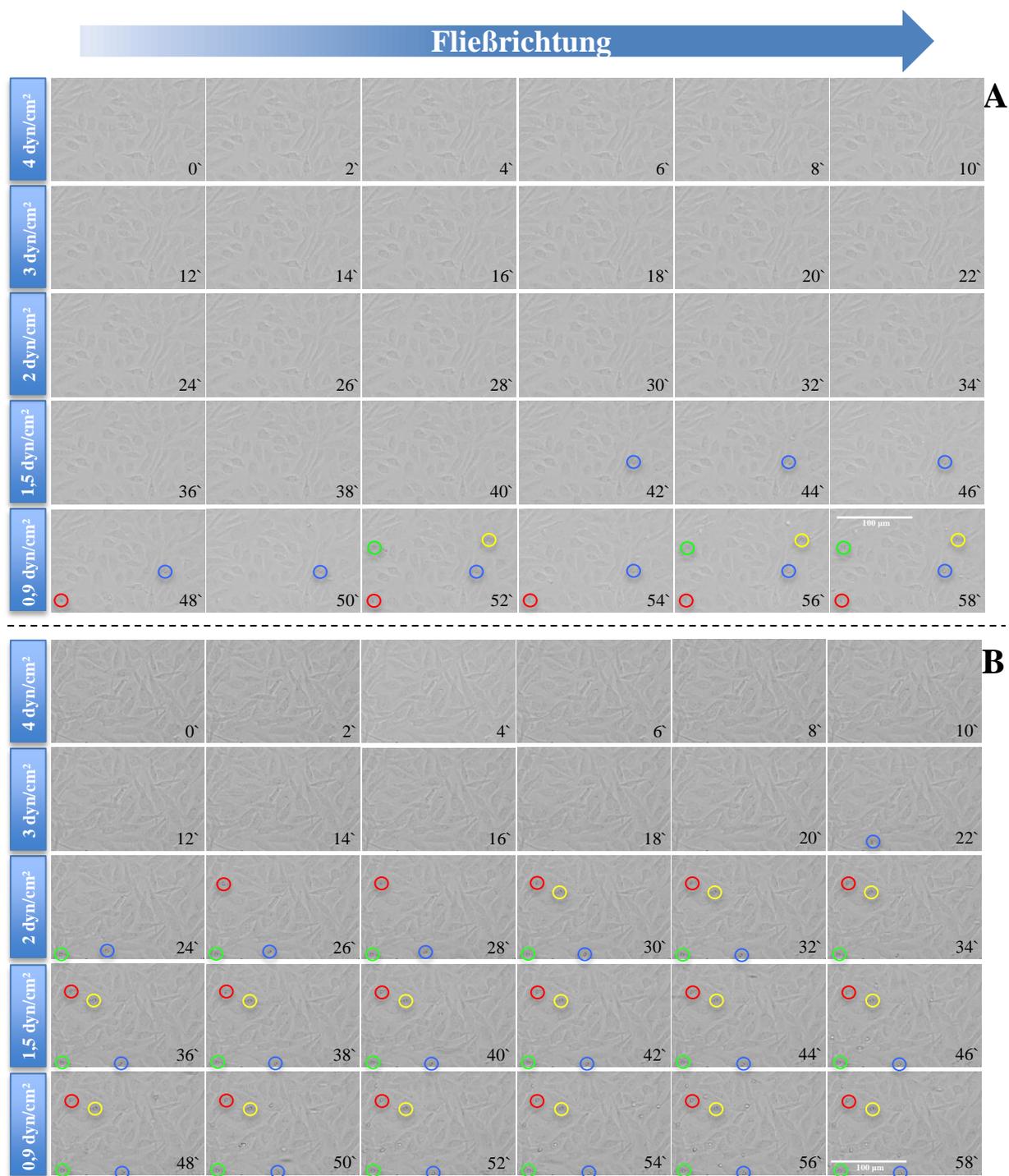


Abbildung 16: Bindungsverhalten von ICAM-1 angereicherten *PfiE* an transgene CHO-ICAM-1 Zellen unter Flussbedingungen. Die Darstellung eines der biologischen Replikate des Experimentes zeigt das Bindungsverhalten von ICAM-1 angereicherten IT4-*PfiE* (A) und 3D7-*PfiE* (B) an transgene CHO-Zellen, die den humanen Endothelrezeptor ICAM-1 auf der Oberfläche tragen, unter unterschiedlichen Scherkräften. Nach der Bindung zeigten die *PfiE* beider Stämme eine statische Bindung an die CHO-ICAM-1 Zellen an. Die farbigen Kreise zeigen einzelne *PfiE*. Jede Farbe markiert eine unterschiedliche Zelle. Die Zeitreihe zeigt eine Aufnahme alle zwei Minuten (0' - 58'). Längenmaßstab: 100 µm.

So zeigten die *PfiE* beider Stämme eine rollende Bewegung unter unterschiedlichen Scherkräften auf CHO-CD36 (Siehe Abb. 15), während auf CHO-ICAM-1 eine statische Bindung beobachtet werden konnte (Siehe Abb. 16).

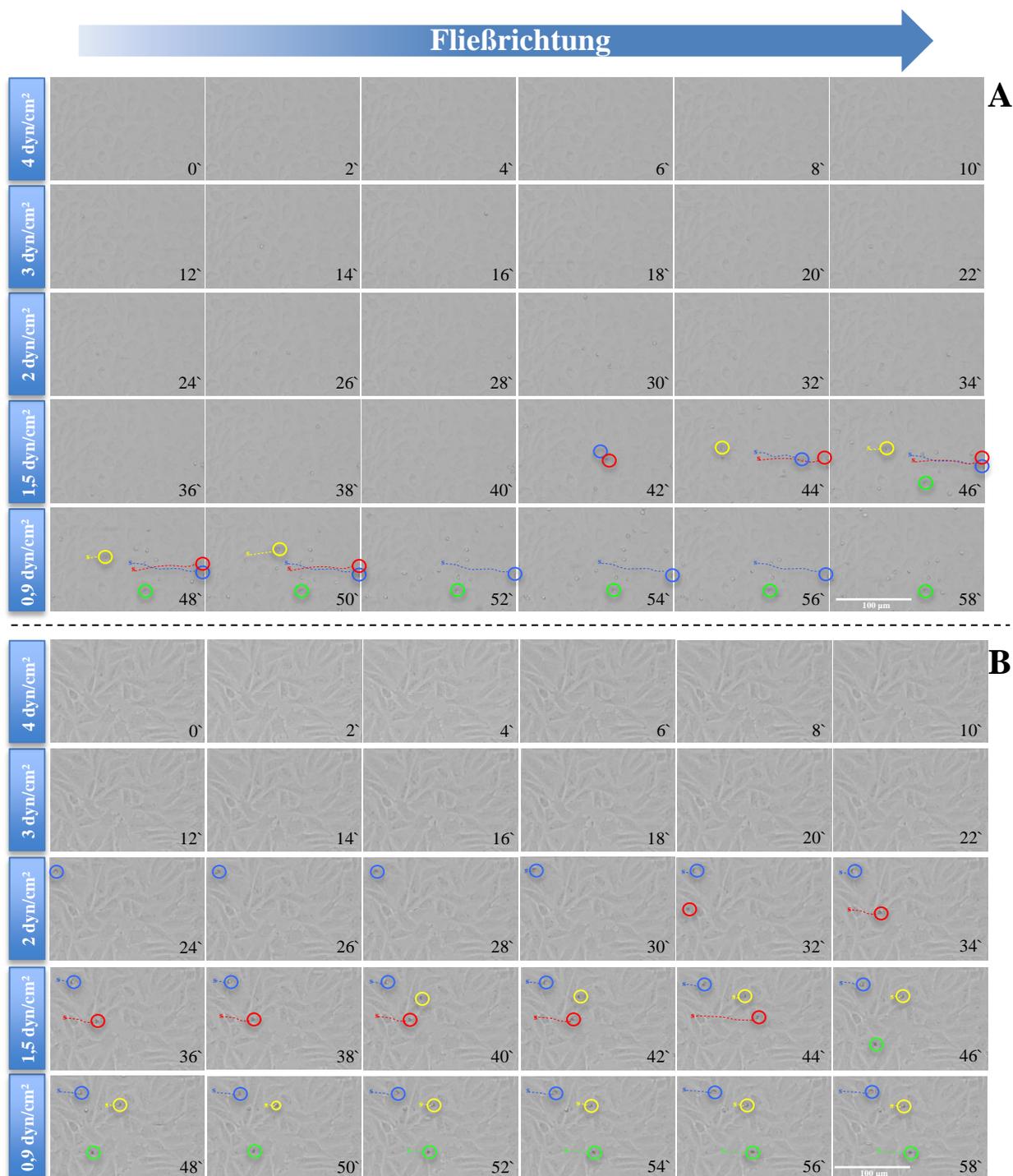


Abbildung 17: Bindungsverhalten von ICAM-1 angereicherten *PfiE* an transgene CHO-CD36 Zellen unter Flussbedingungen. Die Darstellung eines der biologischen Replikate des Experimentes zeigt das Bindungsverhalten von ICAM-1 angereicherten IT4-*PfiE* (A) und 3D7-*PfiE* (B) an transgene CHO-Zellen, die den humanen Endothelrezeptor CD36 auf der Oberfläche tragen, unter unterschiedlichen Scherkräften. Nach der Bindung zeigten ca. 75 – 90 % der *PfiE* beider Stämme eine rollende Bewegung über die CHO-CD36 Zellen. Die rollende Bewegung konnte unter unterschiedlichen Scherkräften, u. a. auch unter physiologischer Scherkraft (0,9 dyn/cm²) beobachtet werden. Die farbigen Kreise zeigen einzelne *PfiE*. Jede Farbe markiert eine unterschiedliche Zelle. Das „s“ markiert den Startpunkt der Bindung für die jeweilige Zelle. Die Zeitreihe zeigt eine Aufnahme alle zwei Minuten (0' - 58'). Längenmaßstab: 100 µm.

Da für die Untersuchung der Interaktion mit ICAM-1, im Gegensatz zu der Untersuchung an CD36, eine Anreicherung der *PfiE* erforderlich war, wurde das Experiment ebenfalls mit ICAM-1 angereicherten *PfiE* auf CHO-CD36 durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Anreicherung einen Einfluss auf das Bindungsverhalten hat.

Ähnlich wie bei den ersten Versuchen, konnte auch in diesem Fall für beide Laborstämme eine rollende Bewegung der *PfiE* über die CHO-CD36 Zellen nachgewiesen werden. Das Verhalten wurde erneut bei unterschiedlichen Scherkräften beobachtet (Siehe Abb. 17).

In weiteren Kontrollversuchen wurde die Interaktion mit CD36 angereicherten *PfiE* sowohl in einer Interaktion mit CHO-CD36 als auch mit CHO-ICAM-1 untersucht, um einen möglichen Effekt einer Anreicherung auf CD36 ausschließen zu können. Es konnten keine Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen den Rezeptoren beobachtet werden. Es konnte erneut eine rollende Bewegung der *PfiE* bei beiden Stämmen auf CHO-CD36 beobachtet werden, während bei der Interaktion mit CHO-ICAM-1 ausschließlich statische Bindungen beobachtet werden konnten (Siehe Anhang E).

3.2.1 Verhaltensunterschiede bei der Interaktion zwischen *PfiE* und den Rezeptoren CD36 und ICAM-1 unter (mikrovaskulär-) physiologischer Scherkraft

Eine der Hauptursache für die Pathogenität der schweren Form der Malaria ist die Adhäsion der infizierten Erythrozyten an die Endothelzellen des mikrovaskulären Gefäßsystems (Udeinya *et al.*, 1981; Howard und Gilladoga, 1989; Berendt *et al.*, 1990; Cooke *et al.*, 1994). Aus diesem Grund ist es wichtig die Interaktion zwischen *PfiE* und Endothelrezeptoren unter mikrovaskulär-physiologischen Bedingungen genauer zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde das Verhalten der Bindung bei einer Scherkraft von $0,9 \text{ dyn/cm}^2$ genauer analysiert. Diese Scherkraft wird als Durchschnittswert für die, in den Kapillaren vorhandene Scherkraft, angenommen und wurde bereits in anderen Studien verwendet (Rieger *et al.*, 2014; Bernabeu *et al.*, 2014; Oh *et al.*, 2015).

Anhand der mikroskopischen Aufnahmen wurden ca. 20 *PfiE* pro biologisches Replikat mittels einer Software (ImageJ - Version 1.48V) zehn Minuten lang verfolgt und somit die akkumulierte Distanz der einzelnen gebundenen *PfiE* ermittelt.

Die Versuche wurden in drei biologischen Replikaten (Exp. 1 - 3) durchgeführt, die keine abnormalen Abweichungen voneinander aufwiesen (Siehe Abb. 18).

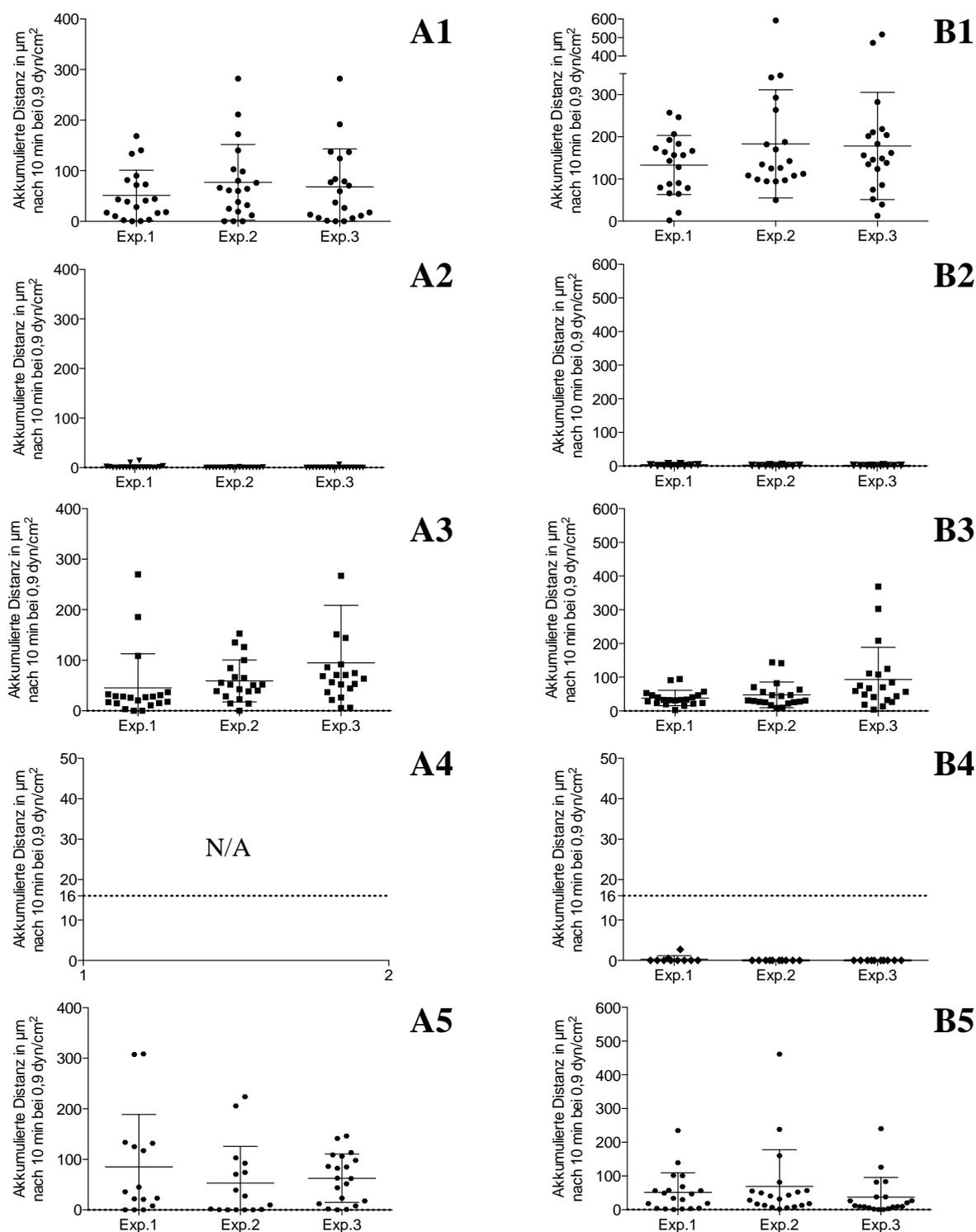


Abbildung 18: Akkumulierte Distanz der *PfiE* auf unterschiedlichen transgenen CHO-Zelllinien nach zehn Minuten bei einer Scherkraft von 0,9 dyn/cm². Die Abbildung zeigt die akkumulierte Distanz in µm der *PfiE* der Laborstämme IT4 (A1-5) und 3D7 (B1-5) auf transgene CHO-Zelllinien, die entweder den humanen Endothelrezeptor CD36 oder ICAM-1 auf der Zelloberfläche trugen. Die akkumulierte Distanz wurde durch die Verfolgung von einzelnen *PfiE* für zehn Minuten unter einer mikrovaskulär-physiologischen Scherkraft von 0,9 dyn/cm² ermittelt. **A1:** IT4-*PfiE* nicht-angereichert auf CHO-CD36; **B1:** 3D7-*PfiE* nicht-angereichert auf CHO-CD36; **A2:** IT4-*PfiE*-ICAM-1 angereichert auf CHO-ICAM-1; **B2:** 3D7-*PfiE*-ICAM-1 angereichert auf CHO-ICAM-1; **A3:** IT4-*PfiE*-ICAM-1 angereichert auf CHO-CD36; **B3:** 3D7-*PfiE*-ICAM-1 angereichert auf CHO-CD36; **A4:** IT4-*PfiE*-CD36 angereichert auf CHO-ICAM-1 (N/A: Nicht ausgewertet); **B4:** 3D7-*PfiE*-CD36 angereichert auf CHO-ICAM-1; **A5:** IT4-*PfiE*-CD36 angereichert auf CHO-CD36; **B5:** 3D7-*PfiE*-CD36 angereichert auf CHO-CD36. Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ - Version 1.48V.

Die Ergebnisse der CD36-angereicherten IT4-*PfiE* auf CHO-ICAM-1 sind hier nicht dargestellt, da pro Experiment lediglich zwei bis drei gebundene *PfiE* nach Beendigung des Versuches identifiziert werden konnten. Interessanterweise konnten beim Stamm 3D7 im gleichen Ansatz 10 - 18 *PfiE* pro biologischem Replikat ausgewertet werden. Wie bei allen bisherigen Versuchen war die Adhäsion an ICAM-1 statisch (Siehe Abb. 18, B4). Für einen besseren Vergleich zwischen den Ansätzen, wurden die Werte der einzelnen Replikate zusammengefügt ($n = 60$) und im Vergleich zu den anderen Versuchen dargestellt (Siehe Abb. 19).

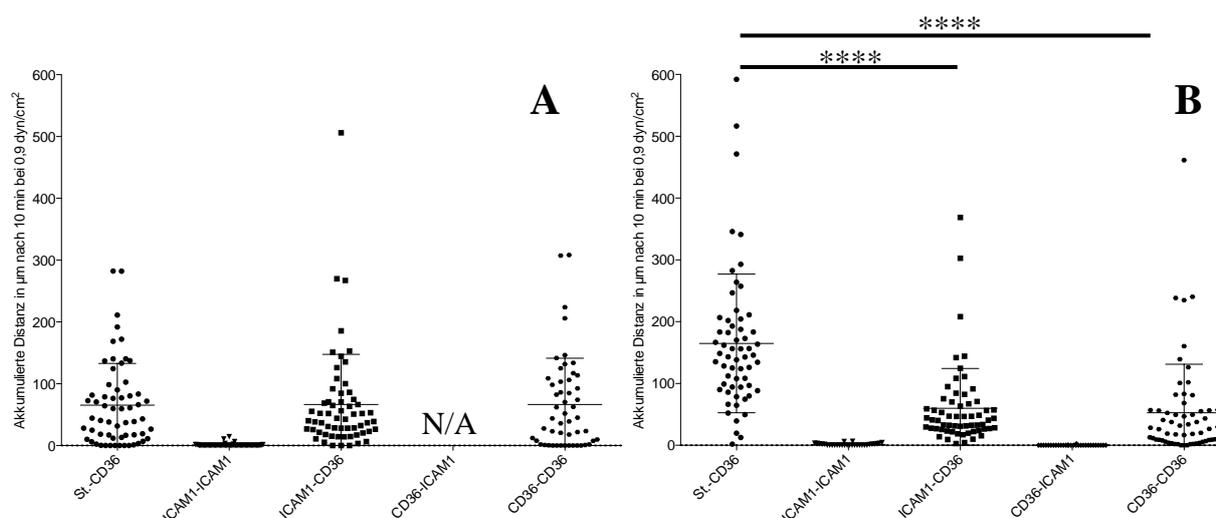


Abbildung 19: Akkumulierte Distanz der *PfiE* auf unterschiedlichen transgenen CHO-Zelllinien nach zehn Minuten bei einer Scherkraft von 0,9 dyn/cm². Die Abbildung zeigt einen Vergleich zwischen den akkumulierten Distanzen in μm der *PfiE* der Laborstämme IT4 (A) und 3D7 (B) auf transgene CHO-Zelllinien, die entweder den humanen Endothelrezeptor CD36 oder ICAM-1 auf der Zelloberfläche trugen. Die akkumulierte Distanz wurde durch die Verfolgung von einzelnen *PfiE* für zehn Minuten unter einer mikrovaskulär-physiologischen Scherkraft von 0,9 dyn/cm² ermittelt und ist hier in μm dargestellt. **A:** IT4-*PfiE* nicht-angereichert auf CHO-CD36; IT4-*PfiE*-ICAM-1 angereichert auf CHO-ICAM-1; IT4-*PfiE*-ICAM-1 angereichert auf CHO-CD36; IT4-*PfiE*-CD36 angereichert auf CHO-ICAM-1 (N/A: Nicht ausgewertet); IT4-*PfiE*-CD36 angereichert auf CHO-CD36; **B:** 3D7-*PfiE* nicht angereichert auf CHO-CD36; 3D7-*PfiE*-ICAM-1 angereichert auf CHO-ICAM-1; 3D7-*PfiE*-ICAM-1 angereichert auf CHO-CD36; 3D7-*PfiE*-CD36 angereichert auf CHO-ICAM-1; 3D7-*PfiE*-CD36 angereichert auf CHO-CD36. Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ - Version 1.48V.

Die Darstellung zeigt erneut deutlich den Unterschied beim Bindungsverhalten der *PfiE* an die Rezeptoren CD36 und ICAM-1. Interessanterweise zeigte der 3D7-Stamm (nicht angereichert) nach zehn Minuten eine akkumulierte Distanz von ca. 165 μm im Schnitt auf CHO-CD36, während beim IT4-Stamm eine akkumulierte Distanz von ca. 65 μm im Schnitt beobachtet werden konnte (Siehe Abb. 19). Die Ergebnisse zeigen auch, dass die *PfiE* beider untersuchten Laborstämme nach einer Anreicherung auf CHO-ICAM-1 immer noch in der Lage waren an CHO-CD36 zu adhären. Interessant dabei war allerdings eine signifikante Reduzierung der akkumulierten Distanz beim 3D7-Stamm von 165 μm auf ca. 60 μm nach der Anreicherung ($p \leq 0,0001$). Diese war ebenfalls zwischen der nicht-angereicherten und

der CD36 angereicherten Populationen bei der Bindung auf CHO-CD36 zu erkennen (Siehe Abb. 19B). Im Vergleich dazu blieb der Durchschnitt der akkumulierten Distanz in diesem Fall beim IT4-Stamm zwischen den beiden Ansätzen ähnlich (ca. 65 μm), wobei dieser, wie bereits oben erwähnt, im Vergleich zu der akkumulierten Distanz der nicht-angereicherten 3D7-Stamm auf CHO-CD36 geringer war.

Die zusätzlichen Kontrollversuche mit den CD36 angereicherten Laborstämmen bei der Bindung an CHO-CD36 ergaben ähnliche Ergebnisse für beide Stämme. Beide zeigten eine ähnliche akkumulierte Distanz wie schon die ICAM-1 angereicherten bei der Bindung an CHO-CD36. Auffällig war allerdings eine größere Streuung zwischen den einzelnen Werten im Vergleich zu den Werten nach der Anreicherung an ICAM-1. Bei dem Ansatz „IT4-CD36 angereichert auf CHO-CD36“ konnten nur 51 infizierte Zellen ausgewertet werden.

3.2.2 Expressionsprofil der *var*-Gene vor und nach Anreicherung an ICAM-1 und CD36

Hauptverantwortlich für die Zytoadhäsion von *P. falciparum* infizierten Erythrozyten an Endothelzellrezeptoren sind die PfEMP1, welche von 60 unterschiedlichen *var*-Genen kodiert werden (Su *et al.*, 1995; Kyes *et al.*, 2001; Kraemer und Smith 2006). Ein Parasit exprimiert ein einziges *var*-Gen pro Zyklus, was dazu führt, dass in jedem infizierten Erythrozyten nur eine Variante des PfEMP1 vorkommt (Chen *et al.*, 1998; Scherf *et al.*, 1998; Kyes *et al.*, 2003; Horrocks *et al.*, 2004; Fastman *et al.*, 2012). Die PfEMP1 besitzen bestimmte Domänen oder Domänenkassetten, die die Bindung an bestimmten Endothelrezeptoren vermitteln (Siehe Punkt 1.5.1.2). Um ein Expressionsprofil der *var*-Gene der in dieser Studie verwendeten Parasitenpopulationen zu erstellen, wurde eine Transkriptom-Analyse mittels NGS (engl. *next generation sequencing*) durchgeführt. Das Ziel war, durch das Expressionsprofil der durch Anreicherung an CD36 und ICAM-1 generierten Parasitenpopulationen, putative PfEMP1-Kandidaten zu identifizieren, die für die Interaktion mit dem jeweiligen Endothelrezeptor verantwortlich sind. Die Transkriptome der nicht-angereicherten Laborstämme IT4 und 3D7 dienten als Kontrolle. Die *var*-Expressionsprofile, der durch die Anreicherung an ICAM-1 und CD36 erhaltenen Parasitenpopulationen unterschieden sich stark von den *var*-Expressionsprofilen der nicht-angereicherten Parasitenpopulationen bei beiden Laborstämmen (Siehe Abb. 20 - 23). Die IT4-ICAM-1 angereicherte Population zeigte fünf Gene, die nach der Anreicherung signifikant stärker vorhanden waren, im Vergleich zur Kontrolle. Diese waren IT4_var06 ($\text{padj} \leq 0,001$),

IT4_var41, IT4_var16 und IT4_var63 ($\text{padj} \leq 0,0001$) der Gruppe B und IT4_var01 ($\text{padj} \leq 0,0001$) der Gruppe C (Siehe Abb. 20).

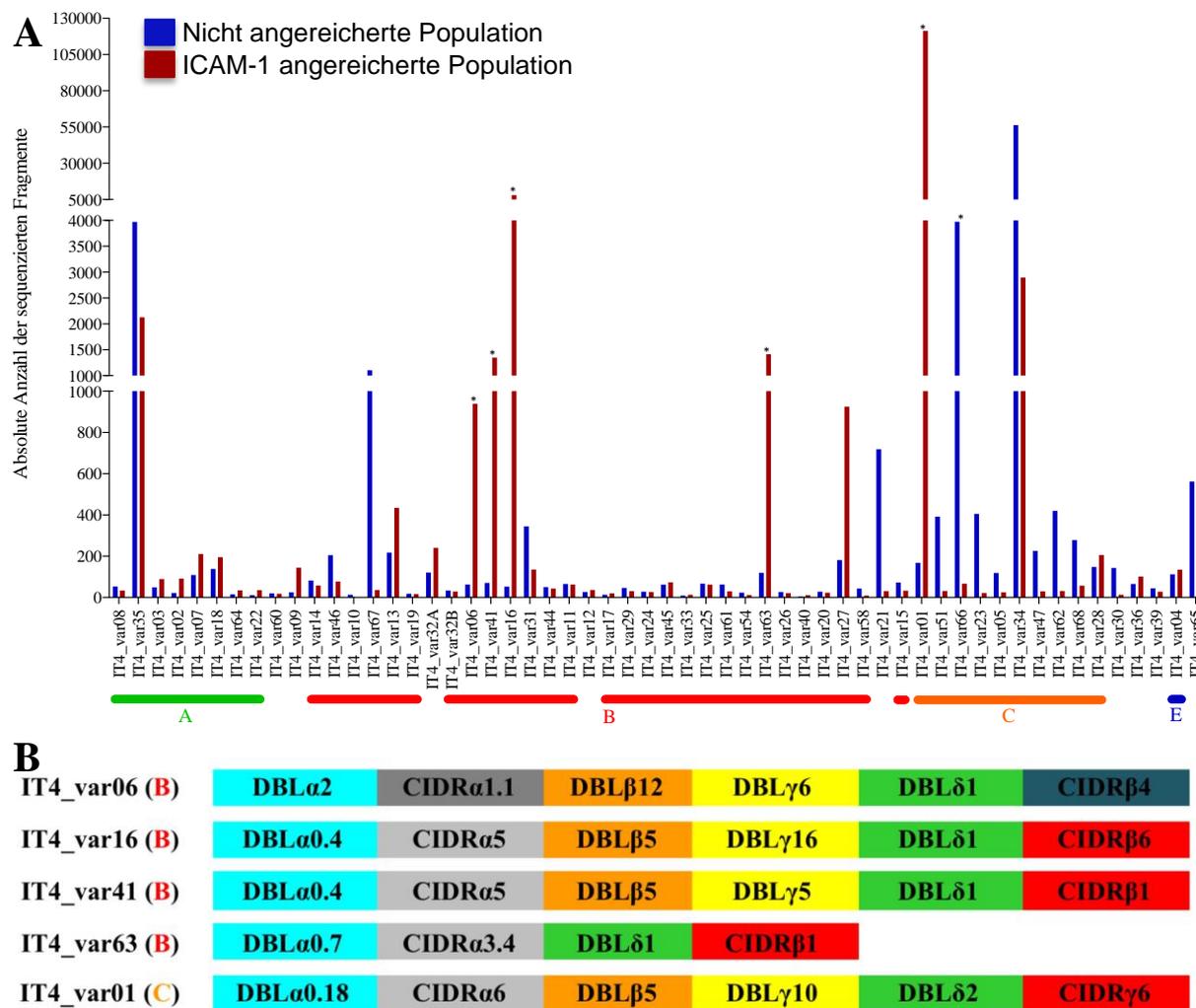


Abbildung 20: Expressionsprofil der var-Gene der nicht-angereicherten und der ICAM-1-angereicherten IT4 *P. falciparum*-Populationen. A: Die Graphik stellt das Expressionsprofil der var-Gene für zwei Populationen vom IT4-Stamm im Ringstadium dar. In blau, das Expressionsprofil der nicht-angereicherten Population und in rot, das Expressionsprofil der ICAM-1 angereicherten Population. Die var-Gene sind in vier unterschiedliche Gruppen aufgeteilt (A, B, C und E). Die sequenzierten Fragmente wurden mit dem Transkriptom von *P. falciparum* mittels Bowtie 2 angeglichen und die differenzielle Expression mit Hilfe von DEseq analysiert. Die Gen-Ontologie wurde PlasmoDB28 entnommen. *: Signifikanz. Der p -Wert wurde mittels Benjamini Hochberg mit einer FDR von 10 % korrigiert. B: Domänenstruktur der PfEMP1 für die IT4-ICAM-1 angereicherte Parasiten-Population. Schematische Darstellung der Domänenstruktur der PfEMP1, die von den var-Genen IT4_var06, IT4_var16, IT4_var41, IT4_var63 (Gruppe B) und IT4_var01 (Gruppe C) kodiert werden. Die fünf var-Gene waren nach Anreicherung auf ICAM-1 signifikant stärker vorhanden als bei der nicht-angereicherten Population (Kontrolle). Die Klassifizierung in den Gruppen A-E sowie die Domänenstrukturen wurden Rask *et al.*, 2010 entnommen.

Von den fünf var-Genen, die bei der IT4-ICAM-1 Population stärker exprimiert waren, kodieren drei für PfEMP1 (IT4_var16, IT4_var41 (Gruppe B) und IT4_var01 (Gruppe C)), die in ihrem extrazellulären Teil eine bekannte Bindungsdomäne für die Bindung an ICAM-1 (DBL β 5) aufweisen. Vier der fünf Gene (IT4_var16, IT4_var41, IT4_var63 (Gruppe B) und IT4_var01 (Gruppe C)) kodieren für Proteine die eine CD36-spezifische Bindungsdomäne

aufweisen (Kopfstruktur: DBL α 0-CIDR2-6). Eines der Gene (IT4_var06) kodiert für ein Protein, das interessanterweise weder eine bekannte Bindungsdomäne für ICAM-1 noch für CD36 aufweist (Siehe Abb. 20B). Auch die Anreicherung des 3D7-Stammes auf ICAM-1 zeigte ein verändertes *var*-Expressionsprofil im Vergleich zu der nicht-angereicherten Parasitenpopulation (Kontrolle).

Die *var*-Gene PFL0020w der Gruppe A/B und MAL6P1.252 der Gruppe C wurden innerhalb der angereicherten Population als signifikant stärker exprimiert detektiert ($p_{adj} \leq 0,0001$) (Siehe Abb. 21).

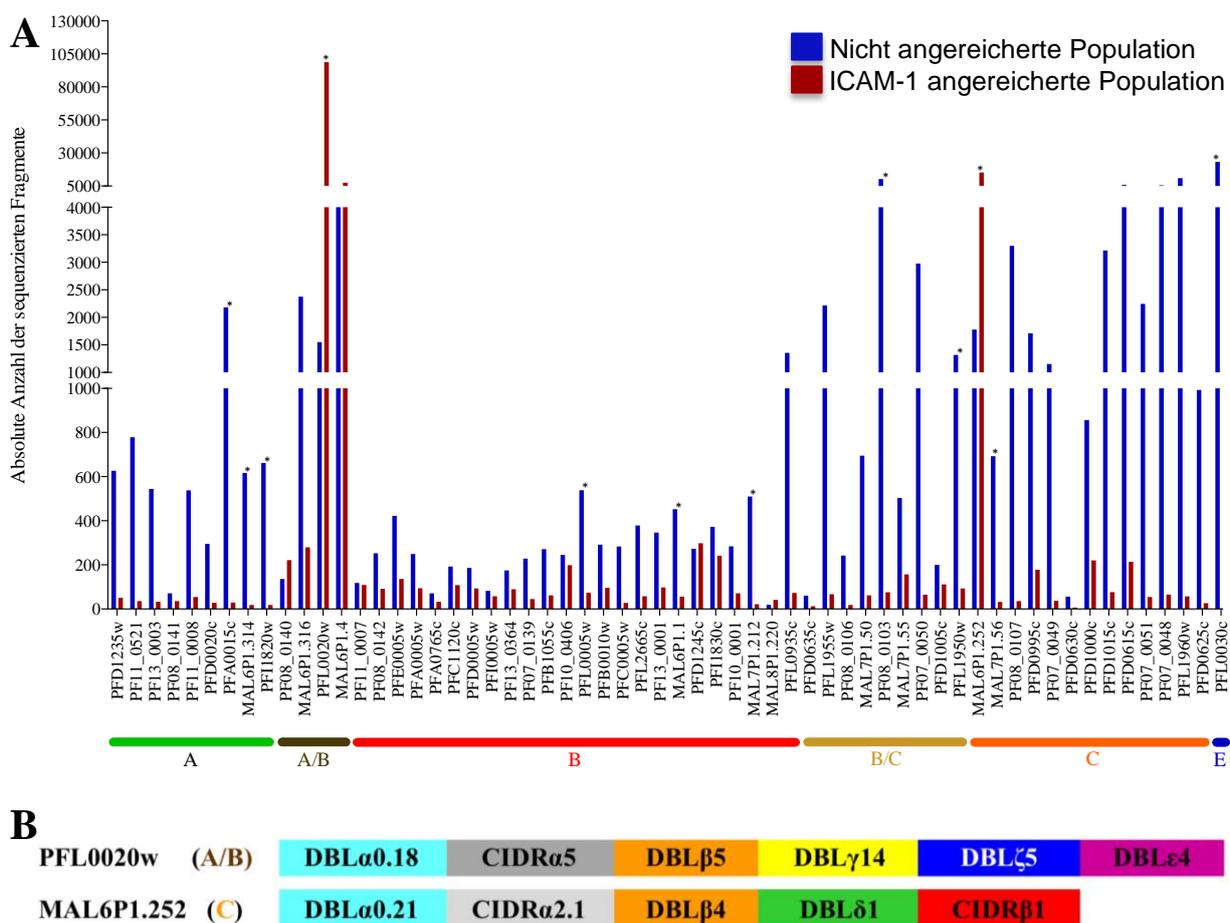


Abbildung 21: Expressionsprofil der *var*-Gene der nicht-angereicherten und ICAM-1-angereicherten 3D7 *P. falciparum*-Populationen. **A:** Die Graphik stellt das Expressionsprofil der *var*-Gene für zwei Populationen vom 3D7-Stamm im Ringstadium dar. In blau, das Expressionsprofil der nicht-angereicherte Population und in rot, das Expressionsprofil der ICAM-1 angereicherten Population. Die *var*-Gene sind in vier unterschiedlichen Hauptgruppen (A, B, C und E) und zwei Zwischengruppen (A/B und B/C) unterteilt. Die sequenzierten Fragmente wurden mit dem Transkriptom von *P. falciparum* mittels Bowtie 2 angeglichen und die differenzielle Expression mit Hilfe von DEseq analysiert. Die Gen-Ontologie wurde PlasmoDB 28 entnommen. *: Signifikanz. Der *p*-Wert wurde mittels Benjamini Hochberg mit einer FDR von 10 % korrigiert. **B: Domänenstruktur der PfEMP1 für 3D7-ICAM-1 angereicherte Parasiten-Population.** Schematische Darstellung der Domänenstruktur der PfEMP1, die von den *var*-Genen PFL0020w (Gruppe A/B) und MAL6P1.252 (Gruppe C) kodiert werden. Beide *var*-Gene sind nach Anreicherung auf ICAM-1 signifikant stärker vorhanden als bei der nicht-angereicherten Population (Kontrolle). Die Klassifizierung in den Gruppen A-E sowie die Domänenstrukturen wurden Lavstsen *et al.*, 2003 und Rask *et al.*, 2010 entnommen.

Das Gen PFL0020w kodiert für ein *PfEMP1*, das in seinem extrazellulären Bereich die ICAM-1-spezifische Bindungsdomäne DBLβ5 sowie die CD36-spezifische Domäne DBLα0.18-CIDRα5 aufweist.

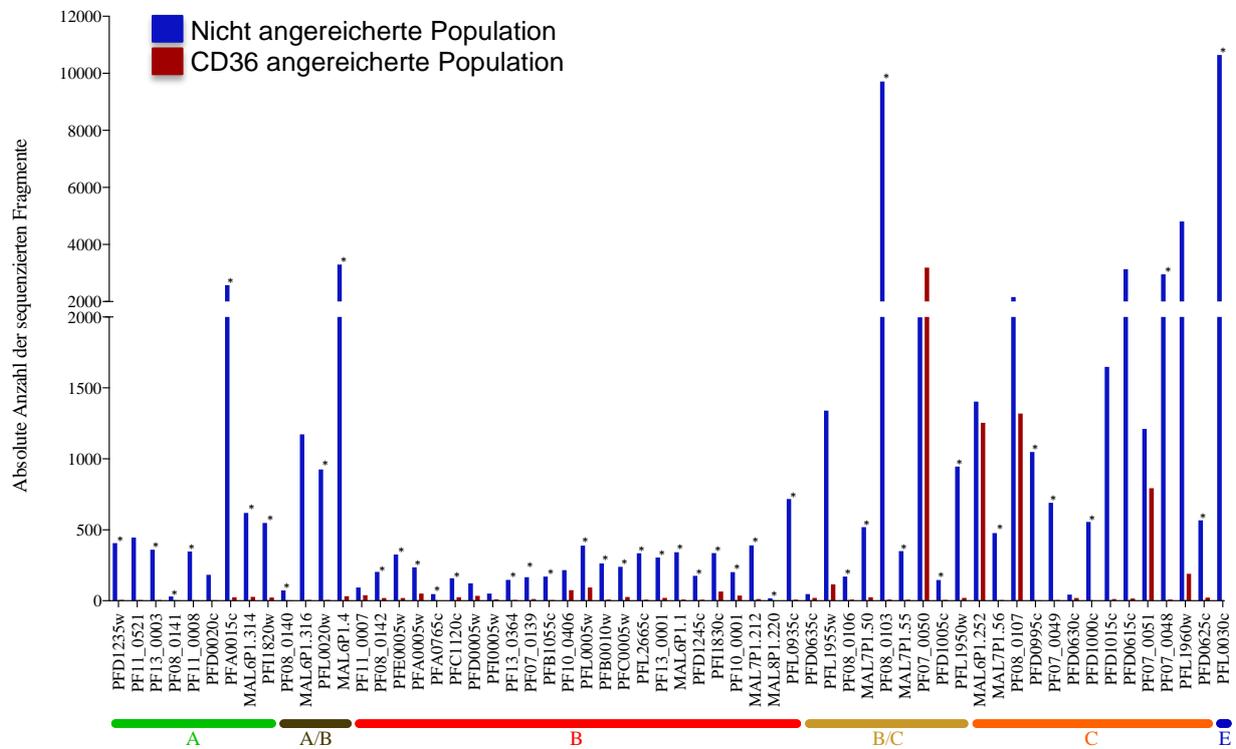


Abbildung 22: Expressionsprofil der var-Gene der nicht-angereicherten und CD36-angereicherten 3D7 *P. falciparum*-Populationen. A: Die Graphik stellt das Expressionsprofil der var-Gene für zwei Populationen vom 3D7-Stamm im Ringstadium dar. In blau, das Expressionsprofil der nicht-angereicherten Population und in rot, das Expressionsprofil der CD36 angereicherten Population. Die var-Gene sind in vier unterschiedlichen Hauptgruppen (A, B, C und E) und zwei Zwischengruppen (A/B und B/C) unterteilt. Die sequenzierten Fragmente wurden mit dem Transkriptom von *P. falciparum* mittels Bowtie 2 angeglichen und die differenzielle Expression mit Hilfe von DEseq analysiert. Die Gen-Ontologie wurde PlasmoDB28 entnommen. *: Signifikanz. Der *p*-Wert wurde mittels Benjamini Hochberg mit einer FDR von 10 % korrigiert. Die Klassifizierung in den Gruppen A-E wurden Lavstsen *et al.*, 2003 und Rask *et al.*, 2010 entnommen.

Das Gen MAL6P1.252 kodiert für ein *PfEMP1*, das eine Bindungsdomäne für CD36 (Kopfstruktur: DBLα0.21-CIDRα2.1) aufweist aber interessanterweise keine bekannte Bindungsdomäne für eine Bindung an ICAM-1 besitzt. Das Gen MAL6P1.4 zeigte sowohl bei der nicht-angereicherten als auch bei der ICAM-1-angereicherten Population ein hohes Expressionslevel. Das Protein, welches von MAL6P1.4 kodiert wird, weist die ICAM-1-spezifische Bindungsdomäne DBLβ5 sowie die CD36-spezifische Domäne DBLα0.8-CIDRα3.2 auf. Anders als bei den ICAM-1-angereicherten Populationen zeigte das Expressionsprofil der CD36-angereicherten Populationen bei beiden Stämmen kein einziges var-Gen, das signifikant stärkerer exprimiert war im Vergleich zur Kontrolle.

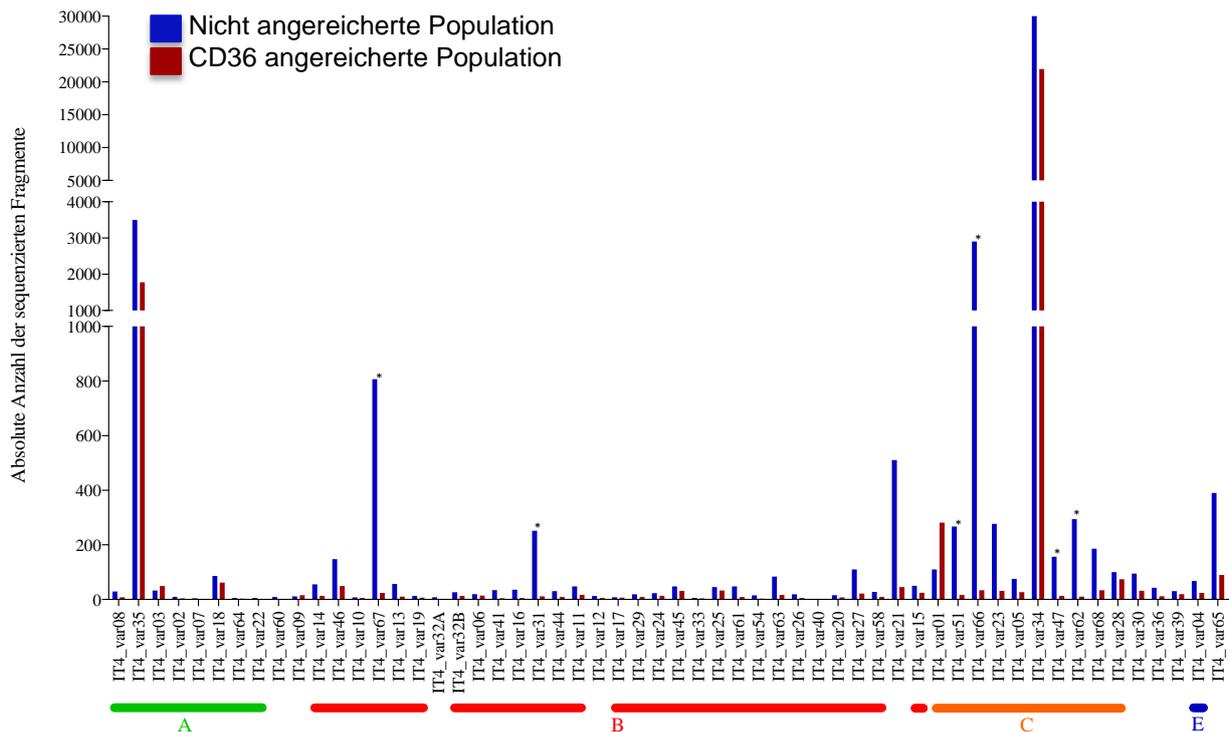


Abbildung 23: Expressionsprofil der *var*-Gene der nicht-angereicherten und der CD36-angereicherten IT4 *P. falciparum*-Populationen. A: Die Graphik stellt das Expressionsprofil der *var*-Gene für zwei Populationen vom IT4-Stamm im Ringstadium dar. In blau, das Expressionsprofil der nicht-angereicherten Population und in rot, das Expressionsprofil der CD36 angereicherten Population. Die *var*-Gene sind in vier unterschiedlichen Gruppen aufgeteilt (A, B, C und E). Die sequenzierten Fragmente wurden mit dem Transkriptom von *P. falciparum* mittels Bowtie 2 angeglichen und die differenzielle Expression mit Hilfe von DEseq analysiert. Die Gen-Ontologie wurde PlasmoDB28 entnommen. *: Signifikanz. Der *p*-Wert wurde mittels Benjamini Hochberg mit einer FDR von 10 % korrigiert. Die Klassifizierung in den Gruppen A-E wurden Rask *et al.*, 2010 entnommen.

Lediglich das Gen *IT4_var01* beim IT4-Stamm und das Gen *PF07_0050* beim 3D7-Stamm zeigten ein minimal stärkeres Vorkommen nach der Anreicherung (Siehe Abb. 22 und 23). Im Gegensatz dazu zeigten die meisten *var*-Gene eine Reduktion des Vorkommens bei den angereicherten Populationen im Vergleich zu den nicht angereicherten. Diese Reduktion war vor allem beim 3D7-Stamm eindeutig zu beobachten. Hier zeigten 45 der 60 *var*-Gene eine signifikante Abnahme der Anzahl an sequenzierten Fragmenten innerhalb der Population im Vergleich zur Kontrolle ($\text{padj} \leq 0,05$).

Des Weiteren konnte sowohl bei IT4 als auch bei 3D7 beobachtet werden, dass die Anzahl der sequenzierten Fragmente einiger stark exprimierten *var*-Gene keine großen Veränderungen zwischen angereicherten und nicht-angereicherten Populationen aufwiesen. Bei IT4 waren es *IT4_var35* und *IT4_var34*. Dieses Verhalten konnte im Expressionsprofil der ICAM-1 angereicherten Population im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls beobachtet werden. *IT4_var34* kodiert für ein *PfEMP1*, das eine CD36-spezifische Bindungsdomäne aufweist, aber das Protein, welches vom Gen *IT4_var35* kodiert wird, weist weder für CD36 noch für ICAM-1 eine spezifische Bindungsdomäne auf. Bei 3D7 waren es *MAL6P1.252*,

PF08_0107 und PF07_0051, die keine starke Veränderung zeigten, was allerdings anders als bei IT4 nicht im Expressionsprofil der ICAM-1 angereicherten Population beobachtet wurde. Alle drei *var*-Gene kodieren für Proteine, die eine CD36-spezifische Bindungsdomäne besitzen (Siehe Anhang D).

3.3 Charakterisierung der Interaktion von *PfiE* mit den Endothelrezeptoren CD9 und P-Selektin

Im Rahmen dieser Studie wurden ebenfalls Bindungsexperimente unter Flussbedingungen mit den Endothelrezeptoren CD9 und P-Selektin durchgeführt, um auch für diese Rezeptoren die Interaktion mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten zu charakterisieren. Die Analyse erfolgte hier genauso, wie bereits für die Experimente mit den Rezeptoren CD36 und ICAM-1 beschrieben.

Bei der Bindung an CHO-CD9 konnte für beide Laborstämme im Vergleich zu der Bindung an ICAM-1 oder P-Selektin eine etwas lockere Bindung beobachtet werden. Die Mehrheit der gebundenen *PfiE* zeigte zwar keine rollende Bewegung. Allerdings konnte bei einigen Zellen eine 180° Wendung (engl. *flipping*) (Siehe Punkt 1.5) beobachtet werden, wo die *PfiE* eine akkumulierte Distanz von ca. 10 bis 16 μm nach 10-minütiger Verfolgung erreichten (Siehe Abb. 24). Hierfür ist es wichtig zu erwähnen, dass eine definierte Distanz von 16 μm festgelegt wurde, um die Art der Bewegung zwischen rollender und umklappender Bewegung zu unterscheiden.

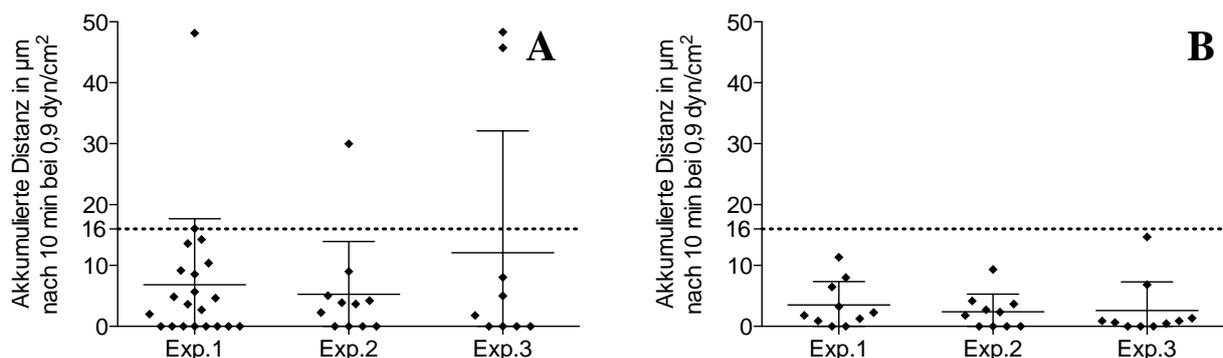


Abbildung 24: Akkumulierte Distanz der *PfiE* auf transgene CHO-CD9 nach zehn Minuten bei einer Scherkraft von 0,9 dyn/cm^2 . Die Abbildung zeigt die akkumulierte Distanz in μm der *PfiE* der Laborstämme IT4 (A) und 3D7 (B) auf eine transgene CHO-Zelllinie, die den humanen Endothelrezeptor CD9 auf der Zelloberfläche trug. Die akkumulierte Distanz wurde durch die Verfolgung von einzelnen *PfiE* für zehn Minuten unter einer mikrovasculär-physiologischen Scherkraft von 0,9 dyn/cm^2 ermittelt. **A:** IT4-*PfiE*-CD9 angereichert auf CHO-CD9; **B:** 3D7-*PfiE*-CD9 angereichert auf CHO-CD9. Die gestrichelte Linie markiert die festgelegte Distanz (16 μm), die die Grenze für die rollende Bewegung definiert. Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ - Version 1.48V.

Bei IT4 konnte bei vier von 41 ausgewerteten infizierten Erythrozyten eine rollende Bewegung beobachtet werden (Siehe Abb. 24A).

Es konnte, ähnliche wie bei der Bindung an ICAM-1, keine rollende Bewegung der *PfiE* auf P-Selektin beobachtet werden (Siehe Abb. 25).

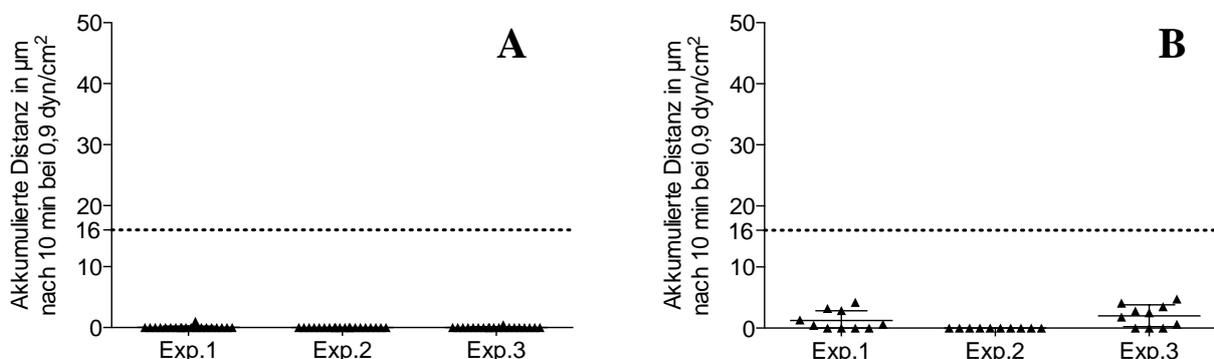


Abbildung 25: Akkumulierte Distanz der *PfiE* auf transgene CHO-P-Selektin nach zehn Minuten bei einer Scherkraft von 0,9 dyn/cm². Die Abbildung zeigt die akkumulierte Distanz in µm der *PfiE* der Laborstämme IT4 (A) und 3D7 (B) auf eine transgene CHO-Zelllinie, die den humanen Endothelrezeptor P-Selektin auf der Zelloberfläche trug. Die akkumulierten Distanzen wurden durch die Verfolgung von einzelnen *PfiE* für zehn Minuten unter einer mikrovaskulär-physiologischen Scherkraft von 0,9 dyn/cm² ermittelt. **A:** IT4-*PfiE*-P-Selektin angereichert auf CHO-P-Selektin; **B:** 3D7-*PfiE*-P-Selektin angereichert auf CHO-P-Selektin. Die gestrichelte Linie markiert die festgelegte Distanz (16 µm), die die Grenze für die rollende Bewegung definiert. Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ - Version 1.48V.

3.4 Charakterisierung der *Plasmodium vivax* VIR-Proteine

Die VIR-Proteine von *P. vivax*, sind Proteine, die von der *vir*-Multigenfamilie kodiert werden. Es wird postuliert, dass sie ähnliche Funktionen wie die *PfEMP1* Moleküle von *P. falciparum* (z. B. Antigenvariation oder Zytoadhäsion) übernehmen. Lange Zeit wurde angenommen, dass *P. vivax* nicht in der Lage wäre zu zytoadhäreren. Allerdings konnten Fälle schwerer *P. vivax*-Infektionen beobachtet werden, was auf eine Beteiligung der Zytoadhäsion an der Pathologie hindeutet (Kochar *et al.*, 2005; Anstey *et al.*, 2007). Weiterhin konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass *P. vivax* in der Lage ist an Endothelzellen zu adhäreren und dass die VIR-Proteine bei dieser Funktion höchstwahrscheinlich eine Rolle spielen (Ansari *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Bernabeu *et al.*, 2012; De las Salas *et al.*, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung der *Plasmodium vivax* VIR-Proteine durchgeführt. Hierbei wurde der Focus auf die Identifizierung von VIR-Proteinen gelegt, die an die Erythrozytenmembran exportiert werden und somit in den Mechanismus der Zytoadhäsion involviert sein könnten.

3.4.1 *In silico* Analyse der VIR-Proteine

Auf Grund der relativ jungen Geschichte der *vir*-Multigenfamilie, die im Jahr 2001 (del Portillo *et al.*, 2001) entdeckt wurde, sind viele Fragen bezüglich der Funktion der entsprechend kodierten Proteine noch unbeantwortet.

Viele der heute vorhandenen Erkenntnisse über die *vir*-Gene sind etwas umstritten, so z. B die eigentliche Anzahl der *vir*-Gene. Aus diesem Grund und aufgrund der Tatsache, dass es nicht möglich wäre alle *vir*-Gene zu untersuchen, wurde in Kooperation mit Dr. Christian Pick an der Universität Hamburg, eine *in silico* Analyse durchgeführt, um somit Kandidaten für eine weitere Charakterisierung zu finden. Das Ziel hier bestand darin Proteine zu identifizieren, die aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften exportiert werden sollten und somit eine Rolle bei der Zytoadhäsion spielen könnten. Für die *in silico* Analyse der *vir*-Gene wurde als erstes eine Clusteranalyse mittels SLiMFinder durchgeführt und diese mit der VIR-Klassifizierung von Lopez *et al.*, 2013 verglichen.

SLiMFinder funktioniert nach dem Prinzip vom Blast-Algorithmus (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*), wobei die untersuchten Proteinsequenzen miteinander verglichen und somit in unterschiedlichen UPC (engl. *unrelated protein clusters*) aufgeteilt werden. Wie unterschiedlich die Sequenzen bei der Klassifizierung voneinander sein dürfen, wird durch die Einstellung eines *e-values* festgelegt. Um eine ideale Clusteraufteilung zu finden wurde die Analyse mit vier unterschiedlichen *e-value*-Werten durchgeführt (1×10^{-15} ; 1×10^{-20} ; 1×10^{-25} und 1×10^{-30}).

Die Clusteranalyse mit einem *e-value* von 1×10^{-15} teilte die 291 untersuchten Proteine in fünf Cluster auf, wobei UPC 2 sowie UPC 5 jeweils aus einem einzelnen Protein bestanden. Die Mehrheit der Proteine wurde UPC 3 zugeordnet (264), gefolgt von UPC 1 (19) und UPC 4 (6). Die weiteren Analysen mit geringeren *e-value* Werten teilten die UPC 1 und 3 in weitere Subcluster auf, welche anschließend mit der Klassifizierung von Lopez *et al.*, 2013 verglichen wurden (Siehe Abb. 26).

Der Vergleich beider Klassifizierungen zeigte viele Gemeinsamkeiten. So konnte man beispielsweise eindeutig erkennen, dass UPC 1 ausschließlich Proteine zugeordnet worden sind, die laut der Klassifizierung von Lopez *et al.*, 2013 im Cluster 6 (Subfamilie J) zu finden sind. Genauso konnte man im UPC 4 lediglich Proteine aus dem Cluster 11 (Subfamilie K) darstellen.

Die genauere Aufteilung vom UPC 3 in Subcluster ergab noch weitere Übereinstimmungen. Der Subcluster 3.1.1.1 bestand überwiegend (109 von 120 Proteine) aus Proteinen des Clusters 1 (Subfamilie E). Die Ausnahmen waren hier vier Proteine (PVX_043190;

PVX_131260; PVX_130260; PVX_129260), die nach der Lopez-Klassifizierung Cluster 14 zugeordnet sind, drei Proteine (PVX_005050; PVX_086880; PVX_086855) aus dem Cluster 10, zwei aus Cluster 8 (PVX_115480; PVX_088790) und zwei aus Cluster 11 (PVX_086890; PVX_115990).

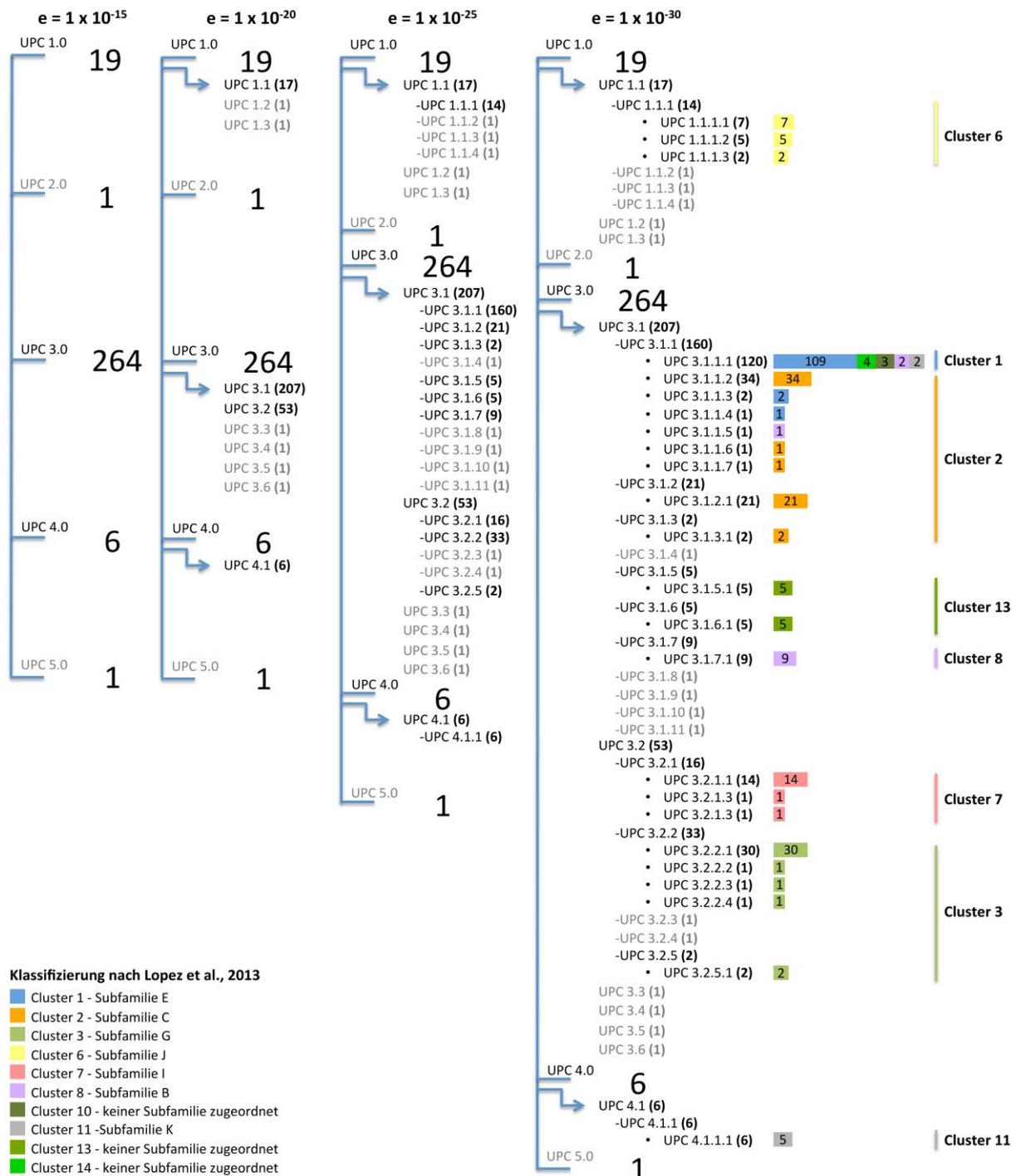


Abbildung 26: Clusteranalyse der VIR-Proteine. Clusteraufteilung der 291 VIR-Proteine im Vergleich zu der bisher bekannten Klassifizierung von Lopez *et al.*, 2013. Die Clusteranalyse wurde mit vier unterschiedlichen *e-value*-Werte (1×10^{-15} ; 1×10^{-20} ; 1×10^{-25} ; 1×10^{-30}) durchgeführt. Für die Analyse wurde der Web-Server SLiMFinder (<http://bioware.ucd.ie/slimfinder.html>) verwendet.

Die Subcluster 3.1.1.2-7 zusammen mit den Subcluster 3.1.2.1 und 3.1.3.1 wiesen eine Mehrheit an Proteinen aus dem Cluster 2 (Subfamilie C) auf. In diesem Fall bestanden die Ausnahmen aus drei Proteinen des Clusters 1 (PVX_009595; PVX_172270; PVX_038190) und ein Protein aus Cluster 8 (PVX_086350). Die Subcluster 3.1.5.1 und 3.1.6.1 setzten sich aus Proteinen des Clusters 10 zusammen. Dieser Cluster, genauso wie Cluster 13 und 14 werden bei Lopez *et al.*, 2013 keiner Subfamilie zugeordnet. Der Subcluster 3.1.7.1 bestand ausschließlich aus Proteinen des Clusters 8 (Subfamilie B). In allen Unterteilungen des Subclusters 3.2.1 waren lediglich Proteine aus dem Cluster 7 (Subfamilie I) zu finden. Schließlich konnte man in den Unterteilungen der Subcluster 3.2.2 und 3.2.5 ausschließlich Proteine aus dem Cluster 3 (Subfamilie G) der Klassifizierung nach Lopez *et al.*, 2013 finden. Zu erwähnen ist hier auch, dass bei der Clusteranalyse mit einem *e-value* Wert von 1×10^{-30} , 19 der 291 VIR-Proteine keinem der noch vorhandenen Cluster oder Subcluster zuzuordnen waren (Siehe Abb. 26, Grau-markierte ID).

Des Weiteren wurden die VIR-Proteine mit Hilfe von Vorhersage-Algorithmen nach Eigenschaften von exportierten Proteinen analysiert. Hier wurde nach Eigenschaften wie Transmembrandomänen (TM) (TMHMM-2.0 - <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) Signalpeptid (SP) (SignalP4.1 - <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) sowie putative PEXEL-Motive (3of5 - <http://www.dkfz.de/mga2/3of5>) gesucht. Von den 291 analysierten VIR-Proteinen, konnte für 171 eine Transmembrandomäne vorhergesagt werden. Diese ist meistens zwischen ca. 50 und 120 Aminosäuren vor dem C-Terminus des Proteins lokalisiert. Lediglich drei der Proteine zeigten ein vorhergesagtes Signalpeptid und bei 13 der Proteine konnte ein klassisches PEXEL-Motiv (RxLxE/Q/D) gefunden werden. Von den 13 Proteinen, die ein klassisches PEXEL-Motiv zeigten, konnte bei einem einzigen die, aus *P. falciparum* bekannte, konservierte Lokalisation beobachtet werden (ca. 40 bis 50 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt). Aus diesem Grund spielte die Anwesenheit von PEXEL-Motiven oder Signalpeptiden in dieser Arbeit keine große Rolle bei der Auswahl der zu untersuchenden Proteine. Hierfür war vor allem wichtig, dass die Proteine eine Transmembrandomäne aufwiesen. Des Weiteren wurde in Kooperation mit Dr. Tobias Spielmann (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin) nach einer weiteren, ebenfalls in *P. falciparum* beschriebenen Eigenschaft für exportierte Proteine gesucht. Diese ist der reife N-Terminus, der als putatives positives Exportsignal (PES) postuliert wird (Siehe Punkt 1.4.1).

Anhand der vorhandenen Erkenntnisse wurden anschließend zwölf VIR-Proteine für eine Lokalisationsanalyse mittels Immunfluoreszenzanalyse (IFA) ausgesucht. Diese waren VIR6-*putative* (PVX_050690), das keine Transmembrandomäne besaß und als Negativkontrolle dienen sollte, VIR21-*like* (PVX_088790), VIR5-*like* (PVX_093715), VIR14-*putative* (PVX_108770), VIR15-*putative* (PVX_010605), VIR14-*putative* (PVX_115475), VIR24-*like* (PVX_086855), VIR (PVX_090295), VIR12-*like* (PVX_090335), VIR2-*like* (PVX_107750), VIR22-*related* (PVX_081850) und VIR12-*related* (PVX_124705) (Siehe Abb. 27).

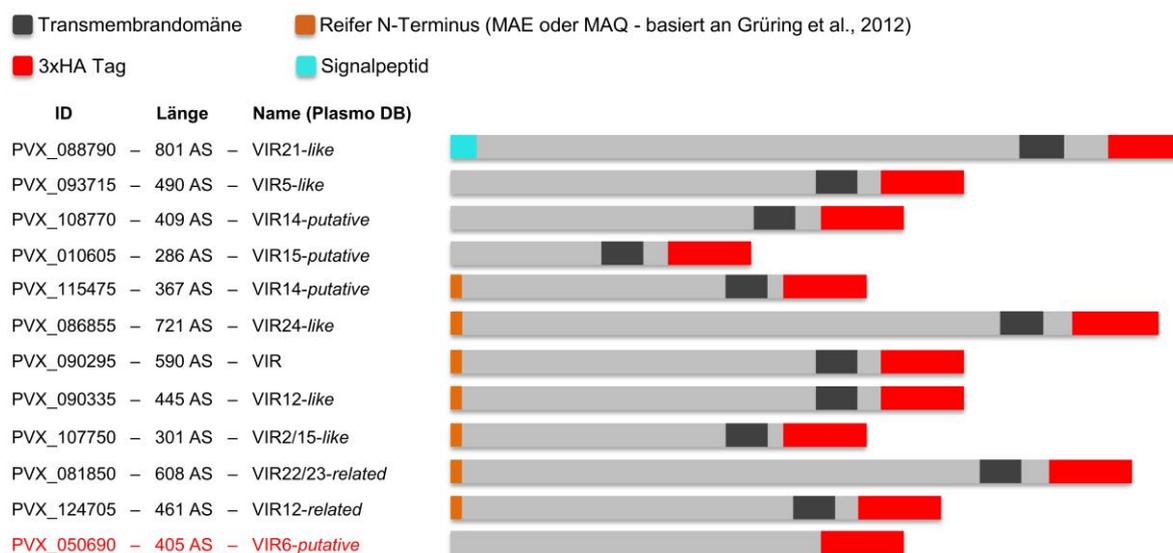


Abbildung 27: Auswahl der zu untersuchenden VIR-Proteine: Die Abbildung zeigt die Struktur der zwölf VIR-Proteine, welche für die Lokalisationsanalyse ausgewählt wurden. VIR6 (rote Schrift) diene als Negativkontrolle. Alle andere Proteine besaßen eine oder mehrere Eigenschaften, die in exportierten Proteinen zu finden sind: Transmembrandomäne (dunkelgrau); Signalpeptid (türkis); putatives positives Exportsignal (orange).

3.4.2 Lokalisation der VIR-Proteine mittels Immunfluoreszenzanalyse (IFA)

Da eine *in vitro* Kultivierung von *P. vivax* über einen längeren Zeitraum nicht möglich ist (Udomsangpetch *et al.*, 2008), mussten transgene *P. falciparum* Zelllinien erzeugt werden, um eine Lokalisationsstudie der VIR-Proteine mittels IFA zu ermöglichen. Dafür wurden die Sequenzen der Gene, die für die ausgewählten Proteine kodieren, an das vom *P. falciparum* bevorzugte Codon angepasst (engl. *codon usage*) und die Gene wurden synthetisch hergestellt (Invitrogen). Diese wurden in den Transfektionsvektor pARL1a(-) kloniert, und anschließend in *P. falciparum* (3D7) transfiziert. Sieben der zwölf ausgewählten *vir*-Gene konnten erfolgreich exprimiert und analysiert werden. Alle zu untersuchende VIR-Proteine wurden am C-Terminus mit einem 3-fachen Hämagglutinin (3xHA) fusioniert.

Da laut mehrerer Studien (Siehe Punkt 1.5) bei *P. vivax* ebenso wie bei *P. falciparum* nur die Trophozoiten und Schizonten in der Lage sind zu zytoadhären, wurden die Lokalisationsanalysen in dieser Arbeit mit diesen beiden Entwicklungsstadien durchgeführt.

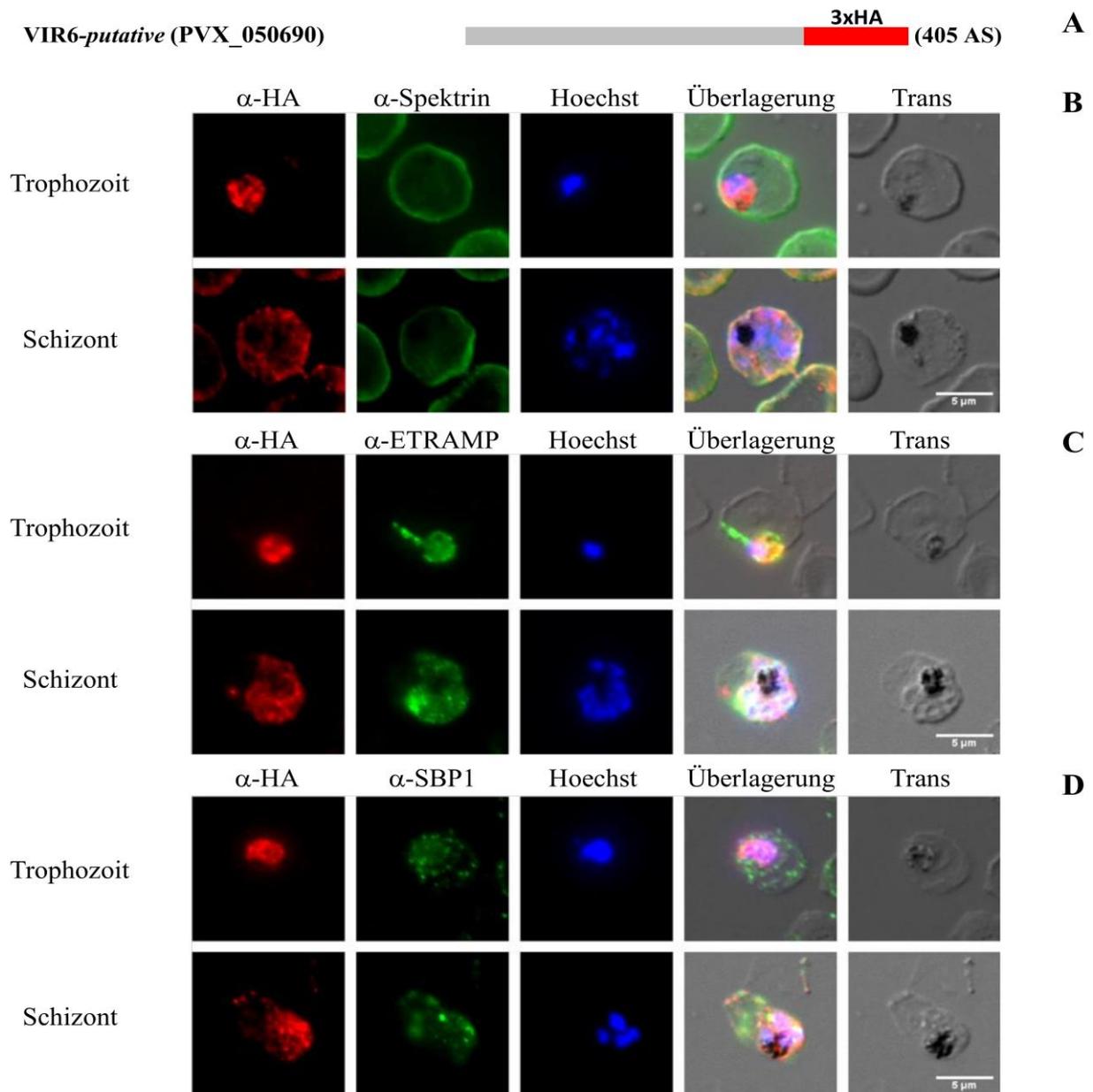


Abbildung 28: Lokalisation des VIR6-putative Proteins in einer *P. falciparum* transgenen Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins VIR6-3xHA (3xHA: rot). B-D: Immunfluoreszenzanalyse Aceton-fixierter transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins VIR6-3xHA in zwei unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Parasiten (Trophozoiten und Schizonten). B: Überprüfung einer Kollokalisierung mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. C: Überprüfung einer Kollokalisierung mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP. D: Überprüfung einer Kollokalisierung mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. Längemaßstab: 5 µm. Die Kernfärbung erfolgte mit Hilfe von Hoechst.

Das VIR-Protein VIR6-putative (PVX_050690) sollte in dieser Untersuchung, aufgrund von fehlenden Exporteigenschaften, als Negativkontrolle für den Export der Proteine an die

Erythrozytenmembran dienen. Das ausgewählte Protein VIR6 zeigte bei der *in silico* Analyse weder eine TM, noch ein SP sowie kein klassisches PEXEL-Motiv und kein putatives PES.

Die Immunfluoreszenzanalyse des Proteins VIR6-3xHA zeigte eine Lokalisation innerhalb des Parasiten. Diese war vor allem in dem Trophozoitenstadium eindeutig zu sehen (Siehe Abb. 28B-D, rote Färbung). Die Lokalisation des VIR6-Proteins innerhalb des Parasiten konnte durch die Kolokalisationsanalyse mit dem parasitophoren Vakuolenmembran (PVM)-Proteins ETRAMP (Spielmann *et al*, 2006a) bestätigt werden (Siehe Abb. 28C). ETRAMP diene als Marker für die PVM und somit als Marker für das Zellsoma des Parasiten. Ebenfalls konnte keine Kolokalisation mit den Proteinen Spektrin oder SBP1 beobachtet werden, was eine Assoziation mit den Maurer'schen Spalten oder der Erythrozytenmembran ausschließt (Siehe Abb. 28B und D).

Die Aminosäuresequenz des Proteins VIR5-like (PVX_093715) wies kein putatives PES, kein klassisches PEXEL-Motiv und kein SP auf, zeigte aber eine TM (Siehe Abb. 29A). Die IFA-Färbung des VIR5-3xHA zeigte bei beiden untersuchten Parasitenstadien eine punktuelle Verteilung über den gesamten iE sowie in den meisten Fällen eine Akkumulierung des Proteins innerhalb des Parasiten im Trophozoitenstadium (Siehe Abb. 29B-D). Aufgrund dieser teilweise sehr starken Akkumulierung innerhalb des Parasiten, kam es zu einer scheinbaren partiellen Kolokalisation mit dem PVM-Protein ETRAMP, welche durch die gelbe Färbung in der Bildüberlagerung (Siehe Abb 29C) zu erkennen ist. Diese konnte allerdings bei der Betrachtung der einzelnen IFA-Färbungen (α -HA und α -ETRAPM) nicht eindeutig bestätigt werden. Es konnte ebenfalls keine Kolokalisation mit Spektrin beobachtet werden. Interessanterweise zeigte die IFA-Färbung von VIR5-3xHA eine sehr gute Kolokalisation mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1 (Siehe Abb. 29D). Dies konnte sowohl bei Trophozoiten als auch bei Schizonten beobachtet werden.

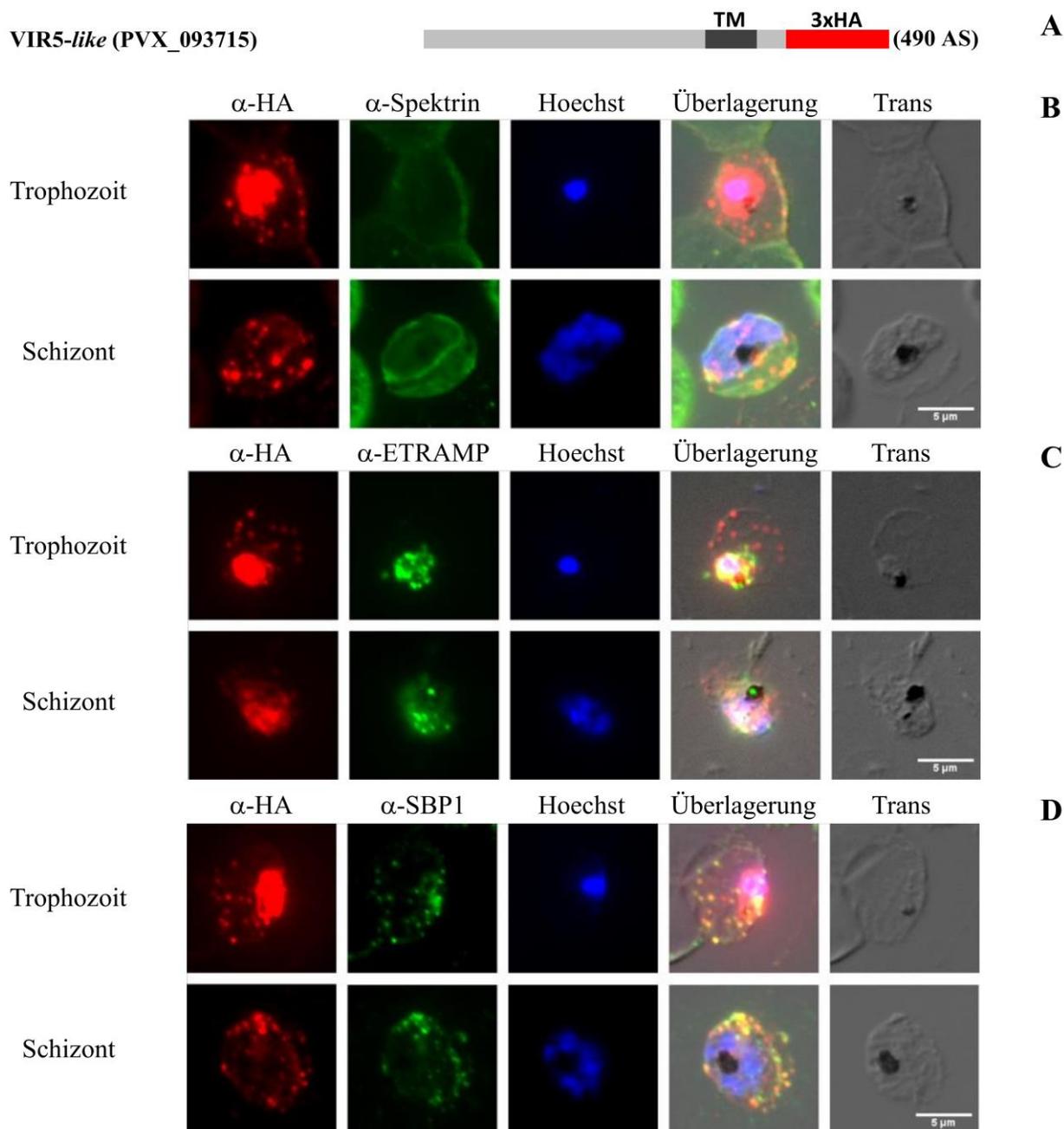


Abbildung 29: Lokalisation des VIR5-like Proteins in einer *P. falciparum* transgene Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins VIR5-3xHA (TM: dunkelgrau; 3xHA: rot). B-D: Immunfluoreszenzanalyse Aceton-fixierter transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins VIR5-3xHA bei zwei unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Parasiten (Trophozoiten und Schizonten). B: Überprüfung einer Kolo-kalisation mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. C: Überprüfung einer Kolo-kalisation mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP. D: Überprüfung einer Kolo-kalisation mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. Längenmaßstab: 5 μ m. Die Kernfärbung erfolgte mit Hilfe von Hoechst.

VIR12-related (PVX_124705) zeigte kein klassisches PEXEL-Motiv und kein SP, wies aber ein TM sowie ein putatives PES (MAQ) auf (Siehe Abb 30A). Ähnlich wie bei VIR5 zeigte die IFA-Färbung von VIR12-3xHA bei beiden untersuchten Parasitenstadien eine punktuelle Verteilung über den gesamten iE sowie ebenfalls in den meisten Fällen eine Akkumulierung

des Proteins innerhalb des Parasiten im Trophozoitenstadium (Siehe Abb. 30B-D). *VIR12-related* zeigte in beiden Parasitenstadien eine partielle Kollokalisierung mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1 (Siehe Abb. 30D). Es konnte für das Protein *VIR12-related* interessanterweise eine partielle Kollokalisierung des Proteins mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin im Schizontenstadium beobachtet werden (Siehe Abb. 30B).

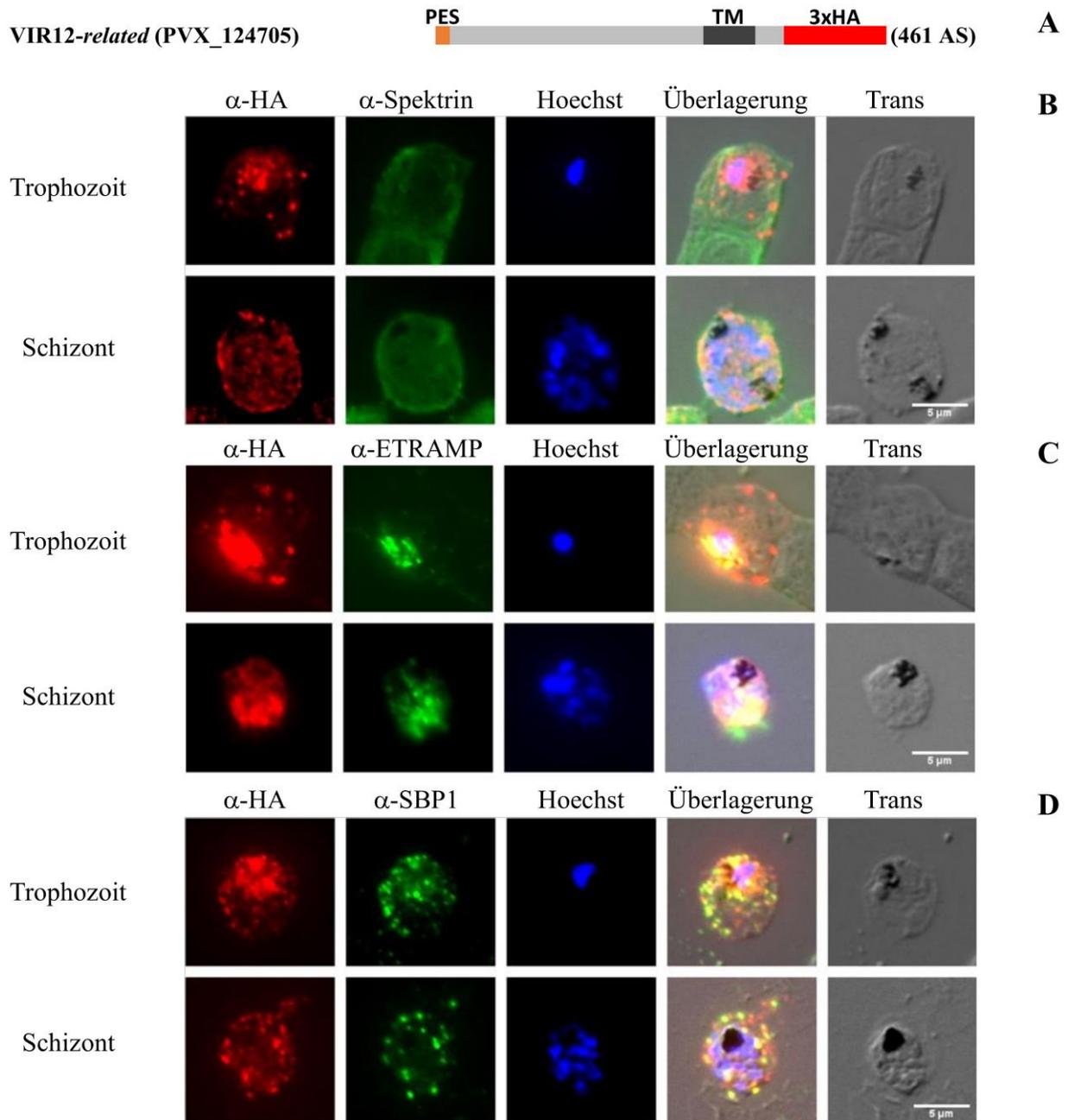


Abbildung 30: Lokalisation des *VIR12-related* Proteins in einer *P. falciparum* transgenen Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins *VIR12-3xHA* (PES: orange; TM: dunkelgrau; 3xHA: rot). **B-D:** Immunfluoreszenzanalyse Aceton-fixierter transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins *VIR12-3xHA* bei zwei unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Parasiten (Trophozoiten und Schizonten). **B:** Überprüfung einer Kollokalisierung mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. **C:** Überprüfung einer Kollokalisierung mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP. **D:** Überprüfung einer Kollokalisierung mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. Längenmaßstab: 5 μ m. Die Kernfärbung erfolgte mit Hilfe von Hoechst.

Das Protein *VIR12-like* (PVX_090335) wies in der *in silico* Analyse ebenso wie *VIR12-related* kein klassisches PEXEL-Motiv und kein SP auf, zeigte aber ein TM sowie ein putatives PES (MAQ) (Siehe Abb. 31A). Erneut wurde hier, wie bereits bei *VIR5* und *VIR12-related*, bei beiden untersuchten Parasitenstadien eine punktuelle Verteilung über den gesamten iE beobachtet.

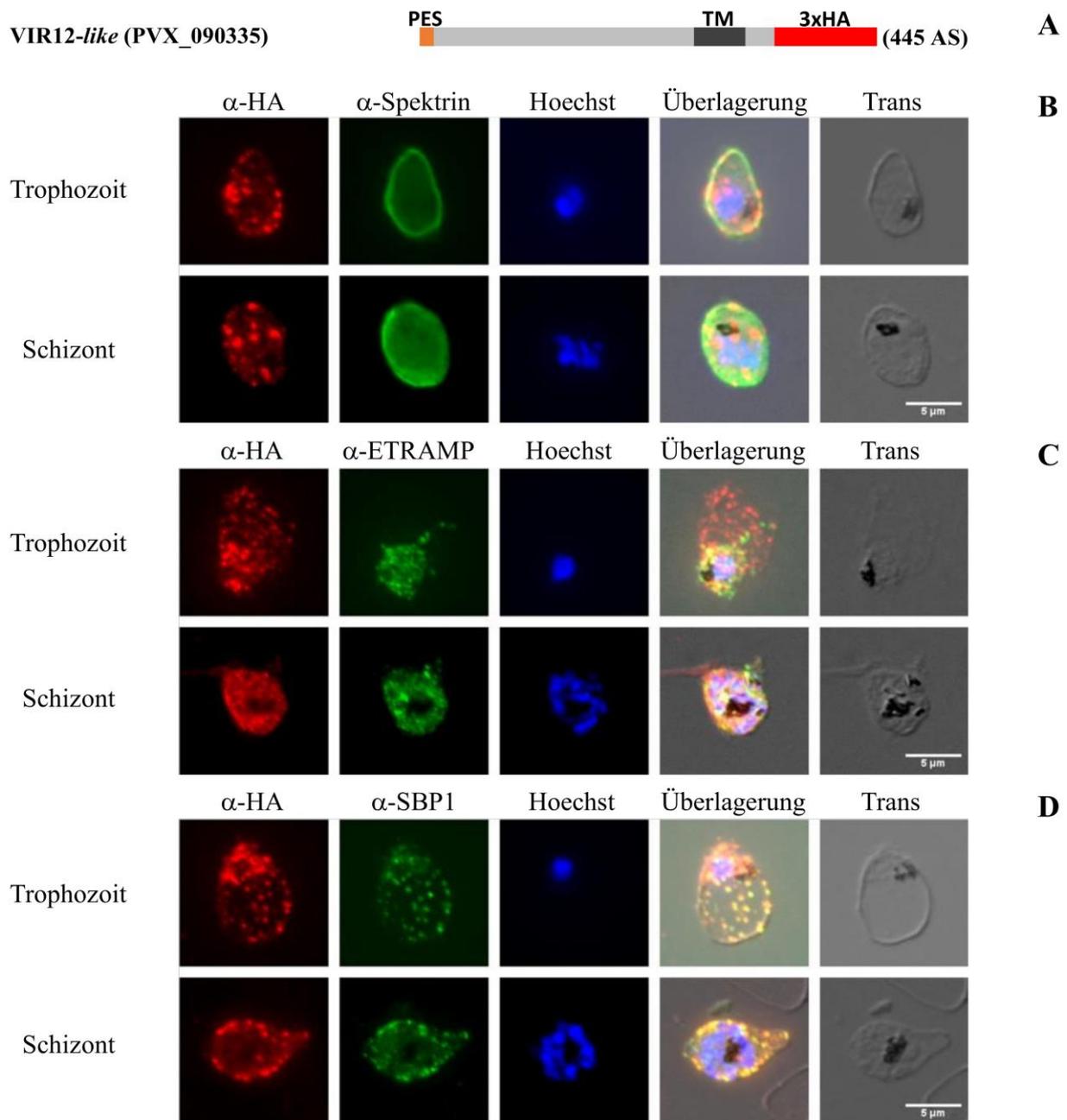


Abbildung 31: Lokalisation des *VIR12-like* Proteins in einer *P. falciparum* transgenen Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins *VIR12-3xHA* (PES: orange; TM: dunkelgrau; 3xHA: rot). B-D: Immunfluoreszenzanalyse Aceton-fixierter transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins *VIR12-3xHA* bei zwei unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Parasiten (Trophozoiten und Schizonten). B: Überprüfung einer Kolo-kalisation mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. C: Überprüfung einer Kolo-kalisation mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP. D: Überprüfung einer Kolo-kalisation mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. Längenmaßstab: 5 µm. Die Kernfärbung erfolgte mit Hilfe von Hoechst.

Auffällig bei *VIR12-like* war, dass es anders als *VIR5* und *VIR12-related* eine wesentlich schwächere Akkumulierung des Proteins innerhalb des Parasiten zeigte (Siehe Abb. 31B-D). *VIR12-like* zeigte sowohl im Trophozoiten- als auch im Schizontenstadium eine starke Kolokalisation mit SBP1 (Siehe Abb. 31D).

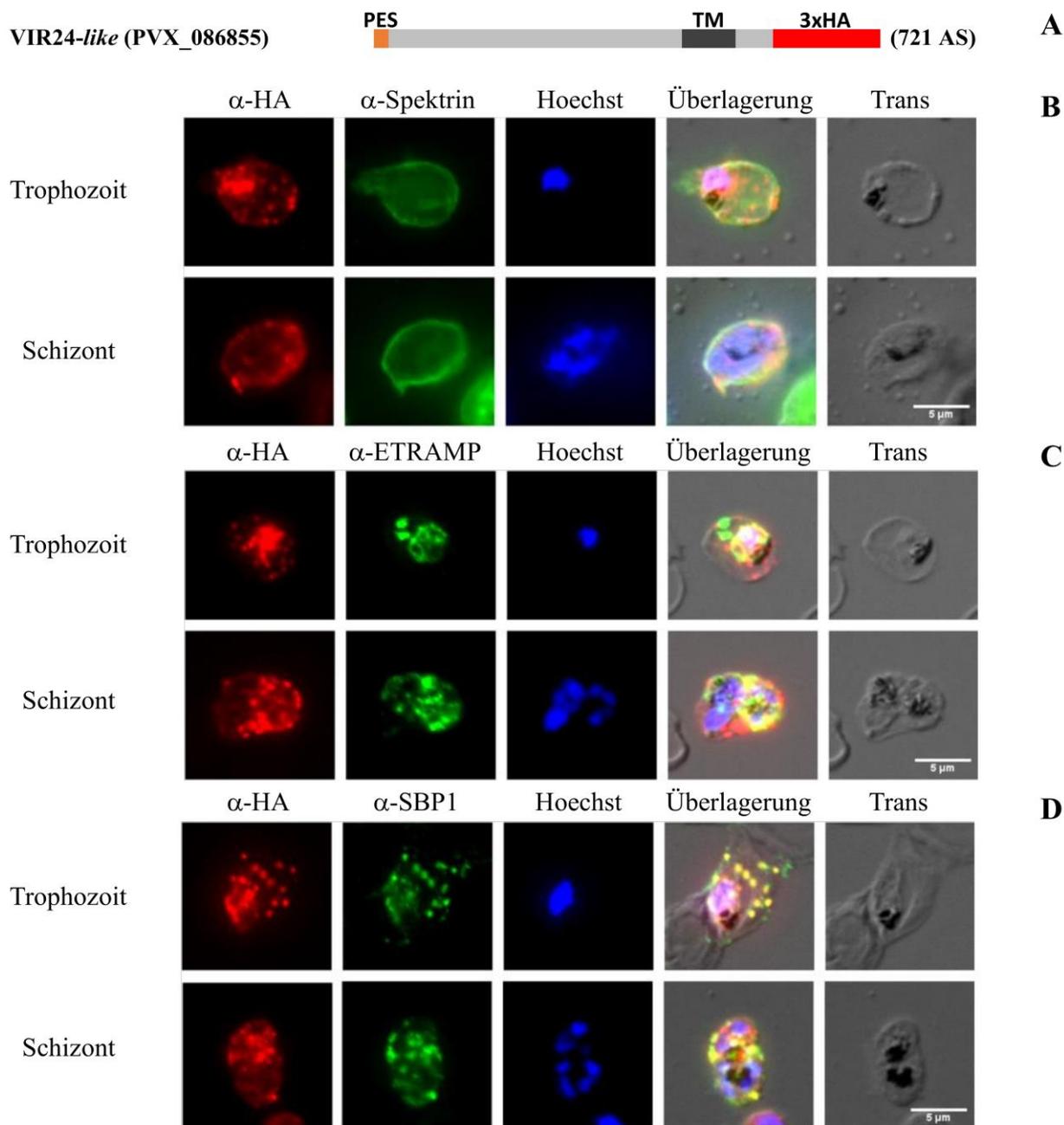


Abbildung 32: Lokalisation des VIR24-like Proteins in einer *P. falciparum* transgenen Zelllinie. **A:** Schematische Darstellung des Fusionsproteins VIR24-3xHA (PSE: orange; TM: dunkelgrau; 3xHA: rot). **B-D:** Immunfluoreszenzanalyse Aceton-fixierter transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins VIR24-3xHA bei zwei unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Parasiten (Trophozoiten und Schizonten). **B:** Überprüfung einer Kolokalisation mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. **C:** Überprüfung einer Kolokalisation mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP. **D:** Überprüfung einer Kolokalisation mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. Längenmaßstab: 5 µm. Die Kernfärbung erfolgte mit Hilfe von Hoechst.

Eine Kolokalisation mit SBP1 konnte ebenfalls bei *VIR24-like* (PVX_086885) beobachtet werden. Diese allerdings nur bei den Trophozoiten, während bei den Schizonten eine partielle Kolokalisation auftrat. *VIR24* zeigte außerdem eine starke Akkumulierung des Proteins innerhalb des Parasiten im Trophozoitenstadium, wie schon bei *VIR5* und *VIR12-related* beobachtet und eine weniger ausgeprägte punktuelle Verteilung der Färbung im Schizontenstadium und eine partielle Kolokalisation mit Spektrin (Siehe Abb. 32B). Das Protein *VIR24-like* zeigte bei der *in silico* Analyse sowohl eine TM als auch ein PES (MEE), aber kein klassisches PEXEL-Motiv und kein SP. Ein weiteres untersuchtes Protein war das *VIR14-putative* Protein (PVX_108770). *VIR14* zeigte bei der *in silico* Analyse weder ein klassisches PEXEL-Motiv, noch ein putatives PES sowie kein SP. Allerdings wies *VIR14*, wie alle anderen untersuchten *VIR*-Proteine, eine Transmembrandomäne auf. Die IFA-Färbung von *VIR14-3xHA* zeigte eine punktuell-verteilte Färbung über den gesamten iE. Ebenfalls wieder zu beobachten war die Akkumulierung des Proteins innerhalb des Parasiten in der Nähe des Zellkerns der Trophozoiten. Interessanterweise konnte für *VIR14-3xHA* im Schizontenstadium eine partielle Kolokalisation mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin beobachtet werden (Siehe Abb. 33B). Anderes als bei den bisher in dieser Arbeit untersuchte *VIR*-Proteinen, zeigte *VIR14* keine Kolokalisation mit SBP1 im Trophozoitenstadium. Im Schizontenstadium zeigte *VIR14* bei der Betrachtung der Bildüberlagerung scheinbar eine partielle Kolokalisation mit SBP1, die allerdings bei Betrachtung der einzelnen Färbungen nicht eindeutig bestätigt werden konnte (Siehe Abb. 33D).

Interessant war auch die Lokalisation des *VIR21* (PVX_088790) Proteins. *VIR21* wies als einziges von den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen ein Signalpeptid auf (Siehe Abb. 34A). Die IFA-Färbung des Proteins *VIR21-3xHA* zeigte erneut die punktuell-verteilte Färbung, welche bereits von den restlichen hier untersuchten *VIR*-Proteinen bekannt ist. Auffällig war in diesem Fall die Beobachtung einer sehr guten Kolokalisation des *VIR24-3xHA* mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1 ausschließlich im Trophozoitenstadium, während dieser im Schizontenstadium nicht zu beobachten war (Siehe Abb. 34D). Aufgrund der ersten Ergebnisse bei *VIR14* und *VIR21*, wo keine Kolokalisation mit SBP1 bzw. bei dem diese lediglich im Trophozoitenstadium zu sehen war, wurde für diese zwei *VIR*-Proteine eine Immunfluoreszenzanalyse zur Kolokalisation mit dem Knobs-assoziierten *PfEMP1* durchgeführt. Dafür würde ein monoklonaler Antikörper gegen die konservierte ATS-Domäne der *PfEMP1* verwendet. Diese zeigte bereits in früheren Studien eine ähnliche punktuell-verteilte Färbung der *PfEMP1* über die Oberfläche des iE (Bachmann *et al.*, 2012), wie die von den 3xHA-Fusionsproteinen gezeigte IFA-Färbung in dieser Arbeit.

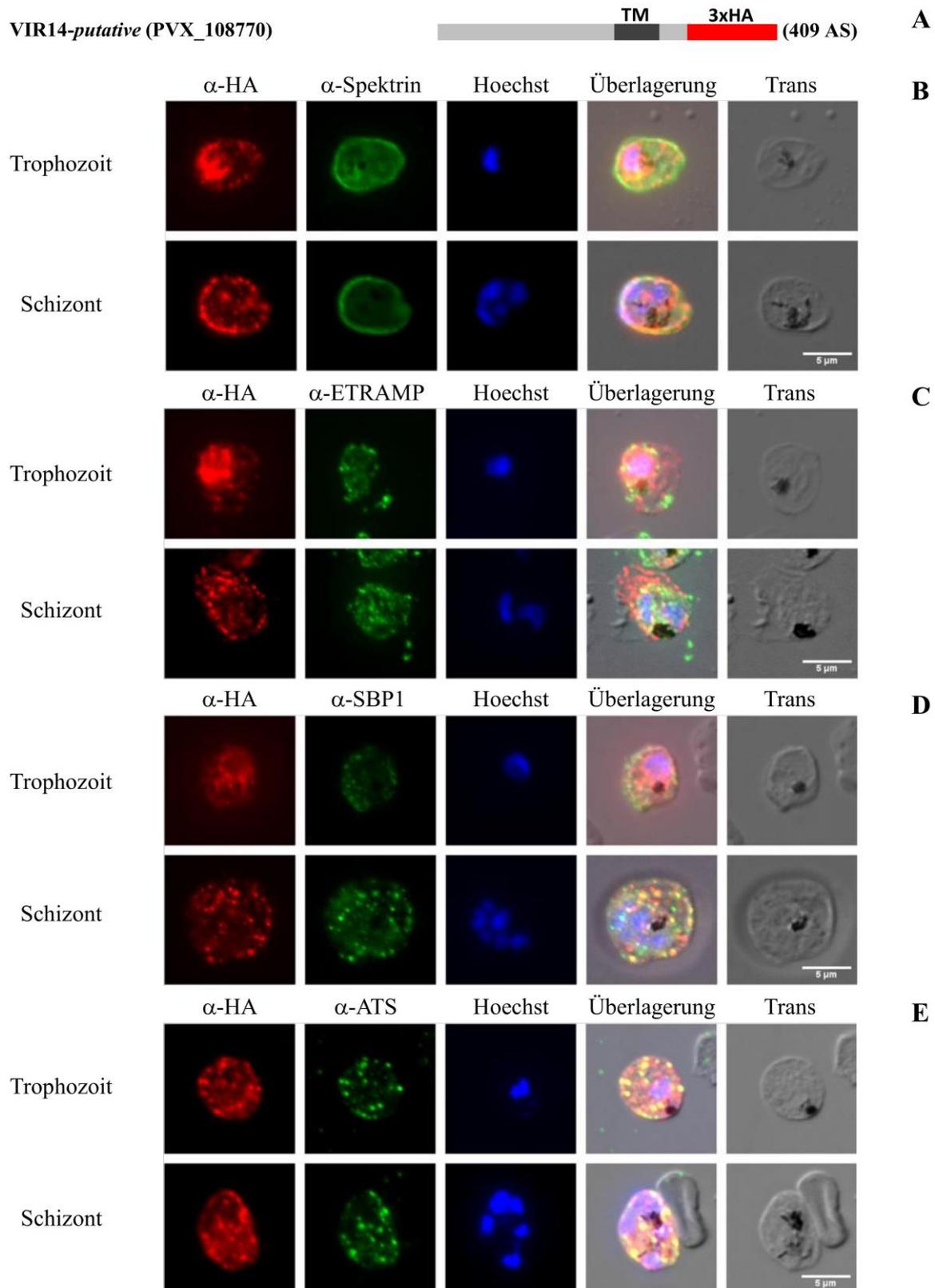


Abbildung 33: Lokalisation des VIR14-like Proteins in einer *P. falciparum* transgenen Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins VIR14-3xHA (TM: dunkelgrau; 3xHA: rot). **B-D:** Immunfluoreszenzanalyse Aceton-fixierter transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins VIR14-3xHA bei zwei unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Parasiten (Trophozoiten und Schizonten). **B:** Überprüfung einer Kolo-kalisation mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. **C:** Überprüfung einer Kolo-kalisation mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP. **D:** Überprüfung einer Kolo-kalisation mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. **E:** Überprüfung einer Kolo-kalisation mit der ATS-Domäne der Knobs-assoziierten Proteine PfEMP1. Längenmaßstab: 5 µm. Die Kernfärbung erfolgte mit Hilfe von Hoechst.

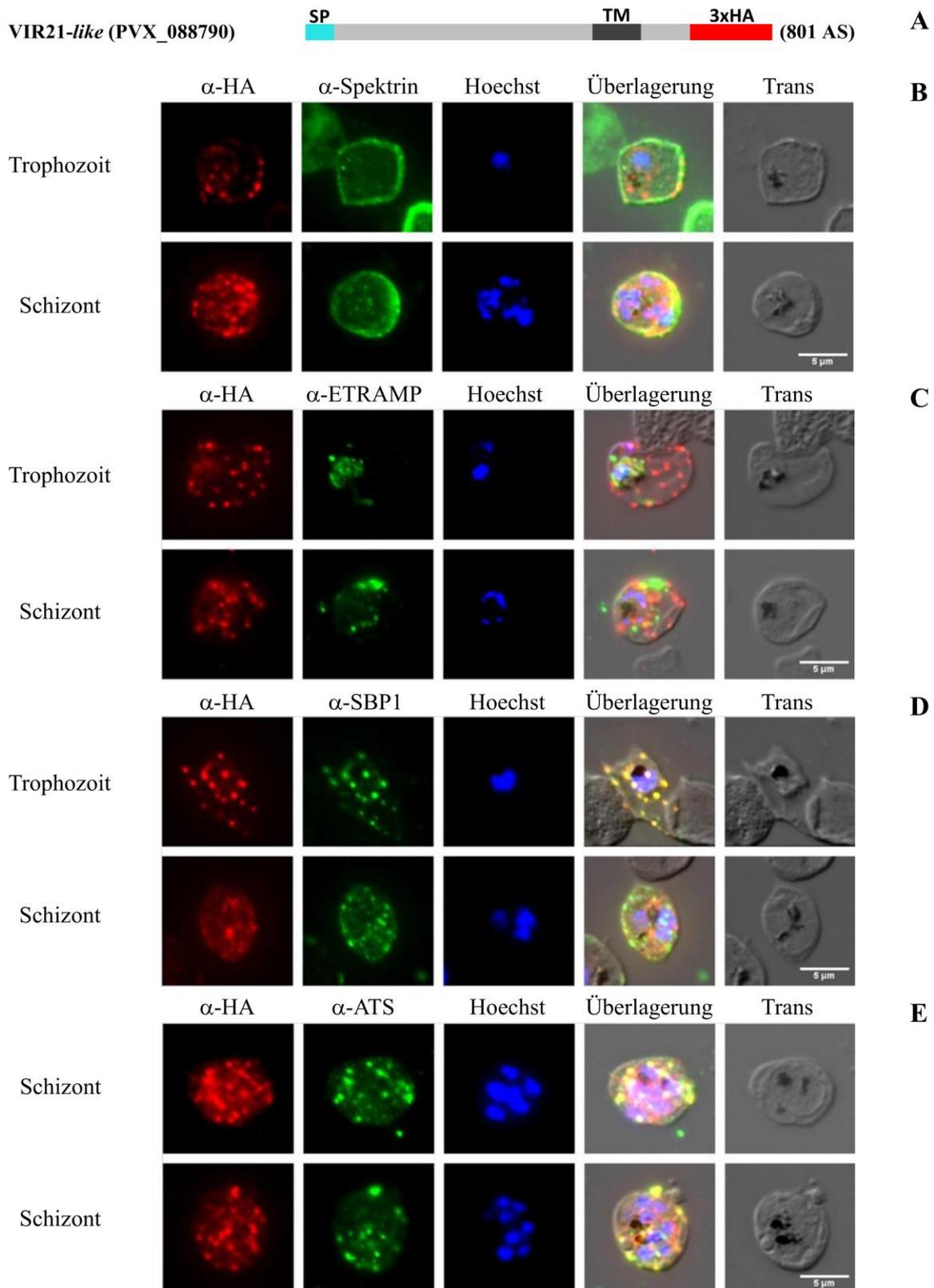


Abbildung 34: Lokalisation des VIR21-like Proteins in einer *P. falciparum* transgenen Zelllinie. **A:** Schematische Darstellung des Fusionsproteins VIR21-3xHA (SP: türkis; TM: dunkelgrau; 3xHA: rot). **B-D:** Immunfluoreszenzanalyse Aceton-fixierter transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins VIR21-3xHA bei zwei unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Parasiten (Trophozoiten und Schizonten). **B:** Überprüfung einer Kolo-kalisation mit dem Erythrozyten-membran-assoziierten Protein Spektrin. **C:** Überprüfung einer Kolo-kalisation mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP. **D:** Überprüfung einer Kolo-kalisation mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. **E:** Überprüfung einer Kolo-kalisation mit der ATS-Domäne der Knobs-assoziierten Proteine *PfEMP1*. Längenmaßstab: 5 μ m. Die Kernfärbung erfolgte mit Hilfe von Hoechst.

Für VIR21 wurde diese Analyse lediglich für Schizonten durchgeführt, da es nur im Schizontenstadium keine Kollokalisierung mit SBP1 zeigte. Sowohl VIR14-3xHA (Tropozoiten und Schizonten) als auch VIR21-3xHA (Schizonten) zeigten eine gute Kollokalisierung mit dem Knobs-assoziierten PfEMP1, was auf einen Export dieser Proteine auf die Oberfläche der infizierten Erythrozyten hindeutet.

3.4.3 Homologievergleich zwischen den N-Termini der untersuchten VIR-Proteine

Schließlich wurde einen Homologievergleich zwischen den ersten 80 N-terminalen Aminosäuren (AS) der VIR-Proteine mittels ClustalW (Version 1.83) durchgeführt. Die Analyse zeigte mit Werten zwischen 16,3 und 50,6 % keine große Ähnlichkeit zwischen den N-Termini. Dennoch konnte, abgesehen vom Vergleich zwischen VIR5 und VIR24 (Siehe Tab. 8, rot umrandet), eine stärkere Ähnlichkeit zwischen den Proteinen VIR5, VIR12-like, VIR12-related und VIR24 untereinander (ca. 23 – 50 % ähnliche AS) als mit VIR14 und VIR21 (ca. 17 – 21 % ähnliche AS) gefunden werden (Siehe Tab. 8, rot bzw. grün hinterlegt). Diese vier Proteine zeigten alle eine Kollokalisierung mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. Auf der anderen Seite wiesen VIR14 und VIR21 ebenfalls eine stärkere Ähnlichkeit untereinander auf (ca. 27 % ähnliche AS), als mit den übrigen vier Proteinen (ca. 17 – 21 % ähnliche AS) (Siehe Tab. 8, blau bzw. grün hinterlegt). VIR14 und VIR21 zeigten beide eine Kollokalisierung mit der ATS-Domäne der Knobs-assoziierten Proteine PfEMP1. Bei der Betrachtung der Identität zwischen den Sequenzen lagen die Werte, bis auf den Vergleich zwischen VIR12-like und VIR12-related, unter 14 % (Siehe Tab. 8)

Tabelle 8: Homologie der untersuchten VIR-Proteine.

	Identische Aminosäuren (%)					
	VIR14	VIR21	VIR24	VIR5	VIR12-related	VIR12-like
VIR14		8,6	9,4	6,6	3,4	5,8
VIR21	27,2		10,6	4,6	10,1	10,5
VIR24	18,8	18,8		4,4	10,3	11,9
VIR5	17,6	16,3	16,7		13,3	9,3
VIR12-related	19,3	18,0	24,1	34,9		41,0
VIR12-like	17,4	20,9	26,2	23,3	50,6	
	Ähnliche Aminosäuren (%)					

Interessanterweise wiesen die vier VIR-Proteine, die mit SBP1 kollokalisiert waren und VIR14 einen konservierten Bereich zwischen Position 58 und 67, wobei VIR14 das hochkonservierte Cystein in dem Bereich am Position 63 fehlt (Siehe Abb. 35, rot markiert). Ebenfalls interessant ist, dass VIR14 und VIR21, welche eine Kollokalisierung mit den PfEMP1

Molekülen aufwiesen, zwar keinen reifen N-Terminus wie *VIR12-like*, *VIR12-related* und *VIR24* besitzen, aber ein PEXEL-ähnliches Motiv zwischen Position 20 und 40 aufweisen. *VIR14* besitzt Motiv RxIxE, während *VIR21* das Motiv RxLxK zeigt. Beide zeigen die für das PEXEL-Motiv typische Lokalisation und unterscheiden sich vom klassischen PEXEL-Motiv RxLxE/Q/D lediglich in einer Aminosäure, welches hier rot markiert ist (Siehe Abb. 35, gelb markiert sowie Tab. 9).

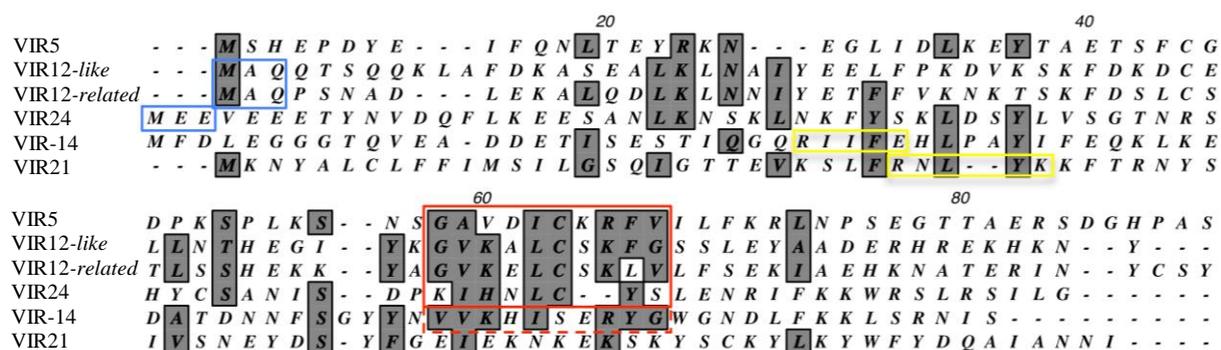


Abbildung 35: Sequenzvergleich der ersten 80 N-terminalen Aminosäuren der untersuchten VIR-Proteine. Der Sequenzvergleich zeigt den konservierten Bereich zwischen den Proteinen *VIR5*, *VIR12-like*, *VIR12-related*, *VIR24* und *VIR14* (rot markiert) sowie die reifen N-Termini der Proteine *VIR12-like*, *VIR12-related* (MAQ) und *VIR24* (MEE) (blau markiert) und die PEXEL-ähnliche Motive der Proteinen *VIR14* und *VIR21* (gelb markiert).

Durch eine erneute Analyse der Sequenzen konnte anschließend für neun weitere *VIR*-Proteinsequenzen ebenfalls ein PEXEL-ähnliches Motiv ermittelt werden, das wie bei *VIR14* und *VIR21* die typische PEXEL-Lokalisation. Einige von den wiesen allerdings keine Transmembrandomäne (TM) auf (Siehe Tab. 9).

Tabelle 9: VIR-Proteine mit einem PEXEL-ähnlichen Motiv.

Protein-ID	PEXEL-ähnliches Motiv	Position	TM (Position)
PVX_108770 (<i>VIR14</i>)	RxIxE	26-30	323-344
PVX_088790 (<i>VIR21</i>)	RxNlyK	29-33	726-747
PVX_103665	RxFLNT	35-39	-
PVX_095995	RxNLPs	16-20	-
PVX_119210	RxNlQ	50-54	760-781
PVX_101560	KsLGE	16-20	380-401
PVX_074190	KsLYE	27-31	246-268
PVX_004510	KxNLPQ	35-39	-
PVX_026190	KxNLSd	34-38	-
PVX_081850	KyLFD	53-57	542-563
PVX_241290	KlLYD	30-34	155-177 / 748-769

4 Diskussion

4.1 Die Zytoadhäsion der *P. falciparum* infizierten Erythrozyten

Der hauptverantwortliche Faktor für die hohe Pathogenität der Malariaerreger ist die Zytoadhäsion, welcher ein komplexer Immunevasionsmechanismus des Parasiten ist und eine Herausforderung für die Malariaforschung darstellt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenproteine der PfEMP1-Familie eine essentielle Rolle als Liganden für die Interaktion mit Endothelzellrezeptoren und somit für die Zytoadhäsion spielen (Magowan *et al.*, 1988; Rogerson *et al.*, 1995; Su *et al.*, 1995; Baruch *et al.*, 1996). Es konnte ebenfalls für mehrere humane Endothelrezeptoren eine Interaktion mit *Plasmodium* infizierten Erythrozyten (iE) nachgewiesen werden und gezeigt werden, dass bestimmte Domänen oder Domänenkassetten innerhalb der PfEMP1-Moleküle, eine spezifische Bindung an bestimmte Rezeptoren wie z. B. CD36 oder ICAM-1 vermitteln können. Dennoch wirft dieser sehr komplexe Mechanismus noch viele Fragen auf, die unbeantwortet sind.

Die Etablierung von Methoden für Bindungsstudien unter Flussbedingungen eröffnete eine neue Möglichkeit diesen Mechanismus zu untersuchen. Dies ermöglicht das Verhalten der unterschiedlichen Bindungsphänotypen, welche bei der Bindung der iE auf die verschiedenen Rezeptoren auftreten. Bezüglich der unterschiedlichen Bindungsphänotypen der PfiE wurde postuliert, dass die Zytoadhäsion der PfiE der Leukozyt-Endothelium-Interaktion bei inflammatorischen Antworten entspricht. Hierbei werden die Leukozyten aus dem Blutstrom durch die Interaktion mit Selektinen herausgenommen (*Tethering*). Anschließend rollen sie über verschiedene Rezeptoren und können durch die Zytokin-induzierte Aktivierung von β_2 - und α_4 -Integrinen, wie z. B. LFA-1 und Mac-1, eine statische Bindung an ICAM-1 oder ICAM-2 etablieren (Helms *et al.*, 2016). Die PfiE zeigen ähnliche Bindungsphänotypen, was zu der Annahme führt, dass sie einen vergleichbaren Ablauf bei der Bindung an Endothelrezeptoren aufweisen (Ho und White, 1999; Helms *et al.*, 2016). Allerdings ist es umstritten welche Rezeptor-Ligand-Interaktion zu welcher Art der Bindung führt.

4.1.1 Die Zytoadhäsion der PfiE an CD36

Der Endothelrezeptor CD36 spielt eine wichtige Rolle bei der Zytoadhäsion von *P. falciparum* (Oquendo *et al.*, 1989). Er ist quantitativ betrachtet der wichtigste Rezeptor bei der Interaktion mit PfiE. Es konnte in einer Studie mit 150 aus Patienten isolierten *P.*

falciparum-Isolaten für alle eine Bindung an CD36 nachgewiesen werden (Newbold *et al.*, 1997). Dies konnte auch in dieser Arbeit im Vergleich zu den anderen hier untersuchten Rezeptoren bestätigt werden und lässt sich vor allem durch die hohe Anzahl an *P. falciparum*-Liganden, welche mit CD36 interagieren, erklären. Die meisten Proteine aus der PfEMP1-Familie besitzen eine CIDR α 2-6-Domäne, welche zusammen mit einer DBL β -Domäne eine Kopfstruktur bildet, die eine Bindung an CD36 vermittelt.

Bei denen in dieser Arbeit untersuchten Laborstämmen sind es 42 PfEMP1-Liganden bei dem IT4-Isolat und 47 beim 3D7-Isolat, die diese Struktur aufweisen (Smith *et al.*, 2000b; Robinson *et al.*, 2003; Smith, 2014). Die Untersuchungen unter Flussbedingungen zeigten, dass eine Bindung bereits bei einer Scherkraft von 4 dyn/cm² stattfand. Die stärkste Erhöhung bei der Anzahl an gebundenen PfiE konnte allerdings erst bei einer Scherkraft von 0,9 dyn/cm² nachgewiesen werden. Dies korreliert mit den Ergebnissen einer früheren Studie, bei der eine maximale Bindungskapazität von PfiE an CD36 bei einer Scherkraft von 1,0 dyn/cm² ermittelt wurde (Yipp *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit konnte bei allen untersuchten Scherkräften eine rollende Bewegung der PfiE über die transgenen CHO-Zellen, welche den Rezeptor CD36 auf der Oberfläche aufwiesen, nachgewiesen werden. Die Studie von Yipp *et al.* zeigte ebenfalls dass die PfiE eine rollende Bewegung (*rolling*) auf Endothelzellen aufwiesen und dass dieser Bindungsphänotyp durch die Interaktion mit CD36 vermittelt wurde, während auf transgenen Endothelzellen, welche eine höhere CD36-Konzentration aufwiesen sowohl eine rollende Bewegung als auch statische Bindungen gezeigt werden konnten (Udomsangpetch *et al.*, 1997). Eine ähnliche Beobachtung zeigten Studien, welche das Bindungsverhalten auf Protein-bedeckter Oberflächen untersuchten. Während auf Oberflächen, die mit einer Konzentration von 25 μ g/ml bedeckt wurden, eine rollende Bewegung beobachtet wurde, zeigten die PfiE auf Oberflächen, die mit 50 μ g/ml bedeckt wurden sowohl eine rollende Bewegung als auch statische Bindungen (Antia *et al.*, 2007; Herricks *et al.*, 2013).

All diese Beobachtungen zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigen, dass sich die Bindung von PfiE an CD36 unterschiedlich verhalten kann und deutet darauf hin, dass dieser Verhaltensunterschied mit der CD36-Konzentration zusammenhängt. Ein weiterer Hinweis dafür lieferten die Ergebnisse aus der Studie von Davis *et al.* (2012). Diese zeigte bei Bindungsstudien mit GFP-CD36-transfizierten HDMECs (engl. *human dermal microvascular endothelial cells*), dass die Bindung von PfiE innerhalb von wenigen Minuten zu einer Rekrutierung von CD36 an der Bindungsstelle führte. Somit könnte eine Interaktion zwischen PfiE und CD36 erst zum Rollen und damit zur Reduzierung der Geschwindigkeit der PfiE

führen. Gleichzeitig würde die Bindung eine Signalkaskade auslösen, welche zu einer Rekrutierung von CD36 an die Oberfläche der Endothelzellen und anschließend zu einer statischen Bindung führen könnte. Eine zusätzliche Erklärung für die unterschiedlichen Bindungsphänotypen bei der Interaktion zwischen *PfiE* und CD36 könnte eine Variation der Bindungseigenschaften zwischen den einzelnen Liganden (*PfEMP1*) sein. Eine Studie mit isogenetischen Parasiten, welche überwiegend eine bestimmte *PfEMP1*-Variante synthetisierte, konnte zeigen, dass die Geschwindigkeit der rollenden Bewegung zwischen den Klonen (welche unterschiedliche *PfEMP1* auf der Oberfläche aufwiesen) um das 5-fach variierte (Herricks *et al.*, 2013). Ein ähnlicher Zusammenhang konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden. Durch die Anreicherung der Parasiten auf den Rezeptoren ICAM-1 oder CD36, fand eine Selektion von Parasitenpopulationen statt, bei den einige wenige (2 - 5) *var*-Gene überwiegend exprimiert wurden. Diese konnten anhand der Transkriptom-Analyse bestätigt werden. Interessanterweise zeigten diese angereicherten Parasitenpopulationen einen Unterschied beim rollenden Verhalten im Vergleich zu der nicht-angereicherten Population bei der Bindung an CD36. Allerdings konnte dieser Unterschied nur beim 3D7-Stamm nachgewiesen werden. Diese wiesen nach 10-minütiger Bindung bei einer Scherkraft von 0,9 dyn/cm² eine durchschnittliche akkumulierte Distanz von ca. 65 µm im Vergleich zu einer akkumulierten Distanz von 165 µm bei den nicht-angereicherten *PfiE*. Beim IT4-Stamm konnte keine Veränderung bei den akkumulierten Distanzen festgestellt werden. Allerdings ist bei der IT4-ICAM-1 angereicherten Population eine geringere Streuung zwischen den akkumulierten Distanzen der einzelnen *PfiE* innerhalb des Experimentes vorhanden. Dies könnte durch die Anreicherung erklärt werden. Dadurch wird eine Population erzeugt, bei der weniger Varianten der *PfEMP1* vorhanden sind und somit wird auch die Variabilität beim Bindungsverhalten zwischen den einzelnen *PfiE* reduziert.

Dennoch ist der Mechanismus hinter der Interaktion zwischen *PfiE* und CD36 viel komplexer und kann durch viele andere Faktoren beeinflusst werden. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass die Bindung von *PfiE* an CD36 eine Signalkaskade aktiviert, die durch die Proteine der Src-Kinase-Familie induziert wird. Diese führt zur Rekrutierung vom $\alpha_5\beta_1$ -Integrin an die Bindungsstelle sowie zu einer Remodulierung des Aktinzytoskeletts der Endothelzellen, was wiederum zu einer Erhöhung der Anzahl an gebundenen *PfiE* sowie zu einer Erhöhung der Bindungsstärke führt. Das Integrin $\alpha_5\beta_1$ zeigt allein keine Interaktion mit *PfiE* aber es agiert synergetisch mit CD36 und führt zu einer Erhöhung der Zytoadhäsion (Davis *et al.*, 2012; Davis *et al.*, 2013). Ein synergetischer Effekt konnte ebenfalls zwischen CD36 und ICAM-1 gezeigt werden (McCormick *et al.*, 1997; Yipp *et al.*, 2000). All diese

Ergebnisse zeigen wie komplex die Interaktion zwischen CD36 und den Liganden des *P. falciparum* ist und dass weitere Untersuchungen notwendig sind um diesen Mechanismus genauer verstehen zu können.

Interessanterweise wurde in dieser Arbeit eine unerwartete Abnahme der Anzahl an gebundenen *PfiE* bei der Bindung an CD36, nach dem die Parasiten spezifisch auf den Rezeptor angereichert wurden, beobachtet. Hier konnten nach Beendigung des Bindungsversuches im Schnitt ca. 39 (3D7) bzw. 44 (IT4) gebundene *PfiE* gezählt werden, während es bei den nicht-angereicherten ca. 68 (3D7) bzw. 124 (IT4) waren. Eine mögliche Erklärung dafür könnten die unterschiedlichen Bedingungen sein, bei denen die Zellen behandelt worden sind. Die Anreicherung der Parasiten fand unter statischen Bedingungen statt. Dies könnte dazu führen, dass eine Parasitenpopulation angereichert wurde, die eine *PfEMP1*-Variante auf der Oberfläche aufweist, welche eine erhöhte Bindungskapazität unter statischer Bedingung zeigt aber eine geringere Bindungskapazität unter Flussbedingungen aufweist.

4.1.2 Zytoadhäsion der *PfiE* an ICAM-1

Ein weiterer wichtiger Rezeptor, der bei der Interaktion mit *PfiE* involviert ist, ist der ICAM-1-Rezeptor. Dieser kommt zwar in geringeren Konzentrationen in den Endothelzellen vor, allerdings wird die Expression des Gens, welches für ICAM-1 kodiert, durch inflammatorische Zytokine, wie Interleukin 6 (IL6) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) induziert (Hunt und Grau 2003; Wung *et al.*, 2005). ICAM-1 ist ebenfalls bekannt für die Interaktion mit den Integrinen LFA-1 oder Mac-1, welche die Adhäsion und Migration von Leukozyten vermittelt (Lennartz *et al.*, 2015). Welche Rolle ICAM-1 bei der Zytoadhäsion von *PfiE* genau einnimmt, ist aber ebenso wie bei CD36 noch umstritten. Cooke *et al.* (1994; 1996) beobachtete eine rollende Bewegung der *PfiE* sowohl auf den humanen Endothelzellen HUVEC (engl. *human umbilical vein endothelial cell*), welche kein CD36 besitzen (Swerlick *et al.*, 1992), als auch auf einer mit ICAM-1 bedeckten Oberfläche. Anhand dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass die Interaktion zwischen *PfiE* und dem Rezeptor ICAM-1 zu einem Rollen der infizierten Erythrozyten über die Endothelzellen führt und somit eine Verlangsamung der iE verursacht, welche die Etablierung einer festen Bindung mit Hilfe anderer Rezeptoren ermöglicht. Allerdings ergaben andere Untersuchungen sowie die Ergebnisse dieser Arbeit Indizien dafür, dass die Interaktion mit ICAM-1 eine statische Bindung vermitteln kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *PfiE* auf transgenen CHO-Zellen, welche ICAM-1 auf der Oberfläche trugen, bei allen untersuchten Scherkräften

(0,9 - 6 dyn/cm²) eine statische Bindung zeigten. Das Gleiche konnte für beide untersuchten Laborstämme (IT4 und 3D7) gezeigt werden. Dieses Verhalten zeigte ebenfalls die Studie von Antia *et al.* (2007). Interessanterweise zeigte diese Studie zum einen eine rollende Bewegung der *PfiE* über eine Protein-bedeckte Oberfläche, während auf transgenen CHO-Zellen, eine statische Bindung stattfand. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Bindungsphänotypen, welche bisher bei der Interaktion mit ICAM-1 beobachtet wurden, könnte sein, dass die Proteine bei den Untersuchungen mit Protein-bedeckten Oberflächen keine richtige Faltung aufweisen. Dies könnte die *PfEMP1*-ICAM-1-Interaktion beeinträchtigen. Eine weitere Erklärung kann die ICAM-1-Konzentration der Ansätze sein, denn ICAM-1 kommt in geringer Konzentration auf den Endothelzellen wie die HUVEC vor, während transgene Zelllinien eine viel größere Menge an Proteinen auf der Oberfläche aufweisen. Die hohe Konzentration an Proteinen könnte zu einer stabileren Bindung auf den transgenen CHO-Zellen führen, woraus eine statische Bindung resultieren würde. Eine Abhängigkeit der Zytoadhäsion mit der Rezeptorkonzentration konnte in einer Studie mit dem Rezeptor CSA (engl. *chondroitin sulfate A*) gezeigt werden (Rieger *et al.*, 2015). Rieger *et al.* zeigte, dass die Anzahl an CSA-Molekülen sowie der Abstand zwischen den Molekülen auf einer Oberfläche essenziell für die Effizienz der Bindung ist. Eine weitere Studie konnte eine Steigerung der statischen Bindung von *PfiE* auf der Oberfläche von humanen Endothelzellen nach einer TNF α -Stimulierung zeigen (Yipp *et al.*, 2000). Das proinflammatorische Zytokin TNF α induzierte die Expression des Gens, welches für ICAM-1 kodiert (Hunt und Grau 2003; Wung *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse geben ein weiteres Indiz dafür, dass der Phänotyp der Interaktion zwischen *PfiE* und ICAM-1 von der ICAM-1-Konzentration auf der Oberfläche der Endothelzellen abhängig ist und das eine inflammatorische Reaktion zur statischen Bindung von *PfiE* auf Endothelzellen führen kann.

Die Transkriptomanalyse der ICAM-1 angereicherten Parasitenpopulationen zeigte beim IT4-Stamm eine angereicherte Population bei der ein signifikant großer Anteil der Parasiten überwiegend die *var*-Gene IT4_var01, IT4_var06, IT4_var16, IT4_var41 oder IT4_var63 exprimierten. Außerdem konnte ebenfalls eine erhöhte differentielle Expression des Gens IT4_var27 bei der IT4-ICAM-1 angereicherten Population nachgewiesen werden. Beim 3D7-Stamm zeigten bei der angereicherten Population zwei *var*-Gene eine signifikant erhöhte Expression (PFL0020w und MAL6P1.252) und die Expression des Gens MAL6P1.4 blieb bei der angereicherten Population hoch. Von diesen neun Genen kodieren sechs für die *PfEMP1*-Varianten, welche eine DBL β 5-Domäne aufweisen. Diese sind IT4_var01, IT4_var16, IT4_var27 und IT4_var27 beim IT4-Stamm sowie PFL0020w und MAL6P1.4 beim 3D7-

Stamm. Die DBL β 5-Domäne ist bekannt für die Interaktion mit ICAM-1 (Howell *et al.*, 2008; Bengtsson *et al.*, 2013). Warum die angereicherte Population ebenfalls eine differenzielle Expression von IT4_var06 und IT4_var63 (IT4-Stamm) sowie von MAL6P1.252 (3D7-Stamm) aufwies, obwohl sie die ICAM-1-Bindungsdomäne DBL β 5 nicht besitzen, kann dadurch erklärt werden, dass die Bindung in einer noch nicht bekannten Interaktion über eine weitere Domäne oder Domänenkombination (Domänenkassette) vermittelt wird. Eine andere Erklärung könnte eine unspezifische Anreicherung durch eine mögliche Interaktion der PfEMP1 mit einem anderen Rezeptor auf der CHO-Zelloberfläche sein. Nahla Metwally (Dissertation, 2016) zeigte eine erhöhte Expression von bestimmten *var*-Genen bei Parasitenpopulationen, welche auf CHO-Wildtypzellen angereichert wurden. Eines der Gene war der MAL6P1.252 vom 3D7-Stamm.

Des Weiteren wiesen, bis auf das Protein, welches vom Gen IT4_var06 (IT4-Stamm) kodiert wird, alle anderen angereicherten PfEMP1- eine Bindungsdomäne für CD36 auf. Dies erklärt warum die ICAM-1 angereicherten Populationen in den Bindungsexperimenten noch in der Lage waren an CD36 zu binden, während die CD36 angereicherten Populationen kaum noch eine Bindung an ICAM-1 zeigten.

4.1.3 Zytoadhäsion der PfIE an CD9

Der Rezeptor CD9 kommt auf der Oberfläche von verschiedenen Zelltypen vor und ist in Ereignissen, wie der Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten (Boucheix *et al.*, 1991) oder der Migration unterschiedlicher Krebszelllinien, involviert (Powner *et al.*, 2011). Im Jahr 2014 wurde CD9 zum ersten Mal als Rezeptor für die Zytoadhäsion von PfIE beschrieben (Esser *et al.*, 2014).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine schwache Bindung der untersuchten Laborstämme an CD9 unter Flussbedingungen. Beim 3D7-Stamm zeigte die PfIE bei einer Scherkraft von unter 2 dyn/cm² eine Bindung, während beim IT4-Stamm nur sehr wenige PfIE überhaupt eine Bindung zeigten und zwar ausschließlich bei einer Scherkraft von 0,9 dyn/cm². Nach 10 min bei einer Scherkraft von 0,9 dyn/cm² banden durchschnittlich lediglich fünf IT4-PfIE an CD9. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen aus Bindungsstudien unter statischen Bedingungen, welche mit diesen zwei Laborstämmen durchgeführt wurden. Auch hier konnte eine schwache Bindungskapazität beider Stämme auf CD9 festgestellt werden, wobei der 3D7-Stamm eine etwas stärkere Bindungskapazität als das IT4-Stamm aufwies (Tilly *et al.*, 2015). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Interaktion mit CD9 eine untergeordnete Rolle bei der Zytoadhäsion spielt. Allerdings zeigte die Studie von Esser *et al.* (2014), dass

Feldisolat bei der Bindung an CD9 eine stärkere Bindungskapazität als der Laborstamm IT4 aufwies, was zeigt, dass die Interaktion eine relevante Rolle bei der Zytoadhäsion spielen kann.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass die Bindung der *PfiE* an CD9 etwas lockerer war als z. B. bei ICAM-1, denn hier zeigten die *PfiE* oft eine einfache umklappende Bewegung. Diese erkennt man anhand der einzelnen Messungen bei denen die *PfiE* eine akkumulierte Distanz von bis zu 16 μm nach 10-minütiger Verfolgung bei einer mikrovaskulär-physiologischen Scherkraft von 0,9 dyn/cm^2 erreichten. Beim 3D7-Stamm zeigten vier der gebundenen *PfiE* sogar eine rollende Bewegung und erreichten eine akkumulierte Distanz von ca. 30 - 48 μm nach einer 10-minütigen Verfolgung bei 0,9 dyn/cm^2 . Dies könnte bedeuten, dass die *PfiE* auf einer Oberfläche bei der die Konzentration an CD9 geringer ist (als bei transgenen Zellen) eine rollende Bewegung zeigen könnten.

CD9 spielt bei der Leukozytenadhäsion eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass es Tetraspanin-Mikrodomäne bilden kann, welche die Adhäsion der Leukozyten an Endothelzellen reguliert (Barreiro *et al.*, 2005). Interessanterweise konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Leukozytenakkumlierung im Gehirn während einer Entzündungsreaktion von sogenannten EAPs (engl. *endothelial adhesive platforms*) vermittelt wird. Die EAPs sind kleine Ausstülpungen bestehend aus CD9 und ICAM-1, welche bei einer Entzündungsreaktion auf den Endothelzellen entstehen (Franz *et al.*, 2016). Dies könnte ebenfalls zu einer erhöhten Zytoadhäsion von *PfiE* an den Endothelzellen im Gehirn führen und somit eine zerebrale Malaria verursachen.

Außerdem ist es ein weiteres Indiz dafür, dass die Zytoadhäsion an Rezeptoren wie CD9 oder ICAM-1 durch eine Entzündungsreaktion verstärkt auftritt und gefährlich werden kann.

4.1.4 Zytoadhäsion der *PfiE* an P-Selektin

Der Rezeptor P-Selektin kommt sowohl in Endothelzellen als auch in Thrombozyten vor (Ley *et al.*, 2007). P-Selektin spielt bei der Rekrutierung von Leukozyten während einer lokalen Entzündungsreaktion eine Rolle (Granger und Kubes 1994), wo es für das Rollen und somit für die Verlangsamung der Leukozyten verantwortlich ist (Lawrence und Springer 1991). Im Jahr 1998 wurde P-Selektin zum ersten Mal als Rezeptor für die Zytoadhäsion von *PfiE* beschrieben (Ho *et al.*, 1998) und im Jahr 2001 wurde *PfEMP1* als Ligand für P-Selektin identifiziert (Senczuk *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass P-Selektin eine ähnliche Rolle bei der Zytoadhäsion der *PfiE* spielt wie bei der Rekrutierung der Leukozyten (Ho *et al.*, 1998; Helms *et al.*, 2016). In dieser Arbeit konnte eine Bindung von *PfiE* auf transgenen

CHO-Zellen, welche P-Selektin auf der Oberfläche trugen bereits bei einer Scherkraft von 4 dyn/cm² (IT4-Stamm) bzw. 3 dyn/cm² (3D7-Stamm) gezeigt werden. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem was bei der Interaktion mit den Rezeptoren CD36 und ICAM-1 beobachtet wurde. So könnte nach diesen Beobachtung eine Interaktion mit jedem dieser Rezeptoren dafür verantwortlich sein, dass die *PfiE* aus dem Blutstrom entzogen werden. Allerdings ist P-Selektin in den Endothelzellen normalerweise in kleinen Zellorganellen (Weibel-Palade-Körperchen) gelagert und wird erst während einer lokalen Entzündungsreaktion an die Oberfläche der Zellen rekrutiert (Bonfanti *et al.*, 1989; Bevilacqua und Nelson 1993; Mayadas *et al.*, 1993; Granger und Kubes, 1994). Somit wäre eine lokale Entzündungsreaktion eine Voraussetzung für die Zytoadhäsion der *PfiE* an P-Selektin. Die Untersuchung zur Dynamik der Interaktion mit dem Rezeptor ergab, dass die Interaktion zu einer statischen Bindung führt, ähnlich wie bei der Interaktion zwischen *PfiE* und ICAM-1. Eine Bindungsstudie mit HDMECs (engl. *human dermal microvascular endothelial cells*), welche mit dem Zytokin Oncostatin-M (OSM) behandelt wurden, zeigte eine Erhöhung sowohl bei der Anzahl der rollenden *PfiE* als auch bei der Anzahl der adhärenen *PfiE* (statische Bindung). OSM ist ein Mitglied der IL-6-Zytokinfamilie und ist in der Lage die Produktion von P-Selektin zu stimulieren (Yipp *et al.*, 2000). Eine andere Studie untersuchte das Verhältnis der Bindung auf einer mit P-Selektin-bedeckten Oberfläche sowie auf Thrombozyten, welche sowohl P-Selektin als auch CD36 auf der Oberfläche aufweisen (Ho *et al.*, 1998). Diese Studie zeigte eine rollende Bewegung der *PfiE* auf der Protein-bedeckten Oberfläche, während auf den Thrombozyten, sowohl eine rollende Bewegung als auch eine statische Bindung beobachtet werden konnte. Eine Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper gegen P-Selektin führte in der Studie von Ho *et al.* zu einer Inhibierung der rollenden Bewegung sowie der statischen Bindung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bindung der *PfiE* an P-Selektin beide Bindungsphänotypen aufweisen kann und dass die Interaktion ebenfalls von der Konzentration an Rezeptoren auf der Zelloberfläche abhängig zu sein scheint.

4.1.5 Die Hypothese

Im Laufe der Zeit entwickelte sich die Hypothese, dass die *PfiE* durch eine Interaktion mit Selektinen, wie P-Selektin, aus dem Blutstrom entnommen werden und anschließend über diverse Rezeptoren u. a. ICAM-1 rollen und langsamer werden bis sie schließlich an CD36 fest adhären (Ho und White, 1999; Helms *et al.*, 2016) (Siehe Abb. 36A). Allerdings lassen die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten vermuten, dass die Dynamik der Zytoadhäsion

von *PfiE* anders aussehen könnte, wodurch hier eine neue Hypothese vorgeschlagen wird. Danach wäre CD36 der wichtigste Rezeptor im Zytoadhäsionsmechanismus des Parasiten. Die Interaktion zwischen *PfEMP1* und CD36 findet in den kleinen Kapillaren statt, wo die Scherkraft gering ist. Die Interaktion mit CD36 führt zu einem Rollen der *PfiE* über das Endothelium. Gleichzeitig würde es eine Signalkaskade induzieren, die zu einer Remodulierung des Aktinzytoskeletts der Endothelzellen sowie zur Akkumulation von CD36 und zu der Rekrutierung vom $\alpha_5\beta_1$ -Integrin, welches mit CD36 synergetisch agiert, führt (Davis *et al.*, 2012; Davis *et al.*, 2013). Das alles würde zu einer Verstärkung der Bindung an CD36 führen. Diese soll zum einen dazu dienen die Geschwindigkeit des Rollens zu reduzieren und somit auch die Wahrscheinlichkeit der *PfiE* trotz Rollen in die Milz zu gelangen. Zum anderen soll es dazu dienen eine verstärkte Bindung zu etablieren, die in der Lage ist die höheren Scherkräfte in den postkapillaren Blutgefäßen auszuhalten. Auf diesem Weg könnte der Parasit eine Eliminierung durch die Milz vermeiden ohne den Blutfluss in den Kapillaren stark zu beeinträchtigen, was bei statischen Bindungen der Fall wäre. Da ca. 70 - 80 % der *PfEMP1* eine CD36-Bindungsdomäne aufweisen, würde dies der Hauptmechanismus für die Zytoadhäsion von *PfiE* darstellen. Allerdings könnte die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, welche u. a. auch durch erste Liganden-Rezeptor-Interaktionen verursacht werden könnte (Tripathi *et al.*, 2009), zu einer Rekrutierung von anderen Rezeptoren, wie beispielsweise ICAM-1 oder P-Selektin sowie zur Ausbildung von Komplexen wie die EAPs, führen (Bonfanti *et al.*, 1989; Bevilacqua und Nelson 1993; Mayadas *et al.*, 1993; Granger und Kubes, 1994; Hunt und Grau 2003; Wung *et al.*, 2005; Franz *et al.*, 2016). Diese Reaktion könnte schließlich zu einer, sowohl aus Sicht des Parasiten als auch aus Sicht des Wirts, ungünstigen statischen Bindung führen, welche zu diversen Komplikationen und somit zu einer schweren Erkrankung an Malaria führen könnte (Siehe Abb. 36B).

Dennoch sind bis heute insgesamt über 20 humane Endothelrezeptoren bekannt, die eine Rolle bei der Zytoadhäsion spielen aber für die meisten davon fehlen genauere Untersuchungen zur Charakterisierung der Liganden-Rezeptor-Interaktion (Rogerson *et al.*, 1995; Baruch *et al.*, 1996; Fried und Duffy 2002; Rowe *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2013; Turner *et al.*, 2013; Esser *et al.*, 2014). Um mehr Klarheit über diesen so komplexen Mechanismus zu erhalten, wäre es wichtig mehr über die einzelnen Interaktionen zu erfahren, wie z. B. über die Domäne bzw. Domänenkassetten die die Interaktion vermitteln oder welche Faktoren ausschlaggebend für die unterschiedlichen Bindungsphänotypen sind.

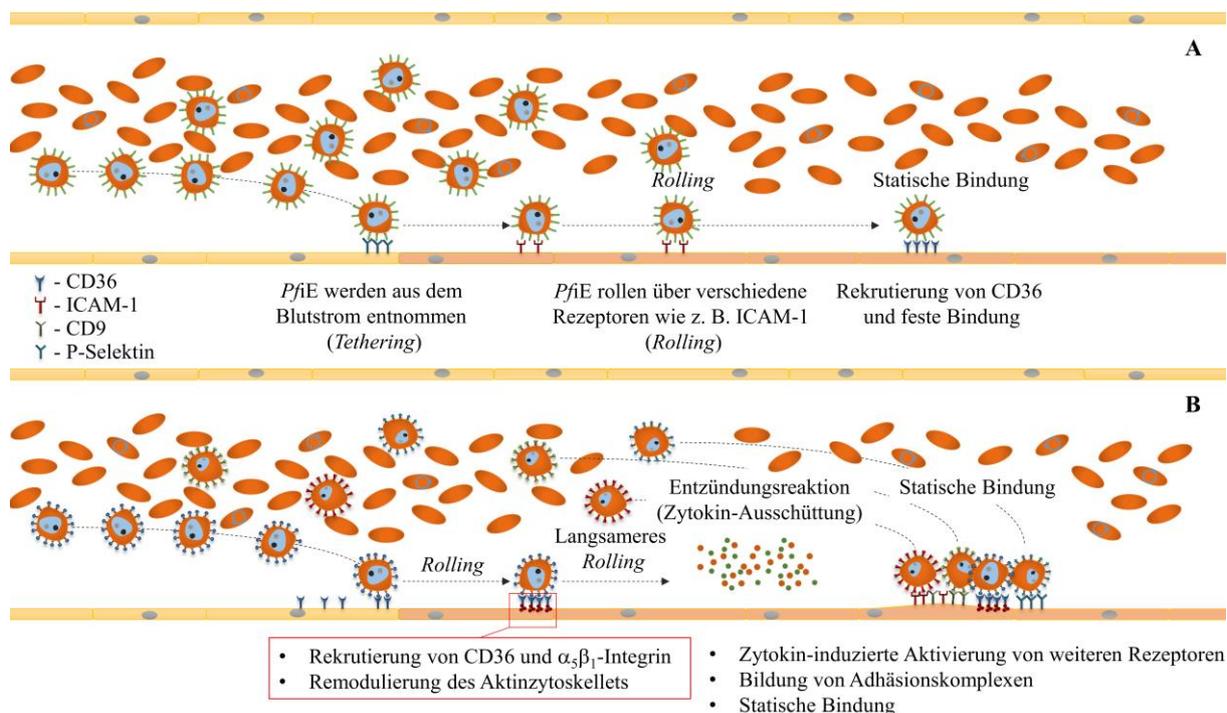


Abbildung 36: Vergleich zwischen zwei Hypothesen für die Zytoadhäsion von *P. falciparum* an Endothelzellen. Die Abbildung zeigt den Vergleich zwischen der klassischen, etablierten Hypothese (A) und der in dieser Arbeit aufgestellten Hypothese (B). **A:** Bei der klassischen Hypothese, werden die *PfiE* durch die Interaktion mit Selektinen wie z. B. P-Selektin aus der Blutbahn entzogen. Anschließend rollen sie über mehrere Rezeptoren und werden langsamer, bis sie schließlich nach einer Rekrutierung von CD36 fest binden. **B:** Bei der in dieser Arbeit aufgestellten Hypothese findet eine Interaktion der *PfiE* mit CD36 statt. Die *PfiE* rollen über CD36. Es kommt zur Remodulierung des Aktinzytoskeletts sowie zu einer Rekrutierung von weiteren CD36 und von $\alpha_5\beta_1$ -Integrin führen, welche zusammen einen Bindungskomplex bilden. Dies dient dazu die Bindung an CD36 zu verstärken, was zu einem langsameren Rollen führt. Das würde vermeiden, dass die Zellen die Milz erreichen oder dass die Bindung die höhere Scherkraft in den postkapillaren Gefäßen aushalten können. Nach dieser Hypothese würde außerdem eine Entzündungsreaktion dazu führen, dass andere Rezeptoren in größerer Konzentration auf der Oberfläche der Endothelzellen präsentiert werden sowie zur Ausbildung von weiteren Adhäsionskomplexen wie z. B. die EAPs (engl. *endothelial adhesive platforms*), welche aus CD9 und ICAM-1 bestehen. Dies wiederum könnte zu einer Steigerung der statischen Bindung von *PfiE* an Endothelzellen führen, welche eine verstärkte Beeinträchtigung von mikrovaskulären Gefäßen verursachen würde und somit gefährliche Komplikationen im Krankheitsverlauf hervorrufen könnten.

4.2 Lokalisation der VIR-Proteine in Transgene *P. falciparum*-Zelllinien

In den letzten Jahren häuften sich schwere Malariafälle, die einer *P. vivax*-Infektion zugeordnet werden konnte (Kochar *et al.*, 2005; Barcus *et al.*, 2007; Tjitra *et al.*, 2008; Genton *et al.*, 2008). Noch ist unklar, ob diese Steigerung mit der Entwicklung von besseren Diagnostikmethoden zusammenhängt oder ob *P. vivax* virulenter geworden ist (Baird, 2013). Lange Zeit wurde angenommen, dass *P. vivax* infizierte Retikulozyten (*PviR*) nicht in der Lage sind an Endothelzellen zu adhären, denn im Gegensatz zu *PfiE*, bei denen fast ausschließlich Ringstadien im peripheren Blut zu finden sind, sind alle intraerythrozytären Stadien des *P. vivax* im Blut sichtbar. Allerdings konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass *P. vivax* infizierte Retikulozyten in der Lage sind an Endothelzellen zu adhären und dass die VIR-Proteine bei dieser Funktion höchstwahrscheinlich eine Rolle spielen (Ansari *et*

al., 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Bernabeu *et al.*, 2012; Chotivanich *et al.*, 2012; De las Salas *et al.*, 2013).

Unglücklicherweise gestaltet sich die Forschung mit *P. vivax* vor allem aufgrund eines fehlenden kontinuierlichen *in vitro*-Kultursystems schwierig. Um Lokalisationsstudien mit den VIR-Proteinen durchführen zu können, wurden hier transgene *P. falciparum*-Zelllinien verwendet. Da *P. vivax*-Promoterregionen in *P. falciparum* nicht erkannt werden (Azevedo und del Portillo, 2007), wurde hierfür der pARL1-Vektor verwendet, welcher einen *Pf*ert-Promoter (engl. *P. falciparum chloroquine resistance transporter*) besitzt. Der *Pf*ert-Promoter ist ab ca. 16 Std. nach der Invasion aktiv und eignet sich somit um die Lokalisation der Proteine im Trophoziten- bzw. Schizontenstadium des Parasiten zu ermitteln. Die untersuchten VIR-Proteine zeigten unterschiedliche Lokalisationen, was auf unterschiedliche Funktionen der Proteine schließen lässt. Des Weiteren konnte die Lokalisation des bereits in einer anderen Studie (Bernabeu *et al.*, 2012) untersuchten VIR14, welches in der Erythrozytenmembran (EM) lokalisiert ist, hier bestätigt werden. Schließlich wurde in dieser Arbeit ein weiteres Protein (VIR21-like - PVX_088790) identifiziert, welches aufgrund der Kolokalisations-Untersuchung vermutlich an der Oberfläche der Erythrozyten lokalisiert ist. Dieses könnte bei der Zytoadhäsion von *PviR* an Endothelzellen eine Rolle spielen.

4.2.1 Der Export von VIR-Proteinen

Bis auf die Negativkontrolle wurden alle in dieser Arbeit untersuchten VIR-Proteine bei den transgenen *P. falciparum*-Zelllinien aus dem Parasiten in die Wirtszelle exportiert. Dies zeigt, dass *P. vivax* über einen ähnlichen Exportmechanismus wie *P. falciparum* verfügen muss. Allerdings konnte oft eine Akkumulierung der Proteine im Parasit beobachtet werden, was auf eine geringere Effizienz bei dem Transport von VIR-Proteinen in *P. falciparum* zurückzuführen ist. Bei *P. falciparum* sind zwei Gruppen von exportierten Proteinen bekannt. Die PEXEL-Proteine und die PNEP (Hiller *et al.*, 2004; Marti *et al.*, 2004; Spielmann und Gilberger, 2010) (Siehe Punkt 1.4.1). Für den Export von PEXEL-Proteinen spielt die Protease Plasmepsin V (PMV) eine essenzielle Rolle (Chang *et al.*, 2008; Boddey *et al.*, 2009; Boddey *et al.*, 2010; Russo *et al.*, 2010; Sleebs *et al.*, 2014). Eine Studie zur Charakterisierung des PMV konnte eine starke Homologie (82.2 % Ähnlichkeit, 54.7 % Identität) und eine ähnliche Aktivität zwischen den PMV aus *P. vivax* und *P. falciparum* nachweisen (Sleebs *et al.*, 2014). Andere Studien zeigten, dass 160 VIR-Proteine ein PEXEL-ähnliches Motiv besitzen (Bernabeu *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2013). Allerdings weisen die PEXEL-Motive von *P. falciparum* eine konservierte Lokalisation innerhalb des Proteins auf,

welche wichtig ist um die kotranslationale Spaltung durch PMV zu gewährleisten (Boddey *et al.*, 2016). Dennoch zeigte die in dieser Arbeit durchgeführte *in silico*-Analyse, dass das bei den VIR-Proteinen nicht der Fall ist. Zwar wiesen viele der VIR-Proteine ein PEXEL-ähnliches Motiv auf aber dieses zeigte in den allermeisten Fällen nicht die konservierte Lokalisation, die für *P. falciparum* beschrieben wurde. Den VIR-Proteinen fehlt auch in den allermeisten Fällen ein Signalpeptid. Dies konnte lediglich für drei der 291 untersuchten VIR-Proteine gezeigt werden. 171 der VIR-Proteine zeigten eine Transmembrandomäne. Diese wiesen somit, durch das Fehlen eines Signalpeptids und das Vorhandensein einer Transmembrandomäne, die klassischen Eigenschaften der *P. falciparum*-PNEPs auf (Spycher *et al.*, 2008; Haase *et al.*, 2009; Saridaki *et al.*, 2009; Grüning *et al.*, 2012). Das lässt vermuten, dass die VIR-Proteine auf einem ähnlichen Weg wie die PNEPs exportiert werden können.

4.2.2 Die Lokalisation der Proteine VIR5-like, VIR12-related, VIR12-like und VIR24-like

Vier der untersuchten VIR-Proteine, VIR5-like (PVX_093715), VIR12-related (PVX_124705), VIR12-like (PVX_090335) und VIR24-like (PVX_086855), zeigten eine Kolokalisation mit dem Maurer'schen Spalten-assoziierten Protein SBP1. Dies konnte sowohl im Trophozoiten- als auch im Schizontenstadium nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die Maurer'schen Spalten ihr Zielort sind und dass sie hier eine Funktion ausüben (Siehe Abb. 37B und C). Zu den Funktionen, welche in den Maurer'schen Spalten ausgeübt werden, zählen vor allem das Sortieren und der Transport von Proteinen (Mundwiler-Pachtlatko und Beck, 2013). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Störung der Genexpression von Genen, die für die Maurer'schen Spalten-assoziierten Proteine REX1, SBP1 oder MAHRP1 kodieren, zur Beeinträchtigung des PfEMP1-Exports an die EM führte (Cooke *et al.*, 2006; Spycher *et al.*, 2008; McHugh *et al.*, 2015). Dass die VIR-Proteine exportiert werden, deutet auf einen ähnlichen Exportmechanismus zwischen *P. falciparum* und *P. vivax* hin. Aufgrund der Kolokalisation mit SBP1, könnte man vermuten, dass diese vier VIR-Proteine bei *P. vivax* eine ähnliche Lokalisation wie z. B. in den *Clefts* (Maurer'sche Spalten-ähnliche Strukturen) oder in den Caveolae-Vesikeln haben, welche im *P. vivax* ebenfalls mit dem Transport von Proteinen in Verbindung gebracht werden (Aikawa, 1988).

Die Ergebnisse der IFA zeigten für die Proteine VIR5-like und VIR12-related zusätzlich zu der Kolokalisation mit SBP1 ebenfalls einzelne Bereiche, wo keine Kolokalisation vorhanden war (Siehe Abb. 29D und 30D). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die heterologe

Transfektion sein. Genauso wie es in manchen Fällen zu einer Akkumulierung von VIR-Proteinen im *P. falciparum*-Parasiten kommt, könnten manche VIR-Proteine in *P. falciparum* Schwierigkeiten haben ihren Zielort zu erreichen. Somit könnten sich diese Proteine als Proteintransportaggregat (PTA) (Papakrivov *et al.*, 2005; Grüning *et al.*, 2011; Grüning *et al.*, 2012) oder in Vesikeln im erythrozytären Zytosol befinden (Siehe Abb. 37B).

Interessanterweise zeigte eine andere Arbeitsgruppe in einer Immunfluoreszenzanalyse ein ähnliches Bild als sie versuchte SBP1 mit dem Hitzeschockprotein 40 (HSP40), welches von dem Gen *pfe0055c* kodiert wird, zu kolokalisieren. Hierbei hat HSP40 eine punktuell-verteilte Lokalisation, welche nur zum Teil mit SBP1 kolokalisierte (Bhattacharjee *et al.*, 2008). HSP40 bildet zusammen mit HSP70 einen Chaperonkomplex, das sogenannte J-Dot (Banumathy *et al.*, 2002; Külzer *et al.*, 2010; Külzer *et al.*, 2012). Dieser Komplex bildet wiederum mit Transmembranproteinen den PTA, wodurch diese Proteine innerhalb des erythrozytären Zytosols transportiert werden können. Somit könnten sich die Proteine *VIR5-like* und *VIR12-related* zum Teil noch in diesen PTAs befinden.

4.2.3 Die Lokalisation der Proteine *VIR14-putative*, *VIR21-like*

Die Studie von Bernabeu *et al.* (2012) postulierte, dass das Protein *VIR14-putative* (PVX_108770) auf der Oberfläche von infizierten Erythrozyten lokalisiert ist und dort die Adhäsion an ICAM-1 vermitteln könnte. Anhand der IFA-Ergebnisse konnte hier die von Bernabeu *et al.* postulierte Lokalisation für *VIR14* in der EM bestätigt werden. Auch hier konnte keine Kolokalisation dieses Proteins mit SBP1 gezeigt werden, was wie schon in der Arbeit von Bernabeu *et al.* erwähnt wurde auf einen MC-unabhängigen Transport des Proteins an die EM hindeutet. Allerdings konnte man bei den Schizonten einige Bereiche beobachten, bei denen eine Kolokalisation vorhanden zu sein scheint. Diese können durch Zufall entstanden sein, indem Bereiche, wo das Protein akkumuliert war und die MCs, durch Zufall bei der Fixierung überlagert wurden. Anders als in der Studie von Bernabeu *et al.* konnte hier eine Kolokalisation mit der *PfEMP1*-konservierten Domäne (ATS) nachgewiesen werden. Dennoch, obwohl die Arbeit von Bernabeu *et al.* keine Kolokalisation zwischen *VIR14* und der ATS-Domäne zeigen konnte, berichtete sie von einer *VIR14*-Lokalisation, die sehr dicht an der Lokalisation der *PfEMP1* ist. Zusätzlich zu der Kolokalisation von *VIR14* mit der ATS-Domäne, scheint *VIR14* ebenfalls eine partielle Kolokalisation mit dem EM-assoziierten Protein Spektrin zu zeigen. Dies deutet darauf hin, dass *VIR14* nicht nur akkumuliert in bestimmten Bereiche der Zelloberfläche vorkommt, sondern auch weniger akkumuliert und verteilt über die gesamte EM vorhanden sein kann. Eine mögliche Erklärung

hierfür könnte sein, dass die punktuelle Färbung, welche auf eine Akkumulierung des Proteins in bestimmten Bereichen hindeutet, ein Effekt des heterogenen Transfektionssystems ist. Somit würde VIR14 im *P. falciparum* überwiegend an bestimmten Regionen der EM transportiert werden wie die PfEMP1, welche zu den Knobs transportiert werden, während es in dem Knobs-losen *P. vivax* nicht akkumuliert, sondern gleichmäßig an der EM verteilt vorkommen kann. Um diese Theorie bestätigen zu können, wäre es wichtig einen spezifischen Antikörper gegen das Protein VIR14 zu entwickeln, um dieses Protein mit Hilfe von IFA-Studien in *P. vivax* infizierten Retikulozyten lokalisieren zu können.

Des Weiteren konnte noch ein Protein identifiziert werden, welches höchstwahrscheinlich ebenfalls an der EM lokalisiert ist, das Protein VIR21-like (PVX_088790). Interessanterweise zeigte VIR21 anders als VIR14 im Trophozoitenstadium eine Kollokalisierung mit SBP1, während es im Schizontenstadium mit ATS kollokalisiert war. Dies zeigt, dass VIR21 vermutlich über die Maurer'schen Spalten in die Erythrozytenmembran transportiert wird. Dass VIR21 im Trophozoitenstadium noch in den MCs lokalisiert ist und erst im Schizontenstadium auf der Oberfläche präsentiert zu sein scheint, ist ein wichtiger Aspekt, denn es wird postuliert, dass *P. vivax* erst in späteren Stadien adhären kann (Field und Reid, 1956; Lopes *et al.*, 2014). Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass VIR21 eine Rolle bei der Zytoadhäsion von *P. vivax* infizierten Retikulozyten spielen kann.

Interessanterweise wiesen beide untersuchten VIR-Proteine (VIR14 und VIR21), welche eine Kollokalisierung mit der ATS-Domäne der PfEMP1 zeigten, ein PEXEL-ähnliches Motiv auf (Siehe Abb. 35). Dies zeigte außerdem die in *P. falciparum* beschriebene konservierte Lokalisation, welche notwendig ist, um die Prozessierung durch PMV zu gewährleisten (Boddey *et al.*, 2016). In einer erneuten Analyse der VIR-Proteinsequenzen konnte diese Eigenschaft bei weiteren neun VIR-Proteinen ermittelt werden (Siehe Tab. 9). Die Arbeit von Schulze *et al.* (2015) untersuchte die Funktionalität von PEXEL-ähnlichen Motiven. Dafür wurden Reporterproteine verwendet, welche ein klassisches PEXEL-Motiv aufweisen. Durch den gezielten Austausch von einzelnen Aminosäuren konnte gezeigt werden, dass die erzeugten PEXEL-ähnlichen Motive teilweise funktionell blieben. Anhand dieser Erkenntnisse könnte diese Eigenschaft ein Ansatzpunkt auf der Suche nach weiteren *P. vivax*-Proteinen sein, welche an die EM exportiert werden und eine Rolle bei der Zytoadhäsion von *P. vivax* an Endothelzellen spielen können.

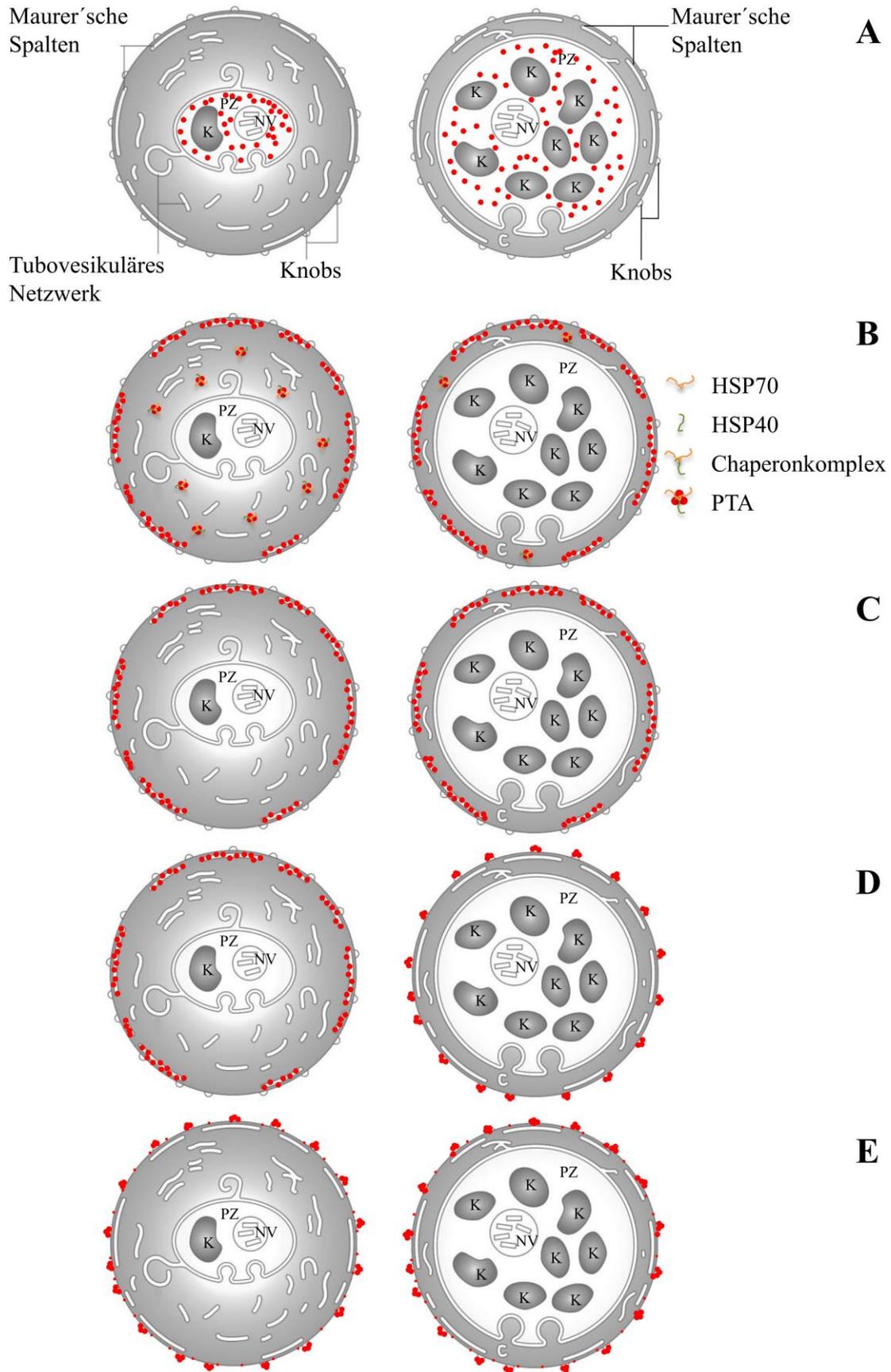


Abbildung 37: Putative Lokalisation der VIR-Proteine. Die Abbildung zeigt die, anhand der IFA, ermittelte putative Lokalisation der untersuchten VIR-Proteine sowohl in Trophozoiten (links) als auch in Schizonten (rechts). A: VIR6-putative; B: VIR5-like und VIR12-related; C: VIR12-like und VIR24-like; D: VIR21-like; E: VIR14-putative. Die Proteine werden durch die roten Punkte dargestellt (nach Meier *et al.*, 2009; modifiziert).

5 Fazit

In dieser Arbeit wurde anhand der Ergebnisse der Bindungsstudie mit *PfiE* auf unterschiedlichen Endothelrezeptoren eine neue Hypothese für die Zytoadhäsion von *P. falciparum* an Endothelzellen entwickelt, die sich von den bisherigen Annahmen unterscheidet. Nach der neuen Hypothese wäre CD36 weiterhin der Hauptrezeptor für die Zytoadhäsion, allerdings weisen die *PfiE* bei der Interaktion mit CD36 keine statische Bindung auf wie bisher postuliert wurde. Die Interaktion vermittelt das Rollen der *PfiE* über das Endothelium. Somit könnte der Parasit eine Eliminierung durch die Milz vermeiden ohne den Blutfluss in den Kapillaren stark zu beeinträchtigen. Andere Rezeptoren wie z. B. ICAM-1, CD9 und P-Selektin würden in geringer Konzentration auf der Zelloberfläche ebenfalls ein Rollen der *PfiE* vermitteln und zunächst aufgrund der geringeren Anzahl an Liganden (*PfEMP1*), welche mit den jeweiligen Rezeptor interagieren kann, eine untergeordnete Rolle bei der Zytoadhäsion spielen. Allerdings werden diese Rezeptoren durch Entzündungsreaktionen rekrutiert, somit kommt es zu einer Erhöhung der Konzentration dieser Rezeptoren auf der Oberfläche der Endothelzellen und zu Ausbildung von Adhäsionskomplexen, wodurch die Bindungen verstärkt werden und statische Bindungen entstehen. Dies könnte eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung der schweren Form der Malariaerkrankung spielen.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit mit Hilfe einer Lokalisationsstudie sowohl der Export als auch eine unterschiedliche Lokalisation der *P. vivax* VIR-Proteine nachgewiesen werden. Der Unterschied bei der Lokalisation zwischen den VIR-Proteinen lässt auf unterschiedliche Funktionen der Proteine schließen. Zudem wurde ein VIR-Protein (VIR21-like - PVX_088790) identifiziert, welches an die Erythrozytenmembran exportiert wird und eine Rolle bei der Zytoadhäsion von *P. vivax* spielen kann. Es konnte gezeigt werden, dass zwei Proteine, die an die EM exportiert wurden, ein PEXEL-ähnliches Motiv aufweisen, was ein wichtiger Ansatzpunkt auf der Suche nach weiteren Proteinen, welche an der Zytoadhäsion von *P. vivax* an Endothelzellen involviert sind, sein könnte.

Die Zytoadhäsion ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor bei der Malariaerkrankung und kann sowohl bei einer *P. falciparum*- als auch bei einer *P. vivax*-Infektion zur schweren Malaria führen, welche tödlich enden kann. Aus diesem Grund ist es von großer Wichtigkeit diesen Mechanismus genauer zu charakterisieren, damit geeignete Therapien und Impfstoffe gezielt entwickelt werden können.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, S., Turner, G. D., Nash, G. B., Micklem, K., Newbold, C. I., & Craig, A. G. (2000). Differential binding of clonal variants of *Plasmodium falciparum* to allelic forms of intracellular adhesion molecule 1 determined by flow adhesion assay. *Infect Immun*, 68(1), 264-269.
- Aikawa, M. (1988). Morphological changes in erythrocytes induced by malarial parasites. *Biol Cell*, 64(2), 173-181.
- Anderson, E. C., Petersen, D. F., & Tobey, R. A. (1970). Density invariance of cultured Chinese hamster cells with stage of the mitotic cycle. *Biophys J*, 10(7), 630-645.
- Andrews, K. T., Adams, Y., Viebig, N. K., Lanzer, M., & Schwartz-Albiez, R. (2005). Adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CHO-745 cells and inhibition of binding by protein A in the presence of human serum. *Int J Parasitol*, 35(10), 1127-1134.
- Ansari, F. A., Kumar, N., Bala Subramanyam, M., Gnanamani, M., & Ramachandran, S. (2008). MAAP: malarial adhesins and adhesin-like proteins predictor. *Proteins*, 70(3), 659-666.
- Anstey, N. M., Handojo, T., Pain, M. C., Kenangalem, E., Tjitra, E., Price, R. N., & Maguire, G. P. (2007). Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *J Infect Dis*, 195(4), 589-596.
- Antia, M., Herricks, T., & Rathod, P. K. (2007). Microfluidic modeling of cell-cell interactions in malaria pathogenesis. *PLoS Pathog*, 3(7), e99.
- Arese, P., & Schwarzzer, E. (1997). Malarial pigment (haemozoin): a very active 'inert' substance. *Ann Trop Med Parasitol*, 91(5), 501-516.
- Autino, B., Corbett, Y., Castelli, F., & Taramelli, D. (2012). Pathogenesis of malaria in tissues and blood. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 4(1), e2012061.
- Azevedo, M. F., & del Portillo, H. A. (2007). Promoter regions of *Plasmodium vivax* are poorly or not recognized by *Plasmodium falciparum*. *Malar J*, 6, 20.
- Bachmann, A., Petter, M., Tilly, A. K., Biller, L., Uliczka, K. A., Duffy, M. F., Tannich, E., & Bruchhaus, I. (2012). Temporal expression and localization patterns of variant surface antigens in clinical *Plasmodium falciparum* isolates during erythrocyte schizogony. *PLoS One*, 7(11), e49540.
- Baillie, A. G., Coburn, C. T., & Abumrad, N. A. (1996). Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J Membr Biol*, 153(1), 75-81.
- Baird, J. K. (2013). Evidence and implications of mortality associated with acute *Plasmodium vivax* malaria. *Clin Microbiol Rev*, 26(1), 36-57.
- Bannister, L. H., & Dluzewski, A. R. (1990). The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells*, 16(2-3), 257-292; discussion 293-257.
- Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S., & Mitchell, G. H. (2000). A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol Today*, 16(10), 427-433.
- Bannister, L. H., Mitchell, G. H., Butcher, G. A., & Dennis, E. D. (1986). Lamellar membranes associated with rhoptries in erythrocytic merozoites of *Plasmodium knowlesi*: a clue to the mechanism of invasion. *Parasitology*, 92 (Pt 2), 291-303.

- Banumathy, G., Singh, V., & Tatu, U. (2002).** Host chaperones are recruited in membrane-bound complexes by *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 277(6), 3902-3912.
- Barber, B. E., William, T., Grigg, M. J., Parameswaran, U., Piera, K. A., Price, R. N., Yeo, T. W., & Anstey, N. M. (2015).** Parasite biomass-related inflammation, endothelial activation, microvascular dysfunction and disease severity in *vivax* malaria. *PLoS Pathog*, 11(1), e1004558.
- Barcus, M. J., Basri, H., Picarima, H., Manyakori, C., Sekartuti, Elyazar, I., Bangs, M. J., Maguire, J. D., & Baird, J. K. (2007).** Demographic risk factors for severe and fatal *vivax* and *falciparum* malaria among hospital admissions in northeastern Indonesian Papua. *Am J Trop Med Hyg*, 77(5), 984-991.
- Barnwell, J. W. (1989).** Cytoadherence and sequestration in *falciparum* malaria. *Exp Parasitol*, 69(4), 407-412.
- Barreiro, O., Yanez-Mo, M., Sala-Valdes, M., Gutierrez-Lopez, M. D., Ovalle, S., Higginbottom, A., Monk, P. N., Cabanas, C., & Sanchez-Madrid, F. (2005).** Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood*, 105(7), 2852-2861.
- Baruch, D. I., Gormely, J. A., Ma, C., Howard, R. J., & Pasloske, B. L. (1996).** *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(8), 3497-3502.
- Beck, J. R., Muralidharan, V., Oksman, A., & Goldberg, D. E. (2014).** PTEX component HSP101 mediates export of diverse malaria effectors into host erythrocytes. *Nature*, 511(7511), 592-595.
- Bengtsson, A., Joergensen, L., Rask, T. S., Olsen, R. W., Andersen, M. A., Turner, L., Theander, T. G., Hviid, L., Higgins, M. K., Craig, A., Brown, A., & Jensen, A. T. (2013).** A novel domain cassette identifies *Plasmodium falciparum* PfEMP1 proteins binding ICAM-1 and is a target of cross-reactive, adhesion-inhibitory antibodies. *J Immunol*, 190(1), 240-249.
- Bernabeu, M., Lopez, F. J., Ferrer, M., Martin-Jaular, L., Razaname, A., Corradin, G., Maier, A. G., Del Portillo, H. A., & Fernandez-Becerra, C. (2012).** Functional analysis of *Plasmodium vivax* VIR proteins reveals different subcellular localizations and cytoadherence to the ICAM-1 endothelial receptor. *Cell Microbiol*, 14(3), 386-400.
- Bevilacqua, M. P., & Nelson, R. M. (1993).** Selectins. *J Clin Invest*, 91(2), 379-387.
- Bhattacharjee, S., Stahelin, R. V., Speicher, K. D., Speicher, D. W., & Haldar, K. (2012).** Endoplasmic reticulum PI(3)P lipid binding targets malaria proteins to the host cell. *Cell*, 148(1-2), 201-212.
- Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Balu, B., Adams, J. H., & Haldar, K. (2008).** Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum* are secretory organelles that concentrate virulence protein reporters for delivery to the host erythrocyte. *Blood*, 111(4), 2418-2426.
- Blackman, M. J., Heidrich, H. G., Donachie, S., McBride, J. S., & Holder, A. A. (1990).** A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med*, 172(1), 379-382.
- Blisnick, T., Morales Betoulle, M. E., Barale, J. C., Uzureau, P., Berry, L., Desroses, S., Fujioka, H., Mattei, D., & Braun Breton, C. (2000).** PfSBP1, a Maurer's cleft *Plasmodium falciparum* protein, is associated with the erythrocyte skeleton. *Mol Biochem Parasitol*, 111(1), 107-121.

- Boddey, J. A., & Cowman, A. F. (2013).** *Plasmodium* nesting: remaking the erythrocyte from the inside out. *Annu Rev Microbiol*, 67, 243-269.
- Boddey, J. A., Hodder, A. N., Gunther, S., Gilson, P. R., Patsiouras, H., Kapp, E. A., Pearce, J. A., de Koning-Ward, T. F., Simpson, R. J., Crabb, B. S., & Cowman, A. F. (2010).** An aspartyl protease directs malaria effector proteins to the host cell. *Nature*, 463(7281), 627-631.
- Boddey, J. A., Moritz, R. L., Simpson, R. J., & Cowman, A. F. (2009).** Role of the *Plasmodium* export element in trafficking parasite proteins to the infected erythrocyte. *Traffic*, 10(3), 285-299.
- Boddey, J. A., O'Neill, M. T., Lopaticki, S., Carvalho, T. G., Hodder, A. N., Nebl, T., Wawra, S., van West, P., Ebrahimzadeh, Z., Richard, D., Flemming, S., Spielmann, T., Przyborski, J., Babon, J. J., & Cowman, A. F. (2016).** Export of malaria proteins requires co-translational processing of the PEXEL motif independent of phosphatidylinositol-3-phosphate binding. *Nat Commun*, 7, 10470.
- Bonfanti, R., Furie, B. C., Furie, B., & Wagner, D. D. (1989).** PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood*, 73(5), 1109-1112.
- Boucheix, C., Benoit, P., Frachet, P., Billard, M., Worthington, R. E., Gagnon, J., & Uzan, G. (1991).** Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins. *J Biol Chem*, 266(1), 117-122.
- Boyle, M. J., Wilson, D. W., & Beeson, J. G. (2013).** New approaches to studying *Plasmodium falciparum* merozoite invasion and insights into invasion biology. *Int J Parasitol*, 43(1), 1-10.
- Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Suarez, Y., Lasuncion, M. A., & Vega, M. A. (1998).** Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res*, 39(4), 777-788.
- Carlton, J. M., Adams, J. H., Silva, J. C., Bidwell, S. L., Lorenzi, H., Caler, E., Crabtree, J., Angiuoli, S. V., Merino, E. F., Amedeo, P., Cheng, Q., Coulson, R. M., Crabb, B. S., Del Portillo, H. A., Essien, K., Feldblyum, T. V., Fernandez-Becerra, C., Gilson, P. R., Gueye, A. H., Guo, X., Kang'a, S., Kooij, T. W., Korsinczky, M., Meyer, E. V., Nene, V., Paulsen, I., White, O., Ralph, S. A., Ren, Q., Sargeant, T. J., Salzberg, S. L., Stoeckert, C. J., Sullivan, S. A., Yamamoto, M. M., Hoffman, S. L., Wortman, J. R., Gardner, M. J., Galinski, M. R., Barnwell, J. W., & Fraser-Liggett, C. M. (2008).** Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature*, 455(7214), 757-763.
- Carvalho, B. O., Lopes, S. C., Nogueira, P. A., Orlandi, P. P., Bargieri, D. Y., Blanco, Y. C., Mamoni, R., Leite, J. A., Rodrigues, M. M., Soares, I. S., Oliveira, T. R., Wunderlich, G., Lacerda, M. V., del Portillo, H. A., Araujo, M. O., Russell, B., Suwanarusk, R., Snounou, G., Renia, L., & Costa, F. T. (2010).** On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis*, 202(4), 638-647.
- Chang, H. H., Falick, A. M., Carlton, P. M., Sedat, J. W., DeRisi, J. L., & Marletta, M. A. (2008).** N-terminal processing of proteins exported by malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 160(2), 107-115.
- Chen, Q., Heddini, A., Barragan, A., Fernandez, V., Pearce, S. F., & Wahlgren, M. (2000).** The semiconserved head structure of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 mediates binding to multiple independent host receptors. *J Exp Med*, 192(1), 1-10.
- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., McGready, R., Proux, S., Newton, P., Pukrittayakamee, S., Looareesuwan, S., & White, N. J. (2002).** Central role of the spleen in malaria parasite clearance. *J Infect Dis*, 185(10), 1538-1541.

- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., Suwanarusk, R., Pukrittayakamee, S., Wilairatana, P., Beeson, J. G., Day, N. P., & White, N. J. (2012). *Plasmodium vivax* adherence to placental glycosaminoglycans. *PLoS One*, 7(4), e34509.
- Combes, V., Rosenkranz, A. R., Redard, M., Pizzolato, G., Lepidi, H., Vestweber, D., Mayadas, T. N., & Grau, G. E. (2004). Pathogenic role of P-selectin in experimental cerebral malaria: importance of the endothelial compartment. *Am J Pathol*, 164(3), 781-786.
- Cooke, B. M., Berendt, A. R., Craig, A. G., MacGregor, J., Newbold, C. I., & Nash, G. B. (1994). Rolling and stationary cytoadhesion of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*: separate roles for ICAM-1, CD36 and thrombospondin. *Br J Haematol*, 87(1), 162-170.
- Cooke, B. M., Buckingham, D. W., Glenister, F. K., Fernandez, K. M., Bannister, L. H., Marti, M., Mohandas, N., & 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. *J Cell Biol*, 172(6), 899-908.
- Cooke, B. M., Rogerson, S. J., Brown, G. V., & Coppel, R. L. (1996). Adhesion of malaria-infected red blood cells to chondroitin sulfate A under flow conditions. *Blood*, 88(10), 4040-4044.
- Cowman, A. F., Berry, D., & Baum, J. (2012). The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol*, 198(6), 961-971.
- Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 124(4), 755-766.
- Cox-Singh, J., & Singh, B. (2008). *Knowlesi* malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol*, 24(9), 406-410.
- Cox, F. E. (2010). History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors*, 3(1), 5.
- Crabb, B. S., Cooke, B. M., Reeder, J. C., Waller, R. F., Caruana, S. R., Davern, K. M., Wickham, M. E., Brown, G. V., Coppel, R. L., & Cowman, A. F. (1997). Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell*, 89(2), 287-296.
- Crosnier, C., Bustamante, L. Y., Bartholdson, S. J., Bei, A. K., Theron, M., Uchikawa, M., Mboup, S., Ndir, O., Kwiatkowski, D. P., Duraisingh, M. T., Rayner, J. C., & Wright, G. J. (2011). Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 480(7378), 534-537.
- Cyrklaff, M., Sanchez, C. P., Kilian, N., Bisseye, C., Simapore, J., Frischknecht, F., & Lanzer, M. (2011). Hemoglobins S and C interfere with actin remodeling in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Science*, 334(6060), 1283-1286.
- Dasgupta, S., Auth, T., Gov, N. S., Satchwell, T. J., Hanssen, E., Zuccala, E. S., Riglar, D. T., Toye, A. M., Betz, T., Baum, J., & Gompper, G. (2014). Membrane-wrapping contributions to malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Biophys J*, 107(1), 43-54.
- Davey, N. E., Haslam, N. J., Shields, D. C., & Edwards, R. J. (2010). SLiMfinder: a web server to find novel, significantly over-represented, short protein motifs. *Nucleic Acids Res*, 38(Web Server issue), W534-539.

- Davis, S. P., Amrein, M., Gillrie, M. R., Lee, K., Muruve, D. A., & Ho, M. (2012). *Plasmodium falciparum*-induced CD36 clustering rapidly strengthens cytoadherence via p130CAS-mediated actin cytoskeletal rearrangement. *FASEB J*, 26(3), 1119-1130.
- Davis, S. P., Lee, K., Gillrie, M. R., Roa, L., Amrein, M., & Ho, M. (2013). CD36 recruits alpha(5)beta(1) integrin to promote cytoadherence of *P. falciparum*-infected erythrocytes. *PLoS Pathog*, 9(8), e1003590.
- de Koning-Ward, T. F., Gilson, P. R., Boddey, J. A., Rug, M., Smith, B. J., Papenfuss, A. T., Sanders, P. R., Lundie, R. J., Maier, A. G., Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2009). A newly discovered protein export machine in malaria parasites. *Nature*, 459(7249), 945-949.
- De las Salas, B., Segura, C., Pabon, A., Lopes, S. C., Costa, F. T., & Blair, S. (2013). Adherence to human lung microvascular endothelial cells (HMVEC-L) of *Plasmodium vivax* isolates from Colombia. *Malar J*, 12, 347.
- Deitsch, K. W., & Hviid, L. (2004). Variant surface antigens, virulence genes and the pathogenesis of malaria. *Trends Parasitol*, 20(12), 562-566.
- del Portillo, H. A., Fernandez-Becerra, C., Bowman, S., Oliver, K., Preuss, M., Sanchez, C. P., Schneider, N. K., Villalobos, J. M., Rajandream, M. A., Harris, D., Pereira da Silva, L. H., Barrell, B., & Lanzer, M. (2001). A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature*, 410(6830), 839-842.
- del Portillo, H. A., Lanzer, M., Rodriguez-Malaga, S., Zavala, F., & Fernandez-Becerra, C. (2004). Variant genes and the spleen in *Plasmodium vivax* malaria. *Int J Parasitol*, 34(13-14), 1547-1554.
- Desai, S. A., Bezrukov, S. M., & Zimmerberg, J. (2000). A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature*, 406(6799), 1001-1005.
- Dhangadamajhi, G., Kar, S. K., & Ranjit, M. (2010). The survival strategies of malaria parasite in the red blood cell and host cell polymorphisms. *Malar Res Treat*, 2010, 973094.
- Dixon, M. W., Hawthorne, P. L., Spielmann, T., Anderson, K. L., Trenholme, K. R., & Gardiner, D. L. (2008). Targeting of the ring exported protein 1 to the Maurer's clefts is mediated by a two-phase process. *Traffic*, 9(8), 1316-1326.
- Dondorp, A. M., Ince, C., Charunwatthana, P., Hanson, J., van Kuijen, A., Faiz, M. A., Rahman, M. R., Hasan, M., Bin Yunus, E., Ghose, A., Ruangveerayut, R., Limmathurotsakul, D., Mathura, K., White, N. J., & Day, N. P. (2008). Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe *falciparum* malaria. *J Infect Dis*, 197(1), 79-84.
- Dupire, J., Socol, M., & Viallat, A. (2012). Full dynamics of a red blood cell in shear flow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(51), 20808-20813.
- Duraisingh, M. T., Triglia, T., Ralph, S. A., Rayner, J. C., Barnwell, J. W., McFadden, G. I., & Cowman, A. F. (2003). Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *EMBO J*, 22(5), 1047-1057.
- Edwards, R. J., Davey, N. E., & Shields, D. C. (2007). SLiMFinder: a probabilistic method for identifying over-represented, convergently evolved, short linear motifs in proteins. *PLoS One*, 2(10), e967.

- Elliott, D. A., McIntosh, M. T., Hosgood, H. D., 3rd, Chen, S., Zhang, G., Baevova, P., & Joiner, K. A. (2008).** Four distinct pathways of hemoglobin uptake in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(7), 2463-2468.
- Elsworth, B., Crabb, B. S., & Gilson, P. R. (2014).** Protein export in malaria parasites: an update. *Cell Microbiol*, *16*(3), 355-363.
- Erbe, D. V., Wolitzky, B. A., Presta, L. G., Norton, C. R., Ramos, R. J., Burns, D. K., Rumberger, J. M., Rao, B. N., Foxall, C., & Brandley, B. K. (1992).** Identification of an E-selectin region critical for carbohydrate recognition and cell adhesion. *J Cell Biol*, *119*(1), 215-227.
- Esser, C., Bachmann, A., Kuhn, D., Schuldt, K., Forster, B., Thiel, M., May, J., Koch-Nolte, F., Yanez-Mo, M., Sanchez-Madrid, F., Schinkel, A. H., Jalkanen, S., Craig, A. G., Bruchhaus, I., & Horstmann, R. D. (2014).** Evidence of promiscuous endothelial binding by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell Microbiol*, *16*(5), 701-708.
- Fastman, Y., Noble, R., Recker, M., & Dzikowski, R. (2012).** Erasing the epigenetic memory and beginning to switch -- the onset of antigenic switching of *var* genes in *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*, *7*(3), e34168.
- Fernandez-Becerra, C., Pein, O., de Oliveira, T. R., Yamamoto, M. M., Cassola, A. C., Rocha, C., Soares, I. S., de Braganca Pereira, C. A., & del Portillo, H. A. (2005).** Variant proteins of *Plasmodium vivax* are not clonally expressed in natural infections. *Mol Microbiol*, *58*(3), 648-658.
- Fernandez-Becerra, C., Yamamoto, M. M., Vencio, R. Z., Lacerda, M., Rosanas-Urgell, A., & del Portillo, H. A. (2009).** *Plasmodium vivax* and the importance of the subtelomeric multigene *vir* superfamily. *Trends Parasitol*, *25*(1), 44-51.
- Ferreira, M. U., da Silva Nunes, M., & Wunderlich, G. (2004).** Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. *Clin Diagn Lab Immunol*, *11*(6), 987-995.
- Field, J. W., & Reid, J. A. (1956).** Malaria control in Malaya; an appreciation of the work of Sir Malcolm Watson. *J Trop Med Hyg*, *59*(2), 23-27.
- Flick, K., & Chen, Q. (2004).** *var* genes, *PfEMP1* and the human host. *Mol Biochem Parasitol*, *134*(1), 3-9.
- Franke-Fayard, B., Fonager, J., Braks, A., Khan, S. M., & Janse, C. J. (2010).** Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria? *PLoS Pathog*, *6*(9), e1001032.
- Franz, J., Brinkmann, B. F., Konig, M., Huve, J., Stock, C., Ebnet, K., & Riethmuller, C. (2016).** Nanoscale Imaging Reveals a Tetraspanin-CD9 Coordinated Elevation of Endothelial ICAM-1 Clusters. *PLoS One*, *11*(1), e0146598.
- Fried, M., & Duffy, P. E. (2002).** Analysis of CSA-binding parasites and antiadhesion antibodies. *Methods Mol Med*, *72*, 555-560.
- Gantt, S. M., Clavijo, P., Bai, X., Esko, J. D., & Sinnis, P. (1997).** Cell adhesion to a motif shared by the malaria circumsporozoite protein and thrombospondin is mediated by its glycosaminoglycan-binding region and not by CSVTCG. *J Biol Chem*, *272*(31), 19205-19213.
- Gardner, J. P., Pinches, R. A., Roberts, D. J., & Newbold, C. I. (1996).** Variant antigens and endothelial receptor adhesion in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(8), 3503-3508.

- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M. S., Nene, V., Shallom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., McFadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Carucci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R., W. Fraser, C. M., & Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419(6906), 498-511.
- Genton, B., D'Acremont, V., Rare, L., Baea, K., Reeder, J. C., Alpers, M. P., & Muller, I. (2008). *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med*, 5(6), e127.
- Gerald, N., Mahajan, B., & Kumar, S. (2011). Mitosis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell*, 10(4), 474-482.
- Giovannini, D., Spath, S., Lacroix, C., Perazzi, A., Bargieri, D., Lagal, V., Lebugle, C., Combe, A., Thiberge, S., Baldacci, P., Tardieux, I., & Menard, R. (2011). Independent roles of apical membrane antigen 1 and rhoptry neck proteins during host cell invasion by apicomplexa. *Cell Host Microbe*, 10(6), 591-602.
- Goel, S., Palmkvist, M., Moll, K., Joannin, N., Lara, P., Akhouri, R. R., Moradi, N., Ojemalm, K., Westman, M., Angeletti, D., Kjellin, H., Lehtio, J., Blixt, O., Idestrom, L., Gahmberg, C. G., Storry, J. R., Hult, A. K., Olsson, M. L., von Heijne, G., Nilsson, I., & Wahlgren, M. (2015). RIFINs are adhesins implicated in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Nat Med*, 21(4), 314-317.
- Goldberg, D. E. (1993). Hemoglobin degradation in *Plasmodium*-infected red blood cells. *Semin Cell Biol*, 4(5), 355-361.
- Granger, D. N., & Kubes, P. (1994). The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*, 55(5), 662-675.
- Grassi, B., Bignami, A., Bastianelli, G. (1899). Ulteriore ricerche sul ciclo dei parassiti malarici umani sul corpo del zanzarone. *Atti Reale Accad Lincei*. 8, 21-28.
- Greenwalt, D. E., Watt, K. W., So, O. Y., & Jiwani, N. (1990). PAS IV, an integral membrane protein of mammary epithelial cells, is related to platelet and endothelial cell CD36 (GP IV). *Biochemistry*, 29(30), 7054-7059.
- Greenwood, B. M., Bojang, K., Whitty, C. J., & Targett, G. A. (2005). Malaria. *Lancet*, 365(9469), 1487-1498.
- Gronkiewicz, K. M., Giuliano, E. A., Sharma, A., & Mohan, R. R. (2016). Molecular mechanisms of suberoylanilide hydroxamic acid in the inhibition of TGF-beta1-mediated canine corneal fibrosis. *Vet Ophthalmol*, 19(6), 480-487.
- Gruring, C., Heiber, A., Kruse, F., Flemming, S., Franci, G., Colombo, S. F., Fasana, E., Schoeler, H., Borgese, N., Stunnenberg, H. G., Przyborski, J. M., Gilberger, T. W., & Spielmann, T. (2012). Uncovering common principles in protein export of malaria parasites. *Cell Host Microbe*, 12(5), 717-729.
- Gruring, C., Heiber, A., Kruse, F., Ungefehr, J., Gilberger, T. W., & Spielmann, T. (2011). Development and host cell modifications of *Plasmodium falciparum* blood stages in four dimensions. *Nat Commun*, 2, 165.

- Gupta, H., Dhunpath, P., Bhatt., A. N., Satyamoorthy, K., & Umakanth, S. (2016).** Cerebral malaria in a man with *Plasmodium vivax* mono-infection. *Trop Doct*, 46(4), 241-245.
- Haase, S., Herrmann, S., Gruring, C., Heiber, A., Jansen, P. W., Langer, C., Treeck, M., Cabrera, A., Bruns, C., Struck, N. S., Kono, M., Engelberg, K., Ruch, U., Stunnenberg, H. G., Gilberger, T. W., & Spielmann, T. (2009).** Sequence requirements for the export of the *Plasmodium falciparum* Maurer's clefts protein REX2. *Mol Microbiol*, 71(4), 1003-1017.
- Haldar, K., & Mohandas, N. (2007).** Erythrocyte remodeling by malaria parasites. *Curr Opin Hematol*, 14(3), 203-209.
- Hawthorne, P. L., Trenholme, K. R., Skinner-Adams, T. S., Spielmann, T., Fischer, K., Dixon, M. W., Ortega, M. R., Anderson, K. L., Kemp, D. J., & Gardiner, D. L. (2004).** A novel *Plasmodium falciparum* ring stage protein, REX, is located in Maurer's clefts. *Mol Biochem Parasitol*, 136(2), 181-189.
- Heiber, A., Kruse, F., Pick, C., Gruring, C., Flemming, S., Oberli, A., Schoeler, H., Retzlaff, S., Mesen-Ramirez, P., Hiss, J. A., Kadekoppala, M., Hecht, L., Holder, A. A., Gilberger, T. W., & Spielmann, T. (2013).** Identification of new PNEPs indicates a substantial non-PEXEL exportome and underpins common features in *Plasmodium falciparum* protein export. *PLoS Pathog*, 9(8), e1003546.
- Helms, G., Dasanna, A. K., Schwarz, U. S., & Lanzer, M. (2016).** Modeling cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and leukocytes-common principles and distinctive features. *FEBS Lett*, 590(13), 1955-1971.
- Hempelmann, E., & Egan, T. J. (2002).** Pigment biocrystallization in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*, 18(1), 11.
- Herricks, T., Avril, M., Janes, J., Smith, J. D., & Rathod, P. K. (2013).** Clonal variants of *Plasmodium falciparum* exhibit a narrow range of rolling velocities to host receptor CD36 under dynamic flow conditions. *Eukaryot Cell*, 12(11), 1490-1498.
- Hiller, N. L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estrano, C., & Haldar, K. (2004).** A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science*, 306(5703), 1934-1937.
- Ho, M., Hickey, M. J., Murray, A. G., Andonegui, G., & Kubes, P. (2000).** Visualization of *Plasmodium falciparum*-endothelium interactions in human microvasculature: mimicry of leukocyte recruitment. *J Exp Med*, 192(8), 1205-1211.
- Ho, M., Schollaardt, T., Niu, X., Looareesuwan, S., Patel, K. D., & Kubes, P. (1998).** Characterization of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte and P-selectin interaction under flow conditions. *Blood*, 91(12), 4803-4809.
- Ho, M., & White, N. J. (1999).** Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol*, 276(6 Pt 1), C1231-1242.
- Holder, A. A. (1988).** The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. *Prog Allergy*, 41, 72-97.
- Howell, D. P., Levin, E. A., Springer, A. L., Kraemer, S. M., Phippard, D. J., Schief, W. R., & Smith, J. D. (2008).** Mapping a common interaction site used by *Plasmodium falciparum* Duffy binding-like domains to bind diverse host receptors. *Mol Microbiol*, 67(1), 78-87.

- Hunt, N. H., & Grau, G. E. (2003).** Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol*, 24(9), 491-499.
- Janssen, C. S., Phillips, R. S., Turner, C. M., & Barrett, M. P. (2004).** *Plasmodium* interspersed repeats: the major multigene superfamily of malaria parasites. *Nucleic Acids Res*, 32(19), 5712-5720.
- Jensen, J. B., & Trager, W. (1978).** *Plasmodium falciparum* in culture: establishment of additional strains. *Am J Trop Med Hyg*, 27(4), 743-746.
- Jin, Y., Kebaier, C., & Vanderberg, J. (2007).** Direct microscopic quantification of dynamics of *Plasmodium berghei* sporozoite transmission from mosquitoes to mice. *Infect Immun*, 75(11), 5532-5539.
- Kansas, G. S. (1996).** Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, 88(9), 3259-3287.
- Kats, L. M., Fernandez, K. M., Glenister, F. K., Herrmann, S., Buckingham, D. W., Siddiqui, G., Sharma, L., Bamert, R., Lucet, I., Guillotte, M., Mercereau-Puijalon, O., & Cooke, B. M. (2014).** An exported kinase (FIKK4.2) that mediates virulence-associated changes in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Int J Parasitol*, 44(5), 319-328.
- Kaviratne, M., Khan, S. M., Jarra, W., & Preiser, P. R. (2002).** Small variant STEVOR antigen is uniquely located within Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Eukaryot Cell*, 1(6), 926-935.
- Keeley, A., & Soldati, D. (2004).** The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol*, 14(10), 528-532.
- Kerlin, D. H., & Gatton, M. L. (2013).** Preferential invasion by *Plasmodium* merozoites and the self-regulation of parasite burden. *PLoS One*, 8(2), e57434.
- Khatab, A., & Klinkert, M. Q. (2006).** Maurer's clefts-restricted localization, orientation and export of a *Plasmodium falciparum* RIFIN. *Traffic*, 7(12), 1654-1665.
- Kilejian, A. (1979).** Characterization of a protein correlated with the production of knob-like protrusions on membranes of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4650-4653.
- Kochar, D. K., Saxena, V., Singh, N., Kochar, S. K., Kumar, S. V., & Das, A. (2005).** *Plasmodium vivax* malaria. *Emerg Infect Dis*, 11(1), 132-134.
- Kraemer, S. M., Kyes, S. A., Aggarwal, G., Springer, A. L., Nelson, S. O., Christodoulou, Z., Smith, L. M., Wang, W., Levin, E., Newbold, C. I., Myler, P. J., & Smith, J. D. (2007).** Patterns of gene recombination shape *var* gene repertoires in *Plasmodium falciparum*: comparisons of geographically diverse isolates. *BMC Genomics*, 8, 45.
- Kraemer, S. M., & Smith, J. D. (2003).** Evidence for the importance of genetic structuring to the structural and functional specialization of the *Plasmodium falciparum var* gene family. *Mol Microbiol*, 50(5), 1527-1538.
- Kraemer, S. M., & Smith, J. D. (2006).** A family affair: *var* genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr Opin Microbiol*, 9(4), 374-380.

- Kriek, N., Tilley, L., Horrocks, P., Pinches, R., Elford, B. C., Ferguson, D. J., Lingelbach, K., & Newbold, C. I. (2003). Characterization of the pathway for transport of the cytoadherence-mediating protein, PfEMP1, to the host cell surface in malaria parasite-infected erythrocytes. *Mol Microbiol*, 50(4), 1215-1227.
- Kulzer, S., Charnaud, S., Dagan, T., Riedel, J., Mandal, P., Pesce, E. R., Blatch, G. L., Crabb, B. S., Gilson, P. R., & Przyborski, J. M. (2012). *Plasmodium falciparum*-encoded exported HSP70/HSP40 chaperone/co-chaperone complexes within the host erythrocyte. *Cell Microbiol*, 14(11), 1784-1795.
- Kulzer, S., Rug, M., Brinkmann, K., Cannon, P., Cowman, A., Lingelbach, K., Blatch, G. L., Maier, A. G., & Przyborski, J. M. (2010). Parasite-encoded HSP40 proteins define novel mobile structures in the cytosol of the *P. falciparum*-infected erythrocyte. *Cell Microbiol*, 12(10), 1398-1420.
- Kwiatkowski, D., Cannon, J. G., Manogue, K. R., Cerami, A., Dinarello, C. A., & Greenwood, B. M. (1989). Tumour necrosis factor production in *falciparum* malaria and its association with schizont rupture. *Clin Exp Immunol*, 77(3), 361-366.
- Kyes, S., Horrocks, P., & Newbold, C. (2001). Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annu Rev Microbiol*, 55, 673-707.
- Kyes, S. A., Kraemer, S. M., & Smith, J. D. (2007). Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: gene organization and regulation of the *var* multigene family. *Eukaryot Cell*, 6(9), 1511-1520.
- Langreth, S. G., Jensen, J. B., Reese, R. T., & Trager, W. (1978). Fine structure of human malaria in vitro. *J Protozool*, 25(4), 443-452.
- Lauer, S., VanWye, J., Harrison, T., McManus, H., Samuel, B. U., Hiller, N. L., Mohandas, N., & Haldar, K. (2000). Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *EMBO J*, 19(14), 3556-3564.
- Lauer, S. A., Rathod, P. K., Ghori, N., & Haldar, K. (1997). A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science*, 276(5315), 1122-1125.
- Laveran, A. (1881). Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme: description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre. *Paris: J.-B. Baillière*.
- Lavstsen, T., Salanti, A., Jensen, A. T., Arnot, D. E., & Theander, T. G. (2003). Sub-grouping of *Plasmodium falciparum* 3D7 *var* genes based on sequence analysis of coding and non-coding regions. *Malar J*, 2, 27.
- Lawrence, M. B., & Springer, T. A. (1991). Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, 65(5), 859-873.
- Leech, J. H., Barnwell, J. W., Aikawa, M., Miller, L. H., & Howard, R. J. (1984). *Plasmodium falciparum* malaria: association of knobs on the surface of infected erythrocytes with a histidine-rich protein and the erythrocyte skeleton. *J Cell Biol*, 98(4), 1256-1264.
- Lennartz, F., Bengtsson, A., Olsen, R. W., Joergensen, L., Brown, A., Remy, L., Man, P., Forest, E., Barfod, L. K., Adams, Y., Higgins, M. K., & Jensen, A. T. (2015). Mapping the binding site of a cross-reactive *Plasmodium falciparum* PfEMP1 monoclonal antibody inhibitory of ICAM-1 binding. *J Immunol*, 195(7), 3273-3283.
- Lew, V. L., Tiffert, T., & Ginsburg, H. (2003). Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood*, 101(10), 4189-4194.

- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7(9), 678-689.
- Lin, C. S., Uboldi, A. D., Marapana, D., Czabotar, P. E., Epp, C., Bujard, H., Taylor, N. L., Perugini, M. A., Hodder, A. N., & Cowman, A. F. (2014). The merozoite surface protein 1 complex is a platform for binding to human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 289(37), 25655-25669.
- Lobo, C. A., Rodriguez, M., Reid, M., & Lustigman, S. (2003). Glycophorin C is the receptor for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding ligand PfEBP-2 (baebl). *Blood*, 101(11), 4628-4631.
- Lopes, S. C., Albrecht, L., Carvalho, B. O., Siqueira, A. M., Thomson-Luque, R., Nogueira, P. A., Fernandez-Becerra, C., Del Portillo, H. A., Russell, B. M., Renia, L., Lacerda, M. V., & Costa, F. T. (2014). Paucity of *Plasmodium vivax* mature schizonts in peripheral blood is associated with their increased cytoadhesive potential. *J Infect Dis*, 209(9), 1403-1407.
- Lopez, F. J., Bernabeu, M., Fernandez-Becerra, C., & del Portillo, H. A. (2013). A new computational approach redefines the subtelomeric *vir* superfamily of *Plasmodium vivax*. *BMC Genomics*, 14, 8.
- Luse, S. A., & Miller, L. H. (1971). *Plasmodium falciparum* malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. *Am J Trop Med Hyg*, 20(5), 655-660.
- Madkhali, A. M., Alkurbi, M. O., Szeszak, T., Bengtsson, A., Patil, P. R., Wu, Y., Al-Harhi, S. A., Jensen, A. T., Pleass, R., & Craig, A. G. (2014). An analysis of the binding characteristics of a panel of recently selected ICAM-1 binding *Plasmodium falciparum* patient isolates. *PLoS One*, 9(10), e111518.
- Magowan, C., Nunomura, W., Waller, K. L., Yeung, J., Liang, J., Van Dort, H., Low, P. S., Coppel, R. L., & Mohandas, N. (2000). *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 1 associates with the band 3 binding domain of ankyrin in the infected red cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1502(3), 461-470.
- Magowan, C., Wollish, W., Anderson, L., & Leech, J. (1988). Cytoadherence by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is correlated with the expression of a family of variable proteins on infected erythrocytes. *J Exp Med*, 168(4), 1307-1320.
- Maier, A. G., Cooke, B. M., Cowman, A. F., & Tilley, L. (2009). Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat Rev Microbiol*, 7(5), 341-354.
- Maier, A. G., Duraisingh, M. T., Reeder, J. C., Patel, S. S., Kazura, J. W., Zimmerman, P. A., & Cowman, A. F. (2003). *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. *Nat Med*, 9(1), 87-92.
- Marin-Menendez, A., Bardaji, A., Martinez-Espinosa, F. E., Botto-Menezes, C., Lacerda, M. V., Ortiz, J., Cistero, P., Piqueras, M., Felger, I., Mueller, I., Ordi, J., del Portillo, H., Menendez, C., Wahlgren, M., & Mayor, A. (2013). Rosetting in *Plasmodium vivax*: a cytoadhesion phenotype associated with anaemia. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(4), e2155.
- Marti, M., Good, R. T., Rug, M., Knuepfer, E., & Cowman, A. F. (2004). Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science*, 306(5703), 1930-1933.
- Marti, M., & Spielmann, T. (2013). Protein export in malaria parasites: many membranes to cross. *Curr Opin Microbiol*, 16(4), 445-451.

- Martin-Jaular, L., Nakayasu, E. S., Ferrer, M., Almeida, I. C., & Del Portillo, H. A. (2011).** Exosomes from *Plasmodium yoelii*-infected reticulocytes protect mice from lethal infections. *PLoS One*, 6(10), e26588.
- Matuschewski, K. (2006).** Getting infectious: formation and maturation of *Plasmodium* sporozoites in the Anopheles vector. *Cell Microbiol*, 8(10), 1547-1556.
- Mayadas, T. N., Johnson, R. C., Rayburn, H., Hynes, R. O., & Wagner, D. D. (1993).** Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-selectin-deficient mice. *Cell*, 74(3), 541-554.
- Mayer, D. C., Cofie, J., Jiang, L., Hartl, D. L., Tracy, E., Kabat, J., Mendoza, L. H., & Miller, L. H. (2009).** Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(13), 5348-5352.
- McCormick, C. J., Craig, A., Roberts, D., Newbold, C. I., & Berendt, A. R. (1997).** Intercellular adhesion molecule-1 and CD36 synergize to mediate adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to cultured human microvascular endothelial cells. *J Clin Invest*, 100(10), 2521-2529.
- McHugh, E., Batinovic, S., Hanssen, E., McMillan, P. J., Kenny, S., Griffin, M. D., Crawford, S., Trenholme, K. R., Gardiner, D. L., Dixon, M. W., & Tilley, L. (2015).** A repeat sequence domain of the ring-exported protein-1 of *Plasmodium falciparum* controls export machinery architecture and virulence protein trafficking. *Mol Microbiol*, 98(6), 1101-1114.
- McMillan, P. J., Millet, C., Batinovic, S., Maiorca, M., Hanssen, E., Kenny, S., Muhle, R. A., Melcher, M., Fidock, D. A., Smith, J. D., Dixon, M. W., & Tilley, L. (2013).** Spatial and temporal mapping of the PfEMP1 export pathway in *Plasmodium falciparum*. *Cell Microbiol*, 15(8), 1401-1418.
- Medana, I. M., & Turner, G. D. (2006).** Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int J Parasitol*, 36(5), 555-568.
- Metwally, N. (2016).** Analyses of the transcriptome profiles of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes selected for binding to the human endothelial receptors (ICAM-1, P-selectin, E-selectin, CD9 and CD151). *Dissertation, UHH*. <http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2016/8090/>.
- Miao, W. M., Vasile, E., Lane, W. S., & Lawler, J. (2001).** CD36 associates with CD9 and integrins on human blood platelets. *Blood*, 97(6), 1689-1696.
- Miller, L. H., Ackerman, H. C., Su, X. Z., & Wellems, T. E. (2013).** Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med*, 19(2), 156-167.
- Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., & Doumbo, O. K. (2002).** The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415(6872), 673-679.
- Milner, D. A., Jr., Lee, J. J., Frantzreb, C., Whitten, R. O., Kamiza, S., Carr, R. A., Pradham, A., Factor, R. E., Playforth, K., Liomba, G., Dзамalala, C., Seydel, K. B., Molyneux, M. E., & Taylor, T. E. (2015).** Quantitative assessment of multiorgan sequestration of parasites in fatal pediatric cerebral malaria. *J Infect Dis*, 212(8), 1317-1321.
- Moon, R. W., Hall, J., Rangkuti, F., Ho, Y. S., Almond, N., Mitchell, G. H., Pain, A., Holder, A. A., & Blackman, M. J. (2013).** Adaptation of the genetically tractable malaria pathogen *Plasmodium knowlesi* to continuous culture in human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(2), 531-536.
- Mundwiler-Pachlatko, E., & Beck, H. P. (2013).** Maurer's clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(50), 19987-19994.

- Nash, G. B., Cooke, B. M., Marsh, K., Berendt, A., Newbold, C., & Stuart, J. (1992). Rheological analysis of the adhesive interactions of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*. *Blood*, 79(3), 798-807.
- Newbold, C., Craig, A., Kyes, S., Rowe, A., Fernandez-Reyes, D., & Fagan, T. (1999). Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*, 29(6), 927-937.
- Newbold, C., Warn, P., Black, G., Berendt, A., Craig, A., Snow, B., Msobo, M., Peshu, N., & Marsh, K. (1997). Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, 57(4), 389-398.
- Niang, M., Bei, A. K., Madnani, K. G., Pelly, S., Dankwa, S., Kanjee, U., Gunalan, K., Amaladoss, A., Yeo, K. P., Bob, N. S., Malleret, B., Duraisingh, M. T., & Preiser, P. R. (2014). STEVOR is a *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding protein that mediates merozoite invasion and rosetting. *Cell Host Microbe*, 16(1), 81-93.
- Oberli, A., Slater, L. M., Cutts, E., Brand, F., Mundwiler-Pachlatko, E., Rusch, S., Masik, M. F., Erat, M. C., Beck, H. P., & Vakonakis, I. (2014). A *Plasmodium falciparum* PHIST protein binds the virulence factor PfEMP1 and comigrates to knobs on the host cell surface. *FASEB J*, 28(10), 4420-4433.
- Ochola, L. B., Siddondo, B. R., Ocholla, H., Nkya, S., Kimani, E. N., Williams, T. N., Makale, J. O., Liljander, A., Urban, B. C., Bull, P. C., Szeszak, T., Marsh, K., & Craig, A. G. (2011). Specific receptor usage in *Plasmodium falciparum* cytoadherence is associated with disease outcome. *PLoS One*, 6(3), e14741.
- Ockenhouse, C. F., Ho, M., Tandon, N. N., Van Seventer, G. A., Shaw, S., White, N. J., Jamieson, G. A., Chulay, J. D., & Webster, H. K. (1991). Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1. *J Infect Dis*, 164(1), 163-169.
- Oh, J., Edwards, E. E., McClatchey, P. M., & Thomas, S. N. (2015). Analytical cell adhesion chromatography reveals impaired persistence of metastatic cell rolling adhesion to P-selectin. *J Cell Sci*, 128(20), 3731-3743.
- Oh, S. S., Voigt, S., Fisher, D., Yi, S. J., LeRoy, P. J., Derick, L. H., Liu, S., Chishti, A. H. (2000). *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is anchored to the actin-spectrin junction and knob-associated histidine-rich protein in the erythrocyte skeleton. *Mol Biochem Parasitol*, 108(2), 237-247.
- Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J., & Seed, B. (1989). CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell*, 58(1), 95-101.
- Pachlatko, E., Rusch, S., Muller, A., Hemphill, A., Tilley, L., Hanssen, E., & Beck, H. P. (2010). MAHRP2, an exported protein of *Plasmodium falciparum*, is an essential component of Maurer's cleft tethers. *Mol Microbiol*, 77(5), 1136-1152.
- Pagola, S., Stephens, P. W., Bohle, D. S., Kosar, A. D., & Madsen, S. K. (2000). The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature*, 404(6775), 307-310.
- Pain, A., Ferguson, D. J., Kai, O., Urban, B. C., Lowe, B., Marsh, K., & Roberts, D. J. (2001). Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(4), 1805-1810.

- Papakrivos, J., Newbold, C. I., & Lingelbach, K. (2005).** A potential novel mechanism for the insertion of a membrane protein revealed by a biochemical analysis of the *Plasmodium falciparum* cytoadherence molecule PfEMP-1. *Mol Microbiol*, 55(4), 1272-1284.
- Pasternak, N. D., & Dzikowski, R. (2009).** PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(7), 1463-1466.
- Pei, X., An, X., Guo, X., Tarnawski, M., Coppel, R., & Mohandas, N. (2005).** Structural and functional studies of interaction between *Plasmodium falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and erythrocyte spectrin. *J Biol Chem*, 280(35), 31166-31171.
- Petter, M., & Duffy, M. F. (2015).** Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Results Probl Cell Differ*, 57, 47-90.
- Philpott, J., & Keystone, J. S. (1987).** Severe falciparum malaria. *CMAJ*, 137(2), 135-136.
- Podrez, E. A., Poliakov, E., Shen, Z., Zhang, R., Deng, Y., Sun, M., Finton, P. J., Shan, L., Gugiu, B., Fox, P. L., Hoff, H. F., Salomon, R. G., & Hazen, S. L. (2002).** Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem*, 277(41), 38503-38516.
- Ponnudurai, T., Leeuwenberg, A. D., & Meuwissen, J. H. (1981).** Chloroquine sensitivity of isolates of *Plasmodium falciparum* adapted to in vitro culture. *Trop Geogr Med*, 33(1), 50-54.
- Ponsford, M. J., Medana, I. M., Prapansilp, P., Hien, T. T., Lee, S. J., Dondorp, A. M., Esiri, M. M., Day, N. P., White, N. J., Turner, G. D. (2012).** Sequestration and microvascular congestion are associated with coma in human cerebral malaria. *J Infect Dis*, 205(4), 663-671.
- Portugal, S., Drake-Smith, H., & Mota, M. M. (2011).** Superinfection in malaria: *Plasmodium* shows its iron will. *EMBO Rep*, 12(12), 1233-1242.
- Powner, D., Kopp, P. M., Monkley, S. J., Critchley, D. R., & Berditchevski, F. (2011).** Tetraspanin CD9 in cell migration. *Biochem Soc Trans*, 39(2), 563-567.
- Proellocks, N. I., Herrmann, S., Buckingham, D. W., Hanssen, E., Hodges, E. K., Elsworth, B., Morahan, B. J., Coppel, R. L., & Cooke, B. M. (2014).** A lysine-rich membrane-associated PHISTb protein involved in alteration of the cytoadhesive properties of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *FASEB J*, 28(7), 3103-3113.
- Prudencio, M., Rodriguez, A., & Mota, M. M. (2006).** The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol*, 4(11), 849-856.
- Przyborski, J. M., Miller, S. K., Pfahler, J. M., Henrich, P. P., Rohrbach, P., Crabb, B. S., & Lanzer, M. (2005).** Trafficking of STEVOR to the Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *EMBO J*, 24(13), 2306-2317.
- Puck, T. T., Cieciura, S. J., & Robinson, A. (1958).** Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med*, 108(6), 945-956.
- Ralph, S. A., & Scherf, A. (2005).** The epigenetic control of antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Curr Opin Microbiol*, 8(4), 434-440.
- Rask, T. S., Hansen, D. A., Theander, T. G., Gorm Pedersen, A., & Lavstsen, T. (2010).** *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 diversity in seven genomes--divide and conquer. *PLoS Comput Biol*, 6(9).

- Rayner, J. C., Galinski, M. R., Ingravallo, P., & Barnwell, J. W. (2000).** Two *Plasmodium falciparum* genes express merozoite proteins that are related to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii* adhesive proteins involved in host cell selection and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(17), 9648-9653.
- Ribaut, C., Berry, A., Chevalley, S., Reybier, K., Morlais, I., Parzy, D., Nepveu, F., Benoit-Vical, F., & Valentin, A. (2008).** Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human *Plasmodium* species. *Malar J*, 7, 45.
- Rieger, H., Yoshikawa, H. Y., Quadt, K., Nielsen, M. A., Sanchez, C. P., Salanti, A., Tanaka, M., & Lanzer, M. (2015).** Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin-4-sulfate is cooperative and shear enhanced. *Blood*, 125(2), 383-391.
- Riglar, D. T., Richard, D., Wilson, D. W., Boyle, M. J., Dekiwadia, C., Turnbull, L., Angrisano, F., Marapana, D. S., Rogers, K. L., Whitchurch, C. B., Beeson, J. G., Cowman, A. F., Ralph, S. A., & Baum, J. (2011).** Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe*, 9(1), 9-20.
- Robinson, B. A., Welch, T. L., & Smith, J. D. (2003).** Widespread functional specialization of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD36 analysed across a parasite genome. *Mol Microbiol*, 47(5), 1265-1278.
- Rogerson, S. J., Chaiyaroj, S. C., Ng, K., Reeder, J. C., & Brown, G. V. (1995).** Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Exp Med*, 182(1), 15-20.
- Rogerson, S. J., Grau, G. E., & Hunt, N. H. (2004).** The microcirculation in severe malaria. *Microcirculation*, 11(7), 559-576.
- Ross, R. (1897).** On some peculiar pigmented cells found in two mosquitos fed on malarial blood. *Br Med J*, 2(1929), 1786-1788.
- Rowe, J. A., Claessens, A., Corrigan, R. A., & Arman, M. (2009).** Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med*, 11, e16.
- Rowe, J. A., Moulds, J. M., Newbold, C. I., & Miller, L. H. (1997).** *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature*, 388(6639), 292-295.
- Rug, M., Prescott, S. W., Fernandez, K. M., Cooke, B. M., & Cowman, A. F. (2006).** The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P. falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood*, 108(1), 370-378.
- Russo, I., Babbitt, S., Muralidharan, V., Butler, T., Oksman, A., & Goldberg, D. E. (2010).** Plasmepsin V licenses *Plasmodium* proteins for export into the host erythrocyte. *Nature*, 463(7281), 632-636.
- Sam-Yellowe, T. Y., Florens, L., Johnson, J. R., Wang, T., Drazba, J. A., Le Roch, K. G., Zhou, Y., Batalov, S., Carucci, D. J., Winzeler, E. A., & Yates, J. R., 3rd. (2004).** A *Plasmodium* gene family encoding Maurer's cleft membrane proteins: structural properties and expression profiling. *Genome Res*, 14(6), 1052-1059.
- Sargeant, T. J., Marti, M., Caler, E., Carlton, J. M., Simpson, K., Speed, T. P., & Cowman, A. F. (2006).** Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. *Genome Biol*, 7(2), R12.

- Saridaki, T., Frohlich, K. S., Braun-Breton, C., & Lanzer, M. (2009).** Export of PfSBP1 to the *Plasmodium falciparum* Maurer's clefts. *Traffic*, 10(2), 137-152.
- Scherf, A., Lopez-Rubio, J. J., & Riviere, L. (2008).** Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol*, 62, 445-470.
- Schofield, L., Hewitt, M. C., Evans, K., Siomos, M. A., & Seeberger, P. H. (2002).** Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature*, 418(6899), 785-789.
- Schofield, L., Vivas, L., Hackett, F., Gerold, P., Schwarz, R. T., & Tachado, S. (1993).** Neutralizing monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol, the dominant TNF-alpha-inducing toxin of *Plasmodium falciparum*: prospects for the immunotherapy of severe malaria. *Ann Trop Med Parasitol*, 87(6), 617-626.
- Schottelius, J., Gilberger, T., Ehrhardt, S., & Burchard, G. (2010).** [*Plasmodium knowlesi*: cause of naturally acquired malaria in humans]. *Dtsch Med Wochenschr*, 135(7), 297-300.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., & Ragg, T. (2006).** The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 7, 3.
- Schulze, J., Kwiatkowski, M., Borner, J., Schluter, H., Bruchhaus, I., Burmester, T., Spielmann, T., & Pick, C. (2015).** The *Plasmodium falciparum* exportome contains non-canonical PEXEL/HT proteins. *Mol Microbiol*, 97(2), 301-314.
- Senczuk, A. M., Reeder, J. C., Kosmala, M. M., & Ho, M. (2001).** *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 functions as a ligand for P-selectin. *Blood*, 98(10), 3132-3135.
- Silverstein, R. L., Baird, M., Lo, S. K., & Yesner, L. M. (1992).** Sense and antisense cDNA transfection of CD36 (glycoprotein IV) in melanoma cells. Role of CD36 as a thrombospondin receptor. *J Biol Chem*, 267(23), 16607-16612.
- Sim, B. K., Chitnis, C. E., Wasniowska, K., Hadley, T. J., & Miller, L. H. (1994).** Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science*, 264(5167), 1941-1944.
- Sim, B. K., Toyoshima, T., Haynes, J. D., & Aikawa, M. (1992).** Localization of the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen in micronemes of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol*, 51(1), 157-159.
- Singh, V., Gupta, P., & Pande, V. (2014).** Revisiting the multigene families: *Plasmodium var* and *vir* genes. *J Vector Borne Dis*, 51(2), 75-81.
- Slater, A. F., & Cerami, A. (1992).** Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature*, 355(6356), 167-169.
- Sleeb, B. E., Lopatnicki, S., Marapana, D. S., O'Neill, M. T., Rajasekaran, P., Gazdik, M., Gunther, S., Whitehead, L. W., Lowes, K. N., Barfod, L., Hviid, L., Shaw, P. J., Hodder, A. N., Smith, B. J., Cowman, A. F., & Boddey, J. A. (2014).** Inhibition of Plasmeprin V activity demonstrates its essential role in protein export, PfEMP1 display, and survival of malaria parasites. *PLoS Biol*, 12(7), e1001897.
- Smith, J. D. (2014).** The role of PfEMP1 adhesion domain classification in *Plasmodium falciparum* pathogenesis research. *Mol Biochem Parasitol*, 195(2), 82-87.

- Smith, J. D., Craig, A. G., Kriek, N., Hudson-Taylor, D., Kyes, S., Fagan, T., Pinches, R., Baruch, D. I., Newbold, C. I., & Miller, L. H. (2000).** Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4), 1766-1771.
- Smith, J. D., Rowe, J. A., Higgins, M. K., & Lavstsen, T. (2013).** Malaria's deadly grip: cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell Microbiol*, 15(12), 1976-1983.
- Smith, J. D., Subramanian, G., Gamain, B., Baruch, D. I., & Miller, L. H. (2000).** Classification of adhesive domains in the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family. *Mol Biochem Parasitol*, 110(2), 293-310.
- Spielmann, T., Dixon, M. W., Hernandez-Valladares, M., Hannemann, M., Trenholme, K. R., & Gardiner, D. L. (2006c).** Reliable transfection of *Plasmodium falciparum* using non-commercial plasmid mini preparations. *Int J Parasitol*, 36(12), 1245-1248.
- Spielmann, T., Gardiner, D. L., Beck, H. P., Trenholme, K. R., & Kemp, D. J. (2006a).** Organization of ETRAMPs and EXP-1 at the parasite-host cell interface of malaria parasites. *Mol Microbiol*, 59(3), 779-794.
- Spielmann, T., & Gilberger, T. W. (2015).** Critical Steps in Protein Export of *Plasmodium falciparum* Blood Stages. *Trends Parasitol*, 31(10), 514-525.
- Spielmann, T., Hawthorne, P. L., Dixon, M. W., Hannemann, M., Klotz, K., Kemp, D. J., Klonis, N., Tilley, L., Trenholme, K. R., & Gardiner, D. L. (2006b).** A cluster of ring stage-specific genes linked to a locus implicated in cytoadherence in *Plasmodium falciparum* codes for PEXEL-negative and PEXEL-positive proteins exported into the host cell. *Mol Biol Cell*, 17(8), 3613-3624.
- Spillman, N. J., Beck, J. R., & Goldberg, D. E. (2015).** Protein export into malaria parasite-infected erythrocytes: mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem*, 84, 813-841.
- Spycher, C., Klonis, N., Spielmann, T., Kump, E., Steiger, S., Tilley, L., & Beck, H. P. (2003).** MAHRP-1, a novel *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein, binds ferriprotoporphyrin IX and localizes to the Maurer's clefts. *J Biol Chem*, 278(37), 35373-35383.
- Spycher, C., Rug, M., Klonis, N., Ferguson, D. J., Cowman, A. F., Beck, H. P., & Tilley, L. (2006).** Genesis of and trafficking to the Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol Cell Biol*, 26(11), 4074-4085.
- Spycher, C., Rug, M., Pachlatko, E., Hanssen, E., Ferguson, D., Cowman, A. F., Beck, H. P., & Beck, H. P. (2008).** The Maurer's cleft protein MAHRP1 is essential for trafficking of PfEMP1 to the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol Microbiol*, 68(5), 1300-1314.
- Srivastava, A., Gangnard, S., Round, A., Dechavanne, S., Juillerat, A., Raynal, B., Faure, G., Baron, B., Ramboarina, S., Singh, S. K., Belrhali, H., England, P., Lewit-Bentley, A., Scherf, A., Bentley, G. A., & Gamain, B. (2010).** Full-length extracellular region of the var2CSA variant of PfEMP1 is required for specific, high-affinity binding to CSA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(11), 4884-4889.
- Storm, J., & Craig, A. G. (2014).** Pathogenesis of cerebral malaria--inflammation and cytoadherence. *Front Cell Infect Microbiol*, 4, 100.
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J. M., Menard, R., & Heussler, V. T. (2006).** Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, 313(5791), 1287-1290.

- Su, X. Z., Heatwole, V. M., Wertheimer, S. P., Guinet, F., Herrfeldt, J. A., Peterson, D. S., Ravetch, J. A., & Wellem, T. E. (1995). The large diverse gene family *var* encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell*, 82(1), 89-100.
- Swerlick, R. A., Lee, K. H., Wick, T. M., & Lawley, T. J. (1992). Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J Immunol*, 148(1), 78-83.
- Tan, L. K., Yacoub, S., Scott, S., Bhagani, S., & Jacobs, M. (2008). Acute lung injury and other serious complications of *Plasmodium vivax* malaria. *Lancet Infect Dis*, 8(7), 449-454.
- Tandon, N. N., Kralisz, U., & Jamieson, G. A. (1989). Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem*, 264(13), 7576-7583.
- Taylor, D. W., Parra, M., Chapman, G. B., Stearns, M. E., Renner, J., Aikawa, M., Uni, S., Aley, S. B., Panton, L. J., & Howard, R. J. (1987). Localization of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 1 in the erythrocyte skeleton under knobs. *Mol Biochem Parasitol*, 25(2), 165-174.
- Tham, W. H., Wilson, D. W., Lopaticki, S., Schmidt, C. Q., Tetteh-Quarcoo, P. B., Barlow, P. N., Richard, D., Corbin, J. E., Beeson, J. G., & Cowman, A. F. (2010). Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for *Plasmodium falciparum* PfRh4 invasion ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(40), 17327-17332.
- Tilly, A. K., Thiede, J., Metwally, N., Lubiana, P., Bachmann, A., Roeder, T., Rockliffe, N., Lorenzen, S., Tannich, E., Gutsmann, T., & Bruchhaus, I. (2015). Type of in vitro cultivation influences cytoadhesion, knob structure, protein localization and transcriptome profile of *Plasmodium falciparum*. *Sci Rep*, 5, 16766.
- Tjitra, E., Anstey, N. M., Sugiarto, P., Warikar, N., Kenangalem, E., Karyana, M., Lampah, D. A., & Price, R. N. (2008). Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med*, 5(6), e128.
- Trager, W., & Jensen, J. B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193(4254), 673-675.
- Trampuz, A., Jereb, M., Muzlovic, I., & Prabhu, R. M. (2003). Clinical review: Severe malaria. *Crit Care*, 7(4), 315-323.
- Triglia, T., Thompson, J., Caruana, S. R., Delorenzi, M., Speed, T., & Cowman, A. F. (2001). Identification of proteins from *Plasmodium falciparum* that are homologous to reticulocyte binding proteins in *Plasmodium vivax*. *Infect Immun*, 69(2), 1084-1092.
- Tripathi, A. K., Sha, W., Shulaev, V., Stins, M. F., & Sullivan, D. J., Jr. (2009). *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce NF-kappaB regulated inflammatory pathways in human cerebral endothelium. *Blood*, 114(19), 4243-4252.
- Turner, G. D., Morrison, H., Jones, M., Davis, T. M., Looareesuwan, S., Buley, I. D., Gatter, K. C., Newbold, C. I., Pukritayakamee, S., & Nagachinta, B. (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*, 145(5), 1057-1069.
- Turner, L., Lavstsen, T., Berger, S. S., Wang, C. W., Petersen, J. E., Avril, M., Brazier, A. J., Freeth, J., Jespersen, J. S., Nielsen, M. A., Magistrado, P., Lusingu, J., Smith, J. D., Higgins, M. K., & Theander, T. G. (2013). Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature*, 498(7455), 502-505.

- Udomsangpetch, R., Kaneko, O., Chotivanich, K., & Sattabongkot, J. (2008).** Cultivation of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol*, 24(2), 85-88.
- Udomsangpetch, R., Reinhardt, P. H., Schollaardt, T., Elliott, J. F., Kubes, P., & Ho, M. (1997).** Promiscuity of clinical *Plasmodium falciparum* isolates for multiple adhesion molecules under flow conditions. *J Immunol*, 158(9), 4358-4364.
- Udomsangpetch, R., Taylor, B. J., Looareesuwan, S., White, N. J., Elliott, J. F., & Ho, M. (1996).** Receptor specificity of clinical *Plasmodium falciparum* isolates: nonadherence to cell-bound E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Blood*, 88(7), 2754-2760.
- Udomsanpetch, R., Thanikkul, K., Pukrittayakamee, S., & White, N. J. (1995).** Rosette formation by *Plasmodium vivax*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 89(6), 635-637.
- Viallat, A., Dupire, J., & Socol, M. (2013).** Dynamics of red blood cells in shear flow. *Med Sci (Paris)*, 29(5), 468-470.
- Villeval, J. L., Lew, A., & Metcalf, D. (1990).** Changes in hemopoietic and regulator levels in mice during fatal or nonfatal malarial infections. I. Erythropoietic populations. *Exp Parasitol*, 71(4), 364-374.
- Waller, K. L., Cooke, B. M., Nunomura, W., Mohandas, N., & Coppel, R. L. (1999).** Mapping the binding domains involved in the interaction between the *Plasmodium falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and the cytoadherence ligand *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). *J Biol Chem*, 274(34), 23808-23813.
- Wassmer, S. C., Taylor, T. E., Rathod, P. K., Mishra, S. K., Mohanty, S., Arevalo-Herrera, M., Duraisingh, M. T., & Smith, J. D. (2015).** Investigating the pathogenesis of severe malaria: A multidisciplinary and cross-geographical approach. *Am J Trop Med Hyg*, 93(3 Suppl), 42-56.
- Waterkeyn, J. G., Wickham, M. E., Davern, K. M., Cooke, B. M., Coppel, R. L., Reeder, J. C., Culvenor, J. G., Waller, R. F., & Cowman, A. F. (2000).** Targeted mutagenesis of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) disrupts cytoadherence of malaria-infected red blood cells. *EMBO J*, 19(12), 2813-2823.
- Weiss, L. (1990).** The spleen in malaria: the role of barrier cells. *Immunol Lett*, 25(1-3), 165-172.
- Wickert, H., Gottler, W., Krohne, G., & Lanzer, M. (2004).** Maurer's cleft organization in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: new insights from three-dimensional reconstruction of serial ultrathin sections. *Eur J Cell Biol*, 83(10), 567-582.
- 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*, 20(20), 5636-5649.
- Winter, G., Kawai, S., Haegstrom, M., Kaneko, O., von Euler, A., Kawazu, S., Palm, D., Fernandez, V., & Wahlgren, M. (2005).** SURFIN is a polymorphic antigen expressed on *Plasmodium falciparum* merozoites and infected erythrocytes. *J Exp Med*, 201(11), 1853-1863.
- World Health Organization (2016).** World malaria report 2016. Geneva.
- Wu, Y., Sifri, C. D., Lei, H. H., Su, X. Z., & Wellems, T. E. (1995).** Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(4), 973-977.
- Wung, B. S., Ni, C. W., & Wang, D. L. (2005).** ICAM-1 induction by TNFalpha and IL-6 is mediated by distinct pathways via Rac in endothelial cells. *J Biomed Sci*, 12(1), 91-101.

Xu, X., Efremov, A. K., Li, A., Lai, L., Dao, M., Lim, C. T., & Cao, J. (2013). Probing the cytoadherence of malaria infected red blood cells under flow. *PLoS One*, 8(5), e64763.

Yipp, B. G., Anand, S., Schollaardt, T., Patel, K. D., Looareesuwan, S., & Ho, M. (2000). Synergism of multiple adhesion molecules in mediating cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to microvascular endothelial cells under flow. *Blood*, 96(6), 2292-2298.

Zinkernagel, R. M., & Doherty, P. C. (1974a). Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature*, 251(5475), 547-548.

Zinkernagel, R. M., & Doherty, P. C. (1974b). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248(5450), 701-702.

Zubairi, A. B., Nizami, S., Raza, A., Mehraj, V., Rasheed, A. F., Ghanchi, N. K., Khaled, Z. N., & Beg, M. A. (2013). Severe *Plasmodium vivax* malaria in Pakistan. *Emerg Infect Dis*, 19(11), 1851-1854.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
α	gr. <i>alpha</i> (steht für gr. <i>anti</i>)
Amp	Ampicillin
ATCC	engl. <i>American type cell culture</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i>
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
CHO	engl. <i>chinese hamster ovary</i>
CIDR	engl. <i>cysteine rich interdomain region</i>
CM	engl. <i>cerebral malaria</i>
cm	engl. <i>centimeter</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRT	engl. <i>chloroquine resistance transporter</i>
CSA	engl. <i>chondroitin sulfat A</i>
CSP	engl. <i>Circumspozoite protein</i>
CT	C-Terminus
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
DBL	engl. <i>duffy binding like</i>
DC	engl. <i>domain cassette</i>
DE	Differentielle Expression
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DIC	engl. <i>differential interference contrast</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	engl. <i>epidermal growth factor</i>
engl.	Englisch
EPCR	engl. <i>endothelial protein C receptor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i> = und andere
ETRAMP	engl. <i>early transcribed membrane protein</i>
EtOH	Ethanol
FACS	engl. <i>fluorescent activated cell sorting</i>
FDR	engl. <i>false detection rate</i>
for	engl. <i>forward</i>
g	Gramm
<i>g</i>	engl. <i>gravity</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
gr.	griechisch
h	engl. <i>hour</i>
hDHFR	Humane Dihydrofolatreduktase
hpi	engl. <i>hours post invasion</i>
ICAM-1	engl. <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
iE	Infizierte Erythrozyten
IFA	engl. <i>immuno flouresemce assay</i>
iFCs	engl. <i>inactivated fetal calf serum</i>
IL	Interleukine
KAHRP	engl. <i>Knob associated histidine rich protein</i>
kDa	Kilodalton
KCl	Kaliumchlorid
kPa	kilopascal
l	Liter
lat.	Latein
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
M	Molar
MC	engl. <i>Maurer's clefts</i>
MFS	engl. <i>Malaria Freezing Solution</i>

mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
µg	Mikrogramm
mind.	mindestens
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	(N-Morpholin)-Propansulfon-Säure
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
MSP	engl. <i>merozoite surface protein</i>
MTS	engl. <i>malaria thawing solution</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ EDTA	Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat Dihydrat
ng	Nanogramm
NGS	engl. <i>next generation sequencing</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NTS	N-terminales Segment
OD	Optische Dichte
O ₂	Sauerstoff
<i>P.</i>	gr. <i>Plasmodium</i>
Pa	Pascal
Padj	engl. <i>p-value adjustment</i>
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PECAM-1	engl. <i>platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PEXEL	engl. <i>plasmodium export element</i>
<i>Pf</i> EMP1	engl. <i>plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
pH	lat. <i>potentia hydrogenii</i>
<i>Pf</i> MC-2TM	engl. <i>plasmodium falciparum maurer's clefts-2 transmembrane</i>
<i>Pf</i> MSP7	engl. <i>plasmodium falciparum merozoite surface protein 7</i>
PNEPs	engl. <i>PEXEL- negative exported proteins</i>
PTEX	engl. <i>plasmodium translocon of exported proteins</i>

PV	engl. <i>parasitophorous vacuole</i>
PVM	engl. <i>parasitophorous vacuole membrane</i>
QC	engl. <i>quality control</i>
REX1	engl. <i>ring exported protein 1</i>
<i>rif</i>	engl. <i>repetitive Interspersed Family</i>
RIN	engl. <i>RNA integrity number</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNasen	Ribonukleasen
RPMI	engl. <i>roswell park memorial institute (cell culture medium)</i>
rRNA	engl. <i>ribosomal RNA</i>
RT	Raumtemperatur
SBP1	engl. <i>skeleton binding protein 1</i>
SP	Signalpeptid
<i>stevor</i>	engl. <i>subtelomeric variable open reading frame</i>
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Acetat-EDTA
TEM	engl. <i>transmission electron microscopy</i>
TNF α	engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TM (D)	Transmembran-(Domain)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u. a.	unter anderem
UA	Uranylacetat
UPS	engl. <i>upstream</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
<i>var</i>	variant gene
VSA	engl. <i>variant surface antigen</i>
WHO	engl. <i>world health organisation</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indixyl- β -D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

Anhang

A Sequenzen der verwendeten synthetischen Genen

3xha

1. CCTAGGATGGAATATCCATATGATGTACCAGATTATGCAGCAGAATATCCTTATGATGTTCCCTGATTAT
 M E Y P Y D V P D Y A A E Y P Y D V P D Y
 70. A A E Y P Y D V P D Y A A K L E *
 GCTGCTGAATATCCATATGATGTTCCAGATTATGCTGCAAAATTAGAATAACTCGAG

vir6-putative – (PVX_050690)

1. GGTACCATGCCAGAAAGTGTAACCTTTAAATGAAATATTTGCTAGAACAAATATTAATGAAGTAGATAAA
 M P E S V T L N E I F A R T N I N E V D K
 K R Y D S A F S E L L R H I N H G H V F F N Y
 70. AAAAGATATGATAGTGCTTTTAGTGAATTATTAAGACATATTAATCATGGACATGTATTTTTAATTAT
 N K E G C W Y I S Y I L H K E V E E I L G Q Y
 139. AATAAAGAAGGATGTTGGTATATTAGTTATATATTACATAAAGAAGTTGAAGAAATATTAGGACAATAT
 Y N S Y A Y D L L K Q F V F K F N E N R S I R
 208. TATAATGTTATGCATATGATTTATTAACAATTTGTTTTAAATTTAATGAAAATAGAAGTATAAGA
 S D I C K K D Y V Y I N S D T Y K I M N G L Y
 277. TCAGATATATGTA AAAAGATTATGTATATATTAATAGTGATACTTATAAAATTATGAATGGATTATAT
 N L Y D E Y T K Y K P I H D N T I P K N C C F
 346. AATTTATATGATGAATATACAAAATTAACCTATTCATGATAATACAATACCAAAAATTGTTGTTTT
 L Y E N I K H F D T E I R K T I L K Y K I Y E
 415. TTATGAAAATATTAACATTTTGATACAGAAAATTAGAAAACAATATTAATATAAAATATATGAA
 C R E Y P Y E V G K L N L Y T P P E P E K T I
 484. TGTAGAGAATATCCATATGAAGTTGAAAATTAATTTATATACACCACCAGAACCGAAAAACAATT
 A P V P V E Q Q Q A P N V L Q N S H H E V T H
 553. GCACCAGTACCAGTAGAACACAACAAGCACAATGTATTACAAAATTCACATCATGAAGTAACACAT
 H P V T A V D K V R K V E A E Q E Q G T A H D
 622. CATCCAGTAACAGCAGTTGATAAAGTTAGAAAAGTGAAGCTGAACAAGAACAAGTACTGCACATGAT
 Q E I A R D Y V N S P E H G R V F K P E G V H
 691. CAAGAAATAGCAAGAGATTATGTTAATAGTCCAGAACATGGAAGAGTTTTAAACCTGAAGGTGTTTAT
 N A E R S R E H G I S H G Y R S T Y N H R G E
 760. AATGCAGAAAGATCAAGAGAACATGGTATAAGTCATGGATATAGAAGTACTTATAATCATAGAGGTGAA
 E K T F R P G L S P Y P Q A F A T H D S S V K
 829. GAAAAAAGTTTTAGACCAGGATTAAGTCCATATCCACAAGCTTTTGCTACACATGATAGTAGTAAAA
 Q E L T D V S S F S Q K S E P Q K E D E G F M
 898. CAAGAATTAACAGATGTATCAAGTTTTAGTCAAAAAGTGAACCACAAAAGAAGATGAAGGTTTTATG
 A N M R N T I T G V L G E V D P V P V G V S
 967. GCAAATATGAGAAATACAATTAAGTGGTATTAGGTGAAGTTGATCCAGTCCAGTACTGGAGTTAGT
 G G M G A L F L F R Y T P V G A F F R G G R
 1036. GGTGGAATGGGAGCATTATTTTTATTATTTAGATATACACCTGTTGGAGCATTTTTTAGAGGTGGAAGA
 G R V H H R I P R S F N G P F P G G F P G F E E
 1105. GGAAGTTTCATAGAATACCTAGAAGTTTTAATGGACCTTTCTGGTGGATTTCAGGATTTGAAGAA
 Y E S G Y I G Y G P M N P L A E
 1174. TATGAATCAGGATATATTGGATATGGTCCAATGAATCCATTAGCAGAACCTAGG

vir14-putative – (PVX_108770)

1. GGTACCATGTTTGAATTTAGAAGGTTGGTGAACACACAAGTAGAAGCAGATGATGAAACAATATCAGAAAAGT
 M F D L E G G G T Q V E A D D E T I S E S
 T I Q G Q R I I F E H L P A Y I F E Q K L K E
 70. ACAATTCAGGACAAAGAATTATATTTGAACATTTACCAGCTTATATTTTTGAACAAAAATAAAAAGAA
 D A T D N N F S G Y Y N V V K H I S E R Y G W
 139. GATGCAACAGATAAATAATTTTTTCAGGATATATAATGTAGTAAAAATATATCTGAAAGATATGGATGG
 G N D L F K K L S R N I S L V H D S Y I E G D
 208. GGAAATGATTTTTTAAAAAATTAACAAGAAATATTAGTTTAGTACATGATAGTTATATTGAAGGGGAT
 E F N R K R C Y D L N Y W L Y D N V Y K N L E
 277. GAATTTAATAGAAAAGATGTTATGATTTAAATTTGGTTATGATAATGTTTTAAAAATTTAGAA
 S S N T N D T D Y F K D I S T K L Q G V W K N
 346. AGTAGTAATACAATGATACAGATTTATTTAAAGATATATCAACAAAATTAACAAGGAGTATGAAAAAT
 I V D N E F K D R P Y Q C Y P D K E L L L N M
 415. ATAGTAGATAATGAATTTAAAGATAGACCATATCAATGTTATCCAGATAAAGAATTTATTTAAATATG
 G Y L Q E I K D L F D F Y E D Y N E M K K E I
 484. GGATATTTACAAGAAAATAAAGATTTATTTGATTTTTATGAAGATTATAATGAAATGAAAAAGAAAAT
 I A D T S G S C R R Y V E Y L K Q R I P V Y Y
 553. ATAGCAGATACAAGTGGAGTTGTAGAAGATATGTAGAATATTTAAAAACAAGAATACCAGTATATTTAT
 T W R D S C K V P E Y T C K R Y I D D Y M K Y
 622. ACTTGGAGAGATAGTTGTAAGTACCAGAATATACATGTAAGAAGATATATTGATGATTATATGAAATAT
 R P A S S I V P D L S P W V V L T Y P G N K C Y
 691. AGACCAGCAAGTATAGTACCAGATTTAAGTCCATGGGTAGTATTAACATATCTGGAATAAATGTTAT
 A T C V Y D I F V K A K E Q P K R N D G I Y K K
 760. GCAACGTATATGATTTTTGTA AAAAGCAAAAACAACCTAAAAGAAGTGAAGAAATTTAAAAA
 K M E K L E K L N P G K S L L N I S M G E G L
 829. AAAATGAAAAAATAGAAAAATTAATCCTGGAAAAAGTTTTATTAATATTAGTATGGGAGAAAGATTA
 R G S E F F I P G D H D D Y W L R L K W D I L
 898. AGAGGAAGTGAATTTTTTATTCCTGGTGATCATGATGATTATTGGTTAAGATTTAAATGGGATATATTA
 L Y I T D D I T P P V L G I V G T L L I F W A
 967. TTATATTTACAGATGATATTACACCACCAGTATTAGGAATAGTAGGAACATTTATTAATTTGGGCA
 L Y K V R K R I R P N I N Y D D I K L L Y G S
 1036. TTATATAAAGTTAGAAAAAGAATTAGACCAAAATTAATTTATGATGATTTAAATTTATTTAGGAAGT
 E S L N S S T D S Y D Y N N D Y D N D Y D
 1105. GAAGAAAGTTTTAAATAGTTCAACAGATAGTTATGATTATAAATAATGATTATGACAATGATTATGATAAT
 D D Y S D S N S S Y N L S Y A S T L D Y
 1174. GATGATTATAGTGATAGTAAATAGTTATAATTTAAGTTATGCAAGTACATTAGATTATCCTAGG

vir24-like – (PVX_086855)

1. **GGTACC** M E E V E E E T Y N V D Q F L K E E S A N
 L K N S K L N K F Y S K L D S Y L V S G T N R
 70. T T A A A A A A T C A A A A T T A A A T A A A T T T T A A T T C T A A A T T A G A T A G T T A T T T A G T T A G T G G A A C A A A T A G A
 S H Y C S A N I S D P K I H N L C Y S L E N R
 139. A G T C A T T A T T G T A G T G C A A A T A T T A G T G A T C C A A A A A T T C A T A A T T T A T G T T A T A G T T T A G A A A A T A G A
 I F K K W R S L R S I L G S S K Y K C Y D Y L
 208. A T T T T A A A A A T G G A G A A G T T T A A G A T C A A T A T T A G G A T C A A G T A A A T A A A A T G T T A T G A T T A T T T A
 N Y W L Y G K L S E Y N S E P L D S F Q F Y K
 277. A A T T A T T G G T T A T A T G G A A A A T T A T C A G A A T A T A A T A G T G A A C C A T T A G A T T C A T T T C A A T T T T A T A A A
 G L E E I F K A K V T G A P S G T Y N K H F E
 346. G G A T T A G A A G A A A T T T T T A A G C A A A A G T A A C A G G T G C A C C A A G T G G T A C T T A T A A T A A A C A T T T T G A A
 Q V T Y Q E T L K N K K E L H D F S E Y F D Y
 415. C A A G T A A C A T A T C A A G A A A C T T T A A A A A T A A A A A A A A T T A C A T G A T T T T C A G A A T T T T G A T T A T
 I I R V I N G A D S G K K G K Y C Q Y V S H I
 484. A T T A T A A G A G T T A T A A A T G G T G C T G A T A G T G G A A A A A A A G G T A A A T A T T G T C A A T A T G T A T C A C A T A T A
 L R L Y H N L K N E Y S T E L S K R Y D K E F
 553. T T A A G A T T A T A T C A T A A T T T A A A A A T G A A T A T T C A A C A G A A T T A T C A A A A G A T A T G A T A A G A A T T T
 K L F E G K F K T E S D L T S L I E K C G M Y
 622. A A A T T A T T T G A A G G A A A A T T T A A A C A G A A A G T G A T T T A C A A G T T T A A T A G A A A A A T G G A A T G T A T
 G A C P T V S E K A A D E E E A E R S P L L R E N V P V
 691. T G T G A C C A A C A G T T A G T G A A A A G A T G A A G A A A A A G A A G T C C A T T A T T A A G A G A A A A T G T A C C A G T A
 E T P R H V Q M P R D L N M N T I Q A G L P S
 760. G A A A C A C C A A G A C A T G T C A A A T G C C A A G A G A T T T A A A T A T G A A T A C A A T T C A A G C A G G A T T A C C A A G T
 K E I Y D E L N K V E G S T Y Y D N Y C K Y F
 829. A A A G A A A T A T A T G A T G A A T T A A A T A A A G T A G A A G G A T C A A C T T A T T A T G A T A A T T A T T G T A A A T A T T T
 D T K N Q E L L K P L C R K I V R N L K N I S D
 898. G A T A C A A A A A T C A A G A A T T A A A A C C A T T A T G T A G A A A A T A G T T A G A A A T T T A A A A A A T T T A G T G A T
 N K I M K K L N Q G D R C L H F I F W A Y D E
 967. A A T A A A A T T A T G A A A A A T T A A A T C A A G G T G A T A G A T G T T T A C A T T T T A T T T T T G G G C T T A T G A T G A A
 I G K K F N W P W R N V Y N I P E A K S L L D
 1036. A T A G A A A A A A A T T T A A T T G G C T T G G A G A A A T G T T T A T A A T T C C A G A A G C T A A A A G T T T A T T A G A T
 V W S K V S M E A L Q R G S T H R V H M A S R
 1105. G T T T G G A G T A A A G T A T C A A T G G A A G C T T T A C A A A G A G G A A G T A C A C A T A G A G T T C A T A T G G C A A G T A G A
 D I D R H C I L R D R N G S C I K H K F I T G
 1174. G A T A T A G A T A G A C A T T G T A T A T T A A G A G A T A G A A A T G G A A G T T G T A T A A A C A T A A A T T T A T T A C T G T
 D E D D Y A L K N Y N T C L Y Y I N C S S N E
 1243. G A T G A A G A T G A T T A T G C T T T A A A A A A T T A T A A T A C T T G T T A T A T T A T A T T A A T T G T A G T T C A A A T G A A
 C K E M K A L Y D Y F Y N F S D I K K K V T T
 1312. T G T A A A G A A A T G A A A G C A T T A T A T G A T T A T T T T A T A A T T T T T C A G A T A T T A A A A A A A A A G T A A C A A C A
 A S T C P T H N A Y L L S Y I A K L Y E K Y R Q
 1381. G C A A G T A C A T G C C A A C A C A T A A T G C T T A T T T A A G T T A T T G C T A A A T T A T A T G A A A A A T A T A G A C A A
 S S K G D C C R R R D C D D F F K C D E D L N
 1450. A G T A G T A A A G G A G A T T G T T G T A G A A G A A G A G A T T G T G A T G A T T T T T T A A A T G T G A T G A A G A T T T A A A T
 P K N L Q K L S V C G G V Q T Y S P R G V T P
 1519. C C A A A A A A T T T A C A A A A A T T A T C T G T A T G T G G T G G T G T A C A A C A T A T A G T C C A A G A G G T G T A A C C C A
 Q G L T A R V L T Q P G L T Q Q G L T E R G L
 1588. C A A G G A T T A A C A G C A A G A G T A T T A C C C A A C C A G G G T T A A C T C A A C A A G G T T T A A C C G A A A A G G G G T T A
 T E R G L T E R G L T Q Q D L T P R A G E E T
 1657. A C T G A A A G A G G A T T A A C A G A A A G G G G T T T A A C A C A A C A A G A T T T A A C A C C A A G A G C T G G T G A A G A A C A
 Y D A S Q R S R L G Q R N P D E S F S Y D G D
 1726. T A T G A T G C A A G T C A A G A A G T A G A T T A G G A C A A A G A A A T C C A G A T G A A T C T T T A G T T A T G A T G G T G A T
 H Y H Y D G H S H G P G H M D D G R V G N T R
 1795. C A T T A T C A T T A T G A T G G A C A T A G T C A T G G A C C A G G A C A T A T G G A T G A T G G A A G A G T T G G A A T A C A A G A
 H A V Q D Q S A E N N S W L F D F S D Y R N N
 1864. C A T G C A G T A C A A G A T C A A A G T G C T G A A A A T A A T A G T T G G T T A T T T G A T T T T C T G A T T A T A G A A A T A A T
 I R L F T V I G V F L L A F G M Y R Y T P A
 1933. A T T A G A T T A T T T A C A G T A A T A G G T G G T A T T T T A T T A G C A T T T G G A A T G T A T A G A T A T A C A C C A G C T
 G K W F N S K N R K K I K L D D F Q F E E N T
 2002. G G A A A A T G G T T T A A T A G T A A A A A T A G A A A A A A A T T A A A T T A G A T G A T T T T C A A T T T G A A G A A A A T A C T
 E D A A T Y A T G Y N D E N S P N R T V Y L G
 2071. G A A G A T G C A G C A A C A T A T G C A A C T G G T T A T A A T G A T G A A A A T T C A C C A A A T A G A A C A G T A T A T T T A G G A
 Y Y P S D E S V Y Q
 2140. T A T T A T C C A A G T G A T G A A T C A G T A T A T C A A **CCTAGG**

vir21-like – (PVX_088790)

1. M K N Y A L C L F F I M S I L G S Q I G T
 GGTACCATGAAAAATTATGCATTATGTTTATTTTTTATTATGAGTATATTAGGAAGTCAAATAGGAACA
 T E V K S L F R N L Y K K F T R N Y S I V S N
 70. ACAGAAAGTAAAAGTTTTATTTAGAAATTTATATAAAAAATTTACAAGAAATTTATAGTATAGTTAGTAAT
 E Y D S Y F G E I E K N K E K S K Y S C K Y L
 139. GAATATGATAGTTATTTTTGGAGAAATTTGAAAAAATAAGAAAAAGTAAATATTCATGTAATATTTA
 K Y W F Y D Q A I A N N I N E S D I D F F P S
 208. AAATATTGGTTTTATGATCAAGCAATAGCAAAATAATTAATGAATCAGATATAGATTTTTTCCATCA
 L W S N L V R S L P G I R D F P C K F Y S L K
 277. TTATGGTCAAATTTAGTTAGAAGTTTACCTGGTATAAGAGATTTTCTTGTAAATTTTTATTCTTTAAAA
 L D E I K E I K Q L Y D Y F A L Y D G Y P D E
 346. TTAGATGAAATAAAAGAAATTAACAATTATATGATTATTTTTGCTTTATATGATGGTTATCCAGATGAA
 A L R N F K I Y D S V H C K Y F K E A I D F Y
 415. GCTTTAAGAAATTTTAAATTTTATGATAGTGTACATTGTAATATTTTAAAGAAAGCAATAGATTTTTAT
 K R M K S R C P N N E S S E Y C K E F H E Y S
 484. AAAAGAATGAAAAGTAGATGTTCAAATAATGAATCTAGTGAATATTGTAAAGAATTTTATGATATTCA
 E D S K F E K A L L S F R G I K H K T L N T
 553. GAAGATAGTAAATTTGAAAAAGCTTTTAAAGTTTTAGAGGAATATGTAACATAAAAACCTTTAAATACA
 T P G G G D E T K V T L D Q D L Q K L A D A D R D
 622. ACACCAAGTGGTGGTATGAAACAAAAGTAAACATTAGATCAAGATTTTCAAAAAATGACGATAGAGAT
 N I L N D I L L S Q F Y E V L N I G F F N N Y E
 691. AATATTTTAAATGATATATTTAAGTCAATTTTATGAAGTTTTAAATATTGGTTTTAATAATTATGAA
 E S H I C N N L I K D S N S Y H I T K I C N K
 760. GAAAGTCATATATGTAATAATTTAATAAAGATTCAAATAGTTATCATATTACAAAAATATGTAATAAA
 L N V I L Q N W D K I L K S F E S V I N R N Y
 829. TTAATGTTATATTACAAAATTTGGGATAAAAATTTTAAAAAGTTTTGAAAGTGTATAAATAGAAATTTA
 C E Y L N Y W I H D Q I K D K M F R K K T T T
 898. TGTGAATATTTAAATTTGGATTGATGATCAAATAAAAGATAAAAATGTTTAGAAAAAACAACAACT
 L I Y T V W D I L N K H K I N S N N K C W Y K
 967. TTAATATATACAGTATGGGATATATTAATAAACAATAAAATTAATAGTAATAATAAATGTTGGTATAAA
 N F N V P E K D F K N K K K L Y E F L E Y N
 1036. AATTTTAAATGTACCAGAAAAAGATTTTAAAAATAAAAAAATTTATATGAATTTTTAGAATATTATAAT
 A I K S K M E K M D S S K K E E Y C E Y L K S
 1105. GCTATAAAAAAGTAAAATGGAAAAATGGATAGTTCAAAAAAAGAAAGTAAATTTGTAATTTTAAAAAGT
 I F S L Y Y T V K H E D L C K K S T V Y K D E
 1174. ATATTTTCATTATATTATACAGTAAAACATGAAGATTTATGTAAAAAAGTACAGTTTATAAAGATGAA
 V D Y F Q K T I K D G D L A F L K K N C P G K
 1243. GTAGATTATTTTCAAAAAACTATAAAAGATGGTATTTAGCATTTTTTAAAAAATTTGTCCTGGAAAA
 N I E L L F K E Q S S P G K G N Q N P Q L T
 1312. AATATTGAATTTATTTTAAAAAAGAACAAGTTACCTGGAAAAAGGTAATCAAATCCACAATTAACA
 K G K Q G D E L N S L S S E T N S N D L D N V
 1381. AAAGGTAACAAGGTGATGAATTAATAGTTAAGTAGTGAACAAATTTCAAATGTTTAGATAATGTA
 E G I D N Y C G I C I N M L K L E K D Y P G I
 1450. GAAGGTATTGATAATTTGTGGTATATGATTAATATGTTAAAAATAGAAAAAGATTATCCTGGTATA
 N E L C K T F A K N L S K I K D K G D Y N D Y
 1519. AATGAATTTATGTAACATTTGCTAAAAATTTATCAAAAAATAAAGATAAAGGTGATTATAATGATTAT
 C L D L T Y W T Y D K L S G M F N S T S D Y S
 1588. TGTTTAGATTTAACTTATTTGGACATATGATAAATTTATCTGGAATGTTTAAATAGTACAAGTATTATCT
 D I G P V V M E L R R V M D H I N N T Q L R N
 1657. GATATAGGACCAAGTAGTAATGGAATTAAGAAGAGTAATGGATCATATTAATAATACTCAATTAAGAAAT
 K P C Y F Y F D G N S T D R N E E A Q L L K Y
 1726. AAACCATGTTATTTTTATTTGATGGAATAGTACAGATAGAAATGAAGAAGCACAATTTAAAAATAT
 F R N F D S I Y A K E S F E N G E K D K Y C N
 1795. TTTAGAAATTTTATTCAATATATGCAAAAAGAAATCATTGAAAAATGGTAAAAAGATAAATATTGTAAT
 F A E S I N T L Y G K Y A N R C C T Y F K D Y
 1864. TTTGCTGAAAGTATAAATCTTTATATGTTAAATGCAAAATAGATGTTGACTTTTAAAGATTAT
 T P F N R C I K Y F K C D P K Y N P Y N L Q L
 1933. ACACCTTTTAAATAGATGATTAATAATTTTAAATGTTGATCCTAAATATAATCCTTATAATTTACAATTA
 K L N C P G V F K T E S T F E K V E A P V P L
 2002. AAATTAATTTGTCCTGGTGTTTTTAAAAACAGAATCAACTTTTAAAAAGTAGAAGCACCAGTACCATTA
 P V T E D N S V N S V K E E P P K R E Y F P K
 2071. CCAGTAACAGAAAGATAATTCAGTAAATAGTAAAAGAAAGAACCCACCTAAAAGAAATATTTTCCAAAA
 V I E S T Y M E L I E D P F Y M A S F S V F F
 2140. GTAATAGAATCAACATATATGGAATTAATAGAAGATCCATTTTATATGGCAAGTTTTAGTGTATTTTT
 L I G I F F V F F Y K F T P I G T W I N R
 2209. TTAATAGGAATATTTTTGTTTTTTGTTATTTATAAATTTACTCCAATAGGAACCTGGATTAATAGA
 K G K K I R H I Q N D Y N D S Q R G K L I M Y
 2278. AAAGGTAAAAAATAGACATATACAAAATGATTATAATGATAGTCAAAGAGGAAAAATTAATATGAT
 D S R P E H I N Y Q N E R I R L S Y H H D
 2347. GATAGTAGACCAGAACATATTAATTTCAAAATGAAAGAATTAGATTAAGTTATCATCATGATCCTAGG

vir12-like – (PVX_090335)

1.	GGTACC	M A Q Q T S Q Q K L A F D K A S E A L K L
		N A I Y E E L F P K D V K S K F D K D C E L L
70.	AATGCAATAT	GAAGAATTATTTCCAAAAGATGTAAAAAGTAAATTTTGATAAAGATTGTGAATTATTA
		N T H E G I Y K G V K A L C S K F G S S L E Y
139.	AATACTCAT	GAAGGAATATATAAAGGTGTAAAAGCTTTATGTTCAAAAATTTGGAAGTAGTTTAGAATAT
		A A D E R H R E K H K N Y C N Y L R Y W L Y D
208.	GCAGCAGAT	GAAAGACATAGAGAAAAACATAAAAATTTATTGTAATTATTTAAGATATTGGTTATATGAT
		E I G K I N K V D R S N K L S A I P F V E D L
277.	GAAATAGG	AAAAATTAATAAAGTAGATAGAAGTAATAAATTTATCAGCAATACCATTTTGTGAAGATTTA
		F T A V N K I N G K L N A N K C T L P F D K N
346.	TTTACAGC	AGTTAATAAAAATTAATGGAAAAATTAATGCAAATAAATGTACTTTTACCATTTTGATAAAAAT
		V T L D D L I K R K I L Y I Y F N K Y T N I K
415.	GTAACATT	GATGATTTAATAAAAAGAAAAATATTATATATTTTATTTAATAAATATACAAATATTAA
		S N I K P Q N K D E C S N Y F T Y L T Y M K S
484.	AGTAATAT	TAAACCACAAAAATAAAGTAGAATGTTCAAATTTTACTTATTTAACTTATATGAAATCA
		L Y D K Y R R M H C P F I W S L S N E S D F L
553.	TTATATGA	TAATATAGAAGAATGCATTGTCTTTTATTTGGAGTTTAAAGTAATGAATCAGATTTTTTA
		R C S S A Y D P K A L L L K V Q Q C K P E E T
622.	AGATGTAG	TAGTGCATATGATCCAAAAGCTTTATTATTAAAAAGTACAACAATGTAACCAGAAAGAACT
		G R S S P S L W D I F F G S S P S R T P A K G
691.	GGTAGAAG	TAGTCCAAGTTTATGGGATATTTTTTTTGGTAGTAGTCTAGTAGAACACCAGCAAAAAGGT
		R D T P A Q E Q G K V V V A R K P A D V E S T
760.	AGAGATAC	ACCAGCACAAGAACAAGGTAAAGTAGTAGTTCGAAGAAAACCAGCAGATGTTGAAAGTACA
		K G K D V T S G P T T N K V L A A V E S P P R
829.	AAAGGTAA	AGATGTTACAAGTGGACCAACAACAATAAAGTATTAGCAGCAGTAGAAAAGTCCACCAAGA
		G E Q T S E V K R V E S R E I S H N S Q S N H
898.	GGTGAACA	AAACATCAGAAGTAAAAAGAGTAAAGTCAAGAGAAAATACATAATAGTCAATCAATCAT
		M L L S G S D G R H S A T T T G H V V L P E V
967.	ATGTTAT	TAAAGTGAAGTGGTAGACATAGTGCAACAACAACAGGACATGTAGTATTACCAGAAAGTA
		A T D S S D F I E K T Y D V L K S E Y F R H A
1036.	GCAACAG	ATAGTAGTATGATTTTTATTGAAAAAACTTATGATGTTTTAAAAAGTGAATATTTTAGACATGCA
		I V G A S I I G V L V C L F F Y F K F T P I Q
1105.	ATAGTTGG	AGCAAGTATAAATGGAGTATTAGTTTGTTTATTTTTTTTATTTTAAATTTACACCTATACAA
		S Q T N K R E R K E R E L E N N Y Y D E Y E E
1174.	AGTCAAACA	AAATAAAGAGAAAGAAAAGAAAAGAGAATTAGAAAATAAATTTATGATGAATATGAAGAA
		E L P R Y G L Q Q S F E E S Q M G D V Y L S Y
1243.	GAATTACCA	AGATATGGATTACAACAAAGTTTTGAAGAAAAGTCAAATGGGAGATGTTATTTAAGTTAT
		E P R S R R D S Y Y
1312.	GAACCTAGA	AGTAGAAGAGATTTCATATTAT CCTAGG

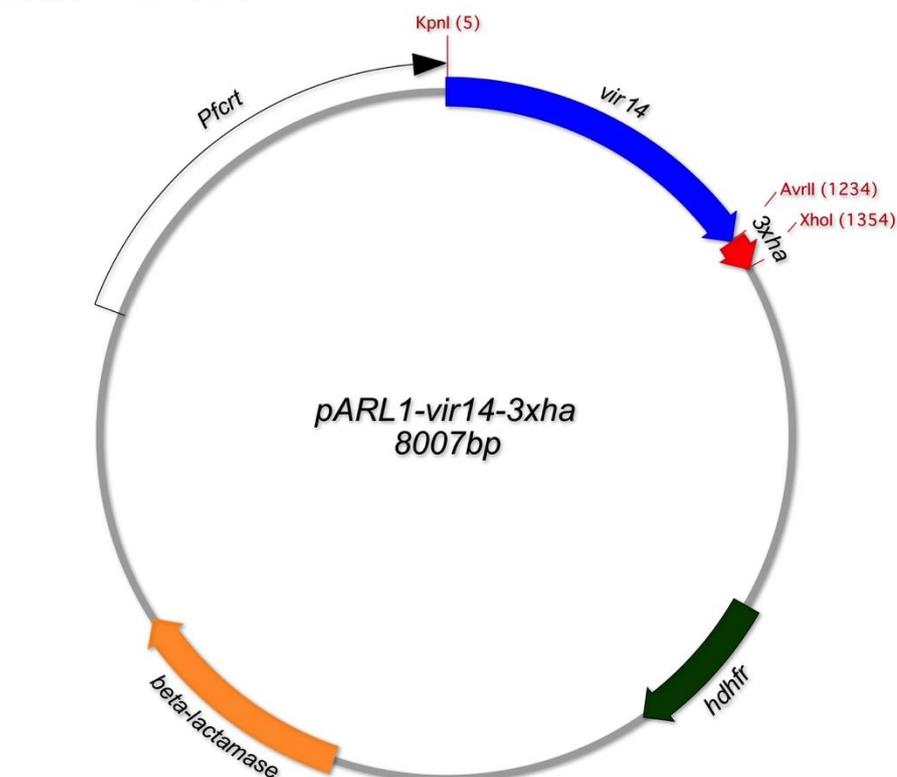
B pARL1-Verktorkarte

Abbildung B.I: Veiktorkarte des pARL1-Vektors. Schematische Darstellung des pARL1-Vektors mit *vir14* als Insert. Der Vektor enthält einen Pfcrt-Promotor sowie die Gene die für die humane DFHR sowie Beta-Laktamase und das 3-fache Hämagglutinin kodieren.

C Klassifizierung der VIR-Proteine und Vergleich mit Lopez et al., 2013

Bases-1.0be-30	Proteine	Positive TM-Vorhersage		Positive Signalpeptid-Vorhersage		Putative PEKEL-Motive		Cluster nach Lopez et al., 2013				
		TMHMM-2.0	Koordinaten	SignalP 4.1	SignalP 4.1	30FS	Cluster	Subfamilie	ID	Länge (AS)	Previous annotation	
UPL1.1.1.1	PXV_010605	Yes	218-240	No	No	PXV_010605	KGGLD		Cluster 6	J	PXV_010605	286 variable surface protein Vtr15, putative
	PXV_168270	Yes	343-365	No	No	PXV_168270			Cluster 6	J	PXV_168270	343 variable surface protein Vtr15, pseudogene, putative
	PXV_167265	Yes	205-228	No	No	PXV_167265	KLIPS		Cluster 6	J	PXV_167265	278 variable surface protein Vtr15, truncated, putative
	PXV_107750	Yes	222-244	No	No	PXV_107750	KLIPS		Cluster 6	J	PXV_107750	301 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_109795	Yes	232-254	No	No	PXV_109795	RVLVS		Cluster 6	J	PXV_109795	301 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_057690	Yes	226-245	No	No	PXV_057690	RVLVS		Cluster 6	J	PXV_057690	301 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_070690	Yes	194-216	No	No	PXV_070690	KVFD		Cluster 6	J	PXV_070690	260 variable surface protein Vtr15, truncated, putative
	PXV_067690	No	-	No	No	PXV_067690	KTYNE		Cluster 6	J	PXV_067690	260 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_096930	No	-	No	No	PXV_096930	KLYE		Cluster 6	J	PXV_096930	248 variable surface protein Vtr15-related, truncated
	PXV_096935	Yes	5-27	No	No	PXV_096935			Cluster 6	J	PXV_096935	304 variable surface protein Vtr15-related
	PXV_105705	No	-	No	No	PXV_105705	KTYD		Cluster 6	J	PXV_105705	191 hypothetical protein
	PXV_105710	Yes	214-236	No	No	PXV_105710	RVLPS		Cluster 6	J	PXV_105710	245 variable surface protein Vtr15, putative
UPL1.1.1.2	PXV_096925	Yes	196-218	No	No	PXV_096925	RVLSD		Cluster 6	J	PXV_096925	289 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_096925	Yes	196-218	No	No	PXV_096925	RVLSD		Cluster 6	J	PXV_096925	289 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_096925	Yes	196-218	No	No	PXV_096925	RVLSD		Cluster 6	J	PXV_096925	289 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_096925	Yes	196-218	No	No	PXV_096925	RVLSD		Cluster 6	J	PXV_096925	289 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_096925	Yes	196-218	No	No	PXV_096925	RVLSD		Cluster 6	J	PXV_096925	289 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_096925	Yes	196-218	No	No	PXV_096925	RVLSD		Cluster 6	J	PXV_096925	289 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_096925	Yes	196-218	No	No	PXV_096925	RVLSD		Cluster 6	J	PXV_096925	289 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_096925	Yes	196-218	No	No	PXV_096925	RVLSD		Cluster 6	J	PXV_096925	289 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_096925	Yes	196-218	No	No	PXV_096925	RVLSD		Cluster 6	J	PXV_096925	289 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_096925	Yes	196-218	No	No	PXV_096925	RVLSD		Cluster 6	J	PXV_096925	289 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_096925	Yes	196-218	No	No	PXV_096925	RVLSD		Cluster 6	J	PXV_096925	289 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_096925	Yes	196-218	No	No	PXV_096925	RVLSD		Cluster 6	J	PXV_096925	289 variable surface protein Vtr15-like
UPL1.1.1.3	PXV_000000	Yes	194-216	Yes	Yes	PXV_000000			Cluster 6	J	PXV_000000	234 variable surface protein Vtr15-like
	PXV_001615	Yes	282-304	No	No	PXV_001615	RLLTS		Cluster 1	E	PXV_001615	365 variable surface protein Vtr22/24-related
	PXV_003600	Yes	320-342	No	No	PXV_003600	KLPD		Cluster 1	E	PXV_003600	451 variable surface protein Vtr2-related
	PXV_072295	Yes	424-447	No	No	PXV_072295	KLLI		Cluster 1	E	PXV_072295	508 variable surface protein Vtr2, putative
	PXV_020680	Yes	509-520	No	No	PXV_020680	KTYE		Cluster 1	E	PXV_020680	520 variable surface protein Vtr12-like
	PXV_015635	Yes	511-528	No	No	PXV_015635	KOQV		Cluster 1	E	PXV_015635	520 variable surface protein Vtr12-like
	PXV_106220	Yes	461-468	No	No	PXV_106220	KALGS		Cluster 1	E	PXV_106220	481 variable surface protein Vtr12, putative
	PXV_017140	Yes	490-507	No	No	PXV_017140	KTYD		Cluster 1	E	PXV_017140	568 variable surface protein Vtr12-like
	PXV_102640	Yes	358-380	No	No	PXV_102640			Cluster 1	E	PXV_102640	441 variable surface protein Vtr12-related
	PXV_078195	Yes	491-508	No	No	PXV_078195			Cluster 1	E	PXV_078195	569 variable surface protein Vtr24-related
	PXV_022685	Yes	552-569	No	No	PXV_022685			Cluster 1	E	PXV_022685	630 variable surface protein Vtr24-related
	PXV_013620	Yes	469-476	No	No	PXV_013620			Cluster 1	E	PXV_013620	537 variable surface protein Vtr12-like
UPL1.1.1.4	PXV_107740	Yes	274-291	No	No	PXV_107740	KYLM		Cluster 1	E	PXV_107740	304 hypothetical protein
	PXV_107735	Yes	270-287	No	No	PXV_107735			Cluster 1	E	PXV_107735	362 hypothetical protein
	PXV_001625	Yes	380-397	No	No	PXV_001625			Cluster 1	E	PXV_001625	460 variable surface protein Vtr12-related
	PXV_077695	Yes	467-484	No	No	PXV_077695	KALLS		Cluster 1	E	PXV_077695	545 variable surface protein Vtr12-like
	PXV_027190	Yes	122-139	No	No	PXV_027190			Cluster 1	E	PXV_027190	200 hypothetical protein
	PXV_094245	Yes	534-551	No	No	PXV_094245	KLIGS		Cluster 1	E	PXV_094245	584 variable surface protein Vtr12-like
	PXV_107745	Yes	279-301	No	No	PXV_107745			Cluster 1	E	PXV_107745	351 variable surface protein Vtr12-like
	PXV_004495	Yes	491-508	No	No	PXV_004495	RALGS		Cluster 1	E	PXV_004495	449 hypothetical protein, conserved
	PXV_120845	Yes	510-527	No	No	PXV_120845	RPLVT		Cluster 1	E	PXV_120845	587 variable surface protein Vtr12-related
	PXV_101620	Yes	520-537	No	No	PXV_101620	RPLVT		Cluster 1	E	PXV_101620	594 variable surface protein Vtr16-related
	PXV_115985	Yes	497-514	No	No	PXV_115985			Cluster 1	E	PXV_115985	574 variable surface protein Vtr, putative
	PXV_183280	Yes	366-383	No	No	PXV_183280	KSITS		Cluster 1	E	PXV_183280	443 variable surface protein Vtr22/24-related
UPL1.1.1.5	PXV_075695	Yes	359-381	No	No	PXV_075695	KSIFS	RNLPE	Cluster 1	E	PXV_075695	436 variable surface protein Vtr22/24-related
	PXV_049690	Yes	289-306	No	No	PXV_049690			Cluster 1	E	PXV_049690	366 hypothetical protein
	PXV_083590	Yes	380-402	No	No	PXV_083590			Cluster 1	E	PXV_083590	452 variable surface protein Vtr2, putative
	PXV_074190	Yes	246-268	No	No	PXV_074190	KSIVE		Cluster 1	E	PXV_074190	452 hypothetical protein
	PXV_120340	Yes	375-397	No	No	PXV_120340			Cluster 1	E	PXV_120340	452 variable surface protein Vtr2-related
	PXV_023185	Yes	399-421	No	No	PXV_023185	KSIVE	KGLPS	Cluster 1	E	PXV_023185	476 variable surface protein Vtr2-related
	PXV_063190	Yes	406-428	No	No	PXV_063190	KALGS		Cluster 1	E	PXV_063190	485 variable surface protein Vtr2-related
	PXV_020170	Yes	384-406	No	No	PXV_020170	KSIVD		Cluster 1	E	PXV_020170	449 variable surface protein Vtr2-related
	PXV_093115	Yes	256-278	No	No	PXV_093115	KSIVD		Cluster 1	E	PXV_093115	332 hypothetical protein
	PXV_042190	Yes	410-432	No	No	PXV_042190	KSIVD		Cluster 1	E	PXV_042190	487 variable surface protein Vtr2-like
	PXV_021265	Yes	373-395	No	No	PXV_021265	KSIVD		Cluster 1	E	PXV_021265	450 variable surface protein Vtr2-related, truncated
	PXV_052690	Yes	319-339	No	No	PXV_052690	KSIVD		Cluster 1	E	PXV_052690	352 variable surface protein Vtr2-related
UPL1.1.1.6	PXV_092355	Yes	518-540	No	No	PXV_092355	KFLD		Cluster 1	E	PXV_092355	374 hypothetical protein
	PXV_034650	Yes	327-349	No	No	PXV_034650	KFLD		Cluster 1	E	PXV_034650	542 hypothetical protein
	PXV_076195	Yes	370-401	No	No	PXV_076195	KLCS		Cluster 1	E	PXV_076195	406 hypothetical protein
	PXV_004537	Yes	442-464	No	No	PXV_004537			Cluster 1	E	PXV_004537	466 hypothetical protein
	PXV_054190	Yes	319-341	No	No	PXV_054190			Cluster 1	E	PXV_054190	398 variable surface protein Vtr14-related, truncated
	PXV_093720	Yes	424-446	No	No	PXV_093720			Cluster 1	E	PXV_093720	498 variable surface protein Vtr24-like
	PXV_010105	Yes	344-366	No	No	PXV_010105	RQLSS		Cluster 1	E	PXV_010105	421 variable surface protein Vtr2-related
	PXV_024685	Yes	342-364	No	No	PXV_024685			Cluster 1	E	PXV_024685	419 variable surface protein Vtr2-related
	PXV_103155	Yes	360-382	No	No	PXV_103155	KGLSS		Cluster 1	E	PXV_103155	442 variable surface protein Vtr2-related
	PXV_073690	Yes	362-384	No	No	PXV_073690	KPLIT		Cluster 1	E	PXV_073690	433 variable surface protein Vtr2-related
	PXV_036690	Yes	20-37	No	No	PXV_036690	KTYD		Cluster 1	E	PXV_036690	98 hypothetical protein
	PXV_112630	Yes	13-30 / 179-601	No	No	PXV_112630			Cluster 1	E	PXV_112630	650 variable surface protein Vtr12, putative
PXV_158260	No	-	No	No	PXV_158260	KFLGD		Cluster 1	E	PXV_158260	287 variable surface protein Vtr12, truncated, putative	
PXV_170270	No	-	No	No	PXV_170270	KSIVD		Cluster 1	E	PXV_170270	332 variable surface protein Vtr12, truncated, putative	
PXV_133260	No	-	No	No	PXV_133260	KFLYD		Cluster 1	E	PXV_133260	268 variable surface protein Vtr12, truncated, putative	
PXV_157260	No	-	No	No	PXV_157260	KSLYD		Cluster 1	E	PXV_157260	315 variable surface protein Vtr12, truncated, putative	

Blastes1_00e-30	Proctene	ID	Positive TM4-Vorfälle TM4HM-Z.0 Koordinaten	Positive Signalpeptid-Vorfälle SignalP 4.1	Putative PROTEIN-Motifs										Cluster	Subfamilie	ID	Lang (AS)	Cluster nach Lopez et al., 2013		
					KILVD	KILVS	KILVD	KILVS	KILVD	KILVS	KILVD	KILVS	KILVD	KILVS					Previo	Proctene	
UPC3.1.7.1	9	PVX_025690	Yes	285-307	No										Cluster 8	B	PVX_025690	351	variable surface protein V121, putative	351	variable surface protein V121, putative
		PVX_103660	No	-	No										Cluster 8	B	PVX_103660	357	variable surface protein V121, putative	357	variable surface protein V121, putative
		PVX_033190	Yes	281-303	No										Cluster 8	B	PVX_033190	357	variable surface protein V121, putative	357	variable surface protein V121, putative
		PVX_058690	Yes	225-247	No										Cluster 8	B	PVX_058690	298	variable surface protein V121, truncated, putative	298	variable surface protein V121, truncated, putative
		PVX_062190	Yes	250-272	No										Cluster 8	B	PVX_062190	326	variable surface protein V121, truncated, putative	326	variable surface protein V121, truncated, putative
		PVX_164265	Yes	281-303	No										Cluster 8	B	PVX_164265	362	variable surface protein V121, putative	362	variable surface protein V121, putative
		PVX_075195	No	-	No										Cluster 8	B	PVX_075195	302	variable surface protein V126, putative	302	variable surface protein V126, putative
		PVX_180275	Yes	9-31	No										Cluster 8	B	PVX_180275	238	variable surface protein V126-like, truncated	238	variable surface protein V126-like, truncated
		PVX_059690	No	-	No										Cluster 8	B	PVX_059690	88	variable surface protein V126, putative	88	variable surface protein V126, putative
UPC3.2.1.1	14	PVX_002495	No	-	No									Cluster 7	I	PVX_002495	324	variable surface protein V127-like	324	variable surface protein V127, truncated, putative	
		PVX_150260	No	-	No									Cluster 7	I	PVX_150260	361	variable surface protein V127, truncated, putative	361	variable surface protein V127, truncated, putative	
		PVX_069190	No	-	No									Cluster 7	I	PVX_069190	343	variable surface protein V127-like, truncated	343	variable surface protein V127-like, truncated	
		PVX_064690	No	-	No									Cluster 7	I	PVX_064690	363	variable surface protein V127, putative	363	variable surface protein V127, putative	
		PVX_014625	No	-	No									Cluster 7	I	PVX_014625	375	variable surface protein V127, putative	375	variable surface protein V127, putative	
		PVX_053190	No	-	No									Cluster 7	I	PVX_053190	344	variable surface protein V127, putative	344	variable surface protein V127, putative	
		PVX_072190	No	-	No									Cluster 7	I	PVX_072190	362	variable surface protein V17, putative	362	variable surface protein V17, putative	
		PVX_064190	No	-	No									Cluster 7	I	PVX_064190	364	variable surface protein V17, putative	364	variable surface protein V17, putative	
		PVX_102630	No	-	No										Cluster 7	I	PVX_102630	345	variable surface protein V127, truncated, putative	345	variable surface protein V127, truncated, putative
		PVX_055690	No	-	No										Cluster 7	I	PVX_055690	192	variable surface protein V127, truncated, putative	192	variable surface protein V127, truncated, putative
		PVX_172775	No	-	No										Cluster 7	I	PVX_172775	328	variable surface protein V17, putative	328	variable surface protein V17, putative
		PVX_048190	No	-	No										Cluster 7	I	PVX_048190	117	variable surface protein V127, truncated, putative	117	variable surface protein V127, truncated, putative
		PVX_023685	No	-	No										Cluster 7	I	PVX_023685	292	variable surface protein V17, putative	292	variable surface protein V17, putative
		PVX_248300	Yes	293-315/322-344	No										Cluster 7	I	PVX_248300	400	variable surface protein V129, pseudogene, putative	400	variable surface protein V129, pseudogene, putative
UPC3.2.1.2	1	PVX_032690	No	-	No									Cluster 7	I	PVX_032690	156	variable surface protein V17, putative	156	variable surface protein V17, putative	
		PVX_054690	No	-	No									Cluster 7	I	PVX_054690	51	variable surface protein V129, truncated, putative	51	variable surface protein V129, truncated, putative	
UPC3.2.2.1	30	PVX_007080	No	-	No									Cluster 3	G	PVX_007080	451	variable surface protein V128, putative	451	variable surface protein V128, putative	
		PVX_071190	No	-	No									Cluster 3	G	PVX_071190	437	variable surface protein V128-related	437	variable surface protein V128-related	
		PVX_059190	No	-	No									Cluster 3	G	PVX_059190	439	variable surface protein V16, putative	439	variable surface protein V16, putative	
		PVX_007585	No	-	No									Cluster 3	G	PVX_007585	447	variable surface protein V128, putative	447	variable surface protein V128, putative	
		PVX_108255	No	-	No									Cluster 3	G	PVX_108255	442	hypothetical protein	442	hypothetical protein	
		PVX_028890	No	-	No									Cluster 3	G	PVX_028890	459	variable surface protein V16, putative	459	variable surface protein V16, putative	
		PVX_039690	No	-	No									Cluster 3	G	PVX_039690	469	variable surface protein V16-like	469	variable surface protein V16-like	
		PVX_032690	No	-	No									Cluster 3	G	PVX_032690	407	variable surface protein V16, putative	407	variable surface protein V16, putative	
		PVX_055190	No	-	No									Cluster 3	G	PVX_055190	446	variable surface protein V16, putative	446	variable surface protein V16, putative	
		PVX_121345	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_121345	410	variable surface protein V16, truncated, putative	410	variable surface protein V16, truncated, putative
		PVX_035190	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_035190	438	variable surface protein V16, putative	438	variable surface protein V16, putative
		PVX_047190	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_047190	325	variable surface protein V128-like	325	variable surface protein V128-like
		PVX_104695	Yes	368-390	No										Cluster 3	G	PVX_104695	435	variable surface protein V16-like	435	variable surface protein V16-like
		PVX_050690	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_050690	405	variable surface protein V16, putative	405	variable surface protein V16, putative
		PVX_079195	Yes	360-382	No										Cluster 3	G	PVX_079195	427	variable surface protein V16-like	427	variable surface protein V16-like
		PVX_014630	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_014630	464	variable surface protein V16, putative	464	variable surface protein V16, putative
		PVX_063690	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_063690	456	variable surface protein V16-like	456	variable surface protein V16-like
		PVX_073190	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_073190	492	variable surface protein V16-like	492	variable surface protein V16-like
		PVX_031190	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_031190	319	variable surface protein V16, putative	319	variable surface protein V16, putative
		PVX_012115	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_012115	109	variable surface protein V16, truncated, putative	109	variable surface protein V16, truncated, putative
PVX_033690	Yes	30-52	No										Cluster 3	G	PVX_033690	506	variable surface protein V16, truncated, putative	506	variable surface protein V16, truncated, putative		
PVX_030690	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_030690	186	variable surface protein V16, putative	186	variable surface protein V16, putative		
PVX_040190	Yes	216-238	No										Cluster 3	G	PVX_040190	266	variable surface protein V16, truncated, putative	266	variable surface protein V16, truncated, putative		
PVX_106210	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_106210	434	variable surface protein V16, putative	434	variable surface protein V16, putative		
PVX_024185	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_024185	427	variable surface protein V16-like	427	variable surface protein V16-like		
PVX_018655	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_018655	515	variable surface protein V128-like	515	variable surface protein V128-like		
PVX_032190	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_032190	497	variable surface protein V128-related	497	variable surface protein V128-related		
PVX_102130	Yes	415-437	No										Cluster 3	G	PVX_102130	456	hypothetical protein	456	hypothetical protein		
PVX_029690	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_029690	399	variable surface protein V16, putative	399	variable surface protein V16, putative		
PVX_014125	Yes	12-34/48-71/92-110	No										Cluster 3	G	PVX_014125	523	variable surface protein V16-like, pseudogene	523	variable surface protein V16-like, pseudogene		
PVX_057190	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_057190	119	variable surface protein V16, truncated, putative	119	variable surface protein V16, truncated, putative		
PVX_174270	Yes	151-173/193-212	No										Cluster 3	G	PVX_174270	475	variable surface protein V16-like, pseudogene	475	variable surface protein V16-like, pseudogene		
PVX_060190	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_060190	84	hypothetical protein	84	hypothetical protein		
PVX_070190	No	-	No										Cluster 3	G	PVX_070190	182	variable surface protein V128, truncated, putative	182	variable surface protein V128, truncated, putative		
PVX_042690	Yes	3-25/265-285	No										Cluster 11	K	PVX_042690	337	variable surface protein V130, putative	337	variable surface protein V130, putative		
PVX_145260	No	-	No										Cluster 11	K	PVX_145260	305	variable surface protein V130, putative	305	variable surface protein V130, putative		
PVX_053265	No	-	No										Cluster 11	K	PVX_053265	349	variable surface protein V130, pseudogene, putative	349	variable surface protein V130, pseudogene, putative		
PVX_053690	No	-	No										Cluster 11	K	PVX_053690	190	variable surface protein V130, putative	190	variable surface protein V130, putative		
PVX_056690	No	-	No										Cluster 11	K	PVX_056690	190	variable surface protein V130, truncated, putative	190	variable surface protein V130, truncated, putative		

D Klassifizierung und Domänenstruktur der var-Gene nach Lavstsen *et al.*, 2003 und Rask *et al.*, 2010

Gene	Location	Orientation (transcribed towards)	DBL1-CIDR1			Domain structure												
			5' region	ATS	3' region	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	C2	DBL3- γ	DBL4- δ	DBL5- ϵ	DBL6- ζ	DBL7- η	...			
PFE1640w**	Telomeric	Telomere	upsD	A	None	None	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	C2	DBL3- γ	DBL4- δ	DBL5- ϵ	DBL6- ζ	DBL7- η	...	var1	
PFL0030c	Near telomere	Telomere	upsE	None	D	X	DBL1- α	DBL2- β	DBL3- γ	DBL4- δ	DBL5- ϵ	DBL6- ζ	ATS				var2	
PFD1235w	Near telomere	Telomere	upsA	A	A	A	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	C2	DBL3- γ	C2	DBL4- δ	DBL4- δ	CIDR- β	ATS		
MAL7P1.1	Telomeric	Telomere	upsA	A	A	A	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	C2	DBL3- γ	C2	DBL4- δ	DBL4- δ	CIDR- β	ATS		
PF11_0521	Telomeric	Telomere	upsA	A	A	A	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	C2	DBL3- γ	C2	DBL4- δ	DBL4- δ	CIDR- β	ATS		
PF13_0003	Near telomere	Telomere	upsA	A	A	A	DBL1- α	CIDR- γ	DBL2- β	C2	DBL3- γ	DBL4- δ	CIDR- β	DBL5- ϵ	C2	ATS		
PF08_0141	Near telomere	Telomere	upsA	A	A	A	DBL1- α	CIDR- γ	DBL2- β	DBL4- δ	CIDR- β	DBL4- δ	C2	ATS			var-Gruppe A	
PF11_0008	Near telomere	Telomere	upsA	A	A	A	DBL1- α	CIDR- γ	DBL2- β	DBL4- δ	CIDR- β	DBL4- δ	C2	ATS				
PFD0020c	Near telomere	Telomere	upsA	A	A	A	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	C2	DBL3- γ	DBL4- δ	DBL4- δ	CIDR- β	ATS			
PFA0015c	Near telomere	Telomere	upsA	A*	A	A	DBL1- α	DBL2- β	ATS									
MAL6P1.314	Near telomere	Telomere	upsA	A*	A	A	DBL1- α	DBL2- β	ATS									
PFI1820w	Near telomere	Telomere	upsA	A*	A	A	DBL1- α	DBL2- β	ATS									
PF08_0140	Near telomere	Centromere	upsBsh	A	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	C2	DBL3- γ	DBL4- δ	CIDR- β	ATS				
MAL6P1.316	Near telomere	Centromere	upsBshA	A	X	X	DBL1- α	CIDR- β	DBL2- β	C2	DBL3- γ	DBL4- δ	DBL5- ϵ	ATS				
PFL0020w	Near telomere	Centromere	upsBsh	X	X	B	DBL1- α	CIDR- β	DBL2- β	C2	DBL3- γ	DBL4- δ	DBL5- ϵ	ATS				
MAL6P1.4	Telomeric	Centromere	upsB	C	X	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	C2	DBL3- γ	DBL4- δ	CIDR- β	DBL5- ϵ	DBL6- ζ	DBL7- η	ATS	
PF11_0007	Telomeric	Centromere	upsB	X	B	D	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PF08_0142	Telomeric	Centromere	upsB	B	B	D	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PFE0005w	Telomeric	Centromere	upsB	B	B	D	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PFA0005w	Telomeric	Centromere	upsB	B	C	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PFA0765c	Telomeric	Centromere	upsB	B	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PFC1120c	Telomeric	Centromere	upsB	B	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PFD0005w	Telomeric	Centromere	upsB	B	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	DBL4-x	CIDR- β	ATS						
PFI0005w	Telomeric	Centromere	upsB	D	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- γ	ATS							
PF13_0364	Telomeric	Centromere	upsB	D	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PF07_0139	Telomeric	Centromere	upsB	D	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	DBL3- γ	DBL4- δ	DBL5- ϵ	ATS				
PF08_0143	Telomeric	Centromere	upsB	D	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PF10_0406	Telomeric	Centromere	upsB	B	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PFL0005w	Telomeric	Centromere	upsB	B	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PFB0010w	Telomeric	Centromere	upsB	B	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	ATS								
PFC0005w	Telomeric	Centromere	upsB	B	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PFL2665c	Telomeric	Centromere	upsB	B	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PF13_0001	Telomeric	Centromere	upsB	B	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
MAL6P1.1	Telomeric	Centromere	upsB	E	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PFD1245c	Telomeric	Centromere	upsB	X	C	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PFI1830c	Telomeric	Centromere	upsB	C	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- γ	ATS							
PF10_0001	Telomeric	Centromere	upsB	C	B	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- γ	ATS							
PFL0935c	Centromeric	Telomere	upsB	D	C	B	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- γ	ATS							
PFD0635c	Centromeric	Telomere	upsBsh	C	C	C	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- γ	ATS							
PFL1955w	Centromeric	Telomere	upsBsh	C	C	C	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PF08_0106	Centromeric	Telomere	upsBsh	C	C	X	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
MAL7P1.50	Centromeric	Telomere	upsBsh	C	C	X	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- γ	ATS							
PF08_0103	Centromeric	Telomere	upsBsh	B	C	X	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
MAL7P1.55	Centromeric	Telomere	upsBsh	B	C	C	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- γ	ATS							
PF07_0050	Centromeric	Telomere	upsBsh	B	B	D	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	C2	DBL3- γ	ATS						
PFD1005c	Centromeric	Telomere	upsBsh	E	B	C	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- γ	ATS							
PFL1950w	Centromeric	Telomere	upsB*	E	B	D	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	C2	DBL3- γ	CIDR- β	ATS					
MAL6P1.252	Centromeric	Telomere	upsC	B	D	X	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	C2	DBL3- γ	CIDR- β	ATS					
MAL7P1.56	Centromeric	Telomere	upsC*	C	B	D	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PF08_0107	Centromeric	Telomere	upsC*	X	B	D	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- γ	ATS							
PFD0995c	Centromeric	Telomere	upsC	C	D	X	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- γ	ATS							
PF07_0049	Centromeric	Telomere	upsC	C	C	X	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- γ	ATS							
PFD0630c	Centromeric	Telomere	upsC	C	C	C	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- γ	ATS							
PFD1000c	Centromeric	Telomere	upsC	C	B	C	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- γ	ATS							
PFD1015c	Centromeric	Telomere	upsC	D	B	X	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PFD0615c	Centromeric	Telomere	upsC	C	X	X	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PF07_0051	Centromeric	Telomere	upsC	C	D	X	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PF07_0048	Centromeric	Telomere	upsC	C	C	C	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PFL1960w	Centromeric	Telomere	upsC	C	C	X	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							
PFD0625c	Centromeric	Telomere	upsC	C	C	X	DBL1- α	CIDR1- α	DBL2- β	CIDR- β	ATS							

Abbildung D.I: Schematische Darstellung der Klassifizierung sowie der Domänenstruktur der var-Gene des 3D7-Stamms (nach Lavstsen *et al.*, 2003; modifiziert).

Gen	Stamm	UPS	NTS	Extrazelluläre Domänenstruktur								ATS	
PF13_0003	3D7	A1	A3	DBLa1.6	CIDRβ1	DBLβ3	DBLy12	DBLδ5	CIDRβ3	DBLβ9		A2	
PF11_0008	3D7	A1	A6	DBLa1.5	CIDRγ3	DBLy12	DBLδ5	CIDRβ4	DBLβ9			A2	
PF11_0521	3D7	A1	A6	DBLa1.7	CIDRα1.4	DBLβ3	DBLβ6	DBLδ3	CIDRγ2			A2	
PFD1235w	3D7	A1	A2	DBLa1.4	CIDRα1.6	DBLβ3	DBLβ3	DBLy13	DBLδ1	CIDRβ5		A2	
PFD0020c	3D7	A1	A7	DBLa1.2	CIDRα1.1	DBLβ12	DBLy6	DBLy11	DBLδ1	CIDRγ6		A1	
PFE1640w	3D7	A2	A1	DBLa1.4	CIDRα1.3	DBLβ1	DBLy15	DBLε1	DBLy8	DBLζ1	DBLε5		
PF08_0141	3D7	A3	A5	DBLa1.6	CIDRδ2	DBLβ6	DBLy14	DBLζ5	DBLε4			A3	
PFA0015c	3D7	A3	A3	DBLa1.3	DBLε8							var3	
MAL6P1.314	3D7	A3	A3	DBLa1.3	DBLε8							var3	
PF11820w	3D7	A3	A3	DBLa1.3	DBLε8							var3	
PF10_0001	3D7	B1	B3	DBLa0.20	CIDRα3.1	DBLδ1	CIDRγ4					B1	
PFI0005w	3D7	B1	B3	DBLa0.16	CIDRα3.4	DBLδ1	CIDRγ12					B6	
PFL0935c	3D7	B1	B3	DBLa0.16	CIDRα3.4	DBLδ1	CIDRγ12					B18	
PF11830c	3D7	B1	B3	DBLa0.1	CIDRα3.1	DBLδ1	CIDRγ5					B1	
MAL7P1.50	3D7	B1	B3	DBLa0.1	CIDRα3.1	DBLδ1	CIDRγ10					B2	
PF08_0142	3D7	B1	B3	DBLa0.9	CIDRα2.11	DBLδ1	CIDRβ1					B1	
PFL0005w	3D7	B1	B3	DBLa0.9	CIDRα2.2	DBLδ1	CIDRβ1					B21	
PFA0765c	3D7	B1	B3	DBLa0.5	CIDRα2.8	DBLδ1	CIDRβ1					B1	
PFA0005w	3D7	B1	B3	DBLa0.11	CIDRα2.8	DBLδ1	CIDRβ1					B3	
PFL2665c	3D7	B1	B3	DBLa0.19	CIDRα2.3	DBLδ1	CIDRβ1					B2	
PF13_0001	3D7	B1	B3	DBLa0.11	CIDRα2.4	DBLδ1	CIDRβ1					B21	
PFE0005w	3D7	B1	B3	DBLa0.11	CIDRα2.4	DBLδ1	CIDRβ1					B1	
PFC0005w	3D7	B1	B3	DBLa0.9	CIDRα2.4	DBLδ1	CIDRβ1					B1	
PF10_0406	3D7	B1	B3	DBLa0.9	CIDRα2.7	DBLδ1	CIDRβ1					B1	
MAL7P1.212	3D7	B1	B3	DBLa0.17	CIDRα3.1	DBLδ1	CIDRβ1					B1	
MAL8P1.220	3D7	B1	B3	DBLa0.1	CIDRα3.1	DBLδ1	CIDRβ1					B1	
PFB1055c	3D7	B1	B3	DBLa0.16	CIDRα3.4	DBLδ1	CIDRβ1					B1	
PF13_0364	3D7	B1	B3	DBLa0.16	CIDRα3.4	DBLδ1	CIDRβ6					B1	
PF11_0007	3D7	B1	B3	DBLa0.15	CIDRα3.2	DBLδ1	CIDRβ1					B2	
MAL6P1.1	3D7	B1	B3	DBLa0.8	CIDRα4	DBLδ1	CIDRβ1					B2	
PFD1245c	3D7	B1	B3	DBLa0.14	CIDRα4	DBLδ1	CIDRβ1					B8	
PFC1120c	3D7	B1	B3	DBLa0.9	CIDRα2.1	DBLδ1	CIDRβ7					B1	
PF07_0139	3D7	B1	B3	DBLa0.16	CIDRα3.4	DBLδ1	CIDRβ1	DBLε4				B1	
PFB0010w	3D7	B1	B3	DBLa0.7	CIDRα2.2	DBLy11						B1	
PFD0005w	3D7	B1	B3	DBLa0.5	CIDRα2.10	DBLy5	DBLδ1	CIDRβ1				B1	
MAL6P1.316	3D7	B2	B3	DBLa2	CIDRα1.8	DBLβ12	DBLy4	DBLζ3	DBLε12			B3	
PF08_0140	3D7	B2	B5	DBLa2	CIDRα1.6	DBLβ12	DBLy4	DBLδ1	CIDRβ1			B1	
PF07_0050	3D7	B3	B3	DBLa0.18	CIDRα6	DBLβ6	DBLy9					B6	
PFD0635c	3D7	B3	B3	DBLa0.1	CIDRα3.1	DBLδ1	CIDRγ2					B5	
PFL1950w	3D7	B4	B3	DBLa0.7	CIDRα4	DBLβ8	DBLδ1	CIDRβ1				B8	
MAL6P1.4	3D7	B5	B3	DBLa0.6	CIDRα3.2	DBLβ5	DBLy13	DBLδ4	CIDRγ1	DBLε2	DBLε7	DBLε3	B16
PFL0020w	3D7	B5	B3	DBLa0.18	CIDRα5	DBLβ5	DBLy14	DBLζ5	DBLε4			B3	
PFD1005c	3D7	B5	B3	DBLa0.8	CIDRα4	DBLδ1	CIDRγ11					B19	
PF08_0103	3D7	B6	B3	DBLa0.12	CIDRα2.2	DBLδ1	CIDRβ1					B9	
MAL7P1.55	3D7	B7	B3	DBLa0.9	CIDRα2.4	DBLδ1	CIDRγ5					B13	
PF08_0106	3D7	B7	B3	DBLa0.2	CIDRα3.1	DBLδ1	CIDRβ1					B14	
PFL1955w	3D7	B7	B3	DBLa0.16	CIDRα3.4	DBLδ1	CIDRβ1					B7	
MAL6P1.252	3D7	C1	B1	DBLa0.21	CIDRα2.1	DBLβ4	DBLδ1	CIDRβ1				B17	
PFD0995c	3D7	C1	B3	DBLa0.1	CIDRα3.2	DBLδ1	CIDRγ6					B11	
PFD1000c	3D7	C1	B3	DBLa0.1	CIDRα3.2	DBLδ1	CIDRγ11					B19	
PF07_0049	3D7	C1	B3	DBLa0.17	CIDRα3.1	DBLδ1	CIDRγ7					B9	
PFD0630c	3D7	C1	B3	DBLa0.1	CIDRα3.1	DBLδ1	CIDRγ2					B5	
PF08_0107	3D7	C1	B3	DBLa0.15	CIDRα3.2	DBLδ1	CIDRγ2					B2	
PF07_0051	3D7	C1	B3	DBLa0.1	CIDRα3.1	DBLδ1	CIDRβ1					B12	
PFD0615c	3D7	C1	B3	DBLa0.17	CIDRα3.1	DBLδ1	CIDRβ1					B10	
PFL1960w	3D7	C1	B3	DBLa0.20	CIDRα3.1	DBLδ1	CIDRβ1					B23	
PFD1015c	3D7	C1	B3	DBLa0.24	CIDRα3.4	DBLδ1	CIDRβ1					B6	
PFD0625c	3D7	C1	B3	DBLa0.1	CIDRα3.2	DBLδ1	CIDRβ1					B5	
PF07_0048	3D7	C1	B3	DBLa0.1	CIDRα3.2	DBLδ1	CIDRβ6					B7	
MAL7P1.56	3D7	C2	B3	DBLa0.20	CIDRα3.1	DBLδ1	CIDRβ1					B1	
PFL0030c	3D7	E	pam	DBLpam1	DBLpam2	CIDRpam	DBLpam3	DBLεpam4	DBLεpam5	DBLε10		pam1	

Abbildung D.II: Schematische Darstellung der Klassifizierung sowie der Domänenstruktur der var-Gene des 3D7-Stamms (nach Rask *et al.*, 2010; modifiziert).

Gen	Stamm	UPS	NTS	Extrazelluläre Domänenstruktur								ATS
IT4var08	IT4	A1	A6	DBLa1.7	CIDRy3	DBLβ3	DBLδ4	CIDRy1	DBLζ6	DBLε9		A1
IT4var35	IT4	A2*	A1	DBLa1.1	CIDRa1.2	DBLβ11	DBLy1	DBLε1	DBLy8	DBLζ1	DBLε5	
IT4var03	IT4	A3	A6	DBLa1.3	DBLε8							var3
IT4var02	IT4	A3	A6	DBLa1.5	CIDRδ1	DBLβ3	DBLy12	DBLδ5	CIDRβ3	DBLβ9		A5
IT4var07	IT4	A3	A6	DBLa1.7	CIDRa1.4	DBLβ1	DBLβ3	DBLy10	DBLδ1	CIDRβ1		A4
IT4var18	IT4	A3	A3	DBLa1.2	CIDRa1.6	DBLβ3	DBLy16	DBLy2	DBLδ1	CIDRβ1		A6
IT4var64	IT4	A3	A5	DBLa1.5	CIDRδ1	DBLβ7	DBLy11	DBLy11				A4
IT4var22	IT4	A3	A2	DBLa1.4	CIDRa1.7	DBLβ3	DBLy10	DBLy11	DBLδ1	CIDRβ1		A3
DQ408104	IT4	A3	A5	DBLa1.5								
IT4var60	IT4		A7	DBLa1.8	CIDRβ2	DBLy7	DBLζ5	DBLε11	DBLε12			A1
IT4var9	IT4		A8	DBLa1.6	CIDRy3	DBLy15	DBLε1	DBLδ1	CIDRβ1			
IT4var14	IT4		B3	DBLa0.23	CIDRa5	DBLβ5	DBLδ1	CIDRy2	DBLy3	DBLζ4		
IT4var46	IT4	B1	B3	DBLa0.10	CIDRa2.2	DBLδ1	CIDRy4	DBLε2	DBLζ3	DBLε3		B19
IT4var10	IT4	B1	B3	DBLa0.5	CIDRa2.6	DBLβ10	DBLδ1					
IT4var67	IT4	B1	B3	DBLa0.10	CIDRa2.2	DBLε2	DBLζ3	DBLε12				B5
IT4var13	IT4	B1	B3	DBLa0.3	CIDRa5	DBLβ5	DBLδ9	CIDRy9	DBLy11	DBLζ4		B5
IT4var19	IT4	B1	B3	DBLa2	CIDRa1.1	DBLβ12	DBLy6	DBLδ1	CIDRβ1	DBLy9		B3
IT4var32a	IT4		B3	DBLa0.23	CIDRa3.2	DBLy6	DBLδ1	CIDRβ1				B16
IT4var32b	IT4	B1	B3	DBLa2	CIDRa1.1	DBLβ12	DBLy6	DBLδ1	CIDRβ1			B15
IT4var06	IT4	B1	B3	DBLa2	CIDRa1.1	DBLβ12	DBLy6	DBLδ1	CIDRβ4			B15
IT4var41	IT4	B1	B3	DBLa0.4	CIDRa5	DBLβ5	DBLy5	DBLδ1	CIDRβ1			
IT4var16	IT4	B1	B3	DBLa0.4	CIDRa5	DBLβ5	DBLy16	DBLδ1	CIDRβ6			B18
IT4var31	IT4	B1	B3	DBLa0.18	CIDRa4	DBLβ3	DBLy9					
IT4var44	IT4	B1	B3	DBLa0.16	CIDRa3.4	DBLβ13	DBLδ1	CIDRβ6				B2
IT4var11	IT4	B1	B3	DBLa0.3	CIDRa2.4	DBLβ10	DBLδ1	CIDRβ1				B1
AAB06961	IT4	B1	B3	DBLa0.18	CIDRa6	DBLβ4	DBLδ1	CIDRβ1				
IT4var12	IT4		B3	DBLa0.18	CIDRa6	DBLβ4	DBLδ1	CIDRβ1				B2
IT4var17	IT4	B1	B3	DBLa0.11	CIDRa2.4	DBLβ8	DBLδ1	CIDRy4	DBLy10			B18
IT4var29	IT4	B1	B3	DBLa0.3	CIDRa3.2	DBLδ1	CIDRy5					B20
IT4var24	IT4	B1	B3	DBLa0.10	CIDRa2.2	DBLδ1	CIDRy5					B1
IT4var45	IT4	B1	B3	DBLa0.5	CIDRa2.9	DBLδ1	CIDRβ1					B1
IT4var33	IT4	B1	B3	DBLa0.11	CIDRa2.4	DBLδ1	CIDRβ5					B15
IT4var25	IT4	B1	B3	DBLa0.11	CIDRa2.4	DBLδ1	CIDRβ1					B8
IT4var61	IT4	B1	B3	DBLa0.9	CIDRa2.7	DBLδ1	CIDRβ1					B6
IT4var54	IT4	B1	B3	DBLa0.1	CIDRa3.1	DBLδ1	CIDRβ1					B1
IT4var63	IT4	B1	B3	DBLa0.7	CIDRa3.4	DBLδ1	CIDRβ1					B5
IT4var26	IT4	B1	B3	DBLa0.23	CIDRa3.3	DBLδ1	CIDRβ1					B1
IT4var40	IT4	B1	B3	DBLa0.12	CIDRa2.11							
IT4var20	IT4	B2	B3	DBLa2	CIDRa1.1	DBLβ12	DBLy6	DBLδ1	CIDRβ1			B16
IT4var27	IT4	B3	B3	DBLa0.6	CIDRa3.1	DBLβ5	DBLy5	DBLδ1	CIDRβ1			B2
IT4var58	IT4	B3*	B3	DBLa0.1	CIDRa3.1	DBLδ1	CIDRβ5					
IT4var59	IT4	B3*	B3	DBLa0.1	CIDRa3.1	DBLδ1	CIDRβ1					B14
IT4var21	IT4		B3	DBLa0.1	CIDRa3.1	DBLδ1	CIDRβ1					B14
IT4var15	IT4	B7	B3	DBLa0.8	CIDRa3.5	DBLβ8	DBLδ1	CIDRβ1				B13
IT4var01	IT4	C1	B6	DBLa0.18	CIDRa6	DBLβ5	DBLy10	DBLδ2	CIDRy6			
IT4var51	IT4	C1	B3	DBLa0.17	CIDRa3.1	DBLδ1	CIDRy12					B5
IT4var66	IT4	C1	B3	DBLa0.19	CIDRa2.10	DBLδ1	CIDRβ1					
IT4var23	IT4	C1	B3	DBLa0.1	CIDRa3.1	DBLδ1	CIDRy10					B10
IT4var05	IT4	C1	B3	DBLa0.5	CIDRa2.3	DBLδ1	CIDRβ1					B1
IT4var34	IT4	C1	B3	DBLa0.1	CIDRa3.1	DBLδ1	CIDRβ4					B12
IT4var47	IT4	C1	B3	DBLa0.1	CIDRa3.3	DBLδ1	CIDRβ1					B4
IT4var62	IT4	C1	B3	DBLa0.1	CIDRa3.1	DBLδ8	CIDRβ2					B11
IT4var68	IT4	C1	B3	DBLa0.1	CIDRa3.2							
IT4var28	IT4	C2	B2	DBLa0.4	CIDRa3.1	DBLδ1	CIDRβ5					B6
IT4var30	IT4			DBLa0.13	CIDRa2.10	DBLδ1	CIDRβ1					B5
IT4var36	IT4			DBLa0.8	CIDRa5	DBLδ1	CIDRβ1					B6
IT4var39	IT4		B3	DBLa0.5	CIDRa2.5	DBLδ1	CIDRβ6					B9
IT4var04	IT4	E	pam	DBLpam1	DBLpam2	CIDRpam	DBLpam3	DBLpam4	DBLpam5	DBLε10		pam1
IT4var65	IT4			CIDRβ1								B10

Abbildung D.III: Schematische Darstellung der Klassifizierung sowie der Domänenstruktur der var-Gene des IT4-Stamms (nach Rask *et al.*, 2010; modifiziert).

E Bindungsdynamik von angereicherten *PfiE* an humane Endothelrezeptoren

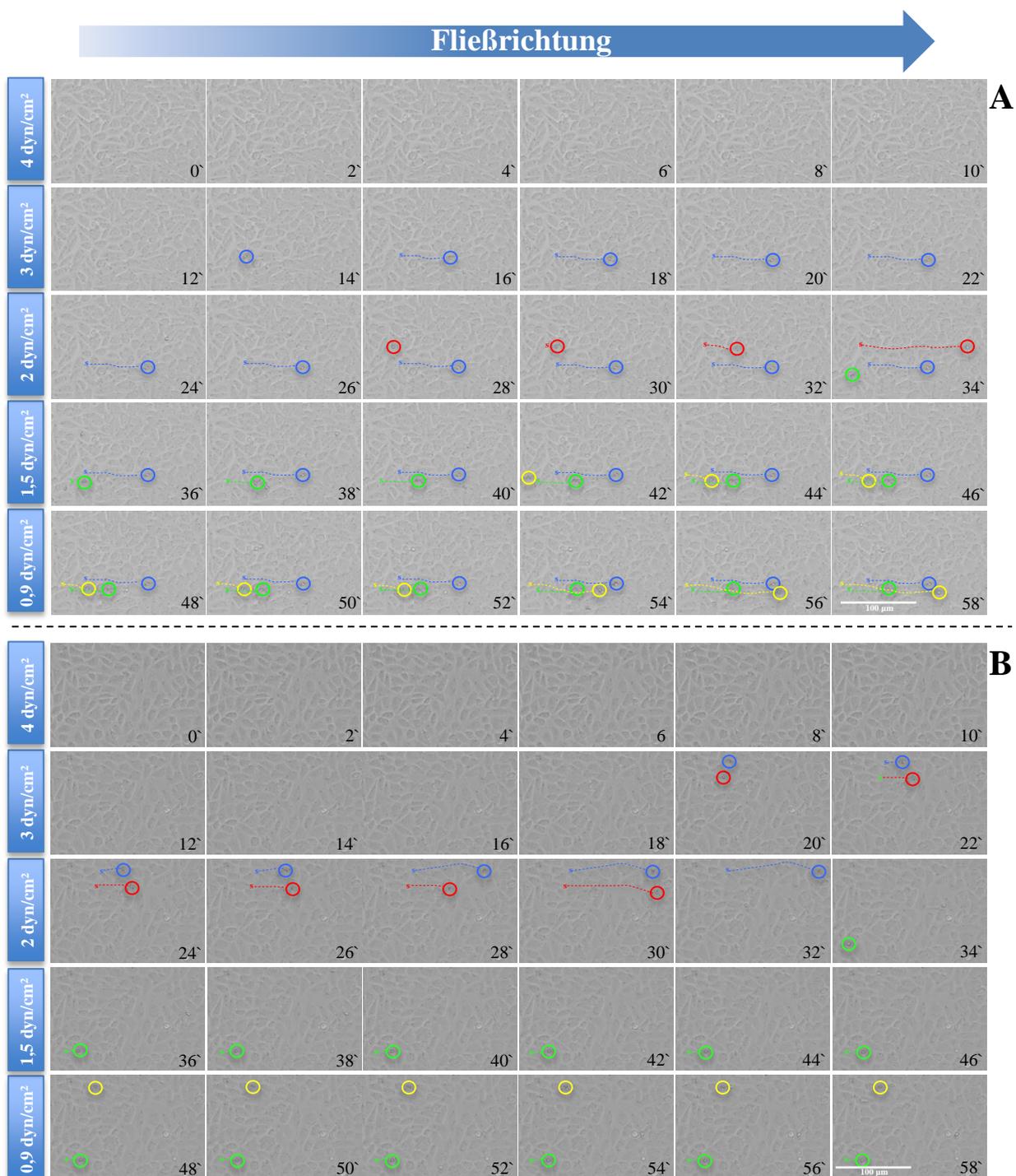


Abbildung E.I: Bindungsverhalten von CD36 angereicherten *PfiE* an transgene CHO-CD36 Zellen unter Flussbedingungen. Die Darstellung eines der biologischen Replikate des Experimentes zeigt das Bindungsverhalten von CD36 angereicherten IT4-*PfiE* (A) und 3D7-*PfiE* (B) an transgene CHO-Zellen, die den humanen Endothelrezeptor CD36 auf der Oberfläche tragen, unter unterschiedlichen Scherkräften. Nach der Bindung zeigten ca. 75 – 90 % der *PfiE* beider Stämme eine rollende Bewegung über die CHO-CD36 Zellen. Die rollende Bewegung konnte unter unterschiedlichen Scherkräften, u. a. auch unter physiologischer Scherkraft (0,9 dyn/cm²) beobachtet werden. Die farbigen Kreise zeigen einzelne *PfiE*. Jede Farbe markiert eine unterschiedliche Zelle. Das „s“ markiert den Startpunkt der Bindung für die jeweilige Zelle. Die Zeitreihe zeigt eine Aufnahme alle zwei Minuten (0' - 58'). Längenmaßstab: 100 µm.

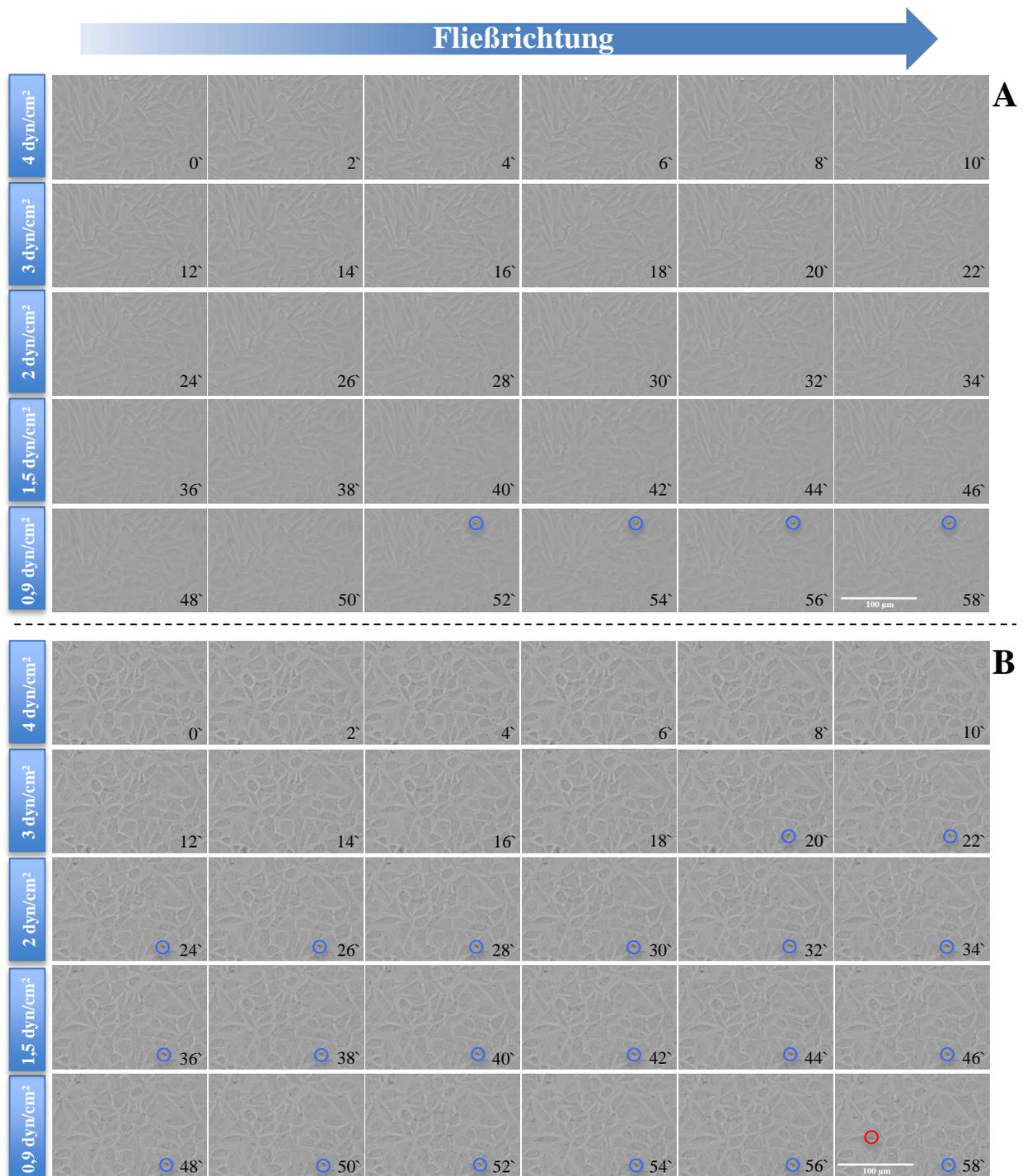


Abbildung E.II: Bindungsverhalten von CD36 angereicherten *PfiE* an transgene CHO-ICAM-1 Zellen unter Flussbedingungen. Die Darstellung eines der biologischen Replikate des Experimentes zeigt das Bindungsverhalten von CD36 angereicherten IT4-*PfiE* (A) und 3D7-*PfiE* (B) an transgene CHO-Zellen, die den humanen Endothelrezeptor ICAM-1 auf der Oberfläche tragen, unter unterschiedlichen Scherkräften. Nach der Bindung zeigten die *PfiE* beider Stämme eine statische Bindung an die CHO-ICAM-1 Zellen. Die statische Bindung konnte bei 100 % der gebundenen *PfiE* beider Stämme beobachtet werden. Die farbigen Kreise zeigen einzelne *PfiE*. Jede Farbe markiert eine unterschiedliche Zelle. Die Zeitreihe zeigt eine Aufnahme alle zwei Minuten (0' - 58'). Längenmaßstab: 100 µm.

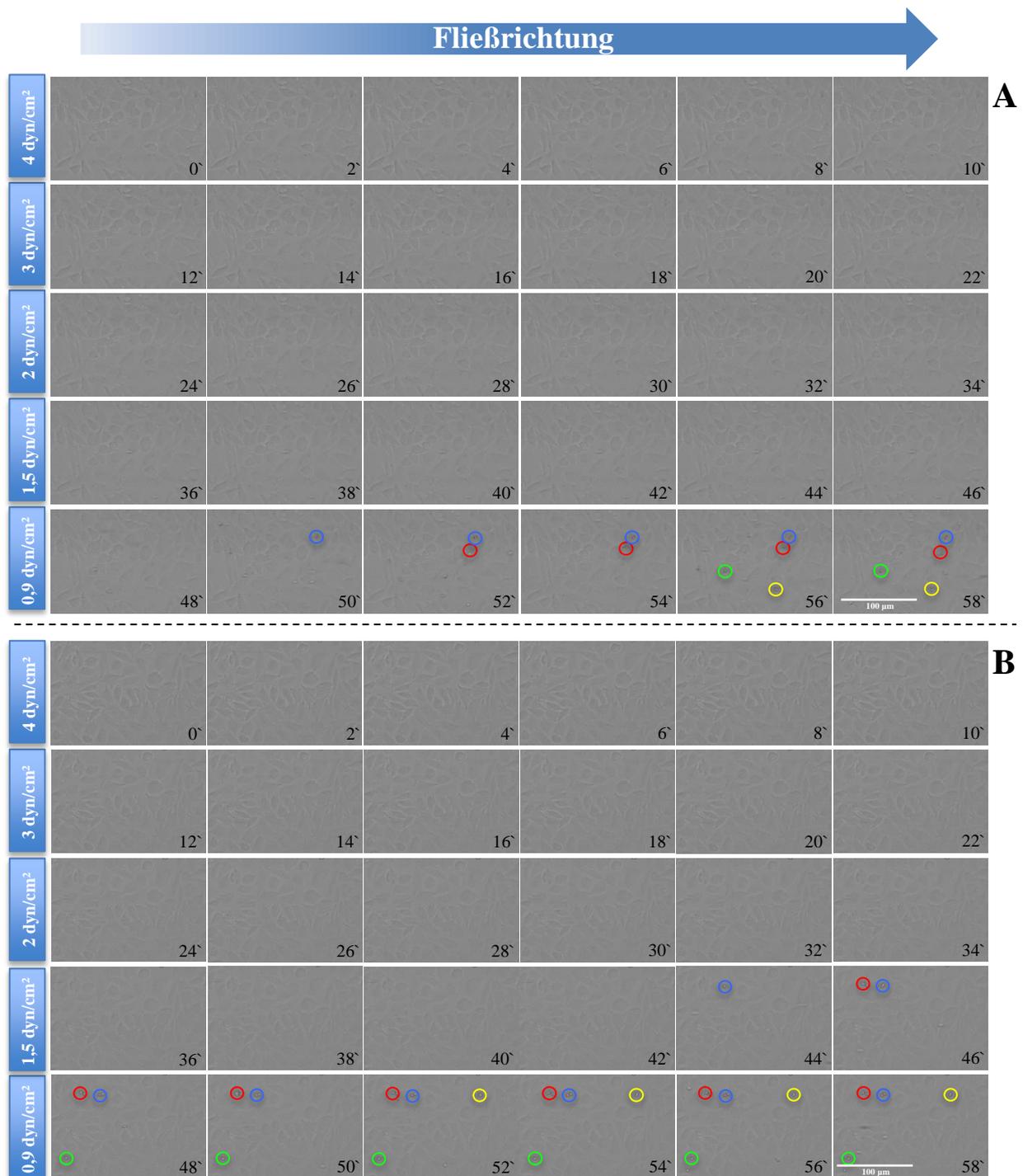


Abbildung E.III: Bindungsverhalten von CD9 angereicherten PfiE an transgene CHO-CD9 Zellen unter Flussbedingungen. Die Darstellung eines der biologischen Replikate des Experimentes zeigt das Bindungsverhalten von CD9 angereicherten IT4-PfiE (A) und 3D7-PfiE (B) an transgene CHO-Zellen, die den humanen Endothelrezeptor CD9 auf der Oberfläche tragen, unter unterschiedlichen Scherkräften. Nach der Bindung zeigten die meisten PfiE beider Stämme eine statische Bindung an die CHO-CD9 Zellen. Die farbigen Kreise zeigen einzelne PfiE. Jede Farbe markiert eine unterschiedliche Zelle. Die Zeitreihe zeigt eine Aufnahme alle zwei Minuten (0' - 58'). Längenmaßstab: 100 µm.

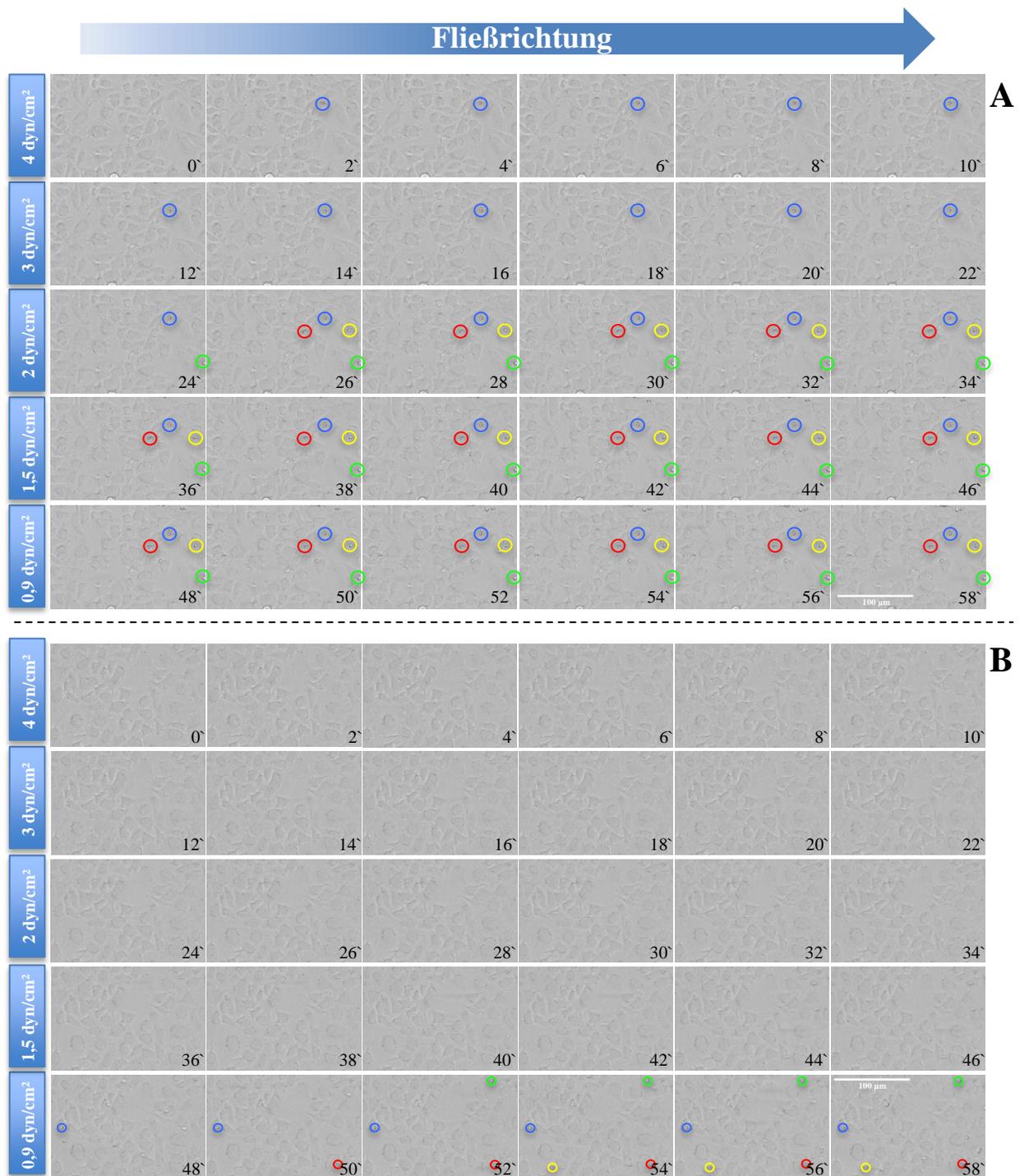


Abbildung E.IV: Bindungsverhalten von P-Selektin angereicherten *PfiE* an transgene CHO-P-Selektin Zellen unter Flussbedingungen. Die Darstellung eines der biologischen Replikate des Experimentes zeigt das Bindungsverhalten von P-Selektin angereicherten IT4-*PfiE* (A) und 3D7-*PfiE* (B) an transgene CHO-Zellen, die den humanen Endothelrezeptor P-Selektin auf der Oberfläche tragen, unter unterschiedlichen Scherkräften. Nach der Bindung zeigten die *PfiE* beider Stämme eine statische Bindung an die CHO-P-Selektin Zellen. Die statische Bindung konnte bei 100 % der gebundenen *PfiE* beider Stämme beobachtet werden. Die farbigen Kreise zeigen einzelne *PfiE*. Jede Farbe markiert eine unterschiedliche Zelle. Die Zeitreihe zeigt eine Aufnahme alle zwei Minuten (0' - 58'). Längenmaßstab: 100 µm.

F Darstellung der Videoaufnahme

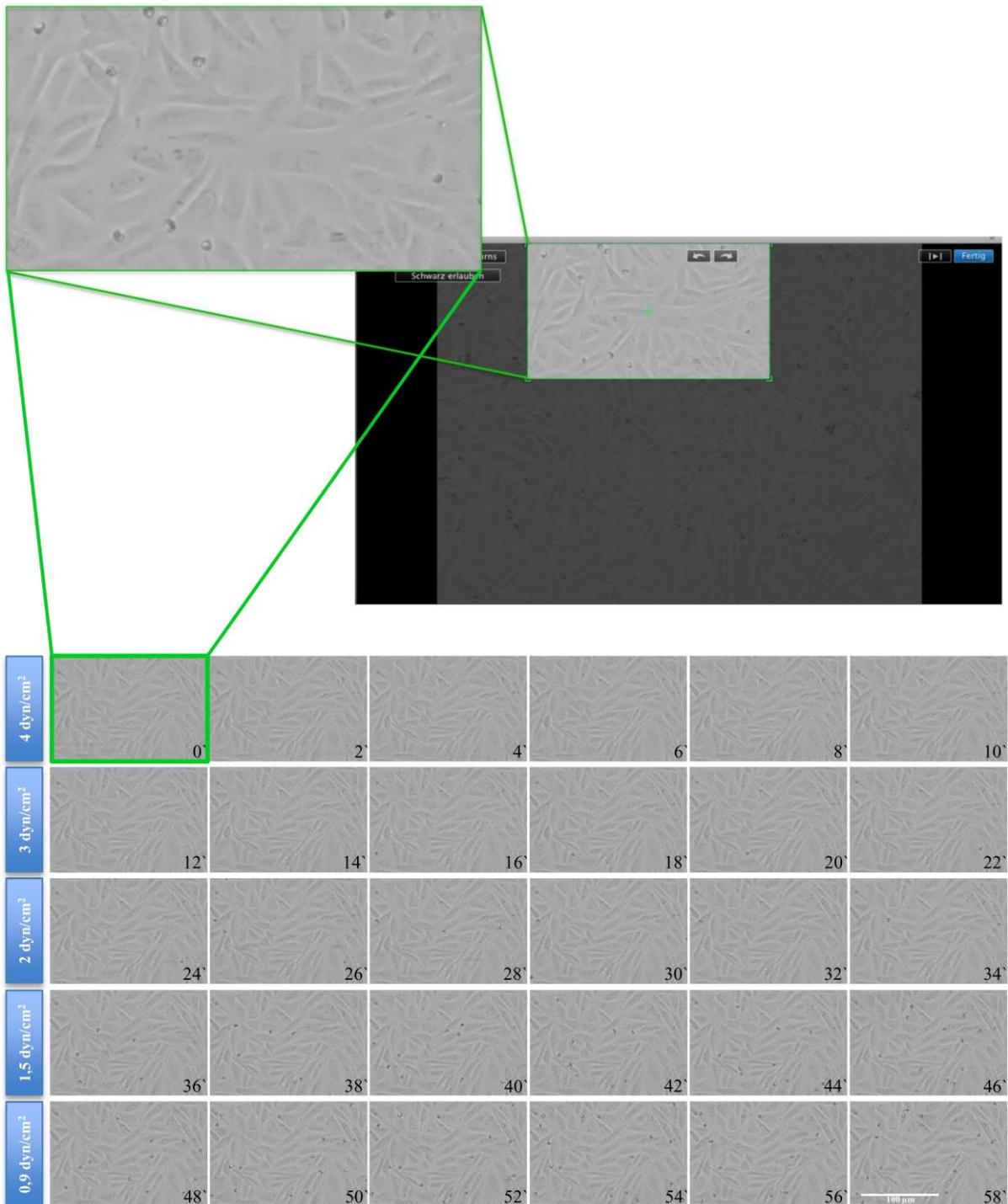


Abbildung F.I: Erläuterung der schematischen Darstellung der Ergebnisse zur Dynamik der Zytoadhäsion. Die Abbildung ist ein Beispiel und dient lediglich zur Erläuterung des Aufbaus für die Darstellung der Videoaufnahme.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Quellen – benutzt habe und die Arbeit von mir vorher nicht einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Hamburg, Januar 2017



Pedro Henrique Lubiana

Danksagung

Mein größtes Dankeschön geht an **Prof. Dr. Iris Bruchhaus**. Danke für die Unterstützung, die tolle Betreuung, für die Geduld und für die Aufmerksamkeit sowie für all das, was du mir während der letzten drei Jahre beigebracht und ermöglicht hast. Du bist eine tolle Doktormutter! ☺

Außerdem möchte ich **Prof. Dr. Egbert Tannich** für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe sowie die ständige Unterstützung danken.

Danke an **Prof. Dr. Thorsten Burmester**, der mich für dieses Projekt empfohlen und den Job des Zweitgutachters übernommen hat. Danke, dass du immer ein offenes Ohr für mich hast. In dem Zusammenhang möchte ich mich auch bei **Dr. Christian Pick** für die Unterstützung und Kooperationsarbeit bedanken.

Danke auch an meine beiden Co-Betreuer **Dr. Kathrin Schuldt** und **Dr. Tobias Spielmann** für die produktiven Gespräche und zahlreichen Tipps.

Ein Dankeschön geht auch an die gesamte AG „Spielberger“. Hier möchte ich besonders **Dr. Paolo Mesén-Ramírez** danken, der mich in die Geheimnisse des Transfektionssystems eingeweiht hat.

Ein großes Dankeschön geht auch an die gesamte **AG Molekulare Parasitologie** am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

Ganz besonders hervorheben möchte ich hier **Dr. Nahla Metwally**. Danke für die Verbreitung guter Laune (durch dich kenne ich jetzt den PHD Movie) und für die ehrliche Freundschaft und ständige Hilfsbereitschaft sowie für die Gespräche über die ganzen Pläne für das „Leben nach der Doktorarbeit“ ☺.

Danke an **Susann Ofori**, die mich sehr bei der Einarbeitung im Labor unterstützt hat und meine Kultur sorgsam gepflegt hat, wenn ich mal wieder dringend Urlaub brauchte ☺.

Ein dickes Dankeschön für die kompetente Arbeit und die Unterstützung geht an den besten Masterstudenten, den ich je betreut habe: **Marius Schmitt** ☺. Naja, du warst ja auch der einzige ☺ aber trotzdem gut gemacht!

Danke auch an **Michael Dörpinghaus** für die bitter benötigten und konstruktiven Kaffeepausen. ☺

Ich möchte auch **Dr. Stephan Lorenzen** für die große Hilfe bei den bioinformatischen Analysen danken.

Danke an **Christian Bade-Hinrichs** für die Leihgabe seines PC's als meiner mit der Arbeit überfordert war. Ohne deine Hilfe, hätte ich eine ordentliche Portion an Nerven mehr gebraucht für diese Dissertation.

In Brasilien sagt man, „Por trás de um grande homem, existe sempre uma grande mulher“, was so viel bedeutet wie jeder großartige Mann hat eine großartige Frau an seiner Seite! Ich möchte damit nicht behaupten ich sei ein großartiger Mann aber eine großartige Frau an meiner Seite habe ich auf jeden Fall ☺. Ein besonderes Dankeschön an die Frau an meiner Seite, **Lisa Hinrichs „fast Lubiana“** ☺. Danke, dass du vor allem in dieser stressigen Schreibphase nach Bachelor- und Masterarbeit immer an meiner Seite standest und versucht hast, auch wenn es nicht einfach war, mich wieder aufzubauen.

Nun möchte ich um Entschuldigung bitten, um ein paar Worte auf Portugiesisch an ganz besondere Menschen in meinem Leben zu richten, meiner Familie. Meu irmão **Caio Cesar Lubiana**, minha Mãe **Ariadenes Silva Lubiana** e meu Pai **Luis Roberto Lubiana!!!**

De todo o meu coração eu gostaria de agradecer e dedicar esse trabalho a minha Família, por que sem vocês eu nada seria. Obrigado meu irmão, pelo seu amor de irmão! Aquele que vai além dos desentendimentos que todos os irmãos tem!! Obrigado por me ensinar com seu jeito de ser que um sorriso sempre vale a pena. Pela sua alegria de viver que contagia quem está perto e me faz lembrar do nosso Pai!

Obrigado Mãe pelas tantas lições de vida, pela guerreira que voce é, por ser Mãe e Pai pra mim desde meus 12 anos de idade. Obrigado por sempre me apoiar e me encorajar em todas as minhas decisões.

Obrigado Pai!!! Obrigado Pai!!! Um cara que dispensa qualquer tipo de comentários e que faz muita falta!!! Muita!!!

Obrigado!!!